ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ
Společnost patologické a klinické fysiologie - Sekce pro atherosklerosu
Česká pediatrická společnost - Komise pro prevenci atherosklerosy v dětském a adolescentním věku

SLOVENSKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
Společnost klinické biochemie - Sekce pro atherosklerosu

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

4. INTERNÍ KLINIKA 1. LF UK

Vás vítají na symposiu s edukačním programem

A T H E R O S K L E R O S A 2 0 1 6

diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku

P r a h a 7. - 8. září 2016

Hlavní název: **ATHEROSKLEROSA 2016**

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 2016

Cena: neprodejné

ISBN 978-80-905595-3-0

Č E S T N É P Ř E D S E D N I C T V O

Prof. MUDr. Jozef Kollár, DrSc.
president Sekce pro aterosklerosu SSKB

Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.
1. LF UK Praha

P R O G R A M O V Ý V Ý B O R

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

A D R E S A S Y M P O S I A

Lékařský dům **tel.: 224 266 201-4**
Sokolská 31
120 26 Praha 2

O B S A H

Autor	Str.
Brůha	**1**
Dostálová	**2**
Dušejovská	**6**
Hertelyová	**7**
Hyánek	**8**
Kazdová	**12**
Lejsková	**17**
Macášek	**20**
Marková	**27**
Matušková	**31**
Oliyarnyk	**35**
Staňková	**41**
Škop	**49**
Tohatyova	**56, 57**
Trnovská	**58**
Zeman	**63**
Žák	**75**

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

JATERNÍ STEATÓZA (NAFLD/NASH) JAKO SOUČÁST METABOLICKÉHO SYNDROMU – JE ČAS PRO PLOŠNÝ SKRÍNING?

NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE AS A COMPONENT OF METABOLIC SYNDROME – TIME FOR SCREENING?

R. Brůha

4. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice; Karlova univerzita, 1. lékařská fakulta

Nealkoholová steatóza jater (NAFLD – **n**on-**a**lcoholic **f**atty **l**iver **d**isease), součást metabolického syndromu, je v současné době celosvětově nejčastější příčinou chronických jaterních onemocnění. Aktuální data z USA ukazují, že NAFLD je v současnosti již druhou nejčastější diagnózou vedoucí k jaterní transplantaci a předpokládá se, že v následujících 10 letech se stane indikací vůbec nejčastější.

Je známo, že NAFLD je významným nezávislým rizikovým faktorem pro vznik diabetu 2. typu (DM2) a jakmile se DM2 v terénu NAFLD objeví, je přítomnost NAFLD jasným rizikovým faktorem pro potřebu nemocniční léčby a pro úmrtí. NAFLD je také významným a nezávislým rizikovým faktorem pro vývoj kardiovaskulárních onemocnění, chronických ledvinných onemocnění a některých nádorů.

Je známo, že snížení stupně jaterní steatózy je následováno snížením rizika vzniku DM2. Logicky vyvstává otázka, zda po NAFLD cíleně pátrat u pacientů s vysokým rizikem vzniku tohoto onemocnění. V aktuálních doporučeních Evropské asociace pro studium jater (EASL) je takový skríning navržen: všichni pacienti s inzulinovou rezistencí a/nebo metabolickými riziky (obezita nebo metabolický syndrom) by měli podstoupit diagnostické vyšetření ke zjištění přítomnosti NAFLD. Jedná se o kombinaci vyšetření „jaterních testů“ a zjištění nadměrného obsahu tuku v játrech. Ideálním vyšetřením ke zjištění nadměrného množství tuku v játrech je buď sonografie nebo tzv. fatty liver index (zahrnuje váhu, výšku a obvod pasu pacienta a hodnotu γ-glutamyltransferázy - GGT a triglyceridů v séru); index lze vypočítat on-line, např. na internetové stránce: *http://www.medicalalgorithms.com/fatty-liver-index-fli-of-bedogni-et-al-for-predicting-hepatic-steatosis*; hodnota indexu > 60 znamená pozitivní nález ve smyslu steatózy. Jedinci s jaterní steatózou a/nebo abnormálními jaterními testy pak musejí být vyšetřeni z pohledu jiných možných příčin jaterní choroby, včetně důkladného zhodnocení možného vlivu alkoholu, a měli by podstoupit další vyšetření ke zjištění závažnosti jaterního onemocnění. Cílem je identifikovat pacienty s rizikem vzniku pokročilé fibrózy/cirhózy.

Platí i opačná situace – všichni pacienti s náhodně zjištěnou jaterní steatózou musí být vyšetřeni na přítomnost jednotlivých komponent metabolického syndromu. Pravděpodobně až další vývoj ukáže, zda důsledným pátráním po NAFLD při metabolickém syndromu můžeme narůstající incidenci NAFLD snížit.

Podpořeno: AZV 15-28745 A.

PALMOVÝ OLEJ Z NUTRIČNÍHO HLEDISKA

PALM OIL FROM THE NUTRTION POINT OF VIEW

J. Dostálová

Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT, Praha

Abstrakt
V přednášce bude uvedeno, co je palmový olej (původ, chemické složení aj.) a oblasti jeho použití. Chemické složení palmového oleje bude zhodnoceno z hlediska výživového. Dále budou uvedeny hlavní skupiny potravinářských výrobků u kterých je v receptuře přítomen palmový olej a důvody jeho používání.

Abstract
The lecture will indicate what is palm oil (origin, chemical composition et al.) and its field of application. The chemical composition of palm oil will be evaluated from the nutrition point of view. The main groups of food products in which formulation is present palm oil and reasons for its use will be presented as well.

V poslední době všechny typy medií často informují o palmovém oleji jako velkém nepříteli lidstva a doporučují nekupovat potravinářské výrobky obsahující palmový olej. Je pravda, že důsledkem rozšiřujícího se pěstování palmy olejné je kácení deštných pralesů a s tím související další negativní vlivy na životní prostředí, ale je opravdu používání palmového oleje v potravinářství opravdu tak nebezpečné? Pokusím se stručně odpovědět na tuto otázku, hlavně z pohledu spotřeby palmového oleje a jeho vlivu na lidské zdraví. Ekologickým otázkám se budu věnovat velice stručně.
Ještě poměrně nedávno se u nás palmový olej, stejně jako další tuky z tropických palem (např. kokosový), používal pro potravinářské účely v daleko menší míře. V současné době je obsažen ve velkém množství potravinářských výrobků, ale využívá se také pro výrobu kosmetiky, detergentů, průmyslových maziv a zejména biopaliv (cca 75 %, podle některých zdrojů dokonce 90 % z celkové produkce).

Palmový olej nebo tuk

Názvy palmový olej i méně často používaný termín palmový tuk označují stejnou surovinu. Z hlediska chemie tuků jsou tuky chemické sloučeniny glycerolu a mastných kyselin (triacylglyceroly). Kapalné jsou označované jako oleje, tuhé jako tuky (1). Palmový olej má v našich klimatických podmínkách většinou polotuhou konzistenci a z tohoto hlediska tedy závisí na teplotě okolí, zda je olejem nebo tukem, ale z hlediska chemického je vždy tukem.
Zdrojem palmového oleje je Palma olejová (častěji se užívá synonymum Palma olejná) *Elaeis guineensis* (JACQ.), která poskytuje dva druhy tuku – palmový, vyrobený z dužiny plodů, a palmojádrový, z jader plodů. Z palmového oleje se fyzikálními postupy získávají různé složky s různými vlastnostmi (např. palmolein, palmstearin). Ty se pak také používají při výrobě potravinářských výrobků, na jejichž obalu jsou v surovinovém složení uváděny pod souhrnným označením palmový olej (tuk) (2).

Složení jednotlivých skupin mastných kyselin nejběžnějších tuků je uvedeno **v tabulce 1**

Tuk nebo olej	SFA	MUFA	PUFA
Mléčný tuk	53 - 72	26 - 42	2 - 6
Sádlo	25 - 70	37 - 68	4 - 18
Hovězí tuk	47 - 86	40 - 60	1 - 5
Olej z jater tresky	14 - 25	35 - 68	20 - 45
Olej ze sledě	17 - 29	36 - 77	10 - 24
Kokosový tuk	88 - 94	5 - 9	1 - 2
Palmový tuk	44 - 56	36 - 42	9 - 13
Palmojádrový tuk	75 - 86	12 - 20	2 - 4
Kakaové máslo	58 - 65	33 - 36	2 - 4
Olivový olej	8 - 26	54 - 87	4 - 22
Sójový olej	14 - 20	18 - 26	55 - 68
Slunečnicový olej	9 - 17	13 - 41	42 - 74
Řepkový olej	5 - 10	52 - 76	22 - 40

Z hlediska složení mastných kyselin nemá palmový olej ideální složení - obsahuje zhruba polovinu nasycených mastných kyselin (SFA) a malé množství vícenenasycených mastných kyselin (PUFA). Z pohledu výživového má výrazně horší složení nejen tuk kokosový, palmojádrový, ale i mléčný a hovězí lůj (4). Vzhledem k tomu, že se v potravinářských výrobcích palmový olej používá většinou ve směsi s jinými rostlinnými tuky, např. řepkovým, slunečnicovým apod., výsledné složení tuku ve výrobku nebývá nepříznivé. Záleží také na tom, kolik výrobků obsahujících palmový olej sníme a jaké další tuky konzumujeme. V případě, že palmový olej nahradí částečně ztužené tuky, které obsahují pro zdraví nevhodné *trans*-nenasycené mastné kyseliny (TFA), je jeho použití pozitivní.

Využití a spotřeba palmového oleje

Tuky z palem se používají pro potravinářské výrobky, kde je nutné použít tuhý tuk. Jsou to zejména rostlinné roztíratelné tuky (margaríny) a pokrmové tuky, polevy na cukroví, pečivo, müsli tyčinky a mražené krémy (zmrzliny), náplně do pečiva a cukrářských výrobků, náhrady čokolády, instantní náhrady smetany do kávy, rostlinné šlehačky, hotové pokrmy. Na palmovém oleji se v průmyslové výrobě také smaží, protože je tepelně stabilní.

V roce 2015 se celosvětová spotřeba palmového oleje vyšplhala na 65 milionů tun (3), což je téměř čtyřikrát více než před dvaceti lety a stále prudce roste. V zemích původu (Malajsie, Indonésie) a v dalších asijských zemích je spotřeba palmového oleje vysoká a roste významně rychleji než v Evropě. Příspěvek evropských zemí, zejména Česka, k celkové spotřebě palmového oleje je minimální.

Protože u nás mají výrobci povinnost uvádět na obalu původ rostlinného tuku od 13. 12. 2014 (dříve uváděli v surovinovém složení pouze rostlinný olej nebo tuk), výrazně se od roku 2015 zvýšil, přesněji zviditelnil, počet výrobků které obsahují palmový olej. Nicméně konzumace palmového oleje se zvyšuje i u nás a souvisí zejména se zvýšenou konzumací některých výrobků, zejména trvanlivého a jemného pečiva, které je často bohaté právě na palmový olej.

Proč je používání palmového oleje v potravinářském průmyslu tak rozšířené? Důvodů je celá řada, mezi ty hlavní patří:

- Tuky z palem nahrazují částečně ztužené tuky, které obsahují *trans*-nenasycené mastné kyseliny, které jsou daleko rizikovější pro zdraví než nasycené mastné kyseliny obsažené v palmovém oleji. V některých zemích bylo používání částečně ztužených tuků dokonce legislativně omezeno. Z řady našich vlastních analýz a dalších dostupných testů a analýz vyplývá extrémní snížení TFA i u výrobků na českém trhu.
- I při novém způsobu výroby tuhých tuků transesterifikací (přeesterifikací), při kterém nevznikají škodlivé TFA, je nutné používání nasycených mastných kyselin. Jejich dobrým zdrojem je právě palmový olej.
- Nasycené mastné kyseliny je možné získat z rostlinných olejů také úplným ztužením, při kterém nevznikají škodlivé TFA, což je ale technologicky náročnější.
- Použít lze i jiné tuky, např. kokosový, bambucký, kakaové máslo, lůj aj., které však nejsou k dispozici v tak velkém množství nebo jsou drahé. Přitom spotřeba potravinářských výrobků, jejichž receptura se neobejde bez nasycených mastných kyselin (např. výrobky s tuhými náplněmi, polevami, mražené krémy), stoupá.
- Tuky z palem jsou relativně levné a snadno dostupné. V lednu 2016 stál 1 kg palmového oleje 14,50 Kč, zatímco řepkového 21,00 Kč (jeho cenu dále podstatně zvyšuje technologická úprava nezbytná pro výrobu tuku o požadované konzistenci). Podle jiného zdroje (5) se cena palmového oleje za posledních dvanáct měsíců pohybovala v rozmezí od 484 do 642 amerických dolarů za tunu, řepkového oleje 742 – 849 dolarů za tunu a za slunečnicový olej zaplatili výrobci ještě více, kolem 960 – 1081 dolarů za tunu.
- Další zdroje tuků, které by mohly nahradit palmový olej, např. tuky z řas, produkty na základě rostlinných vosků, celulosy aj., jsou předmětem výzkumu a jejich používání se neočekává v blízké budoucnosti.

Závěr

- Z hlediska výživového se nemusíme bát všech výrobků, kde je v receptuře obsažen palmový olej, který je použit většinou ve směsi s jinými tuky a oleji
- Rozhodující je celkový obsah tuku a celkové složení mastných kyselin (čím méně nasycených, tím lépe)
- Na obalu nejsou uvedena množství jednotlivých tuků a olejů, a proto je nutné sledovat tabulku výživových hodnot, kde je uveden obsah tuku a nasycených mastných kyselin
- Důležitá je také střídmost v konzumaci výrobků s vysokým obsahem tuku s nepříznivým složením MK
- Pokud máme zájem na ochraně životního prostředí, je vhodné vybírat výrobky s certifikací RSPO, která zahrnuje environmentální i sociální kritéria (cca 16 - 20 % světové produkce palmového oleje). RSPO (Roundtable on Sustainable Palm Oil) je organizace, která podporuje udržitelné pěstování palmy olejné.

Literatura

1. **Velíšek J, Hajšlová J.:** Chemie potravin, OSSIS, Tábor, 2009
2. **Dostálová J, Kadlec P, a kol.:** Potravinářské zbožíznalství. Ostrava, KEY Publishing 2014
3. Statistiky Ministerstva zemědělství ČR
4. **Brát J.:** Palmový olej z hlediska výživy, Výživa a potraviny 2015; 70(2): 30.
5. http://www.vitalia.cz/clanky/kolik-palmoveho-oleje-kupujeme/#ixzz4ETnQm3Uk (přístup 29. 8. 2016)

MAJÍ PACIENTI V CHRONICKÉM HEMODIALYZAČNÍM PROGRAMU JINÝ ATEROGENNÍ FENOTYP?

DO PATIENTS IN CHRONIC HEMODIALYSIS HAVE ANOTHER ATHEROGENIC PHENOTYPE?

M. Dušejovská[1,2], B. Staňková[2], M. Vecka[2], J. Rychlíková[2], L. Vávrová[2], M. Mokrejšová[3], A. Žák[2], I. Rychlík[1,3]

[1]Fresenius Medical Care, Dialysis unit, Prague, [2]4th Department of Internal Medicine 1st Faculty of Medicine Charles University in Prague and General Teaching Hospital Prague, [3]3rd Faculty of Medicine Charles University in Prague

e-mail: m.dusejovska@seznam.cz

Background
High mortality from cardiovascular diseases is observed in patients (pts) with end-stage renal disease despite no abnormalities in their basic lipid profile. The research is now focused on the lipoprotein classes and subclasses and on the possible role of small dense LDL and small HDL particles on the atherogenesis.
The aim of our study was to examine differences in individual lipoprotein classes and subclasses between chronic high volume hemodiafiltration (HD HDF) patients and healthy volunteers (CON).

Methods
60 pts on HD HDF for at least 12 months (PTS) and 60 CON were included into the study. PTS and CON groups were age-matched. Differences between PTS and CON, and also between survivals and non-survivals were established. Individual lipoprotein classes and their subclasses were analysed by Quantimetrix Lipoprint (TM) System using Lipoprint LDL and HDL subfractions Kit and Lipoware software.

Results
Significantly decreased levels of total, HDL and LDL cholesterols and increased levels of triacylglycerols in PTS compared to CON were observed. Despite the decreased levels of HDL-C in PTS, the amount of large HDL particles was higher in PTS than in CON ($p < 0.0001$), in PTS, levels of intermediate ($p = 0.03$) and small HDL ($p < 0.0001$) particles were lowered. In PTS, increased levels of VLDL-C and IDL-C were found ($p < 0.0001$). No difference in amount of small dense LDL particles between groups was observed. Different distribution of cholesterol between VLDL and LDL particles in PTS and CON was found ($\chi^2 = 11.3$; $p < 0.004$).

Conclusion
The results of our study show different, atherogenic, lipoprotein phenotype of PTS in comparison with CON. In accordance with our findings we are planning the extension of the PTS group and of observed markers.

This study was supported by project PRVOUK-P25/LF1/2 of Charles University in Prague

ZMENY V ZLOŽENÍ MASTNÝCH KYSELÍN PO SUPLEMENTÁCII RASTLINNÝMI A ŽIVOČÍŠNYMI ZDROJMI OMEGA-3 POLYNENASÝTENÝCH MASTNÝCH KYSELÍN

CHANGES IN THE FATTY ACIDS COMPOSITION DURING SUPPLEMENTATION OF PLANT AND ANIMAL SOURCES OF OMEGA - 3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

Z. Hertelyová[1], E. Tvrzická[2], B. Staňková[2]

[1] Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice
[2] Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, 4. interní klinika 1. LF UK, Praha

Omega-3 PNMK sú najhodnotnejšie zo všetkých mastných kyselín. Esenciálnou mastnou kyselinou je ALA, ktorá je rastlinného pôvodu. ALA sa konverziou mení na EPA a DHA. Táto premena je ale obmedzená aktivitou Δ-6-desaturázy, ktorá ak je vysoký príjem LA (ω-6) uprednostňuje tvorbu ďalších analógov omega-6 MK (GLA, DGLA a AA). Ďalším problémom ALA je to, že 85% ALA sa v tele vstrebáva a len 15% sa premieňa na EPA a DHA (Ullah et al., 2015). Teda oveľa prínosnejšie je prijať tieto MK živočíšneho pôvodu v potrave vo forme studenomorských rýb (losos, makrela, sleď, tuniak).
Cieľom práce bolo porovnať účinky omega-3 mastných kyselín rastlinného a živočíšneho pôvodu. Taktiež sme sledovali, ako sa mení zastúpenie jednotlivých omega-6 a omega-3 mastných kyselín aj ich pomer počas jedného týždňa.
Do experimentu boli zapojené študentky prevažne LF UPJŠ Košice. Respondentky boli rozdelené do troch skupín – kontrolná a dve experimentálne. Prvá experimentálna skupina prijímala chia semienka (15 g/deň) s vysokým obsahom ALA a druhá experimentálna skupina prijímala omega-3 PNMK vo forme rybieho oleja v kapsulách s obsahom EPA+DHA (3 cps/denne, MaxiCor 70 + 20, SVUS FARMA Hradec Králové, ČR). Z krvného séra sme izolovali MK, ktoré sme transesterifikovali 1 M roztokom metanolátu sódneho. Metylestery mastných kyselín sme analyzovali metódou GC-FID.
Z výsledkov experimentu sme zistili, že najviac účinný je príjem omega-3 živočíšneho pôvodu (MaxiCor). V tejto skupine sme zaznamenali najväčšiu zmenu v pomere omega-6 a omega-3 MK v prospech omega-3 PNMK. Taktiež došlo k výraznému nárastu EPA a DHA. V ďalšej experimentálnej skupine sme mohli pozorovať konverziu ALA na EPA a DHA.
Z našich výsledkov vyplýva, že prídavkom vyššieho obsahu omega-3 MK živočíšneho pôvodu sa uprednostňuje syntéza eikozanoidov z EPA, nie AA.

Práce byla podpořena:
Vedecký grantový systém UPJŠ v Košiciach, Lekárskej fakulty pre študentov dennej formy doktorandského štúdia - 15/GSD/2016 a 1. lékařská fakulta UK - PRVOUK-P25/LF1/2

Ullah R, Nadeem M, Khalique A, et al.: Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): review. J Food Sci Technol 2016; 53: 1-9.
Sopková D, Hertelyová Z, Andrejčáková Z, et al.: The application of probiotics and flaxseed promotes metabolism of n-3 polyunsaturated fatty acids in pigs. J Appl Anim Res 2016; No. 318: 1-6.

NECHOLESTEROLOVÉ STEROLY V GRAVIDITĚ

NONCHOLESTEROL STEROLS IN HEALTHY PREGNANT WOMEN

J. Hyánek, F. Pehal, L. Dubská, J. Miková, L. Gombíková, S. Kubů, P. Haláčková, J. Feyreizel, L. Táborský

Metabolická ambulance Nemocnice na Homolce Praha
Ústav pro matku a dítě Podolí Praha

josef.hyanek@homolka.cz

Abstract

Introduction: noncholesterol sterols (NCHS) - lathosterol (Lat),desmosterol (Des), campesterol (Cam) and sitosterol (Sit) in blood of 84 healthy pregnant women have been analyzed in order to explain the origine of increased gestational hypercholesterolemia.

Material and Methods: from 21 000 healthy pregnant women (16-46 yrs) living in Prague area and hospitalized within 2014 - 2016 - were selected with increased total cholesterol over 7,0 mmol/l - in order to study by GC/MS analysis of NCHS within I. - III. trimester of pregnancy.

The conventional lipid fractions of cholesterol - total cholesterol (TC), LDL-cholesterol (LDL), nonHDL-cholesterol, HDL-cholesterol (HDL), Triacylgylcerols (TAG), apolipo-protein A and B, Lp(a) were analyzed on automat. analyzers Beckman and Cobas. NCHS analyzed by GC/MS on Finnigan Mat 120b with int.standard epicholesterol (6).

Results: in the set of 21000 pregnant women the following medians of lipid fractions (in mmol/l) were detected as seen in Tab. 1.The incidence of gestational hypercholesterolemia (> 7.0 mmol/l) was 1:130. The average values of lipid fractions as well as NHCS in selected group of 84 pregnant women are given in Tab. 2. Correlation coefficients of single lipid fractions and NCHS are given in Tab. 3. The corrrelations have been observed in Lat with TC, LDL, nonHDLcholesterol and TAG. The correlaions of other NCHSs were not significant.

Discussion: the increase of cholesterol values (about 30%) during second half of pregnancy is well known (4,5,9). But the reason and significance of this fact remains unknown (1,3,7,8,10,11). The main increase of cholesterolemia during pregnancy appears in the LDL-Ch fraction (2). According to our findings it could be caused by increased synthesis of cholesterol de novo as demonstrate the higher values of lathosterol.

Conclusions:increased level of cholesterol during pregnancy may be caused by increased cholesterol synthesis. Increased level of cholesterol detected within pregnancy should be used for early detection of pregnant women suffering from familial hypercholesterolemias.

Úvod

V těhotenství dosahuje hladina celkového cholesterolu (CCh) zřejmě maximálních hodnot u člověka. Zvýšení u zdravých těhotných činí v průměru 30 až 40 % proti normě s maximem v 5 - 6. měs. gravidity a je považováno za všeobecně známé (4,5,9). Nejvíce se týká LDL-Ch, méně HDL-Ch nebo VLDL-Ch (2). Zvýšení se dosud považuje za neškodné nebo dokonce výhodné pro matku i plod. Zajišťuje totiž zvýšenou spotřebu cholesterolu na budování buněčných membrán plodu a nebo se spekuluje o dostatečně vysoké hladině sonického hedge-hog proteinu při zajišťování správné organogenezy (1,10). U těhotných pacientek s hetero-zygotní formou familiární hypercholesterolemií (tFH) je zvýšení procentuálně stejné jako u zdravých; prakticky ale dosahuje proto vyšších hodnot cholesterolemie a ve vybraných

případech nebo u homozygotních forem FH vyžaduje i léčebné zajištění možných kardiovaskulárních komplikací (1). Jinak léčebné snižování hladiny CCH v graviditě je považováno za nebezpečné, protože ve zvířecím experimentu byly pozorována hypotrofie plodů a u lidí zvýšená pulsace a. uterina (7,8,10,11). Solidní studie však chybí a nebo jsou velmi rozporné (3,5).

Soubor pacientů a metody

21 000 laboratorních výsledků zdravých těhotných pacientek s různou délkou gravidity bylo klin. biochemicky vyhodnoceno retrográdně při zavádění akreditačního osvědčení v UPMD v letech 2014 - 2016. Medián zvýšených hodnot u tohoto souboru byl nalezen CCh 6,8 mmol/l s jednou extrémní hodnotou 19 mmol/l. Incidence nálezů CCH >7,0 mmol/l činila 1:130. Medián pro LDL-Ch činil 4,6 mmol/l; medián pro HDL-Ch 2,2mmol/l a medián TAG 4,2 mmol/l. Z tohoto souboru bylo náhodně vybráno 84 pacientek s CCh > 7,0 mmol k podrobné analýze necholesterolových sterolů (NCHS) tj. lathosterolu (Lat) a desmosterolu (Des) jako markerů syntézy cholesterolu a sitosterolu (Sit) a kampesterolu (Cam) jako markerů absorbce fytosterolů.

Klasické lipoproteinové frakce cholesterolu byly stanoveny na autom. analyzátoru Beckman Coulter a Cobas a NCHS metodou GC/MS na Finnigan Mat 120b, jako int. standard epicholestero (6). Etická komise NNH doporučila studii se souhlasem jednotlivých pacientek.

Výsledky

Mediány lipidových frakcí základního souboru jsou uvedeny v tab. 1. Průměrné hodnoty lipidových frakcí a necholesterolových sterolů ve vybraném souboru 84 těhotných se zvýšenou cholesterolemií v tab. 2. Korelační koeficienty lipidových frakcí a necholesterolových sterolů jsou v tab. 3. Byla nalezena korelace mezi Lat a CCh, LDL-Ch a nonHDL-Ch ($r = 0,53$; 0,36; a 0,36) ($p < 0,01$); korelace pro Des ($r = 0,352$). Kompensatorní změny fytosterolů na endogenní zvýšenou syntézu cholesterolu jsme nepozorovali (Sit $r = 0,162$ a Cam $r = 0,153$). Hodnoty HDL nekorelovaly s NCHS vůbec. Pro korelaci TAG s Lat ($r = 0,52$), nemáme vhodné vysvětlení.

Diskuse

Zvýšení cholesterolu v graviditě se odehrává převážně v jeho LDL-Ch nebo nonHDL-Ch frakci a je podle našich nálezů způsobeno zvýšenou endogenní syntézou, jak tomu odpovídá nalezená zvýšená hodnota Lat (2). Dal by se očekávat kompensační mechanismus zvýšeného vstřebání fytosterolů, ale hodnoty hlavních fytosterolů Sit a Cam nebyly u našeho souboru těhotných zvýšeny. Studie vyžaduje další sledování NCHS a jejich dynamiky v závislosti na délce těhotenství. Náš soubor pacientek je dosud malý, žádné ověřující literární údaje o metabolismu NCHS v graviditě jsme zatím nenalezli.

Závěry

V souvislosti se zvyšováním hladiny CCh a jeho LDL-Ch frakce v graviditě dochází ke zvýšení endogenní syntézy cholesterolu (Lat), snad pro zajištění vyšší nabídky cholesterolu pro správnou organogenezu plodu. Manifestace familiární hypercholesterolemie v těhotenství zvýšenými hodnota CCh a LDL-Ch se nabízí jako dosud nevyužitý výhodný metabolický marker pro těhotenský screening FH s následnou možnou léčbou a prevencí po skončení gravidity a laktace.

Tabulka 1. Mediány klasických lipidových frakcí (v mmol/l) u souboru zdravých těhotných z ÚPMD z let 2014 - 2016, n = 21 000

	Medián
Celkový cholesterol……...…	6,8
LDL-cholesterol……	4,6
HDL-cholesterol……	2,2
Triacylglyceroly……	4,2

Tabulka 2. Průměrné hodnoty klasických lipidových frakcí (v mmol/l) a necholesterolových sterolů (v umol/l) u souboru vybraných zdravých těhotných pacientek s hypercholesterolemií (n = 84).

	Aritm. prům.	**Sigma**
Celk. cholesterol	7,2	1,2
LDL-cholesterol	4,1	1,7
nonHDL-cholesterol	4,5	1,3
HDL-cholesterol	1,8	0,3
Triacylglyceroly	2,5	1,0
Latosterol	7,8	1,7
Desmosterol	4,7	0,9
Sitosterol	9,6	3,8
Campesterol	9,8	2,6
Lanosterol	0,3	0,1

Tabulka 3. Korelační koeficienty mezi klasickými lipidovými frakcemi a necholesterolovými steroly u souboru 84 náhodně vybraných zdravých pacientek s těhotenskou hypercholesterolemií > 7,0 mmol/l

	Latosterol	**Desmosterol**	**Sitosterol**	**Campesterol**	**Lanosterol**
Celk. cholesterol	0,53	0,35	0,26	0,02	0,41
LDL-cholesterol	0,36	0,4	0,36	0,02	0,35
nonHDL-cholesterol	0,35	0,12	0,29	0,01	0,32
HDL-cholesterol	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
Triacylglyceroly	0,52	0,21	0,01	0,01	0,01

Literatura

1. **Avis HJ, Hutten BA, Twickler MT, et al.:** Pregnancy in women suffering from familial hypercholesterolemia:a harmful period for both mother and newborn? Curr Opinion Lipid 2009; 20: 484-490.
2. **Amundsen AL, Khoury J, Iversen PO, et al.:** Marked changes in plasma lipids and lipoproteins during pregnancy in women with familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis 2006; 189: 451-457.
3. **Edison RJ, Berg K, Remaley A.:** Adverse birth outcome among mothers with low serum cholesterol. Pediatrics 2007; 120: 523-733.
4. **Glueck CJ, Christopher C, Tsang R, Mellies MJ.:** Cholesterol-free diet and the physiologic hyperlipidemia of pregnancy in familial hypercholesterolemia. Metabolism 1980; 29: 949-955.
5. **Herrera E, Amusquivar E, López-Soldado I, Ortega H.:** Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. Horm Res 2006; 65: 59-64.
6. **Hyánek J, Pehal F, Dubská L, et al.:** Lathosterol and nonchlesterol sterols in routine use for the differentiation and monitoring of dietary and drug induced treatment of chypercholesterolemias in children and adolescents. J Nutr Therap 2014; 3: 1-12.
7. **Khoury J, Henriksen T, Chritophersen B, Tonstad S.:** Effect of a cholesterol-lowering diet on maternal cord, and neonatal lipids,and pregnancy outcome:A randomized clinical trial. Amer J Obstet Gynecol 2005; 193: 1292-1301.
8. **Khoury J, Amundsen AL, Tonstad S, et al.:** Evidence for impaired physiological decrease in the uteroplacental vascular resistance in pregnant women with familial hypercholesterolemia. Acta Obstet Gynecol 2009; 88: 222-226.
9. **Napoli C, Glass CK, Witzum JL, et al.:** Influence of maternal hypercholesterolemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood. Fate of early lesions in children (FELIC) study. Lancet 1999; 354: 1234-1241.
10. **Palinski W, D´Armiento FP, Witzum JL, et al.:** Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. Circ Res 2001; 89: 991-996.
11. **Woollett LA.:** Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. Am J Clin Nutr 2005; 82: 1155-1161.

VLIV MLÉČNÝCH PROTEINŮ A TUKŮ NA PORUCHY ASOCIOVANÉ S METABOLICKÝM SYNDROMEM A DIABETEM 2. TYPU.

EFFECT OF DAIRY PROTEIN AND FAT ON THE METABOLIC DISORDERS ASSOCIATED WITH METABOLIC SYNDROME AND TYPE 2 DIABETES

Kazdová L.

Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

V posledních letech je věnována značná pozornost účinku mléčných proteinů a tuků na metabolické poruchy spojené s metabolickým syndromem a diabetem 2. typu. Zájem je stimulován výsledky některých observačních a intervenčních studií o příznivém vlivu mléčných produktů na tyto poruchy. Rovněž meta-analýzy publikované v posledních letech ukázaly inverzní asociaci mezi konzumací mléčných produktů a rizikem metabolického syndromu (Crichton et al. 2011) a diabetem 2. typu (Aune et al. 2013). Je zajímavé, že i malé zvýšení příjmu mléčných produktů ze 2-3 porcí denně na 4-5 snížilo riziko rozvoje diabetu 2. typu. Rovněž zvýšená konzumace sýrů nezvýšila tělesnou hmotnost a navíc měla příznivé účinky na poruchy spojené s metabolickým syndromem (Katergis et al. 2013). Hlavním mléčným produktem je mléko, které obsahuje 87 % vody, 3,5 % bílkovin, 3,4-4 % tuku (70 % saturovaných mastných kyselin) a 4,9 % laktózy. Která z těchto složek a jakým mechanismem se podílí na příznivých účincích mléčných produktů není dosud zcela objasněno.

Mléčné proteiny

Mléčné proteiny obsahují dvě hlavní proteinové frakce – kasein (2,8 %) a syrovátkové proteiny (SP; 0,7 %). Jejich metabolické účinky jsou rozdílné mj. v důsledku jejich odlišné fyziologie trávení a rozdílného zastoupení aminokyselin.

Hlavními komponenty kaseinu jsou čtyři fosfoproteiny (α_{s1}-, α_{s2}-, β- and κ-kaseiny) uspořádány v kaseinových micelách, které v kyselém prostředí v žaludku koagulují a následně jsou hydrolyzovány. Vstřebávání štěpných produktů (peptidů a aminokyselin) probíhá až v tenkém střevě a tím dochází ke zpomalenému postprandiálnímu zvýšení plasmatických hladin aminokyselin. Naproti tomu SP jsou štěpeny přímo v žaludku na peptidy a aminokyseliny, což urychluje jejich vstřebáváni do krevního oběhu a vede k vyšším hladinám aminokyselin v cirkulaci v porovnání s kaseiny (Hall et al. 2003). Kaseiny a SP se liší i v obsahu aminokyselin, přičemž SP mají vyšší zastoupení alaninu, threoninu a větvených aminokyselin: leucinu, isoleucinu, valinu.

Metabolické účinky kaseinu

V porovnání se SP je velice málo údajů o vlivu kaseinu na metabolismus glukózy. Bylo zjištěno, že podávání 35 g kaseinu/den po dobu 12 týdnů zvyšuje u osob s nadváhou koncentraci C-peptidu (Areberg et al. 2012) a že akutní podání kaseinu má slabý insulinotropní účinky zprostředkované glukózo-depenentním izulinotropním polypeptidem (GIP). Zajímavé supresivní účinky má kasein na postprandiální hladiny triacylglycerolů (TAG) a na obsah TAG v chylomikrech po konzumaci diety s vysokým podílem tuků (Brader et al. 2010). Tyto účinky se mohou podílet na snížení lipotoxicity ve tkáních.

Metabolické účinky syrovátkových proteinů (SP)

SP, které jsou vedlejším produktem při výrobě sýrů, jsou heterogenní skupinou proteinů, kde největší podíl má β-laktoglobulin, α-laktalbumin a glykomakropeptidy. Podle současných poznatků mají SP široké spektrum biologických aktivit, které mohou příznivě ovlivňovat řadu metabolických poruch. Komerční preparáty jsou a) syrovátkové koncentráty s obsahem 30 - 85 % proteinů obsahující i laktózu; b) izoláty syrovátkových proteinů s obsahem proteinů > 90 % bez přítomnosti laktózy; c) SP ve formě hydrolyzátu získaných enzymovou hydrolýzou nebo bakteriální fermentací.

Vliv SP na metabolismus glukózy

K akutním účinkům SP na glukózový metabolismus patří snížení postprandiální glykémie zjištěné u zdravých osob a u pacientů s diabetem 2. typu. V mechanismu účinku SP na zlepšení glukózové homeostázy se podílí zvýšená sekrece inzulinu (Akhavan et al. 2014). Svědčí pro to výsledky studií, v nichž byl sledován chronický vliv suplementace SP na glykémii a sekreci inzulinu. Konzumace SP v dávce 55 g /den u obézních osob zvýšila sekreci inzulinu a inzulinovou resistenci (Pal et al. 2010). Inzulinová sekrece může být stimulována přímým účinkem aminokyselin, zejména větvených esenciálních aminokyselin – isoleucinu, leucinu a valinu a dále lysinu a threoninu na β-buňky pankreatu (Patersen et al. 2009). Větvené aminokyseliny nejsou primárně metabolizovány v játrech, která mají nízkou aktivitu enzymů štěpících větvené aminokyseliny (aminotransferáz a α-ketodehydrogenáz) a jsou cirkulací transportovány do svalů, kde jsou metabolizovány. Větvené aminokyseliny, zejména leucin, aktivují rapamycinovou (mTOR) signální dráhu, a syntézu proteinů vedoucí ke zvýšené sekreci inzulinu a GIP (Jakubowicz and Froy 2013). Dalším mechanismem, který může hrát roli v insulinotropním efektu SP je aktivace inkretinového systému. Podle současných názorů aminokyseliny, dieptidy a tripeptidy vzniklé při tráven mléčných proteinů v tenkém střevě mohou stimulovat v endokrinních buňkách tenkého střeva sekreci inkretinových hormonů. Svědčí proto korelace mezi hladinami esenciálních aminokyselin a inkretinových hormonů (Salehi et l. 2012). Zvýšení GLP-1 je vysvětlováno vlivem dipeptidů a tripeptidů vzniklých při trávení SP v tenkém střevě, které mohou inhibovat enzym dipeptidylpeptidázy IV (DPP-4), což zabraňuje degradaci GIP a tím prodlužuje jeho inzulinotropní aktivitu (Olivos et al. 2014).

Vliv SP na lipidový metabolismus

Vliv SP na parametry lipidového metabolismu byl studován v četných krátkodobých i chronických pokusech. V akutních pokusech SP podávané ve formě izolátů (obsah proteinů vyšší než 90 %) snižovaly v porovnání s kaseinem nebo glutenovými proteinem hladiny postprandiálních TAG u obézních osob (Holmer-Jensen et al. 2013) a pacientů s diabetem 2. typu (Mortensen et al. 2009). Chronická intervence s izoláty SP (54g/den) u osob s nadváhou nebo u obézních osob vedla po 6 týdnech ke snížení TAG měřených v lačném stavu o 22 % a toto snížení bylo patrné i po dalších 6 týdnech podávání SP (Pal et al. 2010). Rovněž v letošním roce publikovaná meta-analýza 13 randomizovaných studií ukázala že suplementace SP v dávkách 0,7 – 90g/den po dobu 4 – 48 týdnů snížila v porovnání s kaseinem cirkulující hladiny TAG o 0,11 mmol/l, (95 % CI: -0,21, 0; p = 0,05), zatímco neovlivnila hladiny celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu ani LDL-cholesterolu. Naproti tomu hypotriglyceridemický účinek nebyl prokázán u osob s nízkým BMI nebo po podávání SP v dávkách nižších než 30 - 35 g/den (Zhang et al. 2016).

Mechanismy, kterými SP vedou ke snížení plasmatických hladin TAG nejsou objasněny. Přispívá k tomu i skutečnost, že hladiny TAG jsou ovlivněny řadou faktorů jako je příjem a složení potravy, metabolismem TAG v játrech, ve střevě a jejich mobilizace z tukové tkáně a využití pro oxidaci a ukládání ve tkáních. Do jaké míry jsou tyto jednotlivé metabolické

pochody ovlivněny SP není známo. Hypotriglyceridemický vliv SP může souviset s obsahem funkčních komponent v SP. Podle jedné hypotézy, vysoký obsah β-laktoglobulinu, který tvoří až 45 % bílkovin v SP a který patří k lipokalinům může vychytávat hydrofobní molekuly, a tak snižovat absorpci lipidů ve střevě. Rovněž sfingolipidy přítomné v izolátech SP mohou snižovat absorpci lipidů. Svědčí pro to výsledky studie provedené u APOE*3Leidenských myší krmených dietou typickou pro západní vyspělé země, u kterých suplementace se sfingolipiy po dobu 9 týdnů snižovala absorpci cholesterolu a plazmamitcké hladiny volných mastných kyselin a TAG o 58 % (Duivenvoorden et al. 2006). Rovněž vysoký obsah větvených aminokyselin přítomných v SP může ovlivnit lipidový metabolismus. V *in vitro* studiích leucin, izoleucin valin snížovaly expresi genů zapojených do transportu a syntézy lipidů (Chen and Reimer 2009). Lysin je zapojený do metabolismu mastných kyselin s dlouhým řetězcem, které jsou esenciální pro syntézu karnitinu. Jeho deficience snižuje hladiny karnitinu a vede k akumulaci TAG ve tkáních, naopak suplementace diety lysinem akumulaci TAG ve tkáních snížila (Hlais et al. 2012).

Vliv mléčných lipidů

V lipidové frakci mléka jsou zastoupeny saturované mastné kyselin (SFA, 70 %), mononenasycené mastné kyseliny (25 %) a polynenasycené mastné kyseliny (2,3 %). Saturované mastné kyseliny jsou složeny z: kyseliny palmitové 30 %, stearové 11 %, myristové 10 % a 13 % mastných kyselin s krátkou a střední délkou (MC-SFA) řetězce C4:0 – C12:0 a 3 % trans mastných kyselin. Zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku může být ovlivněno krmením, přičemž nízký obsah tuku v krmivu (při pastvě) stimuluje syntézu mastných kyselin *de novo* a tím i podíl MC-SFA. Mléčný tuk dále obsahuje 0,5 % mastných kyselin s rozvětveným řetězcem C15:0 (pentadekanoic acid) a C17:0 (margaric acid), jejichž příjem se v USA odhaduje přibližně na 220mg/den. Mléčný tuk nebyl pro vysoký obsah SFA doporučován ve zdravé výživě. Nicméně recentní meta-analýzy neprokázaly negativní vliv mléčných SFA na riziko kardiovaskulárních poruch (Chowhury et al. 2014, Bohl et al. 2015). Biologické účinky mastných kyselin se střední délkou řetězce jsou v porovnání s mastnými kyselinami s dlouhou délkou řetězce (> C14; LC-SFA) odlišné: a) gastrointestinální hydrolýza a absorpce MC-SFA je rychlejší. b) většina těchto mastných kyselin je po absorpci ze střeva transportována přímo do jater, zatímco LC-SFA jsou inkorporovány do chylomiker spolu s apolipoproteinem apoB-48. Po hydrolýze triacylglycerolů vznikají chylomikronové remnanty, které mohou pronikat cévní stěnou, akumulovat se v subendoteliálním prostoru a podílet se na tvorbě aterosklerotických lézí. c) v některých studiích byl prokázán příznivý vliv MC-SFA na redukci tělesné hmotnosti a na poruchy lipidové a glukózové homeostázy (Marten et al. 2006).

V recentní klinické studii, ve které byl testován vliv dietní suplementace s MC-SFA a SP po dobu 12 týdnů u osob s abdominální obezitou, bylo zjištěno, že v porovnání s kaseinem SP snižovaly postprandiální hladiny apoB-48 a tím redukovaly i riziko aterogeneze (Bohl et al. 2015).

Mléčný tuk obsahuje i trans mastné kyseliny, z nichž největší zájem je věnován konjugované kyselině linolové (CLA). Její isomer cis-9, trans-11 18:2 (rumenic acid), tvořený v zažívacím traktu přežvýkavců, má výrazné antiobezitní, antiaterogenní, protizánětlivé účinky, redukuje ektopickou akumulaci TAG a snižuje inzulinovou rezistenci (Malínská et al. 2015).

Závěr

Z dosavadních výsledků klinických i experimentálních studií vyplývá, že mléčné proteiny mohou příznivě ovlivnit poruchy asociované s metabolickým syndromem a diabetem 2. typu. SP a v menší míře i kaseiny stimulují sekreci inzulinu, mají inhibiční vliv na DPP-4 a tím mohou zlepšit poruchy metabolismus glukózy a snižují postprandiální hladiny TAG. V žádné dosud provedené studii nebyly po suplementaci diety mléčnými produkty zjištěny negativní účinky na metabolické poruchy spojené s metabolickým syndromem a diabetem 2 typu.

Studie byla podpořena projektem MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001“).

Literatura

Akhavan T, Luhovyy BL, Panahi S, et al.: Mechanisms of action of premeal consumption of whey protein on glycemic control in young adults. J Nutr Biochem 2014; 25: 36-41.

Arnberg K, Mølgaard C, Michaelsen KF, et al.: Skim milk, whey, and casein increase body weight and whey and casein increase the plasma C-peptide concentration in overweight adolescents. J Nutr 2012; 142: 2083-2090.

Aune D, Norat T, Romundstad P, Vatten LJ.: Dairy products and the risk of type 2 diabetes: systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. Am J Clin Nutr 2013; 98: 1066-1083.

Bohl M, Bjørnshave A, Rasmussen KV, et al.: Dairy proteins, airy lipids, and postprandial lipemia in persons with abdominal obesity (Dairyl-Health): a 12-wk, randomized, parallel-controlled, double-blinded, diet intervention study. Am J Clin Nutr 2015; 101: 870-878.

Brader L, Holm I, Mortensen L, et al.: Acute effects of casein on postprandial lipemia and incretin responses in type 2 diabetic subjects. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2010; 20: 101-109.

Chen Q, Reimer RA.: Dairy protein and leucine alter GLP-1 release and mRNA of genes involved in intestinal lipid metabolism in vitro. Nutrition 2009; 25: 340-349.

Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S, et al.: Association of dietary, circulating and supplement fatty acids with coronary risk. A systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med 2014; 160: 398-406.

Crichton GE, Bryan J, Buckle J, Murphy KJ.: Dairy consumption and metabolic syndrome: a systematic review of findings and methodological issues. Obes Rev 2011; 12: e190-e201.

Duivenvoorden I, Voshol PJ, Rensen PC, et al.: Dietaey sphingolipids lower plasma cholesterol and triacylglycerol and prevent liver steatosis in APOE*3Leiden mice. Am J Clin Nutr 2006; 84: 312-321.

Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM.: Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. Br J Nutr 2003; 89: 239-248.

Hlais S, Reslan DR, Sarieddine HK, et al.: Effect of lysine, vitamin B(6) and carnitine supplementation on the lipid profile of male patients with hypertriglyceridemia: a 12-week open-label, randomized, placebo-controlled trial. Clin Ther 2012; 34: 1674-1682.

Holmer-Jensen J, Mortenser LS, Astrup A, et al.: Acute differential effects of dietary protein quality on postprandial lipemia in obese non-diabetic subjects. Nutr Res 2013; 33: 34-40.

Jakubowitcz D, Froy O.: Biochemical nd metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and type 2 diabetes. J Nutr Biochem 2013; 24: 1-5.

Kalergis M, Leung Yinko SS, Nedelcu R.: Dairy products and prevention of type 2 diabetes: complications for research and practice. Front Endocrinol (Lausanne) 2013; 4: 90.

Malínská H, Hüttl M, Oliyarnyk O, et al.: Conjugated linoleic acid reduces visceral and ectopic lipid accumulation and insulin resistance in chronic severe hypertriacylglycerolemia. Nutrition 2015; 31: 1045-1051.
Marten B, Pfeuffer M, Schrezenmeir J.: Medium-chain triglycerides. Int Dairy J 2006; 16: 1374-1382.
Mortensen LS, Hartvigsen ML, Brader LJ, et al.: Differential effects of protein quality on postprandial lipemia in response to a fat rich meal in type 2 diabetes: comparison of whey, casein, gluten, and cod protein. Am J Nutr 2009; 90: 41-48.
Olivos DR, McGrath LE, Turner CA, et al.: Intraduodenal milk protein concentrate augments the glycemic and food intake suppressive effects of DPP-IV inhibition. Am J Physio Regul Integr Comp Physiol 2014; 306: R157-R163.
Pal S, Ellis V, Dhaliwal S.: Effects of whey protein isolate on body composition, lipids, insulin and glucose in overweight and obese individuals. Br J Nutr 2010; 104: 716-723.
Petersen BL, Ward LS, Bastian ED, et al.: A whey protein supplement decreases post-prandial glycemia. Nutr J 2009; 8: 47.
Salehi A, Gunnerud U, Muhammed SJ, et al.: The insulinogenic effect of whey protein is partially mediated by a direct effect of amino acid and GIP on β-cells. Nutr Metab (Lond) 2012; 9: 48.
Zhang JW, Tong X, Wan Z, et al.: Effect of whey protein on blood lipid profiles: a meta-analysis of randomized controlled trials. Eur J Clin Nutr 2016; 70: 879-885.

NOVÉ POHLEDY NA PATOGENEZI A LÉČBU DIABETU; GLIFLOZINY - NEJEN PŘEKVAPIVĚ VYSOKÝ PŘÍNOS, ALE I RIZIKA

NEW VIEWS ON THE PATHOGENESIS AND TREATMENT OF DIABETES; GLIFLOZINS – NOT ONLY SURPRISINGLY HIGH BENEFIT, BUT ALSO RISKS

M. Lejsková

IPVZ Praha, TN Praha

Epidemicky stoupající prevalence diabetu během posledních desetiletí zprvu v rozvinutých zemích, nyní i v dalších oblastech, které přecházejí na tzv. „western lifestyle“, je doprovázena intenzivním výzkumem patogeneze a hledáním možností prevence a léčby diabetu. Klinická praxe ukazuje, že odlišení typů diabetu podle předpokládané etiologie často nebývá jednoznačné[1] a tato skutečnost byla nyní přejata i do doporučení ADA[2]. Diabetes 2.typu je tak diagnostikován *per exclusionem* a představuje nejčetnější a značně heterogenní skupinu pacientů, u nichž je typicky přítomna nadváha/obezita s inzulinovou rezistencí (IR) a refrakterní hyperglykemií především v důsledku nevhodného životního stylu s pozitivní energetickou bilancí a neúspěšností pokusů o změnu.

Je známo, že přítomnost diabetu je asociována se zdvojnásobením rizika KV (kardiovaskulárního) úmrtí a přítomnost diabetu 2.typu při anamnéze IM je asociována se čtyřnásobným KV rizikem ve srovnání s pouze diabetem 2.typu nebo pouze anamnézou IM[3]. Výsledky farmakoterapeutických studií u diabetiků 2.typu během posledních dvou desetiletí potvrdily sice prospěšnost těsné kompenzace diabetu pro snížení rizika diabetických komplikací z glykace (tzv. mikrovaskulárních komplikací), ale současně byl nalezen určitý potenciál nepříznivých vlivů na kardiovaskulární systém (ACCORD[4], ADVANCE[5], VADT[6]). Prvním překvapením v tomto směru bylo zvýšené riziko srdečního selhání při léčbě inzulin-senzitizujícími agonisty nukleárních PPAR gamma/(alfa) receptorů (glitazary, glitazony /thiazolidindiony)[7,8]. Zcela jiný mechanizmus účinku na IR má metformin, který má důkazy kardiovaskulární prospěšnosti již ze studie UKPDS[9], a který je i nadále lékem 1. volby u diabetu 2.typu. Působí především jako nepřímý aktivátor AMPK, jehož komplexní inzulinsenzitizujcí účinek je stále intenzivně zkoumán: v posledních letech bylo např. prokázáno, že inhibuje mitochondriální komplex I a ovlivňuje střevní mikrobiom[10]. Nové pohledy na roli IR v buněčném metabolizmu dokazují, že především u nejrizikovější skupiny diabetiků 2.typu je IR obranných mechanizmem, který chrání inzulinsenzitivní buňky (včetně myokardu) před poškozením z přetížení nutriety[11,12,13].

Po kardiovaskulárním neúspěchu glitazonů byly očekávány příznivé výstupy v léčbě diabetu 2.typu od tzv. inkretinové léčby, založené na účinku endogenního enterohormonu/inkretinu GLP-1. Doplněné studie s kardiovaskulárním rizikem zprvu očekávání nesplnily: saxagliptin ze skupiny gliptinů, zesilujících účinek endogenního inkretinu GLP-1 inhibicí dipeptidylpeptidázy 4: zvýšil riziko srdečního selhání v porovnání s placebem (SAVOR-TIMI 53)[14]. Hraniční riziko přinesl alogliptin, a proto nedůvěra k tzv. inkretinové léčbě diabetu rostla, i když ostatní kardiovaskulární výstupy zmíněných gliptinů byly noninferiorní. Výsledky sitagliptinu byly plně noninferiorní i pro srdeční selhání (TECOS). Podobně i výsledky lixisenatidu, agonisty receptorů GLP-1 - kardiovaskulárně noninferiorní včetně srdečního selhání (ELIXA)[15]. Teprve **liraglutid** ze stejné skupiny, jehož výsledky byly publikovány před dvěma měsíci (LEADER)[16], měl v porovnání s placebem superioritu ve

snížení KV rizika (úmrtí z KV příčin, nefatální IM, nefatální iktus) a navíc i noninferioritu s trendem ke snížení pro riziko srdečního selhání.

S rozpaky byla diabetology vnímána skupina inhibitorů SGLT2 receptorů (iSGLT2), které inhibicí zpětného vstřebávání glukózy v primárních tubulech ledvin vyvolávají glykosurii s mírným diuretickým účinkem a s negativní energetickou bilancí. Obavy z minerálního rozvratu se nepotvrdily. Zatímco pro první užívané léky jsou zatím k dispozici jen příznivé metaanalýzy, ale cílené kardiovaskulární studie se zařazením vysoce kardiovaskulárně rizikových pacientů dosud probíhají (canagliflozin/CANVAS, dapagliflozin/DECLARE-TIMI-58), byla první kardiovaskulární studie ukončena a publikována pro novější **empagliflozin** (EMPA-REG OUTCOME)[17] a svými jednoznačně příznivými výsledky u vysoce kardiovaskulárně rizikových diabetiků (snížení rizika KV úmrtí, celkové mortality a hospitalizace pro srdeční selhání) vyvolala značnou diskusi o mechanizmech, kterými gliflozinyna metabolizmus působí[18].

Výsledky jsou o to pozoruhodnější, že příznýtrend efektu empagliflozinu byl patrný časně, již několik týdnů po randomizaci, což naznačuje, že nejde (jen) o antiaterogenní efekt(y). Ke známým účinkům gliflozinů, kromě výše zmíněných, patří snížení krevního tlaku, k němuž dochází již během prvních týdnů, a vede ke snížení afterloadu; ke snížení preloadu může přispívat mírná hemokoncentrace. Kromě příznivých kardiovaskulárních účinků mají gliflozinyi příznivé účinky renální (zpomalují růst mikroalbuminurie i hladiny kreatininu) – zpomalují rozvoj nefropatie. Gliflozinyy (iSGLT2) tedy zřejmě působí příznivě na metabolizmus dvou klíčových orgánů – myokardu a ledvin. Kromě efektu snížení krevního tlaku je nejčastěji diskutovanou okolností mírná perzistující ketonemie (při zvýšené ketogenezi v hepatocytech, která je při léčbě glitazony pozorována), a která zvyšuje dostupnost beta-hydroxybutyrátu. Tento substrát pak umožní produkci většího množství ATP v podmínkách mírné hypoxie a může tak znamenat pro myokard a ledviny významnou metabolickou výhodu[19]. Za určitých okolností však ketogeneze může vést i k velice vzácné, ale obávané a potenciálně infaustní komplikaci – euglykemické diabetické ketoacidóze - tj. k rozvoji ketoacidózy u diabetika léčeného iSGLT2, která je provázena pouze mírnou hyperglykemií. Nejběžněji uváděnými riziky pro její vznik je indikace iSGLT2 u diabetika s nízkou vlastní sekrecí inzulinu (diabetes 1.typu, pankreatopatie), v kombinaci s ketogenními metabolickými vlivy jako je nízkosacharidová dieta a alkohol[20].

Závěr

Výsledky studií kardiovaskulárního rizika u diabetiků z posledních let znamenají určitý přelom v pohledu na význam IR i mírné perzistující ketonemie pro buněčný metabolizmus, a jsou tak dobrým východiskem pro další výzkum v kardiovaskulární prevenci u diabetu a prediabetu.

Literatura

1. **Leslie RD, Palmer J, Schloot NC, Lernmark A.:** Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. Diabetologia 2016; 59: 13-20.
2. **Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, et al.:** The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes. Diabetes Care 2016; 39: 179-186.
3. **Association** of cardiometabolic multimorbidity with mortality. The Emerging Risk Factors Collaboration. JAMA 2015; 314: 52–60.

4. **Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, et al.:** Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. NEJM 2008; 358: 2545-2559.
5. **Patel A, MacMahon S, Chalmers J, et al.**: Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. NEJM 2008; 358: 2560-2572.
6. **Duckworth W, Abraira C, Moritz T, et al.:** Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. NEJM 2009; 360: 129-139.
7. **Nissen SE, Wolski K, Topol EJ.**: Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. JAMA 2005; 294: 2581-2586.
8. **Nissen SE, Wolski K.**: Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. NEJM 2007; 356: 2457-2471.
9. **Intensive** blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet 1998; 352: 837-853.
10. **Hur KY, Lee MS.:** New mechanisms of metformin action: Focusing on mitochondria and the gut. J Diabetes Investig 2015; 6: 600-609.
11. **Taegtmeyer H, Beauloye C, Harmancey R, Hue L.:** Insulin resistance protects the heart from fuel overload in dysregulated metabolic states. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2013; 305: H1693–H1697.
12. **Connor T, Martin SD, Howlett KF, McGee SL.:** Metabolic remodelling in obesity and type 2 diabetes: pathological or protective mechanisms in response to nutrient excess? Clin Exp Pharmacol Physiol 2015; 42: 109–115.
13. **Nolan CJ, Ruderman NB, Kahn SE, et al.:** Insulin Resistance as a Physiological Defense Against Metabolic Stress: Implications for the Management of Subsets of Type 2 Diabetes. Diabetes 2015; 64: 673–686.
14. **Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, et al.:** Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. NEJM 2013; 369: 1317-1326.
15. **Pfeffer MA, Claggett B, Diaz R, et al.:** Lixisenatide in patients with type 2 diabetes and acute coronary syndrome. NEJM 2015; 373: 2247-2257.
16. **Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al.:** Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. NEJM 2016; 375: 311-322.
17. **Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al.:** Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. EMPA-REG OUTCOME Investigators. NEJM 2015; 373: 2117-2128.
18. **Marx N, McGuire DK.:** Sodium-glucose cotransporter-2 inhibition for the reduction of cardiovascular events in high-risk patients with diabetes mellitus. Eur Heart J 2016; [Epub ahead of print]
19. **Ferrannini E, Mark M, Mayoux E.:** CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME Trial: A "Thrifty Substrate" Hypothesis. Diabetes Care 2016; 39: 1108-1114.
20. **Ogawa W, Sakaguchi K.:** Euglycemic diabetic ketoacidosis induced by SGLT2 inhibitors: possible mechanism and contributing factors. J Diabetes Investig 2016; 7: 135–138.

MASTNÉ KYSELINY U ONKOLOGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ

J. Macášek, M. Zeman, E. Tvrzická, B. Staňková, M. Vecka, A. Žák

IV. interní klinika, 1. LFUK a VFN Praha

Odchylky metabolismu MK u nádorů a vztah ke kancerogenezi

Onkologická onemocnění patří mezi skupinu chorob se závažnou prognózou. Většinou jsou doprovázena závažnou malnutricí a změnami metabolismu lipidů včetně mastných kyselin (MK). Významným činitelem rizika řady chorob, včetně nádorových onemocnění je kvalita výživy. Odhaduje se, že faktory, spojené se složením stravy odpovídají až za 35 % nádorových onemocnění v rozvinutých zemích (Doll et Peto1981). Významem jednotlivých nutričních komponent pro vznik a progresi nádorových chorob v různých populacích se zabývala řada studií. Se zvýšeným rizikem vzniku nádorů je spojována například zvýšená konsumace červeného masa (Sinha et al. 2009), naopak zvýšený příjem ovoce a zeleniny ve stravě byl spojen se sníženým rizikem úmrtí na nádorové onemocnění (Genkinger et al. 2004). Velká pozornost je v současné době věnována významu kvantity i kvality tuku, přijímaného ve stravě k úmrtnosti na nejzávažnější onemocnění, včetně nádorů. V několika studiích bylo prokázáno, že příjem tuku a nasycených mastných kyselin je asociován s rizikem vzniku onkologických onemocnění (Howe and Burch 1996, Stolzenberg-Solomon et al. 2002,Thiebaut et al. 2009). Další studie se zabývaly úlohou vícenenasycených MK řady n-3 a n-6. Vícenenasycené MK řady n-6 podporují proliferaci tumoru, invazivitu, metastazování a zánětlivou reakci organizmu, zatímco vícenenasycené MK řady n-3 působí opačně (Wendel 2009) brání vzniku nádorových onemocnění (Berquin et al. 2008). Nutno dodat, že změna metabolismu MK je přítomna i u dalších onemocnění, např. u kardio-vaskulárních chorob, při obezitě či diabetes mellitus 2. typu (Vigneri et al. 2009).

Nádorové buňky vykazují mnoho metabolických abnormalit. Vzhledem k rychlému růstu a proliferaci vyžadují značný přísun energie, což je zajištěno specifickými změnami metabolismu všech základních substrátů, např. Warburgův efekt, při kterém je upřednostněna anaerobní glykolýza na úkor aerobního katabolismu glukózy při aerobních podmínkách. Kancerogeneze je provázena řadou významných změn lipidového metabolismu (Wulaningsih et al. 2012). Nádorové buňky k zajištění zvýšené potřeby MK aktivují lipogenezu *de novo,* lipolýzu a ve zvýšené míře vychytávají MK přijímané exogenně. Složení MK v plasmatických fosfolipidech a cholesterylesterech odpovídá jednak jejich exogennímu příjmu v průběhu několika týdnů, jakožto i endogennímu metabolizmu MK (syntéza, lipoperoxidace atd.) (Riccardi et al. 2004). K vychytávání MK z bezprostředního okolí slouží intensivně exprimované membránové proteiny *fatty acid binding protein 4* (FABP 4) a CD36 (Currie et al. 2013). U řady nádorů (např. karcinom prsu, plic, kolorektální karcinom, karcinom jícnu či štítné žlázy) byla prokázána aktivace lipogeneze *de novo* (Guo et al. 2014). Zvýšená lipogeneze *de novo* je spojena s *„upregulací“* lipogenních enzymů, jako je acetyl-CoA karboxyláza, ACC (katalyzuje karboxylaci acetyl-CoA na malonyl-CoA, limitující krok v syntéze MK), nebo syntáza MK (fatty acid synthase, FAS), která katalyzuje tvorbu palmitátu z acetyl-CoA a malonyl-CoA. Za fyziologických okolností je aktivita FAS prokazována v játrech a tukové tkáni (Semenkovich et al. 1995). V rakovinných buňkách je exprimována za účelem uspokojení nutričních potřeb těchto buněk (Lupu and Menendez 2006, Flowers and Ntabi 2008). Zvýšená lipogeneze v nádorových buňkách koreluje s horší prognózou nádorového onemocnění (Kuhajda 2006) a aktivita syntázy MK je nalézána již v rané fázi onkogeneze a předurčuje agresivitu nádorových buněk (Menendez and Lupu 2007). Agresivně rostoucí tumory jsou charakterizovány nejen zvýšenou syntézou MK *de novo* ale i zvýšenou přeměnou nasycených MK v mononenasycené MK. Tyto desaturační

přeměny jsou na podkladě zvýšené exprese stearoyl-CoA desaturázy (SCD-1). Zvýšená aktivita SCD1 je nalézána u různých onkologických onemocnění. SCD-1 katalyzuje desaturaci kyseliny palmitové (16:0) na palmitolejovou (16:1 n-7) a kyseliny stearové (18:0) na olejovou (18:1 n-9). Aktivita FAS s SCD-1 stabilizuje maligní fenotyp nádorových buněk, a podporuje jejich přeživání a proliferaci (Lupu and Menendez 2006, Flowers and Ntambi 2008, DeBerardinis et al. 2008).

V membránách nádorových buněk tedy převažují vzhledem k vysoké aktivitě syntézy MK a nepřítomnosti Δ12 desaturázy v savčích buňkách především nasycené a mononenasycené MK nad vícenenasycenými. Toto specifické složení poskytuje nádorovým buňkám ochranu před lipoperoxidací (Zaidi et al. 2013) a snižuje fluiditu membrány se změnou membránové dynamiky s následky na procesy signalizace, receptorových funkcí, ciliogeneze atd. V konečném důsledku činí tyto změny nádorové buňky mnohem resistentnější vůči působení a vychytávání chemoterapeutik (Rysman et al. 2010).

U pacientů s karcinomem prostaty a leukémií bylo zjištěno, že hlavním zdrojem energie je katabolismus MK cestou zvýšené ß- oxidace (Liu et al. 2010, Zha et al. 2005, Samudio et al. 2010).

MK jsou prekurzory mnoha signálních látek, které mohou mít protumorigenní potenciál. Jednou z významných signálních molekul vycházejících z MK je fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát [PI(3,4,5)P3], který vzniká působením fosfatidylinositol-3-kinázy a aktivuje proteinkinázu B/Akt stimulující proliferaci a přežití buňky (*Yuan et Cantley, 2008, Zunder et al., 2008*). Mezi další důležité signální molekuly vycházející z MK jsou eikosanoidové deriváty arachidonové kyseliny (AA), zejména PEG2 a lysofosfatidová kyselina podporující agresivitu nádorových buněk (Ren et al. 2006). Vícenenasycená MK řady n-6 AA je metabolizována působením cyclooxygenázy a lipoxygenázy na prostangladiny a tromboxany řady 2, leukotrieny řady 4 a hydroxyeikosatetraenové kyseliny. Tyto působky mají proinflamatorní a tumorigenní vlastnosti. Zástupci vícenenasycených MK řady n-3 (LA, EPA, DHA) jsou naopak přeměňováni působením cyklooygenázy a lipoxygenázy na protektivně působící prostanglandiny a tromboxany řady 3, resolviny, hydroperoxyeikosapentaenové kyseliny (Lenihan-Geels et al. 2016).

MK u nádorové kachexie, úloha vícenenasycených MK

Vztah mezi složením MK v tělesných tkáních a patofyziologií kancerogeneze je komplexní. Důležitou roli hraje příjem MK v potravě ale i jejich endogenní metabolizmus, který může být ovlivněn různými procesy, které doprovázejí onkologická onemocnění. Nádor většinou indukuje malnutriční stav, zánětlivou odpověď, zvyšuje oxidační stres a také využívá katabolizmus MK jako zdroj energie. Pacienti s maligními nádory bývají postiženi kachexii. U mnoha nádorů je studována metabolická podstata tohoto jevu, při kterém v plasmě nalézáme zvýšenou koncentraci volných MK, monoacylglycerolů a diacylglycerolů, ve zvýšené míře vychytávaných nádorovými buňkami. U melanomu je znám faktor indukující kachexii, jedná se o inhibitor lipoproteinové lipázy v tukové tkáni, což vede k inhibici extracelulární lipolýzy a v konečném důsledku k depleci intracelulárních lipidů (Mori et al. 1991).

V nádorových buňkách dochází ke zvýšení syntézy MK *de novo* a zvýšení přeměny nasycených MK na nenasycené MK zvýšením aktivit desaturáz. Byly prokázány odlišné účinky vícenenasycených MK řady n-3 a n-6, které jsou úzce propojeny s metabolizmem eikosanoidů. Je známo, že inhibice růstu tumoru je spojena se snížením aktivity cyclooxygenázy-2 a snížených koncentrací prostaglandinu E_2. Vícenenasycené MK řady n-6 aktivují mitogenní signální kaskádu prostřednictvím PKC, ERK1/2 a NF-κB. Vícenenasycené MK řady n-3 mají opačný efekt (Berquin et al. 2008), inhibují aktivaci eIF2α kinázy a suprimují expresi onkogenů a G1 cyklinů. Experimentální i klinické studie prokázaly

protektivní účinky nenasycených MK řady n-3 proti karcinomu prostaty, prsu, a kolorektálnímu karcinomu (Clarke 2001, Larrson et al. 2004). Avšak nižší obsah plazmatických vícenenasycených MK řady n-3 byl zjištěn u jiných typů nádorů (Zuijdgeest-van Leeuwen 2002).

MK u vybraných maligních chorob

Karcinom pankreatu

Vysoký příjem vícenenasycených MK řady n-6 (PUFA n-6), zvláště kyseliny linolové, zvyšuje riziko vzniku nádorů trávicího traktu (kolorektální karcinom, karcinom pankreatu), ale i karcinomu prsu a prostaty (Berquin et al. 2008). V případě karcinomu pankreatu (KP) došlo u obézních jedinců ke snížení rizika jeho vzniku při zvýšeném příjmu vícenenasycených MK na úkor těch nasycených (Nkondjock et al. 2005). Bylo prokázáno, že pacienti s KP mají specifický profil MK v plazmatických lipidech. Ve skupině pacientů s KP byl zjištěn nižší obsah LA, ALA a EPA a vyšší obsah mononenasycených MK, především kyseliny palmitové, olejové a vakcenové (Macášek et al.). Pacienti s KP nemají vyšší koncentraci konjugovaných dienů v LDL částicích jako ukazatelů lipoperoxidace (Žák et al. 2007), tudíž snížené množství linolové (LA, 18:2n-6), α-linolenové (ALA, 18:3n-3) a timnodonové kyseliny (EPA, 20:5n-3) není způsobeno lipoperoxidací, ale pravděpodobně nižším dietním přísunem těchto mastných kyselin. V jedné studii (Neoptolemos et al. 1988), bylo zjištěno, že u zdravých jedinců koreluje obsah LA v tukové tkáni i v erytrocytech, kdežto u pacientů s kolorektálním karcinomem tato korelace chybí. Pacienti s KP měli zvýšenou aktivitu desaturáz SCD1 (D9D) a D5D.

Karcinom prsu

V nádorových buňkách karcinomu prsu dochází k typickým nádorovým změnám metabolismu MK. V těchto buňkách je zvýšená nejenom *de novo* lipogeneze zvýšením exprese syntázy MK, ale dochází i ke zvýšené míře vychytávání MK z okolí, protože buňky karcinomu prsu produkují ve zvýšeném množství lipoproteinovou lipázu a CD36 zajišťující zvýšený přísun volných MK (Kuemmerle et al. 2011). U karcinomu prsu bylo prokázáno, že zvýšená exprese syntázy MK je spojena se špatnou prognózou tohoto onemocnění (Kuhajda et al. 2000, Menendez et Lupu 2007).

Vícenenasycené MK řady n-3 vykazují projektivní účinky před vznikem nádorů prsu. Uvažuje se o mnoha mechanismech. Vícenenasycené MK řady n-3 mají pozitivní vliv na remodelaci buněčné membrány (Williams et al. 2012, Rogers et al. 2010) a snižují aktivitu onkogenních signálních drah faktorů EGFR a CXCR4 (Rogers et al. 2010, Altenburg et Siddiqui 2009). Mezi další významné mechanismy antionkogenního potenciálu vícenenasycených MK u karcinomu prsu spočívá v inhibici mitogenních účinků estrogenu a naopak k aktivaci inhibičně působícího E2 (WenQing Cao et al. 2012).

Kolorektální karcinom

Při vzniku kolorektálního karcinomu hraje významnou úlohu výživa. V epidemiologických studiích bylo prokázáno, že vliv konzumace vícenenasycených MK řady n-3 působí protektivně před jeho vznikem. Zvažují se především jejich antiinflamatorní účinky (Gerber 2012).

Karcinom prostaty

Karcinom prostaty patří mezi nejčastější malignity u mužů. Epidemiologické studie poukázaly na některé rizikové faktory vzniku karcinomu prostaty, např. rodinná anamnéza, věk, rasa, ale i chronická prostatitida. Vzhledem k úloze zánětu v kancerogenezi byl zkoumán vliv dietního přísunu antiinflamatorně působících vícenenasycených MK řady n-3. U buněk karcinomu prostaty byla prokázána nižší závislost energetického metabolismu na katabolismu glukózy a naopak zvýšená exprese enzymů, které se účastní katabolismu MK v procesu

ß - oxidace, dokazující dominantní energetickou závislost na MK (Liu et al. 2010, Zha et al. 2005).

MK a terapie nádorů

V nádorových buňkách dochází k výrazné alteraci metabolismu MK a toho by teoreticky bylo možné využít v terapii onkologických onemocnění. V úvahu připadají léčebné zásahy v dějích lipogenezy i lipolýzy. Inhibice enzymů, které se účastní lipogeneze jako jsou jsou ATP citrát lyáza, acetyl-CoA karboxyláza, syntáza MK, acyl-CoA syntetáza (ligáza), vede v experimentálních studiích ke snížení intracelulární dostupnosti MK a následně ke zpomalení buněčného růstu nádorových buněk bez účinku na buňky nenádorové (Currie et al. 2013). Navíc bylo zjištěno, že dochází k potenciaci cytotoxického účinku inhibitorů lipogeneze v prostředí chudém na přísun MK (Zaidi et al. 2012). V experimentu u mnoha nádorů prokazuje pozitivní efekt benzen-trikarboxylátový analog inhibicí citrátového přenašeče ve vnitřní mitochondriální membráně, který je zvýšeně exprimován v nádorech se špatnou prognózou (Catalina-Rodriguez et al. 2012). Dalším slibným terapeutickým cílem je inhibice SCD, což vede ke snížení množství nenasycených MK a alteraci membránových dějů nádorových buněk (Ariyama et al. 2010). Selektivní inhibitor SCD, jehož součástí je mykotoxin cerulenin, zkracuje délku života nádorových buněk (Falvella et al. 2002).

Vzhledem ke složitému intracelulárnímu metabolismu MK se cílem potenciálního terapeutického zásahu může stát jakákoliv jeho část. V experimentálních studiích se zkouší ovlivnění řady dalších zúčastněných enzymů či proteinů řídících expresi genů zodpovědných za lipidový metabolismus (malonyl CoA dekarboxyláza, ovlivnění exprese SREBP-1).

V současné době je studován vliv vícenenasycených MK řady n-3 při protinádorové terapii. Tyto MK mohou být využity jako adjuvantní protinádorová léčba, protože je známo, že klasická chemoterapeutika i radioterapie mají vyšší účinnost při současné suplementaci vícenenasycenými MK řady n-3 s dlouhými řetezci (Murphy et al. 2011). Vícenenasycené MK řady n-3 mají pleiotropní protinádorové účinky. Inhibují angiogenezi a proces metastazování, nicméně přesný mechanismus není objasněn (Baracos et al. 2004). Vícenenasycené MK řady n-3 jsou důležité i pro jejich protektivní působení proti rozvoji nádorové kachexie. Suplementace těmito MK snižuje nádorově podmíněnou degradaci svalů tím, že vícenenasycené MK řady n-3 snižují expresi podjednotek proteosomů zodpovědných za katabolismus proteinů a inhibují akutní zánětlivou reakci (Tvrzická et al. 2002).

Závěr

Maligní nádory vykazují komplexní změny v metabolismu MK. Tyto děje jsou v současné době intensivně studovány, protože detailní znalost patofyziologických a patobiochemických změn v metabolismu MK by mohla přispět k novým přístupům v diagnostice (nové biomarkery) i v léčbě onkologických onemocnění. Nové znalosti též implikují potřebu řádné nutriční podpory pacientů, která zlepšuje kvalitu života kachektických pacientů a podporuje jejich delší přežívání. Dieta bohatá na vícenenasycené MK řady n-3 snižuje pravděpodobnost vzniku nádorových onemocnění a má důležitou roli v prevenci.

Práce byla podpořena výzkumnými projekty – PRVOUK P25/LF1/2 MŠMT ČR a RVO VFN64165/2012 MZ ČR

Literatura

Altenburg JD, Siddiqui RA.: Omega-3 polyunsaturated fatty acids downmodulate CXCR4 expression and function in MDA-MB-231 breast cancer cells. Mol Cancer Res 2009; 7: 1013–1020.

Baracos VE, Mazurak VC, Ma DW.: n-3 Polyunsaturated fatty acids throughout the cancer trajectory: influence on disease incidence, progression, response to therapy and cancer-associated cachexia. Nutr Res Rev 2003; 17: 177–192.

Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ.: Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. Cancer Letters 2008*;* 269, 363-377.

Cao W, Ma Z, Rasenick MM, et al.: N-3 Poly-Unsaturated Fatty Acids Shift Estrogen Signaling to Inhibit Human Breast Cancer Cell Growth. Cancer Cell Growth. PLoS One 2012; 7: e52838.

Catalina-Rodriguez O, Kolukula VK, Tomita Y, et al.: The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. Oncotarget 2012; 3: 1220–1235.

Clarke SD.: Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. J Nutr 2001; 131: 1129-1132.

Currie E, Schulze A, Zechner ER, et al.: Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. Cell Metabolism 2013; 18: 153-161.

Doll R, Peto R.: The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst 1981; 66: 1191–1308.

Falvella SF, Pascale RM, Gariboldi M, et al.: Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) gene overexpression i associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. Carcinogenesis 2002; 23, 1933–1936.

Fernandez-del Castillo C, Jimenez RE.: Pancreatic cancer, cystic pancreatic neoplasms, and other non-endocrine pancreatic tumors. In Sleisinger & Fordtrans´s Gastrointestinal and Liver Disease. Pathophysiology/Diagnosis/Management. 7th edition. Feldman M, Friedman LS, and Sleisinger MH, eds. Philadelphia, WB. Saunders Company, 2002, 970- 987.

Flowers MT, Ntambi JM.: Role of Stearoyl-Coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. Curr Opin Lipidol 2008; 19: 248-256.

Genkinger JM, Platz EA, Hoffman SC, et al.: Fruit, vegetable, and antioxidant intake and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in a community-dwelling population in Washington County, Maryland. Am J Epidemiol 2004; 160: 1223-1233.

Gerber M.: Omega-3 fatty acids and cancers: a systematic update review of epidemiological studies. Brit J Nutr 2012; 107: S228–S239.

Howe GR, Burch JD.: Nutrition and pancreatic cancer. Cancer Causes Control 1996; 7: 69-82.

Kuemmerle NB, Rysman E, Lombardo PS, et al.: Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. Mol Cancer Ther 2011; 10:427–436.

Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, et al.: Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 3450–3454.

Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. Cancer Res 2006; 66: 5977-5980.

La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, et al.: A case control study of diabetes mellitus and cancer risk. Br J Cancer 1994; 70: 950–953.

Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A.: Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. Am J Clin Nutr 2004; 79: 935-945.

Lenihan-Geels G, Bishop KS, Ferguson LR.: Cancer Risk and Eicosanoid Production: Interaction between the Protective Effect of Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Genotype. J Clin Med 2016; 5: E25.

Liu Y, Zuckier LS, Ghesani NV.: Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach. Anticancer Res 2010; 30: 369–374.
Lupu R Menendez JA.: Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: an alternative to selective estrogen receptor modulators? Endocrinology 2006; 147: 4056-4066.
Menendez JA, Lupu R.: Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer 2007; 7: 763–777.
Mori M, Yamaguchi K, Honda S, et al.: Cancer cachexia syndrome developed in nude mice bearing melanoma cells producing leukemia-inhibitory factor. Cancer Res 1991; 51: 6656–6659.
Murphy RA, Yeung, E, Mazurak VC, Mourtzakis M.: Influence of eicosapentaenoic acid supplementation on lean body mass in cancer cachexia. Brit J Cancer 2011; 105: 1469-1473.
Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QS, et al.: Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. Cancer 2011; 117: 3774–3780.
Neoptolemos JP, Clayton H, Heagerty AM, et al.: Dietary fat in relation to fatty acid composition of red cells and adipose tissue in colorectal cancer. Br J Cancer 1988; 58: 575–579.
Nkondjock A, Krewski D, Johnson KC, et al.: Specific fatty acid intake and the risk of pancreatic cancer in Canada. Brit J Cancer 2005; 92: 971-977.
Ren J, Xiao YJ, Singh LS, et al.: Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. Cancer Res 2006; 66: 3006-3014.
Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA.: Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. Clin Nutr 2004; 23: 447-456.
Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, et al.: Docosahexaenoic Acid Alters Epidermal Growth Factor Receptor Related Signaling by Disrupting its Lipid Raft Association. Carcinogenesis 2010; 31: 1523–1530.
Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, et al.: Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. J Clin Invest 2010; 120: 142–156.
Semenkovich CF, Coleman T, Fiedorek FT Jr.: Human fatty acid synthase mRNA: tissue distribution, genetic mapping, and kinetic decay after glucose deprivation. J Lipid Res 1995; 36, 1507-1521.
Sinha R, Cross AJ, Graubard BI, et al.: Meat intake and mortality: a prospective study of over half a million people. Arch Intern Med 2009; 169: 562-571.
Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Taylor PR, et al.: Prospective study of diet and pancreatic cancer in male smokers. Am J Epidemiol 2002; 155: 783-792.
Thiebaut AC, Jiao L, Silverman DT, et al.: Dietary fatty acids and pancreatic cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. J Natl Cancer Inst 2009; 101: 1001-1011.
Tvrzická E, Vecka M, Staňková B, Žák A.: Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionisation detection: Quantitative aspects. Anal Chim Acta 2002; 465: 337–350.
Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, et al.: Diabetes and cancer. Endocr Relat Cancer 2009; 16: 1103-1123.
Wang DD, Li Y, Chiuve SE, et al.: Association of Specific Dietary Fats With Total and Cause-Specific Mortality. JAMA Intern Med 2016; 176: 1134-1145.
Wendel M, Heller AR.: Anticancer actions of omega-3 fatty acids--current state and future perspectives. Anticancer Agents Med Chem 2009; 9: 457-470.

Williams JA, Batten SE, Harris M, et al.: Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids segregate differently between raft and nonraft domains. Biophys J 2012; 103: 228–237.
Yuan TL, Cantley LC.: PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene 2008; 27: 5497–5510.
Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB et al.: Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids, Prog Lipid Res 2013; 52: 585–589.
Zaidi N, Royaux I, Swinnen JV, Smans K.: ATP Citrate Lyase Knockdown Induces Growth Arrest and Apoptosis through Different Cell- and Environment-Dependent Mechanisms. Mol Cancer Ther 2012; 11: 1925–1935.
Zha S, Ferdinandusse S, Hicks JL, et al.: Peroxisomal branched chain fatty acid beta-oxidation pathway is upregulated in prostate cancer. Prostate 2005; 63: 316–323.
Zunder ER, Knight ZA, Houseman BT, et al.: Discovery of drug-resistant and drug-sensitizing mutations in the oncogenic PI3K isoform p110 alpha. Cancer Cell 2008; 14: 180–192.
Žák A, Tvrzická E, Vecka M, et al.: Severity of metabolic syndrome unfavorably influences oxidative stress and fatty acid metabolism in men. Tohoku J Exp Med 2007; 212: 359-371.

STÁRNUTÍ JAKO VÝZNAMNÝ RIZIKOVÝ FAKTOR V PATOGENEZI INZULÍNOVÉ REZISTENCE

AGING AS AN IMPORTANT RISK FACTOR IN THE PATHOGENESIS OF INSULIN RESISTANCE

I. Marková, H. Malínská, M. Hüttl, O. Oliyarnyk, J. Trnovská, V. Škop, L. Kazdová

Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Abstract
It has been known that insulin resistance (IR) progressively increases with age in both humans and rats, but the mechanisms implicated in the worsening of IR and other accompanying symptoms with increasing age, are not fully understood. The aim of the study was to investigate some parameters of lipid and carbohydrate metabolism in 3- and 18-months old Wistar rats. The relative weight of the epididymal fat pads, which is considered as an indicator of visceral obesity, increased with age almost fourfold. 18-months old rats exhibited increased serum triglycerides, cholesterol, insulin, nonesterified fatty acids and ectopic lipid accumulation. Muscle and white adipose tissue insulin sensitivity was reduced in old rats. Reduced utilization of fatty acids for oxidation and lipogenesis found in brown adipose tissue showed that this tissue may contribute to age-induced metabolic disorders. Our results indicate that the age-related increase of IR and the deterioration of some parameters of carbohydrate and lipid metabolism are associated with dyslipidemia, ectopic lipid accumulation, increased abdominal fat, absence of adipose tissue sensitivity to insulin action and decreased fatty acid utilization in brown adipose tissue.

Úvod
Již dlouho je známo, že stárnutí je spojeno s inzulínovou rezistencí (IR) jak u lidí, tak potkanů (Davidson 1979, Zeyda et al. 2009), ale mechanismy, které jsou zodpovědné za pokles citlivosti tkání k účinku inzulínu s přibývajícím věkem, nejsou plně objasněny. Předpokládá se, že tyto poruchy jsou spojeny se zvýšeným podílem tukové tkáně a obezitou (Das et al. 2004, Vaughan et al. 2016), dále se na zhoršování IR může podílet nedostatečná sekreční kapacita inzulínu (Ferranini et al. 1996), dyslipidémie (Howard 1999) nebo defekty v inzulínové signalizační kaskádě (Qu et al. 1999). Dalším faktorem, jenž je prohlubován stárnutím je oxidační stres, který se významně podílí na progresi IR a metabolického syndromu. Pro uplatnění oxidačního stresu při IR svědčí výsledky našich studií, v nichž jsme zjistili u starých, šestnáctiměsíčních Wistar potkanů v porovnání s mladými, čtyřměsíčními potkany významně snížené sérové koncentrace glutathionu a snížené aktivity katalázy a superoxiddismutázy. Tyto změny byly spojeny s nárůstem koncentrace lipoperoxidačních produktů (Malínská et al. 2007). S přibývajícím věkem se snižuje aktivita antioxidačního systému.
Stárnutí je obvykle doprovázeno nárůstem tělesné hmotnosti a tukové hmoty. Abdominální tuk koreluje s IR a hyperinzulinémií. Přibývající věk také významně ovlivňuje spektrum sekretovaných adipocytokinů, což je pravděpodobně způsobeno nárůstem viscerální tukové tkáně, prohloubeným systémovým zánětem tukové tkáně a změnami velikosti adipocytů. S věkem stoupají sérové koncentrace leptinu, vaspinu a chemerinu, což je doprovázeno nežádoucím lipidovým profilem, IR a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob a diabetu 2. typu (Adamiak et al. 2016). IR pozorovaná u starých lidí může být pozitivně ovlivněna fyzickou aktivitou. Řada studií prokázala, že redukce tělesné hmotnosti pomocí vhodné diety a cvičení zmírňuje ztrátu svalové hmoty spojenou se stárnutím, zlepšuje glukózovou toleranci,

zlepšuje lipidový profil a profil cytokinů produkovaných tukovou tkání a zvyšuje inzulínovou senzitivitu (Ryan 2000, Adamiak et al. 2016, Cartee et al. 2016). Bylo prokázáno, že dlouhověcí lidé mají snížené hladiny leptinu a zejména vysoké koncentrace adiponektinu, což je navíc spojováno s vyššími hladinami HDL cholesterolu, nižšími koncentracemi C reaktivního proteinu a glykovaného hemoglobinu (Adamiak et al. 2016).
V naší studii jsme sledovali u mladých a starých potkanů některé parametry sacharidového a lipidového metabolismu, zaměřili jsme se i na substrátovou utilizaci v hnědé tukové tkáni. Pokusili jsme se definovat změny, které mohou vést nebo přispívat ke vzniku a prohlubování IR v souvislosti s přibývajícím věkem.

Materiál a metody
Pokusy byly provedeny u potkaních samců kmene Wistar ve věku 3 a 18 měsíců, kteří byli krmeni standardní laboratorní dietou. Počet zvířat ve skupině tříměsíčních byl 8, osmnáctiměsíčních 4. Koncentrace triacylglycerolů (TAG), neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) v séru a obsah TAG ve tkáních byly stanoveny komerčně dostupnými enzymatickými kity. Koncentrace sérového inzulínu byla stanovena imunochemickým kitem RAT Insulin ELISA Kit (Mercodia, Švédsko). Rezistence svalové (bránice) a epididymální tukové tkáně k účinku inzulínu byla sledována podle bazální a inzulínem stimulované inkorporace (250 μU/ml) ^{14}C-U-glukózy do glykogenu a lipidů *ex vivo*. Metabolické parametry hnědé tukové tkáně byly stanoveny *ex vivo* podle inkorporace radioaktivně značené kyseliny palmitové do intracelulárních lipidů a do CO_2 (oxidace palmitátu).

Výsledky a diskuse
Tělesná hmotnost Wistar potkanů se v období mezi 3. a 18. měsícem zvýšila ze 177 ± 2 g na 831 ± 43 g ($p < 0,001$). Relativní hmotnost epididymální tukové tkáně, která je považovaná za ukazatel viscerální obezity, se s přibývajícím věkem zvýšila téměř čtyřnásobně (0,653 ± 0,049 vs 2,441 ± 0,353 g/100 g tělesné hmotnosti, $p < 0,01$). Vzhledem k tomu, že u potkanů s věkem významně stoupal podíl tukové tkáně, lze se domnívat, že jednou z možných příčin zhoršování IR s věkem může být obezita, i když přítomnost obezity není nutnou podmínkou vzniku IR, jak ukázaly naše studie u hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (Divišová et al. 2002). Svědčí pro to i klinická pozorování, která ukázala, že IR jako součást metabolického syndromu není u 20 % pacientů asociována s obezitou (Ding et al. 2016).

Tabulka 1. Koncentrace vybraných analytů v séru

	3 měsíce	**18 měsíců**	**p <**
TAG (mmol/l)	1,219 ± 0,107	5,161 ± 1,408	0,07
celkový cholesterol (mmol/l)	2,121 ± 0,112	6,652 ± 1,331	0,05
NEMK (mmol/l)	0,268 ± 0,029	0,475 ± 0,069	0,05
inzulín (nmol/l)	0,144 ± 0,025	0,546 ± 0,093	0,02

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM.

U starých potkanů jsme zjistili zvýšené koncentrace TAG, cholesterolu, NEMK a inzulínu v séru (tabulka 1). Výraznou změnou u osmnáctiměsíčních potkanů bylo zvýšené ektopické ukládání TAG ve tkáních, které bylo v játrech zvýšené na dvojnásobné koncentrace a v kosterním svalu na trojnásobné hodnoty (tabulka 2). Zvýšené množství TAG ve tkáních může být důsledkem zvýšeného transportu sérových TAG uvolněných z tukové tkáně nebo jejich sníženou oxidací ve tkáních.

Tabulka 2. Ektopické ukládání triacylglycerolů

tkáň	**3 měsíce**	**18 měsíců**	**p <**
játra (μmol/g)	4,146 ± 0,290	9,078 ± 1,242	0,025
m. gastrocnemius (μmol/g)	2,603 ± 0,413	7,183 ± 1,352	0,04
myokard (μmol/g)	1,913 ± 0,170	2,3191 ± 0,607	NS

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM.

Bazální inzulínová senzitivita svalové tkáně (bránice), měřená podle inkorporace radioaktivně značené glukózy do glykogenu ve svalu, se mezi mladými a starými potkany nelišila (272,5 ± 47,8 vs 363,2 ± 54,3 nmol glukózy/g/2 hod, NS). Po stimulaci inzulínem se u mladých potkanů významně zvýšila o 79 %, zatímco u starých potkanů zvýšení po stimulaci dosahovalo 29 % (3 měsíce, vliv stimulace inzulínem: 272,5 ± 47,8 vs 487,4 ± 76,5 nmol glukózy/g/2 hod, $p < 0,05$; 18 měsíců, vliv stimulace inzulínem: 363,2 ± 54,3 vs 467,3 ± 75,3 nmol glukózy/g/2 hod, NS). Tyto nálezy jsou do jisté míry překvapivé, protože podle hypotézy právě snížená senzitivita svalové tkáně je zodpovědná za poruchy IR.
Obsah bílkovin v bílé tukové tkáni byl u mladých potkanů výrazně vyšší (tabulka 3), což nepřímo ukazuje na přítomnost malých, metabolicky aktivních adipocytů, které jsou citlivé k účinku inzulínu. Tento nález je v souladu s naměřenou inzulínovou senzitivitou bílé tukové tkáně, která byla u tříměsíčních potkanů za nestimulovaného stavu vyšší o 246 % oproti osmnáctiměsíčním potkanům. Dále byla tuková tkáň mladých potkanů výrazně citlivá na stimulaci inzulínem, kdežto tuková tkáň starých potkanů byla k účinku inzulínu zcela rezistentní. Tyto nálezy svědčí pro důležitou roli bílé tukové tkáně v patogenezi IR.

Tabulka 3. Parametry bílé tukové tkáně

Bílá tuková tkáň-epididymální tukové těleso					
			3 měsíce	**18 měsíců**	**p <**
bílkoviny	%		1,723 ± 0,054	0,907 ± 0,199	0,005
lipogeneze z glukózy	nmol gl./g/2 hod	bazální	1675,0 ± 90,0	483,5 ± 118,3	0,0005
		stimulovaná inzulínem	4136,8 ± 569,5	497,8 ± 46,5	0,0005

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM.

V poslední době je velká pozornost věnována studiu hnědé tukové tkáně (HTT). Aktivní HTT se nachází i u lidí dospělého věku. Nálezy z poslední doby ukázaly, že aktivita HTT negativně koreluje s věkem a stupněm obezity a že větší množství HTT může chránit před obezitou související s věkem (Cypess et al. 2009). V naší práci jsme studovali, zda pokročilý věk ovlivňuje metabolickou aktivitu HTT. Jak ukazuje tabulka 4, hmotnost HTT i obsah proteinů v ní byl u starých potkanů významně nižší oproti potkanům ve věku 3 měsíce. Dále byla u starých potkanů v HTT výrazně snížená oxidace exogenního palmitátu i tendence k jeho sníženému využití pro inkorporaci do lipidů. Výsledky získané z pokusů s HTT ukazují, že snížená oxidace mastných kyselin spolu s poklesem inkorporace tohoto substrátu do energetických rezerv v HTT může přispívat ke zvýšení sérových koncentrací TAG, k ektopické akumulaci TAG v játrech a ve svalu a ke snížení inzulínové senzitivity epididymální tukové tkáně během stárnutí. Výsledky podporují hypotézu, podle které se snížená aktivita HTT může podílet na rozvoji metabolických poruch během stárnutí.

Tabulka 4. Parametry hnědé tukové tkáně

Hnědá tuková tkáň (interskapulární)					
			3 měsíce	**18 měsíců**	**p <**
hmotnost HTT	g/100 g těl. hm.		0,096 ± 0,006	0,026 ± 0,007	0,001
bílkoviny	%		6,996 ± 0,426	4,132 ± 0,315	0,0005
oxidace palmitátu	nmol palm./g/2 hod	bazální	97,7 ± 24,4	27,6 ± 8,6	0,03
lipogeneze z palmitátu		bazální	1240,4 ± 85,4	850,7 ± 118,1	0,05

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM.

Závěr

Stárnutí je významný faktor, který se podílí na zhoršování IR. Naše výsledky ukazují, že důležitou úlohu v patogenezi IR spojené se stárnutím může hrát nárůst tělesné hmotnosti spojený s obezitou. V průběhu stárnutí dochází u potkanů k dyslipidémii, výrazně zvýšenému ektopickému ukládání TAG ve tkáních a ke sníženému inzulínem stimulovanému využití glukózy zejména v tukové tkáni. Důležitou úlohu jistě hraje i pokles aktivity HTT spojený se sníženým využitím energetických substrátů, který se může podílet na rozvoji metabolických poruch během stárnutí. Uvedené výsledky ukazují, že zvyšování IR a zhoršování některých parametrů sacharidového a lipidového metabolismu s přibývajícím věkem je komplexní proces, na kterém se podílí řada faktorů.

Podpořeno MZ ČR–RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001“)

Literatura

Adamiak P, Lacka K. Adipose tissue, adipokines and aging. Pol Merkur Lekarski 2016; 40(236): 122-128.

Cartee GD, Hepple RT, Bamman MM, Zierath JR. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. Cell Metab 2016; 23(6): 1034-1047.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al.: Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. New Engl J Med 2009; 360(15): 1509-1517.

Das M, Gabriely I, Barzilai N.: Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. Obes Rev 2004; 5(1): 13-19.

Davidson MB.: The effect of aging on carbohydrate metabolism: A review of the English literature and practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly. Metabolism 1979; 28(6), 688-705.

Ding C, Chan Z, Magkos F.: Lean, but not healthy: the 'metabolically obese, normal-weight' phenotype. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2016, Aug 23. [Epub ahead of print].

Divišová J, Kazdová L, Hubová M, Meschisvili E.: Relationship between insulin resistance and muscle triglyceride content in nonobese experimental models of insulin resistance syndrome. Ann N Y Acad Sci 2002; 967: 440-445.

Ferranini E, Vichi S, Beck-Nielsen H, et al.: Insulin action and age. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). Diabetes 1996; 45(7): 947-953.

Howard BV.: Insulin resistance and lipid metabolism. Am J Cardiol 1999; 84(1A), 28J-32J.

Malínská H, Oliyarnyk O, Kazdová L.: Vztah věku k aktivitě antioxidačního systému u metabolického syndromu. Atherosklerosa sborník 2007, 54-57.

Qu X, Seale JP, Donelly R.: Tissue and isoform-specific effect of aging on protein kinase C in insulin-sensitive tissues. Clin Sci (Lond) 1999; 97(3): 355-361.

Ryan AS.: Insulin resistance with aging: effects of diet and exercise. Sports Med 2000, 30(5), 327-46.

Vaughan KL, Mattison JA.: Obesity and aging in humans and nonhuman primates: A mini- review. Gerontology 2016; Apr 28. [Epub ahead of print].

Zeyda M, Stulning TM.: Obesity, inflammation, and insulin resistance – A mini-review. Gerontology 2009; 55(4): 379-386.

VLIV SILYMARINU, N-3 POLYNENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN A JEJICH KOMBINACE NA EXPRESI MRNA VYBRANÝCH JATERNÍCH TRANSPORTNÍCH PROTEINŮ U HEREDITÁRNĚ HYPERTRIGLYCERIDEMICKÉHO POTKANA

THE EFFECT OF SILYMARIN, N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, AND THEIR COMBINATION ON THE EXPRESSION OF MRNA OF SELECTED LIVER TRANSPORT PROTEINS IN HEREDITARY HYPERTRIGLYCERIDEMIC RATS

Z. Matušková[1], M. Poruba[1], L. Kazdová[2], O. Oliyarnyk[2], V. Škop[2], R. Večeřa[1*]

[1]*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*
[2]*Center 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
Hypolipidemic action of silymarin (SM) and n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) are well known, but the precise mechanism of action is still not understood. Therefore, the aim of this study was to describe the effects of SM, PUFA, and their combination on the mRNA expression of ABCG5, ABCG8, and ABCA1 transporters in a model of metabolic syndrome.
A total of 23 adult male hereditary hypertriglyceridemic rats were divided into four groups. Control group of rats were fed by standard laboratory diet for four weeks. Experimental groups were fed by standard laboratory diet containing SM (1%), PUFA (300 mg/kg/day), or their combination also for four weeks. The determination of mRNA expression of liver transporters was performed using the RT-PCR method.
The expression of ABCG5/8 mRNA was significantly increased in rats with PUFA or SM + PUFA diets.
Our results suggest that the hypolipidemic effect of the combination of SM + PUFA or the effect of PUFA alone is partly caused by the up-regulation of ABCG5/8 transporters which leads to the increased excretion of cholesterol into the bile.

Úvod

Homeostáza cholesterolu je v organismu zajišťována složitými mechanismy, které zahrnují nejen regulaci jeho syntézy pomocí enzymu hydroxymethyl-glutaryl koenzym A reduktázy (cílová struktura pro všeobecně oblíbené statiny), ale také regulaci jeho absorpce a také exkrece. Absorpce cholesterolu probíhá v tenkém střevě pomocí transportního proteinu Niemann-Pick C1-L1 (NPC1L1). Ten se také nachází v játrech, kde je jeho hlavním úkolem re-absorbovat eliminovaný cholesterol ze žluče (Wang a Song 2012). Opačnou funkci mají ABC transportéry, tedy transportní proteiny schopné vázat ATP. Konkrétně se jedná o proteiny ABCG5 a ABCG8, které se nacházejí jak v tenkém střevě, tak i v játrech. V tenkém střevě se podílejí na snížení absorpce cholesterolu ze střeva, v játrech pak na zvýšení exkrece cholesterolu do žluče (Brown a Yu 2009). Reverzní transport cholesterolu, tedy cesta cholesterolu z periferních tkání do jater, probíhá za účasti ABCA1 transportního proteinu. Ten se v játrech a tenkém střevě podílí na formování tzv. částic o vysoké hustotě (HDL) (Fielding a Fielding 1995). Zvýšené množství cholesterolu v organismu je rizikem vzniku kardiovaskulárních nemocí, jako je např. infarkt myokardu, a proto je zapotřebí hledat nové možnosti, jak toto riziko snížit.

Pro naši studii jsme si zvolili zvířecí model metabolického syndromu - hereditárně hypertriglyceridemické (HHTg) samce potkana (Vrána a Kazdová 1990, Zicha et al. 2006). Podávaná dieta byla zvolena dle našich předchozích výsledků, kdy jsme zjistili, že se silymarin (extrakt ze semen ostropestřce mariánského) ukazuje jako vhodné hypolipidemikum (Poruba et al. 2015). Tuto dietu se silymarinem jsme obohatili o n-3 polynenasycené mastné kyseliny, významně se podílející na snížení hypercholesterolemie a snížení rizika vzniku kardiovaskulárních nemocí (Balasubramaniam et al. 1985). Přesný mechanismus účinku silymarinu nebyl dosud objasněn, proto by mohla naše studie přinést další zajímavé informace o účinku tohoto přírodního extraktu, ale i zároveň nové informace o n-3 polynenasycených mastných kyselinách.
Cílem této studie bylo tedy lépe prozkoumat jak mechanismus účinku silymarinu, tak také n-3 polynenasycených mastných kyselin a jejich kombinace u modelu metabolického syndromu – HHTg potkana.

Materiál a metody

Zvířata a diety

Pro studii bylo vybráno celkem 23 hereditárně hypertriglyceridemických (HHTg) potkanů - samců. Zvířata byla chována za standardních laboratorních podmínek s volným přístupem ke krmivu i vodě. Jako potrava posloužila standardní laboratorní dieta (STD) a v případě experimentálních skupin (celkem tří) byla STD obohacena o mikronizovaný silymarin (1 % v dietě), n-3 polynenasycené mastné kyseliny (300 mg/kg/den), nebo kombinaci mikronizovaného silymarinu a mastných kyselin ve stejných dávkách. Po čtyřech týdnech byla zvířata dekapitována, exsanguinována a z každého jedince byla odebrána jaterní tkáň. Odebrané tkáně byly ihned uloženy do RNA lateru (Qiagen, Valencia, CA, USA) a uskladněny při teplotě -70°C. Tyto vzorky pak byly použity pro stanovení exprese mRNA vybraných transportních proteinů metodou RT-PCR.
Silymarin byl koupen od firmy Favea, s.r.o., Kopřivnice, Česká Republika, n-3 polynenasycené mastné kyseliny byly zakoupeny od firmy EPAX (Sandvika, Norsko).
Odborná etická komise MŠMT schválila projekt pokusů pro práci s těmito zvířaty.

Stanovení exprese mRNA

Pro izolaci mRNA byl použit standardní RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Koncentrace a čistota mRNA byla ověřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Pro Syntézu cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). Stanovení bylo provedeno na 1536jamkových destičkách za použití Automate Labcyte Echo (Dublin, Ireland) a LightCycler 1536 Instrument (Roche). Pro stanovení byly použity sondy TaqMan Gene Expression Assays. Získaná data byla zpracována metodou „Delta-Delta Ct“ a veškeré výsledky byly normalizovány a vztaženy ke genům Hprt a Actb (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Statistické zpracování

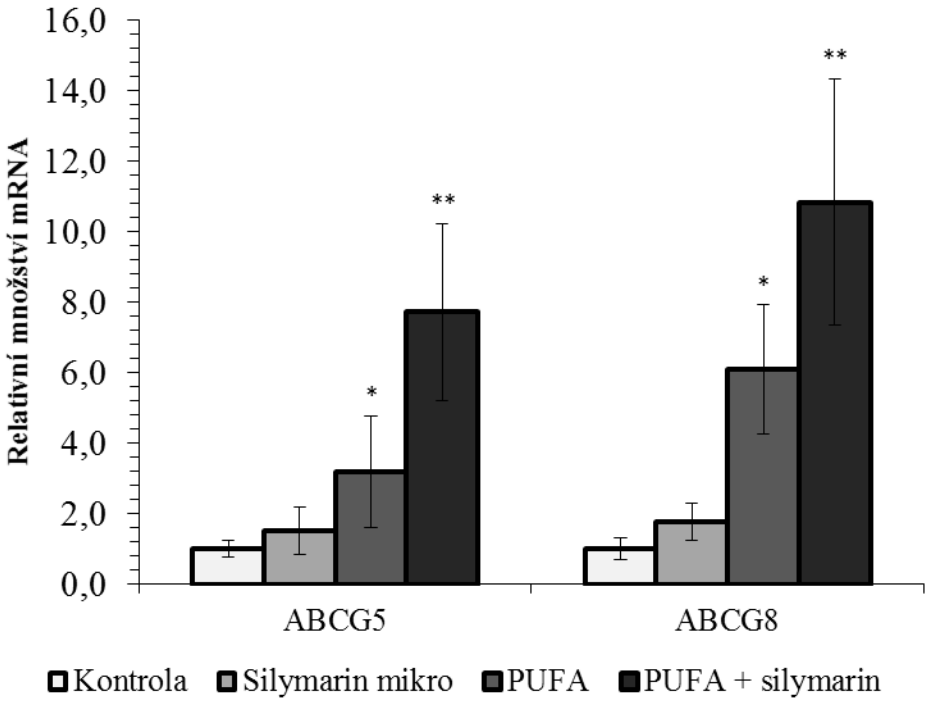
Všechny výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SD, $n \geq 5$. Získaná data byla statisticky analyzována pomocí testů ANOVA a Studentova *t*-testu s použitím programu Statistica Cz 12 (StatSoft CR, Praha, Česká Republika).

Výsledky a diskuze

U HHTg potkanů, krmených po dobu čtyř týdnů experimentální dietou obohacenou o 1% silymarin nebo o n-3 polynenasycené mastné kyseliny (v dávce 300 mg/kg/den) nebo jejich kombinace, bylo zjištěno zvýšené množství mRNA genů jaterních transportérů ABCG5 a ABCG8 (obr. 1). Statisticky významné zvýšení mRNA bylo zjištěno u diety s obsahem n-3 polynenasycených mastných kyselin a jejich kombinace se silymarinem. V případě ABCG5

byla exprese mRNA zvýšena 11násobně, u ABCG8 se jednalo dokonce o 17násobné zvýšení ($p < 0,0001$). Po dietě obohacené pouze o n-3 polynenasycené mastné kyseliny byla mRNA zvýšena 5násobně u ABCG5 a 8,5násobně u ABCG8 ($p < 0,001$). U diety obohacené o samotný silymarin došlo ke statisticky nevýznamnému zvýšení exprese mRNA obou sledovaných genů.

Naše výsledky ukazují, že kombinace silymarinu a n-3 polynenasycených mastných kyselin v dietě signifikantně zvyšuje množství mRNA jaterních transportérů, které se významně podílejí na eliminaci cholesterolu z organismu. Deficit, případně mutace ABCG5/8 transportérů může vést k sitosterolémii a je známo, že se významně podílí na rozvoji aterosklerózy (Berge et al. 2000). Již dříve se v našich studiích prokázalo, že dieta, obsahující silymarin, snižuje absorpci cholesterolu ze střeva u potkanů krmených vysoce cholesterolovou dietou (Sobolová et al. 2006). Podobné výsledky se změnami v expresi mRNA ABCG5/8 transportérů jsme získali již v dřívější studii na zdravých potkanech kmene Wistar, krmených vysoce cholesterolovou dietou se silymarinem (Večeřa et al. 2011).



Obrázek 1. Změna jaterní exprese mRNA sledovaných genů ABCG5 a ABCG8 u HHTg potkana po čtyřech týdnech podávané diety. Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), Silymarin mikro (STD + mikronizovaný silymarin), PUFA (STD + n-3 polynenasycené mastné kyseliny) a PUFA + silymarin (STD + mikronizovaný silymarin + n-3 polynenasycené mastné kyseliny). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, * $p < 0,001$ vs. kontrola, ** $p < 0,0001$ vs. kontrola.

Další sledovaný transportní protein byl ABCA1, který je odpovědný za formování HDL částic a za tzv. reverzní transport cholesterolu. Deficit, či mutace ABCA1 genu by mohla vést k rozvoji Tangierové nemoci, charakterizované vážným snížením HDL (Puntoni et al. 2012). V naší studii však nebylo zjištěno významné ovlivnění exprese mRNA po podání experimentální diety složené z 1% silymarinu, ani z n-3 polynenasycených mastných kyselin (v dávce 300 mg/kg/den). Byl objeven jen mírný trend ke zvýšení exprese mRNA ABCA1 (tab. 1)

Tabulka 1. Změna exprese mRNA sledovaného genu ABCA1 u HHTg potkana po čtyřech týdnech podávané diety. Kontrola - standardní laboratorní dieta (STD), Silymarin mikro (STD + mikronizovaný silymarin), PUFA (STD + n-3 polynenasycené mastné kyseliny) a PUFA + silymarin (STD + mikronizovaný silymarin + n-3 polynenasycené mastné kyseliny).

	Kontrola	**Silymarin mikro**	**PUFA**	**PUFA + silymarin**
Hodnota	1,00	1,18	1,29	1,29
SD	0,38	0,60	0,27	0,15

Závěr

Naše výsledky ukazují, že podání diety složené z kombinace silymarinu a n-3 polynenasycených mastných kyselin pravděpodobně působí synergicky na zvýšení množství mRNA sledovaných transportních proteinů ABCG5 a ABCG8. Statisticky signifikantní zvýšení mRNA způsobila také dieta obohacená jen o n-3 polynenasycené mastné kyseliny. V naší studii se nám nepodařilo prokázat, že silymarin a n-3 polynenasycené mastné kyseliny ovlivňují mRNA transportního proteinu ABCA1.

I přes naše pozitivní výsledky jsou stále zapotřebí další studie věnující se ať již silymarinu samotnému, tak jeho kombinaci s jinými hypolipidemicky působícími látkami.

Autoři děkují za finanční podporu grantu GAČR P303/13-10813S.

Literatura

Balasubramaniam S, Simons LA, Chang S, Hickie JB.: Reduction in plasma cholesterol and increase in biliary cholesterol by a diet rich in n-3 fatty acids in the rat. J Lipid Res 1985; 26: 684-689.

Berge KE, Tian H, Graf GA, et al.: Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. Science 200; 290: 1771-1775.

Brown JM, Yu L.: Opposing gatekeepers of apical sterol transport: Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) and ATP-Binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8). Immunol Endocr Metab Agents Med Chem 2009; 9: 18-29.

Fielding CJ, Fielding PE.: Molecular physiology of reverse cholesterol transport. J Lipid Res 1995; 36: 211-228.

Poruba M, Kazdová L, Oliyarnyk O, et al.: Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. Xenobiotica 2015; 45: 751-756.

Puntoni M, Sbrana F, Bigazzi F, Sampietro T.: Tangier disease: epidemiology, pathophysiology, and management. Am J Cardiovasc Drugs 2012; 12:303-311.

Sobolová, L, Škottová N, Večeřa R, Urbánek K.: Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. Pharmacol Res 2006; 53: 104-112.

Večeřa R, Zachařová A, Orolin J, et al.: The effect of silymarin on expression of selected ABC transporters in the rat. Vet Med 2011; 56: 59-62.

Vrána A, Kazdová L.: The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. Transplant Proc 1990; 22: 2579.

Wang LJ, Song BL.: Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. Biochim Biophys Acta 2012; 1821: 964-972.

Zicha J, Pechanová O, Cacányiová S, et al.: Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? Physiol Res 2006; 55(Suppl. 1): S49-63.

PHYTOSOME FORMS OF SILYMARIN AND SILYBIN IMPROVES INSULIN RESISTANCE AND OXIDATIVE STRESS IN THE SPONTANEOUSLLY HYPERTENSIVE RATS OVEREXPRESSING HUMAN C- REACTIVE PROTEIN

O. Oliyarnyk[1], H. Malinská[1], J. Trnovská[1], I. Marková[1], V. Škop[1], L. Kazdová[1], M. Poruba[2], R. Večeřa[2], M. Pravenec[3]

[1]*Center for Experimental Medicine, IKEM, Prague, Czech Republic*
[2]Institute of Pharmacology, *Palacky University, Olomouc, Czech Republic.*
[3]*Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic.*

Abstract

Curative effect of the extract from *Silybum marianum* - silymarin and its major component silybin is well known, but its mechanisms were not elucidated yet. We investigated the effect of these compounds on hyperglycemia, dyslipidemia, inflammation and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats expressing human C-reactive protein. Silymarin and silybin reduced plasma IL-6 (26%, -13%), glycemia (-11%, -10%) and insulinemia (-42%, -36%) respectively. Plasma triacylglycerols decreased only after silymarin supplementation (-28%), total cholesterol- only after silybin (-10%). Treatment with both compounds reduced concentration of lipoperoxidation products in liver and myocardium. Liver GSH/GSSG ratio markedly increased after silymarin (+43%) and silybin (+55%) treatment. Myocardial GSH level elevated after silymarin (+16%) and silybin (+13%). Both substances activated antioxidant enzymes in liver: superoxide dismutase (silymirin+28%; silybin +44%), catalase (silymirin+31%; silybin +39%) and paraoxonase 1 (silymirin+23%; silybin+27%). Silybin was more effective for the activation of antioxidant enzymes in myocardium: superoxide dismutase (+62%) and glutathione reductase (+22%). Activity of glutathione peroxidase increased after treatment with silymarin (+30%) or silybin (+29%). Results indicate that silybin is more effective than silymarin for the therapy of metabolic syndrome related disorders.

Introduction

Growing evidence indicate that chronic inflammation and oxidative stress might promote disorders associated with metabolic syndrome like type 2 diabetes, nonalcoholic steatohepatitis and cardiovascular diseases (1). Recently, more attention has been paid to natural herbal remedies in attempt to reduce these complications, especially because of their lesser adverse side effects, lower costs and acceptability among patients (2). Silymarin, the active component of the milk thistle from *Silybum marianum* was used for ages in therapy of toxic liver damage including chronic inflammatory liver diseases, acute and chronic viral hepatitis, liver cirrhosis, paracetamol damage and *Amanita phalloides* poisoning. Silymarin is a complex of flavonolignans: silybin, isosilybin, silydianin, silychristin, flavonoids (taxifolin, quercetin) and polyphenols. The most effective component of silymarin is silybin, which represents about 50% to 70% of the silymarin extract (3). Multiple properties seem to be linked with curative effect of silymarin and silybin: down regulating of proinflammatory cytokines, free radical scavenging activity, prevention of glutathione oxidation and depletion, membrane stabilizing effect, inhibition of arachidonic acid metabolism and increased protein synthesis (4). Earlier studies have not described the comparative effect of silymarin and silybin on disorders, associated with metabolic syndrome and have not done complete investigation of the influence of these substances on the oxidative stress parameters.

Unfortunately, silymarin and silybin have low absorption from the gastrointestinal tract due to poor aqueous solubility and miscibility with membrane lipids. Using phytosomes (complex

silymarin or silybin with phosphatidylcholine) might be beneficial for increase of their metabolic activity.
In current study we compared the effects of silymarin and silybin extract on plasma concentration of inflammatory biomarker IL-6, disorders associated with metabolic syndrome (hyperglycemia, hyperinsulinemia and dyslipidemia), concentration of lipoperoxidation products: initial-conjugated dienes and final-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), glutathione balance (concentration of reduced - GSH and oxidized-GSSG forms), the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase - SOD, glutathione peroxidase - GSH-Px, glutathione reductase - GR, glutathione transferase-GST, catalase, paraoxonase1 - PON-1) in liver and myocardium in experimental model of hypertension, insulin resistance and inflammation- spontaneously hypertensive rats (SHR) expressing human C-reactive protein (CRP).

Materials and Methods
The experiments were carried on male 4 months old SHR rats. Transgenic rats (Tg) were derived by microinjecting SHR zygotes with a construct contained cDNA of human CRP under control of the liver - specific ApoE promoter. Rats were fed a standard laboratory diet and divided in four groups: 1) Control - SHR rats without supplementation; 2) Tg-transgenic SHR rats without supplementation; 3) Tg + SM-transgenic SHR rats supplemented with phytosomes containing silymarin extract (1%, Silymarin ®, Indena, Italy); 4) Tg + SB-transgenic SHR rats supplemented with phytosomes containing silybin extract (0.5%, Siliphos®, Indena, Italy). Biochemical analysis was performed using methods described before (5).

Results
Increased inflammation in transgenic SHR rats expressing human CRP was associated with elevated plasma IL-6 concentration. Supplementation with silymarin or silybin ameliorated production of this proinflammatory cytokine (Table 1).
Transgenic expression of CRP did not affected parameters of insulin resistance in SHR rats, but treatment with silymarin or silybin decreased plasma glucose and insulin. TAG concentration reduced in plasma only after silymarin treatment. In contrast, only supplementation with silybin decreased total cholesterol. Plasmatic HDL-cholesterol and tissues TAG levels were unaffected (Table 1).
Aggravated oxidative stress in liver in transgenic SHR rats was determined as increased level of conjugated dienes and TBARS. As shown in the Table 2, concentrations of these substances were reduced after silymarin or silybin supplementation. Concentration of GSH was unaffected by silymarin or silybin, but the level of GSSG was decreased. As a consequence GSH/GSSG- ratio markedly elevated. However, liver activities of glutathione-dependent antioxidant enzymes (GSH-Px, GR and GST) were unaffected (Table 2). In contrast, other antioxidant enzymes (SOD, catalase and PON1) in liver were activated after silymarin or silybin treatment without any significant difference in efficiencies.
Elevated oxidative stress in myocardium in transgenic SHR rats was shown as increased TBARS concentration that was reduced after silymarin and silybin treatment (Table 2). Expression of human CRP was associated with impaired antioxidant defense in myocardium: decreased concentration of GSH and activities of GSH-Px, SOD and PON1. Treatment with silymarin improved GSH concentration and activated GSH-Px. In contrast, supplementation with silybin was more effective: increased GSH level and activities of GSH-Px, GR and SOD (Table 2). GST activity was unaffected (data not shown).

Discussion

SHR rats expressing human CRP is a model of chronic inflammation, which is associated with insulin resistance and oxidative stress. Anti-inflammatory activity of silymarin and silybin was shown as decreased plasma IL-6 concentration. Anti-inflammatory effect of these substances were observed in patients with non-alcoholic fatty liver disease (6) and after coronary artery bypass surgery (7). Reduced levels of CRP and proinflammatory cytokines such as TNFα, IL-1β, IL-2, IL-6 and INF-γ after silymarin treatment were shown in experimental studies in rats fed a high fructose diet (8), after alcohol (9) and sodium nitrite cytotoxity (10).

Table 1. Metabolic parameters in plasma of SHR rats after silymarin and silybin treatment

	Control	**Transgenic**	**Tg+SM**	**Tg+SB**
IL-6, pg/ml	0.85 ± 0.04	3.41 ± 0.45[a]	1.14 ± 0.12 [b]	2.29 ± 0.19 [bc]
Glucose, mmol/l	6.81 ± 0.11	6.41 ± 0.20	5.73 ± 0.78 [b]	5.78 ± 0.77[b]
Insulin, nmol/l	0.43 ± 0.05	0.36 ± 0.04	0.21 ± 0.02 [b]	0.23 ± 0.04 [b]
Triacylglyceros, mmol/l	0.59 ± 0.03	0.58 ± 0.05	0.45 ± 0.07 [b]	0.54 ± 0.07
Total cholesterol. mmol/l	1.13 ± 0.03	1.10 ± 0.02	1.06 ± 0.08	1.02 ± 0.11[b]
HDL-colesterol, mmol/l	0.93 ± 0.03	0.85 ± 0.03	0.85 ± 0.10	0.78 ± 0.03

Table 2. Parameters of oxidative stress in SHR rats after silymarin and silybin treatment

	Control	**Transgenic**	**Tg+SM**	**Tg+SB**
Liver				
Conjugated dienes, nmol/mg_{prot}	33 ± 2	45 ± 4[a]	30 ± 1[b]	34 ± 2[b]
TBARS, nmol/mg_{prot}	1.15 ± 0.07	1.77 ± 0.11[a]	1.56 ± 0.16[b]	1.23 ± 0.13 [b]
GSH, µmol/ mg_{prot}	71.8 ± 1.5	62.0 ± 0.53[a]	61.3 ± 0.8	67.7 ± 22.3
GSSG, µmol/ mg $_{prot}$	1.83 ± 0.02	2.19 ± 0.02[a]	1.47 ± 0.22 [b]	1.26 ± 0.14 [b]
GSH/GSSH	39.9 ± 0.03	29.9 ± 0.01	43.4 ± 3.6 [b]	55.1 ± 3.7 [b]
GSH-Px, µmol NADPH/min/mg_{prot}	322 ± 15	279 ± 26	312 ± 13	292 ± 24
GR, nmol NADPH/min/mg_{prot}	126 ± 9	92 ± 4[a]	93 ± 5	85 ± 6
SOD, U/mg_{prot}	0.126 ± 0.007	0.100 ± 0.003[a]	0.128 ± 0.011 [b]	0.144 ± 0.009 [b]
CAT, µmol H_2O_2/min/ mg_{prot}	1391 ± 77	1281 ± 124	1674 ± 135[b]	1786 ± 125 [b]
PON1, µmol PNP/min/mg_{prot}	4.12 ± 0.23	3.79 ± 0.23	4.68 ± 0.26 [b]	4.80 ± 0.33 [b]
Myocardium				
Conjugated dienes, nmol/mg_{prot}	19.5 ± 1.6	16.5 ± 1.2	19.9 ± 1.5	20.7 ± 1.7
TBARS, nmol/mg_{prot}	0.61 ± 0.04	0.79 ± 0.04[a]	0.55 ± 0.04 [b]	0.66 ± 0.05 [b]
GSH, µmol/ mg_{prot}	25.3 ± 2.1	21.0 ± 1.7[a]	24.3 ± 1.1 [b]	23.8 ± 1.9 [b]
GSH-Px, µmol NADPH/min/mg_{prot}	117 ± 7	96 ± 4[a]	125 ± 8 [b]	124 ± 10 [b]
GR, nmol NADPH/min/mg_{prot}	77 ± 4	67 ± 4	71 ± 3	82 ± 4 [bc]
SOD, U/mg_{prot}	0.061 ± 0.004	0.045 ± 0.003[a]	0.042 ± 0.004	0.073 ± 0.006 [bc]
CAT, µmol H_2O_2/min/ mg_{prot}	593 ± 36	684 ± 67	641 ± 61	647 ± 75
PON1, µmol PNP/min/mg $_{prot}$	21.7 ± 0.6	17.1 ± 1.4[a]	17.0 ± 1.4	14.3 ± 1.0

Tukey ANOVA results: [a]denotes significance $p < 0.05$ of Tg vs. Control (strain effect); [b]denotes significant $p < 0.05$ effect of silymarin or silybin supplementation (Tg + SM or Tg+SB vs. Tg); [c]denotes significant $p < 0.05$ effect of silymarin vs. silybin treatment (Tg + SM vs. Tg + SB).

Observed hypoglycemic effect of silymarin and silybin may results from the inhibition of gluconeogenetic metabolic pathway (11).

Treatment with silymarin or silybin decreased plasmatic TAG concentration, which might be due to the inhibition of hepatic de novo lipogenesis (8). Current observation corresponds to our earlier finding using silymarin in hereditary hypertriglyceridemic rats (12) and study from Ali et all. done using phytosomes containing silybin (13). Hypocholesterolemic effect of silybin could be attributed to decrease of the intracellular cholesterol esterification and inhibition of HMG-CoA reductase (13).

Growing evidence indicate that oxidative stress is implicated in the pathogenesis of metabolic syndrome (14). Using silymarin or silybin extract inhibited lipid peroxidation in liver. Current results are in accordance with our previous observation made using extracts of total silymarin in HHTg rats (15) and other studies conducted in rats with fatty liver induced by cholin deficient (16) and high fat diet (17).

Antioxidant effect of silymarin and silybin in liver in transgenic SHR rats could be attributed to the aggravation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense. Both substances improved oxido-reductive balance of important intracellular antioxidant-glutathione. Although we have not shown any increase in GSH concentration, which might be conditioned by the intensive using of GSH during detoxification processes in the liver parenchymal cells (18). Current observation corroborates our earlier study made using silymarin extract in HHTg rats fed a high sucrose diet (15).

Little is elucidated about the antioxidant effect of silymarin and silybin in myocardium. The heart is very sensitive to oxidative stress because of highly metabolism and lower antioxidant defense compared to other organs. Some in vitro and in vivo studies have shown decreased production of free radicals and lipid peroxidation products after treatment with these compounds (19). In present study the level of TBARS was reduced after silymarin or silybin treatment. Myocardial level of GSH elevated after supplementation with both extracts, which corresponds with the study of Salmone et all. made using an experimental model of NASH in mice (20). As a consequence, GSH-dependent antioxidant enzymes were activated. In addition, SOD and GR activity elevated only after treatment with silybin. So silybin was more effective than silymarin for the activation of antioxidant enzymes in myocardium in transgenic SHR rats.

The inhibitory effect of silymarin and silybin on lipid peroxidation at first could be attributed to a direct silybin free radical scavenging and binding with free radicals making flavonoid radical, which has a greater stability (21). Moreover, silybin induces hepatic protein synthesis, which is important for liver regeneration and elimination of disorders related to oxidative stress (6).

Silybin is reported to enhance the activity of γ-glutamylcysteine synthetase and demonstrated simultaneous increase in the intracellular glutathione level. Moreover, silymarin and silybin are able to protect the SH groups from the oxidative damage through the inhibition of peroxidation of membrane lipids and stabilization of the cell membrane (22). Restoration of GSH level was already observed in NASH in patients (16), fatty liver rats (17), in rats with thioacetamide- induced cirrhosis (13). Another possible mechanism of the activation of antioxidant enzymes could be attributed to the positive effect of silymarin and silybin supplementation on their transcription. In rats after arsenic induced cytotoxity treatment with silybin led to stabilization of the transcription nuclear factor (erythroid-derived 2) - related factor 2 (Nrf2). Nrf2 is a key transcription factor responsible for constitutive and inducible

expression of antioxidant response elements-regulated genes of antioxidant enzymes including SOD, GSH-Px, GST, GR, catalase, and γ-glutamylcysteine synthetase (22). Unfortunately, in current study we have not shown any effect of silymarin and silybin on Nrf2 expression (data not shown).

Conclusion

Treatment with silymarin and silybin in form of phytosomes, which has better bioavailability, of SHR rats expressing human C-reactive protein improved inflammation, hyperglycemia, hyperinsulinemia, dyslipidemia and oxidative stress. Results indicate better efficiency of silybin in the activation of antioxidant defense in myocardium compared to silymarin. Current findings provide an evidence that silymarin and silybin could play a key role in the hepatoprotective, cardioprotective and other curative effects of the extract of *Silybium marianum.*

Supported by grant P303/13-10813S

References

1. **Ebrahimpour Koujan S, Gargari BP, Mobasseri M, et al.:** Effects of Silybum marianum (L.) Gaertn. (silymarin) extract supplementation on antioxidant status and hs-CRP in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. Phytomedicine 2015; 22: 290-296.
2. **Soto C, Perez J, Garcia V, et al.:** Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan-induced diabetes mellitus. Phytomedicine 2010; 17: 1090-1094.
3. **Loguercio C, Andreone P, Brisc C, et al.:** Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. Free Radic Biol Med 2012; 52: 1658-1665.
4. **Li D, Xu D, Wang T, et al.:** Silymarin attenuates airway inflammation induced by cigarette smoke in mice. Inflammation 2015; 38: 871-878.
5. **Skop V, Malinska H, Trnovska J, et al.:** Positive effects of voluntary running on metabolic syndrome-related disorders in non-obese hereditary hypertriacylglycerolemic rats. PLoS One 2015; 10: e0122768.
6. **Hackett ES, Twedt DC, Gustafson DL:** Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. J Vet Intern Med 2013; 27: 10-16.
7. **Altaei T:** Protective effect of silymarin during coronary artery bypass grafting surgery. Exp Clin Cardiol 2012; 17: 34-38.
8. **Prakash P, Singh V, Jain M, et al.:** Silymarin ameliorates fructose induced insulin resistance syndrome by reducing de novo hepatic lipogenesis in the rat. Eur J Pharmacol 2014; 727: 15-28.
9. **Lin CJ, Chiu CC, Chen YC, et al.:** Taurine Attenuates Hepatic Inflammation in Chronic Alcohol-Fed Rats Through Inhibition of TLR4/MyD88 Signaling. J Med Food 2015; 18: 1291-1298.
10. **Sherif IO, Al-Gayyar MM.:** Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of silymarin on hepatic dysfunction induced by sodium nitrite. Eur Cytokine Netw 2013; 24: 114-121.
11. **Colturato CP, Constantin RP, Maeda AS, et al.:** Metabolic effects of silibinin in the rat liver. Chem Biol Interact 2012; 195: 119-132.
12. **Poruba M, Kazdova L, Oliyarnyk O, et al.:** Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. Xenobiotica 2015; 45: 751-756.

13. **Ali SO, Darwish HA, Ismail NA:** Modulatory effects of curcumin, silybin-phytosome and alpha-R-lipoic acid against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. Chem Biol Interact 2014; 216: 26-33.
14. **Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, et al.:** Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β-Cell Dysfunction. Oxid Med Cell Longev 2015; 2015: 181643.
15. **Skottova N, Kazdova L, Oliyarnyk O, et al.:** Phenolics-rich extracts from Silybum marianum and Prunella vulgaris reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. Pharmacol Res 2004; 50: 123-130.
16. **Grattagliano I, Diogo CV, Mastrodonato M, et al.:** A silybin-phospholipids complex counteracts rat fatty liver degeneration and mitochondrial oxidative changes. World J Gastroenterol 2013; 19: 3007-3017.
17. **Haddad Y, Vallerand D, Brault A, Haddad PS.:** Antioxidant and hepatoprotective effects of silibinin in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Evid Based Complement Alternat Med 2011; 2011: nep164.
18. **Kidd P, Head K:** A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos). Altern Med Rev 2005; 10: 193-203.
19. **Gabrielova E, Kren V, Jaburek M, Modrianský M.:** Silymarin component 2,3-dehydrosilybin attenuates cardiomyocyte damage following hypoxia/reoxygenation by limiting oxidative stress. Physiol Res 2015; 64: 79-91.
20. **Salamone F, Galvano F, Marino Gammazza A, et al.:** Silibinin improves hepatic and myocardial injury in mice with nonalcoholic steatohepatitis. Dig Liver Dis 2012; 44: 334-342.
21. **Weber KC, Honório KM, Bruni AT, da Silva AB:** The use of classification methods for modeling the antioxidant activity of flavonoid compounds. J Mol Model 2006; 12: 915-920.
22. **Prabu SM, Muthumani M:** Silibinin ameliorates arsenic induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. Mol Biol Rep 2012; 39: 11201-11216.

KORELACE KLINICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH NÁLEZŮ U OSOB SE ZVÝŠENOU KONCENTRACÍ APOLIPOPROTEINU B-48

CORRELATIONS OF CLINICAL AND BIOCHEMICAL FINDINGS IN SUBJECTS WITH INCREASED CONCENTRATIONS OF APOLIPOPROTEIN B-48

B. Staňková[1], J. Macášek[1], M. Zeman[1], M. Vecka[1], E. Tvrzická[1], L. Vávrová[1], J. Rychlíková[1], M. Jáchymová[2], A. Slabý[1], A. Žák[1]

[1/] IV. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze; [2/] ÚKBLD 1. LF UK a VFN v Praze

Abstrakt

Zvýšené koncentrace apoproteinu (apo) B-48, který je specifickým strukturním apo chylomikronů a jejich remnantních částic, jsou rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění nezávislým na konvenčních rizikových faktorech. Srovnávali jsme osoby se zvýšenou koncentrací apo B-48 (≥ 8,1 mg/l; n = 78) s probandy s normální koncentrací apo B-48 (n = 93). Probandi se zvýšenou koncentrací apo B-48 měli signifikantně větší obvod pasu, vyšší počet komponent metabolického syndromu, častější zastoupení fenotypu B velikosti LDL, index HOMA-IR, koncentrace konjugovaných dienů a oxidativně modifikovaných LDL. V plasmatickém fosftidycholinu vyšší koncentraci kys. stearové, aktivitu D-9 desaturázy a opačné změny D-5 desaturázy. Nižší zastoupení minoritních alel polymorfismů SCD-1 (rs2167444, rs508384) ve skupině s vyšší koncentrací apo B-48 implikuje účast genetických faktorů v patogeneze podskupiny MS s vyšší koncentrací apo B-48.

Úvod

Apolipoprotein B-48 (apo B-48) je specifickým strukturním apolipoproteinem, který je součástí chylomikronů (CM) a remnantních CM (CMr). Apo B-48, je bílkovina, které sestává z 2152 aminokyselin (AA) a je podobný N-terminálnímu konci apo B-100, který obsahuje 4536 AA. U člověka je apo B-48 syntetizován pouze v enterocytech. Apo B-48 mRNA vzniká post-transkripčně enzymovou deaminací, při níž je cytidin v kodónu CAA (pro glutamin) zaměněn za uracil (UAA) se vznikem stop kodónu. Tento proces je popisován jako apo B mRNA editace. CM i CMr obsahují vždy jednu molekulu apo B-48, a tak koncentrace apo B-48 informují o počtu lipoproteinových částic (Sakai et al. 2003; Nakajima et al. 2014).

Bylo prokázáno, že lipoproteiny bohaté triglyceridy (TRL) tj. CM (apo B-48), lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) (apo B-100) a jejich dceřiné částice (remnanty) jsou významným rizikovým faktorem aterotrombotických kardiovaskulárních chorob a nezávislé na koncentracích celkového cholesterolu (TC), triglyceridů (TG), LDL-cholesterolu (LDL-C) i HDL-cholesterolu (HDL-C) (Nakajima et al. 2014).

Bylo prokázáno, že apo B-48 jsou rizikovým faktorem klinicky vyjádřené i subklinické aterosklerózy u diabetiků i u nediabetiků (Nakajima et al. 2014; Mori et al. 2013; Valdivielso et al. 2010; Tanimura et al. 2008) a je asociovány s endoteliální dysfunkcí (Chan et al. 2013). Zvýšená koncentrace apo B-48 byla dále popsány diabetické nefropatie, konečného stádia renálního selhání (Hayashi et al. 2008), obezity, metabolického syndromu a některých fenotypů hyperlipidémií (Sakai et al. 2003).

Cílem pilotní studie bylo analyzovat klinické a laboratorní nálezy ve vztahu k odlišným koncentracím apo B-48 u osob se zvýšeným kardiometabolickým rizikem. Jako mezní hraniční hodnota apo B-48 byla použita koncentrace 8,1 mg/l, která odpovídá 90. percentilu hodnot kontrolních osob (data neuvedena) a je shodná s údaji publikovanými v písemnictví (Nakajima et al. 2014; Otokozawa et al. 2009; Chan et al. 2012).

Materiál a metody

Soubor nemocných sestává ze 173 nemocných konsekutivně vyšetřených v lipidové a diabetické ambulanci IV. interní kliniky 1. LF UK a VFN v Praze v období dubna 2014 až října 2015. Všechny sledované osoby podepsaly informovaný souhlas se zařazením do studie, který byl schválen Etickou komisí 1. LF UK a VFN v Praze.

Diagnostika metabolického syndromu (MS) byla provedena podle kritérií Mezinárodní diabetické federace (International Diabetes Federation, IDF, 2005), (Alberti et al. 2006). Počet komponent, resp. rizikových faktorů MS byl určen na základě přítomnosti dosažených definičních kritérií [obvod pasu, koncentrace triglyceridů (TG), HDL-cholesterolu (HDL-C), krevního tlaku (TK), resp. léčby hypertenze, porušené glykémie nalačno, resp. porušené glukózové tolerance, případně léčby DM]. K dalším komponentám MS se dnes počítá hyperurikémie (kyselina močová > 420 μmol/l) a zvýšená koncentrace malých denzních LDL (sd-LDL, small-dense LDL) (Das 2010). Základní klinická data a antropometrické parametry (tělesná hmotnost, výška, obvod pasu, obvod paže, tloušťka čtyř kožních řas) byly vyšetřeny u všech osob postupy doporučenými na Arlie konferenci (Lochman et al. 1989). Tělesná hustota a podíl tělesného tuku byly určeny ze součtu tloušťky 4 kožních řas (biceps, triceps, subscapularis a suprailiaca) s užitím specifických výpočtů pro daný věk a pohlaví (Duernin a Womersley 1974). Hmotnost tuku byla získána vynásobením tělesné hmotnosti procentuálním podílem tuku.

Žilní krev byla odebírána mezi 7. a 8. hodinou ranní po předchozím 12 hodinovém lačnění. Vzorky krve, obsahující 1 mg/ml EDTA, byly ihned po odběru ochlazeny na 4 - 6 °C, plasma separována do 30 min za stejné teploty při 1000 g po dobu 10 min. Vzorky pro rutinní biochemické a hematologické analýzy byly zpracovány ihned, pro další analýzy byly skladovány při - 80 °C.

Koncentrace celkového cholesterolu (TC), triglyceridů (TG), kyseliny močové a glukózy byly stanoveny pomocí enzymaticko-kolorimetrických metod (CHOD/PAP, GPO/PAP; Boehringer Mannheim; Oxochrom kyselina močová, GOD-PAP Oxochrom Glukosa, Lachema a.s. Brno). Koncentrace HDL-C byla stanovena v supernatantu po srážení LP-B kyselinou fosfowolframovou a Mg^{2+} s použitím komerčního setu Boehringer Mannheim. Hodnoty LDL-C byly stanoveny výpočtem.

Neesterifikované mastné kyseliny (non-esterified fatty acids, NEFA) byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickou metodou (NEFA, Randox Labs, Velká Britanie). Apolipoproteiny byly měřeny Laurellovou raketovou elektroforézou (EIA) s použitím standardů a specifických protilátek proti apo-A1, apo-B (Boehring Werke AG, Marburg, SRN) a proti Lp(a) (Immuno AG, Vídeň, Rakousko). Koncentrace apolipoproteinu B-48 (apo B-48) byly určeny metodou ELISA s pomocí vyšetřovací soupravy Human Apo B-48 ELISA kit (Shibayagi Co., Ltd., Shibukawa, Gunma, Japan). Průměrné koncentrace apo B-48 u zdravých osob se udávají v hodnotách 0,48 ± 0,15 mg/dl (rozsah 0,27 – 0,81 mg/dl) (Nakajima et al. 2014). Imunoreaktivní inzulín (IRI) byl stanoven RIA metodou s použitím dvojích (monoklonálních) protilátek (Insulin IRMA, Imunotech Praha, ČR) v plasmě. Hladiny C-peptidu byly určeny chemiluminiscenční metodou ECLIA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, SRN).

Koncentrace subfrakcí LDL byly analyzovány pomocí vysokoúčinné diskontinuální gelové elektroforézy (Lipoprint ® LDL System, Quantimetrix, U.S.A.). Koncentrace cholesterolu v sd-LDL nad 6 mg/dl nebo průměrná velikost částic LDL ≤ 26.8 nm svědčí pro *fenotyp B velikosti LDL*, čili pro převahu sd-LDL (Gazi et al. 2006).

K stanovení profilu mastných kyselin (FA) byly využity chromatografické metody, vyvinuté na našem pracovišti (Tvrzická et al. 2002). Ke stanovení koncentrace konjugovaných dienů v precipitovaných LDL byla použita modifikovaná spektrofotometrická (Ahotupa et al. 1996).

Koncentrace cirkulujících oxidovaných LDL byly stanoveny metodou ELISA pomocí soupravy firmy Mercodia (Sweden). Koncentrace hs-CRP byly analyzovány ELISA metodou s použitím soupravy Human hs-CRP ELISA (BioVendor, ČR).
U všech sledovaných osob (173) jsme identifikovali řadu genetických odchylek ve 4 genech – *APOE, FADS1, FADS2 a SCD-1*.
Vzorky DNA byly izolovány z leukocytů periferní krve modifikovanou vysolovací metodou (Miller 1988). Poté byla změřena koncentrace a čistota DNA (Nanodrop ND 1000) jako parametry důležité pro optimalizaci dalších metod.
Genetické analýzy byly provedeny pomocí metody PCR – RFLP (restriction fragment length polymorphism) a přímého sekvenování. Přímé sekvenování bylo použito ve všech případech pro potvrzení známého restrikčního místa a známého restrikčního enzymu. V případech, kdy u příslušného SNP není znám restrikční enzym, případně nebylo nalezeno restrikční místo v příslušném úseku DNA, byla provedena analýza konkrétního SNP metodou přímého sekvenování. Izoformy apolipoproteinu E (apo E) byly určeny dříve popsanou metodou RFLP (Hixson a Vernier 1990) s vlastní modifikací analytického postupu (Jáchymová et al. 2001). Finální detekce fragmentů byla provedena pomocí elektroforézy (3 % agarózový gel) s přídavkem ethinium bromidu a vizualizace pod UV lampou. Každá odchylka byla kontrolována nejméně dvakrát různými osobami.
Součástí vyšetření byl výpočet matematických ukazatelů inzulínové senzitivity – HOMA IR a HOMA B (homeostasis model assessment) (Matthews 1985).
Z dalších odvozených parametrů byly vyšetřovány aktivity desaturáz mastných kyselin, které byly vypočteny jako poměr produkt/substrát. Jedná se o výpočet aktivity Δ9-desaturázy (Δ9D); Δ9D16 je vypočtena jako poměr 16:1n-7/16:0, Δ6D18 jako poměr 18:1n-9/18:0. Aktivita Δ6D je vypočtena jako poměr 18:3n-6/18:2n-6. Aktivitu Δ5D reflektuje poměr 20:4n-6/20:3n-6 (Žák et al. 2007; Tosi et al. 2014).
Ke statistickému zpracování dat byl použit software STATISTICA® for Windows. Kategorické veličiny jsou uvedeny v absolutních hodnotách, resp. jako %; kontinuální veličiny jsou vyjádřeny jako průměr a standardní odchylka, resp. jako medián a 25. – 75. percentil. Distribuce kategorických veličin byla testována pomocí $\chi 2$-testu. Frekvence všech genotypů a alel byla testována pro Hardyho-Weinbergerovu rovnováhu pomocí $\chi 2$-testu. Pearsonův $\chi 2$-test byl použit k analýze rozdílů frekvence jednotlivých genotypů, resp. alelických variant (s event. Yatesovou korekcí pro malá čísla). Jako statisticky významné byly použity hodnoty $P < 0.05$.

Výsledky
Tabulka 1 uvádí klinické a laboratorní charakteristiky pacientů se zvýšenou koncentraci apo B-48 (hyper apo B-48, ≥ 8,1 mg/l) ve srovnání se skupinou charakterizovanou normální hladinou apo B-48 (normo apoB-48, < 8,1 mg/l). Obě skupiny se nelišily věkem, hmotnostním indexem, hmotností tukové tkáně, koncentracemi glukózy, NEMK a hs-CRP. Ve skupině probandů s vyšší koncentrací apo B-48 bylo zastoupeno více mužů (60 vs 38 %, P < 0,005) i osob se 3 a více komponentami MS (MSC ≥ 3; 55 vs 33 %, P < 0,004), což odpovídá vyššímu zastoupení osob s MS. Charakteristiku této skupinu doplňuje větší obvod pasu, vyšší koncentrace kyseliny močové, celkového, LDL-C i non-HDL-C a nižší koncentrace HDL-C. Očekávané bylo v této skupině signifikantní zvýšení koncentrací apoB-100, apo B-48 a opačné změny koncentrace apo A-I. Hyperinsulinémie byla spojena se zvýšeným indexem inzulínové rezistence. Zvýšené koncentrace apo B-48 byly asociovány nejen se zvýšenou koncentrací cholesterolu v malých denzních LDL (sd-LDL) a častějším fenotypem velikosti LDL (34 vs 17, %, P < 0,012). Z měřených surogátních markerů oxidačního stresu měla skupina s vyšším apo B-48 vyšší koncentrace konjugovaných dienů v LDL (KD/LDL) i vyšší koncentrace oxidativně modifikovaných LDL (ox-LDL).

Tabulka 1 Klinická a laboratorní charakteristika sledovaných skupin

Parametr	Apo B-48 < 8,1 (mg/l)	Apo B-48 ≥ 8,1 (mg/l)	Významnost
Počet	93	78	-
M/F	35/58	47/31	0,005[c]
Věk (roky)	50,1 ± 15,2[a]	50,5 ± 14,4	0,881
Komponenty MS ≤2/≥3[d]	62/31	35/43	0,004[c]
Fenotyp velikosti LDL (počet);	16/77	27/53	0,012[c]
BMI (kg/m^2)	28,5 ± 5,4	29,9 ± 6,4	0,144
Obvod pasu (cm)	94,3 ± 15,8	99,4 ± 15,2	0,032[b]
Hmotnost tuku (kg)	33,4 ± 10,6	34,6 ± 11,5	0,474
TC (mmol/l)	4,99 ± 1,02	5,68 ± 2,51	0,016
TG (mmol/l)	0,97 (0,72 – 1,28)	1,81 (1,30 – 2,63)	0,005
HDL-C (mmol/l)	1,57 ± 0,46	1,34 ± 0,37	0,001
LDL-C (mmol/l)	2,93 ± 0,87	3,22 ± 0,9923	0,050
non-HDL-C (mmol/l)	3,42 ± 0,96	4,34 ± 2,51	0,001
Apo A1 (g/l)	1,50 ± 0,33	1,40 ± 0,27	0,025
Apo B-100 (g/l)	1,04 ± 0,29	1,19 ± 0,32	0,001
Apo B-48 (mg/l)	4,3 (2, 9 – 6,3)	13,8 (10,4 – 27,5)	0,001
NEMK (mmol/l)	0,55 (0,37 – 0,71)	0,57 (0,42 – 0,72)	0,906
sd-LDL-C (mg/dl)	2,0 (0,0 – 4,0)	3,0 (2,0 – 13,0)	0,001
Glukosa (mmol/l)	5,09 ± 0,67	5,41 ± 1,49	0,067
HOMA-IR (index)	1,669 (1,311 – 3,182)	2,728 (1,694 – 4,519)	0,006
Insulin (μU/ml)	7,79 (6,09 – 13,53)	10,87 (7,51 – 17,62)	0,004
KD (μmol/l)	60,548 ± 15,370	68,244 ± 16,914	0,002
ox-LDL (U/l)	31,7 (17,8 – 55,0)	47,6 (19,7 – 71,9)	0,032
hs-CRP (mg/l)	2,27 (0,92 – 4,24)	2,86 (1,38 – 4,25)	0,906
Kyselina močová (μmol/l)	288 ± 79	335 ± 80	0,001

[a/] průměr ± SD (resp. medián, 25. – 75. percentil); [b/] Studentův t-test;[c/] χ^2 test; [d/] komponenty MS (MSC) – obvod pasu > 94/80 cm (M/F), TG > 1.70 mmol/l; HDL-C < 1.00/1.30 (M/F)) mmol/l (M/F, resp.); TK > 130/85 mm Hg (nebo antihypertensivní léčba), glukóza > 5.60 mmol/l (nebo léčený DM 2. typu);
Zkratky: apo – apolipoprotein, BMI – body mass index, TC – celkový cholesterol; TG – triglyceridy; HDL-C – cholesterol v HDL, LDL-C – cholesterol v LDL, hs-CRP – vysoce sensitivní C-reactive protein, CD-LDL – konjugované dieny v LDL; sd-LDL – malé denzní LDL; NEMK – neesterifikované mastné kyseliny; ox-LDL – oxidativně modifikované LDL; HOMA-IR – index insulinové rezistence; M – muži; F - ženy

Při analýze profilu mastných kyselin v plasmatickém fosfatidylcholinu jsem u skupiny se zvýšenou koncentrací apo B-48 ve srovnání s probandy s normálními koncentracemi apo B-48 zjistili signifikantně zvýšenou koncentraci kys. stearové (C18:0) (14,906 ± 1,620 vs 14,435 ± 1,320; mol %, P < 0,025), spolu se zvýšenou aktivitou Δ-9 desaturázy (Δ9D) pro kyselinu palmitovou (Δ9D16) (0,019 ± 0,006 vs 0,018 ± 0,004; poměr 16:1n-7/16:0; P < 0,018) a sníženou aktivitou Δ5D (3,254 ± 0,766 vs 3,549 ± 0,927; poměr 20:4n-6/20:3n-6; P < 0,026). Aktivitou Δ-6 desaturázy se obě skupiny významně nelišily.
Koncentrace apo B-48 v celé analyzované skupině osob ukazovaly významné korelace s TG (r = 0,543; Spearmanův korelační koeficient; P < 0,001), sd-LDL (r = 0,420; P < 0,001)

celkovým cholesterolem (r = 0,279; P < 0,01), LDL-C (r = 0,249; P < 0,01) a konjugovanými dieny (r = 0,83; P < 0,01). Hladiny apo B-48 negativně korelovaly s HDL-C (r = -0,237; P < 0,05).
Při analýze polymorfismů FADS1 (rs174537G/T; rs174545G/C; rs174546G/A), FADS2 (rs174570C/T; rs174575 C/G; rs174602 T/C; rs 174589 C/G; rs968567 C/T, A, G) jsme neprokázali významnou asociaci genotypů a alel mezi sledovanými skupinami s rozdílnou koncentrací apo B-48. Podobně, nebyla zjištěna významná asociace polymorfismů a alel apoE mezi oběma skupinami.
Analýza polymorfismu stearoyl-CoA desaturázy 1 (SCD-1, Δ9D) prokázala pouze významnou asociaci alel (T/A) polymorfismu SCD-1 (rs2167444) se skupinou s nízkou koncentrací apo B-48 (145/41) a vysokou koncentrací apo B-48 (136/20; $\chi 2$ s Yatesovou korekcí = 4,315; P < 0,038) a podobné asociace alel (C/A) polymorfismu SCD-1 (rs508384) se skupinou s nízkou koncentrací apo B-48 (148/42) a vysokou koncentrací apo B-48 (135/21; $\chi 2$ s Yatesovou korekcí = 3,741; P < 0,053).

Diskuse

Zvýšené koncentrace apo B-48 jsou považovány za RF aterotrombotických klinických komplikací – jako je ischemická choroba srdeční, uzávěrová choroba dolních končetin i stenóz tepen hlavy a krku u diabetiků i nediabetiků. Koncentrace apo B-48 jsou asociovány s progresí aterosklerotických koronárních lézí, s šíří IMT a negativně korelují s endotel-dependentní vasodilatací (Mori et al. 2013; Valdivielso et al. 2010; Tanimura et al. 2008). Jsou jak markerem rizika klinických komplikací aterosklerózy (Mori et al. 2013), ale mají pravděpodobně i proaterogenní potenciál (Nakajima et al. 2014). Ten souvisí s prodlouženým rezidenčním časem TLP, vznikem sd-LDL a ox-LDL, které jsou jejich metabolickými produkty (Nakajima et al. 2014). Studie *in vitro* prokázaly podobnost proaterogenních a prozánětlivých vlastností ox-LDL a remnantních lipoproteinů (sd-LDL, remnantní CM) (Nakajima et al. 2006).
U skupiny probandů vyšetřených v metabolické ambulanci kliniky se zvýšeným rizikem kardiometabolických chorob jsme ve skupině se zvýšenou koncentrací apo B-48 (≥ 8,1 mg/l) prokázali významně vyšší zastoupení mužů. Tento nález je v souladu se zvýšenou koncentrací apo B-48 u mužů. Navíc tato skupina měla vyšší podíl probandů se 3 a více komponentami MS (MSC ≥ 3). Podle definice NCEP AT (2001) tyto odpovídají definičním kritériím MS (Das 2010). MS, podobně jako osoby s hypertriglyceridémií (fenotyp HLP I, III, V), obezitou a DM2 typu mají ve srovnání s kontrolními osobami a vyšší koncentrace apo B-48 (Sakai et al. 2003; Otokozawa et al. 2009).
Zvýšená syntéza CM v enterocytech je stimulována insulinem a je vyšší u stavů s insulínovou rezistencí (Nakajima et al. 2014). V podskupině s vyšší koncentrací apo B-48 byla zjištěny charakteristiky nemocných, které jsou typické pro MS, jako je abdominální distribuce tukové tkáně (vyšší obvod pasu), vyšší koncentrace apo B-100, pokles HDL-C a vzestup TC, TG a non-HDL-C. Rovněž probandi s vyšší koncentrací apo B-48 vykazovali vyšší koncentrace sd-LDL a vyšší podíl fenotypu B velikosti LDL. Fenotyp B velikosti LDL (převaha sd-LDL) je dyslipidemickou komponentou MS. Metabolickým prediktorem sd-LDL jsou vyšší koncentrace TG a aktivita jaterní lipázy (Žák 2016). Koncentrace TG jsou surogátním markerem TRL, mezi které patří VLDL a jejich remnantní částice (IDL), které jsou jaterního původu a obsahují apo B-100 a chylomikronů (CM) a jejich remnantní částice (CMr), které jsou střevního původu a obsahují výlučně apo B-48. Oba typy částic kompetují o stejný lipolytický systém, t.j o lipoproteinovou lipasu (LPL) tukové tkáně a kosterního svalstva a jaterní triglyceridovou lipásu. Pokles katabolismu TRL pak zvyšuje rezidenční čas VLDL, IDL, CM i CMr (Nakajima et al. 2014). Tomuto mechanismu odpovídají námi nalezené

významné korelace mezi koncentracemi apo B-48, na straně jedné, a hladinami TG a sd-LDL na straně druhé a byly popsány dalšími autory (Sato et al. 2009).
Vzestup koncentrace nasycených mastných kyselin se zvýšením aktivit Δ9D, Δ6D a s poklesem aktivity Δ5D je popisován jako jedna z komponent alterace metabolismu mastných kyselin u MS (Žák et al. 2007; Tosi et al. 2014).
Aktivita SCD-1 (resp. Δ9D) je ovlivněna genetickými faktory, činiteli zevního prostředí i chorobnými stavy. Zvýšené aktivity Δ9D jsou spojeny s dyslipidémií, ischemickou chorobou srdeční a MS (Merino et al. 2010; Mauvoisin a Mounier 2011).
Předpokládá se, že aktivita Δ9D je prediktorem hyperglykémie a manifestace DM 2 typu (Warensjö et al. 2008). Zvýšení aktivity Δ9D zvyšuje riziko některých nádorů (Byberg et al. 2014), obezity, distribuce tukové tkáně, insulinové rezistence (Warensjö et al. 2007) i prevalence MS (Gong et al. 2011).
Námi popsaná významná asociace alel (T/A) polymorfismu SCD-1 (rs2167444) a alel (C/A) polymorfismus SCD-1 (rs508384) ukazuje na nižší zastoupení minoritních, protektivních, alel (A) ve skupině s nízkou koncentrací apo B-48. Švédští autoři popsali významnou asociaci minoritních alel čtyř polymorfismů SCD-1 (rs10883463, rs7849, rs2167444, rs508384) s nižším BMI, menším obvodem pasu a menší inzulínovou rezistencí. I když předpokládají vztah minoritních alel k nižší aktivitě D9D, tak rozdíly aktivit D9D mezi nosiči minoritních a běžných alel nebyly signifikantní (Warensjö et al. 2007). Studie na kostarické populaci prokázala významnou asociaci polymorfismu SCD-1 rs1502893 s MS (Gong et al. 2011). Studie španělských autorů prokázala asociaci několika polymorfismů SCD-1 s obezitou. U nosičů minoritních alel rs7849 a rs508384 prokázali nízké riziko obezity, zatímco vliv minoritní alely rs1502593 byl opačný (Martín-Núñez et al. 2013). Kardiometabolické RF (triglyceridy, CRP, IL-6 a glukóza) jsou asociovány s některými polymorfismy SCD-1 (rs508384, rs3071, rs3829160) stejně jako aktivity Δ9D (rs2234970). Byla pozorována signifikantní interakce pro rs508384, příjem PUFA n-3 a změnu glykémie (Rudkowska et al. 2014). V „Epic-Potsdam Study“ byla popsána slabá asociace některých polymorfismů SCD-1 s hladinou TG, glykovaným hemoglobinem a funkčními jaterními testy (Arregui et al. 2012).

Závěry

Naše výsledky potvrzují význam zvýšení koncentrací apo B-48 (≥ 8,1 mg/l) jako indikátoru spojeného se zvýšeným kardiometabolickým rizikem. Vyšší koncentrace apo B-48 jsou významně asociovány s *fenotypem B velikosti LDL* (převaha sd-LDL), zvýšenou úrovní oxidačního stresu, abdominální distribucí tukové tkáně a insulinovou rezistencí. Vyšší koncentrace apo B-48 jsou spojeny se vzestupem aktivity Δ9D a opačnými změnami Δ5D. Nižší zastoupení minoritních alel polymorfismů SCD-1 (rs2167444, rs508384) ve skupině s vyšší koncentrací apo B-48 implikuje účast genetických faktorů v patogeneze podskupiny MS s vyšší koncentrací apo B-48.

Práce byla podpořena výzkumnými projekty – NT/13199-4 IGA MZ ČR, PRVOUK P25/LF1/2 MŠMT ČR a RVO VFN64165/2012 MZ ČR

Reference

Ahotupa M, Ruutu M, Mantyla E.: Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. Clin Biochem 1996; 29: 139-144.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, et al.: Metabolic syndrome - a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. Diabet Med 2006; 23: 469-480.

Arregui1 M, Buijsse B, Stefan N, et al.: Heterogeneity of the Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1)Gene and Metabolic Risk Factors in the EPIC-Potsdam Study. PLoS One 2012; 7: e48338.

Byberg L, Kilander L, Warensjö Lemming E, et al.: Cancer death is related to high palmitoleic acid in serum and to polymorphisms in the SCD-1 gene in healthy Swedish men. Am J Clin Nutr 2014; 99: 551–558.

Chan DC, Wong AT, Yamashita S, et al.: Apolipoprotein B-48 as a determinant of endothelial function in obse subjects with type 2 diabetes mellitus: effects of fenofibrate treatment. Atherosclerosis 2012; 221: 484-489.

Das UN.: Metabolic syndrome pathophysiology. The role of essential fatty acids, 1st Ed. Iowa, USA, Willey-Blackwell 2010, 268 str.

Durnin JV, Womersley J.: Body fat assessed from the total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 71 years. Brit J Nutr 1974; 32: 77-97.

Gazi IF, Filippatos TD, Tsimihodimos V, et al.: The hypertriglyceridemia waist phenotype is a predictor of elevated levels of small, dense LDL cholesterol. Lipids 2006; 41: 647-654.

Gong J, Campos H, McGarvey S, et al.: Genetic Variation in Stearoyl-CoA Desaturase-1 Is Associated with Metabolic Syndrome. Prevalence in Costa Rican Adults. J Nutr 2011; 141: 2211–2218.

Hayashi T, Hirano T, Taira T, et al.: Remarkable increased of apolipoprotein B48 level in diabetic patients with end-stage renal disease. Atherosclerosis 2008; 197: 154-158.

Hixson JE, Vernier DT.: Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. J Lipid Res 1990; 31: 545-548.

Jáchymová M, Horký K, Bultas J, et al.: Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthese gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. Biochem Biophys Res Commun 2001; 284: 426-430.

Lohman T, Roche A, Martorel R. eds. *Standardization of Anthropometric Measurements*. Champaign, Human Kinetics 1989, pp. 39–80.

Martín-Núñez GM, Cabrera-Mulero R, Rojo-Martínez G, et al.: Polymorphisms in the SCD1 gene are associated with indices of stearoyl CoA desaturase activity and obesity: A prospective study. Mol Nutr Food Res 2013; 57: 2177–2184.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al.: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia1985; 28: 412-419.

Mauvoisin D, Mounier C.: Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. Biochimie 2011; 93: 78e86.

Merino DM, Johnston H, Clarke S, et al.: Polymorphisms in FADS1 and FADS2 alter desaturase activity in young Caucasian and Asian adults. Mol Genet Metab 2011; 103: 171-178.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.: A simple salting out procedure for extracting Dna from human nucleated cells. Nucleic Acid Research 1988; 16: 1215.

Mori K, Ishida T, Yasuda T, et al.: Fasting serum concentration of apolipoprotein B48 represents residual risks in patients with new-onset and chronic coronary artery disease. Clin Chim Acta 2013; 421: 51-56.

Nakajima K, Nakano T, Tanaka A.: The oxidative modification hypothesi of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. Clin Chim Acta 2006; 367: 36-47.
Nakajima K, Nagamine T, Fujita MQ, et al.: Apolipoprotein B-48: A Unique Marker of Chylomicron Metabolism. Adv Clin Chem 2014; 64: 117-177.
Otokozawa S, Ai M, Diffenderfer MR, et al.: Fasting and postprandial apolipoprotein B-48 levels in healthy, obese and hyperlipidemic subjects. Metabolism 2009; 58: 1536-1542.
Rudkowska I, Julien P, Couture P, et al.: Cardiometabolic risk factors are influenced by Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) -1 gene polymorphisms and n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation. Mol Nutr Food Res 2014; 58: 1079-1086.
Sakai N, Uchida Y, Ohashi K, et al.: Measurement of fasting serum apoB-48 levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects by ELISA. J Lipid Res 2003; 44: 1256-1262.
Sato I, Ishikawa Y, Ishimoto A, et al.: Significance of measuring serum concentrations of remnant lipopoproteins and apolipoprotein B-48 in fasting period. J Atheroscl Thromb 2009; 16: 12-20.
Tanimura K, Nakajima, Nagao M, et al.: Association of serum apolipoprotein B48 level with the presence of carotid plaque in type 2 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 2008; 81: 338-344.
Tosi F, Sartori F, Guarini P, et al.: Delta-5 and Delta-6 Desaturase: Crucial Enzymes in Polyunsaturated Fatty Acid-related Pathways with Pleitropic Influences in Health and Disease. Adv Exp Med Biol 2014; 114: 1269-1279.
Tvrzická E, Vecka M, Staňková B, et al.: Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionisation detection. Quantitative aspects. Anal Chim Acta 2002; 465: 337-350.
Valdivielso P, Puerta S, Rioja J, et al.: Postprandial apolipoprotein B48 is associated with asymptomatic peripheral arterial disease: A study in patients with type 2 diabetes and controls. Clin Chim Acta 2010; 411: 433-437.
Warensjö E, Ingelsson E, Lundmark P, et al.: Polymorphisms in the SCD1 Gene: Associations With Body Fat Distribution and Insulin Sensitivity. Obesity 2007; 15: 1732-1740.
Warensjö E, Risérus U, Gustafsson IB, et al.: Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2008; 18: 683-690.
Žák A, Tvrzická E, Vecka M, et al.: Severity of metabolic syndrome unfavourable influences oxidative stress and fatty acid metabolism in men. Tohoku J Exp Med 2007; 212: 359-371.
Žák A.: Obezita a poruchy lipidového metabolismu. In Základy obezitologie, M. Kunešová ed. Praha, Galén, 2016, 31-45.

VLIV METABOLITŮ PRODUKOVANÝCH VLÁKNITOU HOUBOU *MONASCUS PURPUREUS* NA PARAMETRY METABOLICKÉHO SYNDROMU U HEREDITÁRNĚ HYPERTRIACYLGLYCEROLEMICKÝCH POTKANŮ

EFFECT OF *MONASCUS PURPUREUS* METABOLITES ON METABOLIC SYNDROME PARAMETERS IN HEREDITARY HYPERTRIACYLGLYCEROLEMIC RATS

V. Škop[1], J. Trnovská[1], I. Marková[1], O. Oliyarnyk[1], H. Malínská[1], M. Hüttl[1], M. Hanáková[2], B. Branská[2], P. Patáková[2], L. Kazdová[1]

[1] Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha
[2] Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Abstract

In Asian countries filamentous fungi *Monascus purpureus* have been used for centuries for the production of food components with positive effects on human health. *Monascus purpureus* produces variety of secondary metabolites (best known is monacolin K - lovastatin), most of them with still unknown biological activity. Aim of this study was to determine the effect of *Monascus purpureus* extract containing mostly yellow pigments monascin and ankaflavin on metabolic syndrome related parameters in hereditary hypertriacylglycerolemic (HHTg) rats.

Monascus purpureus CBS 109.07 was cultivated in liquid medium for 12 days and secondary metabolites were extracted using 70% EtOH. Adult HHTg rats were fed a diet containing this extract for 6 weeks. Dosage of monascin and ankaflavin was 6 mg/kg and 2 mg/kg respectively.

Monascus purpureus extract reduces fasting glucose, non-fasting insulinemia and amount of visceral adipose tissue, however, had no effect on brown adipose tissue activity. Positive effect was reduced oxidative and dicarbonyl stress, which was associated with increased activity of antioxidant enzymes and increased level of reduced glutathione.

Results show potential application of yellow pigments *Monascus purpureus* monascin and ankaflavin in the treatment of metabolic syndrome related disorders.

Úvod

Red Mold Rice, Red Yeast Rice (RYR), koji, red koji, anka, ang-kak či ben-koji, jsou označení pro vláknitou houbu *Monascus purpureus* kultivovanou na rýži (Cheng et al. 2010). Tato plíseň je používána především v Asii, kde se používá v potravinářství k dobarvování a dochucování pokrmů. V tradiční čínské medicíně byla červená fermentovaná rýže (Red Yeast Rice, RYR) používána pro své léčivé účinky, zejména ve vztahu ke kardiovaskulárním komplikacím (Heber et al. 1999).

Monascus purpureus produkuje celou řadu sekundárních metabolitů, mezi které patří zejména monakoliny, pigmenty a citrinin. Nejprostudovanějším monakolinem je Monakolin K (více známý pod názvem lovastatin), který byl prvním statinem používaným v klinické praxi (ke schválení FDA došlo v roce 1987) (Vrablík et al. 2005). Monakolin K je inhibitor HMG-CoA reduktázy a tím také biosyntézy cholesterolu a je tak považován za hlavní účinnou složku doplňků stravy s Red Yeast Rice (Lee et al. 2011). Citrinin je toxický sekundární metabolit, který je produkován i dalšími mikroorganizmy jako například *Aspergillus* a *Penicillium*. Tento mykotoxin vykazuje hepatotoxické, nefrotoxické a mutagenní účinky a jeho hladina by měla být v produktech obsahujících *Monascus purpureus* kontrolována (Sabater-Vilar et al. 1999). Kvůli možné přítomnosti citrininu a vzhledem k nejednotné dávce

monakolinu K, který zejména v kombinaci s dalšími hypolipidemiky může mít negativní účinky, se přípravky (zejména doplňky stravy) obsahující RYR nedoporučují (Patel 2016).
Další sekundární metabolity produkované vláknitou houbou rodu *Monascus* se pro svoji barevnost označují jako pigmenty a v současnosti jich bylo popsáno již více než 50. Výzkum je však převážně soustředěn na šest hlavních pigmentů. Jsou to oranžové pigmenty rubropunktatin a monaskorubrin, dále červené pigmenty rubropunktamin a monaskorubramin a žluté pigmenty monascin a ankaflavin (Zhong et al. 2015). Tyto pigmenty vykazují širokou škálu biologických aktivit, včetně antibakteriálních, antimykotických, imunosupresivních, hepatoprotektivních antioxidačních a hypolipidemických účinků (ovlivňují hladiny cholesterolu zejména inhibicí cholesteryl ester transfer proteinu). Avšak některé z těchto pigmentů mají výrazně negativní účinky, zejména cytotoxické, embryotoxické a teratogenní (Patáková 2013). Zejména pro jejich hypolipidemické, antioxidační a protizánětlivé působení by některé z pigmentů produkovaných *Monascus purpureus* mohly nalézt uplatnění při léčbě poruch spojovaných s metabolickým syndromem. Přítomnost toxicky působících pigmentů, citrininu a monakolinu K však značně komplikuje nejen jejich využití, ale i testování potenciálních biologických aktivit. Vliv jednotlivých pigmentů na poruchy spojené s metabolickým syndromem tak prozatím není dostatečně objasněn.
Důležitou vlastností *Monascus purpureus* je produkce různých sekundárních metabolitů v závislosti na kultivačních podmínkách. Kultivace může probíhat buď tradičně na pevné fázi, kterou tvoří nejčastěji rýže, ale také semena chlebovníku a ovesná či pšeničná zrna, nebo submerzně v kapalném médiu. Výsledné složení sekundárních metabolitů je možné ovlivnit délkou fermentace, množstvím kyslíku, teplotou a osvětlením. U submerzní kultivace je možné dále řídit tvorbu sekundárních metabolitů pomocí pH a zdroje dusíku (organický/anorganický). Hlavní výhodou kultivace v kapalném médiu je snadné řízení procesu, kratší doba kultivace a vyšší kvalita získaných sekundárních metabolitů.
Cílem této studie bylo testovat vliv ethanolového extraktu vláknité houby *Monascus purpureus* kultivované v kapalném médiu na parametry metabolického syndromu u hereditárně hypertriacylglycerolemických potkanů. Extrakt použitý v tomto experimentu měl definované složení a *Monascus purpureus* byla kultivována za podmínek podporujících tvorbu žlutých pigmentů a inhibujících tvorbu monakolinu K a citrininu.

Metody

Monascus purpureus CBS 109.07 z holandské sbírky byla kultivována ve sterilním tekutém médiu (50 g/l glukóza, 5 g/l $(NH4)_2SO_4$, 0,5 g/l KCl, 4 g/l KH_2PO_4, 0,01 g/l $ZnSO_4*7H_2O$, 0,5 g/l $MgSO_4*7H_2O$, 0,01 g/l $FeSO_4*7H_2O$) po dobu 12 dní ve tmě na rotační třepačce při 30°C. Obsah kultivačních baněk byl následně přefiltrován a sekundární metabolity ze získaných micelií byly extrahovány 70% EtOH. Po odpaření do sucha byly negativně působící oranžové pigmenty reakcí s glutamátem sodným rozpuštěným ve směsi ethanol: voda 1:1 převedeny na červené. Tento extrakt byl přidán do standardní krmné diety tak, že denní dávka žlutých pigmentů byla - monascin: 6 mg/kg a ankaflavin: 2 mg/kg. Obsah oranžových pigmentů byl pod detekčním limitem HPLC metody, červené pigmenty a monakolin K nebyly stanoveny (vzhledem k délce kultivace by se monakolin K neměl tvořit), extrakt obsahoval i malé množství citrininu (denní dávka citrininu byla 1,7 μg/kg).
Extrakt byl v dietě podáván dospělým hereditárně hypertriacylglycerolemickým (HHTg) potkanům po dobu 6 týdnů. Placebo u kontrolní skupiny bylo tvořeno roztokem, ve kterém byl suchý extrakt rozpuštěn. HHTg potkani byly vyselektováni z kmene Wistar jako model lidské hypertriacylglycerolemie. U tohoto kmene potkanů se však vyskytují i další abnormality, zejména inzulínová rezistence, poruchy glukózového metabolizmu a hypertenze. Koncentrace triacylglycerolů (TAG), glukózy, celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu a neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) byla stanovena komerčními analytickými

soupravami (Erba Lachema, ČR, Roche Diagnostics, Švýcarsko, resp.). Obsah TAG ve tkáních byl určen podle metody popsané v publikaci (Qi et al. 2002), koncentrace inzulínu byla měřena komerčním imunochemickým kitem Rat Insulin ELISA kit (Mercodia, Švédsko). Metabolické parametry bílé a hnědé tukové tkáně byly stanoveny *ex vivo*. Oxidace (inkorporace do CO_2) glukózy a její inkorporace do intracelulárních lipidů byla stanovena inkubací tkáně v přítomnosti radioaktivně (^{14}C-U) značené glukózy. Lipolýza byla sledována podle uvolňování NEMK z tkáně do média. Koncentrace produktů lipoperoxidace, TBARS, byla stanovena spektrofotometricky reakcí s kyselinou thiobarbiturovou. Koncentrace oxidovaného a redukovaného glutathionu (GSSG a GSH) byla stanovena HPLC kitem (ChromSystems, Německo). Aktivity antioxidačních enzymů superoxiddismutázy (SOD), glutathionperoxidázy (GSH-Px), glutathionreduktázy (GR) a glutathion-S-transferázy (GST) byly určeny s využitím kitů Cayman Chemicals assay kits (Cayman Chemicals, USA). Aktivita katalázy (CAT) byla měřena spektrofotometricky na základě úbytku H_2O_2 a jeho reakce s molybdenanem amonným. Aktivita glyoxalázy I (GLO I) byla měřena spektrometricky v UV oblasti jako rychlost tvorby S-D-lactoylglutathionu z methylglyoxalu a GSH. Obsah reaktivních dikarbonylů byl stanoven HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci 1,2-diamino-benzenem. Relativní míra genové exprese (kvantifikace mRNA) byla určena metodou RT-qPCR s využitím kitu TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA)

Výsledky a diskuze

Změny v základních biochemických parametrech po podávání extraktu z *Monascus purpureus*, HHTg potkanům jsou shrnuty v tab. 1. Podávání extraktu obsahující zejména žluté a červené pigmenty vedlo ke snížení lačné glykémie a postprandiální inzulinémie, což ukazuje na mírné zlepšení inzulínové senzitivity. Extrakt z *Monascus purpureus* dále pozitivně ovlivnil metabolizmus lipidů snížením ektopického ukládání lipidů v játrech a srdci. Avšak plazmatické parametry lipidového metabolizmu nebyly výrazně ovlivněny. Dále jsme studovali vliv extraktu z *Monascus purpureus* na metabolické vlastnosti viscerální bílé a interskapulární hnědé tukové tkáně (tab. 2). Pozitivní změnou bylo snížení hmotnosti epididymálního tukového tělesa (ETT) a zvýšení bazální lipogeneze v ETT. Lee et al. (2013) a Hsu et al. (2014) spojovali změny v metabolizmu glukózy a lipidů po podávání žlutých pigmentů se zvýšenou aktivitou transkripčních faktorů PPAR-α a PPAR-γ. Nicméně žádná další skupina tuto hypotézu nepotvrdila a mechanizmus vlivu žlutých pigmentů na tyto parametry tak stále zůstává nejasný.

V posledních letech se pozornost vědců zabývajících se metabolickým syndromem zaměřuje na studium hnědé tukové tkáně. Je to dáno zejména tím, že i malé množství této tkáně je schopno odbourat velké množství energetických zásob, a nedávným objevem, že se aktivní hnědá tuková tkáň u lidí nachází i v dospělém věku (Nedergaard et al. 2010). V hnědé tukové tkáni byla v předchozích studiích prokázána exprese genu pro transkripční faktor PPARα (Iizuka et al. 2013). Aktivace HTT prostřednictvím tohoto faktoru by tak mohla být jedním z mechanizmů pozitivních účinků žlutých pigmentů na metabolizmus. Přímý vliv pigmentů z *Monascus purpureus* na hnědou tukovou tkáň (HTT) nebyl dosud studován. Z tohoto důvodu bylo důležitou částí této studie sledování efektu extraktu z *Monascus purpureus* na metabolické parametry HTT (tab. 2). Celkové množství, obsah bílkovin, ukládání glukózy do lipidů ani její oxidace nebyly v HTT podáváním extraktu ovlivněny. Došlo pouze k mírnému zvýšení uvolňování NEMK do media *ex vivo*. Naše výsledky ukázaly, že podávání pigmentů z *Monascus purpureus* neovlivňuje aktivitu HTT a jejich účinek je tak zprostředkován jinými mechanizmy.

Tabulka 1. Vliv extraktu z *Monascus purpureus* na biochemické a metabolické parametry HHtg potkanů.

parametr	placebo	extrakt	P
tělesná hmotnost (g)	400 ± 10	386 ± 6	NS
Biochemické parametry v plazmě			
glukóza na lačno (mmol/l)	5,15 ± 0,12	4.67 ± 0,12	< 0,05
OGTT (AUC)	861 ± 29	829 ± 11	NS
glukóza postprandiální (mmol/l)	8,67 ± 0,15	7,91 ± 0,23	NS
TAG postprandiální (mmol/l)	6,47 ± 0,64	5,83 ± 0,43	NS
inzulín (nmol/l)	0,219 ± 0,01	0,169 ± 0,02	< 0,05
celkový cholesterol (mmol/l)	1,52 ± 0,03	1,55 ± 0,04	NS
HDL cholesterol (mmol/l)	0,56 ± 0,05	0,54 ± 0,03	NS
NEMK (mmol/l)	0,34 ± 0,03	0,45 ± 0,03	< 0,05
Ektopické ukládání lipidů			
TAG v játrech (μmol/g)	10,37 ± 0,804	7,245 ± 0,432	< 0,05
TAG v srdci (μmol/g)	2,537 ± 0,158	1,733 ± 0,189	< 0,05
TAG v *m. gastrocnemius* (μmol/g)	3,597 ± 0,520	2,713 ± 0,387	NS

Tabulka 2. Vliv extraktu z *Monascus purpureus* na parametry bílé a hnědé tukové tkáně u HHTg potkanů.

parametr		placebo	extrakt	P
Bílá tuková tkáň (epididymální)				
hmotnost ETT (g/100g $_{\text{těl. hm)}}$		1,97 ± 0,1	1,7 ± 0,08	< 0,05
ETT - obsah bílkovin (%)		0,83 ± 0,06	0,88 ± 0,07	NS
ETT - lipogenese (nmol/g/2h)	bazální	199 ± 22	285 ± 17	< 0,05
	+ inzulín	305 ± 26	336 ± 29	NS
Hnědá tuková tkáň (interskapulární)				
hmotnost HTT (g/100g $_{\text{těl. hm)}}$		0,079 ± 0,006	0,074 ± 0,003	NS
HTT - obsah bílkovin (%)		4,55 ± 0,23	4,58 ± 0,21	NS
HTT – lipogenese - glu (nmol/g/2h)		751 ± 33	569 ± 93	NS
HTT – oxidace glukózy (nmol/g/2h)		302 ± 19	250 ± 32	NS
HTT – lipolýza (μmol NEMK/g/2h)		5,47 ± 0,35	6,54 ± 0,3	< 0,05

Významným jevem, který provází rozvoj metabolického syndromu, je zvýšení oxidačního stresu. Antioxidační ochrana nejčastěji pomocí potravinových doplňků se tak zdá být vhodnou doplňkovou léčbou tohoto onemocnění. Rajasekaran et al. (2015) ukázali, že červená fermentovaná rýže má pozitivní vliv na parametry oxidačního stresu. Není však jasné, které ze sekundárních metabolitů jsou za tento efekt zodpovědné, ani není znám mechanizmus tohoto antioxidačního působení. Abychom zjistili, jaké antioxidační účinky má extrakt obsahující zejména žluté pigmenty, stanovili jsme v rámci této studie také základní parametry oxidačního stresu v játrech, srdci a plazmě (tab. 3). Extrakt z *Monascus purpureus* snížil množství TBARS ve všech studovaných tkáních, snížil množství konjugovaných dienů a zvýšil koncentraci GSH a poměr GSH/GSSG v játrech, což ukazuje na snížení lipoperoxidace a oxidačního stresu. Snížení oxidačního stresu bylo alespoň částečně způsobeno zvýšenou antioxidační ochranou, vzhledem k tomu, že jsme ve všech studovaných tkáních nalezli zvýšené katalytické aktivity některých antioxidačních enzymů. Hsu et al. (2013) ukázali, že žlutý pigment monascin je aktivátorem transkripčního faktoru Nrf 2. Protože exprese genů

pro námi studované antioxidační enzymy je ovlivňována tímto transkripčním faktorem, mohla by jeho aktivace být mechanizmem nalezené antioxidační ochrany. Z tohoto důvodu jsme v játrech stanovili expresi Nrf 2 na úrovni mRNA, která však extraktem ovlivněna nebyla. Monascin tak pravděpodobně ovlivňuje Nrf 2 na úrovní proteinu a nikoliv jeho genovou expresi.

Tabulka 3. Vliv extraktu z *Monascus purpureus* na parametry oxidačního a dikarbonylového stresu u HHTg potkanů.

parametr	placebo	extrakt	P
	Játra		
SOD (U/mg)	0,123 ± 0,01	0,176 ± 0,02	NS
GSH-Px (μmol/min/mg)	302 ± 17	358 ± 15	< 0,05
GR (nmol/min/mg)	206 ± 21	179 ± 23	NS
GST (nmol/min/mg)	174 ± 12	220 ± 15	< 0,05
CAT (μmol/min/mg)	1340 ± 99	1763 ± 91	< 0,05
CD (nmol/mg)	32,7 ± 2,1	26,9 ± 2,1	< 0,05
TBARS (nmol/mg)	1,57 ± 0,13	1,13 ± 0,06	< 0,05
GSH (μmol/mg)	54,9 ± 3	67,2 ± 4,1	< 0,05
GSSG (μmol/mg)	3,37 ± 0,3	2,85 ± 0,3	NS
GSH/GSSG	16,7 ± 0,9	24,3 ± 2	< 0,05
3-deoxyglukoson (nmol/mg)	1,28 ± 0,1	1,1 ± 0,06	NS
glyoxal (nmol/mg)	1,39 ± 0,09	1,27 ± 0,07	NS
methylglyoxal (nmol/mg)	4 ± 0,28	2,98 ± 0,17	< 0,05
GLO I (μmol/min/mg)	2,9 ± 0,07	2,86 ± 0,3	NS
GLO I relativní mRNA	1,01 ± 0,06	1,29 ± 0,02	< 0,05
Nrf 2 relativní mRNA	1 ± 0,03	1,14 ± 0,02	NS
	Srdce		
SOD (U/mg)	0,066 ± 0,007	0,088 ± 0,005	< 0,05
GSH-Px (μmol/min/mg)	182 ± 21	216 ± 15	NS
GR (nmol/min/mg)	52,0 ± 3,8	68,9 ±3,5	< 0,05
GST (nmol/min/mg)	46,4 ± 3,9	44,1 ± 2,3	NS
CAT (μmol/min/mg)	615± 42	548 ± 35	< 0,05
CD (nmol/mg)	19,9 ± 1,2	18,9 ± 1,4	NS
TBARS (nmol/mg)	0,67 ± 0,04	0,54 ± 0,05	< 0,05
	Plazma		
SOD (U/ml)	1,56 ± 0,17	2,07 ± 0,12	< 0,05
GSH-Px (μmol/min/ml)	278 ± 12	274 ± 23	NS
GR (nmol/min/ml)	135 ± 11	128 ± 10	NS
GST (nmol/min/ml)	3,6 ± 0,3	4,0 ± 0,4	NS
CAT (μmol/min/ml)	1432 ± 134	2084 ± 161	< 0,05
TBARS (nmol/ml)	1,65 ± 0,18	1,09 ± 0,04	< 0,05

S oxidačním stresem a metabolizmem glukózy úzce souvisí dikarbonylový stres. Reaktivní dikarbonyly (např. glyoxal, methylglyoxal a 3-deoxyglukoson) vznikají v těle zejména jako produkty odbourání glykovaných proteinů, z trióza-fosfátů při odbourávání glukózy a při odbourávání produktů lipoperoxidace. Jejich prekurzory však mohou být i aminokyseliny nebo ketolátky. Tyto reaktivní sloučeniny obsahující dvě karbonylové skupiny vedle sebe pak

reagují s buněčnými složkami a mají za následek vznik pokročilých produktů glykace, oxidační stres, mikro a makrovaskulární komplikace. Reaktivní dikarbonyly jsou spojovány s rozvojem diabetické neuropatie a nefropatie. Přestože Hsu et al. (2013) ukázali, že monascin je schopen zmírnit negativní poruchy způsobené podáváním methylglyoxalu, vliv pigmentů z *Monascus purpureus* na hladiny dikarbonylů nebyl dosud studován. Naše výsledky ukazují, že podávání extraktu z *Monascus purpureus* snižuje množství methylglyoxalu v játrech. Methylglyoxal je nejvýznamnější a nejvíce zastoupený reaktivní dikarbonyl. Snížení jeho množství může být dáno buď nižší tvorbou nebo zrychleným odbouráváním. Nejdůležitějším degradačním mechanizmem je glyoxalázový systém, který využívá GSH a převádí methylglyoxal na D-laktát. Abychom zjistili, jak extrakt z *Monascus purpureus* ovlivní tento systém, stanovili jsme aktivitu glyoxalázy I (GLO I, která katalyzuje první krok této dráhy) a expresi jejího genu na úrovni mRNA. Přestože byla mírně zvýšená exprese, její katalytická aktivita zůstala nezměněná. Zvýšení exprese genu pro GLO I ukazuje na zvýšenou aktivitou transkripčního faktoru Nrf 2, který se podílí na regulaci exprese tohoto genu (Xue et al. 2013). Protože však katalytická aktivita GLO I zůstala nezměněná, snížení množství methylglyoxalu tak nejspíše nebylo způsobeno zvýšením množství tohoto enzymu. S degradcí methylglyoxalu pomocí glyoxalázového systému souvisí také metabolizmus glutathionu. Zvýšené množství GSH a lepší poměr GSH/GSSG tak může být jedním z hlavních důvodů sníženého množství methylglyoxalu. Je dále možné, že nižší množství methylglyoxalu je dáno jeho sníženou tvorbou, kdy vlivem podávání extraktu z *Monascus purpureus* byly zlepšeny parametry glukózového metabolizmu a oxidačního stresu, které tvorbu reaktivních dikarbonylů výrazně ovlivňují.

Závěr

Extrakt ze submerzně kultivované vláknité houby *Monascus purpureus*, který obsahoval zejména žluté pigmenty monascin a ankaflavin, výrazně zlepšil parametry oxidačního a dikarbonylového stresu, měl dále pozitivní účinky na metabolizmus glukózy a snížil množství viscerální tukové tkáně. Extrakt z *Monascus purpureus* však neovlivnil aktivitu hnědé tukové tkáně. Výsledky ukazují potenciální využití žlutých pigmentů *Monascus purpureus* při léčbě poruch spojených s metabolickým syndromem.

Studie byla podpořena a projektem MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001“)

Literatura

Heber D, Yip I, Ashley JM, et al.: Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. Am J Clin Nutr 1999; 69: 231-236.

Hsu WH, Lee BH, Chang YY, et al.: A novel natural Nrf2 activator with PPARγ-agonist (monascin) attenuates the toxicity of methylglyoxal and hyperglycemia. Toxicol Appl Pharmacol 2013; 272: 842-851.

Hsu WH, Pan TM.: Treatment of metabolic syndrome with ankaflavin, a secondary metabolite isolated from the edible fungus Monascus spp.Appl Microbiol Biotechnol 2014; 98: 4853-4863.

Cheng MJ, Wu MD, Yang PS, et al.: Secondary metabolites isolated from the fungus Monascus kaoliang-fermented rice. J Chil Chem Soc 2010; 55: 107–110.

Iizuka K, Wu W, Horikawa Y, et al.: Feedback looping between ChREBP and PPARα in the regulation of lipid metabolism in brown adipose tissues. Endocr J 2013; 60: 1145-1153.

Lee CL, Pan TM.: Red mold fermented products and Alzheimer's disease: a review. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 91: 461-469.

Lee CL, Wen JY, Hsu YW, Pan TM.: Monascus-fermented yellow pigments monascin and ankaflavin showed antiobesity effect via the suppression of differentiation and lipogenesis in obese rats fed a high-fat diet. J Agric Food Chem 2013; 61: 1493-1500.
Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B.: Three years with adult human brown adipose tissue. Ann N Y Acad Sci 2010; 1212: E20-36.
Patakova P.: Monascus secondary metabolites: production and biological activity. J Ind Microbiol Biotechnol 2013; 40: 169-181.
Patel S.: Functional food red yeast rice (RYR) for metabolic syndrome amelioration: a review on pros and cons. World J Microbiol Biotechnol 2016; 32: 87.
Qi N, Kazdová L, Zídek V, et al.: Pharmacogenetic evidence that cd36 is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone. J Biol Chem 2002; 277: 48501-48507.
Rajasekaran A, Kalaivani M.: Protective effect of Monascus fermented rice against STZ-induced diabetic oxidative stress in kidney of rats. J Food Sci Technol 2015; 52: 1434-1443.
Sabater-Vilar M, Maas RF, Fink-Gremmels J.: Mutagenicity of commercial Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination. Mutat Res 1999; 444: 7-16.
Vrablik M, Češka R.: Statiny: od lipidologie ke kardiologii. Klin Farmakol Farm 2005; 19: 149–151.
Xue M, Rabbani N, Momiji H, et al.: Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. Biochem J 2012; 443: 213-222.
Zhong S, Zhang X, Wang V.: Preparation and characterization of yellow Monascus pigments. Sep Purif Technol 2015; 150: 139-144.

„ŠKOLA OBEZITY„ - SKUPINOVÁ TERAPIA OBEZITY

A.Tóhátyová, M. Jarčušková, M. Maňíková, J. Šaligová, L. Potačňáková, A. Babičová, K. Fujeríková, I. Schusterová

Klinika detí a dorastu UPJŠ LD a DFN Košice, Slovakia

Detská obezita je jeden z najzávažnejších zdravotných *výziev* 21. storočia, pričom trend nárastu prevalencie je alarmujúci. Detská obezita často pretrváva aj v dospelosti a je spojené s rizikom vzniku srdcovo-cievnych chorôb - aterosklerózy, „kardiomyopatie obéznych“, a DM. Nadváha a obezita, ako aj s ňou súvisiace ochorenia sú do značnej miery preventabilné. Avšak, u tretiny obéznych jedincov nikdy nevznikne kardiovaskulárne ochorenie, táto skupina sa nazýva metabolicky "zdraví" obézni. Ambulancia preventívnej kardiológie (Detská fakultná nemocnica v Košiciach) sa zameriava na ambulantnú skupinovú terapiu obezity a stratifikáciu kardiovaskulárneho rizika u detí a adolescentov. Organizovaný tím špecialistov sa venuje interdisciplinárnemu programu - „Školy obezity“. Cieľom tohto programu je vyhrať boj proti obezite, prevencia a včasná diagnostika kardiovaskulárnych ochorení spojených s obezitou a liečba detskej obezity novým spôsobom.

“SCHOOL OF OBESITY” - GROUP THERAPY FOR OBESITY

A.Tóhátyová, M. Jarčušková, M. Maňíková, J. Šaligová, L. Potačňáková, A. Babičová, K. Fujeríková, I. Schusterová

Faculty of Medicine, Pavol Jozef Safarik University in Kosice, Slovakia

Childhood obesity is one of the most serious public health challenges of the 21st century. The prevalence of obesity has increased at an alarming rate. Overweight and obese children are likely to stay obese into adulthood and more likely to develop noncommunicable diseases like diabetes and cardiovascular diseases at a younger age. Overweight and obesity, as well as their related diseases, are largely preventable. However, a third of obese individuals never develop cardiovascular disease; and this group is called the metabolically “healthy” obese. Our Preventive cardiology clinic, (Children's Faculty Hospital in Kosice) focuses on group outpatient therapy for obesity, and also on cardiovascular risk stratification in children and adolescent. Highly organized team of specialists is working on interdisciplinary outpatient program - “Obesity reduction program- School of Obesity”. The goal of this program is to win the fight against obesity- prevention of cardiovascular disease associated with obesity, and treatment of childhood obesity by new ways.

VÝZNAM VČASNEJ DIAGNOSTIKY SUBKLINICKEJ ATEROSKLERÓZY U DETÍ S CHRONICKÝMI OCHORENIAMI

A.Tóhátyová, I. Schusterová, M. Jarčušková, E. Sádová

Klinika detí a dorastu UPJŠ LD a DFN Košice, Slovakia

Ateroskleróza začína už v detstve a o jej progresii rozhodujú rovnaké rizikové faktory jako u dospelých. V detskom veku nedochádza ku klinickej manifestácii ochorenia, ale dá sa zistiť prítomnosť rizikových faktorov podporujúcich rozvoj aterosklerotických zmien. Patologické štúdie u detí a adolescentov potvrdili priamu súvislosť medzi počtom a intenzitou rizikových faktorov a závažnosťou aterosklerotických zmien. Chronické ochorenia obličiek, diabetes mellitus, familiárna hypercholesterolémia patria do skupiny vysoko rizikových faktorov kardiovaskulárneho ochorenia. Detekcia funkčných a morfologických zmien artériovej steny (hrúbka intimo-medie karotíd, endotelová dysfunkcia, rýchlosť pulznej vlny) môžu odhaliť závažnosť kardiovaskulárneho postihnutia u vysokorizikových detí z pohľadu kardiovaskulárneho rizika. Na konkrétnych kazuistikách je popísaný význam včasnej diagnostiky subklinickej aterosklerózy u detí s chronickými ochoreniami.

EARLY DETECTION OF PRECLINICAL ATHEROSCLEROSIS IN HIGH RISK CHILDREN

A.Tóhátyová, I. Schusterová, M. Jarčušková, E. Sádová

Faculty of Medicine, Pavol Jozef Safarik University in Kosice, Slovakia

The atherosclerotic process begins in childhood, with progression clearly shown to be mediated by the presence of identified risk factors. Pathological studies in children and young adults demonstrate that the extent of atherosclerotic vascular change is associated with both the number of premortem risk factors and their intensity. Chronic kidney disease, diabetes mellitus are the major factors contributing to cardiovascular morbidity and mortality. Non-invasive methods of measuring vascular changes (intimo-media thickness, flow-mediated dilatation, pulse wave velocity) are available to assess the presence and severity of cardiovascular damage. These examinations are well validated as surrogate markers of future cardiovascular events in adult patients with chronic disease (for example with chronic kidney disease), but need technical adaptation, standardization and validation for use in children.

PŘÍZNIVÉ ÚČINKY SALSALATU NA PORUCHY SPOJENÉ S METABOLICKÝM SYNDROMEM

POSITIVE EFFECTS OF SALSALATE ON METABOLIC SYNDROME AND RELATED DISORDERS

J. Trnovská, V. Škop, M. Hüttl, I. Marková, J. Urbanová, H. Malínská, L. Kazdová

Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Abstract

Growing evidence indicate that the metabolic syndrome is associated with a pro-inflammatory state, which may be mediated by cytokines and subsequently cause elevated levels of C-reactive protein that might predispose to an increased risk of type 2 diabetes and its cardiovascular complications (1). Salsalate belongs to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs with minimal side effects on the gastrointestinal tract. The present study evaluated the effect of salsalate on metabolic parameters associated with metabolic syndrome (MS).

We used male hereditary hypertriglyceridemic rats, non-obese strain with dyslipidemia and insulin resistance, as model of metabolic syndrome disturbances. Animals were treated with salsalate mixed as part of standard diet for six weeks. This study showed positive effect of salsalate administration on blood glycaemia, plasma triacylglycerols (TAG), ectopic TAG accumulation in tissue and higher insulin sensitivity of muscle and adipose tissue. Results indicate that salsalate therapy could participate in the improvement of MS disorders and its progression into organ complications as liver steatosis.

Úvod

Součástí poruch provázejících metabolický syndrom (hypertriacylglycerolémie, inzulinová rezistence, hyperinzulinémie) je chronický mírný zánět, který se může podílet na rozvoji diabetu 2. typu a jeho komplikací, včetně jaterní steatózy a kardiovaskulárních onemocnění (1). Tyto nálezy podporují hypotézu, podle které, by léčba tohoto chronického zánětu mohla zmírnit nebo zabránit rozvoji inzulínové rezistence a diabetu. V 60. letech minulého století se salicyláty používaly převážně k léčbě revmatoidních onemocnění a přitom bylo zjištěno, že mohou redukovat koncentrace glukózy v krvi. V roce 1957 Reid a jeho kolegové (2) podávali pacientům s diabetem 2. typu aspirin po dobu 14 dnů. Tato léčba snížila u všech pacientů koncentrace glukózy v krvi a zlepšila vstřebávání glukózy při OGTT. Studie Yin et al. v roce 1998 (3) nastínili mechanizmus účinku salsalatu a aspirinu, jejich protizánětlivé účinky spočívají v inhibici IκB kinázy a následné inhibici transkripční aktivity NF-κB genů a snížení produkce prozánětlivých cytokinů, jako je IL-6, TNFα, MCP-1, CRP.

Problémem při používání aspirinu je, že účinné jsou pouze vysoké dávky, které mají negativní vliv za zažívací trakt, ve kterém mohou způsobit krvácení. Oproti tomu salsalat, neacetylovaná forma salicylátu, nemá negativní účinky na žaludeční sliznici (4-6), protože je nerozpustný v kyselém prostředí žaludku a postupuje do tenkého střeva a tím šetří žaludeční sliznici.

V současnosti se salsalat používá při léčbě revmatoidních onemocnění a to v USA, Kanadě, Austrálii, Indii, Novém Zélandu, Turecku a Velké Británii. Novější klinické studie potvrdily pozitivní účinky salsalatu na poruchy spojené s metabolickým syndromem a prediabetem v dávce 3 – 4,5 g/den (7-10).

Cílem studie bylo zjistit účinky salsalatu u modelu metabolického syndromu – potkanů s hereditární hypertriglyceridémií (HHTg).

Metodika

Samcům kmene HHTg (věk 5 měsíců) byla podávána standardní dieta bez nebo s přidáním salsalatu v dávce 200 mg salsalatu/kg tělesné hmotnosti/den po dobu 6 týdnů.

Množství triacylglycerolů (TAG) v plazmě a po extrakci z tkání, bylo stanoveno analytickou soupravou TG L 250 S (Erba-Lachema, ČR). Neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) byly měřeny komerčním kitem free fatty acids, half micro test (Roche Diagnostic, Německo), koncentrace glycerolu kitem GLY (Randox, UK). Koncentrace sérového inzulínu komerčním imunochemickým kitem RAT Insulin ELISA kit (Mercodia, Švédsko), C-reaktivní protein (CRP; AlphaDiagnostic, USA), vysokomolekulární (HMW) Adiponectin (MyBiosource, USA).

Metabolické parametry svalové tkáně (bránice) byly stanoveny *ex vivo* podle oxidace radioaktivně značené glukózy (inkorporace do CO_2) a její inkorporace do glykogenu a to bez nebo s přidáním inzulínu (250 μU/mL) do inkubačního média. Metabolická aktivita bílé tukové tkáně byla stanovena podle inkorporace radioaktivně značené glukózy do intracelulárních lipidů bez nebo s přidáním inzulínu (250 μU/mL). Lipolýza byla sledována podle uvolňování NEMK a glycerolu do média.

Výsledky a diskuze

Dřívější klinické (10; 11) i experimentální studie (12), prokázaly účinnost salsalatu na snižování glykémie, zlepšení lipidového profilu a inzulínové senzitivity. Mechanizmus působení salsalatu ovšem není dosud zcela objasněn.

V této studii jsme potvrdili, salsalat snižuje koncentrace glukózy v krvi (6,54 ± 0,13 vs. 7,54 ± 0,13 (mmol/l); $p < 0,001$) a zlepšuje lipidový profil v cirkulaci (tab. 1). Navíc se u HHTg potkanů, kterým byl podáván salsalat, nezvýšila tělesná hmotnost oproti kontrolní skupině (začátek pokusu: 391 ± 5 vs. 399 ± 5 (g); konec pokusu 392 ± 5 vs. 432 ± 5 (g); $P < 0,001$), přičemž spotřeba krmiva se mezi kontrolní a pokusnou nelišila. Nižší hmotnost potkanů, kterým byl podáván salsalat, byla spojena převážně s úbytkem viscerální tukové tkáně (3,840 ± 0,138, vs. 4,51 ± 0,13; $P < 0,01$ (g/100 g t. hm.) (epididymální tuková tkáň: 1,799 ± 0,069 vs. 2,075 ± 0,055 (g/100g t. hm.); perirenální tuková tkáň: 2,041 ± 0,077 vs. 2,435 ± 0,088 (g/100g t. hm.); $P < 0,01$). Skutečnost, že salsalat zamezuje přírůstek tělesné hmotnosti, který je doprovázen především úbytkem tukové tkáně byla zjištěna i ve studii Cao et al. (13) u Goto-Kakizaki potkanů, kteří jsou modelem spontánního vývoje diabetu 2. typu. Snižování hmotnosti nebylo doprovázené sníženým příjmem potravy, dá se tedy předpokládat, že dochází spíše ke zvýšení výdeje energie (14).

Koncentrace plazmatických NEMK se po podání salsalatu nelišily, tento výsledek je v souladu s výsledky dalších studií (14; 15). Naproti tomu snížené hladiny NEMK po podání salsalatu byly pozorovány u obézních lidí, se zvýšenými hladinami NEMK (16; 17). Důležitým nálezem v naší studii byly snížené plazmatické koncentrace prozánětlivých mediátorů, IL-6 a monocytového chemotaktického proteinu MCP-1, dokumentující protizánětlivé účinky salsalatu.

Tabulka 1. Vliv salsalatu na vybrané ukazatele v plazmě

	Standardní dieta	Salsalat	P <
TAG (mmol/l)	5,560 ± 0,242	2,243 ± 0,121	0,001
NEMK (mmol/l)	0,498 ± 0,056	0,471 ± 0,045	N.S.
Cholesterol (mmol/l)	1,524 ± 0,031	1,249 ± 0,043	0,001
HDL (mmol/l)	0,754 ± 0,021	0,809 ± 0,040	N.S.
Inzulín (nmol/l)	0,224 ± 0,028	0,225 ± 0,024	N.S.
CRP (µg/ml)	230,2 ± 16,7	271,6 ± 27,4	N.S.
MCP-1 (pg/ml)	231,8 ± 25,6	164,9 ± 14,71	0,05
IL-6 (pg/ml)	12,674 ± 1,052	9,724 ± 0,616	0,05
HMW Adiponektin (µg/ml)	2,539 ± 0,151	2,119 ± 0,213	N.S.

Salsalat měl vliv i na akumulaci TAG a cholesterolu v játrech, kdy po podání salsalatu došlo k významnému snížení jejich koncentrací v játrech a mírnému snížení v srdci a *m. gastrocnemiu* (tab. 2)

Tabulka 2. Vliv salsalatu na ektopickou akumulaci TAG a cholesterolu ve tkáních

		Standardní dieta	Salsalat	P <
Játra (µmol/g)	**TAG**	8,831 ± 0,311	6,302 ± 0,344	0,001
	CHOL	9,095 ± 0,249	7,885 ± 0,209	0,01
Srdce (µmol/g)		1,689 ± 0,275	1,492 ± 0,213	N.S.
M. gastrocnemius (µmol/g)		4,028 ± 0,694	3,628 ± 0,648	N.S.

Předpoklad, že salsalat zlepšuje inzulínovou senzitivitu tkání (11; 18), jsme sledovali pomocí inkorporace radioaktivně značené glukózy do bílé tukové tkáně a svalové tkáně (bránice) při inkubaci těchto tkání ex vivo bez nebo s přidáním inzulínu do inkubačního media. V tabulce 3 je patrné, že salsalat měl významný vliv na inzulínovou senzitivitu, jak v bílé tukové tkáni, tak v bránici.

Tabulka 3. Vliv salsalatu na inzulínovou senzitivitu tukové a svalové tkáně

		Standardní dieta	Salsalat	P <
Lipogeneze (nmol/g/2hod.)	**bazální**	286 ± 12	347 ± 21	0,05
	inzulínem stimulovaná	330 ± 18	471 ± 31	0,01
Glykogeneze (nmol/g/2hod.)	**bazální**	844 ± 90	917 ± 104	N.S.
	inzulínem stimulovaná	1074 ± 76	1641 ± 152	0,01

Dalším sledovaným ukazatelem bylo množství uvolněných mastných kyselin společně s glycerolem, které je ukazatelem lipolytické aktivity tukové tkáně. Pokud se z poměru NEMK a glycerolu vypočítá reesterifikace, tato hodnota nám určí kolik NEMK, uvolněných hydrolýzou z TAG bylo využito v tukové tkání pro oxidaci a kolik jich bylo vyloučeno do média.

Salsalat zvýšil v bílé tukové tkáni jak množství uvolněných NEMK tak i glycerolu v podobném poměru a vypočítaná reesterifikace nebyla významně ovlivněna. Lze tedy usuzovat, že v bílé tukové tkáni dochází ke zrychlení hydrolýzy zásobních TAG (tab. 4).

Tabulka 4. Vliv salsalatu na lipolytickou aktivitu v bílé a hnědé tukové tkáni

		Standartní dieta	Salsalat	P <
Bílá tuková tkáň	NEMK (μmol/g)	1,58 ± 0,09	2,39 ± 0,15	0,001
	Glycerol (μmol/g)	0,85 ± 0,05	1,11 ± 0,04	0,001
	Reesterifikace	1,90 ± 0,15	2,18 ± 0,15	N.S.

Závěr

Počet lidí, kteří mají prediabetes nebo diabetes 2. typu stále narůstá a ne vždy se daří tato onemocnění vyléčit pouhou změnou životního stylu nebo farmakoterapií, o čemž svědčí stále vysoký výskyt orgánových komplikací asociovaný s tímto onemocněním. Z tohoto důvodu jsou stále hledány možnosti účinnější a cenově dostupné farmakoterapie. Jak již bylo prokázáno v několika klinických studiích, salsalat, v dávce 3,5 - 4 g denně, je schopen snižovat hladiny glykémie, zlepšovat inzulínovou senzitivitu a další parametry spojené s metabolickým syndromem. Výsledky naší studie ukázaly příznivé účinky salsalatu na metabolické poruchy spojené s hypertriacylglycerolémií a metabolickým syndromem. Zdá se tedy, že léčba salsalatem by mohla být jednou z možností, kterou je však nutné ověřit v klinických studiích.

Podpořeno grantem MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001)

Literatura

1. **Agrawal NK, Kant S.:** Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options. World J Diabetes 2014; 5: 697-710.
2. **Reid J, Macdougall AI, Andrews MM.:** Aspirin and diabetes mellitus. Br Med J 1957; 2: 1071-1074.
3. **Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB.:** The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. Nature 1998; 396: 77-80.
4. **Lanza F, Rack MF, Doucette M, et al.:** An endoscopic comparison of the gastroduodenal injury seen with salsalate and naproxen. J Rheumatol 1989; 16: 1570-1574.
5. **Cryer B, Goldschmiedt M, Redfern JS, Feldman M.:** Comparison of salsalate and aspirin on mucosal injury and gastroduodenal mucosal prostaglandins. Gastroenterology 1990; 99: 1616-1621.
6. **Scheiman JM, Behler EM, Berardi RR, Elta GH.:** Salicylsalicylic acid causes less gastroduodenal mucosal damage than enteric-coated aspirin. An endoscopic comparison. Dig Dis Sci 1989; 34: 229-232.
7. **Faghihimani E, Aminorroaya A, Rezvanian H, et al.:** Reduction of insulin resistance and plasma glucose level by salsalate treatment in persons with prediabetes. Endocr Pract 2012; 18: 826-833.
8. **Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, et al.:** Salicylate (salsalate) in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. Ann Intern Med 2013; 159: 1-12.
9. **Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, et al.:** The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. Ann Intern Med 2010; 152: 346-357.

10. **Rumore MM, Kim KS.:** Potential role of salicylates in type 2 diabetes. Ann Pharmacother 2010; 44: 1207-1221.
11. **Anderson K, Wherle L, Park M, et al.:** Salsalate, an old, inexpensive drug with potential new indications: a review of the evidence from 3 recent studies. Am Health Drug Benefits 2014; 7: 231-235.
12. **Wang X, DuBois DC, Cao Y, et al.:** Diabetes disease progression in Goto-Kakizaki rats: effects of salsalate treatment. Diabetes Metab Syndr Obes 2014; 7: 381-389.
13. **Cao Y, Dubois DC, Sun H, et al.:** Modeling diabetes disease progression and salsalate intervention in Goto-Kakizaki rats. J Pharmacol Exp Ther 2011; 339: 896-904.
14. **Meex RC, Phielix E, Moonen-Kornips E, et al.:** Stimulation of human whole-body energy expenditure by salsalate is fueled by higher lipid oxidation under fasting conditions and by higher oxidative glucose disposal under insulin-stimulated conditions. J Clin Endocr Metab 2011; 96: 1415-1423.
15. **Koska J, Ortega E, Bunt JC, et al.:** The effect of salsalate on insulin action and glucose tolerance in obese non-diabetic patients: results of a randomised double-blind placebo-controlled study. Diabetologia 2009; 52: 385-393.
16. **Fleischman A, Shoelson SE, Bernier R, Goldfine AB.:** Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. Diabetes Care 2008; 31: 289-294.
17. **Goldfine AB, Silver R, Aldhahi W, et al.:** Use of salsalate to target inflammation in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. Clin Transl Sci 2008; 1: 36-43.
18. **Kim MS, Yamamoto Y, Kim K, et al.:** Regulation of diet-induced adipose tissue and systemic inflammation by salicylates and pioglitazone. Plos One 2013; 8: e82847.

MASTNÉ KYSELINY U NEUROPSYCHIATRICKÝCH ONEMOCNĚNÍ

FATTY ACIDS IN NEUROPSYCHIATRIC DISEASES

M. Zeman[1], M. Vecka[1], R. Jirák[2], J. Macášek[1], T. Vařeka[1], E. Tvrzická[1], A. Žák[1]

[1]Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, IV. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze,
[2] Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN Praha, Centrum pro Alzheimerovu chorobu

Úvod

Mastné kyseliny jsou základním stavebním kamenem lipidových sloučenin, které spolu s uhlovodany a bílkovinami představují hlavními složky živých organismů. Mastné kyseliny (MK) slouží jako energetický substrát, přičemž u člověka jsou zdrojem asi 30 % celkové přijímané energie. Jednotlivé MK významně ovlivňují metabolickou přeměnu glycidů i lipidů, ovlivňují biologické vlastnosti buněčných membrán a tkání, ovlivňují genovou expresi, a některé mastné kyseliny jsou zdrojem významných biologicky aktivních mediátorů.
V plasmě cirkulují MK většinou esterifikované v triacylglycerolech, fosfolipidech a esterech cholesterolu, které jsou součástí lipoproteinových částic, jednak neesterifikované (NEFAs) vázané na albumin. V každém z těchto „poolů“ je zastoupení jednotlivých MK různé. Lipoproteiny i NEFA zajišťují transport MK mezi různými tělesnými kompartmenty, ve kterých hrají různé metabolické role.
Mastné kyseliny jsou významným zdrojem energie, která je uvolňována při jejich oxidací. MK jsou součástmi fosfolipidů buněčných membrán. Jejich složení významně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti membrán a tím i jejich funkce. Zastoupení MK v membránách ovlivňuje např. vlastnosti receptorů, iontových kanálů i dalších struktur. Deriváty membránových lipidů, jako např. diacylglyceroly (DAG) nebo ceramidy, mají významné signální funkce. Jednotlivé MK, uvolňované různými stimuly z membrán jsou také prekursory prostaglandinů, leukotrienů, tromboxanů a dalších látek s rozmanitými biologickými funkcemi. Zdrojem mastných kyselin v organismu je jednak jejich přívod v potravě, jednak jejich endogenní syntéza. Spektrum MK je dále modulováno desaturačními a elongačními procesy, jednak enzymatickou (β-oxidace) i neenzymatickou (lipoperoxidace) degradací (Žák et al. 2014). Výsledný profil MK u každého jedince ovlivněn rasovými, etnickými, genetickými faktory i působením různých onemocnění (Hodson et al. 2008). Složení MK esterifikovaných v různých lipidových třídách (estery cholesterolu, celkové fosfoláipidy, fosfatidylcholin, triacylglyceroly) vykazuje u různých patologických stavů specifické odchylky. Na složení MK má vliv jejich obsah v dietním tuku (obsah MK v esterech cholesterolu a fosfolipidech je odrazem jejich příjmu ve stravě v posledních týdnech) (Ricardi et al. 2004) i jejich endogenní metabolismus (Nakamura a Nara 2004).

Biochemie mastných kyselin

Mastné kyseliny (MK) jsou složeny z uhlíkového řetězce, který má většinou sudý počet uhlíků. Nasycené MK mají mezi sousedícími uhlíky pouze jednoduchou vazbu. Monoenové MK obsahují jednu dvojnou vazbu (C = C), polyenové (vícenenasycené) mastné kyseliny *(polyunsaturated fatty acids, PUFA)* mají v molekule alespoň dvě nebo více dvojných vazeb. Poslední uhlík řetězce, počítáno od karboxylového konce molekuly je označován *omega*. Například eikosapentaenová kyselina (EPA, 20:5 n-3) je n-3 (omega-3) mastná kyselina s 20 uhlíky v řetězci a pěti dvojnými vazbami. Pojem n-3 znamená, že první dvojná vazba, počítáno od metylového konce řetězce, je umístěna mezi 3. a 4. uhlíkem. Vyskytují se 4 řady PUFA: „n-3“, resp. „omega-3“ řada, odvozená z kyseliny alfa-linolenové, ALA, 18:3 n-3,

„n-6“ řada, odvozená z kyseliny linolové, LA, 18:2 n-6, „n-9“ řada z kyseliny olejové, OA, 18:1 n-9, a „n-7“ řada, odvozená z kyseliny palmitolejové, PA, 16:1 n-7 (Vance a Vance 2002, Žák et al. 2005). Lidský organismus může syntetizovat nasycené a monoenové MK, není však schopen vnést dvojnou vazbu blíže než na devátý uhlík počítáno od karboxylového konce (delta-9 desaturace) a není tedy schopen syntetizovat n-3 a n-6 dvojné vazby. Kyselina linolová, 18:2 n-6 a alfa-linolenová, 18:3 n-3, které jsou prekursory dalších PUFA n-3 a PUFA n-6 řady, musí být proto přiváděny potravou a jsou označovány jako esenciální MK. PUFA n-6 jsou obsaženy v rostlinných olejích, kyselina arachidonová (20:4 n-6) je obsažena také v mase. Kyselina alfa-linolenová se nachází v řepkovém, sójovém a zejména lněném oleji nebo v listové zelenině. PUFA n-3 s delším řetězcem, jejichž nejvýznamnějšími představiteli jsou kyselina eikosapentaenová, EPA, 20:5 n-3 a dokosahexaenová, DHA, 22:6 n-3, jsou obsaženy v tuku mořských ryb a živočichů. Řetězce PUFA řady n-3 a n-6 mohou být dále prodlužovány a desaturovány za účasti enzymů elongáz a desaturáz (de Gomez a Brenner 1975). U lidí je sice do určité míry možná i elongace a desaturace ALA na EPA a DHA, odhaduje se, že asi 5 % ALA je takto přeměněno (Brenner et al. 2002), avšak hlavním zdrojem EPA a DHA jsou oleje mořských ryb. Afinita jednotlivých řad mastných kyselin k desaturázám a elongázám klesá v pořadí n-3 > n-6 > n-9, takže za fyziologických podmínek jsou metabolity řady n-9 nacházeny jen vzácně, za deficience esenciálních MK (Fokkema et al. 2002). Po požití ve stravě jsou PUFA rychle inkorporovány do fosfolipidů buněčných membrán tělesných tkání, PUFA n-3 se koncentrují zejména v membránách mozku, sítnice a myokardu.

Mastné kyseliny - transport a metabolismus v CNS

Spektrum mastných kyselin, nacházených v CNS je rozdílné od složení MK v plasmatických lipidech, v adipocytech tukové tkáně i dalších tkání. Nacházejí se zde vícenenasycené MK v mnohonásobně vyšších koncentracích. Nejvíce zastoupenými PUFA je kyselina dokosahexaenová (DHA, 22:6 n3) a arachidonová (AA, 20:4 n-6) (Bazinet a Layé 2014).

Nasycené a monoenové MK mohou být v mozku syntetizovány *de novo*, zatímco PUFAs se do CNS dostávají převážně z krevního oběhu. Mozková tkáň je vybavena enzymy, které jsou zapotřebí k tvorbě AA i DHA, ovšem přísun z oběhu je kvantitativně významnější (Bazinet a Layé 2014).

Na počátku vývoje lidského organismu, se v mozku hromadí MK, nacházející se v myelinových pochvách, zejména kyselina olejová (OA, 18:1 n-9). V posledním trimestru těhotenství se v mozku ve zvýšené míře hromadí PUFAs, zejména DHA (Kuipers et al. 2012). DHA má zřejmě pro vyvíjející se mozek velký význam, v některých, i když ne ve všech studiích, bylo zjištěno, že děti s dostatečným přísunem DHA ve stravě, měly lepší hodnoty skore, ukazující úroveň rozvoje CNS, než ty, které měly nedostatek DHA (Innis 2008). Do mozku mohou být mastné kyseliny transportovány buď jako volné (neesterifikované) MK, nebo esterifikované v lipidových třídách. U krys byl identifikován transportér pro DHA esterifikovanou ve lysofosfolipidech (MFSD2A – *major facilitator superfamily domain-containing protein 2A*). V experimentálních studiích bylo zjištěno, že neesterifikované MK mohou do mozku difundovat pasivně (Hamilton 2007). Nicméně, v mozku byly identifikováno několik kandidátních transportérů MK. Většina transportérů mají aktivitu *long-chain-fatty-acid-CoA syntázy* (ACSL) a pravděpodobně vychytávají MK a usnadňují jejich transport do specifických lipidových poolů (Mashek a Coleman 2006). Vstup volných MK do mozku není selektivní, např. volná EPA vstupuje do mozku stejně rychle jako volná DHA, ale její koncentrace v mozku je 200 – 500 x nižší než DHA (Bazinet a Layé 2014). EPA je totiž rychle metabolizována beta-oxidací, dále elongací s desaturací na DPA a DHA. V mozku je další faktor, usnadňujicí metabolismus MK, CD36 (také známý jako SRB1). CD 36 pravděpodobně transportuje především estery cholesterolu (Xu et al. 2013). V dospělém

mozku již nedochází k dalšímu hromadění DHA a AA, je jen udržována rovnováha mezi spotřebou a přísunem (Carver et al. 2001).
Vícenenasycené MK, zejména DHA a AA, jsou po vstupu do mozku aktivovány působením ACSL a pak esterifikovány do PL membrán, jiné, jako ALA, EPA a LnA, jsou směrovány k beta-oxidaci. Některé transportéry mají aktivitu ACSL a v kombinaci s působením FABP (*fatty acid binding proteins*) usnadňují rozdělení MK buď k esterifikaci nebo k metabolizaci (Chen a Bazinet 2014). Ve fosfolipidech jsou dvě MK stereospecificky číslovány 1. a 2. uhlík (*sn-1 a sn-2* pozice) glycerolové molekuly. Po esterifikaci MK do PL buněčných membrán MK v *sn-1* pozici mohou být deesterifikovány a uvolněny z membrány fosfolipázou A1 (PLA1), zatímco MK v *sn-2* pozici (jako AA a DHA) jsou deesterifikovány PLA2. Metabolismus AA a DHA je v mozku zřejmě selektivně regulován.

Funkce PUFA V CNS

Mechanismy působení PUFA v CNS jsou mnohostranné. PUFA ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti membrán neuronů a složek, v nich obsažených (receptory, enzymy, buněčné transportéry, aj.), ovlivňují nitrobuněčnou signalizaci, genovou expresi a transkripci, modulují imunitní a zánětlivé pochodů a oxidační stresu. PUFA se také podílejí na mechanismech neurogeneze, neuroprotekce a neurotransmise. Zvýšení fluidity membrány usnadňuje laterální pohyb proteinů uvnitř lipidové dvouvrstvy a tak umožňuje snadnější interakce mezi proteiny v membráně uloženými (Murphy et al. 1990). Jiným příkladem je ovlivnění funkce fotoreceptorů v sítnici. Dostatek DHA ve fosfolipidech sítnicových tyčinek podporuje aktivaci rhodopsinu a konformační změny, vedoucí k tvorbě jeho aktivní formy metarhodopsinu II (Stinson et al. 1991). PUFA jsou agonisty oxysterolových LXR receptorů, dále receptorů, aktivovaných peroxisomálními proliferátory (PPAR), jaterního nukleárního faktoru HNF4, dále GPR32 (*G-protein coupled receptor 32*), lipoxinového receptoru ALX/FPR2. Mohou také aktivovat protein-kinázu C (PKC) a inhibovat nukleární faktor kappa B (NF-ƙB) (Salem Jr et al. 2001, Serhan 2014, Bazinet a Layé 2014). Další formou působení PUFA je modulace endokannabinoidového systému, přičemž endokanabinoidy jsou samy derivovány z PUFAs. Mezi nejvýznamnější kanabinoidy, které vznikají při metabolismu GP, patří anandamid (arachidonyl-ethanolamid, AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Tato látky působí na kanabinoidní receptory které byly v CNS identifikovány. V neuronech jsou exprimovány zejména CB_1, kde se účastní regulace uvolňování neurotransmitterů a intensity synapse, zatímco CB_2 receptory byly nalezeny zejména gliích a mikrogliích. AEA a 2-AG působí na receptory CB1 (Bazinet a Layé 2014). Kanabinoidy mají v CNS řadu funkcí. Účastní se na proliferaci neuronů, jejich diferenciaci, morfogenezi a synaptogenezi (Harkany et al. 2008). Suprimují uvolňování neurotransmitterů, např. glutamátu, GABA, monoaminů, opioidů a acetylcholinu působením jako retrográdní messengery na presynaptických CB1 (Castillo et al. 2012). Retrográdní endokanabinoidová signalizace zprostředkuje krátkodobé formy synaptické plasticity jak na excitačních tak na inhibičních synapsích. Další formou působení endokanabinoidů je modulace synaptického přenpsu působením na TRPV1 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*), který je umístěn postsynapticky a na receptory na astrocytech. V experimentech bylo zjištěno, že DHA může regulovat syntézu 2-AG nezávisle na AA. DHA také reguluje aktivitu CB1 a s nimi spojené signální cesty ve specifických oblastech mozku (prefrontální kortex, nc. accumbens. DHA je mimořádně dostupná v oblasti synapsí, kde ovlivňuje integritu synapsí konstituci tzv. komplexu SNARE (akronym odvozený z "**SNA**P (Soluble NSF Attachment Protein) **RE**ceptor") (Bazinet a Layé 2014). PUFAs, zejména DHA, hrají dále významnou roli při neurogenezi a neuroprotekci. V nervovém systému je DHA zastoupena nejvíce ve fosfolipidech fosfatidyletanoaminu (PE) a fosfatidylserinu (PS). Zvýšení příjmu DHA vede ke zvýšené tvorbě PS, který se účastní buněčné signalizace. Zvýšené hladiny PS usnadňují

translokaci *raf-1* kinázy a PI_3-kinázy do plasmatické membrány, zvyšují aktivitu PI_3-kinázy, což vede k poklesu aktivace kaspázy-3 a k inhibici apoptózy (Marszalek a Lodish 2005). Jeden z derivátů DHA, *synaptamid,* je ještě mnohonásobně účinnějším promotérem neurogeneze, synaptogeneze a synaptické funkce, než samotná DHA (Kim a Spector 2013). Jiným derivátem DHA, který vzniká působením lipoxygenázy (LOX), je neuroprotektin NPD-1. Tento dokosanoid má neuroprotektivní účinek, daný zvýšenou expresí genů kodujících antiapoptotické proteiny BCL2 (B-cell lymphoma 2), BCLXL, a BCL2A1 a současným poklesem exprese pro-apoptotických proteinů BAD (*BCL2-associated agonist of cell death),* BAX, BID a BIK (Lukiw et al. 2005). DHA také zvyšovala v experimentu hladiny BDNF (*brain-derived neurotropic factor*) v mozku (Wu et al. 2004). BDNF pozitivně ovlivňuje neurogenezí i přežívání neuronů (Mattson et al. 2004). DHA a její deriváty mají protizánětlivé účinky a zvýšený příjem v potravě je spojen s nižším rizikem neuropsychiatrických onemocnění, v jejichž patogenezi hraje roli zánětlivý proces, jako jsou Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc, či deprese (Layé 2010). U všech těchto onemocnění se v patogeneze uplatňují zánětlivé cytokiny, jako je interleukin-1 beta (IL-1β), IL-2, IL-6, interferon-gamma a tumor necrosis factor alpha (TNFα), které aktivují osu hypotalamus-hypofýza, snižují hladiny prekurzorů neurotransmitterů a působí změny metabolismu neurotransmitterů (Maes a Smith 1998). V patogenetických mechanismech neuropsychiatrických onemocnění se často uplatňuje prostaglandin E2, jehož prekursorem je prostaglandin H2, tvořený z AA působením enzymů cyklooxygenáz (COX) (Bosetti et al. 2002). Arachidonová kyselina rovněž stimuluje syntézu glutamátu, jehož nadbytek potencuje destrukci neuronů v důsledku nadprodukce kyslíkových radikálů. Poruchy metabolismu AA v mozku jsou popisovány u řady neurodegenerativních i psychiatrických onemocnění, např. u Alzheimerovy nemoci, schizofrenie či depresivní poruchy a dalších (Bazan et al. 2002, Bosetti et al. 2002, Teismann et al. 2003, Sublette et al. 2004). PUFAs (tedy v CNS především AA a DHA) jsou po uvolnění z membránových PL působením fosfolipáz A2 a C substráty enzymatické i neenzymatické přeměny za vzniku širokého spektra derivátů. Působením enzymů cyklooxygenáz (COX), lipoxygenáz (LOX) a epoxygenáz cytochromu P450 vznikají prostaglandiny (PG), tromboxany (TX), společně nazývané prostanoidy, dále leukotrieny (LT), lipoxiny (LX), hydroperoxyeikosatetraenové kyseliny (HPETE) a hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETE) a resolviny (Fitzpatrick a Soberman 2001, Serhan et al. 2011). Arachidonová kyselina stimuluje syntézu glutamátu, jehož nadbytek potencuje destrukci neuronů v důsledku nadprodukce kyslíkových radikálů. DHA naopak působí protizánětlivě a proti oxidačnímu stresu. DHA je podobně jako AA přeměňována oxidací za účasti 12- a 15-lipoxygenáz na deriváty, (resolviny, Rvs, neuroprotektiny, NP a maresiny, Mar) které mají významné biologické účinky (Serhan et al. 2011). Resolviny (*resolution-phase interaction products*) a dokosatrieny antagonizují účinky derivátů AA (prostaglandinů, leukotrienů a tromboxanů) a mají významné protizánětlivé a imunoregulační vlastnosti (Serhan et al. 2011). Resolviny blokují tvorbu IL-1 v mikrogliích a snižují infiltraci mozku polymorfonukleáry. Neuroprotektin D1 rovněž snižuje příliv leukocytů, snižuje expresi zánětlivých cytokinů a NFκB a indukuje expresi antiapoprotických proteinů BCL-2, snižuje expresi proapoptotických proteinů BAX a BAD (Bazan 2005*)* a neuroprotektivních genů, které omezují neurotoxicitu působenou amyloidem beta (Lukiw et al. 2005, Bazan 2009).

Mastné kyseliny u patologických stavů v neuropsychiatrii

a/ Alztheimerova choroba

Do patofyziologických procesů Alzheimerovy nemoci zasahuje AA a její deriváty řadou mechanismů. AA uvolňovaná fosfolipázou A_2 z PL ovlivňuje synaptickou transmisi zprostředkovanou glutamátem.AA amplifikuje vzestup kalciových iontů v neuronech po stimulaci NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptorů (Goracci et al. 2010). NMDA receptory

hrají významnou roli v mechanismech dlouhodobé potenciace (*long-term potentiation*), která ovlivněním synaptické účinnosti ve specifických oblastech mozku, zejména v hippokampu ovlivňuje procesy paměti a učení (Bliss a Collingridge 1993) a na druhé straně nadměrná stimulace NMDA receptorů např. nadbytkem glutamátu vede k poškození neuronů (glutamátová excitotoxicita) (Zhou a Sheng 2013). Deriváty AA, jako jsou prostaglandiny (PG), leukotrieny (LT), a tromboxany (TX) po vazbě na odpovídající receptory ovlivňují řadu biologických funkcí, např. cévní tonus, imunitní a zánětlivé pochody. Modulace jejich působení by mohla mít potenciálně terapeutické účinky. Inhibice COX-2 interferuje s glutamátovou neurotoxicitou zprostředkovanou NMDA receptorem (Pepicelli et al. 2005) a antagonista receptoru prostaglandinového receptoru EP_1 v experimentu snižoval neuronální excitotoxicitu zprostředkovanou NMDA receptory (Kawano et al, 2006). PGE_2 zvyšuje expresi genu pro amyloidový prekursorový protein (APP) *in vitro*, což je spojeno s aktivací receptoru EP_2 v mikrogliích (Pooler et al. 2004). Předpokládá se, že zánětlivá aktivita v mozku je významným činitelem patofyziologie AD (Halliday et al. 2000). V mozkové kůře a hippokampech nemocných s AD byla zjištěna ve srovnání se stejně starými kontrolami zvýšená exprese COX-1 a COX-2. Je zajímavé, že několik epidemiologických studií zjistilo, že dlouhodobé užívání nesteroidních protizánětlivých farmak (NSAIDs) může nositelům alely ε4 apolipoproteinu E (*APOE* ε4) chránit proti vzniku AD. Biologické mechanismy tohoto jevu nejsou jasné a mohou zahrnovat protizánětlivé účinky NSAIDs nebo jejich schopnost interferovat s kaskádou β-amyloidu (Aβ). Na druhé straně dlouhodobé, placebem kontrolované klinické studie s neselektivními i COX-2 selektivními inhibitory u nemocných s mírnou až středně těžkou formou AD nepřinesly pozitivní výsledky. Je možné, že podávání NSAIDs může být prospěšné jen u velmi časných stádií (Imbimbo et al. 2010). Nyní se pozornost obrací k možnosti příznivého ovlivnění AD působením na receptory PGE2 (Frisardi et al. 2011). Naproti tomu DHA a její deriváty působí na patogenetické pochody u AD příznivě. Epidemiologické údaje ukázaly, že dostatečný dietní přísun PUFA n-3 (DHA) je spojen s poklesem rizika vzniku demence (Johnson a Schaefer 2006). U jedinců, kteří mají koncentrace DHA v plasmatickém fosfatidylcholinu v horním kvartilu, je ve srovnání s těmi s DHA v dolním kvartilu významně nižší riziko vývoje AD během devítiletého sledování (Schaefer et al. 2006). Nemocní se sporadickou formou AD mají nižší expresi proteinu SorLA (LR11) i jeho mRNA. Tento protein snižuje štěpení APP α- a β-sekretázami, což snižuje tvorbu β-amyloidu. Podávání DHA transgenním myším zvyšovalo expresi LR11 v neuronech a snižovalo hladinu β-amyloidu (Ma et al. 2007). Zvýšený oxidační stres, působený Aβ či hypoxií zvyšuje tvorbu NPD1 z DHA (Jicha a Markesbery 2010). NPD1 dále zvyšuje antioxidační ochranu neuron indukcí tvorby antioxidačních enzymů (Hashimoto et al. 2002) a inhibuje aktivaci kaspázy 3, indukovanou oxidačním stresem a expresi COX-2 stimulovanou interleukinem 1 (Bazan 2005). Enzym 14-lipoxygenáza v makrofázích přeměnuje DHA na maresin 1 (7,14-dihydroxy DHA), který omezuje přísun leukocytů a stimuluje odstraňování apoptotického materiálu (Serhan et al. 2009), jeho význam u AD ještě není prostudován. Neuroprotektivní účinek DHA u AD je zřejmě podmíněn i jejími fyzikálně-chemickými vlastnostmi. DHA pomáhá udržovat flexibilitu neuronálních membrán, což hraje roli při signální transdukci, neurotransmisi, a tvorbě *"lipid rafts"(*Innis 2007, Cunnane et al. 2009). V autoptickém materiálu frontálních kortexů osob s AD byl prokázán významně snížený obsah DHA a také monoenových mastných kyselin (zejména olejové) v „*lipid rafts*" (Martin et al. 2010). DHA moduluje expresi řady genů interakcí s transkripčními faktory. Význam zde má hlavně interakce s PPARγ, jelikož uvolňování Aβ je na PPARγ dependentní (Cunnane et al. 2009).

b/ depresivní poruchy

Spotřeba ryb ve stravě různých populací negativně koreluje s výskytem deprese (Hibbeln a Salem Jr. 1995). U depresivních osob byly nalezeny snížené hladiny PUFA n-3 v PL různých

tělesných tkání (Edwards et al 1998, Maes et al.1999, Mamalakis et al. 2006a, McNamara et al. 2007). Hladiny PUFA n-3 negativně korelují s tíží depresivní symptomatologie (Tiemeier et al. 2003, Conklin et al. 2007a, Féart et al. 2008, Mamalakis 2006b). Současně s poklesem PUFA n-3 jsou často nalézány zvýšené hodnoty poměru AA/EPA , AA/DHA, či poměru n-6/ n-3 mastných kyselin. Omezení příjmu omega-3 PUFA u experimentálních krys zvyšuje skóre v testech deprese i agresivity, přičemž u experimentálních zvířat byl pozorován pokles centrálního serotonergního a dopaminergního přenosu a snížení počtu hipokampálních neuronů. Naopak při dietní suplementaci krys DHA dochází k zvýšení hladin noradrenalinu, serotoninu, dopaminu i acetylcholinu v mozku (De Mar Jr. et al. 2006). Z klinických zkušeností je známo, že u některých pacientů, zejména vyššího věku, trpících dlouhými, farmakorezistentními fázemi deprese, dochází k rozvoji demence. Studie na zdravých dobrovolnících, užívajících vyšší dávky PUFA n-3, prokázala metodou strukturální MR zvyšování množství šedé hmoty mozku v oblastech významných pro emotivitu i kognitivní funkce – v pravém hipokampu, pravé amygdale a v předním cingulu (Conklin et al. 2007b). V randomizovaných kontrolovaných studiích byl často zjištěn příznivý účinek podávání PUFA n-3 u depresí. Výsledky nejsou zcela jednoznačné. Nedávno byla publikována nová metaanalýza těchto studií (Appleton et al. 2010), která hypotézu o příznivém terapeutickém efektu podporuje, ale současně bylo uzavřeno, že je obtížné tyto výsledky sumarizovat a úplně zhodnotit vzhledem ke značné heterogenitě. Lepší efekt PUFA n-3 byl zjištěn u osob s těžší depresivní symptomatologií, zatímco u osob bez diagnostikovaného depresivního onemocnění byl účinek na náladu menší. V heterogenitě výsledků hraje zřejmě roli řada faktorů, např. různý obsah PUFA n-3 i n-6 řady ve stravě, složení placeba, rozdíl ve věku a mezi pohlavími, v průvodné léčbě, v trvání studie, dávce i typu použité PUFA n-3, nebo způsob hodnocení deprese (Appleton et al. 2010).

Poporodní deprese je symptomatická depresivní porucha, která má stejné příznaky jako velká depresivní porucha nebo depresivní porucha v rámci BAD. Etiologie je zřejmě multifaktoriální. V jedné studii měly postižené ženy před začátkem deprese deficit PUFA n-3 při normálním obsahu PUFA n-6 (De Vriese et al. 2003).

c/ bipolární afektivní porucha

Bipolární afektivní porucha (BAD) má celoživotní prevalenci 1 – 2 %. Kromě fází deprese, klinickým obrazem shodných s velkou depresivní poruchou, se vyskytují i fáze manie, vyznačující se elací nálady a psychomotorického tempa, zrychlením myšlení až myšlenkovým tryskem, zrychlením řeči, snížením soudnosti a společenského odstupu, nespavostí. Podobně jako u depresivní poruchy byly i u BAD v nalezeny významně snížené hladiny PUFA n-3, zejména DHA (McNamara a Weige 2016). Ovšem význam nedostatku PUFA n-3 je zjevný hlavně u depresivních fází. Vztah PUFA k manickým fázím není dosud vyřešen. Klinických studií s PUFA n-3 bylo provedeno málo, výsledky nejsou přesvědčivé. Stoll et al. (1999) srovnávali u BAD efekt olivového oleje jakožto aktivního placeba a rybího oleje s denní dávkou EPA 6.2 g a DHA 3.4 g. U pacientů, užívajících rybí tuk, došlo k signifikantnímu snížení relapsů choroby. PUFA n-3 zlepšovaly především příznaky deprese, nikoli manie. Podobně Frangou et al. (2006) v dvojitě slepé, placebem kontrolované studii u 74 nemocných s BAD podávali buď 1 nebo 2 g EPA denně po dobu 12 týdnů a zjistili, že podávání EPA mělo statisticky významný příznivý efekt na depresivni symptomy, zatímco manické příznaky neovlivnilo. Omega-3 mastné kyseliny byly zkoušeny v léčbě BAD i u dětí a adolescentů. V jedné placebem kontrolované studii byly zjišťovány účinky lněného oleje v kapslích, obsahujících kyselinu alfa-linolenovou (α-LNA) 550 mg na 1 gram za použití Young Mania Rating Scale, Child Depression Rating Scale-Revised, and Clinical Global Impressions-Bipolar ratings. Tíže příznaků deprese negativně korelovala se sérovými koncentracemi PUFA n-3 (% α-LNA ($r = -0.45$, $p < 0.007$), % (EPA) ($r = -0.47$, $p < 0.005$), a pozitivně s AA ($r = 0.36$, $p < 0.05$) a DPA ($r = 0.48$, $p < 0.004$) (Gracious et al. 2010).

d/ schizofrenie

V patogeneze schizofrenie hrají roli změny ve složení PL, zejména koncentrace fosfatidylserinu (PS), fosfatidylcholinu (PC), fosfatidyletanolaminu (PE) v buněčných membránách, v důsledku poklesu obsahu PUFA (Mahadik et al. 2003). V membránách erytrocytů i v mozcích nemocných schizofrenií byl popsán zejména pokles AA a DHA (Horrobin et al. 1992, Yao a Reddy 2002). Nedávno byly v erytrocytech u mladých osob s mimořádným rizikem psychosy ve srovnání se zdravými kontrolami prokázány deficity ALA, EPA, ale i PUFA n-6 (Rice et al. 2015). Je zajímavé, že změny MK v membránách mají u schizofrenie pravděpodobně význam zejména v patogeneze „negativních" příznaků, které jsou ovšem primárními psychopatologickými manifestacemi schizofrenie. Závažnost negativních příznaků korelovala pozitivně s monoenovými MK eikosenovou (20:1 n-9) a erukovou (22:1 n-9) zatímco negativní korelace byly zaznamenány u dvou nasycených MK (myristová, 14:0 a margarová, 17:0), u kyseliny nervonové (24:1 n-9) a n-3 MK dokosapentaenové (22:5 n-3). Zároveň u nemocných s predominantně negativními příznaky ve srovnání s pacienty s predominantně pozitivními příznaky byly celkové monoenové MK a poměr n-6/n-3 významně vyšší, zatímco celkové PUFA n-3 byly významně nižší (Kim et al. 2016). Na nízké hladině PUFA se může podílet i oxidační stres nebo jiné příčiny degradace PUFA (McNamara et al. 2007). V jedné studii byla v kůře frontálních laloků schizofreniků nalezena zvýšená hladina mRNA delta-6 desaturázy (klíčový enzym, katalyzující přeměnu kyseliny alfa-linolenové na DHA), což ukazuje na to, že mozek se snaží zvýšit tvorbu DHA při poklesu její hladiny (Liu et al. 2009). V membránových PL, obsahujících PUFA n-3, jsou ukotveny receptory pro neurotransmittery a pokles koncentrace těchto PL by mohl souviset s poruchami funkcí těchto receptorů (Horrobin 1998, du Bois et al. 2005). Obsah PUFA v membránách erytrocytů koreloval s některými funkcemi (např. sémantická paměť) schizofreniků (Condray et al. 2008). Někteří autoři našli za pomoci magnetické rezonanční spektroskopie (MRS) při použití značeného P^{31} sníženou hladinu fosfomonoesterů a zvýšenou hladinu fosfodiesterů v temporálních a frontálních lalocích schizofreniků (Fukuzako et al. 1999, Keshavan et al. 2000). V krvi a mozcích schizofreniků byly také zjištěny zvýšené hladiny kalcium-independent fosfolipázy A2 (PLA2), což je enzym účastnící se štěpení MK ze Sn2 pozice PL (Ross et al. 1999, Takeuchi et al. 2002). Bylo provedeno více placebem kontrolovaných studií s podáváním PUFA n-3 schizofrenním pacientům. Výsledky jsou značně inkonzistentní, často srovnatelné s placebem (Ross et al. 2007). Nedávno byla publikována randomizovaná kontrolovaná studie, která sledovala efekt 12ti týdenního podávání PUFA n-3 v denní dávce 1,2 g u 76 mladých jedinců (13 – 25 let) s hraniční psychosou *(subtreshold psychosis*) na progresi do první epizody psychózy. Celá studie trvala 12 měsíců a kumulativní riziko progrese do manifestní psychózy bylo ve skupině s PUFA n-3 sníženo o 22,6 % ($p = 0.007$) (Amminger et al. 2010).

e/ další neuropsychiatrická onemocnění

Deficit PUFA n-3 se uplatňuje i patofyziologii dalších neuropsychiatrických onemocnění, včetně onemocnění, spojených se zánětem *(„neuroinflamací")* a dostatek PUFA n-3 naopak příznivě ovlivňuje např. průběh poranění mozku a míchy (Crupi et al. 2013). U vaskulárních demencí se mimo jiné uplatňují antiaterogenní a antitrombogenní efekty. V Rotterdamské studii pravidelný příjem nenasycených mastných kyselin snižoval riziko vzniku Parkinsonovy choroby (PD), v jejíž patogenezi se uplatňuje ztráta dopaminergních neuronů v substantia nigra *pars compacta*, která vede k významnému poklesu dopaminu v cílových strukturách, jako je striatum a další. Předpokládá se, že se zde uplatňuje protizánětlivé a neuroprotektivní působení PUFA n-3 a také snížení toxicity alfa-synukleinu, degenerativního neuronálního proteinu (Bousquet et al. 2011). Dieta s vysokým obsahem PUFA n-3 zlepšovala přežívání dopaminergních neuronů na experimentálních modelech PD u hlodavců (Shchepinov et al. 2011). U pacientů s PD je v cerebrospinálním likvoru zvýšena hladina AEA (endoka-

nabinoidu odvozeného z n-6 MK) a riziko PD je snižováno dietou bohatou na PUFA n-3 (Dong et al. 2014).

Práce byla podpořena výzkumnými projekty – PRVOUK P25/LF1/2 MŠMT ČR a RVO VFN64165/2012 MZ ČR

Literatura

Amminger GP, Schäfer MR, Papageorgiou K, et al.: Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial. Arch Gen Psychiatry 2010; 67: 146-154.

Appleton KM, Rogers PJ, Ness AR.: Updated systematic review and meta-analysis of the effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on depressed mood. Am J Clin Nutr 2010; 91:757-770.

Bazan NG, Colangelo V, Lukiw WJ.: Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer‘s disease. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002; 68–69: 197–210.

Bazan NG.: Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer‘s disease. J Lipid Res 2009; 50: S400–S405.

Bazan NG.: Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. Mol Neurobiol 2005; 32: 89-103.

Bazinet RP, Layé S.: Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. Nat Rev Neurosci 2014; 15: 771-785.

Bliss TV, Collingridge GL.: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 1993; 361: 31-39.

Bosetti F, Rintala J, Seemann R, et al.: Chronic lithium downregulates cyclooxygenase-2 activity and prostaglandin E(2) concentration in rat brain. Mol Psychiatry 2002; 7: 845-850.

Bousquet M, Calon F, Cicchetti F.: Impact of ω-3 fatty acids in Parkinson's disease. Ageing Res Rev 2011; 10: 453-463.

Brenner RR, Bernasconi AM, González MS, Rimoldi OJ.: Dietary cholesterol modulates delta6 and delta9 desaturase mRNAs and enzymatic activity in rats fed a low-eFA diet. Lipids 2002; 37: 375-383.

Carver JD, Benford VJ, Han B, Cantor AB.: The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. Brain Res Bull 2001; 56: 79-85.

Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimotodani Y.: Endocannabinoid signaling and synaptic function. Neuron 2012; 76: 70-81.

Condray R, Yao JK, Steinhauer SR, et al.: Semantic memory in schizophrenia: association with cell membrane essential fatty acids. Schizophr Res 2008; 106: 13-28.

Conklin SM, Gianaros PJ, Brown SM, et al.: Long-chain omega-3 fatty acid intake is associated positively with corticolimbic gray matter volume in healthy adults. Neurosci Lett 2007; 421: 209-212.

Conklin SM, Harris JI, Manuck SB, et al.: Serum omega-3 fatty acids are associated with variation in mood, personality and behavior in hypercholesterolemic community volunteers. Psychiatry Res 2007; 152: 1-10.

Crupi R, Marino A, Cuzzocrea S.: n-3 fatty acids: role in neurogenesis and neuroplasticity. Curr Med Chem 2013; 20: 2953-2963.

Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, et al.: Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. Prog Lipid Res 2009; 48: 239-256.

de Gomez, INT, Brenner RR.: Oxidative desaturation of alpha-linolenic, linoleic and stearic acids by human liver microsomes. Lipids 1975; 10: 315-317.

De Vriese SR, Christophe AB, Maes M.: Lowered serum n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels predict the occurrence of postpartum depression: further evidence that lowered n-PUFAs are related to major depression. Life Sci 2003; 73: 3181-3187.
DeMar Jr. JC, Ma K, Bell JM, et al.: One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and agression test scores in rats. J Lipid Res 2006; 47: 172-180.
Dong J, Beard JD, Umbach DM, et al.: Dietary fat intake and risk for Parkinson's disease. Mov Disord 2014; 29: 1623–1630.
du Bois TM, Deng C, Huang XF.: Membrane phospholipid composition, alterations in neurotransmitter systems and schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005; 29: 878-888.
Edwards R, Peet M, Shay J, Horrobin D.: Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and red blood cell membtranes of depressed patients. J Afect Disord 1998; 48: 149-155.
Féart C, Peuchant E, Letenneur L, et al.: Plasma eicosapentaenoic acid is inversely associated with severity of depressive symptomatology in the elderly: data from the Bordeaux sample of the Three-City Study. Am J Clin Nutr 2008; 87: 1156-1162.
Fitzpatrick FA, Soberman R.: Regulated formation of eicosanoids. J Clin Invest 2001; 107: 1347–1351.
Fokkema M., Smit EN, Martini MA, et al.: Assessment of essential fatty acid and omega3-fatty acid status by measurement of erythrocyte 20:3omega9 (Mead acid), 22:5omega6/20:4omega6 and 22:5omega6/22:6omega3. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002; 67: 345-356.
Frangou S, Lewis M, McCrone P.: Efficacy of ethyl-eicosapentaenoic acid in bipolar depression: randomised double-blind placebo-controlled study. Br J Psychiatry 2006; 188: 46-50.
Frisardi V, Panza F, Seripa D, et al.: Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: a complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. Prog Lipid Res 2011; 50: 313-330.
Fukuzako H, Fukuzako T, Hashiguchi S, et al.: Changes in levels of phosphorus metabolities in temporal lobesof drug naive schizophrenic patients. Am J Psychiatry 1999; 156: 1205-1208.
Goracci G, Ferrini M, Nardicchi V.: Low molecular weight phospholipases A2 in mammalian brain and neural cells: roles in functions and dysfunctions. Mol Neurobiol 2010; 41: 274-289.
Gracious BL, Chirieac MC, Costescu S, et al.: Randomized, placebo-controlled trial of flax oil in pediatric bipolar disorder. Bipolar Disord 2010; 12: 142-54.
Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J.: Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. Clin Exp Pharmacol Physiol 2000; 27: 1-8.
Hamilton JA.: New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2007; 77: 355-361.
Harkany T, Keimpema E, Barabás K, Mulder J.: Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. Mol Cell Endocrinol 2008; 286(Suppl 1): S84-90.
Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, et al.: Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. J Neurochem 2002; 81: 1084-1091.
Hibbeln JR, Salem N Jr.: Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy. Am J Clin Nutr 1995; 62: 1-9.
Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA.: Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. Prog Lipid Res 2008; 47: 348-380.

Horrobin DF.: The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. Schizophr Res 1998; 30: 193-208.
Horrobin DF.: The relationship between schizophrenia and essential fatty acid and eicosanoid metabolism. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1992; 46: 71-77.
Chen CT, Bazinet RP.: β-oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2015; 92: 33-40.
Imbimbo BP, Solfrizzi V, Panza F.: Are NSAIDs useful to treat Alzheimer's disease or mild cognitive impairment? Front Aging Neurosci 2010; 2.pii: 19.
Innis SM.: Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. Brain Res 2008; 1237: 35-43.
Jicha GA, Markesbery WR.: Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer‘s disease. Clin Interv Aging 2010; 5: 45–61.
Johnson EJ, Schaefer EJ.: Potential role of dietary n-3 fatty acids in the prevention of dementia and macular degeneration. Am J Clin Nutr 2006; 83(6 Suppl): 1494S-1498S.
Kawano T, Anrather J, Zhou P, et al.: Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. Nat Med 2006; 12: 225-229.
Keshavan MS, Stanley JA, Pettegrew JW.: Magnetic resonance spectroscopy in schizophrenia: methodological issues and findings--part II. Biol Psychiatry 2000; 48: 369-380.
Kim HY, Spector AA.: Synaptamide, endocannabinoid-like derivative of docosahexaenoic acid with cannabinoid-independent function. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2013; 88: 121-125.
Kim SW, Jhon M, Kim JM, et al.: Relationship between Erythrocyte Fatty Acid Composition and Psychopathology in the Vienna Omega-3 Study. PLoS One 2016; 11: e0151417.
Kuipers RS, Luxwolda MF, Offringa PJ, et al.: Gestational age dependent changes of the fetal brain, liver and adipose tissue fatty acid compositions in a population with high fish intakes. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2012; 86: 189-199.
Layé S.: Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2010; 82: 295-303.
Liu Y, Jandacek R, Rider T, et al.: Elevated delta-6 desaturase (FADS2) expression in the postmortem prefrontal cortex of schizophrenic patients: relationship with fatty acid composition. Schizophr Res 2009; 109: 113-120.
Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, et al.: A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. J Clin Invest 2005; 115: 2774-2783.
Ma QL, Teter B, Ubeda OJ, et al.: Omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid increases SorLA/LR11, a sorting protein with reduced expression in sporadic Alzheimer's disease (AD): relevance to AD prevention. J Neurosci 2007; 27: 14299-14307.
Maes M, Christophe A, Delanghe J, et al.: Lowered omega3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients.Psychiatry Res 1999; 85: 275-291.
Maes M, Smith RS.: Fatty acids, cytokines, and major depression. Biol Psychiatry 1998; 43: 313-314.
Mahadik SP, Evans DR.: Is schizophrenia a metabolic brain disorder? Membrane phospholipid dysregulation and its therapeutic implications. Psychiatr Clin North Am 2003; 26: 85-102.
Mamalakis G, Kalogeropoulos N, Andrikopoulos N, et al.: Depression and long chain n-3 fatty acids in adipose tissue in adults from Crete. Eur J Clin Nutr 2006; 60: 882-888.

Mamalakis G, Kiriakakis M, Tsibinos G, et al.: Depression and serum adiponectin and adipose omega-3 and omega-6 fatty acids in adolescents. Pharmacol Biochem Behav 2006; 85: 474-479.
Marszalek JR, Lodish HF.: Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. Annu Rev Cell Dev Biol 2005; 21: 633-657.
Martín V, Fabelo N, Santpere G, et al.: Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. J Alzheimers Dis 2010; 19: 489-502.
Mashek DG, Coleman RA.: Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. Curr Opin Lipidol 2006; 17: 274-278.
Mattson MP, Maudsley S, Martin B.: BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. Trends Neurosci 2004; 27: 589-594.
McNamara RK, Hahn CG, Jandacek R, et al.: Selective deficits in the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. Biol Psychiatry 2007; 62: 17-24.
McNamara RK, Jandacek R, Rider T, et al.: Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem orbitofrontal cortex of schizophrenic patients: gender differences and partial normalization with antipsychotic medications. Schizophr Res 2007; 91: 37-50.
McNamara RK, Welge JA.: Meta-analysis of erythrocyte polyunsaturated fatty acid biostatus in bipolar disorder. Bipolar Disord 2016; 18: 300-306.
Murphy MG.: Dietary fatty acids and membrane protein function. J Nutr Biochem 1990; 1: 68-79.
Nakamura MT, Nara TY.: Structure, function, and dietary regulation of Δ6, Δ5, and Δ9 desaturases. Ann Review Nutr 2004; 24: 345–376.
Pepicelli O, Fedele E, Berardi M, et al.: Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus. J Neurochem 2005; 93: 1561-1567.
Pooler AM, Arjona AA, Lee RK, Wurtman RJ.: Prostaglandin E2 regulates amyloid precursor protein expression via the EP2 receptor in cultured rat microglia. Neurosci Lett 2004; 362: 127–130.
Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA.: Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. Clin Nutr 2004; 23: 447-456.
Rice SM, Schäfer MR, Klier C, et al.: Erythrocyte polyunsaturated fatty acid levels in young people at ultra-high risk for psychotic disorder and healthy adolescent controls. Psychiatry Res 2015; 228: 174-176.
Ross BM, Seguin J, Sieswerda LE.: Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? Lipids Health Dis 2007; 6: 21.
Ross BM, Hudson C, Turennes A, et al.: Differential alteration of phospholipase A2 activities in brain of patients with schizophrenia. Brain Res 1999; 821: 407-413.
Salem N Jr, Litman B, Kim HY, Gawrisch K.: Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. Lipids 2001; 36: 945-959.
Serhan CN, Yang R, Martinod K, et al.: Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. J Exp Med 2009; 206: 15-23.
Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N.: Novel Anti-Inflammatory -- Pro-Resolving Mediators and Their Receptors Curr Top Med Chem 2011; 11: 629–647.
Serhan CN.: Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. Nature 2014; 510: 92-101.
Shchepinov MS, Chou VP, Pollock E, et al.: Isotopic reinforcement of essential polyunsaturated fatty acids diminishes nigrostriatal degeneration in a mouse model of Parkinson’s disease. Toxicol Lett 2011; 207: 97-103.

Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, et al.: Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. Arch Neurol 2006; 63: 1545-1550.

Stinson AM, Wiegand RD, Anderson RE.: Fatty acid and molecular species compositions of phospholipids and diacylglycerols from rat retinal membranes. Exp Eye Res 1991; 52: 213–218.

Stoll AL, Severus WE, Freeman MP, et al.: Omega 3 fatty acids in bipolar disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial. Arch Gen Psychiatry 1999; 56: 407-412.

Sublette ME, Russ MJ, Smith GS.: Evidence for a role of the arachidonic acid cascade in affective disorders: a review. Bipolar Disord 2004; 6: 95–105.

Takeuchi T, Fukumoto Y, Farada E.: Influence of a dietary n-3 fatty acid deficienty on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. Behav Brain Res 2002; 131: 193-203.

Teismann P, Vila M, Choi DK, et al.: COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. Ann N Y Acad Sci 2003; 991: 272-277.

Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, et al.: Plasma fatty acid composition and depression are associated in the elderly: the Rotterdam Study. Am J Clin Nutr 2003; 78: 40-46.

Vance DE, Vance JE.: Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes. 4th Edition , Amsterdam, Elsevier 2002, 607 p.

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F.: Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma 2004; 21: 1457-1467.

Xu S, Jay A, Brunaldi K, et al.: CD36 enhances fatty acid uptake by increasing the rate of intracellular esterification but not transport across the plasma membrane. Biochemistry 2013; 52: 7254-7261.

Yao JK, Reddy RD.: Membrane pathology in schizophrenia: implication for arachidonic acid signaling. ScientificWorldJournal 2002; 2: 1922-1936.

Zhou Q, Sheng M.: NMDA receptors in nervous system diseases. Neuropharmacology. 2013; 74: 69-75.

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.

Žák A, Burda M, Vecka M, et al.: Fatty acid composition indicates two types of metabolic syndrome independent of clinical and laboratory parameters. Physiol Res 2014; 63(Suppl 3): S375-S385.

FYSIOLOGICKÝ A KLINICKÝ VÝZNAM STEAROYL-KOENZYM A DESATURASY 1

PHYSIOLOGICAL AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF STEAROYL-COENZYME A DESATURASE 1

A. Žák, A. Slabý, E. Tvrzická, J. Macášek, M. Vecka, M. Zeman, B. Staňková

IV. interní klinika a Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze

Abstrakt

Choroby asociované s insulínovou rezistencí jako je nadváha/obezita, diabetes mellitus 2.typu, srdečně-cévní onemocnění a některé nádory, jsou charakterizovány poklesem obsahu tkáňových vícenenasycených mastných kyselin řetězcem a současně zvýšenou akumulací neesenciálních – nasycených (SFA) i mononenasycených mastných kyselin (MFA) v tukové tkáni a dalších orgánech (játra, myokard, kosterní svalstvo a pankreas). Zde se hromadí mastné kyseliny (FA) s 16 či 18 atomy C – kys. palmitová (16:0), palmitolejová (16:1n-7), stearová (18:0), vakcenová (18:1n-7) a olejová (18:1n-9). Zde tyto FA přispívají zhruba ze 75 % k *poolu* FA triglyceridů (TG). K akumulaci uvedených FA dochází v důsledku vysokého příjmu tuku potravou, nebo v důsledku stimulované *de novo lipogeneze* (DNL) syntézou z netukových sloučenin, převážně sacharidů. Enzymy DNL – syntáza mastných kyselin (FAS) katalyzuje syntézu PA (16:0) z acetyl-CoA, elongáza FA (ELOVL6) katalyzuje prodloužení PA (16:0) na SA (18:0) a POA (16:1n-7) na VA (18:1n-7). Posledním enzymem je stearoyl-CoA desaturáza-1 (SCD-1), která vnáší dvojnou vazbu do pozice Δ9 molekuly FA. SCD-1 katalyzuje syntézu POA z PA a OA z SA. Aktivita SCD-1 je regulována geneticky, hormonálně i nutričně. Dále ji ovlivňuje řada faktorů zevního prostředí i chorobné stavy.

Změny aktivit SCD-1 (resp. D9D) byly popsány u řady chorob, mezi něž patří metabolická onemocnění (obezita, metabolický syndrom, DM2, aterogenní dyslipidémie), KVO (hypertenze, ischemická choroba srdeční), chronické subklinický zánět, osteoporóza i některé nádory.

Genetická manipulace *Scd-1* u laboratorních zvířat a některé polymorfismy *SCD-1* u lidí, asociované s homozygotní konfigurací minoritních variant ukazují, že ztráta/nebo snížení aktivity D9D může mít protektivní účinek u stavů spojených se zvýšenou akumulací lipidů neesenciálních FA. Deficit SCD-1 redukuje množství tukové tkáně, zvyšuje citlivost orgánů a insulin a je spojen s rezistencí vůči dietou indukované obezitě. Předpokládá se, že inhibice exprese SCD-1 by mohla mít přispívat k léčbě obezity, diabetes mellitus a dalších metabolických chorob.

Experimentální studie na zvířecích modelech a výskyt vzácných onemocnění spojených s chyběním, resp. výrazným poklesem aktivit D9D podtrhují význam SCD-1 pro zdravý vývoj organismu i pro etiologii a patogenezi mnoha civilizačních chorob.

Úvod

Nadměrná akumulace tuků a/nebo nepoměr mezi jednotlivými skupinami FA potravinových tuků je považována za rizikový faktor rozvoje metabolických chorob, jako je obezita, diabetes mellitus (DM), nealkoholová steatóza jater, dále kardiovaskulárních onemocnění i některých nádorů (Lottenberg et al. 2012; Saponaro et al. 2015). V patogeneze těchto onemocnění se uplatňuje jak ektopická akumulace tuku tak lipotoxicita. Příčinou lipotoxicity není pouze nadměrný příjem tuků a nepoměr mezi nasycenými a vícenenasycenými mastnými kyselinami v potravních tucích, ale také excesivní lipolýza, poruchy adipogeneze a insulinová rezistence

tukové tkáně (Saponaro et al. 2015). I když dysbalance lipidového metabolismu je primární příčinou lipotoxicity, změny lipogeneze a lipolýzy mohou být jak příčinou tak následkem inzulínové rezistence (Saponaro et al. 2015).
Lipogeneze je stimulována v důsledku nadměrného příjmu tuků/a nebo sacharidů potravou a nadměrný tuk je uskladněn ve formě triglyceridů (TG) v tukové tkáni. Nalačno se nadbytek volných mastných kyselin (FFA), uvolněných převážné ze subkutánní tukové tkáně, akumuluje ve netukových tkáních (ektopická akumulace tuku). Nadměrná akumulace tuku v játrech je spojena s hypertriglyceridémií i nealkoholovou chorobou jater, hromadění tuku v pankreatu je spojeno s poruchou sekrece insulinu, dysfunkcí β-buněk a jejich apoptózou. Akumulace lipidů v myokardu má vztah ke kardiomyopatii, koronární ateroskleróze a náhlé smrti. Zvýšení obsahu lipidů kosterního svalstva zapříčiňuje insulinovou rezistenci a zpomalené vychytáváním glukózy.
Základní příčinou tkáňové akumulace lipidů je nepoměr mezi *de novo lipogenezou*, příjmem tuků potravou, na straně jedné a katabolismem FA β-oxidací v mitochondriích (Saponaro 2015).
Akumulace TG ovlivňují zásadně 3 pochody *de novo lipogeneze* (DNL), lipolýza a oxidace tuků (Saponaro et al. 2015). Syntéza TG je přesně regulovaný proces, který se odehrává především v tukové tkání, v játrech, myokardu, kosterním svalstvu a pankreatu.
Nadměrný kalorický příjem vede k akumulaci TG tukové tkáně, ve kterých jsou nejhojněji zastoupeny následující FA: kys. olejová (OA: 18:1n-9), palmitová (PA: 16:0) a linolová (LA, 18:2n-6), které přispívají ze 75 % ke všem FA TG tukové tkáně. Dále je zde přítomna kys. palmitolejová (POA, 16:1n-7), stearová (SA, 18:0) a vakcenová (VA, 18:1n-7), které přispívají dalšími 8 % k *poolu* FA TG tukové tkáně (Tan et al. 2015).
V lidské tukové tkáni jsou exprimovány 3 enzymy nezbytné pro DNL výše uvedených FA. Jedná se o syntázu mastných kyselin (FAS), která syntetizuje kys. palmitovou z acetyl-CoA, elongázu mastných kyselin (ELOVL6), která elonguje řetězec FA s 16 C na FA s 18 C a stearoyl-CoA desaturáza 1 (SCD-1), která vnáší dvojnou vazbu do molekuly FA (Tan et al. 2015). Experimentální studie s geneticky modifikovanými laboratorními zvířaty prokázaly, že ztráta aktivity SCD-1 je spojena se zlepšením metabolického profilu, zmírněním insulinové rezistence i odolností vůči rozvoji dietně indukované obezity (Hodson a Fielding 2013).

Stearoyl-CoA desaturáza: struktura a biochemie
SCD-1 (EC 1.14.99.5) je enzym obsahující železo, vázaný na endoplasmatickém retikulum (ER), který katalyzuje syntézu mononenasycených FA z příslušných nasycených FA, až již syntetizovaných *de novo*, nebo exogenních, přijímaných potravou. SCD-1 vnáší *cis* dvojnou vazbu do molekuly SFA mezi 9. a 10. atom C nasycené FA (Δ-9 desaturace, D9D).
I když SCD-1 může vnést *cis* dvojnou vazbu do řetězce FA s 12 až 19 atomy C, tak preferenčním substrátem SCD-1 je palmitoyl-CoA (16:0) a stearoyl-CoA (18:0), které jsou v reakci katalyzovaná SCD-1 za spoluúčasti NADH, cytochrom b_5 reduktázy, cytochromu b_5 a molekulárního kyslíku přeměněny na palmitoleoyl-CoA (16:1n-7) a oleoyl-CoA (18:1n-9) (Mauvoisen a Mounier 2011). Schéma D9D je schématicky znázorněna na obrázku 1.
Specificita částečně purifikované SCD-1 klesá v pořadí 18:0 > 17:0 > 16:0 > 19:0 > 14:0 > 15:0. Desaturace kys. stearové (18:0) na kys. olejovou (18:1n-9) v plasmě dosahuje 14 % během 7 dní, zatímco kys. palmitové (16:0) na palmitolejovu (16:1n-7) ve stejném období činí pouhá 2 % (Hodson a Fielding 2013).
Kyseliny palmitolejová (16:1n-7) a olejová (18:1n-9) patří mezi nejhojněji zastoupené monenové FA. Jsou substrátem syntézy řady lipidových sloučenin – fosfolipidů (PL), triglyceridů (TG), esterů cholesterolu (CE), vosků i alkyldiacylglycerolů. Složení FA fosfolipidů je důležité pro zachování fluidity buněčných membrán a fyziologických buněčných funkcí. MFA jsou nejen důležitou strukturní součástí lipidů, ale u také mediátory

signální transdukce, buněčného růstu, diferenciace a regulují příjem potravy v CNS (Bradley et al. 2008; Obici et al. 2002; Yonezawa et al. 2008).
Syntéza TG a CE *de novo* je aplifikována propojením syntetických drah SCD-1, acyl-CoA:acyltransferázy (ACAT) a diacylglycerolové acyltransferázy (DGAT) na membráně ER (obrázek 2).
SCD-1, má relativní molekulovou hmotnost 40 kDa, obsahuje 4 transmebránové domény, přičemž NH2- a -COOH konce jsou orientované do cytozolu a 8 histidinových (His) zbytků, vytváří His box, vázající molekulu železa v katalytickém centru desaturázy.
U lidí jsou známy 2 geny kontrolující D9D aktivitu. *SCD-1*, který je exprimován převážně v tukové tkáni a játrech a *SCD-5*, který je exprimován v mozku a pankreatu (Paton a Ntambi 2009). *SCD-1* gen je kódován na 10. chromozómu, má velikost 24 kb s 6 exony. Gen *SCD-5* je kódován na 4. chromozómu (4q21.1) s délkou 169 kb a 5 exony. Lidský SCD-1 vykazuje vysokou homologii s *Scd-1* myší a potkanů, zatímco *SCD-5* je specifický pouze pro primáty.
SCD-1 je účinně a rychle regulována. Regulace je komplexní a je ovlivněna degradací enzymu v mikrosomech a změnami její transkripce. Biologický poločas jaterní SCD-1 činí 3 – 5 hodin. Za normálních dietních podmínek je SCD-1 mRNA exprimována v tukové tkání, játrech a meibomské žláze (Mauvoisen a Mounier 2011).
Aktivitu SCD-1 reguluje řada faktorů dietní povahy, hormonálních činitelů i faktorů zevního prostředí. Promotor SCD-1 obsahuje několik předpokládaných vazebných míst pro transkripční faktory, které pozitivně či negativně regulují transkripci genu pro SCD-1. Insulin, androgeny, ghrelin a růstové faktory (PDGF, EGF, TGF-β) aktivují SCD-1. Naopak působení leptinu, estrogenů, glukagonu, DHEA, trijódtyroninu potlačuje expresi SCD-1. Aktivitu D9D (resp. SCD-1) inhibují prozánětlivé cytokiny (TNF-α, interleukin-11) a c-AMP (včetně léků zvyšujících jeho intracelulární koncentrace). Ženy mají ve srovnání s muži vyšší aktivitu SCD-1 i poměr 16:1n-7(16:0 v plasmatických esterech cholesterolu (Hodson a Fielding 2013).
Z nutričních faktorů ovlivňují expresi SCD-1 především mastné kyseliny, sacharidy, exogenní cholesterol a některé vitaminy. Nasycené FA, vitamin A, aktivátory PPAR (thiazolidindiony, fibráty) a exogenní cholesterol aktivují expresi SCD-1. Opačné účinky, inhibice exprese SCD-1, byla popsána po podávání vícenenasycených FA (PUFA), konkrétně působením α-linolenové (ALA, 18:3n-3), dokosahexaenové (DHA, 22:6n-3), eikosapentaenové (EPA, 20:5n-3), arachidonové (AA, 20:4n-6) a konjugované linolové kyseliny (CLA, trans-10, cis-12 18:2). Na rozdíl od nasycených a vícenenasycených FA mají oleje obsahující monoenové FA neutrální vliv na změnu exprese SCD-1. Konsumace alkoholu u lidí zvyšuje koncentrace 16:1n-7 v plasmatických fosfolipidech. Podobně kouření cigaret ve většině studií zvyšovalo koncentrace 16:1n-7 a 18.1n-9 v plasmatických fosfolipidech a esterech cholesterolu.
Mezi předpokládané regulátory exprese SCD-1 patří následující transkripční faktory – SREBP-1c, LXR, PPAR a estrogenové receptory a další (NF-Y, NF-1, AP-1). Vysokosacharidová dieta indukuje expresi SCD-1 aktivací SREBP-1-c převážně v jaterní tkáni a myokardu (Paton a Ntambi 2009; Mauvoisen a Mounier 2011). Experimentální i klinické studie prokázaly propojení metabolismu sirných aminokyselin (methionin, cystein, taurin, homocystein) s metabolismem lipidů a aktivitami enzymů lipogeneze. Homocystein aktivuje SREBP-1c a PPARα, cystein moduluje aktivitu SREBP-1c, PPARγ a receptory pro estrogen. Populační studie prokázaly vazbu mezi koncentrací cysteinu v plasmě na straně jedné a indexem D9D (poměr 16:1n-9/16:0) a plasmatickou koncentrací cholesterolu, TG, apolipoproteinu B na straně druhé (Poloni et al. 2015).

Stanovení aktivity SCD-1

Aktivita SCD-1 (resp. D9D) lze analyzovat přímo *in vitro* pomocí radioaktivně značených substrátů (^{14}C stearát, nebo ^{14}C palmitát) ve tkáňových homogenátech za optimálních katalytických podmínek nebo u experimentálních zvířat pomocí rychlosti konverze radioaktivně značených prekurzorů na jejich produkty (Hodson a Fielding 2013). Další možností je měření exprese SCD-1 v bioptických vzorcích tukové tkáně nebo jater.

Přímé určení aktivity však není realizovatelné na rozsáhlých souborech klinických a epidemiologických z důvodů etických i praktických. V klinické praxi se jako surogátního markeru využívá různých poměrů produkt/substrát lipidových tříd plasmy (fosfolipidy, estery cholesterolu, TG), nebo isolovaných VLDL. Jako tzv. SCD-1 index se užívá poměr 18:1n-9/18:0 (D9D18), nebo 16:1n-7/16:0 (D9D16) plasmatických fosfolipidů nebo esterů cholesterolu. Možné je použít poměr 14:1n-5/14:0, ale jeho využití je ztíženo nízkými koncentracemi kys. myristové (14:0) a myristolejové (14:1n-5) (Hodson a Fielding 2013). Nejlepší korelace mezi expresí jaterní SCD-1 u lidí byla zjištěna pro poměr 16:1n-7/16:0 v TG isolovaných VLDL. Jiní autoři používají jako surogátní marker aktivity SCD-1 poměr kyselin vakcenové (18:1n-7), palmitolejové (16:1n-7) a olejové (18:1n-9) ku kyselinám palmitové (16:0) a olejové (18:0) (Tan et al. 2015).

Manipulace SCD-1 u experimentálních zvířat

U laboratorních myší s globálně vyřazeným (knock-out) genem pro *Scd-1* ($^{-/-}$) bylo popsáno zmenšení objemu tukové tkáně a tělesné hmotnosti přes zvýšený příjem potravy, rezistence vůči dietně (sacharidy i tuky) indukované obezitě, spolu se zvýšení citlivosti na insulin. Tyto změny jsou částečně podmíněny zvýšením metabolického obratu, bazálního energetického výdeje a β-oxidace FA. U těchto zvířat byla prokázána vyšší exprese carnitin-palmitoyl-transferázy I (CPT-I) a up-regulace enzymů oxidace FA (Jogl et al. 2004). Změny jsou pravděpodobně indukovány nahromaděním nasycených FA, které alostericky inhibují acetyl-CoA karboxylázu syntetizující malonyl-CoA. Pokles koncentrace malonyl-CoA stimuluje transport FA do mitochondrií (Sundberg et al. 200; Warensjö et al. 2005). Uvažuje se, že v důsledku deficitu SCD-1 je stimulována AMP-dependentní proteinová kináza (AMPK), která stimuluje oxidaci FA (Yonezawa et al. 2008). Naproti tomu myši s vyřazením genu SCD-1 v játrech (*Scd-1* ($^{-/-}$) jsou chráněny pouze proti sacharidy-indukované obezitě (Miyazaki et al. 2007).

Myši s vyřazením genu *Scd-1* ($^{-/-}$) mají ve srovnání s kontrolními zvířaty – *SCD-1* ($^{+/+}$) – lepší homeostázu glukózy a působení insulinu v periferních tkáních. Ztráta SCD-1 funkce zvyšuje fosforylaci tyrosinových zbytků insulinového receptoru (IR) a substrátu-1 IR (IRS1) a zlepšuje tak insulin-dependentní transport glukózy. Nezávisle na přítomné lipodystrofii mají myši s *Scd-1* ($^{-/-}$) účinnější insulínovou signalizaci (Rahman et al. 2003). Vyřazení SCD-1 se vysvětluje náhradou oleátu za PUFA ve fosfolipidech buněčných membrán s následným zvýšením fluidity membrány a zlepšením funkce insulinové signalizace (Pan et al. 1994).

Aktivita D9D a polymorfismy SCD-1 u lidí

Experimentální a klinické studie ukazují, že zvyšování. hmotnosti tukové tkáně je spojeno s vyšším stupněm desaturace FA spojeným s aktivitou D9D (resp. SCD-1), zatímco metabolickou dysfunkci reflektuje lépe aktivita elongázy mastných kyselin (ELOVL6), na kterou nepřímo ukazuje index vyjádřený poměrem neesenciálních FA s 18C ku FA s 16C, tj. poměr součtu kyselin stearové, vakcenové a olejové ku součtu kyselin palmitové a palmitolejové (Tan et al. 2015).

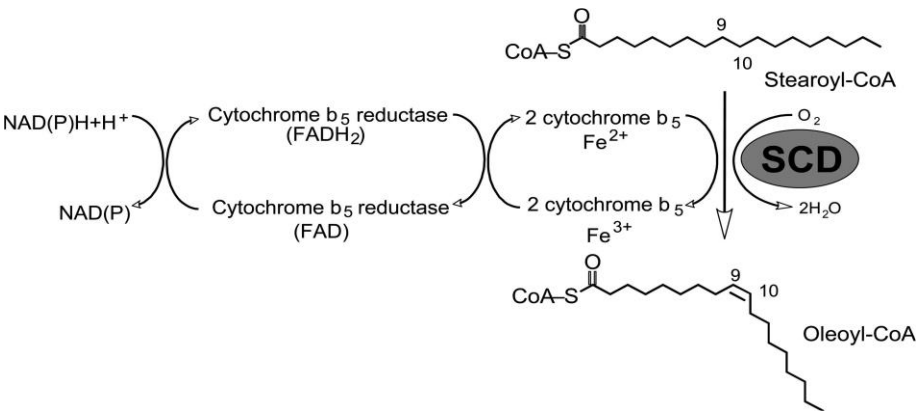
Předpokládá se účast zvýšené exprese SCD-1 v etiologii hypertriglyceridémie, aterosklerózy a DM. Byla popsána zvýšená aktivita D9D u osob s familiární kombinovanou hyperlipidémií

(Mar-Heyming et al. 2004), dále u pankreatického duktálního karcinomu (Macášek et al. 2012), karcinomu jícnu (Zemanová et al. 2016) i u chronické pankreatitidy (Zeman et al. 2016). Aktivita D9D je spojena s počtem komponent MS a nepříznivě koreluje s parametry oxidačního stresu (Žák et al. 2007).

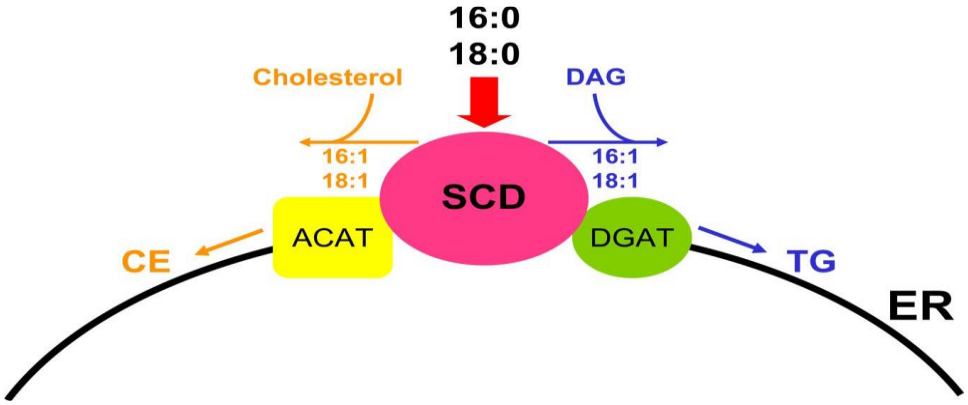
Polymorfismy *SCD-1* byly sledovány u některých nádorů, obezity, metabolického syndromu, kardio-metabolických rizikových faktorů a byla sledována jejich interakce s příjmem monoenových FA na rozvoj obezity i hypolipidemickou odpověď po podávání PUFA n-3. Švédští autoři prokázali vrozenou variabilitu *SCD-1* genu ve vztahu k riziku úmrtí na zhoubné nádory. Zjistili, že běžná alela (AA) rs3701 a minoritní alela rs379367 byla spojena se zvýšenou D9D aktivitou, resp. poměrem 16:1n-7/16:0, přičemž rizikové jsou tyto tyto polymorfismy u mužů s nízkým příjmem PUFA (Byberg et al. 2014). První studie zabývající se vztahem polymorfismů *SCD-1* k riziku vzniku DM2 zjistila hraniční asociaci mezi rs41290540 a DM2T (p=0.06), přičemž byla zjištěna vyšší frekvence minoritní alely u DM (Liew et al. 2004). Švédští autoři popsali významnou asociaci minoritních alel čtyř polymorfismů *SCD-1* (rs10883463, rs7849, rs2167444, rs508384) s nižším BMI, menším obvodem pasu a nižší inzulínovou rezistencí. I když předpokládají vztah minoritních alel k nižší aktivitě D9D, tak rozdíly aktivit D9D mezi nosiči minoritních a běžných alel nebyly signifikantní (Warensjö et al. 2007). Studie na kostarické populaci prokázala významnou asociaci polymorfismu SCD-1 rs1502893 s MS, kdy genotypy CT a TT, oproti běžnému genotypu CC, vykazovaly vyšší prevalenci MS a tato asociace byla vyznaná u žen (Gong et al. 2011). Studie španělských autorů zjistila vazbu několika polymorfismů SCD-1 s obezitou. U nosičů minoritních alel rs7849 a rs508384 prokázali nízké riziko obezity, zatímco vliv minoritní alely rs1502593 byl opačný. Současně poukázali na významnou interakci polymorfismu *SCD-1* (rs10883463) s dietním příjmem 18:1n-9 a 18:2n-6 ve vztahu k aktivitě D9D (Martín-Núñez et al. 2013). Kardiometabolické RF (TG, CRP, IL-6 a koncentrace glukózy) jsou asociovány s některými polymorfismy SCD-1 (rs508384, rs3071, rs3829160) stejně jako aktivity D9D (rs2234970). Také byla pozorována signifikantní interakce pro rs508384, příjem PUFA n-3 a změnu glykémie (Rudkowska et al. 2014). V „Epic-Potsdam Study“ byla popsána slabá asociace některých polymorfismů *SCD-1* s koncentrací TG, glykovaného hemoglobinu a funkčními jaterními testy (Arregui et al. 2012).

Lipidy jsou klíčovými protagonisty hromadných metabolických chorob, zvláště za stavů, kdy dochází k jejich nahromadění v oblasti viscerální nebo netukových tkání. Za těchto stavů způsobují buněčnou dysfunkci a poškození orgánů. Jedním z časných markerů dysfunkce lipidového metabolizmu zvýšení aktivity SCD-1, která je významným regulátorem lipidové a glukózové homeostázy.

Obrázek 1. Schéma Δ-9 desaturace



Obrázek 2. Propojení aktivit SCD-1 a syntézy triglyceridů a esterů cholesterolu



Vysvětlivky: 16:0 – kys. palmitová; 18:0 – kys. stearová; 16:1 – kys. palmitolejová; 18:1 – kys. olejová; SCD – stearoyl Co-A desaturáza; CE – estery cholesterolu; DAG – diacylglycerol; TG – triglyceridy; DGAT – diacylglycerol acyltransferázy; ACAT – acyl-CoA cholesterol:acyltransferázy; ER – endoplasmatickém retikulum

Práce byla podpořena výzkumnými projekty – PRVOUK P25/LF1/2 (MŠMT ČR) a RVO VFN64165/2012 (MZ ČR).

Reference

Arregui1 M, Buijsse B, Stefan N, et al.: Heterogeneity of the Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1)Gene and Metabolic Risk Factors in the EPIC-Potsdam Study. PLoS One 2012; 7: e48338.

Bradley RL, Fisher FM, Maratos-Flier E.: Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-α and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. Obesity (Silver Spring) 2008; 16: 938-944.

Byberg L, Kilander L, Warensjö Lemming E, et al.: Cancer death is related to high palmitoleic acid in serum and to polymorphisms in the SCD-1 gene in healthy Swedish men. Am J Clin Nutr 2014; 99: 551-558.

Gong J, Campos H, McGarvey S, et al.: Genetic Variation in Stearoyl-CoA Desaturase-1 Is Associated with Metabolic Syndrome. Prevalence in Costa Rican Adults. J Nutr 2011; 141: 2211-2218.

Hodson L, Fielding BA.: Stearoyl-CoA desaturase: rogue or innocent bystander? Prog Lipid Res 2013; 52: 15–42.

Jogl G, Hsiao Y, Tong L.: Structure and function of carnitine acyltransferases. Ann NY Acad Sci 2004; 1033: 17-29.

Liew CF, Groves CJ, Wiltshire S, et al.: Analysis of the contribution to type 2 diabetes susceptibility of sequence variation in the gene encoding steraroyl-CoA desaturase, a key regulator of lipid and carbohydrate metabolism. Diabetologia 2004; 47: 2168-2175.

Lottenberg AM, Afonso MDA S, Lavrador MS, et al.: The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. J Nutr Biochem 2012; 23: 1027-1040.

Macášek J, Vecka M, Žák A, et al.: Plasma Fatty Acid Composition in Patients with Pancreatic Cancer: Correlations to Clinical Parameters. Nutr Cancer 2012; 64: 946-955.

Mar-Heyming R, Miyazaki M, Weissglas-Volkov D, et al.: Association of stearoyl-CoA desaturase 1 activity with familial combined hyperlipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 1193–1199.

Martín-Núñez GM, Cabrera-Mulero R, Rojo-Martínez G, et al.: Polymorphisms in the SCD1 gene are associated with indices of stearoyl CoA desaturase activity and obesity: A prospective study. Mol Nutr Food Res 2013; 57: 2177-2184.
Mauvoisin D, Mounier C.: Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. Biochimie 2011; 93: 78-86.
Obici S, Feng Z, Morgan K, et al.: Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. Diabetes 2002; 51: 271-275.
Pan DA, Hulbert AJ, Storlien LH.: Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. J Nutr 1994; 124: 1555–1565.
Paton CM, Ntambi JM.: Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009; 297: E28-E37.
Poloni S, Blom HJ, Schwartz IV.: Stearoyl-CoA Desaturase-1: Is it link between sulphur aminoacids and lipid metabolism? Biology (Basel) 2015; 4: 383-396.
Rahman SM, Dobrzyn A, Dobrzyn P, et al.: Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 11110-11115.
Rudkowska I, Julien P, Couture P, et al.: Cardiometabolic risk factors are influenced by Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) −1 gene polymorphisms and n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation. Mol Nutr Food Res 2014; 58: 1079-1086.
Saponaro C, Gaggini M, Carli F, et al.: The subtle balance between lipolysis and lipogenesis, A critical point in metabolic homeostasis. Nutrients 2015; 7: 9453–9474.
Sundberg JP, Boggess D, Sundberg BA, et al.: Asebia-2J [Scd1(ab2J)]: a new allele and a model for scarring alopecia. Am J Pathol 2000; 156: 2067-2075.
Tan CY, Virtue S, Murfitt S, et al.: Adipose tissue fatty acid chain length and non-unsaturation increases with obesity and insulin resistance. Sci Rep 2015; 5: 18366.
Warensjö E, Riserius U, Vessby B.: Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. Diabetologia 2005; 48: 1999–2005.
Warensjö E, Ingelsson E, Lundmark P, et al.: Polymorphisms in the SCD1 gene: associations with body fat distribution and insulin sensitivity. Obesity (Silver Spring) 2007; 15: 1732–1740.
Yonezawa T, Haga S, Kobayashi Y, et al.: Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2008; 367: 729–735.
Zeman M, Macášek J, Burda M, et al.: Chronic pancreatitis and the composition of plasma phosphatidylcholine fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2016; 108: 38-44.
Zemanová M, Vecka M, Petruželka L, et al.: Plasma Phosphatidylcholines Fatty Acids in Men with Squamous Cell Esophageal Cancer: Chemoradiotherapy Improves Abnormal Profile. Med Sci Monit 2016; 22: in press;
Žák A, Tvrzická E, Vecka M, et al.: Severity of metabolic syndrome unfavourable influences oxidative stress and fatty acid metabolism in men. Tohoku J Exp Med 2007; 212: 359-371.