

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

SLOVENSKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
Společnost klinické biochemie – Sekce pro aterosklerosu

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

4. INTERNÍ KLINIKA 1. LF UK

Vás vítají na symposiu s edukačním programem
pořádaném pod záštitou děkana 1. LF UK prof. MUDr. Aleksiho Šeda, DrSc.

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

2 0 1 8

diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku

P r a h a 12. - 13. září 2018

Hlavní název: ATHEROSKLEROSA 2018

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 2018

Cena: neprodejné

ISBN 978-80-905595-5-4

ČESTNÉ PŘEDSEDNICTVO

Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

Děkan 1. LF UK Praha

doc. MUDr. Milan Kuchta, CSc.

Lékařská fakulta UPJŠ, Košice, Slovensko

Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Předseda Oborové rady biochemie a patobiochemie 1. LF UK Praha

PROGRAMOVÝ VÝBOR

**Josef Hyánek, Jozef Kollár, Marie Kunešová, Magdalena Lejsková,
Jaroslav Macášek, Petr Nachtigal, František Stožický, Miroslav Zeman,
Aleš Žák**

ADRESA SYMPOSIA

Lékařský dům

Sokolská 490/31, Praha 2

Věnováno památce doc. MUDr. Jozefa Kollára, DrSc.



Doc. MUDr. Jozef Kollár, DrSc. a jeho cesta v lipidológii

**doc. MUDr. Milan Kuchta, CSc., RNDr. Darina Petrášová, PhD.
doc. MUDr. Ingrid Schusterová, PhD.**

Lekárska fakulta UPJŠ, Košice Slovensko

V Košiciach dňa 11. 1. 2018, vo veku 87 rokov, zomrel doc. MUDr. Jozef Kollár, DrSc. Docent Kollár sa narodil 3. apríla 1932 v obci Ovčie, v okrese Prešov. V roku 1950 maturoval v Prešove, lekársku fakultu študoval v 1950 - 1953 na LF UK a v 1953 -1956 na LF UPJŠ, kde aj promoval. V 1967 nastúpil na II. internú kliniku LF UPJŠ. V rokoch 1969 - 1970 absolvoval študijný pobyt na London School Hygiene and Tropical Medicine. V 1974 absolvoval I. atestáciu – vnútorné choroby a v 1978 II. atestáciu. Titul CSc. obhájil v 1974 na LF UK, kde aj v 1980 habilitoval. Získal aj tituly vedecký pracovník IIa., Ia. V roku 1997 získal titul DrSc. Po založení Ústavu experimentálnej medicíny UPJŠ v r. 1984 sa stal v roku 1985 jeho prvým riaditeľom a bol ním až do roku 1998. Bol mimoriadne aktívnym organizátorom vedeckých a odborných podujatí o čom svedčí aj zorganizovaných niekoľko desiatok odborných konferencií, medzinárodných kongresov, medzinárodných edukačných kurzov, sympózií o použití počítačových programov v kardiológii, či vedeckých dní o dyslipémiách a ateroskleróze. Bol aj zanietým učiteľom, veď viedol 34 krúžkov ŠVOČ, 12 CSc. a PhD. doktorandov, tiež 33 diplomantov TU Košice, 15 rokov sprevádzal zahraničných študentov. Publikoval 256 pôvodných vedeckých prác, z toho 50 v zahraničí mimo Čiech, 159 odborných prác, predniesol vyše 500 prednášok doma i v zahraničí a jeho práce majú 224 citácií. Napísal viacero významných monografií ako sú: Ateroskleróza – dá sa pred ňou chrániť? (1993), Relatívne koronárne riziko apolipoproteínov, antioxidačnej záťaže a antioxidačná ochrana

(1994), Lipidy a lipoproteíny (1996), Rukoväť porúch lipidového metabolizmu. Klinika a molekulová biológia (1997), Apoprotein Research (2007 USA), Aterotrombóza – patofyziológia a epidemiológia (2016).

V roku 1996 bol poverený, v rámci Sekcie aterosklerózy SSKB, funkciou hlavného odborného redaktora časopisu Ateroskleróza, metabolizmus, klinika a liečba, čo súviselo so založením tohto časopisu, ktorého bol 2 desaťročia najvýznamnejším redaktorom.

Bol fyzickým aj duchovným prepojením medzi slovenskou a českou lipidológiou celý svoj profesionálny život.

Za svoju dlhoročnú činnosť získal viaceré ocenenia, z ktorých spomenieme: 2012 - Zlatá medaila SLS, 2012 – zlatá medaila American Biographical Institut, 1982 - Strieborná medaila LF UPJŠ, 1986 - bronzová medaila ÚV ČSTVJ za aplikovanie výpočtovej techniky do kardiológie, 2005 - Great Minds of the 21 st. Century for Education (American Biographical Institut), 1962 - strieborná medaila ČSČK, 1979 - pamätná plaketa prof. Libenského, za rozvoj československej kardiológie, 2011 - bronzová medaila Karlovej univerzity, 2016 - pamätná medaila Založenia spoločnosti lekársko slovanskej v Budapešti – SLS, 1992, 1994 a 1998 - Reinišova cena ČS. angiologickej spoločnosti. Najlepšia monografia roka Slovenského literárneho fondu: Ateroskleróza – dá sa pred ňou chrániť? Bol čestným členom Patofyziologickej spoločnosti J. E. Purkyně, riadnym členom The New York Academy of Sciences. Jeho vedecko-výskumné aktivity boli zamerané na: Epidemiológiu rizikových faktorov a ICHS, na experimentálne štúdie na zvieratách a na klinické štúdie. Riešil množstvo vedecko-výskumných úloh a súbory probandov v nich mali aj vyše 5000 členov. Všetkými jeho prácami sa, ako červená niť, prepletala „lipidológia“. Jeho invencia a pracovitosť boli jedným z dôvodov, že ako prvý na Slovensku diagnostikoval a opísal „alkoholické srdce“ (etanolickú – toxickú kardiomyopatiu), tiež ako prvý na Slovensku diagnostikoval a opísal kongestívnu srdcovú slabosť zapríčinenú tvorbou protilátok proti srdcovému svalu a medzi prvými vo svete opísal príčiny náhlej smrti po vypití smrteľného množstva 50 % alkoholu (4 gramy a viac na kg) u psov.

Chceme mu aj takouto formou poďakovať za vyše 50 ročnú pedagogickú, vedeckú a publikačnú činnosť, za rozvoj experimentálnej medicíny na východe Slovenska, za trvalé stimuly, za výsledky práce, za kolegialitu, za disemináciu výsledkov klinického výskumu, za podporu mladých, za reprezentáciu LF UPJŠ i Slovenska. Budeme sa snažiť pokračovať v jeho práci a jeho odkaze.

O B S A H

Autor	Str.
Floriánková	1
Fojtíková	7
Hertelyová	13
Hrabák	17
Hüttl	25
Hyánek	30
Lejsková	35
Macášek	42
Malínská	51
Marková	54
Nachtigal	58
Oliyarnyk	59
Poruba	63
Široká	67
Šmíd	71
Vecka	72
Zeman	81
Žák	90

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

SPECIFIKA LIPIDOVÉHO METABOLISMU U PACIENTŮ S MENTÁLNÍ ANOREXIÍ

LIPID METABOLISM SPECIFICS IN PATIENTS WITH ANOREXIA NERVOSA

M. Floriánková^{1,2}, M. Vecka¹, B. Staňková¹, P. Szitányi², A. Žák¹

¹ Univerzita Karlova, 1.lékařská fakulta, IV. interní klinika

² Univerzita Karlova, 1.lékařská fakulta, Klinika dětského a dorostového lékařství

Abstract

Anorexia nervosa (AN) is a complex psychiatric disorder with a high morbidity and mortality, characteristic with a food intake restriction (restricting type) and/ or other weight-regulatory behaviours such as self-induced vomiting, misuse of laxatives and diuretics or excessive exercise (purging type).

The disorder has a prevalence of around 0.2 - 0.8 % among young women and women/men ratio is about 10:1. The most common onset of AN is in early to mid-adolescence. AN represents a pathophysiological model of simple starvation with endocrinal, metabolic, hematologic, musculoskeletal and nutritional abnormalities. In patients with AN, dyslipidemia with elevated total cholesterol, HDL-C and triglycerides is present in more than 50 %. Some studies have proved a deficiency in polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) of the n-3 and n-6 family in patients with AN, with compensatory changes in non-essential fatty acids (FA). There have been no sign of essential fatty acids deficiency. There have been found elevated levels of short chain saturated, short-chain monounsaturated, branched chain and odd-chain fatty acids in plasma phospholipids in patients with AN. In our previous study, we have proved elevated levels of plant sterols (campesterol and β -sitosterol), which have been used as a surrogate marker of exogenous cholesterol intake. Lathosterol (as a marker of de-novo cholesterol synthesis) level have been unchanged. Patients with AN had increased levels of plasma total cholesterol, triglycerides and HDL-cholesterol. We have found significant differences between AN group and control group in FA profiles in cholesterol esters and phosphatidylcholine. An increased activity of $\Delta 9$ desaturase and a decreased activity of $\Delta 5$ desaturase have been observed in cholesterol esters of AN group.

There is a supposition, that proinflammatory cytokines, eicosanoids and oxylipins (docosanoids) can be involved in AN development. A novel AN susceptibility gene, Epoxide Hydrolase 2 (*EPHX2*), influences AN risk through *in vivo* interaction with dietary LC-PUFA. There have been found significantly higher activity of soluble Epoxide Hydrolase in AN patients, with higher levels of proinflammatory oxylipins derived from α -linolenic acid, docosahexaenoic acid, arachidonic acid, linoleic acid.

A role of bile acids in metabolic changes in patients with AN is an actual subject of our research. Nestel (1973) describes a decreased secretion of bile acids in AN patients. Bile acids, which had been considered as compounds, necessary for lipid digestion and absorption, are now considered as important metabolic modulators with significant endocrine and metabolic effects.

Anorexia nervosa is a complex disorder with extensive changes in lipid metabolism, including dyslipidemia, changes in fatty acids profiles or changes in conversion of LC-PUFA to proinflammatory and anti-inflammatory eicosanoids. A role of bile acids in metabolic pathways is a subject of our further research.

Úvod do problematiky

Mentální anorexie (anorexia nervosa, AN) je komplexní psychiatrická porucha s vysokou morbiditou a mortalitou, která se nejčastěji manifestuje během dospívání. Tato porucha příjmu potravy je typická omezením energetického příjmu s cílem snížení tělesné hmotnosti a chorobným strachem z váhového přírůstku, spojeným s poruchou vnímání vlastní hmotnosti a tvaru postavy (American Psychiatric Association, 2013; Zipfel et al., 2015). Kromě energetické restriktce a excesivního cvičení, které jsou charakteristické pro restriktivní typ AN, mohou být zapojeny i další mechanismy vedoucí ke snížení tělesné hmotnosti, jako je cíleně vyvolávané zvracení, zneužívání laxativ nebo diuretik (purgativní typ AN) (Winston, 2012). Prevalence AN v ekonomicky vyspělých zemích (USA, EU) se odhaduje na 0,2 - 0,8 % s poměrem žen k mužům 10:1 (Zipfel et al., 2015; Winston, 2012). Až u třetiny nemocných se vyvíjí terapeuticky rezistentní forma, která až v 15 - 20 % případů může vést k předčasnému úmrtí (Winston, 2012). Pacienti s mentální anorexií představují klinický model prostého hladovění s řadou endokrinních, metabolických, hematologických, muskuloskeletálních a nutričních abnormalit (Tajiri et al., 2006). Malnutrice u pacientů s AN se vyznačuje zmenšením tělesných zásob tukové tkáně, ale i kosterního svalstva, v kombinaci se zhoršenými biologickými funkcemi (svalová slabost, kognitivní deficit, porucha obranyschopnosti) bez přítomnosti systémového zánětu (Soeters et al., 2008). Dochází k poklesu bazálního energetického výdeje (American Psychiatric Association, 2013; Winston, 2012).

Mezi rizikové faktory AN patří úzkostné poruchy či obsedantní rysy v dětství, environmentální faktory (vliv historického a kulturního prostředí), stejně jako genetické a fyziologické faktory (zvýšené riziko bipolární afektivní poruchy a depresivních poruch v rodinách s AN, speciálně purgativního typu; zvýšený výskyt AN u monozygotních dvojčat ve srovnání s dizygotními dvojčaty). Častější je rozvoj AN u pacientů s diabetem 1. typu (Winston, 2012). Předpokládá se, že genetické faktory ovlivňují riziko vzniku AN, psychosociální a interpersonální činitele mohou spouštět manifestaci onemocnění, zatímco neurální síť stabilizuje chorobný stav (Zipfel et al., 2015).

Nemocní s AN vykazují během fáze hladovění hematologické abnormality (anémie, trombocytopenie, leukopenie s relativní lymfocytózou), metabolické poruchy (dyslipidémie s fenotypem HLP IIa, pokles koncentrace minerálních látek, vitamínů a stopových prvků – zejména K, Mg, P, ale i Ca, Zn, thiaminu, vit. A, B₂, B₆ a C), endokrinní abnormality (syndrom nízkého T₃I a tyroxinu, vzestup reverzního trijódtyroninu, hyperkortikalismus) a další abnormality (kardiomyopatie, arytmie, hypotermie, hypotenze, hepatopatie, útlum funkce kostní dřeně, osteopénie, primární či sekundární amenorrhea, neuropatie a další) (Winston, 2012; Tajiri, 2006). U 13 - 38 % pacientů s AN se rozvíjí osteoporóza (Winston, 2012). U pacientů, kteří si vyvolávají zvracení, se může rozvinout metabolická alkalóza a hypochloremie. Naopak u pacientů, zneužívajících laxativa, se může rozvinout hypokalemická a hypochloremická metabolická acidóza (Winston, 2012). Ve fázi nutriční podpory může docházet k rozvoji deficitu minerálních látek (zejména P, K, Mg, Ca), až k obrazu realimentačního syndromu.

Změny v metabolismu lipidů u pacientů s AN

Ve více než 50 % případů je přítomna hypercholesterolemie (zvýšená hladina celkového cholesterolu, triacylglycerolu a HDL-cholesterolu), která může být důsledkem zvýšené absorpce exogenního cholesterolu spolu se zpomaleným tranzitním časem střeva při nezměněné úrovni syntézy cholesterolu (Žák et al., 2005; Feillet et al., 2000). Publikována byla studie s negativní korelací mezi hladinou cholesterolu a hladinou T₃ a T₄ (Matzkin et al., 2007). Přestože přesná příčina hypercholesterolemie není dosud jasná, je hypercholesterolemie u pacientů s AN užitečným diagnostickým kritériem, které umožňuje

AN odlišit například od nespecifických střevních zánětů nebo malabsorpčních syndromů, u kterých je obvykle hladina cholesterolu při dolní hranici normy nebo snižená (Winston, 2012). Výjimečně se však i u pacientů s AN může vyskytovat hypocholesterolemie až abetalipoproteinémie (Takeshita et al., 2002).

Změny v profilech mastných kyselin u pacientů s mentální anorexií

U pacientů s AN byl prokázán deficit membránových vícenenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LC-PUFA, long-chain polyunsaturated fatty acids), zejména elongačních a desaturačních produktů n-6 a n-3 LC-PUFA, bez biochemických známek deficitu esenciálních mastných kyselin (EFA, essential fatty acids) (Žák et al., 2005; Caspar-Bauguil et al., 2012). Obsah LC-PUFA řady n-6 v tkáních pozitivně koreluje s hmotností tukové tkáně (čím méně tukové tkáně, tím nižší hladiny LC-PUFA n-6), pravděpodobně proto, že tuková tkáň obsahuje pouze minimální množství LC-PUFA n-6 a nedokáže při lipolýze vykompenzovat nedostatečný příjem kyseliny linolové v potravě (Caspar-Bauguil et al., 2012). V řadě n-3 LC-PUFA byla u kyseliny α -linolenové (ALA, α -linolenic acid, 18:3 n-3) nalezena naopak negativní korelace s množstvím tukové tkáně. Někteří autoři (Casper-Bauguil et al., 2012) předpokládají, že tuková tkáň může být při intenzivní lipolýze po určité době signifikantním zdrojem ALA, přičemž ALA se z tukové tkáně žen uvolňuje přednostně. V některých studiích však byl naopak zjištěn pokles hladin ALA (Holman et al., 1995; Langan a Farrell, 1985) a v naší studii nebyl prokázán významný rozdíl (Žák et al., 2005). Výraznější nedostatek bývá LC-PUFA řady n-3, kde byly zjištěny významně snížené hladiny jak kyseliny dokosahexaenové (DHA, docosahexaenoic acid, 22:6n-3), tak kyseliny eikosapentaenové (EPA, eicosapentaenoic acid, 20:5 n-3). V LC-PUFA řady n-6 byl nalezen u pacientů s AN významně snížený obsah kyseliny arachidonové (AA, arachidonic acid, 20:4 n-6), ale v hladinách kyseliny adrenové, Meadovy a dihomogamma-linolenové nebyly nalezeny významné rozdíly (Caspar-Bauguil et al., 2012). Naopak hladiny EFA nejsou u pacientů s AN snižené vzhledem k tomu, že lipolýza triglyceridů je dostatečným zdrojem EFA ke kompenzaci jejich sníženého příjmu (Caspar-Bauguil et al., 2012). Naopak zvýšené bývají u pacientů s AN hladiny nasycených mastných kyselin s krátkým řetězcem, mononenasycených mastných kyselin s krátkým řetězcem, větvených mastných kyselin, a mastných kyselin s lichým počtem uhlíků v plazmatickém fosfatidylcholinu. Tyto změny ukazují na zesílenou biosyntézu alternativních mastných kyselin (FA, fatty acids), které jsou pouze částečně schopny kompenzovat nedostatek LC-PUFA pro udržování fluidity membrán (Holman et al., 1995).

V našich předchozích studiích jsme prokázali specifické změny v koncentracích necholesterolových sterolů a spektra mastných kyselin. Osoby s AN měly zvýšené koncentrace fytoosterolů (kampesterol a β -sitosterol) (jakožto markerů vstřebávání exogenního cholesterolu) při nezměněných koncentracích latosterolu (jako markeru syntézy cholesterolu de novo) (tab. 1). Skutečnost, že nebyly zjištěny významné rozdíly v hladinách apo B (které odrážejí počet VLDL, IDL a LDL částic) podporuje předpoklad, že dyslipidémie u pacientů s AN je způsobena částečně zvýšeným vstřebáváním exogenního cholesterolu (Žák et al., 2005). Statisticky významně byla u pacientů s AN oproti kontrolní skupině zvýšena hladina celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu, triglyceridů, fosfolipidů a neesterifikovaných FA. Současně byl nalezen pokles koncentrace n-6 PUFA ve všech lipidových třídách, který byl kompenzován vzestupem koncentrace mononenasycených (MUFA) mastných kyselin v esterech cholesterolu, vzestupem hladin nasycených mastných kyselin (SFA) v triglyceridech a zvýšenou koncentrací MUFA a SFA ve fosfatidylcholinu.

Ve všech lipidových třídách byla zjištěna snížená koncentrace kyseliny linolové (LA, linoleic acid, 18:2n-6) a zvýšená koncentrace kyseliny palmitolejové (POA, palmitoleic acid, 16:1n-7) (Žák et al., 2005; Holman et al., 1995). POA je považována za surogátní marker lipogeneze.

Příčinou poklesu hladin LA u pacientů s AN může být zvýšená citlivost této kyseliny k lipoperoxidaci, která je u pacientů s AN díky snížené antioxidační kapacitě a snížené hladině estrogenů zvýšená (Sack et al., 1994). Statisticky významný rozdíl v profilech mastných kyselin mezi skupinou pacientů s AN a kontrolní skupinou byl zjištěn pouze ve fosfatidylcholinu a esterech cholesterolu (obojí na hladině významnosti $P < 0.05$). V triglyceridech nedosáhl rozdíl statistické významnosti. V esterech cholesterolu byly nalezeny zvýšené hladiny kyseliny olejové (OA, oleic acid, 18:1n-9) a vakcenové (VA, vaccenic acid, 18:1n-7) a snížená hladina DHA (Žák et al., 2005). V triglyceridech a fosfatidylcholinu byl zjištěn zvýšený obsah kyseliny palmitové (PA, palmitic acid, 16:0) a snížený obsah kyseliny cis-7 hexadecenové (cis-7 hexadecenoic acid, 16:1n-9). Snížený obsah kyseliny stearové (SA, stearic acid, 18:0) byl pozorován pouze ve fosfatidylcholinu. Pacienti s AN měli zvýšený obsah nasycených mastných kyselin ve fosfatidylcholinu a triglyceridech, zvýšený obsah MUFA v esterech cholesterolu a fosfatidylcholinu a snížený obsah n-6 PUFA ve všech lipidových třídách. U n-3 PUFA nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v hladinách (Žák et al., 2005). V esterech cholesterolu a fosfatidylcholinu byla u pacientů s AN zjištěna zvýšená aktivita $\Delta 9D$, v esterech cholesterolu byla nalezena snížená aktivita $\Delta 5D$ (Žák et al., 2005).

Změny v hladinách derivátů LC-PUFA a markery oxidačního stresu

Předpokládá se, že na rozvoji AN se mohou podílet mimo jiné i prozánětlivé cytokiny (Yehuda a Rabinowitz, 2016). Jejich schopnost indukovat AN závisí na jejich schopnosti překročit hematoencefalickou bariéru. Názory na význam chronického subklinického zánětu v patogenezi AN jsou však kontroverzní. Metaanalýza 22 studií prokázala, že pacienti s AN měli ve srovnání se zdravými kontrolami zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-6 a IL1- β) ve spojení se snížením koncentrace CRP a IL-6R, přičemž exprese receptorů pro TNF- α nebyla změněna. V dalších 11 studiích zabývajících se AN nebyly změny koncentrací prozánětlivých cytokinů pozorovány (Solmi et al., 2015). LC-PUFA řady n-3 snižují efekt prozánětlivých cytokinů a jejich suplementace by měla být zvážena jako součást terapie AN (Yehuda a Rabinowitz, 2016).

Někteří autoři míní, že jedním z genů, podílejících se na rozvoji AN, je epoxidová hydroláza 2 (*EPHX2*). Od ní odvozený enzym, rozpustná epoxidová hydroláza (sEH), konvertuje bioaktivní protizánětlivé epoxidy PUFA na příslušné prozánětlivé metabolity - eikosanoidy a oxylipiny (dokosanoidy). *EPHX2* ovlivňuje riziko AN pomocí in vivo interakce s LC-PUFA v potravě a zvýšená produkce prozánětlivých eikosanoidů má vliv mimo jiné na omezování tuku ve stravě pacientů s AN (Shih et al., 2017; Shih et al., 2016). Usuzuje se, že interakce PUFA (řady n-3 i n-6) s konverzí na PUFA s delším řetězcem a vyšším počtem dvojných vazeb (vlivem desaturáz a elongáz mastných kyselin) spolu s aktivitou *EPHX2* může přispívat k patogenezi a prognóze AN (Shih et al., 2016). U pacientů s AN byla oproti zdravým kontrolám popsána významně vyšší aktivita sEH, projevující se rozdílnými hladinami z LC-PUFA derivovaných oxylipinů. S AN jsou asociované především některé metabolity DHA (10.11.EpDPE a 13.14.EpDPE) a metabolit AA (9.10.EpOME) (Shih et al., 2016). Významně zvýšené byly u pacientů s AN oxylipiny odvozené od ALA, DHA, ARA a LA. Významný rozdíl v hladinách byl nalezen pouze u oxylipinů, produkovaných cestou cytochromu P450, nikoli však u oxylipinů, metabolizovaných cyklooxygenázou a lipoxygenázou (Shih et al., 2016). Podle novějších studií nemá správný poměr n-3 a n-6 LC-PUFA jednoznačný vliv na regulaci produkce pro- a protizánětlivých lipidových metabolitů, nutno je brát v úvahu také genový polymorfismus a jejich vzájemnou interakci (Shih et al., 2017). U AN byla popsána zvýšená úroveň oxidačního stresu také ve spojení s nálezem zvýšené lipoperoxidace (Tajiri et al., 2006) a snížení aktivitě NO syntézy. Zvýšená intenzita oxidačního stresu v játrech je spojena s tvorbou deposit železa a se sníženými

hladinami antioxidantů. Publikovány byly rovněž kontroverzní údaje týkající se aktivity superoxidismutasy a katalázy (Rodrigues et al., 2010; Moyano et al., 1999).

Aktuálním předmětem našeho výzkumu jsou hladiny žlučových kyselin u pacientů s AN. Nestel (1973) popisuje u pacientů s AN sníženou sekreci žlučových kyselin. Žlučové kyseliny (BA, bile acids) byly dříve pokládány pouze za sloučeniny významné pro digesti a absorpci tuku, dnes jsou pokládány za významné metabolické modulátory. Jedná se o versatilní signální molekuly s významnými endokrinními a metabolickými účinky. Tyto účinky jsou zprostředkovány interakcí s nukleárními a cytoplasmatickými receptory, především s farnesoidním X receptorem (FXR) a cytoplasmatickým receptorem spřaženým s G proteiny (TGR5). Aktivace FXR a TGR5 ovlivňuje energetický výdej a kontrolu hmotnosti, glukózový a lipidový metabolismus, modulaci zánětu, jaterní fibrogeny a karcinogenezi (deAguiar Vallim et al., 2013; Marin et al., 2015; Vítek a Haluzík, 2016).

Tabulka 1

	Kontrolní skupina	Mentální anorexie
Počet osob	25	16
Celkový cholesterol (mmol/l)	4.51 ± 0.11	5.52 ± 0.41 **
Triglyceridy (mmol/l)	0.85 ± 0.09	1.21 ± 0.08 ***
Fosfolipidy (mmol/l)	2.65 ± 0.07	3.15 ± 0.15 **
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.22 ± 0.05	1.58 ± 0.05 ***
NEFA (mmol/l)	0.44 ± 0.05	0.78 ± 0.09 ***
Campesterol (μmol/l)	14.50 ± 0.89	17.77 ± 2.69 *
β-sitosterol (μmol/l)	11.28 ± 0.46	17.46 ± 2.66 **
LDL-cholesterol (mmol/l)	2.91 ± 0.11	3.49 ± 0.50
Non-HDL-cholesterol (mmol/l)	3.30 ± 0.11	4.04 ± 0.49
Apolipoprotein B (g/l)	0.69 ± 0.04	0.76 ± 0.05
Apolipoprotein A-I (g/l)	1.58 ± 0.04	1.78 ± 0.05
Lipoprotein [a] (g/l)	0.16 ± 0.05	0.22 ± 0.08
Lathosterol (μmol/l)	4.84 ± 0.53	3.70 ± 0.69
Cholestanol (μmol/l)	7.00 ± 0.41	7.38 ± 0.57
Lathosterol/TC (poměr x 10 ³)	1.05 ± 0.09	0.81 ± 0.16
Campesterol/TC (poměr x 10 ³)	3.20 ± 0.21	4.35 ± 0.59
β-sitosterol/TC (poměr x 10 ³)	2.51 ± 0.14	3.14 ± 0.41

podle Žák et al. 2005

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM; statistická analýza: (Mann-Whitney U-test):

*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Závěr

Mentální anorexie je komplexní porucha s rozsáhlými změnami v lipidovém metabolismu, zahrnujícími mimo jiné dyslipidémii, změny v profilech mastných kyselin či změny v konverzi polynenasycených mastných kyselin na prozánětlivé a protizánětlivé metabolity. Role žlučových kyselin v metabolismu pacientů s mentální anorexií je předmětem našeho dalšího výzkumu.

Práce byla podpořena MZ ČR RVO VFN64165, PROGRES Q25/LF1/2 a MPO-FV10380

Literatura

Caspar-Bauguil S, Montastier E, Galinon F, et al. Anorexia nervosa patients display a deficit in membrane long-chain poly-unsaturated fatty acids. Clin Nutr 2012; 31: 386-390.

- de Aguiar Vallim TQ., Tarling EJ., Edwards PA.:** Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism* 2013; 17: 657-669.
- Feillet F, Feillet-Coudray C, Bard J, et al.:** Plasma cholesterol and endogenous cholesterol synthesis during refeeding in anorexia nervosa. *Clin Chim Acta* 2000; 294: 45-56.
- Ghanizadeh A.** Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edn. *Compr Psychiatry* 2013; 54: 7-10.
- Holman RT, Adams CE, Nelson RA, et al.** Patients with anorexia nervosa demonstrate deficiencies of selected essential fatty acids, compensatory changes in nonessential fatty acids and decreased fluidity of plasma lipids. *J Nutr* 1995; 125: 901-907.
- Langan SM, Farrell PM.** Vitamin E, vitamin A and essential fatty acid status of patients hospitalized for anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr* 1985; 41: 1054-1060.
- Marin JJ, Macias RI, Briz O, et al.** Bile acids in physiology, pathology and pharmacology. *Curr Drug Metab* 2015; 17: 4-29.
- Matzkin V, Slobodianik N, Pallaro A, et al.** Risk factors for cardiovascular disease in patients with anorexia nervosa. *Int J Psychiatr Nurs Res* 2007; 13: 1531-1545.
- Moyano D, Sierra C, Brandi N, et al.** Antioxidant status in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 1999; 25: 99-103.
- Nestel PJ.** Cholesterol Metabolism in Anorexia Nervosa and Hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38: 325-328.
- Rodrigues PN, Bandeira MM, Assumpcao CR, et al.** Oxidative stress, l-arginine-nitric oxide and arginase pathways in platelets from adolescents with anorexia nervosa. *Blood Cells Mol Dis* 2010; 44: 164-168.
- Sack MN, Rader DJ, Cannon RO 3rd.** Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 1994; 343: 269-270.
- Shih BP, Yang J, Morisseau C, et al.** Dysregulation of Soluble epoxide hydrolase and lipidomic profiles in anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 537-546.
- Shih BP, Morisseau C, Le T, et al.** Personalized polyunsaturated fatty acids as a potential adjunctive Treatment for anorexia nervosa. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2017; 133: 11-19.
- Soeters PB, Reijven PL, van Bokhorst-de van der Schueren MA, et al.** A rational approach to nutritional assessment. *Clin Nutr* 2008; 27: 706-716.
- Solmi M, Veronese N, Favaro A, et al.** Inflammatory cytokines and anorexia nervosa: A meta-analysis of cross-sectional and longitudinal studies. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 51: 237-252.
- Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, Sugiyama T.** A Case Report of Oxidative Stress in a Patient with Anorexia Nervosa. *Int J Eat Disord* 2006; 39: 616-618.
- Takeshita J, Yasumichi A, Nobuyoshi H, et al.** Abetalipoproteinemia-Like Lipid Profile and Acanthocytosis in a Young Woman with Anorexia Nervosa. *Am J Med Sci* 2002; 324: 281-284.
- Vítek L, Haluzík M.** The role of bile acids in the metabolic regulations. *J Endocrinol* 2016; 228: R85-R96.
- Winston AP.** The Clinical Biochemistry of anorexia nervosa. *Ann Clin Biochem* 2012; 49: 132-143.
- Yehuda S, Rabinowitz S.** The role of essential fatty acids in anorexia nervosa and obesity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56: 2021-2035.
- Zipfel S, Giel KE, Bulik CM, et al.** Anorexia nervosa: aetiology, assessment, and treatment. *Lancet Psychiatry* 2015; 12: 1099-1111.
- Žák A, Vecka M, Tvrzicka E, et al.** Composition of plasma fatty acids and non-cholesterol sterols in anorexia nervosa. *Physiol Res* 2005; 54: 443-451.

OXYSTEROLY A METABOLICKÝ SYNDROM**OXYSTEROLS AND METABOLIC SYNDROME****Š. Fojtíková, M. Zeman, J. Macásek, M. Vecka, B. Staňková, A. Žák***Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, IV. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze***Abstrakt**

Metabolický syndrom je dnes jedním z globálních zdravotních problémů; jeho význam spočívá zejména v několikanásobném zvýšení rizika výskytu kardiovaskulárních příhod a rozvoje diabetu mellitu 2. typu. V poslední době byla shromážděna řada údajů, které ukázaly, že sloučeniny, označované souhrnně jako oxysteroly, zřejmě mohou různým způsobem ovlivňovat některé patogenetické pochody metabolického syndromu (inzulínová rezistence, endoteliální dysfunkce a další). Oxysteroly jsou velmi různorodá skupina kyslíkových derivátů cholesterolu s širokými pleiotropními účinky. V článku je uveden mechanismus tvorby oxysterolů a rozebrány jejich pozitivní i negativní účinky ve vztahu k metabolickému syndromu.

Abstract

The metabolic syndrome is today one of the global health problems; its risk lies mainly in a multiple increase of cardiovascular diseases and the development of diabetes mellitus type 2. Recently, a large number of data have been collected that have shown that compounds, collectively known as oxysterols, are likely to affect some pathogenic pathways of the metabolic syndrome (insulin resistance, endothelial dysfunction and others) in a variety of ways. Oxysterols are a very heterogeneous group of oxygenated derivatives of cholesterol with wide pleiotropic effects. The article describes the mechanism of formation of oxysterols and their positive and negative effects relating to the metabolic syndrome.

Úvod

Metabolický syndrom je definován jako současný výskyt metabolických i hormonálních odchylek, které většinou představují rizikové faktory rozvoje aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění. Metabolický syndrom je dnes jedním z globálních zdravotních problémů; je odhadováno, že zhruba 20 - 25 % dospělé populace trpí metabolickým syndromem. Největší zastoupení je v populacích ve vývojově vyspělých státech, má dlouhodobě zvyšující se trend výskytu, což koresponduje s nárůstem obezity v průmyslově vyspělých státech.

Závažnost z toho vyplývající je zejména dvojnásobná až trojnásobně vyššího rizika úmrtí na srdečně cévní onemocnění než u osob bez metabolického syndromu. Dále je prokázáno zhruba pětinašobně vyšší riziko rozvoje diabetu mellitu 2. typu. Definice metabolického syndromu se v průběhu let vyvíjela a stále není jednotná. V současné době jsou nejvíce užívány IDF (International Diabetes Federation) a NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III). Kritéria pro diagnostiku metabolického syndromu jsou uvedena v tabulce (tabulka), nutné je splnění alespoň tří z uvedených kritérií.

Tabulka

Definice NCEP ATP III	Muži	Ženy
Obvod pasu	102 cm	88 cm
Hodnota HDL	< 1,00 mmol/l	< 1,30 mmol/l
Hodnota triglyceridů	> 1,7 mmol/l	
Arteriální hypertenze či již léčená hypertenze	130/85 mm Hg	
Porucha glykémie nalačno či již diagnostikovaný DM	> 5,6 mmol/l	

Vedle zvýšeného rizika rozvoje diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulárních komplikací je prokázán též zvýšený výskyt NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), určitých typů nádorových onemocnění a některých neuropsychiatrických onemocnění.

Důsledná komplexní léčba všech složek metabolického syndromu je významným úkolem v primární prevenci k zabránění vzniku diabetu mellitu či aterosklerózy (ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin, ischemické cévní mozkové příhody). Důsledná léčba má též svůj nesporný význam v prevenci sekundární, a zlepšuje tak prognózu nemocných. Proto by diagnostika a léčba jednotlivých komponent metabolického syndromu neměla být opomíjena a je snaha nalézt možné nové biomarkery k rozhodnutí o včasném nasazení vhodné léčby, a zlepšení prognózy pacientů.

V etiopatogenezi metabolického syndromu se uplatňuje celá řada faktorů, jako je stárnutí, obezita v důsledku zvýšeného energetického příjmu a fyzické inaktivity, kvalitativní složení tuků ve stravě, protrombotický stav, chronický subklinický zánět, oxidační stres a další. Pojmem oxidační stres je označován zvýšený poměr prooxidační k antioxidační aktivitě daný nadměrnou tvorbou a/nebo nedostatečným odstraňováním reaktivních kyslíkových a dusíkatých substancí (RONS). V poslední době byla shromážděna řada údajů, které ukázaly, že sloučeniny, označované souhrnně jako oxysteroly (oxidované deriváty cholesterolu), zřejmě mohou různým způsobem ovlivňovat některé patogenetické pochody metabolického syndromu (inzulínová rezistence, endoteliální dysfunkce a další).

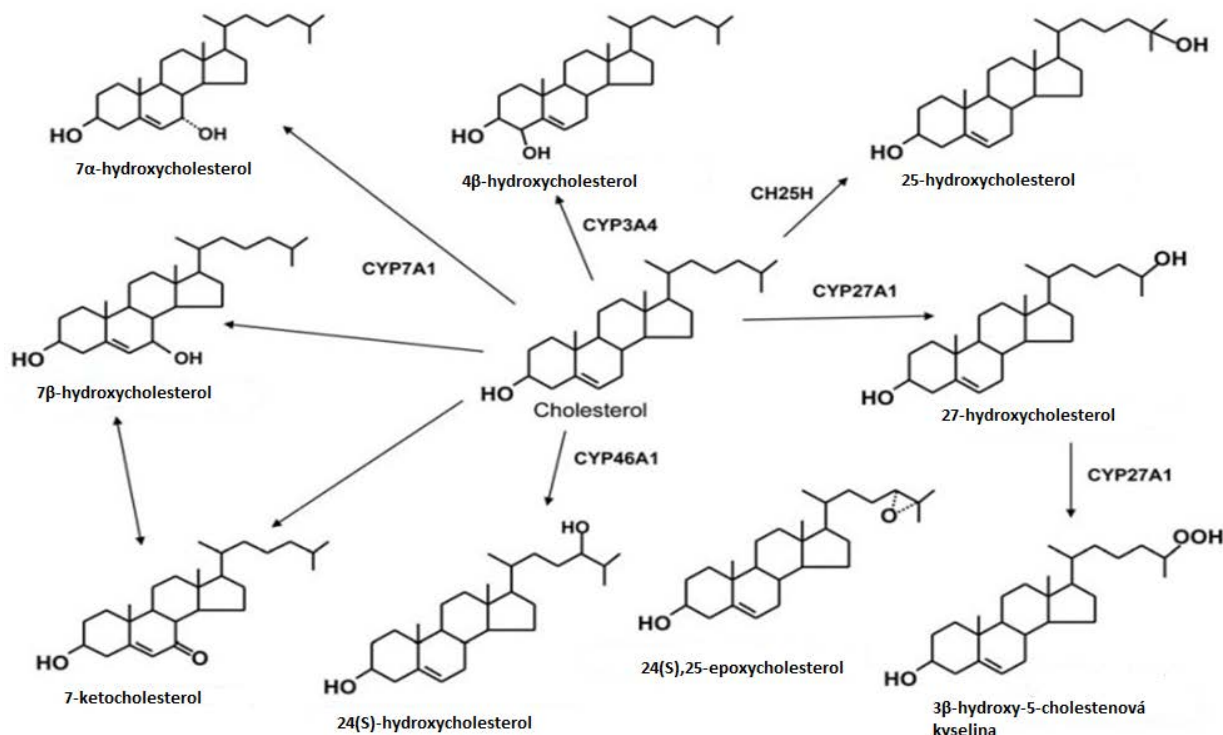
Oxysteroly

Oxysteroly jsou velmi různorodá skupina kyslíkových derivátů cholesterolu s širokými pleiotropními účinky. Jsou tvořeny přidáním hydroxy-, keto- či epoxidové skupiny k postrannímu řetězci či kruhu cholesterolu. Příklady jednotlivých oxysterolů a zapojených enzymů jsou uvedeny v obrázku 1. Jsou vysoce reaktivní a jejich biologický poločas je tak několikanásobně kratší než biologický poločas cholesterolu. Tvorba oxysterolů se odehrává především v játrech (fyziologicky při syntéze žlučových kyselin), ale produkce oxysterolů jsou schopny i další tkáně, např. tuková tkáň a hypothalamus. Část oxysterolů v organismu pochází z potravy.

Oxysteroly vznikají enzymatickou či neenzymatickou cestou. Enzymaticky vznikají za účasti hydroxyláz či dalších enzymů převážně z rodiny cytochromů P450 v rámci regulace homeostázy cholesterolu. Jejich tvorba se odehrává fyziologicky v iniciální fázi syntézy žlučových kyselin (enzymy CYP7A1, CYP27A1) či jako možnost eliminace cholesterolu ze specifických orgánů jako je např. mozek (enzym CYP24A1). Další možností vzniku je neenzymatická cesta (tzv. autooxidace) vlivem oxidačního stresu kyslíkovými radikály. Tímto způsobem vznikají oxysteroly, jejichž zvýšená hladina významně narušuje homeostázu metabolismu cholesterolu i glukózy, což vede k nastartování kaskády patologických dějů podílejících se na rozvoji aterosklerózy.

Cholesterol je náchylný k modifikaci peroxylovými radikály zejména na pozici C4 nebo C7 za vzniku 4- či 7-hydroperoxycholesterolu v α či β konfiguraci. Hydroperoxydoly dále interagují za vzniku hydroxycholesterolů a ketocholesterolů. Mnoho těchto reakcí je katalyzováno enzymy z rodiny CYP450.

Obrázek 1 Příklady oxysterolů



https://www.researchgate.net/Structure-and-origin-of-selected-common-oxysterols-Most-of-the-oxysterol-species_fig1_228437122 [accessed 23 Aug, 2018]

Účinky oxysterolů v organismu

Oxysteroly jsou vysoce senzitivními biomarkery oxidačního stresu. Hladina oxysterolů v organismu koreluje s počtem přítomných kardiovaskulárních rizikových faktorů, jako je diabetes mellitus, dyslipidémie, obezita či kouření. Tento vztah souvisí s úrovní oxidačního stresu. Neenzymatickou cestou, autooxidací, vznikají různé kyslíkové deriváty cholesterolu, např. 7-ketocholesterol, 7 β -hydroxycholesterol a cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol. Měřeními bylo zjištěno, že hladina těchto oxysterolů i poměr jejich hladiny k cholesterolu je signifikantně zvýšen v aterosklerotických placích cév ve srovnání se zdravými cévami. Oxysteroly působí cytotoxicky na buňky hladkého svalstva, fibroblasty a buňky cévního endotelu, nejpotentnější je v tomto smyslu 7-ketocholesterol. Kromě účinků cytotoxických mají i účinky proinflatorní, a nepřímo se tak podílí na udržování chronického zánětu, který se účastní v patogenezi aterosklerózy.

Klinické studie prokázaly, že hladiny měřených oxysterolů (7-ketocholesterol, 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol a cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol) pozitivně koreluje s markery metabolického syndromu, jako je obezita (obvod pasu, BMI), hladina celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a apo-B.

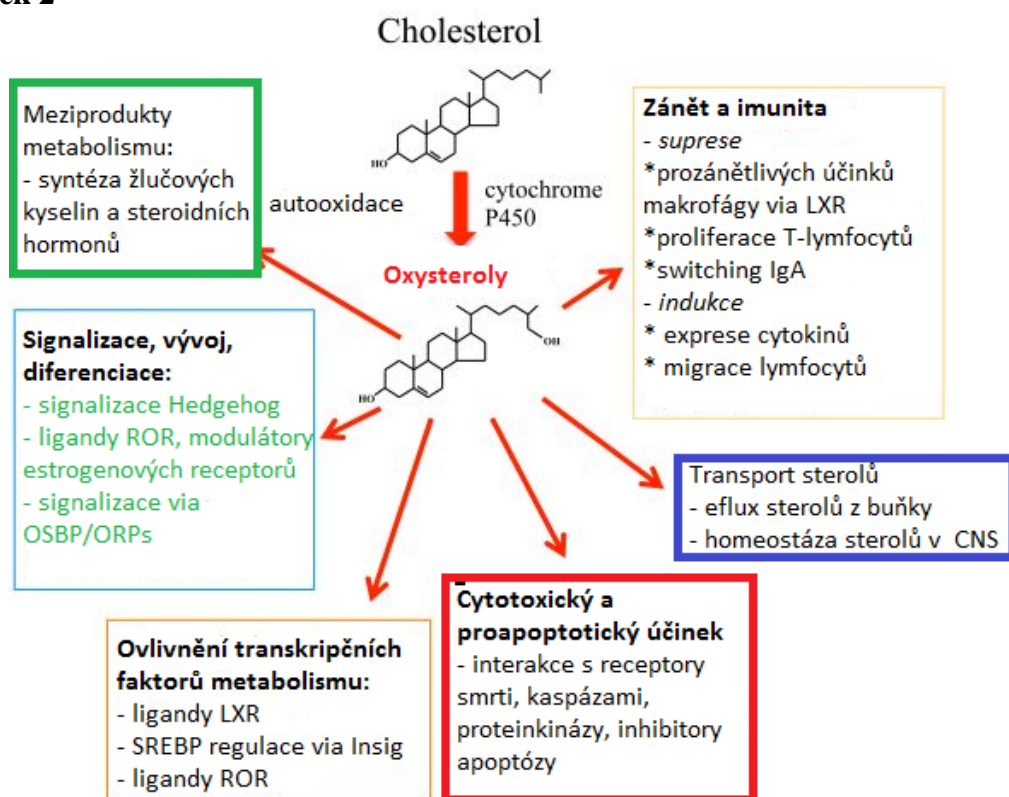
U diabetiků – jak DM 2. typu, tak u DM1. typu – jsou pozitivní korelace hladin výše uvedených oxysterolů s glykovaným hemoglobinem, LDL, VLDL a TAG. U kouření byla též pozorována zvýšená hladina výše uvedených oxysterolů ve srovnání s nekuřáky. Nabízí se tak, že hladina těchto oxysterolů by mohla být u pacientů s diabetem mellitem monitorována jako biomarker oxidačního stresu.

Medikamentózní léčba jednotlivých složek metabolického syndromu vede k významnému snížení hladiny oxysterolů (měřeny 7-ketocholesterol, 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol a cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol). Snížení glykemií u diabetiků z dlouhodobého hlediska za pomoci perorálních antidiabetik vede ke snížení tvorby AGEs, nižší tvorbě kyslíkových radikálů, a tím ke snížení lipidové peroxidace, snížení produkce superoxidového aniontu, zvýšení hladiny glutathionu a aktivity dalších anti-oxidačních enzymů. Hladiny měřených oxysterolů se snížily, avšak samotné podávání inzulínu nevedlo ke snížené hladině těchto oxysterolů v plazmě.

Významnou pozitivní roli hrají v léčbě metabolického syndromu i statiny (vysoce potentní skupina hypolipidemik), které fungují na principu inhibice HMGCoA-reduktázy. Statiny kromě svých hypolipidemických vlastností mají však i další intrinsické účinky, mimo jiné antioxidační aktivitu: inhibují vznik superoxidového aniontu, zvyšují aktivitu ostatních antioxidačních enzymů a zvyšují genovou expresi endotelové NOS.

Jak již bylo zmíněno výše, účinky oxysterolů jsou pleiotropní, což souvisí se širokou škálou receptorů, jejichž jsou oxysteroly ligandy. Účinky oxysterolů v metabolismu či transportu sterolů, při ovlivnění transkripčních faktorů regulujících metabolismus lipidů, role v procesu zánětu, podíl na buněčné signalizaci a buněčném vývoji a diferenciaci či jejich cytotoxické účinky jsou shrnuty v obrázku 2.

Obrázek 2



Převzato z Olkkonen, V.M.; Béaslas, O.; Nissilä, E. Oxysterols and Their Cellular Effectors. *Biomolecules* 2012; 2: 76-103.

Oxysteroly jako významné ligandy jaderných receptorů LXR (liver X receptors) mají i řadu významných pozitivních účinků na metabolismus lipidů a glukózy. Hlavními ligandy LXR jsou 22(R)-hydroxycholesterol, 24(S)-hydroxycholesterol a 27-hydroxycholesterol. Aktivace LXR receptorů těmito oxysteroly vede k expresi genů, podílejících se na regulaci homeostázy lipidů i glukózy. Ovlivňují vstřebávání cholesterolu ve střevě, reverzní transport cholesterolu, syntézu žlučových kyselin, lipogenezi v játrech či tvorbu nascentních HDL částic.

V játrech aktivací LXR dochází ke zvýšení exprese cholesterolových transportérů (ABCA1, ABCG5 a ABCG8) a CYP7A1 (enzymu zprostředkovávající tvorbu žlučových kyselin z cholesterolu). Zvyšuje se také exprese FAS (syntáza mastných kyselin), ACC (acetyl-CoA karboxyláza) a SCD-1 (steateryl-CoA desaturáza1) podílejících se na lipogenezi *de novo*. Neméně významnou roli má aktivace LXR oxysteroly v procesu glukoneogeneze, kde se podílí na zvýšené expresi těchto enzymů: PGC-1, PEPCK a G6Páza; dále působí na GLUT-4 transportéry v tukové tkáni a svalch.

Aktivace LXR má i protizánětlivé účinky – dochází ke snížení exprese IL-6, iNOS (inducibilní) a COX-2. Klesá i exprese MMP-9 (matrix metalloproteinázy 9), která má zásadní úlohu v degradaci extracelulární matrix a destabilizaci aterosklerotického plátu.

Oxysteroly jsou také ligandy SREBPs (sterol regulatory element binding proteins), což jsou transkripční faktory podílející se na regulaci syntézy a degradace cholesterolu, které spolu s SCAP (SREBP cleavage activation protein) monitorují hladinu cholesterolu v buňce. Interagují tak s Insig, tak, že v případě nízké hladiny cholesterolu zapůsobí jako transkripční faktor vazbou na SRE (sterol regulatory element) působící jako promotér cílového genu. 25-OHC se váže na Insig přímo, a může tak spustit celou kaskádu SREBP přímo i bez vazby cholesterolu na SCAP. 24(S), 25-epoxycholesterol suprimuje aktivitu SREBP a reguluje tak zpětnovazebně syntézu cholesterolu. Je však také významným ligandem LXR. S Insig reaguje i 27-OHC, přičemž při vysoké hladině cholesterolu dochází k degradaci HMGCoAR a k zástavě syntézy cholesterolu *de novo*.

Kromě kyslíkových derivátů na pozici C7 jsou u metabolického syndromu zajímavé i účinky 27-hydroxycholesterolu (dále 27-OHC). Tento oxysterol vzniká hydroxylací cholesterolu pomocí CYP27A1 a je to jeden z nejvíce abundantních oxysterolů. Je tvořen v hepatocytech, ale i v ostatních tkáních – adipocytech, buňkách kosterní svaloviny či v kůži. Z experimentů se značenými izotopy se usuzuje, že až 80 % cirkulujícího 27-OHC je tvořeno právě v extrahepatálních tkáních. Je dále známo, že adipocyty ve viscerální tukové tkáni jsou mnohem více metabolicky aktivní než adipocyty v podkoží, což platí i pro produkci 27-OHC. Tvorba 27-OHC v adipocytech je považována za jeden z významných lokálních regulátorů ve vývoji adipocytů *de novo*. Ukazuje se, že enzym CYP27A1 působí jako negativní regulátor v procesu adipogeneze a syntéza 27-OHC představuje jednu z možností odstranění přebytečného cholesterolu v adipocytech. Je to významný ligand LXR s účinky uvedenými výše.

Zvýšená hladina 27-OHC spolu s 4β-OHC a 25-OHC byla pozorována u pacientů s NAFLD ve srovnání se zdravými kontrolami. Vysvětlením může být to, že 27-hydroxycholesterol je považován jako významný lokální regulátor za účelem udržování homeostázy v jaterní tkáni. 27-OHC působí nepříznivě na buňky imunitního systému svým proinflatorním účinkem na makrofágy (s tendencí k přeměně v pěnové buňky) i zvýšenou adhezivitou leukocytů k cévní stěně. Spolu s dalšími oxysteroly (např. 7 α-OHC a 7-KC) působí snížení poddajnosti cév a jejich zvýšenou tuhost. Zvýšená hladina 27-OHC je pozorována u pacientů s aterosklerotickými pláty, zejména v již pokročilých plátech v aortě; v pěnových buňkách je jedním z nejvíce zastoupených oxysterolů.

27-OHC je také vysoce potentní ligand na ER (estrogenových receptorů) a působí jako SERM (selective estrogen receptor modulator), jeho úloha u karcinomu prsu je nyní v popředí zájmu. Ve vysokých hladinách může antagonizovat pozitivní účinky estrogenů na cévní stěnu u pre-

menopauzálních žen snížením produkce NO a přirozené obnovy endotelu (reendotelizace) karotid.

Závěr

Závěrem lze říci, že účinky oxysterolů u metabolického syndromu jsou velmi rozmanité. Negativně působí především oxysteroly vznikající neenzymatickou cestou (autooxidací), zejména 7-ketocholesterol, 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol a cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol. U těchto oxysterolů je dokumentován jejich cytotoxický, proapoptotický a prozánětlivý efekt s významnou rolí v progresi aterosklerózy.

Naopak oxysteroly vznikající enzymaticky působením hydroxyláz mají velmi široké spektrum účinků jak pozitivních, tak negativních. Vazbou na LXR či SREBP ovlivňují celou řadu regulačních dějů v metabolismu lipidů i glukózy. Podílí se také na buněčné signalizaci a buněčném vývoji a diferenciaci.

V současné době jsou objevovány další receptory, jejichž jsou oxysteroly ligandy. Přesné účinky aktivace těchto receptorů nejsou dosud známy, a proto jsou předmětem intenzivního výzkumu.

Studie byla podpořena projekty RVO-VFN64165/2012, MPO-FV10380 a PROGRES Q25/LF1/2

Literatura

Alkazemi D, Egeland G, Vaya J, et al. Oxysterol as a marker of atherogenic dyslipidemia in adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(11): 4282-4289.

Brzeska M, Szmyczyk K, Szterk A. Current Knowledge about Oxysterols: A Review. *J Food Sci* 2016; 81(10): R2299-R2308.

Guillemot-Legris O, Mutemberezi V, Muccioli GG. Oxysterols in Metabolic Syndrome: From Bystander Molecules to Bioactive Lipids. *Trends Mol Med* 2016; 22(7): 594-614.

Li J, Daly E, Campioli E, et al. De novo synthesis of steroids and oxysterols in adipocytes. *J Biol Chem* 2014; 289(2): 747-764.

Niki E. Oxidant-specific biomarkers of oxidative stress. Association with atherosclerosis and implication for antioxidant effects. *Free Radic Biol Med* 2018; 120: 425-440.

Olkkonen VM, Béaslas O, Nissilä E. Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules* 2012; 2(1): 76-103.

Samadi A, Gurlek A, Sendur SN, et al. Oxysterol species: reliable markers of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 2018 Mar 21. [Epub ahead of print]

LIPIDOVÝ METABOLIZMUS A ZASTÚPENIE MASTNÝCH KYSELÍN V ANIMÁLNO MODELI ATEROSKLERÓZY A KOLOREKTÁLNEHO KARCINÓMU

LIPID METABOLISM AND PRESENCE OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN THE ANIMAL MODEL OF ATHEROSCLEROSIS AND COLORECTAL CARCINOMA

Z. Hertelyová¹, M. Široká², R. Salaj³, E. Tvrzická⁴, B. Staňková⁴, A. Bomba¹

¹ Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta

² Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Ústav lekárskej chémie a biochémie, Lekárska fakulta

³ Medirex a.s., Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice

⁴ Univerzita Karlova v Praze, 1. lekárska fakulta a Všeobecná fakultní nemocnice, IV. Interní klinika

Abstrakt

Cardiovascular disease (CVD) and cancer are the 2 leading causes of death worldwide. Although commonly thought of as 2 separate disease entities, CVD and cancer possess various similarities and possible interactions, including a number of similar risk factors (eg, obesity, diabetes mellitus), suggesting a shared biology for which there is emerging evidence. Although chronic inflammation is an indispensable feature of the pathogenesis and progression of both CVD and cancer, additional mechanisms can be found at their intersection. Therapeutic advances, despite improving longevity, have increased the overlap between these diseases, with millions of cancer survivors now at risk of developing CVD. Cardiac risk factors have a major impact on subsequent treatment-related cardiotoxicity. In our experiment, we explored the lipid parameters and the presence of polyunsaturated fatty acids, mainly omega-6 and omega-3, in the animal model of atherosclerosis and colorectal carcinoma. Pathogenesis of lipid parameters were significantly higher in the model of atherosclerosis. Ratio of omega-6 and omega-3 significantly increased in the model of atherosclerosis and colorectal carcinoma in the comparison to control group ($P < 0.001$). Total amount of omega-3 was significantly higher in the control group ($P < 0.01$).

Úvod

Nádorové a srdcovo-cievne choroby sú najzávažnejšími chorobami, ktoré spôsobujú alarmujúcu mortalitu a morbiditu ľudí (Zhang et al., 2014). Ateroskleróza a rakovina boli mnoho rokov považované za choroby, ktoré majú navzájom úplne nesúvisiace mechanizmy v patogenéze a progresii ochorenia a úplne odlišné terapeutické stratégie. Rôzne predispozičné a etiologické faktory, biomarkery a molekulárne mechanizmy v patogenéze a progresii ochorenia, ktoré sú spoločné pre aterosklerózu a rakovinu naznačujú, že uvedené dve najbežnejšie choroby v celosvetovom meradle sú navzájom prepojené oveľa viac ako sa doposiaľ predpokladalo (Koenne et al., 2016). Usudzuje sa, že ateroskleróza a rakovina predstavujú varianty podobného chorobného procesu. Obe choroby zdieľajú spoločné etiologické faktory: genetickú predispozíciu, vek, pohlavné hormóny, fajčenie, vysoký príjem tukov, toxíny a mutagény. Následkami pôsobenia uvedených etiologických faktorov sú deregulácia bunkového cyklu, oxidačný stres, chronický zápal, endoteliálna dysfunkcia, deregulácia apoptózy a angiogenézy, DNA nestabilita a narušená oprava DNA. Okrem uvedených biomarkerov a patogénnych faktorov spoločných pre patogenézu aterosklerózy a

nádorových chorôb sa v progresii oboch chorôb uplatňuje niekoľko ďalších molekulových mechanizmov, ktoré sú spoločné obom chorobám ako sú: TGF- β signálna cesta, rastové faktory, bunkové adhezívne molekuly, Wnt- β -kateninová signálna cesta, zvýšená digestia matrix s matrix metaloproteázami a NF-kappaB signálna cesta. Spoločná progresia choroby pri ateroskleróze a rakovine je východiskom pre uplatnenie nových terapeutických prístupov (Giufang et al., 2016; Kwan et al., 2012).

Cieľom štúdie je porovnať lipidové parametre a zastúpenie mastných kyselín v patogenéze aterosklerózy a kolorektálneho karcinómu využitím animálnych experimentálnych modelov.

Metodika práce

Do experimentu boli zaradené potkany, samce kmeňa Sprague Dawley 10 kusov v skupine vo veku 6 týždňov. Zvieratá boli rozdelené do skupín: kontrolná skupina (KS), kontrolná skupina s vysokotukovou diétou (AT), kontrolná skupina s kolorektálnym karcinómom (KK).

Ateroskleróza bola indukovaná dieteticky pomocou diéty s vysokým obsahom cholesterolu (10%) a omega-6 MK (Miško, Snina, Slovenská republika). Kolorektálny karcinóm bol indukovaný aplikáciou azoxymetánu (AOM) (Sigma - Aldrich, Missouri, USA) intraperitoneálne v dávke 15 mg/kg v dvoch dávkach počas dvoch týždňov. Na konci experimentu, po 6 mesiacoch (25 týždňov), boli zvieratá uvedené do celkovej anestézy použitím Zoletil 50 (Virbac, Carros, Francúzsko) v dávke 50 mg/kg a Xylazín (Riemser, Greifswald, Nemecko) v dávke 15 mg/kg. Zvieratám v celkovej anestéze bola odobratá krv punkciou srdca a črevný obsah na potrebné mikrobiologické a biochemické analýzy.

Celkový cholesterol (TC), HDL, LDL, triacylglycerol (TAG) sme stanovili pomocou biochemického analyzátoru RX Daytona 3901 (Írsko). Parametre ako *non* HDL a aterogénne indexy (HDL/LDL, TC/HDL, TAG/HDL) boli vypočítané. Mastné kyseliny (MK) sme analyzovali metódou plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom.

Hodnoty v grafoch sú vyjadrené ako aritmetický priemer a smerodajná odchýlka ($x \pm SD$). Výsledky boli vyhodnotené použitím štatistického testu Tukey test (MINITAB for Windows 11, 21)

Výsledky

Celkový cholesterol, LDL, *non* HDL, TAG v AT skupine boli signifikantne vyššie ako v skupinách KS a KK. Hodnoty HDL boli najvyššie v KK skupine a najnižšie v AT skupine, pričom tieto zmeny neboli signifikantné. Aterogénne indexy (CH/HDL, TAG/HDL) boli signifikantne vyššie v skupine, ktorým bol podávaný cholesterol a zároveň v tejto AT skupine boli signifikantne najnižší pomer HDL/LDL.

Sledovaním zmien MK sme zistili, že v kontrolnej skupine v porovnaní so skupinami AT a KK sme dosiahli najvyššie hodnoty kyseliny laurovej (LA), myristovej (MA), stearovej (SA), alfa-linolénovej (ALA), arachidónovej (AA) a dokozahexaénovej (DHA). Signifikantné rozdiely boli zaznamenané pri ALA a DHA. Na druhej strane najnižšie hodnoty boli zistené pri kyseline linolovej (LA). V skupine s indukovaným kolorektálnym karcinómom sme zaznamenali najvyššie zastúpenie kyseliny palmitovej, linolovej a najnižšie hodnoty pri LA, MA, ALA a kyseline eikozapentaénovej (EPA). V skupine, kde bolo krmivo obohatené o cholesterol (10 %) sme zaznamenali najvyššie zastúpenie kyseliny gama-linolénovej (GLA) a EPA, najnižší obsah bol zaznamenaný pri PA, SA, AA a DHA.

Okrem zastúpenia mastných kyselín sme vypočítali vzorcami aj desaturačné enzýmy, vďaka ktorým, hoci v obmedzenej miere, dochádza vzniku ďalších metabolitov MK s vyšším reťazcom a taktiež k tvorbe eikozanoidov. Najvyššiu aktivitu delta-6-desaturázy (pomer GLA/LA, omega-6 PNMK), delta-5-desaturázy (pomer AA/DGLA), delta-4-desaturázy (pomer DPA/AA) sme pozorovali v skupine AT, avšak rozdiely medzi skupinami neboli signifikantné.

Suma omega-3 PNMK boli najvyššia v skupine KS a najnižšia v skupine AT. Medzi skupinami sme zaznamenali štatisticky významné rozdiely. Suma omega-6 PNMK odrážala výsledky omega-3 MK, teda najvyššia bola v skupine AT, najnižšia v skupine KS, pričom rozdiely medzi skupinami neboli signifikantné. Nakoniec sme sledovali pomer omega-6/omega-3 MK. V skupina KS mala pomer 10,3:1, KK 12,7:1 a AT 17:1. Rozdiely medzi sledovanými skupinami boli štatisticky významné.

Diskusia

Príjem potravy s vysokým obsahom lipidov, najmä so zvýšeným obsahom cholesterolu a nasýtených mastných kyselín, je dôležitým rizikovým faktorom v etiológii kardiovaskulárnych ochorení (Matáková, 2016). Vysoká koncentrácia cholesterolu, a to najmä LDL cholesterolu, asocuje s rozvojom kardiovaskulárnych ochorení (Žák et al., 2011; Chiang et al., 2001). Dôležitý faktor vyjadrujúci množstvo aterogénnych častíc v plazme (VLDL+IDL+LDL) je non HDL cholesterol. Porovnaním s LDL cholesterolom je to vhodnejší parameter pri hodnotení kardiovaskulárneho rizika, a to najmä u chorobných stavov spojených s hypertriglyceridémiou v kombinácii s *diabetes mellitus*, metabolickým syndrómom a ochorením obličiek (Reiner et al., 2011). U potkanov kŕmených krmivom so zvýšeným obsahom tukov sme dosiahli štatisticky významné zvýšenie non HDL cholesterolu. Zloženie potravou prijímaných mastných kyselín sa podieľa ako na zdraví prospešných účinkoch pre organizmus, tak aj na rozvoji obezity a s ňou spojených chorobných stavov. Simopolous (2008), Vrablík, (2007) opisujú, ako zvýšený príjem polynenasýtených mastných kyselín, konkrétne kyseliny linolovej, prispieva k zvýšeniu oxidačného stresu u ľudí. Oxidačný stres je jeden z prvých faktorov, ktorý sa uplatňuje v rozvoji aterosklerózy. Vo svojej humánnej štúdií zistil štatisticky významne zvýšenú exkréciu 8-iso-PGF_{2α} a signifikantný pokles exkrécie metabolitov NO porovnaním s kontrolnou skupinou. Produkcia F₂ isoprostanov sa výrazne zvyšuje pri stavoch spojených so zvýšeným oxidačným stresom (Montuschi et al., 2004).

Zvýšený príjem tukov je taktiež rizikovým faktorom onkologických ochorení, hlavne u kolorektálneho karcinómu, karcinómu prsníka alebo prostaty. Kyselina linolová (LA, 18:2, ω-6) a od nej odvodená kyselina arachidonová (AA, 20:4, ω-6) je dôležitým zdrojom biologicky aktívnych mediátorov – eikozanoidov (prostaglandíny, leukotriény) a v experimentálnych systémoch je často dokazovaný podporný účinok pre vznik a rozvoj nádorov. Naopak u kyseliny alfa-linolovej (ALA, 18:3, ω-3) a od nej odvodených ekozapentaénovej (EPA, 20:5, ω-3) a dokozahexaénovej (DHA, 22:6, ω-3) kyseliny boli preukázané v experimentálnych systémoch inhibičné protinádorové účinky. Epidemiologické, klinické a laboratórne štúdie poukazujú na dôležitosť množstva a druhov konzumovaných tukov v etiológii a prežívaní niektorých typov nádorov (hlavne prsníka a kolorektálneho karcinómu). Kým nasýtené mastné kyseliny môžu stimulovať iniciáciu karcinogenézy, nenasýtené mastné kyseliny môžu pôsobiť v promočnej a progresívnej fáze v dávkovej závislosti. Epidemiologické štúdie predpokladajú, že nízkotuková diéta v kombinácii s nenasýtenými MK, kde je vyvážený pomer ω-6:ω-3 na úrovni 10-4:1 súvisí s nižšou mortalitou u nádorov prsníka a kolorektálneho karcinómu. Úloha PNMK je sledovaná rovnako u ďalších typov nádorov gastrointestinálneho traktu (napr. pankreasu) aj u nádorov prostaty. Niektoré tuky, hlavne s obsahom mononenasýtených alebo ω-3 PNMK nemajú promočné účinky, i keď ich obsah v potrave je vysoký (Matáková, 2016; Reiner et al., 2011; Simopolous, 2008).

Presné mechanizmy účinku rôznych lipidov a PNMK nie sú však stále objasnené. Uvažuje sa o nasledovných mechanizmoch pôsobenia PNMK v procese karcinogenézy:

□ štrukturálne a funkčné zmeny membrán, ktorých neoddeliteľnou súčasťou sú PNMK. Ovplyvnenie biofyzikálnych a biochemických vlastností membrán má dopad hlavne na funkciu proteínov viazaných na membránu, prenášačov a receptorov;

□ produkcia špecifických metabolitov ovplyvňujúcich bunkovú signalizáciu a génovú expresiu, napr. eikozanoidy, ceramid, DAG atď. a imunitný systém uplatňujúcich sa v zápale;
□ produkcia množstva ROS, NOS a lipidových peroxidov vznikajúcich v metabolizme VNMK a ovplyvňujúcich celý rad dejov v bunkách a tkanivách. VNMK ovplyvňujú aj antioxidantné systémy a dochádza ku zmenám redoxnej rovnováhy;

□ priame pôsobenie na vnútrobunkové signálne zložky ako špecifické signálne molekuly (kinázy, fosfatázy) a transkripčné faktory. V dôsledku toho dochádza potom ku zmenám prenosu signálov a expresii génov s dopadom na chovanie buniek (Matáková, 2016).

Účinky tukov môžu byť priame (zahŕňajú zmeny v štruktúre a funkcii bunkových membrán) alebo nepriame (zahŕňajú zmeny v endokrinnom systéme a metabolizme PNMK, tj. syntéza eikozanoidov - prostaglandínov a leukotriénov a ďalej supresia imunitnej odpovede). Niektoré PNMK môžu účinne a priamo riadiť transkripciu špecifických génov (napr. gény kódujúce lipogénne proteíny, delta desaturázy) (Sopková et al., 2016).

Nádorové podporné pôsobenie niektorých tukov môže tiež súvisieť s ich schopnosťou znižovať alebo inhibovať medzibunkovú komunikáciu a blokovať tak metabolickú kooperáciu. Strata spätiväzobnej kontroly následne prispieva k nádorovému bujneniu. V našom experimente sme nepozorovali signifikantné zvýšenie lipidových parametrov vzhľadom k tomu, že nedošlo takému rozvoju karcinogenézy, ktorý sme na začiatku experimentu predpokladali. Ale čo sa týka zastúpenia MK, bol pozorovaný signifikantný pokles omega-3 PNMK, nárast omega-6 MK a pomeru omega-6/omega-3 oproti kontrole.

Záver

Naše zistenia poukazujú, že prídavok cholesterolu a kyseliny linolovej zvýšil lipidové parametre v skupine AT v porovnaní so skupinami KS a KK. V skupine AT sme sledovali taktiež nárast omega-6 MK, aj pomeru omega-6/omega-3. V kontrolnej skupine sme sledovali pokles omega-6/omega-3 a výrazný vyšší podiel omega-3 PNMK, najviac ALA a DHA. Potvrdilo sa, že MK korelujú s rozvojom aterosklerózy. Pri kolorektálnom karcinóme sme zaznamenali vyšší pomer omega-6/omega-3 oproti KS. Nízky obsah omega-3 PNMK a nižší pomer n-6/n-3 v skupine KK oproti kontrole naznačuje vzájomný vzťahy MK vs. kolorektálny karcinóm, ale nenaznačuje vzájomný vzťah lipidové parametre vs. kolorektálny karcinóm.

Táto štúdia bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVa Š SR: VEGA 1/0584/16

Literatúra

Koenne RJ, Koene RJ, Prizment AE, et al. Circulation 2016; 133(11): 1104-1114.

Kwan YCH. Microb Ecol Health Dis 2012; 23: 55.

Matáková T. Vybrané kapitoly z patobiochémie a klinickej biochémie v onkológii. Martin: Jesseniova lekárska fakulta 2016.

Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. FASEB J 2004; 18(15): 1791-1800.

Reiner Ž, et al. Eur Heart J 2011; 32(14): 1769-1818.

Simopoulos AP. Exp Biol Med 2008; 233(6): 674-688.

Sopková D, Hertelyová Z, Andrejčaková Z, et al. J Appl Animal Res 2016; 44(1): 1-6.

Vrablík M. Interní Med 2007; 9(6): 262-264.

Zhang X, Zhao XW, Liu DB, et al. World J Gastroenterol 2014; 20(26): 8646-8652.

Yan G, Li L, Zhu B, Li Y. Oncotarget 2016; 7(22): 33429-33439.

Žák A, a kol. Ateroskleróza nové pohľady. Praha: Grada publ. 2011.

STŘEVNÍ MIKROBIOM A KARDIOMETABOLICKÁ ONEMOCNĚNÍ**GUT MICROBIOME AND CARDIOMETABOLIC SYNDROME****P. Hrabák, T. Krechler, A. Žák***IV. interní klinika Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy***Abstrakt**

Shrnuty poznatky o vztazích mezi střevním mikrobiomem a lidským organismem. Střevní mikrobiom, převyšující nás počtem buněk i velikostí genetické informace, je důležitým zdrojem esenciálních látek i aktivních metabolitů. V posledních letech se mnozí autoři soustředili na zkoumání vlivu mikrobiomu na rozvoj kardiometabolických onemocnění. Výsledky těchto prací ukazují, že další výzkum zaměřený na mechanismy, kterými mikrobiom ovlivňuje etiopatogenezi kardiometabolického syndromu má potenciál odhalit potenciální terapeutické možnosti, které budou k léčbě této enormní socioekonomické zátěže klinicky využitelné.

Abstract

In this article we briefly reviewed recent advance in research of relationship between gut microbiome and host metabolism. Gut microbiome, vastly outnumbering our organism with number of cells and genetic information, is important source of active metabolites and essential substrates. In recent years many studies focused on influence of gut microbiome on etiopathogenesis of cardiovascular syndrome were published. Their results are promising, and further research focused on mechanisms which uses microbiome to influence our organism and how it participates in etiopathogenesis of metabolic syndrome could discover possible advantages in treatment of this enormous socioeconomical burden.

Metabolický, resp. kardiometabolický syndrom (KMS) je soubor rizikových faktorů pro kardiovaskulární onemocnění na podkladě aterosklerózy a pro diabetes mellitus 2. typu. Kardiovaskulární onemocnění jsou jednou z nejvýznamnějších příčin úmrtí na světě. Roční náklady na péči o pacienty s kardiovaskulárními chorobami jsou v celém světě odhadovány na 108 miliard dolarů (Cook et al., 2014). Většina kardiovaskulárních onemocnění je zapříčiněna tvorbou aterosklerotických plátů na stěnách cév. Průběh a míra postižení v rámci kardiovaskulárního syndromu jsou závislé na kombinaci v různé míře ovlivnitelných a neovlivnitelných faktorů. Mezi neovlivnitelné faktory patří pohlaví, věk či genetické faktory. Mezi ovlivnitelné faktory patří například kouření, fyzická aktivita, dieta, stres, hypertenze a dyslipidemie (Tegos et al., 2001; Chen et al., 2018).

Lidským mikrobiomem rozumíme soubor organismů (včetně jejich genetické informace) nacházejících se v lidském střevě. Obdobně nazýváme metabolomem soubor metabolických produktů mikrobiot či proteomem soubor bílkovinných produktů mikrobiot.

Lidské střevo je osídleno zhruba 10 bilióny bakterií (nepočítaje viry, houby, protozoa...), což z něj činí jednu z nejhustěji osídlených částí zemského povrchu. Souhrnná hmotnost těchto bakterií je větší nežli lidský mozek. Již poměr buněk 10:1 (resp. dle současné práce 1,2:1, počítáme i bezjaderné erytrocyty) ve prospěch buněk bakteriálních svědčí o významu, který tento „orgán“ pro náš organismus má (Sender et al., 2016). Mikrobiom nás převyšuje nejen počtem buněk, ale i rozsahem své genetické informace (cca 120x více genů, nežli lidská DNA). Lidský mikrobiom má významný funkční potenciál, který uplatňuje v úzké spolupráci s organismem svého hostitele – člověka.

V posledních letech, zejména díky rostoucím znalostem o střevním mikrobiomu, se ukazuje, že mezi lidským organizmem a střevním mikrobiomem panují úzké, avšak dosud ne vždy přesně definované vztahy. Hlavní důvod, proč střevní mikrobiom dlouho zůstával stranou vědeckého zájmu je nemožnost kultivovat valnou většinou jeho zástupců. Nedostatek selektivních kultivačních půd a obtížné získávání vzorků různých etáží trávicího traktu znesnadňuje identifikaci mikrobiot „klasickou“ cestou i dnes. Teprve díky rozvoji molekulárně genetických metod, zejména díky sekvenční genetické analýze prostřednictvím malých podjednotek ribozomálních RNA (16s rRNA sekvenování), jsme schopni přesněji identifikovat, které mikroorganismy jsou v GIT přítomny. Díky metagenomickému sekvenování zároveň zjišťujeme, jakou genetickou výbavu, a tedy i funkce střevní mikrobiom má.

Zastoupení jednotlivých mikrobiot i jejich absolutní počet se v jednotlivých etážích trávicího traktu výrazně liší. Distribuce mikrobů tak odráží rozdílnou dostupnost živin, kyslíku a dalších proměnných v různých částech digestivního aparátu (GIT). V proximálních částech GIT dominují Gram pozitivní (G+) fakultativní anaeroby – bakterie, které dokáží přežít za přístupu kyslíku i jeho nedostatku. Vyšší zastoupení bakterií v žaludku je výrazně limitováno jeho nízkým pH, které je i důležitou bariérou proti průniku patogenů do distálních částí GIT. Výraznější zastoupení mikrobiot v tenkém střevě znesnadňuje jeho výrazná peristaltika i další faktory (např. žlučové kyseliny), které ztěžují kolonizaci sliznice mikroorganismy. Valná většina bakterií osidluje tlusté střevo. Z 99 % se jedná o obligatorní anaeroby. Mimo tento „longitudinální“ gradient distribuce mikrobiot existuje ještě „vertikální“ gradient – rozdíl mezi mikrobiální populací střevního lumina a mikroby adhezujícími ke sliznici střeva. Tyto rozdíly znesnadňují zkoumání mikrobiomu a mohou být jednou z příčin rozporupných výsledků některých vědeckých prací.

Složení střevního mikrobiomu je interindividuálně odlišné, nicméně lze definovat určitá schémata složení mikrobiomu – nazývané enterotypy. Dle převahy jednotlivých bakteriálních rodů jsou označovány jako typ 1 (s převahou rodu *Bacteroides*), typ 2 (s převahou rodu *Prevotella*) a typ 3 (převahou rodu *Ruminococcus*) (Arumugan et al., 2011). U pacientů s aterosklerózou dominuje enterotyp 3, malá část pacientů pak nese enterotyp 1 (Karlsson et al., 2012).

Enterotyp jedince nezávisí na věku, pohlaví, ani rase, je však do značné míry závislý na dietě. Vliv krátkodobých změn diety se příliš neprojeví ve složení mikrobiomu, ovlivní však enzymatickou a metabolickou aktivitu přítomných bakterií. Teprve razantní změny v dietě mohou dlouhodoběji pozměnit složení mikrobiomu (Singh et al., 2017). Typickým příkladem je tzv. západní dieta (western diet), charakteristická vysokým obsahem tuků. Zavedení této diety vede mimo jiné k postupné redukci zastoupení *Akkermansia muciphila* a laktobacilů, což jsou mikroby příznivě ovlivňující lidský metabolismus (Singh et al., 2017). V posledních desetiletích se ovlivnění střevního mikrobiomu využívá jako účinný terapeutický prostředek u jinak obtížně léčitelných onemocnění, jakým je například klostridiová kolitida (CDI). Fekální bakterioterapie je v dnešní době běžně prováděnou, relativně levnou a efektivní metodou léčby CDI.

Mikrobiom je také nepříznivě ovlivňován antibiotickou (ATB) terapií, jejíž důsledky ve smyslu změny složení mikrobiomu mohou být patrné měsíce či roky po ukončení podávání ATB (Jernberg et al., 2007; Yap et al., 2016).

Mikrobiota ovlivňují náš organizmus mnoha různými mechanismy. Modulují střevní bariéru, regulují dostupnost živin, kompetitivně inhibují patogenní střevní flóru a brání tak infekci. Mikrobiota se podílejí také na utváření imunitního systému.

Mikrobiota jsou první, kdo zpracovává přijímanou potravu a ovlivňují složení látek, které organismus získává z přijaté potravy. Střevní mikrobiom se podílí na energetickém příjmu a syntéze některých vitaminů (K, B₂, B₁, kyselina listová, biotin, pantotenová kyselina). Dále

ovlivňuje metabolismus glukózy, žlučových kyselin a cholesterolu. Střevní bakterie rovněž syntetizují některé esenciální aminokyseliny (Lefebvre et al., 2009; Vyas a Ranganathan, 2012).

V souvislosti s rozšiřujícím se poznáním o patogenezi kardiovaskulárních chorob vychází najevo, že hodnocení „tradičních“ rizikových faktorů nestačí k efektivní predikci rizika rozvoje kardiovaskulárních chorob (Fernández-Friera et al., 2015; Fernández-Friera et al., 2017). To, spolu s relativně nedostatečným efektem dosud známých terapeutických možností vede ke snaze o hlubší pochopení patogeneze kardiometabolických onemocnění. WHO i odborné společnosti dlouhodobě zdůrazňují vliv fyzické aktivity a diety na snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění a aterosklerózy. V posledních letech se množí důkazy o tom, že jedním z důležitých faktorů v oblasti patogeneze kardiometabolických chorob je střevní mikrobiom.

Ukazuje se, že u pacientů s aterosklerózou (AS), u nichž není přítomen žádný z vnějších rizikových faktorů jejího rozvoje, se tradičně považuje za rizikový faktor vliv genetický. Nicméně takto lze vysvětlit etiologii AS jen u části pacientů. Je tedy nasnadě pátrat po dalších možných rizikových faktorech AS. Lze se domnívat, že byla již identifikována většina environmentálních faktorů (faktorů vnějšího prostředí), které se na riziku AS mohou podílet. Málo pozornosti však bylo dosud věnováno faktorům působícím přímo v našem organismu, respektive v onom zvláštním „vnitřně-vnější“ prostředí, jakým je lumen lidského střeva. V poslední době se množí důkazy o tom, že rizikovým faktorem AS mohou být i metabolické produkty tvořené lidským střevním mikrobiomem.

K tomu, aby mikrobiota mohla ovlivnit vzdálené orgánové systémy, je nutné, aby se signál, vyslaný mikrobioty pronikl přes střevní bariéru. Toho lze dosáhnout jednak využitím receptorů přítomných na buňkách střevního epitelu – takto jsou zaznamenávány strukturální molekuly stěn bakterií, jednak průnikem mikrobiálních proteinů, včetně toxických metabolitů při porušení intestinální bariery. Jiným způsobem může být tvorba bioaktivních molekul, které jsou vstřebávány střevními buňkami a dále transportovány do vzdálených částí lidského organismu.

Takový mechanismus se uplatňuje například v metabolismu mastných kyselin, zejména pak mastných kyselin s krátkým řetězcem (short chain fatty acids, SCFA). Volné mastné kyseliny jsou nejen významným energetickým substrátem, ale mají (zejména SCFA) funkci signálních molekul. Množství SCFA v našem organismu je do značné míry závislé na střevním mikrobiomu, který je vytváří fermentací vlákniny. SCFA slouží nejen jako zdroj energie pro buňky střevního epitelu, ale prostřednictvím specifických s G-proteinem spřažených receptorů ovlivňují i vzdálené orgány. Příkladem takových receptorů jsou GPR41 a GPR43. GPR41 je receptor s vysokou afinitou zejména k propionátu (Samuel et al., 2008). Je exprimován v tukové tkáni, střevě a periferním nervovém systému. Stimulován SCFA reguluje střevní glukoneogenezi. Propionát prostřednictvím GPR41 exprimovaném v sympatickém nervovém systému reguluje aktivitu sympatiku. GPR41 exprimovaný v periferních nervech se podílí na udržování energetické homeostázy organismu mimo jiné i regulací osy střevo-mozek-periferní nervový systém. Vzhledem k tomu, že tento receptor je přítomen i v beta-buňkách lidského pankreatu, lze předpokládat, že se přímo podílí na regulaci sekrece insulínu (Miyamoto et al., 2016).

Dalším zástupcem SCFA je acetát, který je hlavním ligandem receptoru GPR43 (Brown et al., 2003). Tento receptor je exprimován v neuroendokrinních buňkách L buňkách lidského střeva. Jimi secernovaný peptid YY (PYY) inhibuje motilitu trávicího traktu, ovlivňuje kostní metabolismus a snižuje chuť k jídlu (Darzi et al., 2011). Stejnými buňkami uvolňovaný glucagon-like peptid (GLP-1) se účastní na udržování glukózové homeostázy. U GPR43-deficientních myší dochází k redukci sekrece GLP-1. Pokusy na transgenních myších s deficitem GPR43 exprimovaným v tukové tkáni ukázaly, že míra aktivace těchto receptorů a

jimi zprostředkovaný efekt se liší u bezmikrobních (germ-free) myší a myší léčených antibiotiky. Ukazuje to na klíčovou úlohu střevního mikrobiomu v aktivaci GPR43. GPR 43 inhibuje akumulaci tuku v tukové tkáni, příznivě ovlivňuje sekreci GLP-1 a přímo reguluje sekreci insulinu v pankreatu (Kimura et al., 2013). Některé studie potvrzují vliv GPR43 na modulaci zánětlivé odpovědi organismu (Maslowski et al., 2009). Stimulace GRP43 inhibuje zánětlivé změny střevní sliznice, naopak GPR43 deficientní myší kmeny vykazují těžší kolitidu, astma či artritidu. Zdá se, že mikrobiálními produkty aktivovaný GPR43 pozitivně ovlivňuje regulační T lymfocyty ve střevní sliznici (Miyamoto et al., 2016).

Vliv SCFA na energetický metabolismus potvrzují i výsledky některých dalších studií. Například vyšší příjem propionátu či acetátu reguluje expresi genů odpovědných za lipogenezi, snižuje v řádu týdnů obsah triacylglycerolu v jaterní tkáni, nemá však vliv na hmotnost. Suplementace propionátem a acetátem ovlivnila ve studii Weitkunatové et al. složení mastných kyselin s dlouhým řetězcem ve smyslu snížení $\omega 6/\omega 3$ poměru. Propionát, zdá se, přímo zvyšuje syntézu C15:0 a C17:0 mastných kyselin v játrech. Zvýšený příjem propionátu snižuje vysokotukovou dietou indukovanou insulinovou rezistenci u myší. Nejspíše právě stimulací intestinální glukoneogeneze zvyšuje propionát insulinovou senzitivitu (De Vadder et al., 2014; Weitkunat et al., 2016).

Na druhou stranu v souvislosti s metabolickým syndromem dokazují ve své studii Perry a kol., že acetát, produkovaný alterovaným střevním mikrobiomem aktivuje parasympatický nervový systém, což vede k zvýšené glukózou stimulované insulinové sekreci a rezultuje v hyperfagii a obezitě se všemi známými důsledky (Perry et al., 2016).

Dalším významným produktem mikrobiálního metabolismu je trimethylamin (TMA) - produkt vycházející mimo jiné z metabolismu fosfatidylcholinu (lecitinu). Tato molekula je hlavním potravinovým zdrojem cholinu – látky, která v lidském těle hraje několik důležitých úloh. Je nejen prekurzorem acetylcholinu-významného neuroendokrinního působku, ale podílí se i na funkci membrán a ovlivňuje lipidový metabolismus. Cholin je rovněž zdrojem metylových skupin, důležitých pro syntézu některých aminokyselin. Význam TMA v problematice kardiovaskulárních onemocnění dobře ilustrují studie, které prokazují pozitivní korelaci mezi TMA a velikostí aterosklerotických plátů či rizikem vážných komplikací u pacientů po koronarografii (Wang et al., 2011; Tang et al., 2013).

Dvoustupňovým metabolismem, kdy specifická střevní flóra vytváří z prekurzorů (lecitin, cholin, betain L-karnitin) trimethylamin, který je dále v játrech metabolizován působením FMO-3 (flavin containing monooxidase -3), vzniká trimethylamin-N-oxid (TMAO). Vysoké hladiny TMAO vedou k vyšší akumulaci cholesterolu v pěnových buňkách, které jsou iniciálním substrátem aterosklerotických lézí. Navíc, TMAO byl identifikován ve větších koncentracích u dialyzovaných pacientů – skupiny pacientů, která má zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění. Sama vysoká hladina TMAO je i prognostickým faktorem závažnosti renálního poškození u pacientů s renální insuficiencí (Tang et al., 2013; Wilson et al., 2015).

Na zvířecích modelech se rovněž ukazuje, že přítomnost aterosklerotických plátů je asociována s významnějším zastoupením některých mikrobiot (např. *Clostridiales*, *Ruminococcus* a *Lachnospiraceae*), naopak méně jsou u těchto pacientů zastoupeny *Bacteroidetes*. Mimoto jsou s kardiovaskulárními onemocněními asociovány některá vzácnější mikrobiota-rod *Collinsella* je zastoupena u rizikových pacientů více, zatímco *Roseburia* a *Eubacterium* jsou naopak četnější u zdravé populace.

Mikrobiom je však s problematikou aterosklerózy spojen ještě těsněji. Koren a kol. ve své práci prokázal bakteriální osídlení přímo v aterosklerotických plátech. Některé z bakterií (např. *Pseudomonas luteola*) byla autory studie identifikována jen v aterosklerotických plátech, jiné bakterie (některé stafylokoky a příslušníci rodu *Burgholderia*) byly u těchto pacientů izolovány i ve stolici a ústní dutině. Autoři připouštějí možnost, že *Pseudomonas*

luteola je klíčovým organismem kolonizujícím aterosklerotické pláty a nejspíše se podílí na jejich tvorbě. Rovněž našli závislost počtu leukocytů aterosklerotických plátů na přítomnosti bakteriální DNA uvnitř plátu. Domnívají se tedy, že bakteriální infekce aterosklerotických plátů přímo ovlivňuje jejich stabilitu, přičemž se ukazuje, že přinejmenším část mikroorganismů aterosklerotických plátů pochází ze střevní mikroflóry (Koren et al. 2011).

Rovněž dysbióza, vedoucí k porušení střevní bariéry a následně i bakteriální translokaci, může vést k rozvoji mírného chronického zánětlivého stavu, který přispívá k rozvoji aterosklerózy.

V souvislosti s kardiovaskulárními chorobami popisuje Lam v práci z roku 2012 popisuje snížení hladin cirkulujícího leptinu a následně i menší rozsah ischemického poškození myokardu při perorálním užití vankomycinu resp. probiotik (*Lactobacillus leptum*) oproti kontrolám u zvířecích modelů s uměle navozenou ischemií srdečního svalu. Naznačuje tak možné budoucí směřování strategie částečné redukce následků infarktu myokardu pomocí ovlivnění střevní mikroflóry (Lam et al., 2012).

Nedílnou součástí kardiometabolického syndromu je hypertenze. Jakkoli je obvykle poměrně dobře korigovatelná medikací, příčiny esenciální hypertenze nejsou dosud do detailů známy. Metaanalýza devíti prací publikovaná r. 2014 prokazuje, že při dostatečně dlouhém užívání některých probiotik dochází k signifikantnímu snížení systolického i diastolického tlaku (Khalesi et al., 2014). Obdobný efekt užívání fermentovaného mléka pak prokázal ve své metaanalýze Dong (Dong et al., 2013). Ukazuje se rovněž, že jedním z modulátorů krevního tlaku jsou SCFA. Receptory pro SCFA jsou mimo jiné přítomny i v buňkách hladkého svalů malých rezistenčních cév či ledvinném juxtaglomerulárním aparátu a Pluznick s kol. v této souvislosti popsali modifikaci krevního tlaku u myši pomocí antibiotické terapie (Pluznick et al., 2013).

V poslední době se množí práce zkoumající možnosti ovlivnění složení střevního mikrobiomu v souvislosti se snížením kardiovaskulárního rizika. Kuka et al. medikamentózním ovlivněním bakteriálního metabolismu L-karnitinu snížil v experimentu plazmatické hladiny proaterogenního TMAO (Kuka et al., 2014). Fekální transplantací (FBT) stolice štíhlých jedinců bylo ve studii Vrieze a kol. dosaženo zvýšení insulinové sensitivity u pacientů s metabolickým syndromem (Vrieze et al., 2012). Z výsledků je zřejmý vliv butyrát produkujících bakterií (*Roseburia*, *Eubacteria*) na glukózovou homeostázu. Podobně Gregory et al. dosáhl přenosem stolice elevaci plazmatických hladin TMAO u myši a dokázal tak možnost horizontálního přenosu proaterogenního rizika (Gregory et al., 2015). Vzhledem k rizikům FBT (infekce, toxemie), která je asociována s alogenní transplantací stolice, však využití této metody je v současné době výrazně limitováno. Cílem dalšího výzkumu by tak mohla být identifikace konkrétních skupin bakterií, jejichž podáním by bylo možno ovlivnit kardiovaskulární riziko. V době rozvoje genetického inženýrství se nabízí možnost využití této metody tak, jak to ukázal Jones et al., když podáním geneticky modifikovaného kmene *Lactobacillus reuteri* snížil u pacientů, jimž byla tato bakterie podávána, plazmatické hladiny cholesterolu (Jones et al., 2012). Další, snad nejlépe dostupnou modalitou, je fyzická aktivita a dietní opatření. Vliv fyzické aktivity na kardiovaskulární riziko je obecně přijímaným faktem (Thompson et al., 2007). Zdá se, že minimálně část efektu fyzické aktivity je zprostředkována změnami střevního mikrobiomu (Chen et al., 2018). Dietní opatření jsou nedílnou součástí terapie metabolického syndromu již v dnešní době. Detailní poznání vztahu diety a mikrobiálního metabolismu a jeho efektu na kardiovaskulární riziko by v budoucnu mohlo přinést efektivnější dietní doporučení. Pochopení vztahu lidského metabolismu a střevního mikrobiomu potenciálně otevírá nové možnosti terapie kardiometabolických onemocnění.

Tabulka Zaživací trakt a mikrobiota

Oddíl GIT	Počet CFU/ml	Mikrobiota
Žaludek	1 - 10 ²	Lactobacillus, Streptococcus, Helicobacter (pylori), Peptostreptococcus
Duodenum	10 - 10 ²	Lactobacillus, Streptococcus, Helicobacter, Peptostreptococcus
Jejunum	10 ³ - 10 ⁴	Streptococcus, Lactobacillus,
Ileum	10 ⁷ - 10 ⁹	Bacteroides, Clostridium, Streptococcus, Actinomycinaea
Tlusté střevo	10 ¹¹	Bacteriodes, Clostridium, Bifidobacterium, Enterobacteriaceae, Akkermansia, Prevolla, Ruminococcus, Eubacteria, Bacillus, Lactobacillus, Fusobacterium, Enterococcus

(Guarner 2003; a Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease 2010)

Studie byla podpořena projekty RVO-VFN64165/2012, MPO-FV10380 a PROGRES Q25/LF1/2

Literatura

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473: 174-180.

Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 2003; 278: 11312-11319.

Cook C, Cole G, Asaria P, et al. The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol* 2014;171: 368-376.

Darzi J, Frost GS, Robertson MD. Do SCFA have a role in appetite regulation? *Proc Nutr Soc* 2011; 70: 119-128.

De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 2014; 156: 84-96.

Dong JY, Szeto IM, Mäkinen K, et al. Effect of probiotic fermented milk on blood pressure: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr* 2013; 110: 1188-1194.

Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, et al. Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation* 2015; 131: 2104-2113.

Fernández-Friera L, Fuster V, López-Melgar B, et al. Normal LDL-cholesterol levels are associated with subclinical atherosclerosis in the absence of risk factors. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70: 2979-2991.

Gregory JC, Buffa JA, Org E, et al. Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. *J Biol Chem* 2015; 290: 5647-5660.

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-519.

Chen J, Guo Y, Gui Y, Xu D. Physical exercise, gut, gut microbiota, and atherosclerotic cardiovascular diseases. *Lipids Health Dis* 2018; 17: 17.

Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* 2007; 1: 56-66.

Jones ML, Martoni CJ, Prakash S. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66: 1234-1241.

- Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, et al.** Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 2012; 3: 1245.
- Khalesi S, Sun J, Buys N, Jayasinghe R.** Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension* 2014; 64: 897-903.
- Kimura I, Ozawa K, Inoue D, et al.** The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun* 2013; 4: 1829.
- Koren O, Spor A, Felin J, et al.** Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(Suppl 1):4592-4598.
- Kuka J, Liepinsh E, Makrecka-Kuka M, et al.** Suppression of intestinal microbiota-dependent production of pro-atherogenic trimethylamine N-oxide by shifting L-carnitine microbial degradation. *Life Sci* 2014; 117: 84-92.
- Lam V, Su J, Koprowski S, et al.** Intestinal microbiota determine severity of myocardial infarction in rats. *FASEB J* 2012; 26: 1727-1735.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, et al.** Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol Rev* 2009; 89: 147-191.
- Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al.** Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 2009; 461: 1282-1286.
- Miyamoto J, Hasegawa S, Kasubuchi M, et al.** Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 450.
- Perry RJ, Peng L, Barry NA, et al.** Acetate mediates a microbiome-brain- β cell axis promoting metabolic syndrome. *Nature* 2016; 534: 213-217.
- Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, et al.** Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 4410-4415.
- Samuel BS, Shaito A, Motoike T, et al.** Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 16767-16772.
- Sender R, Fuchs S, Milo R.** Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell* 2016; 164: 337-340.
- Singh RK, Chang H-W, Yan D, et al.** Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med* 2017; 15: 73.
- Sleisenger MH, Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ.** Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: Pathophysiology, diagnosis, management. 9th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier 2010.
- Tang WH, Wang Z, Levison BS, et al.** Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013; 368: 1575-1584.
- Tegos TJ, Kalodiki E, Sabetai MM, Nicolaides AN.** The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review. *Angiology* 2001; 52: 89-98.
- Thompson PD, Franklin BA, Balady GJ, et al.** Exercise and acute cardiovascular events placing the risks into perspective: a scientific statement from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism and the Council on Clinical Cardiology. *Circulation* 2007; 115(17): 2358-2368.
- Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, et al.** Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012; 143: 913-916.
- Vyas U, Ranganathan N.** Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond. *Gastroenterol Res Pract* 2012; 2012: 872716.
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al.** Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; 472: 57-63.

Weitkunat K, Schumann S, Nickel D, et al. Importance of propionate for the repression of hepatic lipogenesis and improvement of insulin sensitivity in high-fat diet-induced obesity. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60: 2611-2621.

Wilson Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, et al. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine *N*-oxide (TMAO) Pathway Contributes to Both Development of Renal Insufficiency and Mortality Risk in Chronic Kidney Disease. *Circ Res* 2015; 116: 448-455.

Yap TW, Gan HM, Lee YP, et al. *Helicobacter pylori* Eradication Causes Perturbation of the Human Gut Microbiome in Young Adults. *PLoS One* 2016; 11: e0151893.

HEPATOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY TROXERUTINU U MODELU POSTMENOPAUZÁLNÍHO METABOLICKÉHO SYNDROMU

M. Hüttl¹, M. Poruba², H. Malínská¹, I. Marková¹, O. Oliyarnyk¹, J. Trnovská¹, L. Kazdová¹, R. Večeřa²

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

² Ústav Farmakologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc

Úvod

Hypertenze, dyslipidemie, abdominální obezita, rezistence tkání k účinku inzulinu a glukózová intolerance náleží do souboru onemocnění, který je souhrnně nazýván metabolický syndrom. Prevalence metabolického syndromu v populaci lidí středního věku se pohybuje mezi 20 - 30 %: u mužů 8 - 24 %, u žen 7 - 46 %. Jeho přítomností stoupá u těchto jedinců riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění a diabetu 2. typu. Kardiovaskulární onemocnění je častější u mužů než u žen v premenopauzálním období, ale po menopauze incidence onemocnění dramaticky stoupá (Blum & Blum, 2009). Četné epidemiologické studie dokládají, že klíčovou rolí v ochraně před rozvojem aterogeneze a metabolických poruch hraje estrogen. Ztráta ovariálního cyklu tudíž vede k nárůstu tělesné hmotnosti, viscerální adipozity, inzulinové rezistenci, jaterní steatóze, poruchám lipidového i glukózového metabolismu a mírného zánětu.

Troxerutin je semisyntetický derivát flavonoidu rutinu, jehož přírodní zdroje jsou v Jerlínu japonském (*Sophora japonica*), v čaji, kávě, obilných zrnech, ovoci a zelenině. Troxerutin příznivě ovlivňuje viskozitu krve a agregaci trombocytů. V současné době je používán k léčbě chronické žilní insuficience a varikozity. Recentní pozorování naznačují také jeho antioxidační, hepatoprotektivní, protizánětlivé, hypolipidemické a hypoglykemické účinky, tudíž by mohl být vhodným kandidátem pro léčbu poruch spojených s metabolickým syndromem. Mechanismy příznivého působení troxerutinu v této oblasti nejsou dosud přesně objasněny.

Cíl práce

Cílem práce bylo sledovat u modelu postmenopauzálního metabolického syndromu účinky troxerutinu na poruchy spojené s metabolickým syndromem a zhodnotit jeho potenciální využití v léčbě negativních metabolických důsledků menopauzy.

Metodika

Samicím potkanů kmene Wistar byla ve věku 8 týdnů chirurgicky provedena ovariektomie nebo sham operace. Po dobu následujících 4 měsíců byly samice obou skupin krmeny standardní dietou *ad libitum*. Během této doby se u ovariektomovaných potkanů rozvíjely poruchy spojené s postmenopauzálním metabolickým syndromem. Ve věku 6 měsíců byly samice ze skupiny s ovariektomií rozděleny: část ovariektomovaných samic (OVX + TROX, n = 8) byla po dobu 4 týdnů podávána standardní dieta s přídatkem troxerutinu v dávce 150mg/kg tělesné hmotnosti/den a druhá část skupiny (OVX, n = 8) byla nadále krmena standardní dietou. Kontrolní skupinu tvořily samice s sham operacemi (SHAM, n = 8) krmené standardní dietou *ad libitum*.

Hladiny sledovaných látek byly stanoveny pomocí komerčních/ELISA souprav: glukóza, triglyceridy, cholesterol Erba-Lachema (ČR), neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) Roche Diagnostic (Germany), inzulin Mercodia (Sweden), HMW adiponektin MyBiosource Inc. (USA), interleukin-6 komerčně dostupnými kity. Genové exprese byly stanoveny kvantitativní PCR. Ke stanovení obsahu triacylglycerolů v játrech, resp. svalch byla tkáň

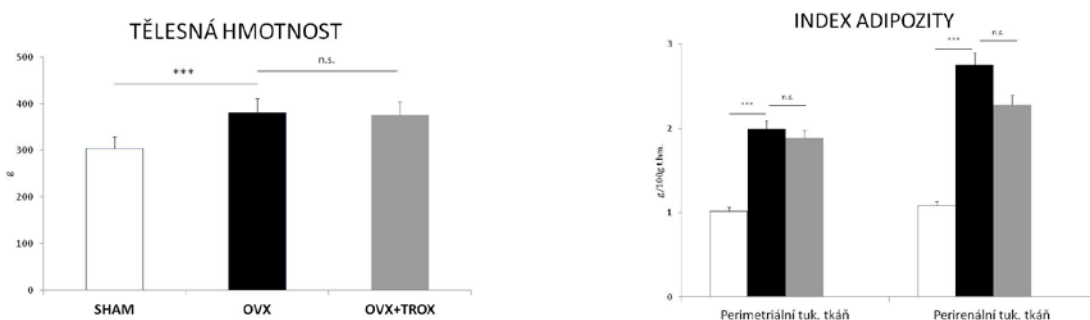
rozdrovena v kapalném dusíku a extrahována ve směsi chloroformu a methanolu. Po přidání 2% KH_2PO_4 byla směs centrifugována. Po odpaření byl obsah triglyceridů stanoven pomocí analytické soupravy Erba–Lachema (ČR).

Senzitivita tkání k účinku inzulinu byla sledována *ex vivo* při inkubaci tkáně bez inzulinu a s inzulinem (250 $\mu\text{U/ml}$) podle inkorporace $^{14}\text{C-U}$ -glukózy do glykogenu kosterního svalu, resp. tukové tkáně. Data byla hodnocena pomocí statistické metody ANOVA a Bonferroniho testem.

Výsledky

Navození menopauzy se u samic potkanů projevilo 25 % ním nárůstem tělesné hmotnosti a zvýšením podílu viscerální tukové tkáně o 88 %, přičemž negativní dopad ovariektomie troxerutin signifikantně nezvrátil (graf 1 a 2).

Graf 1 a 2



U sledovaných skupin se výrazně nelišily hladiny glukózy a inzulinu samic v sytém stavu. Naproti tomu HOMA-IR index, který vyjadřuje vztah mezi hladinami lačného inzulinu a lačné glukózy v séru a vykazuje silnou korelaci s hyperinzulinemickým euglykemickým glukózovým klempem, byl výrazně negativně zvýšen ovariektomií a podávání troxerutinu jeho hodnoty průkazně snížilo. Troxerutin působil v cirkulaci mírně protizánětlivě. Podle předpokladů byly léčbou bioflavonoidem troxerutinem zlepšeny parametry oxidačního stresu v séru – významně se zvýšily hladiny glutation-dependentních enzymů a poklesly hladiny produktů lipoperoxidace. Pozitivním účinkem léčby postmenopauzálních samic byl významný pokles krevních lipidů, jejichž profil byl po ovariektomii zhoršený (celkový cholesterol +52 %) v porovnání s kontrolami (tab 1).

PARAMETRY V CIRKULACI					
	SHAM	OVX	p1<	OVX+TROX	p2<
glykémie sytá mmol/l	6,058 ± 0,323	6,554 ± 0,206	ns	6,304 ± 0,122	ns
inzulin sytý nmol/l	0,120 ± 0,018	0,143 ± 0,017	ns	0,110 ± 0,013	*
HOMA-IR	1,437 ± 0,108	2,308 ± 0,356	**	1,614 ± 0,153	**
triglyceridy mmol/l	1,511 ± 0,164	1,300 ± 0,222	ns	0,759 ± 0,056	*
cholesterol mmol/l	1,814 ± 0,124	2,763 ± 0,085	***	2,304 ± 0,066	**
NEMK nmol/l	0,378 ± 0,025	0,398 ± 0,024	ns	0,344 ± 0,036	ns
IL-6 nmol/l	40,97 ± 7,52	42,1 ± 2,80	ns	26,98 ± 2,90	***
MCP-1 nmol/l	1510 ± 142	1730 ± 181	*	1649 ± 174	ns

Tab. 1 p1 = vliv ovariektomie, p2 = vliv léčby troxerutinem, p < 0,05=*, p < 0,01=**, p < 0,001=***

U samic ovariektomie zvyšovala ektopickou akumulaci lipidů v jaterní tkáni: obsah triacylglycerolů byl o 57 % a obsah cholesterolu o 31 % vyšší koncentrace vyšší v porovnání s premenopauzálními samicemi. Léčba troxerutinem depozici lipidů ve tkáních nesnížila (tab 2).

EKTOPICKÉ UKLÁDÁNÍ LIPIDŮ						
		SHAM	OVX	p1<	OVX+TROX	p2<
Kosterní sval	TAG $\mu\text{mol/g}$	3,30 \pm 0,34	6,62 \pm 0,77	**	6,25 \pm 0,48	ns
Játra	TAG $\mu\text{mol/g}$	4,70 \pm 0,62	7,37 \pm 0,62	**	8,67 \pm 1,21	ns
	CHOL $\mu\text{mol/g}$	7,66 \pm 0,70	10,29 \pm 0,65	**	10,84 \pm 0,62	ns

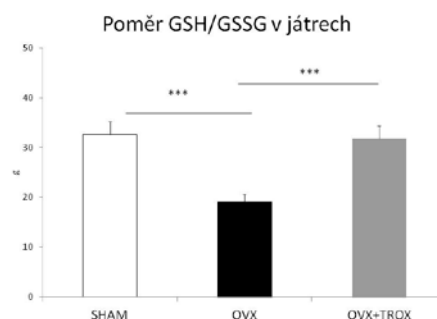
Tab. 2 p1 = vliv ovariektomie, p2 = vliv léčby troxerutinem, p < 0,05=*, p < 0,01=**, p < 0,001=***

Citlivost viscerální tukové tkáně a kosterních svalů k účinku inzulinu byla významně zhoršena u modelu postmenopauzy a 4-týdenní podávání troxerutinem citlivost tkání u postmenopauzálních samic nezlepšilo (tab 3)

SENZITIVITA TKÁNÍ K ÚČINKU INZULINU						
		SHAM	OVX	p1<	OVX+TROX	p2<
Glykogeneze mmol gl./g/2h	bazální	2687 \pm 318	1989 \pm 316	*	2296 \pm 253	ns
	+ inzulin	3815 \pm 415	2689 \pm 398	ns	3015 \pm 307	ns
Lipogeneze mmol gl./g/2h	bazální	1550 \pm 322	696 \pm 158	*	677 \pm 66	ns
	+ inzulin	1111 \pm 141	704 \pm 173	*	653 \pm 55	ns

Tab. 3 p1 = vliv ovariektomie, p2 = vliv léčby troxerutinem, p < 0,05=*, p < 0,01=**, p < 0,001=***

K nejvýznamnějším metabolickým změnám po léčbě troxerutinem došlo v jaterní tkáni. Navození menopauzy vedlo u samic k výraznému zhoršení parametrů oxidačního stresu v játrech: o 19 % klesl obsah glutationu, snížila se aktivita glutathion-dependentních enzymů a zvýšil se obsah produktů lipoperoxidace. Následná léčba troxerutinem dané parametry významně zlepšila (graf 3, tab 4). Relativní exprese nukleárního faktoru Nrf2 v játrech, který je hlavním regulátorem antioxidační odpovědi, nebyly u sledovaných skupin rozdílné.



Graf 3

PARAMETRY OXIDAČNÍHO STRESU V JÁTRECH						
		SHAM	OVX	p1<	OVX+TROX	p2<
SOD U/mg		0,135 \pm 0,005	0,127 \pm 0,007	n.s.	0,149 \pm 0,008	*
GSHPx uM min/mg		304 \pm 19	292 \pm 12	n.s.	368 \pm 14	***
GR uM min/mg		112 \pm 6	100 \pm 6	n.s.	124 \pm 8	*
GST uM min/mg		170 \pm 12	155 \pm 12	n.s.	194 \pm 15	*
CD uM/mg		29 \pm 2	46 \pm 3	***	45 \pm 2	n.s.
TBARS uM/mg		1,174 \pm 0,073	1,473 \pm 0,128	*	1,128 \pm 0,062	*

Tab. 4 p1 = vliv ovariektomie, p2 = vliv léčby troxerutinem, p < 0,5=*, p < 0,01=**, p < 0,001=***

V játrech postmenopauzálních samic troxerutin zvýšil expresi Abc transportérů (ATP-binding Cassette) ($p < 0,001$), které jsou zodpovědné za eflux cholesterolu z jater do žluče a jsou tudíž důležitou složkou eliminace cholesterolu. Intervence troxerutinem snižovala ovariektomií zvýšenou expresi Cyp2e1 ($p_2 < 0,01$). Zvýšená exprese tohoto membránového proteinu přispívá k patogenezi metabolických onemocnění tím, že zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v organismu (Porubsky et al., 2008). Troxerutin v našem experimentu chránil před zvýšením exprese Cyp4a1, Cyp4a2 a Cyp4a3, kteří hrají důležitou roli v metabolismu mastných kyselin, zejména kyseliny arachidonové, a jsou úzce spojeni s inzulinovou rezistencí. Hormonální změny u ovariektomovaných samic vedly v játrech až k sedminásobnému zvýšení exprese lipoproteinové lipázy ($p_1 < 0,001$), přičemž je známo, že overexprese tohoto enzymu vedou u experimentálních modelů k inzulinové rezistenci a obezitě (Delezie et al., 2012). Podávání troxerutinu exprese Lpl významně snižovalo ($p_1 < 0,001$). Expese Hmgcr (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase), jehož hlavním úkolem je regulace rychlosti biosyntézy cholesterolu a který stojí na počátku jeho endogenní syntézy, nebyly léčbou ovlivněny.

Příznivé působení troxerutinu v játrech dokládá i zlepšení spektra mastných kyselin ve fosfolipidech. Antiinflamační index (SHAM: $20,9 \pm 2,2$ vs OVX: $15,4 \pm 0,5$ vs OVX + TROX: $22,4 \pm 1,5$; $p_1 < 0,01$; $p_2 < 0,01$), který ukazuje na protizánětlivé působení mastných kyselin, byl po 4-týdenní intervenci troxerutinem v játrech ovariektomovaných samic významně zvýšen.

Diskuse

Tělesná hmotnost po léčbě troxerutinem se neměnila a ačkoliv pokles relativní hmotnosti bílé tukové tkáně statisticky významný nebyl, trend ve snižování viscerální adipozity je patrný. I přes zlepšení lipidového spektra v cirkulaci a snížení HOMA-IR, který může být dobrým prediktorem celkové inzulinové senzitivity (Antunes et al., 2016), nedošlo u postmenopauzálních samic po léčbě troxerutinem k redukci ektopického ukládání lipidů ani ke zvýšení citlivosti tkání k účinku inzulinu. Zlepšení profilu lipidového spektra v cirkulaci se zdá být dáno příznivým působením troxerutinu na regulaci metabolismu v játrech. Nejenže bioflavonoid troxerutin redukoval v játrech oxidační stres navozený ovariektomií, ale současně i pozitivně ovlivňoval složení mastných kyselin ve fosfolipidech jaterní tkáně. Výsledky dále naznačují, že troxerutin neovlivňuje tvorbu cholesterolu, neboť relativní exprese Hmgcr stojícím na počátku jeho biosyntézy nebyla léčbou ovlivněna, ale působí příznivě spíše na eliminaci cholesterolu. To dokládají pozitivní změny v expresi jednotlivých složek cytochromu P450, zejména pak Cyp2e1.

Experiment s chirurgicky navozenou menopauzou naznačuje, že troxerutin by mohl být vhodným doplňkem k léčbě žen po menopauze nejen pro své pozitivní účinky na mikrovaskulární komplikace, ale i s ohledem na zlepšování parametrů metabolického syndromu, který se po hormonálních změnách rozvíjí.

Závěr

Troxerutin u postmenopauzálního modelu metabolického syndromu pozitivně ovlivnil dyslipidemii, parametry oxidačního stresu a zánětu. V hepatoprotektivním účinku troxerutinu mohou mít důležitou úlohu změny v expresi Cyp4a ovlivňujícím metabolismus mastných kyselin a Cyp2e1, neboť cytochrom P450 2e1 je zdrojem tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) a klíčovým faktorem v patogenezi nealkoholové jaterní steatózy.

Studie byla podpořena grantem GAČR 17-08888-S

Literatura

Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, et al. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. Arch Endocrinol Metab 2016; 60: 138-142.

Blum A, Blum N. Coronary artery disease: Are men and women created equal? Gend Med 2009; 6: 410-418.

Delezie J, Dumont S, Dardente H, et al. The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. FASEB J 2012, 26: 3321-3335.

Porubsky PR, Meneely KM, Scott EE. Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. J Biol Chem 2008, 283: 33698-33707.

Sampath S, Kurundevi B. Effect of troxerutin on signaling molecules in thegastrocnemius muscle of high fat and sucrose-induced type-2 diabetic adult male rat. Mol Cell Biochem 2014; 395: 11-27.

DIAGNOSTIC VALUE OF SELECTED NONCHOLESTEROL STEROLS IN TREATMENT OF HEREDITARY HYPERCHOLESTEROLEMIA: 20-YEAR EXPERIENCE AMONG SCHOOL CHILDREN AND ADOLESCENTS SUFFERING FROM HYPERCHOLESTEROLEMIA

DIAGNOSTICKÁ CENA VYBRANÝCH NECHOLESTEROLOVÝCH STEROLŮ V PRŮBĚHU LÉČBY FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLEMIE: 20 LETÉ ZKUŠENOSTI U ŠKOLNÍCH DĚTÍ A ADOLESCENTŮ S HYPERCHOLESTEROLEMIÍ

J. Hyánek^{1, *}, F. Pehal², L. Dubská², B. Miková², V. Martíníková¹, J. Privarová¹, J. Brtnová², L. Táborský²

¹Metabolic Centre, and ²Department of Clinical Biochemistry, Hematology and Immunology; both Na Homolce Hospital, Prague, Czech Republic

Aims

Paper presents our 20-year experience with diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia (HFH) and monitoring its diet and drug treatment in 94 children (6 - 18 years) by means of noncholesterol sterols (NCS) spectrum, namely lathosterol (Lat) & desmosterol (Des) as cholesterol synthesis precursors, and campesterol (Cam) & sitosterol (Sit) as cholesterol absorption markers.

Patients and methods

Four groups of children were included in the study: (1) 64 children with genetically confirmed HFH; (2) 30 children with clinical and laboratory symptoms of HFH where the relevant genetic mutations have not been found; (3) 77 children with alimentary hyperlipidemia (AH), and (4) 84 healthy children as a control group.

The followed-up markers were routine lipid profile comprising total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triacylglycerides (TAG), complemented by apolipoprotein A1 (ApoA), apolipoprotein B (ApoB), lipoprotein(a) (Lp(a)), low-density lipoprotein receptor (LDL-R), apolipoprotein E (ApoE) polymorphism, and plasma NCS (Lat, Des, Cam & Sit), the latter being established by means of GC/MS.

The medical treatment of HFH patients consisted of simvastatin and ezetimibe. Correlations between TC lowering and decrease in Lat and other NCS values during combination treatment were examined in various types of hypercholesterolemia. Flow chart of treatment pattern followed by children presenting to Metabolic Unit in Hospital Na Homolce is given on Fig. 1.

Results

HFH patients, whether genetically confirmed or not, exhibit a significant decrease in Lat (and in milder concentrations also Des) which correlates directly to the TC lowering during the combination therapy ($r = 0.912$ for Lat; $r = 0.798$ for Des; $p < 0,001$). Fig. 2 and Fig. 3 Cam and Sit do not correlate with the TC lowering at all ($r = -0.378$ for Cam; $r = -0,208$ for Sit). Linear regression for TC and Lat in 25 selected HFH-Gen patients with highest TC levels and most severe LDL-R mutations is given on Fig. 4.

By contrast, high TC levels in AH patients are not accompanied by significantly elevated Lat levels, and, therefore, caloric restriction cannot result in significant Lat or Des decrease

($p < 0.001$). Lat levels show increasing values following drug treatment interruption during long vacations or when the drug treatment is neglected as graphically shown on Fig. 5. Compensatory elevation of Cam and Sit occurs in 50% of treated children patients after the desirable TC level below 4.8 mmol/l has been achieved and maintained. In our experience, the combination of statin and ezetimibe is the most efficacious therapy to lower TC together with Lat and Des in children with HFH.

Conclusions

Inclusion precursors for cholesterol synthesis and absorption in laboratory testing improves differential diagnosis of HFH, and makes monitoring and/or treatment of pediatric patients more precise and convenient.

Keywords: noncholesterol sterols, lathosterol, desmosterol, campesterol, sitosterol, phytosterols, heterozygous familial hypercholesterolemia, alimentary hyperlipidemia, monitoring diet and drug treatment, simvastatins, ezetimibe

Fig.1.

Flowchart of Medical Treatment for Children Admitted to Metabolic Unit

1st Visit	<ul style="list-style-type: none"> • TCh: >5,0mmol/l • Lat: >5 umol/l • TAG:< 3mmol/l • CVD Risk and Pedigree:++ • Th:Ezetimibe 10 mg/d • Living Style + Sporting • Lowcholesterol Diet Control • Genetic Consultation for Family 	<ul style="list-style-type: none"> • TCh: < 5 mmol/l • Lat: < 5umol/l • TAG: > 3,5 mmol/l • CVD Risk + Pedigree: 0 • Lowcaloric Diet +Sporting
2nd Visit	<ul style="list-style-type: none"> • TCh: > 4,8 mmol/l • Lat: > 5,0 umol/l • Th:Ezetimibe + Statin 10 mg/d 	
3rd Visit	<ul style="list-style-type: none"> • TCh: > 4,8mmol/l • Lat: > 5,0 umol/l • Th: _Ezetimibe + statin 20m/d 	
4th Visit	<ul style="list-style-type: none"> • TCh: < 4,8 mmol/l • Lat: < 3, 8 umol/l • Th: Continuation on Selected Doses 	

Fig. 2. Monitoring of TC and NCS levels in 25 selected HFH-Gen patients with highest TC levels and most severe LDL-R mutations.

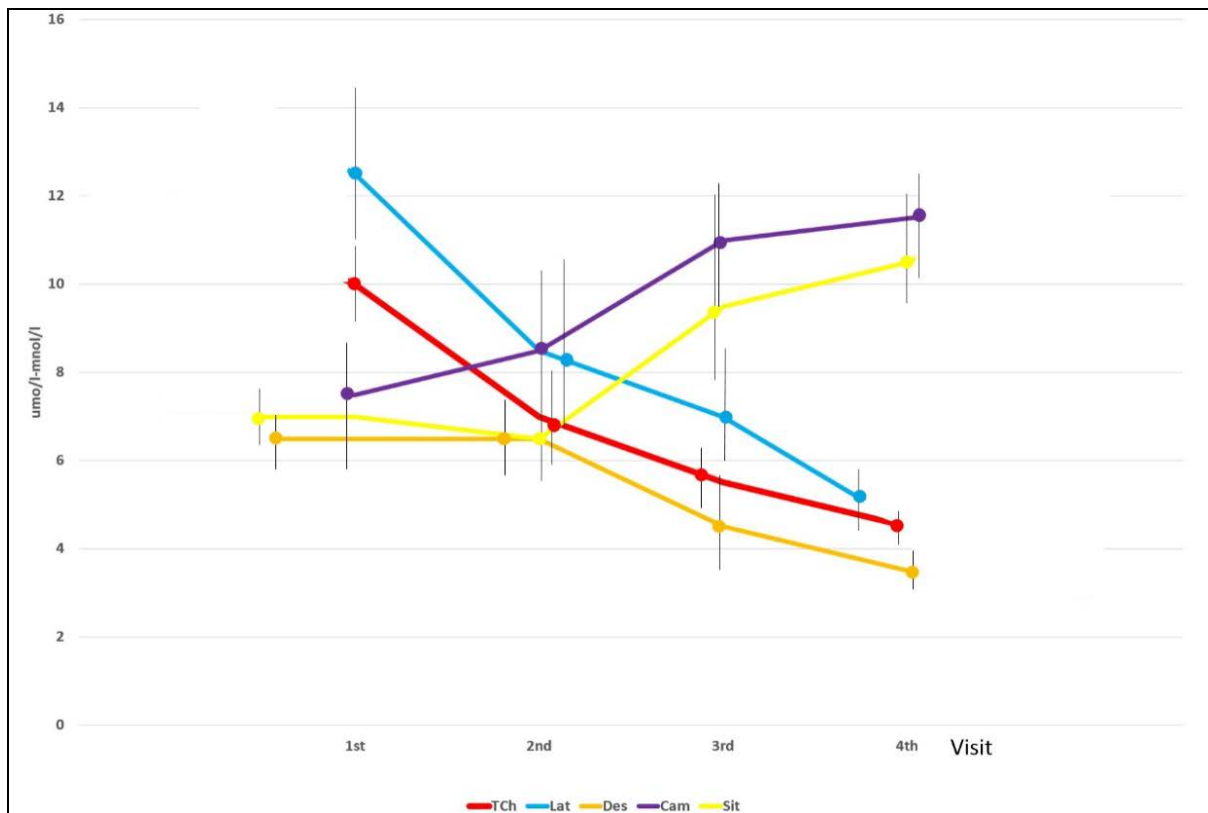


Fig. 3. Monitoring of TC and NCS levels in 25 selected HFH-Gen patients with highest TC levels where LDL-R mutations have not been proved.

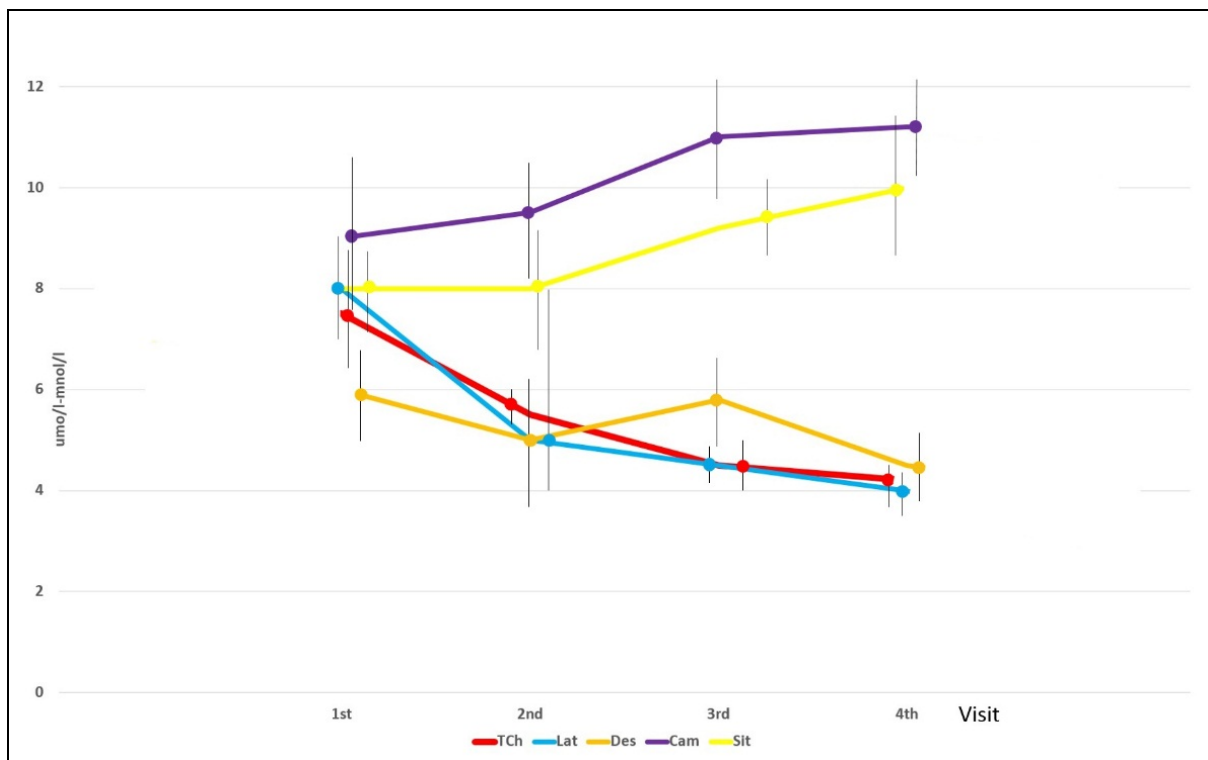
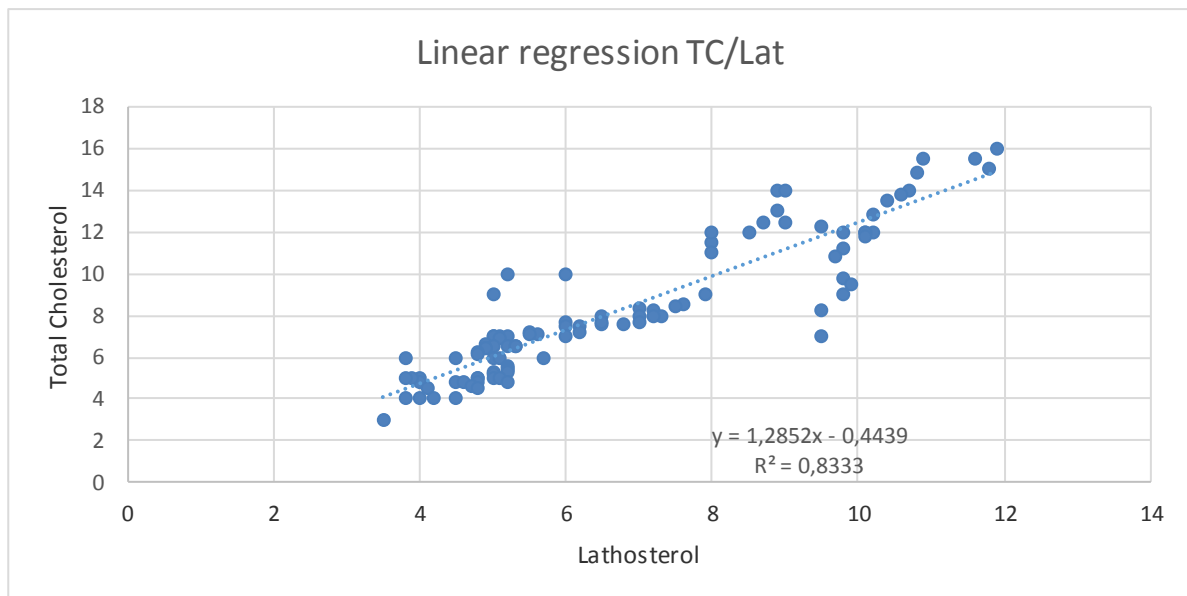
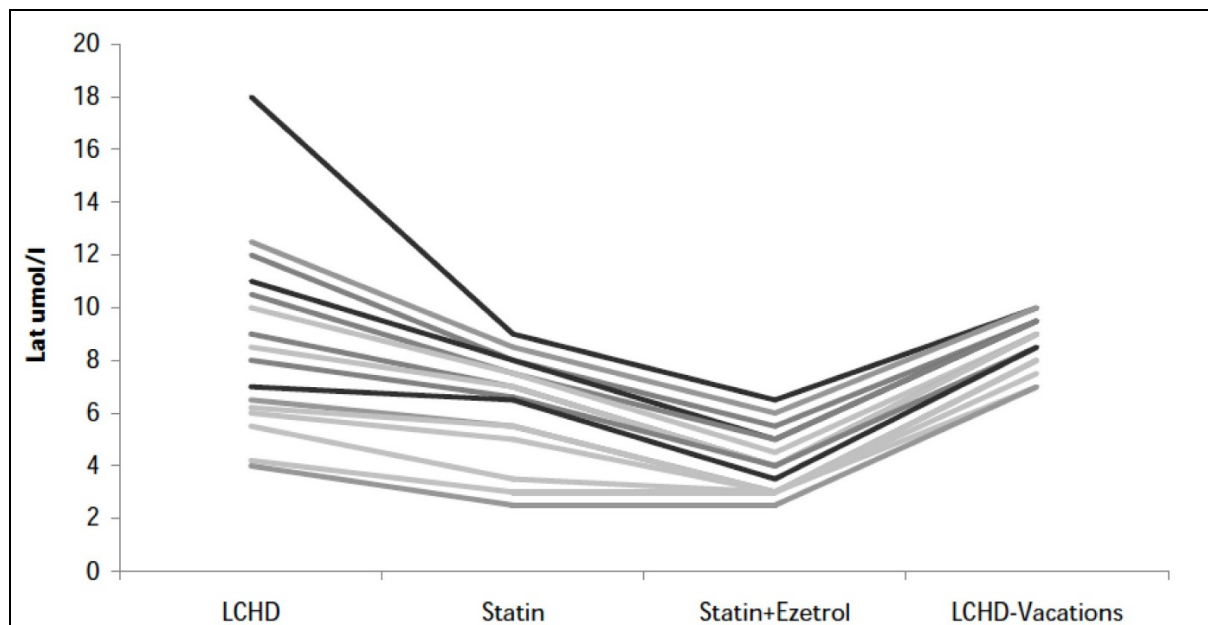


Fig. 4. Linear nregression for TC and Lat in 25 selected HFH-Gen patients.**Fig. 5. Summary of Lat changes in HFH children patients undergoing different types of therapy including medical therapy discontinuation during summer school holiday.**

e-mail: josef.hyanek@homolka.cz

NOVÁ PERORÁLNÍ ANTIDIABETIKA: KARDIOVASKULÁRNÍ ÚČINKY PODLE VÝSLEDKŮ STUDIÍ, MOŽNOSTI A OMEZENÍ V PRAXI

NEW ORAL GLUCOSE-LOWERING AGENTS: CARDIOVASCULAR EFFECTS ACCORDING TO RESULTS OF CARDIOVASCULAR TRIALS, POSSIBILITIES AND LIMITATIONS IN CLINICAL PRACTICE

M. Lejsková

Interní oddělení TN, Praha, IPVZ Praha

K hlavním příčinám morbidity a mortality diabetiků 2. typu patří, kromě tzv. pozdních komplikací diabetu souvisejících přímo s glykací, především kardiovaskulární onemocnění (CVD, Cardiovascular Disease). V průběhu posledních dvou dekád se podařilo dosáhnout postupného poklesu závažných kardiovaskulárních příhod (MACE, MAJOR Cardiovascular Events) především díky zlepšené kontrole ovlivnitelných rizikových faktorů, přesto je u diabetiků incidence KV (KardioVaskulárních) příhod i KV mortalita nadále podstatně vyšší než u nediabetických kontrol. Podle některých výsledků však klesla celková mortalita méně u diabetiků než u kontrol.¹ Ve vývoji morbidity a mortality na KV choroby a diabetes existují značné geografické rozdíly.²

Je známo, že přiměřeně těsnější kompenzace diabetu je asociována se snížením KV rizika^{3,4,5}, ale i skutečnost, že KV riziko z hypoglykemií narůstá při těsnější kompenzaci diabetu a může anulovat její KV prospěch.⁶ V míře KV rizika je důležité nejen aktuální docílení přiměřeně kompenzovaného diabetu, ale i setrvalost optimální kompenzace.⁷

Optimální volba antidiabetika ze stále zdokonalované palety antidiabetik s různými mechanismy účinku⁸ může nepochybně silně ovlivnit kardiovaskulární komplikace pacienta, a nejde přitom jen o riziko hypoglykemií: Po zveřejnění metaanalýzy, která ukázala kardiologická rizika thiazolidindionů, byla roku 2008 dle pokynů US Food and Drug Administration (FDA) zavedena pro Spojené státy povinnost prokázat KV bezpečnost u nových antidiabetik.⁹ Na rozdíl od farmakologických studií ověřujících bezpečnost a účinnost dávkování léku (2. a 3. fáze), byly nové, cíleně KV studie s novými antidiabetiky uspořádány především na co nejrychlejší ověření (časový medián zpravidla 1,5 - 3 roky) KV noninferiority na souboru diabetiků s pokročilou aterosklerózou a vyšším KV rizikem, **zpravidla v sekundární prevenci**. Nejsprávněji by proto měly být jejich výsledky **interpretovány jako důkaz KV bezpečnosti u takto kardiovaskulárně rizikových diabetiků**.¹⁰ V těchto studiích bývá primárním endpointem trojitý MACE (KV mortalita, nefatální infarkt myokardu, nefatální iktus) a sekundárními endpointy jsou tyto jednotlivé složky a smrt ze všech příčin. Někdy je uváděn tzv. rozšířený MACE (např. trojitý MACE + hospitalizace pro nestabilní anginu pectoris). Význam četnosti hospitalizací pro srdeční selhání (HF, Heart Failure) při antidiabetické farmakoterapii je stále naléhavější, ale dosavadní uspořádání studií tomuto problému nevěnovalo potřebnou pozornost.¹¹

Tento článek je zaměřen na dvě nové skupiny **perorálních** antidiabetik, (inhibitory DPP-4 a inhibitory SGLT-2), pro které jsou výsledky KV randomizovaných kontrolovaných studií (RCT) a které bývají nejčastěji zvažovány jako bezpečná léčba 2. volby po selhání léčby metforminem. Pro úplnost jsou uvedeny i výsledky studií 2. a 3. fáze klinického výzkumu necílených na KV endpoint, do nichž byli zařazeni méně rizikovití diabetici 2. typu.

Inhibitory DPP-4 (inhibitory DiPeptidyl Peptidázy-4) - -gliptiny

Charakteristika: DPP-4 štěpí dva střešní inkretinové hormony (GLP-1 a GIP), které glukózo-dependently stimulují sekreci inzulínu a snižují sekreci glukagonu, jejich účinek má

proto dobrý bezpečnostní profil (inhibitor DPP-4 přidaný k metforminu neohrožuje závažnou hypoglykemií na rozdíl od starších sekretagog), a proto byla očekávána KV bezpečnost. Předběžné studie ukázaly příznivé působení gliptinů na řadu KV rizikové faktory: snižují výrazněji postprandiální než lačnou glykémii, jejich působení na hmotnost i krevní tlak je neutrální až mírně příznivé, snižují i postprandiální lipemii, zánětlivé markery, oxidační stres a endoteliální dysfunkci u pacientů s diabetem 2. typu.^{12,13,14} Avšak DPP-4 je široce expri-mována ve většině buněk a tkání, kde enzymaticky působí proti desítkám peptidových hormonů a chemokinů a navíc působení některých méně selektivních DPP-4 inhibitorů může ovlivnit i jiné DPP – základní účinek inhibitorů DPP-4 vyplývající ze zpomalení inaktivace účinku GLP-1 a GIP může být dosti modifikován.^{15,16}

Několik analýz **randomizovaných studií 2. - 3. fáze** klinického výzkumu s inhibitory DPP-4 **nenalezlo** ani zvýšené KV ani riziko HF ve srovnání s placebem nebo jiným antidiabetikem: alogliptin,¹⁷ saxagliptin (v metaanalýze 20 studií se saxagliptinem dokonce pro HF se silným trendem k **nižší** incidenci: HR 0,55; CI 0,27 - 1,12),¹⁸ sitagliptin (neutralita k placebu, MACE superiorita k sekretagogu),¹⁹ linagliptin (superiorita pro rozšířený MACE, zejména ve srovnání s glimepiridem),²⁰ a vildagliptin.²¹ Jednalo se však o studie s krátkým trváním, se zařazením diabetiků s nízkým KV rizikem, které **nebyly** cíleny na posouzení KV příhod. Podobně neutrální KV výsledky měly inhibitory DPP-4 sumárně v metaanalýzách těchto studií.^{22,23} **KV studie porovnávající inhibitor DPP-4 s placebem** zařadily diabetiky 2. typu s vysokým KV rizikem, zpravidla s anamnézou CVD (tabulka 1), kteří dostávali i léčbu doporučenou pro sekundární KV prevenci (zejména statiny, antiagregancia, inhibitory renin-angiotenzinového systému, β -blokátory).

Ve studii **EXAMINE s alogliptinem** (tabulka 1) splnily přepokládanou noninferioritu nejen ve výsledcích primárního endpointu MACE i jeho složek (infarktu myokardu, iktu, KV mortality), ale i mortalitě ze všech příčin a noninferiorní byl i 5ti-složkový endpoint, který zahrnoval i koronární revaskularizaci a KV hospitalizaci.²⁴ Ve skupině s alogliptinem byl pozorován **trend** k častější hospitalizaci pro HF nedosahující významnosti, který neměl vliv na složený endpoint – kombinaci s KV úmrtím v post hoc analýze (HR 1,00; 95 % CI 0,82 - 1,21).²⁵

Rovněž ve studii **SAVOR-TIMI 53 se saxagliptinem** (tabulka 1) byla jednoznačně splněna noninferiorita pro primární trojitý endpoint MACE i jeho složky (stejně jako ve studii EXAMINE) i pro mortalitu ze všech příčin. Bezpečnost v tomto směru byla navíc prokázána u vysokého počtu starých a velmi starých účastníků.²⁶ Nebyla nalezena heterogenita účinku saxagliptinu na MACE nebo KV úmrtí podle výchozích kategorií HbA1c.²⁷ Přesto bylo významně více pacientů ve skupině se **saxagliptinem hospitalizováno pro HF** (3,5 % oproti 2,8 %, P = 0,007), které nebylo asociováno se zvýšením rizika KV smrti nebo celkové úmrtnosti a nezáviselo na věkové kategorii,²⁶ ani na vysokém počátečním HbA1c.²⁷ Toto zvýšení rizika HF bylo nejvýraznější u pacientů se vstupně zvýšenými hladinami natriuretických peptidů nebo s přítomnou CKD.²⁸

Ve studii **TECOS se sitagliptinem** (tabulka 1) byla jednoznačně splněna **noninferiorita** pro primární rozšířený endpoint MACE (o hospitalizaci pro nestabilní anginu pectoris) i pro jeho složky, pro mortalitu ze všech příčin, i pro trojitý endpoint MACE shodný s předchozími studii a mezi staršími pacienty. V kontrastu ke dvěma předchozím KV studiím s inhibitory DPP-4 byly plně noninferiorní i výsledky týkající se hospitalizací pro HF: **četnost hospitalizací pro HF se nelišila** mezi oběma skupinami - sitagliptinem a placebem, a riziko KV úmrtí v obou specifických podskupinách bylo očekávaně nižší u pacientů bez vstupní anamnézy HF.²⁹

Pro **vildagliptin nebyla** provedena ani naplánována žádná studie zaměřená na KV výsledek, k dispozici je tak pouze **retrospektivní metaanalýza prospektivně potvrzených**

kardiovaskulárních příhod s noninferiorními výsledky pro trojitý MACE i pro potvrzené HF²¹ a neintervenci kohortová studie „**real world**“ naznačující KV bezpečnost vildagliptinu v porovnání s jinými neinzulinovými antidiabetiky, včetně rizika HF.³⁰ Na srdeční selhání byla zaměřena studie **VIVID** (Vildagliptin ve Ventrikulární Dysfunkci Diabetes): ve srovnání s placebem vildagliptin neměl výraznější vliv na ejekční frakci levé komory, ale ve skutečnosti vedl ke zvýšení objemu levé komory - s nejasnou příčinou a klinickým významem.³¹

V nejbližší době jsou očekávány výsledky do určité míry unikátních studií **CARMELINA** (zařazení diabetici s pokročilejší CKD na rozdíl od výše zmíněných studií) a **CAROLINA** (komparátorem je glimepirid) s **linagliptinem**, což je jediný gliptin, jehož dávka není ovlivněna progresí CKD.

Závěrem k inhibitorům DPP-4: podle dosavadních studií je celkový KV bezpečnostní profil inhibitorů DPP-4/-gliptinů dobrý, i když jen **noninferiorní**. Výsledky platí i pro starší pacienty, pacienti s poškozením ledvin nebo diabetiky v sekundární prevenci CVD nebo s jinou příčinou vysokého kardiovaskulárního rizika.³² Mírně zvýšené riziko akutní pankreatitidy je minimální,³³ a není zvýšeno riziko rakoviny pankreatu.³⁴ Otazné je riziko hospitalizací pro **HF**, které bylo významné jen v jedné studii s DPP-4 inhibitory (SAVOR-TIMI 53), trend v jiné studii (EXAMINE), ale jednoznačná noninferiorita v další (TECOS) (tabulka 1). V experimentech byly hledány mechanismy pro nežádoucí účinky saxagliptinu na srdeční funkci,³⁵ autoři dokazují, že saxagliptin je schopen snížením obsahu Ca²⁺ v sarkoplazmatickém retikulu myocytu vést k **přetížení Ca²⁺ v diastole**, k systolické dysfunkci a k poruše kontraktility. Mechanizmy nebyly zkoumány pro další inhibitory DPP-4, podle dostupných dat však ani cílená metaanalýzy neprokázala statistický rozdíl mezi DPP-4 inhibitory.³⁶

Inhibitory SGLT-2 (Sodium-Glucose Linked coTransporter-2 Inhibitors) - -glifloziny

Charakteristika: Inhibitory SGLT-2 snižují glykemii navozením glukosurie nezávisle na hladině inzulínu – inhibicí kotransportéru pro sodík a glukózu v proximálních tubulech ledvin.⁴² V důsledku toho mají řadu potenciálně KV prospěšných účinků: glykosurií podporují úbytek hmotnosti, nevyvolávají hypoglykemii (míra účinku je závislá na glykemii, ale nezávislá na endogenní sekreci inzulínu), současně mají diuretický efekt se zvýšením natriurezy a s poklesem krevního tlaku, zvláště je i urikosurie. Limitující pro popsání účinek je pokročilejší CKD (**středně závažná až těžká**), ale samotný účinek inhibitorů SGLT-2 progresi CKD zpomaluje (viz nefroprotektce níže). Na zvýšení hematokritu se kromě hemokoncentrace (vyvolané osmotickou diurézou), může podílet i zvýšení erythropoézy, což může mít rovněž pozitivní KV účinky.⁴³ Kromě toho byla popsána a je dále studována řada dalších účinků, některé s nejasným KV vlivem, jiné (např. snížení albuminurie) zřejmě KV prospěšné. Podrobnosti přesahují rozsah tohoto článku.

Tabulka 1. Výsledky KV studií porovnávajících DPP-4 inhibitor s placebem (Zpracováno podle Scheen 2018)

Klinická studie	Denní dávka i-DPP-4*	I-DPP-4 vs placebo, n	KV sek. prev.	Medián sledování	Trojité MACE †	Infarkt myokardu	Iktus	KV mortalita	Celková mortalita	Hospitalizace pro HF
SAVORTIMI53 ³⁷	Saxagliptin 5 mg	8280 vs 8212	78%	2,1 roku	1,00 (0,89–1,12)	0,95 (0,80–1,12)	1,11 (0,88–1,39)	1,03 (0,87–1,22)	1,11 (0,96–1,27)	1,27 (1,07–1,51)
EXAMINE ^{25,38}	Alogliptin 25 mg	2701 vs 2679	100%	1,5 roku	0,96 (≤1,16)‡	1,08 (0,88–1,33)	0,91 (0,55–1,50)	0,85 (0,66–1,1)§	0,88 (0,71–1,09)	1,07 (0,79–1,46)
TECOS ³⁹	Sitagliptin 100 mg	7257 vs 7266	100%	3,0 roky	0,98 (0,89–1,08)	0,95(0,81–1,11)¶	0,97(0,79–1,19)¶	1,03 (0,89–1,19)	1,01 (0,90–1,14)	1,00 (0,83–1,20)

Výsledky jsou vyjádřeny poměrem rizika (s 95% intervalem spolehlivosti). KV kardiovaskulární; DPP-4, Dipeptidyl peptidáza-4; EXAMINE, Examination of Cardiovascular Outcomes: Alogliptin vs. Standard of Care in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Acute Coronary Syndrome; SAVOR-TIMI, Saxagliptin Assessment of Vascular Outcomes Recorded in Patients With Diabetes Mellitus-Thrombolysis in Myocardial Infarction 53; TECOS, Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes With Sitagliptin.

*Redukce denní dávky v případě snížení glomerulární filtrace.

†Kardiovaskulární úmrtí, infarkt myokardu nebo iktus. Ve studii TECOS rozšířen o hospitalizaci pro nestabilní anginu pectoris.

‡Horní hranice jednostranného intervalu spolehlivosti.

§K úmrtím z primárního endpointu jsou zahrnuta úmrtí po příhodách z primárního endpointu.

¶Včetně úmrtí na infarkt myokardu resp. iktus.

Tabulka 2. Výsledky KV studií porovnávajících inhibitor SGLT-2 s placebem

Klinická studie	Denní dávka i-SGLT-2	I-SGLT-2 vs placebo, n	KV sek. prev	Medián sledování	Trojité MACE †	Infarkt myokardu¶	Iktus¶	KV mortalita	Celková mortalita	Hospitalizace pro HF
EMPA-REG OUTCOME ⁴⁰	Empagliflozin 10 nebo 25 mg	4687 vs 2333	99%	3,1	0,86 (0,74–0,99) p=0,04	0,87 (0,70–1,09)	1,18 (0,89–1,56)	0,62 (0,49–0,77) P<0,001	0,68 (0,57–0,82) P<0,001	0,65 (0,50–0,85) p=0,002
CANVAS ⁴¹	Canagliflozin 100; 300 mg	5795 vs 4347	65%	2,4	0,86 (0,75–0,97) p=0,02	0,89 (0,73–1,09)	0,87 (0,69–1,09)	0,87 (0,72–1,06)	0,87 (0,74–1,01)	0,67 (0,52–0,87) p=0,002

Výsledky jsou vyjádřeny poměrem rizika (s 95% intervalem spolehlivosti). KV kardiovaskulární; SGLT-2, sodíko-glukózový kotransportér 2.typu; CANVAS Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study; CVD-REAL, Comparative Effectiveness of Cardiovascular Outcomes in New Users of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors; EMPAREG OUTCOME, EMPAgliflozin Cardiovascular OUTCOME Events in Type 2 Diabetes Mellitus Patients;

†Kardiovaskulární úmrtí, infarkt myokardu nebo iktus.

¶Včetně úmrtí na infarkt myokardu resp. iktus.

Několik analýz **randomizovaných studií 2. až 3. fáze (RCT)** s inhibitory SGLT-2 (kanagliflozinem^{44,45} dapagliflozinem⁴⁶ a empagliflozinem⁴⁷) vykazovalo nevýznamný trend k **nižší** incidenci MACE ve srovnání s placebem nebo s jinými antidiabetiky. Tyto relativně krátké studie zařazovaly většinou pacienty v primární prevenci KV chorob, protože nebyly určeny k testování KV rizika. Při nízkém počtu MACE v jednotlivých studiích nedosáhly statistické významnosti. Avšak v **metaanalýze** těchto RCT bylo nalezeno významné **snížení KV i celkové mortality, snížení incidence infarktu myokardu a hospitalizací pro HF**.⁴⁸

KV studie porovnávací inhibitor SGLT2 s placebem probíhaly několik let, sledovány byly velké soubory diabetiků 2. typu s vysokým KV rizikem - zpravidla s anamnézou CVD (tabulka 2).

Ve studii **EMPA-REG OUTCOME** s **empagliflozinem** byly nalezeny **superiorní** výsledky nejen pro trojitý MACE, ale pro oba mortalitní endpointy spolu se snížením hospitalizací pro HF o třetinu (0,65; 0,50 - 0,85; p = 0,002 - tabulka 2), - tento efekt nastoupil časně, již během prvního půl roku. Příznivý vliv empagliflozinu na kombinovaný endpoint (KV úmrtí + hospitalizace pro HF) byl konzistentní ve 3 skupinách podle míry 5-letého rizika HF.⁴⁹ Navíc byla prokázána **nefroprotektivita**: snížení zhoršení nefropatie (0,61; 0,53 - 0,70), snížení progresu makroalbuminurie (0,62; 0,54 - 0,72), snížení zdvojnásobení sérového kreatininu... (0,56; **0,39 - 0,59**) a snížení nutnosti dialýzy (0,45; 0,21 - 0,97).⁵⁰

Program **CANVAS** zahrnuje data ze dvou studií (**CANVAS** a **CANVAS-R** [Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study-Renal]) zahrnujících celkem 10 142 pacientů s diabetem (tabulka 2) a vysokým KV rizikem (jen 65 % mělo anamnézu CVD). **Superiorní** výsledky kanagliflozinu pro trojitý MACE (při nižší četnosti příhod) a pro snížení hospitalizací pro srdeční selhání byly téměř shodné s EMPAREG, ale snížení úmrtnosti, zejména KV, bylo pouze mírné a nedosáhlo statistické významnosti. Byla rovněž prokázána **nefroprotektivita** - podobná empagliflozinu: snížení progresu albuminurie (0,73; 0,67 - 0,79), snížení trojitého renálního endpointu (zahrnujícího ≥ 40 % snížení eGFR, nutnost hemodialýzy, úmrtí z renálních příčin; 0,60; 0,47 - 0,77).⁴¹ Adaptivní návrh programu CANVAS s různými populacemi v CANVAS a CANVAS-R byl kritizován, ale přes určité slabiny v návrhu programu CANVAS není možné vznést pochybnosti k interpretaci dat.

Očekávány jsou výsledky dalších dvou KV studií s SGLT2 inhibitory: studie **VERTIS-CVOT** s **ertugliflozinem** (100 % diabetiků v sekundární prevenci) a rozsáhlá studie **DECLARE TIMI-58** s **dapagliflozinem** (většina vstupujících diabetiků v primární prevenci - jejich výsledky ukáží, zda se i u KV méně rizikových diabetiků uplatní KV výhody SGLT2 inhibitorů).

Pro dapagliflozin jsou k dispozici výsledky velmi rozsáhlých studií „reálné praxe“ **CVD-REAL** (glifloziny, převážně dapagliflozin, s aktivními komparátory): ukázaly stejný vliv gliflozinů jako KV randomizované studie nejen na hospitalizaci pro HF, ale i na MACE. Pouze dapagliflozin byl zkoumán ve studii **CVD-REAL Nordic** (aktivní komparátor pouze inhibitor DPP-4), která našla navíc vysoce významné snížení **mortality ze všech příčin** (0,44; 0,33 - 0,60; p < 0,001).⁵¹

Individuální přístup: inhibitor DPP-4 nebo SGLT-2?

Z hlediska kardiologa je po selhání léčby metforminem u diabetika v sekundární prevenci se zvýšeným rizikem HF lékem 2. volby k metforminu nepochybně inhibitor SGLT2, a to (podle dosud publikovaných KV studií) empagliflozin, který měl z gliflozinů přesvědčivější mortalitní výsledky (tabulka 2) (nebo liraglutid, agonista GLP-1 receptorů).⁵² Ve skupině agonistů GLP-1 receptorů mají podobně příznivé výsledky jako empagliflozin na mortalitu a MACE jen **některé** (liraglutid, studie LEADER; semaglutid, studie SUSTAIN-6), tyto léky je však nutno aplikovat injekčně, jsou ekonomicky náročnější a postrádají míru snížení rizika

HF typickou pro inhibitory SGLT-2 (nicméně KV výsledky dalších, např. dulaglutidu, jsou očekávány).⁵³

Z hlediska diabetologa je užití SGLT-2 inhibitorů v praxi často komplikováno skutečností, že klesá antidiabetický účinek úměrně poklesu eGFR, a **nejso indikovány u pacientů se středně závažnou až těžkou poruchou funkce ledvin**. (SGLT-2 inhibitory patří k ekonomicky náročným antidiabetikům, proto je tato kontraindikace sledována i zdravotními pojišťovny.) **Naopak inhibitory DPP-4** mohou být do léčby zařazeny bez ohledu na funkci ledvin za předpokladu, že je denní dávka upravena podle eGFR. Za poslední dekádu jsou s nimi poměrně široké klinické zkušenosti a mohou být bezpečně použity u křehkých starších pacientů s vyšším rizikem hypoglykemie nebo dehydratace.⁵⁴

V reálné praxi má právě řada diabetiků s pokročilým CVD a/nebo HF také středně závažné zhoršení funkce ledvin, které kontraindikuje zahájení nebo pokračování léčby inhibitory SGLT-2. Pro diabetologa v této situaci, kdy musí být postupně redukována i dávka metforminu, je přínosné zařazení inhibitoru DPP-4 s jednoznačnou KV noninferiorností (např. sitagliptin, studie TECOS, tabulka 1), s úpravou denní dávky podle eGFR. V této situaci by indikace vhodného **agonisty GLP-1 receptorů** - s průkazem KV superiority a s průkazem bezpečnosti při středně závažné a těžké poruše funkce ledvin - mohla být **kardiologicky přínosnější, navíc diabetologicky bezpečná** z hlediska hypoglykemií a změn hmotnosti na rozdíl od sekretagog nebo inzulinoterapie, přestože z hlediska praxe jde o injekční a navíc ekonomicky nejnáročnější variantu. Tento přístup doporučují aktuální standardy České Diabetologické Společnosti: ... U vybraných skupin nemocných by mělo být vždy zváženo antidiabetikum s prokázáním příznivým efektem na danou komorbiditu, tj u osob s vysokým kardiovaskulárním rizikem – empagliflozin a/nebo liraglutid a u osob s rizikem srdečního selhání - empagliflozin nebo canagliflozin.⁵⁵

Literatura

1. **Rawshani A, Franzén S, Eliasson B, et al.** N Engl J Med 2017; 376: 1407-1418.
2. **Gregg EW, Sattar N, Ali MK, et al.** Lancet Diabetes Endocrinol 2016; 4: 537-547.
3. **Ray KK, Seshasai SR, Wijesuriya S, et al.** Lancet 2009 23; 373: 1765-1772.
4. **Turnbull FM, Abraira C, Anderson RJ, et al.** Diabetologia 2009; 52: 2288-2298.
5. **Hemmingsen B, Lund SS, Gluud C, et al.** Cochrane Database Syst Rev 2013; 11: CD008143.
6. **Boussageon R1, Bejan-Angoulvant T, Saadatian-Elahi M, et al.** BMJ 2011; 343: d4169
7. **Roussel R, Steg PG, Mohammedi K, et al.** Diabetes Obes Metab 2018; 20: 238-244.
8. **Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S.** Lancet 2014; 383: 1068-1083.
9. **Goldfine AB.** N Engl J Med 2008; 359: 1092-1095.
10. **Scheen AJ.** Circ Res 2018; 122: 1439-1459.
11. **Greene SJ, Vaduganathan M, Khan MS, et al.** J Am Coll Cardiol 2018; 71: 1379-1390.
12. **Nauck MA, Meier JJ, Cavender MA, et al.** Circulation 2017; 136: 849-870.
13. **Scheen AJ.** Nat Rev Cardiol 2013; 10: 73-84.
14. **Ussher JR, Drucker DJ.** Circ Res 2014; 114: 1788-1803.
15. **Mulvihill EE, Drucker DJ.** Endocr Rev 2014; 35: 992-1019.
16. **Avogaro A, Fadini GP.** Br J Clin Pharmacol 2018; 84: 1686-1695.
17. **White WB, Pratley R, Fleck P, et al.** Diabetes Obes Metab 2013; 15: 668-673
18. **Iqbal N, Parker A, Frederich R, et al.** Cardiovasc Diabetol 2014; 13: 33.
19. **Engel SS, Golm GT, Shapiro D, et al.** Cardiovasc Diabetol. 2013; 12: 3.
20. **Johansen OE, Neubacher D, von Eynatten M, et al.** Cardiovasc Diabetol 2012; 11: 3.
21. **McInnes G, Evans M, Del Prato S, et al.** Diabetes Obes Metab 2015; 17: 1085-1092.
22. **Monami M, Ahrén B, Dicembrini I, et al.** Diabetes Obes Metab 2013; 15: 112-120.
23. **Xu S, Zhang X, Tang L, et al.** Postgrad Med 2017; 129: 205-215.

24. Shimada YJ, Cannon CP, Liu Y, et al. *Am Heart J* 2016; 175: 18-27.
25. Zannad F, Cannon CP, Cushman WC, et al. *Lancet* 2015; 385: 2067-2076.
26. Leiter LA, Teoh H, Braunwald E, et al. *Diabetes Care* 2015; 38: 1145-1153.
27. Cavender MA, Scirica BM, Raz I, et al. *Am J Med* 2016; 129: 340.e1-8.
28. Scirica BM, Braunwald E, Raz I, et al. *Circulation* 2014; 130: 1579-1588.
29. Sharma A, Green JB, Dunning A, et al. *Diabetes Care* 2017; 40: 1763-1770.
30. Williams R, de Vries F, Kothny W, et al. *Diabetes Obes Metab* 2017; 19: 1473-1478.
31. McMurray JJV, Ponikowski P, Bolli GB, et al. *JACC Heart Fail* 2018; 6: 8-17
32. Abbas AS, Dehbi HM, Ray KK. *Diabetes Obes Metab* 2016; 18: 295-299.
33. Tkáč I, Raz I. *Diabetes Care* 2017; 40: 284-286.
34. Overbeek JA, Bakker M, van der Heijden AAWA, et al. *Diabetes Metab Res Rev* 2018; 34: e3004.
35. Koyani CN, Kolesnik E, Wölkart G, et al. *Biochem Pharmacol* 2017; 145: 64-80.
36. Verma S, Goldenberg RM, Bhatt DL, et al. *CMAJ Open* 2017; 5: E152-E177.
37. Scirica BM, Bhatt DL. *N Engl J Med* 2013; 369: 1317-1326.
38. White WB, Cannon CP, Heller SR, et al. *N Engl J Med* 2013; 369: 1327-1335.
39. Green JB, Bethel MA, Armstrong PW, et al. *N Engl J Med* 2015; 373: 232-242.
40. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. *N Engl J Med* 2015; 373: 2117-2128.
41. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, et al. *N Engl J Med* 2017; 377: 644-657.
42. Abdul-Ghani MA, Norton L, Defronzo RA. *Endocr Rev* 2011; 32: 515-531.
43. Sano M, Takei M, Shiraishi Y, Suzuki Y. *J Clin Med Res* 2016; 8: 844-847.
44. **Food and Drug Administration:** Center for Drug Evaluation and Research.
Canagliflozin (Invokana): Summary Review (Application Number: 204042Orig1s000).
45. Tang H, Fang Z, Wang T, et al. *Am J Cardiol* 2016; 118: 1774-1780.
46. Sonesson C, Johansson PA, Johnsson E, et al. *Cardiovasc Diabetol* 2016; 15: 37.
47. Salsali A, Kim G, Woerle HJ, et al. *Diabetes Obes Metab* 2016; 18: 1034-1040.
48. Savarese G, D'Amore C, Federici M, et al. *Int J Cardiol* 2016; 220: 595-601.
49. Fitchett D, Butler J, van de Borne P, et al. *Eur Heart J* 2018; 39: 363-370.
50. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, et al. *N Engl J Med* 2016; 375: 323-334.
51. Persson F, Nyström T, Jørgensen ME, et al. *Diabetes Obes Metab* 2018; 20: 344-351.
52. **American Diabetes Association.** 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: *Diabetes Care* 2018; 41: S73-S85. <https://doi.org/10.2337/dc18-S008>
53. Tanaka A, Node K. *Cardiovasc Diabetol* 2018; 17: 85.
54. Scheen AJ. *Expert Opin Drug Saf* 2015; 14: 505-524.
55. http://www.diab.cz/dokumenty/standard_lecba_dm_typ_II.pdf

ASOCIACE POLYMORFISMŮ DESATURÁZ MASTNÝCH KYSELIN S KARDIOMETABOLICKÝMI RIZIKOVÝMI FAKTORY

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS OF FATTY ACID DESATURASES AND CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS

J. Macásek¹, B. Staňková^{1,2}, M. Jáchymová², M. Vecka^{1,2}, M. Zeman¹, E. Tvrzická^{1,2},
A. Žák¹

^{1/4}. interní klinika, ^{2/}ÚKBLD 1. LF UK a VFN v Praze

Abstract

Cardiometabolic diseases (CMD) are responsible for high morbidity and mortality. There are many risk factors playing role in the development of CMD. The change of fatty acid profile is involved and lipogenic enzymes take part. Lipogenic enzymes, stearoyl-coenzyme A-desaturase (SCD-1), delta-5 desaturase and delta-6 desaturase, are related to risk factors and to CMD (metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus). Estimated activity of these enzymes is influenced by the single-nucleotide polymorphism (SNP) of their genes (*SCD-1*, *FADS1*, *FADS2*, respectively) with consequences for the development of CMD. We tried to analyze associations between SNPs of these genes and particular anthropometric and laboratory parameters. The study population consisted of 555 subjects with average age of 49,7. Subjects were divided into three groups: 87 healthy subjects, 193 patients with metabolic syndrome and 275 subjects with at least one risk factor but without metabolic disease. We demonstrated no significant association between SNPs of *FADS1* and risk factors. We proved significant correlations of some SNPs of *FADS2* and *SCD-1* genes with examined anthropometric (e.g. BMI) and laboratory parameters (e.g. LDL-C concentration, uric acid level, insulinaemia). Results of our pilot study are in concordance with previous studies but there is still need to continue our studies.

Úvod

Kardiovaskulární a metabolická (KM) onemocnění způsobují značnou celkovou mortalitu a morbiditu. Samotná kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou zodpovědná za polovinu úmrtí v zemích západního světa. U pacientů, kteří mají současně kardiovaskulární i metabolické onemocnění (např. diabetes mellitus 2. typu) je riziko mortality 2x až 4x vyšší, než kdyby měli metabolické onemocnění samotné (Betteridge, 2011). Vzhledem k těmto okolnostem je důležité identifikovat rizikové faktory, které jsou zodpovědné za rozvoj KM. Rizikovými faktory KM jsou rodinná anamnéza KM onemocnění, nedostatečná fyzická aktivita, metabolický syndrom, porušená glukózová tolerance, hypertriacylglycerolémie (hyperTAG) a nízká hodnota HDL-cholesterolu (Jia et al., 2007; Xu et al., 2012; Xu et al., 2013). Kardiometabolická onemocnění jsou charakterizována poklesem koncentrace vícenenasycených mastných kyselin (PUFA) a zvýšením koncentrací nasycených (SFA) a monoenasycených mastných kyselin (MUFA). Klíčovou desaturázou katalyzující vznik mononenasycených mastných kyselin (MUFA) je stearoyl-CoA desaturáza-1 (SCD-1), známá též jako delta-9 desaturáza (D9D).

Stearoyl-CoA desaturáza-1 je klíčovým enzymem endogenní lipogeneze MUFA. Gen pro SCD-1 je lokalizován na chromosomu 10 (Paton a Ntambi, 2009). Vyšší aktivita SCD-1 je asociována s obezitou, diabetes mellitus 2. typu (DM2T) či zánětlivými reakcemi. Vzhledem k tomu to faktu se jeví jako vhodný terapeutický terč zásahů k zamezení progresu obezity, T2DM, steatózy jater a aterosklerózy. Inhibice SCD-1 zlepšuje insulinovou senzitivitu, snižuje množství lipidů v hepatocytech, redukuje množství tukové tkáně a působí

preventivně před vznikem dietou navozené obezity u potkanů. Některé inhibitory SCD-1 byly již testovány jako potencionální léčiva. Kromě těchto pozitivních faktů však přetrvávají i kontroverze. Nadměrná inhibice SCD-1 může vést k akumulaci nasycených mastných kyselin (SFA), což představuje rizikový faktor působení inhibitorů SCD-1. Není ani mnoho studií, které by hodnotily bezpečnost a efektivitu léčby těmito inhibitory. Monitorace množství palmitolejové společně s olejovou kyselinou, což jsou dva hlavní produkty působení SCD-1, může posloužit jako indikátor ovlivnění SCD-1. Aktivita SCD-1, potažmo její úloha v různých patologických procesech, je ovlivněna jednonukleotidovými polymorfismy jejího genu (single-nucleotide polymorphism-SNP). Tyto polymorfismy byly sledovány u obezity, metabolického syndromu a dalších KM rizikových faktorů. Švédští autoři zjistili, že běžná alela (AA) rs3701 a minoritní alela rs379367 jsou asociovány se zvýšenou D9D aktivitou (měřenou poměrem 16:1n-7/16:0), a tyto polymorfismy jsou rizikové u mužů s nízkým příjmem PUFA (Byberg et al., 2014). Vztahy polymorfismů *SCD-1* k riziku vzniku DM2 byly studovány od 2004 a mezi první zjištění patřila hraniční asociace mezi rs41290540 a DM2T ($p = 0.06$). U DM byla zjištěna vyšší frekvence minoritní alely (Liew et al., 2004). Další švédští autoři popsali významnou asociaci minoritních alel čtyř polymorfismů *SCD-1* (rs10883463, rs7849, rs2167444, rs508384) s nižším BMI, menším obvodem pasu a nižší inzulinovou rezistencí. Nicméně i přes předpoklad nižší aktivity D9D u nosičů minoritních alel v porovnání s nosiči alel běžných, nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl (Warensjö et al., 2007). V další práci byla popsána asociace některých polymorfismů *SCD-1* (rs508384, rs3071, rs3829160) s kardiometabolickými rizikovými faktory (TAG, CRP, IL-6 a koncentrace glukózy) stejně jako s aktivitou D9D (rs2234970). Byla pozorována signifikantní interakce pro rs508384, příjem PUFA n-3 a změnu glykémie (Rudkowska et al., 2014).

Mezi další savčí desaturázy patří delta-5 desaturáza (D5D) a delta-6 desaturáza (D6D). Mezi esenciální PUFA patří kyseliny linolová a α -linolenová, které podstupují přeměnu na PUFA s dlouhým řetězcem v reakcích katalyzovaných elongázami a desaturázami, jmenovitě delta-6 desaturázou a delta-5 desaturázou. Desaturázy jsou významným regulátorem koncentrace PUFA a MUFA, hrající důležitou roli ve fyziologických i patofyziologických procesech. Obě desaturázy jsou hlavními endogenními determinanty hladiny PUFA. Aktivity D6D a D9D (*SCD-1*) pozitivně korelují s hladinou insulinu, triacylglycerolu (TAG), koncentrací LDL-C, insulinovou rezistencí (HOMA-IR), a predikují vznik metabolického syndromu a DM2T, zatímco D5D vykazuje opačnou korelaci (Steffen et al., 2008; Zhou et al., 2009; Choi et al., 2014; Žák et al., 2016). Aktivita D5D (vypočtená jako D5D index) byla inverzně asociována s BMI (Murakami et al., 2008; Wolters et al., 2015) a hodnotami krevního tlaku (Murakami et al., 2008; Kim et al., 2015).

Přímé měření aktivity desaturáz je obtížné především z etického hlediska, proto se k jejímu určení užívá poměr produkt/substrát. K určení aktivity D6D (tzv. D6D index) se užívá poměr těchto mastných kyselin: 20:3n-6/18:2n-6, a k určení aktivity D5D (D5D index) poměr těchto kyselin 20:4n-6/20:3n-6 (Warensjö et al., 2008).

Delta-6 desaturáza i D5D jsou membránově vázané enzymy, které katalyzují rychlost určující reakci v syntéze endogenních PUFA s dlouhým řetězcem. Expres desaturáz D5D a D6D je řízena geny *FADS1/FADS2* (*fatty acid desaturase*) (Nakamura a Nara, 2004; Guillou et al., 2010). Geny kódující *FADS1* a *FADS2* jsou lokalizovány na chromosomu v clusteru 11q12–13.1 (Dumont et al., 2011), v literatuře existuje i údaj o chromosomu 3 (Li et al., 2016). Ve stejném clusteru je i gen pro *FADS3*, jehož úloha není plně objasněna (Li et al., 2016). *FADS3* vykazuje 52 % a 62 % sekvenční homologii s *FADS1* respektive *FADS2*, což je důsledek genové duplikace (Marquardt et al., 2000). Předpokládá se, že geny řídící aktivity genů *FADS1,2* a *SCD1* mají pleiotropní funkce. Je známo, že jednonukleotidové polymorfismy (SNP) genů *FADS* určují plasmatickou koncentraci mastných kyselin (PUFA) a jejich zastoupení v různých tkáních a buňkách (Cormier et al., 2012; Hong et al. 2013; Harslof et

al., 2013), což následně ovlivňuje fyziologické i patologické reakce prostřednictvím syntézy různě působících eikosanoidů (prostaglandinů, tromboxanů, resolvinů atd), dále prostřednictvím jejich signálních funkcí, např. jsou ligandy PPAR- α a ovlivňují expresi lipoproteinové lipázy a apolipoproteinu A-I, A-II a C-III, ovlivňují i koncentrace lipidů, především HDL-cholesterol (Vu-Dac et al., 1994; Vu-Dac et al., 1995; Hertz et al. 1995). Například polymorfismus *FADS1* označený jako rs174546 má silný vliv na množství jednotlivých zástupců PUFA v plazmě. Nosiči minoritní alely T rs174546 mají sníženou funkci D5D, což vede ke zvýšení množství prekurzorových zástupců PUFA n-6 i n-3 (LA a DGLA, ALA), zatímco množství kyseliny arachidonové (ARA) a eikosapentaenové (EPA) je sníženo (Bokor et al., 2010). Tito nosiči T alely vykazovali ve studii velkého autorského kolektivu (Teslovich et al., 2010) nižší koncentrace HDL a LDL-cholesterolu a vyšší hladiny triacylglycerolů. Autoři Lu et al. zjistili v Doetinchem Cohort Study, že koncentrace celkového cholesterolu (TC) je signifikantně ovlivněna rs174546 genotypem. Alela C rs174546 byla asociována s vyšší hladinou TC (Lu et al., 2010). Lidé s TT genotypem rs174546 měli nižší hladinu LDL-cholesterolu a nižší poměr LDL-C/TC (Sone et al., 2013). Polymorfismus rs174576 *FADS2* podobně jako výše uvedený polymorfismus *FADS1* koreluje s koncentrací LDL-cholesterolu, HDL-cholesterolu a triacylglycerolů (Kathiresan et al., 2009; Nakayama et al., 2010; Hellstrand et al., 2012).

Geny *FADS* se staly cílem přirozené selekce u různých lidských populací (Buckley et al., 2017). V jedné studii bylo prokázáno, že africká populace má vyšší frekvenci alel asociovaných s účinněji fungujícími desaturázami (Mathias et al., 2011; Mathias et al., 2012). U inuitské populace byly naopak prokázány dva SNP v genu *FADS2* (rs7115739 a rs174570), které jsou odpovědné za sníženou aktivitu desaturázy a s tím související nižší endogenní syntézu PUFA s dlouhým řetězcem, protože tato populace jich má dostatek v přijímané potravě, a naopak potřebuje spíše PUFA se středně dlouhým řetězcem. Stejná studie prokázala, že výše uvedené polymorfismy jsou asociovány se snížením váhy, výšky, nižší sérovou koncentrací insulinu a LDL cholesterolu nalačno (Fumagalli et al., 2015). Jednonukleotidové polymorfismy genů *FADS1* a *FADS2* korelují s výskytem mnoha chorob (kardiovaskulární, jaterní, alergická, ADHD atd.). Dle autorů Li a kol. mají probandi s alelou rs174460 C vyšší kardiovaskulární riziko než probandi s T alelou. U jiného SNP polymorfismu označeného jako rs174537 jsou nosiči alely T v nižším kardiovaskulárním riziku než nosiči polymorfismu rs174537 G (Li et al., 2013). Genomové studie lidí upozornily též na to, že polymorfismy genů *FADS1* a *FADS2* ovlivňují metabolismus glukózy a lipidů, včetně hladiny celkového a LDL-cholesterolu, a jsou tak asociovány s metabolickým syndromem, dyslipidemií a ischemickou chorobou srdeční (Dixon et al., 2007; Tanaka et al., 2009).

Cílem pilotní studie bylo zjistit asociaci vybraných polymorfismů tří desaturáz a kardiometabolických rizikových faktorů (KM RF).

Materiál a metody

Studovaná skupina sestávala z 555 osob (269M/286F) středního věku [49,7 (36,0 - 62,4), roky, medián (25. – 75. percentil)]. Skupina zahrnovala 87 kontrolních osob (38M/49F); 193 osob s metabolickým syndromem (105M/88F) a 275 osob s alespoň jedním KM RF (126M/149F). Všechny osoby byly klinicky i antropometricky vyšetřeny. Tělesná hmotnost, výška, obvod pasu, obvod paže a tloušťka čtyř kožních řas byly stanoveny v souladu s doporučenými postupy na konferenci v Arlie (Lohman 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 (Durnin a Womersley, 1974).

Odběr žilní krve byl prováděn po celonočním 12 hodinovém lačnění do dvou odběrových zkumavek BD Vacutainer® EDTA pro separaci plazmy. Z jedné zkumavky byla do 30 minut po odběru centrifugací při 3500 rpm při 4° C po dobu 10 minut separována plazma, která byla následně rozdělena na několik alikvotů. Vzorky pro rutinní biochemické analýzy byly zpracovány ihned, pro další analýzy byly skladovány při -80° C. Druhá zkumavka pro následnou izolaci DNA byla skladována při 4° C, vlastní izolace musela být provedena do 3 týdnů po odběru.

Koncentrace celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu, triacylglycerolů, kyseliny močové, a glukózy byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickými metodami (CHOD/PAP, přímá homogenní enzymaticko-kolorimetrická reakce bez precipitace, GPO/PAP, urikáza/PAP, GOD-PAP, Lachema a.s. Brno). Koncentrace apolipoproteinů A1 a B100 byly stanoveny nefelometricky pomocí diagnostického setu Beckman Coulter. Neesterifikované mastné kyseliny byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickou metodou (NEFA, Randox Labs). Inzulín byl stanoven RIA metodou s použitím monoklonálních protilátek (Insulin IRMA, Imunotech) a hsCRP byl stanoven imunochemickou metodou ELISA (Human hsCRP ELISA, BioVendor-Laboratorní medicína, a.s.).

Vzorky DNA byly z leukocytů periferní krve izolovány modifikovanou vysolovací metodou (Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research* 1988; 16: 1215). U všech sledovaných osob byly vyšetřeny jednonukleotidové polymorfismy genů – *FADS1*, *FADS2* a *SCD-1*. Genetické analýzy [FADS1 (rs174537, rs174545, rs174546), FADS2 (rs174570, rs174575, rs174602, rs174589, rs968567), SCD1 (rs2167444, rs508384, rs7849, rs55710213, rs56334587)] byly uskutečněny pomocí PCR-RFLP a přímého sekvenování. Finální detekce fragmentů byla provedena pomocí elektroforézy (3 % agarózový gel) s přidavkem ethinium bromidu a vizualizací pod UV lampou.

Ke statistickému zpracování dat byl použit software STATISTICA 12.0 (Stat Soft, ČR).

Výsledky

Klinické a biochemické parametry jsou uvedeny v tabulce 1 a všechny tři skupiny se mezi sebou v téměř všech parametrech lišily. Skupina metabolického syndromu měla signifikantně významné zvýšení prakticky ve všech sledovaných parametrech v porovnání jak s kontrolami, tak i s non-MS skupinou. Skupina non-MS měla signifikantně vyšší hodnoty mnoha parametrů v porovnání s kontrolami. Asociace mezi *FADS2* a *SCD1* a znaky metabolického syndromu jsou prezentovány v tabulce 2. Žádný z vyšetřovaných KM RF nebyl asociován s polymorfismy *FADS1*. Polymorfismus rs174575 (*FADS2*) byl asociován s koncentrací apoB (cut-off $\geq 1,23$ g/l), apo AI (cut-off $\leq 1,26$ g/l) a urikémií u mužů (cut-off ≥ 420 $\mu\text{mol/l}$).

Polymorfismy rs 2167444 (*SCD1*) byly asociovány s obezitou (BMI $\geq 30,0$ kg/m²), zvýšením procentuálního podílu tuku (adjustovaného na věk a pohlaví dle tab. 3), koncentrací LDL-C (cut-off $\geq 4,10$ mmol/l), hs-CRP (cut off ≥ 3 mg/l) a urikémií u žen (cut-off ≥ 340 $\mu\text{mol/l}$). Dále jsme prokázali vazbu rs55710231 a rs56334583 s urikémií u žen, arteriální hypertenzí u obou pohlaví, inzulinémií (cut-off $\geq 24,9$ $\mu\text{U/ml}$) a koncentrací hs-CRP (cut-off ≥ 3 mg/l) taktéž u obou pohlaví. U ostatních vyšetřovaných polymorfismů nebyly prokázány signifikantní asociace s vyšetřovanými parametry.

Závěry

V pilotní, explorativní studii jsme našli významné asociace analyzovaných polymorfismů *FADS2* a *SCD1* k některým antropometrickým ukazatelům (BMI, podíl tuku), koncentracím lipidových parametrů (LDL-C, apo B a apoA1), kyseliny močové, hladině insulínu, hodnotám krevního tlaku a subklinickému zánětu. Zjištěné vztahy, kromě neprokázání asociace

polymorfismů *FADS1* s rizikovými faktory kardiovaskulárních chorob v naší studii, jsou v souladu s výsledky ostatních autorů a budou předmětem dalšího výzkumu.

Tabulka 1 Klinická a biochemická charakteristika sledovaných skupin

Parametr	KON	non-MS	MS
Počet (%)	87 (15/7)	275 (49/5)	193 (34/8)
Počet muži/ženy	38/49	126/149	105/88
Věk (roky)	41 ± 18	48 ± 16 ^{***}	56 ± 12 ^{***,+++}
STK (mm Hg)	117 ± 9	129 ± 16 ^{***}	139 ± 16 ^{***,+++}
DTK (mm Hg)	75 ± 6	82 ± 10 ^{***}	89 ± 9 ^{***,+++}
Hypertenze (%)	0 (0)	142 (51,6)	170 (88,1)
BMI (kg/m ²)	22,6 ± 2,6	26,5 ± 4,3 ^{***}	31,3 ± 5,0 ^{***,+++}
Obvod pasu (cm)	78,1 ± 8,0	90,4 ± 12,9 ^{***}	104,3 ± 11,0 ^{***,+++}
Hmotnost tuku (kg)	16,4 ± 5,1	24,9 ± 8,4 ^{***}	34,4 ± 10,2 ^{***,+++}
TC (mmol/l)	5,17 ± 1,17	5,7 ± 1,4 ^{**}	5,92 ± 1,99 ^{***}
TG (mmol/l)	0,88 (0,74-1,07)	1,32 (0,96-1,89) ^{***}	2,09 (1,59-3,06) ^{***,+++}
HDL-C (mmol/l)	1,66 ± 0,35	1,49 ± 0,39 ^{***}	1,29 ± 0,35 ^{***,+++}
LDL-C (mmol/l)	2,96 ± 1,01	3,31 ± 1,09 [*]	3,29 ± 0,99 ^{**}
ApoA1 (g/l)	1,50 ± 0,23	1,44 ± 0,28	1,36 ± 0,30 ^{***,++}
ApoB-100 (g/l)	0,96 ± 0,28	1,15 ± 0,37 ^{***}	1,30 ± 0,36 ^{***,+++}
NEMK (mmol/l)	0,47 (0,35-0,63)	0,49 (0,33-0,69)	0,56 (0,41-0,76) ^{*,++}
Glukosa (mmol/l)	4,6 ± 0,5	4,9 ± 0,9 ^{**}	5,8 ± 1,6 ^{***,+++}
HOMA-IR (index)	1,18 (0,90-1,77)	1,67 (1,21-2,47) ^{***}	3,07 (1,95-4,90) ^{***,+++}
Insulin (μU/ml)	5,9 (4,5-8,2)	7,8 (5,8-11,1) ^{***}	12,4 (8,3-17,6) ^{***,+++}
hs-CRP (mg/l)	2,0 (1,0-4,2)	2,5 (1,0-4,4)	3,4 (2,0-6,3) ^{***,+++}
Urikémie (μmol/l)	278 ± 66	307 ± 83 ^{**}	350 ± 82 ^{***,+++}

Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka pro parametrické veličiny nebo medián (dolní a horní kvartil) pro neparametrické veličiny. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly zkoumány pomocí jedno-faktorové ANOVY s Neuman-Keulsovým post-testem, pro neparametrickou analýzu byla použita Kruskal-Wallisova ANOVA. * non-MS, MS vs. KON, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; + non-MS vs. MS, + $P < 0,05$; +++ $P < 0,001$.

Zkratky: KON – skupina zdravých osob; non-MS – osoby s alespoň jednou komponentou MS; MS – metabolický syndrom; STK – systolický tlak krve; DTK – diastolický tlak krve; BMI – body mass index; TC – celkový cholesterol; TG – triglyceridy; HDL-C – cholesterol v HDL, LDL-C – cholesterol v LDL; apo – apolipoprotein; NEMK – neesterifikované mastné kyseliny; HOMA-IR – index insulinové rezistence; hs-CRP – vysoce sensitivní C-reaktivní protein.

Tabulka 2 Průměrné hodnoty doporučeného množství tělesného tuku (v procentech)

Věk	Ženy	Muži
20 - 24	25,0	19,0
25 - 29	25,4	20,3
30 - 34	26,4	21,5
35 - 39	27,7	22,6
40 - 44	29,3	23,6
45 - 49	30,9	24,5
50 - 59	33,1	25,6
60 a více	34,0	26,2

Tabulka 3 Asociace mezi FADS2 a SCD1 a znaky metabolického syndromu

			FADS 2	SCD 1		
Znak	Cut-off	Pohlaví	rs174575	rs2167444	rs55710213	rs56334587
Hypertenze		M/Ž	ns	ns	$\chi^2=8,622^{**}$ (genotyp)	$\chi^2=8,622^*$ (genotyp)
BMI	30 kg/m ²	M/Ž	ns	$\chi^2=6,443^*$ (genotyp)	ns	ns
% tuku	dle tab. 2b	M/Ž	ns	$\chi^2=7,331^*$ (genotyp)	ns	ns
LDL-C	4,10 mmol/l	M/Ž	ns	$\chi^2=6,806^*$ (genotyp) $\chi^2=6,889^{**}$ (alely)	ns	ns
ApoB	1,23 g/l	M/Ž	$\chi^2=6,01^*$ (genotyp)	ns	ns	ns
ApoA1	1,26 g/l	M/Ž	$\chi^2=7,110^*$ (genotyp) $\chi^2=4,547^*$ (alely)	ns	ns	ns
Kyselina močová	420 μ mol/l	M	$\chi^2=6,061^*$ (genotyp)	ns	ns	ns
Kyselina močová	340 μ mol/l	Ž	ns	$\chi^2=0,904^*$ (genotyp) $\chi^2=6,431^{**}$ (alely)	$\chi^2=8,107^*$ (genotyp) $\chi^2=7,564^{**}$ (alely)	$\chi^2=8,107^*$ (genotyp) $\chi^2=7,564^{**}$ (alely)
Insulin	24,9 μ U/ml	M/Ž	ns	ns	$\chi^2=14,016^{***}$ (genotyp)	$\chi^2=14,016^{***}$ (genotyp)
hs-CRP	3 mg/l	M/Ž	ns	$\chi^2=3,935^*$ (alely)	$\chi^2=6,615^*$ (genotyp)	$\chi^2=6,615^*$ (genotyp)

χ^2 – test; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Zkratky: BMI – body mass index; LDL-C – cholesterol v LDL; apo – apolipoprotein; hs-CRP – vysoce sensitivní C-reaktivní protein; M – muži; Ž – ženy; ns – nesignifikantní.

Studie byla podpořena projekty RVO-VFN64165/2012, MPO-FV10380 a PROGRES Q25/LF1/2

Literatura

- Betteridge DJ.** Lipid control in patients with diabetes mellitus. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 278-290.
- Bokor S, Dumont J, Spinneker A, et al.** Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. *J Lipid Res* 2010; 51: 2325-2333.
- Buckley MT; Racimo F, Allentoft ME, et al.** Selection in Europeans on fatty acid desaturases associated with dietary changes. *Mol Biol Evol* 2017; 34: 1307-1318.
- 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.
- Cormier H, Rudkowska I, Paradis AM, et al.** Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. *Nutrients* 2012; 4: 1026-1041.
- Dixon AL, Liang L, Moffatt MF, et al.** A genome-wide association study of global gene expression. *Nat Genet* 2007; 39: 1202-1207.
- Dumont J, Huybrechts I, Spinneker A, et al. and HELENA Study group.** FADS1 Genetic Variability Interacts with Dietary α -Linolenic Acid Intake to Affect Serum Non-HDL-Cholesterol Concentrations in European Adolescents. *J Nutr* 2011; 141: 1247-1253.
- Durnin JV, Womersley J.** Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974; 32: 77-97.
- Fumagalli M, Moltke I, Grarup N, et al.** Greenlandic Inuit show genetic signatures of diet and climate adaptation. *Science* 2015; 349: 1343-1347.
- Guillou H, Zadavec D, Martin PG, Jacobsson A.** The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 2010; 49: 186-199.
- Harslof LB, Larsen LH, Ritz C, et al.** FADS genotype and diet are important determinants of DHA status: a cross-sectional study in Danish infants. *Am J Clin Nutr* 2013; 97: 1403-1410.
- Hellstrand S; Sonestedt E; Ericson U, et al.** Intake levels of dietary long-chain pufas modify the association between genetic variation in FADS and LDL-C. *J Lipid Res* 2012; 53: 1183-1189.
- Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J.** Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem* 1995; 270: 13470-13475.
- Hong SH, Kwak JH, Paik JK, et al.** Association of polymorphisms in FADS gene with age-related changes in serum phospholipid polyunsaturated fatty acids and oxidative stress markers in middle-aged nonobese men. *Clin Interv Aging* 2013; 8: 585-596.
- Choi YS, Jang HB, Park JY, et al.** Associations between estimated desaturase activity and insulin resistance in Korean boys. *Osong Public Health Res Perspect* 2014; 5: 251-257.
- Jia WP, Pang C, Chen L, et al.** Epidemiological characteristics of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in a Chinese adult population: the Shanghai diabetes studies, a cross-sectional 3-year follow-up study in Shanghai urban communities. *Diabetologia* 2007; 50: 286-292.
- Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, et al.** Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009; 41: 56-65.

- Kim SR, Jeon SY, Lee SM.** The association of cardiovascular risk factors with saturated fatty acids and fatty acid desaturase indices in erythrocyte in middle-aged Korean adults. *Lipids Health Dis* 2015; 14: 133.
- Li SW, Wang J, Yang Y, et al.** Polymorphisms in FADS1 and FADS2 alter plasma fatty acids and desaturase levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *J Transl Med* 2016; 14: 79.
- Li SW, Lin K, Ma P, et al.** FADS gene polymorphisms confer the risk of coronary artery disease in a Chinese Han population through the altered desaturase activities: based on high-resolution melting analysis. *Plos One* 2013; 8: e55869.
- Liew CF, Groves CJ, Wiltshire S, et al.** Analysis of the contribution to type 2 diabetes susceptibility of sequence variation in the gene encoding stearoyl-CoA desaturase, a key regulator of lipid and carbohydrate metabolism. *Diabetologia* 2004; 47: 2168-2175.
- Lochman T, Roche A, Martorel R.** (eds). Standardization of anthropometric measurements. Champaign: Human Kinetics Publishers, 1989, 39-80.
- Lu Y, Feskens EJ, Dolle ME, et al.** Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid intake interacts with FADS1 genetic variation to affect total and HDL-cholesterol concentrations in the Doetinchem Cohort Study. *Am J Clin Nutr* 2010; 92: 258-265.
- Marquardt A, Stohr H, White K, Weber BH.** cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics* 2000; 66: 175-183.
- Mathias RA, Sergeant S, Ruczinski I, et al.** The impact of FADS genetic variants on ω 6 polyunsaturated fatty acid metabolism in African Americans. *BMC Genetics* 2011; 12: 50-50.
- Mathias RA, Fu W, Akey JM, et al.** Adaptive evolution of the FADS gene cluster within Africa. *PLoS One* 2012; 7: e44926.
- Murakami K, Sasaki S, Takahashi Y, et al.** Lower estimates of delta-5 desaturase and elongase activity are related to adverse profiles for several metabolic risk factors in young Japanese women. *Nutr Res* 2008; 28: 816-824.
- Nakamura MT, Nara TY.** Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24: 345-376.
- Nakayama K, Bayasgalan T, Tazoe F, et al.** A single nucleotide polymorphism in the FADS 1/ FADS 2 gene is associated with plasma lipid profiles in two genetically similar Asian ethnic groups with distinctive differences in lifestyle. *Hum Genet* 2010; 127: 685-690.
- Paton CM, Ntambi JM.** Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E28-E37.
- 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.
- Sone Y, Kido T, Ainuki T, et al.** Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster are associated with plasma LDL cholesterol levels in Japanese males. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2013; 59: 325-335.
- Steffen LM, Vessby B, Jacobs DR Jr, et al.** Serum phospholipid and cholesteryl ester fatty acids and estimated desaturase activities are related to overweight and cardiovascular risk factors in adolescents. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 1297-1304.
- Tanaka T, Shen J, Abecasis GR, et al.** Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI study. *Plos Genetics* 2009; 5: e1000338.
- Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al.** Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010; 466: 707-713.
- Voruganti VS, Higgins PB, Ebbesson SO, et al.** Variants in CPT1A, FADS1, and FADS2 are associated with higher levels of estimated plasma and erythrocyte delta-5 desaturases in Alaskan Eskimos. *Front Genet* 2012; 3: 86.

- Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, et al.** Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J Biol Chem* 1994; 269: 31012-31018.
- Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, et al.** Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 1995; 96: 741-750.
- Wang L, Athinarayanan S, Jiang G, et al.** Fatty acid desaturase 1 gene polymorphisms control human hepatic lipid composition. *Hepatology* 2015; 61(1) :119-128.
- 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.
- Warensjö E, Sundström J, Vessby B, et al.** Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 203-209.
- Wolters M, Schlenz H, Bornhorst C, et al.** Desaturase activity is associated with weight status and metabolic risk markers in young children. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 3760-3769.
- Xu FX, Zhou X, Shen F, et al.** Decreased peripheral blood mitochondrial DNA content is related to HbA1c, fasting plasma glucose level and age of onset in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2012; 29: E47-54.
- Xu Y, Wang L, He J, et al.** Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. *JAMA* 2013; 310: 948-959.
- Zhou YE, Egeland GM, Meltzer SJ, Kubow S.** The association of desaturase 9 and plasma fatty acid composition with insulin resistance-associated factors in female adolescents. *Metabolism*. 2009; 58: 158-166.
- Žák A, Slabý A, Tvrzická E, et al.** Desaturázy mastných kyselin: patofyziologie a klinický význam. *Cas Lek ces* 2016; 155: 15-21.

VLIV LIPOTOXICITY NA RENÁLNÍ DYSFUNKCE U MODELU METABOLICKÉHO SYNDROMU

THE EFFECT OF LIPOTOXICITY ON RENAL DYSFUNCTION IN MODEL OF METABOLIC SYNDROME

H. Malínská¹, M. Hüttl¹, I. Marková¹, O. Oliyarnyk¹, P. Kačer², L. Kazdová¹

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

²Biocev, Univerzita Karlova, Praha

Úvod

Chronické onemocnění ledvin (CKD) není jen prekurzorem závažného poškození ledvin, ale je rovněž důležitým rizikovým faktorem rozvoje kardiovaskulárního onemocnění. Recentní výsledky populačních studií ukázaly, že CKD bylo spojeno se zvýšeným výskytem celkové mortality, předčasné smrti, poškozením kognitivních funkcí i nižší celkovou kvalitou života. Epidemiologické studie upozorňují, že renální dysfunkce začínají ještě před nástupem hypertenze nebo manifestací diabetu 2. typu. Výsledky prospektivní desetileté studie na více jak 6000 respondentech prokázaly, že přítomnost metabolického syndromu i inzulinové resistance jsou nezávislými prediktory CKD. Osoby s metabolickým syndromem v této studii vykazovali zhoršenou glomerulární filtraci u 35 % subjektů. Úzký vztah mezi zvýšenou incidencí CKD při metabolickém syndromu může být dán společnými patofyziologickými mechanismy.

Důležitými rizikovými faktory zhoršení glomerulární filtrace i progresu CKD jsou hyperinzulinémie i samotná inzulinová resistance, která hraje centrální roli v patogenezi metabolického syndromu. Přestože ledviny nepatří k tradičním inzulin-senzitivním tkáním, inzulin má v ledvinách řadu důležitých metabolických i regulačních funkcí. Vedle příjmu glukózy do buněk, inzulin reguluje glomerulární funkce, tubulární transport iontů, působí preventivně na apoptózu a vykazuje antinatriuretický efekt v distálních tubulech. Renální inzulinová resistance vede rovněž ke zvýšení glukoneogeneze a může tak přispívat k rozvoji hyperglykémie. Až 25 % glukózy je tímto mechanismem uvolňováno do cirkulace.

K rozvoji renálních dysfunkcí spojených s metabolickým syndromem a prediabetem mohou přispívat kromě dyslipidémie také ektopické ukládání lipidů a jejich toxických metabolitů i poruchy metabolismu lipidů. Většina dosavadních studií je však více zaměřena na úlohu lipoproteinů a jejich metabolismu ve vztahu k renálním dysfunkcím. Na poškození funkce ledvin se může podílet též produkce prozánětlivých a profibrotických cytokinů sekretovaných z tukové tkáně, které mohou přímo poškozovat ledvinové buňky i potencovat inzulinovou rezistenci. Patofyziologické mechanismy vzniku a rozvoje zhoršené funkce ledvin při metabolickém syndromu nejsou plně objasněny.

Cíl

Cílem studie bylo sledovat projevy lipotoxicity v ledvinách v průběhu stárnutí u modelu metabolického syndromu - hereditárně hypertriglyceridemických (HHTg) potkanů ve srovnání se stejně starými kontrolními potkany Wistar. Hodnoty mikroalbuminurie byly srovnávány s analýzami močové proteomiky.

Metodika

HHTg i kontrolní potkani Wistar krmění standardní dietou byly sledovány v průběhu stárnutí ve věku 3, 12 a 20 měsíců. Mikroalbuminurie byla stanovena HPLC metodou, močová proteomika hmotnostní spektroskopií MS/MS. Relativní exprese zánětlivých cytokinů byly stanoveny metodou kvantitativní PCR (Life Technologies).

Výsledky

Hypertriglyceridémie u HHTg potkanů byla spojena s chronicky zvýšenými hladinami NEMK během OGTT i v průběhu 24 hodinového sledování. Kromě kvantitativního zvýšení hladin NEMK u HHTg potkanů (+80 %; $p < 0.01$) byly rovněž pozorovány kvalitativní změny profilu mastných kyselin v lipidové třídě NEMK, představované zvýšeným zastoupením satureovaných ($p < 0.05$) a snížením zastoupení n3-polynenasycených ($p < 0.01$) mastných kyselin, zejména kyselin 20:4n3 a 22:5n3. Ektopická akumulace lipidů – triglyceridů (+30 %; $p < 0.05$) i cholesterolu (+10 %) v ledvinách HHTg potkanů byla s postupujícím věkem doprovázena výrazným nárůstem hodnot mikroalbuminurie ($p < 0.001$), přestože v mladém věku 3 měsíců HHTg potkani mikroalbuminurii nevykazovali. Histologické vyšetření ledvin prokázalo přítomnost depozit neutrálních lipidů distribuovaných v tubulech i glomerulech ledvin HHTg potkanů.

Detailní proteomická analýza moče odhalila zvýšení prozánětlivých markerů (MCP-1; IL-6 a IL-8; $p < 0.01$) spolu se snížením epidermálního růstového faktoru (EGF; $p < 0.01$) (tabulka 1) a to ještě před nástupem mikroalbuminurie. Akumulace lipidů v ledvinách u HHTg potkanů byla rovněž spojena se zvýšením relativní exprese mRNA prozánětlivého cytokinu MCP-1 ($p < 0.01$), relativní exprese IL-6 v ledvinách se výrazně zvyšovala ($p < 0.01$) s postupujícím věkem zvířat. Naproti tomu v perirenální tukové tkáni nebyla pozorována zvýšená exprese těchto prozánětlivých cytokinů, navzdory stoupající hmotnosti perirenální tukové tkáně ($p < 0.01$) u HHTg potkanů.

Tabulka 1 Proteomické markery v moči

	W - 3m	HHTg - 3m	W - 20m	HHTg - 20m	P skupina
malondialdehyd	23.3 ± 0.7	25.4 ± 1.5	25.0 ± 0.9	27.8 ± 1.2	n.s.
8-isoprostan	22.8 ± 1.6	26.2 ± 1.6	22.6 ± 1.6	25.3 ± 1.6	n.s.
4-hydroxynonenal	15.7 ± 1.0	19.8 ± 0.6	16.0 ± 1.9	21.2 ± 0.6	< 0.01
IL-6	48.7 ± 1.4	82.3 ± 4.2	53.7 ± 0.7	81.3 ± 4.8	< 0.001
IL-8	20.9 ± 1.7	44.9 ± 1.6	25.9 ± 1.6	44.6 ± 1.8	< 0.001
MCP-1	1.7 ± 0.1	3.4 ± 0.2	2.0 ± 0.1	3.3 ± 0.2	< 0.001
EGF	4.7 ± 0.3	2.0 ± 0.2	4.8 ± 0.2	2.0 ± 0.1	< 0.001
α1-antitrypsin	12.1 ± 0.7	22.0 ± 1.3	14.1 ± 1.0	21.7 ± 1.5	< 0.001
heparansulphate	0.07 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.30 ± 0.01	< 0.05

Hodnoty udávají průměr ± SE, počet zvířat ve skupině 8-10

Diskuze

V patofyziologii rozvoje renálních dysfunkcí při metabolickém syndromu se uplatňují multifaktoriální mechanismy. Podílet se mohou inzulinová rezistence, hypertenze, dyslipidémie, aktivace zánětlivých a profibrotických procesů i zvýšený oxidační stres. V mechanismu negativního účinku akumulace lipidů v ledvinách se můžou významně uplatnit FFA vázané na albumin, které jsou filtrovány přes glomeruly a přeměňují se na toxické metabolity. Podocyty jsou velmi citlivé zejména k negativnímu účinku satureovaných mastných kyselin. Lipotoxické intermediáty (diacylglyceroly a ceramidy), které

vznikají z triglyceridů i FFA, interferují s inzulínovou signální kaskádou, tím ji poškozují a mohou tak přispívat k rozvoji inzulínové rezistence. Na zvýšené akumulaci lipidů v ledvinách se mohou podílet také abnormality a poruchy lipidového metabolismu, které poškozují ledvinový parenchym, např. zvýšená exprese lipogenního enzymu SCD nebo transkripčního faktoru SREBP-1c.

Metabolický syndrom je provázen mikrovaskulárními poruchami, které se v souvislosti s renálními dysfunkcemi projevují zejména mikroalbuminurií. Stanovení mikroalbuminurie patří mezi hojně používaný, citlivý parametr včasné detekce rizika rozvoje CKD, ale nejedná se o ukazatel specifický a jeho stanovení má své limity. Pacienti s mikroalbuminurií mají 5x vyšší riziko rozvoje nezvratného selhání ledvin, ale na druhou stranu mohou mít diabetičtí pacienti závažnou poruchu glomerulární filtrace bez projevů proteinurie. Panel močových peptidů a proteinů by tak mohl odhalit toto riziko s větší přesností a citlivostí. Zatím jediná větší klinická studie CKD-273 odhaduje vysoce rizikové pacienty na základě proteomické analýzy 273 močových peptidů. Tato studie identifikovala zejména specifické fragmenty kolagenu jako nejdůležitější ukazatele včasného odhalení rizika ledvinového poškození. Dalšími vhodnými diagnostickými a prognostickými markery mohou být zánětlivé a fibrotické cytokiny, které prokázala i naše studie s HHTg potkany. Prozánětlivý MCP-1 je aktivován NFκB a sekretován glomerulárními i tubulárními epiteliálními buňkami. Zvýšená vazba MCP-1 na heparan sulfát - proteoglykan extracelulární matrix, může ovlivnit zánětlivou odpověď tím, že aktivuje tyto buňky ke zvýšené expresi MCP-1 a L-selektinu.

Močová proteomika odráží nejen poškození ledvin ale také vaskulárního systému, neboť močový proteom pochází ze 70 % z ledvinové tkáně a ze 30 % z krevní plazmy. Výsledky močové proteomiky se mohou uplatnit také jako možné kardiovaskulární rizikové parametry.

Závěr

Výsledky potvrzují významnou úlohu dyslipidémie a ektopického ukládání lipidů v rozvoji renálního poškození při metabolickém syndromu. Sledování zánětlivých cytokinů v moči by se mohlo uplatnit jako včasný ukazatel renálních dysfunkcí spojených s metabolickým syndromem.

Podpořeno MZ ČR - RVO („IKEM, IČ 0023001)

Literatura

- Artunc F, Schleicher E, Weigert C, et al.** Nat Rev Nephrol 2016; 12: 721-737.
Guebre-Egziabher F, Alix PM, Koppe L, et al. Biochimia 2013; 95: 1971-1979.
Huh JH, Yadav D, Kim JS, et al. Metabolism 2017; 67: 54-61.
Christou GA, Kiortsis DN. J Endocrinol 2017; 221: R49-R61.
Izquierdo-Lahuerta A, Martínez-García C, Medina-Gómez G. J Nephrol 2016; 29: 603-610.
Joyce T, Chirino YI, Natalia MT, Jose PC. Eur J Pharmacol 2018; 818: 554-568.
Sieber J, Jehle AW. Front Endocrinol (Lausanne) 2014; 5: 186.
Zhang X, Lerman LO. Translational Research 2017; 183: 14-25.

NOVÉ ADIPOCYTOKINY U MODELU INZULINOVÉ REZISTENCE A METABOLICKÉHO SYNDROMU

NEW ADIPOKINES IN THE MODEL OF INSULIN RESISTANCE AND METABOLIC SYNDROME

I. Marková, H. Malínská, M. Hüttl, L. Kazdová

Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Úvod

Tuková tkáň je kromě zásobárny energie také aktivní endokrinní orgán, ve kterém se tvoří a sekretuje řada bioaktivních mediátorů – adipocytokinů, které mají různé biologické funkce a účinky (1). Tuková tkáň prostřednictvím své metabolické aktivity ovlivňuje lipidový a glukózový metabolismus, zánět, angiogenezi, chuť k jídlu, energetickou homeostázu i inzulínovou senzitivitu tkání (2). Zatím asi nejvýraznější vztah k inzulínové senzitivitě byl pozorován u adiponektinu, který má protizánětlivé, antioxidantní, antiaterogenní účinky a zvyšuje citlivost tkání k účinku inzulínu. V poslední době bylo identifikováno několik nových adipocytokinů, jejichž sekrece a vztah k rozvoji inzulínové rezistence (IR) a dyslipidémie, ani jejich přesné funkce nejsou zcela objasněny.

Cílem naší práce bylo sledovat plasmatické hladiny nových adipocytokinů - zejména chemerinu, omentinu, vaspinu a obestatinu u modelu metabolického syndromu (MS) a porovnat je s tradičními parametry inzulínové senzitivity, zejména s adiponektinem.

Materiál a metody

Pokusy jsme prováděli na potkaních samcích kmene hereditárně hypertriglyceridemického potkana (HHTg), který je využíván jako neobézní model MS. Kontrolní skupinu (K) tvořili samci kmene Wistar. Potkany jsme krmili standardní dietou, v každé skupině bylo 8 zvířat. Parametry jsme sledovali ve věku 3, 12 a 20 měsíců (3M, 12M, 20M).

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). Plasmatické hladiny adipocytokinů byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA kity. Rezistence svalové (bránice) a epididymální tukové tkáně k účinku inzulínu byla sledována podle bazální a inzulínem stimulované inkorporace ($250 \mu\text{U/ml}$) $^{14}\text{C-U}$ -glukózy do glykogenu a lipidů *ex vivo*.

Výsledky a diskuse

S přibývajícím věkem potkanů se u obou kmenů zvyšovala relativní hmotnost epididymální tukové tkáně, která je ukazatelem viscerální obezity, sérové hladiny TAG, NEMK i inzulínu, přičemž nárůst těchto parametrů byl výraznější u kmene HHTg potkanů (tabulka 1). Pokročilý věk byl u obou kmenů doprovázen zvýšeným ektopickým ukládáním TAG do jater a kosterního svalu (tabulka 2). Koncentrace TAG v obou tkáních byly výrazně vyšší u HHTg potkanů. Na zvýšeném ektopickém ukládání TAG se významně podílí dyslipidémie, která doprovází metabolický syndrom u kmene HHTg.

Bazální, nestimulovaná inzulínová senzitivita svalu byla u HHTg potkanů snížena oproti kontrolám (K vs. HHTg 3M: 799 ± 78 vs. 408 ± 49 , 12M: 805 ± 43 vs. 309 ± 31 , 20M: 593 ± 68 vs. 279 ± 65 nmol glukózy/g/2 hod, vliv kmene $p < 0,01$). S postupujícím věkem potkanů citlivost svalu k účinku inzulínu klesala jak u HHTg, tak i kontrolních potkanů (vliv věku $p < 0,01$). Snížená inzulínová senzitivita kosterního svalu může souviset se zvýšeným

ektopickým ukládáním TAG, jejichž nadměrné množství poškozuje tkáň a vede k její dysfunkci. V řadě studií bylo u lidí a zvířat opakovaně prokázáno silné propojení mezi nadměrnou akumulací lipidů a IR (3-5). TAG v kosterním svalu snižují vychytávání a utilizaci glukózy, podílí se na zhoršení inzulinové signalizace a rozvoji IR (6).

Dále jsme se v naší studii zaměřili na tukovou tkáň, která hraje klíčovou roli v rozvoji MS. V tukové tkáni u mladých kontrolních potkanů inzulin zvýšil inkorporaci radioaktivně značené glukózy do lipidů o 115 %, u HHTg potkanů o 88 %. Tuková tkáň 12-ti měsíčních HHTg potkanů a 20-ti měsíčních kontrolních i HHTg potkanů byla již téměř rezistentní k účinku inzulinu (vliv kmene $p < 0,05$; vliv věku $p < 0,01$). IR tukové tkáně je u HHTg potkanů významně akcelerovaná.

V plasmě i ve svalu obou kmenů potkanů došlo s postupujícím věkem k poklesu koncentrace adiponektinu (tabulka 3) (pokles ve svalu u K o 31 %, u HHTg o 37 %, vliv věku $p < 0,01$). Tento nálezn je v souladu s výsledky studií, ve kterých byly nalezeny snížené hladiny adiponektinu u diabetiků 2. typu (DM2), obézních a osob s IR. V nedávné době bylo dokonce publikováno, že adiponektin se podílí na regulaci signalizace dlouhověkosti a o adiponektinových receptorech se uvažuje jako o klíčových faktorech zdravé dlouhověkosti (7). Hladiny nových adipocytokinů chemerinu a omentinu s přibývajícím věkem mírně klesaly a nelišily se mezi kmény (tabulka 3). Chemerin je protein s pleiotropními účinky, kromě stimulace zrání a diferenciacie adipocytů reguluje také imunitní odpověď. Vysoké koncentrace chemerinu byly pozorovány u obézních a hypertenzních osob a DM2 (8). Hladiny chemerinu se však u pacientů s MS mění, dokonce se liší během dne (9). Hladiny omentinu jsou na rozdíl od koncentrací chemerinu u pacientů s IR a DM2 snížené (10). Omentin má protizánětlivé a antiaterogenní účinky a reguluje inzulinovou senzitivitu a metabolismus glukózy (11).

Koncentrace dalších adipokinů-leptinu, obestatinu a vaspinu stoupaly se stárnutím zvířat a byly vyšší u HHTg potkanů. O leptinu je známo, že ovlivňuje příjem potravy a energetický výdej a tím reguluje tělesnou hmotnost. Také obestatin reguluje příjem potravy a tělesnou hmotnost, ale jeho biologické efekty nejsou zatím zcela známy i díky krátkému biologickému poločas (12). Je to nedávno objevený peptid s pleiotropními účinky v různých buňkách a tkáních, který je kromě tukové tkáně exprimován především v žaludku a trávicím traktu. Obestatin reguluje lipidový metabolismus, krevní tlak, střevní motilitu, ale to, zda může mít úlohu při obezitě, MS nebo DM2 stále zůstává nejasné.

Zvýšené hladiny vaspinu byly pozorovány u obézních a pacientů s IR, s redukcí hmotnosti koncentrace vaspinu klesala (13). Z literatury je patrné, že koncentrace vaspinu stoupá s postupujícím věkem, což je v souladu i s našimi výsledky. Díky svému vztahu k obezitě a IR by vaspin mohl být nový marker obezity a IR. Z uvedených výsledků vyplývá, že aktivita tukové tkáně se v průběhu stárnutí mění a je doprovázena kvalitativními i kvantitativními změnami sekrece adipocytokinů.

Závěr

S přibývajícím věkem potkanů se snižovala inzulinová senzitivita tkání a zhoršovaly se parametry lipidového metabolismu, přičemž negativní změny byly výraznější u HHTg potkanů. Z nových adipocytokinů zejména hladiny vaspinu korelovaly s postupujícím věkem a IR. Vaspin by podobně jako adiponektin mohl být nový citlivý ukazatel inzulinové senzitivity.

Tabulka 1: Hmotnostní a sérové parametry

		3M	12M	20M	P kmen	P věk
Hmotnost (g)	K	407 ± 5	635 ± 28	663 ± 21	< 0,001	< 0,001
	HHTg	304 ± 5	478 ± 14	566 ± 12		
Epididymální t.t. (g/100g)	K	1,09 ± 0,06	1,46 ± 0,15	1,32 ± 0,20	< 0,001	< 0,001
	HHTg	1,16 ± 0,04	2,53 ± 0,04	2,53 ± 0,10		
TAG (mmol/l)	K	1,55 ± 0,14	1,84 ± 0,18	2,07 ± 0,51	< 0,001	< 0,001
	HHTg	5,45 ± 0,45	5,33 ± 0,72	9,82 ± 0,79		
NEMK (mmol/l)	K	0,209 ± 0,021	0,360 ± 0,025	0,334 ± 0,027	< 0,001	< 0,001
	HHTg	0,401 ± 0,037	0,661 ± 0,053	0,473 ± 0,072		
Glykémie sytá (mmol/l)	K	7,2 ± 0,3	6,6 ± 0,1	6,4 ± 0,6	< 0,05	NS
	HHTg	7,7 ± 0,2	8,2 ± 0,3	7,6 ± 0,7		
Inzulin (pmol/l)	K	156 ± 47	288 ± 86	488 ± 85	< 0,05	< 0,05
	HHTg	257 ± 103	239 ± 122	598 ± 131		

Tabulka 2: Ektopické ukládání triacylglycerolů

TAG (μmol/g)		3M	12M	20M	P kmen	P věk
Játra	K	7,25 ± 0,45	10,74 ± 1,04	13,15 ± 2,10	< 0,001	< 0,01
	HHTg	11,03 ± 0,77	20,73 ± 1,23	23,30 ± 3,84		
Sval	K	1,78 ± 0,24	3,48 ± 0,78	6,71 ± 0,77	< 0,001	< 0,01
	HHTg	3,21 ± 0,32	4,03 ± 0,56	11,76 ± 0,96		

Tabulka 3: Plasmatické hladiny adipocytokinů

		3M	12M	20M	P kmen	P věk
Adiponektin (μg/ml)	K	6,05 ± 0,34	4,61 ± 0,39	3,20 ± 0,26	NS	< 0,05
	HHTg	5,87 ± 0,41	4,64 ± 0,35	2,90 ± 0,23		
Leptin (pg/ml)	K	2654 ± 209	4113 ± 343		< 0,01	< 0,001
	HHTg	3605 ± 170	5337 ± 477			
Chemerin (pg/ml)	K	408 ± 19	476 ± 27	326 ± 37	NS	< 0,05
	HHTg	434 ± 20	413 ± 19	313 ± 6		
Omentin (ng/ml)	K	2,64 ± 0,15	2,56 ± 0,07	2,49 ± 0,12	NS	< 0,05
	HHTg	2,65 ± 0,12	2,51 ± 0,05	2,29 ± 0,18		
Vaspin (ng/ml)	K	0,363 ± 0,080	0,443 ± 0,070	0,457 ± 0,189	< 0,01	< 0,01
	HHTg	0,518 ± 0,101	0,596 ± 0,049	2,055 ± 0,507		
Obestatin (pg/ml)	K	1127 ± 79	2193 ± 622	2875 ± 752	< 0,01	< 0,01
	HHTg	628 ± 244	2486 ± 604	4213 ± 649		

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

Literatura

1. **Wronska A, Kmiec Z.** Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol* 2012; 205: 194-208.
2. **Blüher M, Mantzoros CH S.** From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism Clinical and experimental* 2015; 64: 131-145.
3. **Phillips DI, Caddy S, Ilic V, et al.** Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism* 1996; 45: 947-950.
4. **Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, et al.** Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 1997; 46: 983-988.
5. **Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, et al.** Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 1991; 40: 1397-1403.
6. **Timmers S, Schrauwen P, Vogel J.** Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiol Behav* 2008; 94: 242-251.
7. **Iwabu M, Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Kadowaki T.** Adiponectin/adiponectin receptor in disease and aging. *NPJ Aging Mech Dis* 2015; 1: 15013.
8. **Roguska J, Zubkiewicz-Kucharska A.** Chemerin as an early marker of metabolic syndrome. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2018; 24: 45-51.
9. **Parlee SD, Ernst MC, Muruganandan S, et al.** Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and Tumor necrosis factor- α . *Endocrinology* 2010; 151: 2590-2602.
10. **Jialal I, Devaraj S, Kaur H, et al.** Increased chemerin and decreased omentin-1 in both adipose tissue and plasma in nascent metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(3): E514-7.
11. **Elsaid NH, Sadik NH, Ahmed NR, et al.** Serum omentin-1 levels in type 2 diabetic obese women in relation to glycemic control, insulin resistance and metabolic parameters. *J ClinTransl Endocrinol* 2018; 13: 14-19.
12. **Cowan E, Burch KJ, Green BD, Grieve DJ.** Obestatin as a key regulator of metabolism and cardiovascular function with emerging therapeutic potential for diabetes. *Br J Pharmacol* 2016; 173: 2165-2181.
13. **Escoté X, Gómez-Zorita S, López-Yoldi M, et al.** Role of Omentin, Vaspin, Cardiotrophin-1, TWEAK and NOV/CCN3 in obesity and diabetes development. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1770-1796.

IS SOLUBLE ENDOGLIN INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION?

PODÍLÍ SE SOLUBILNÍ ENDOGLIN NA ROZVOJI ENDOTELOVÉ DYSFUNKCE?

P. Nachtigal¹, B. Vitverova¹, M. Vican¹, I. Najmanova¹, E. Dolezelova¹, C. Bernabeu², M. Pericacho³

¹ Department of Biological and Medical Sciences, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

² Center for Biological Research, Spanish National Research Council (CSIC), and Biomedical Research Networking Center on Rare Diseases, Madrid, Spain

³ Department of Physiology and Pharmacology, Renal and Cardiovascular Physiopathology Unit, University of Salamanca, Salamanca, Spain

A soluble form of tissue/membrane endoglin (sEng) circulating in plasma is increased in hypercholesterolemia, atherosclerosis and type II diabetes mellitus patients. Moreover, it has been proposed that sEng might be least partially responsible for the induction of endothelial dysfunction (but not studied in atherosclerosis prone blood vessels so far) and related to the presence of hypercholesterolemia. We provided couple of experiments in order to reveal whether high levels of sEng combined with hypercholesterolemia might affect vascular/endothelial function and inflammation in mice aorta.

Three-month-old female transgenic mice on CBAxC57BL/6J background with high levels of sEng (*Sol-Eng⁺ high HFD*) and their littermates with low levels of sEng (*Sol-Eng⁺ low HFD*) were fed high fat diet (HFD) for either 3 months or 6 months. Plasma samples were used for biochemical analyses of total cholesterol and ELISA analyses of sEng and inflammatory markers. Functional parameters of aorta were assessed by means of wire myograph 620M. Western Blot analysis endothelial dysfunction/inflammation markers in aorta was performed. HUVEC and HEK were exposed to recombinant human endoglin at concentration 40, 500 ng/mL at different times (16 - 48 hours).

3 months exposure to high sEng levels and HFD resulted in induction of inflammation (increased expression of P-selectin, ICAM-1, pNFκB and COX-2) in aorta of high *Sol-Eng⁺ high HFD*. Moreover, 6 months exposure to high sEng levels and HFD resulted in impaired KCl induced vasoconstriction, endothelial-dependent relaxation after administration of acetylcholine, endothelial-independent relaxation induced by sodium nitroprusside. In addition, the expressions of endoglin, p-eNOS/eNOS, pSmad2/3/Smad2/3 signaling pathway were significantly lower in *Sol-Eng⁺ high HFD* group compared to *Sol-Eng⁺ low HFD* group. sEng treatment in endothelial cells resulted in activation of pro-inflammatory NF-κB/IL-6 expression and increased expression of membrane endoglin but without significant effects on cell adhesion molecules.

Current results show that high levels of soluble endoglin alone or in combination with hypercholesterolemia induce signs of inflammation and endothelial dysfunction in vascular endothelium both *in vivo* and *in vitro*. Thus, we might propose that high levels of soluble endoglin presented in patients with hypercholesterolemia, atherosclerosis and type II diabetes mellitus might worsen endothelial dysfunction in combination with hypercholesterolemia, thus soluble endoglin might be considered as a risk factor of cardiovascular diseases.

This work was supported by project EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) co-funded by ERDF, GAUK 1158413C, 1216217, and SVV/2017/260414 and Czech Health Research Council (AZV CR 17-31754A)

TROXERUTIN IMPROVES INSULIN SENSITIVITY AND DYSLIPIDEMIA IN HEREDITARY HYPERTRIGLYCERIDEMIC RATS.

O. Oliyarnyk¹, H. Malínská¹, I. Marková¹, M. Hüttl¹, Z. Matušková², M. Poruba², L. Kazdová¹, R. Večera²

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

²Institute of Pharmacology, Palacky University, Olomouc

Abstract

Troxeutin, a semi-synthetic derivative of the natural bioflavonoid rutin, has been reported to possess many beneficial effects as vasoprotective, anti-inflammatory, antioxidant etc. We investigated the effect of its treatment on insulin resistance and oxidative stress parameters in hereditary hypertriglyceridemic rats. Troxeutin decreased plasma glucose (7.75 ± 0.26 vs. 8.55 ± 0.28 mmol/l) and insulin concentration (0.16 ± 0.03 vs. 0.29 ± 0.05 nmol/l), increased HMW adiponectin (4.68 ± 0.09 vs. 4.00 ± 0.17 μ g/ml) and improved insulin sensitivity of epididymal adipose tissue and muscle. Moreover, we found hypolipidemic effect of troxeutin: decreased cholesterol accumulation in liver (5.51 ± 0.22 vs. 6.55 ± 0.18 μ mol/g) and triacylglycerols in *musculus soleus* (2.70 ± 0.29 vs. 4.10 ± 0.56 μ mol/g) associated with inhibited expression of HMG-CoA reductase and stearoyl-CoA desaturase 1. Troxeutin administration decreased oxidative stress in liver: inhibited lipoperoxidation measured as conjugated dienes (-27 %) and TBARS (-33 %); increased GSH/GSSG ratio (+34 %), activated antioxidant enzymes-superoxide dismutase (+33 %) and glutathione peroxidase (+21 %). Results indicate that troxeutin might have a curative effect in therapy of metabolic syndrome-associated disorders.

Introduction

Troxeutin is a trihydroxyethylated derivative of the bioflavonoid rutin, present in tea, coffee, cereal grains, and a variety of fruits and vegetables. It has been used for a number of therapeutic purposes preliminary for the treatment of chronic venous insufficiency and improving capillary function. Troxeutin also possesses antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, anticancer, neuroprotective and radioprotective activities [1]. Clinical trials found that troxeutin has high bioavailability, good safety profile and tolerability even at high doses [2].

Troxeutin has the capability to inhibit obesity, hyperglycemia and hyperlipidemia in high cholesterol fed rodents and protects against atherosclerosis improving dyslipidemia and reducing homocysteine level [3]. Recent published studies have shown hypoglycemic effect of troxeutin in experimental models of type 2 diabetes [4]. In other experimental model of metabolic syndrome, high-fat-high-fructose diet-fed mice troxeutin administration restricted obesity, reduced blood pressure, lipid accumulation, upregulated fatty acids oxidation, and down-regulated fatty acids transport and lipogenesis [5].

Since troxeutin has three more hydroxyl groups than rutin, it has advanced antioxidant effect [5] demonstrated in plasma and myocardium in different models of diabetes and metabolic syndrome [6], but it was not well described in liver yet. Hepatoprotective effect of troxeutin was demonstrated as improved aminotransferases activities in different pathological conditions [7,8]. We investigated the effect of supplementation with troxeutin on the parameters of insulin resistance, dyslipidemia, lipoperoxidation and activity of antioxidant enzymes in experimental model of metabolic syndrome- hereditary hypertriglyceridemic rats (HHTg).

Material and Methods

The experiments were carried on male 5 months old HHTg rats fed standard laboratory diet with or without supplementation with troxerutin, *ad libitum* in dose 150 mg/kg of body weight (Cilkanol, Zentiva, Czech Republic). Biochemical analysis was performed using methods described before [9]. Expressions of HMG-CoA reductase (HMGCR), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) and transcription factor Nrf2 were determined by Real time PCR, using kits from Life Technologies (MA, USA).

Results

Troxerutin administration have not influenced body weight of HHTg rats and weight of epididymal fat pads, but we observed its hypoglycemic, hypoinsulinemic effect and increased plasmatic concentration of HMW adiponectin (Table 1). Troxerutin supplementation improved insulin sensitivity of epididymal adipose tissue determined as basal and insulin stimulated incorporaion of ^{14}C -U glucose into lipids (Fig.1). Troxerutin treatment increased muscle insulin sensitivity measured as insulin-stimulated incorporation of ^{14}C -U glucose into diaphragmal glycogen (Fig. 2). Lipid parameters (triacylglycerols, total and HDL-cholesterol, nonesterified fatty acids) were unaffected in plasma, but we showed decreased ectopic cholesterol accumulation in liver and triacylglycerols in *m. soleus* (2.70 ± 0.29 vs. 4.10 ± 0.56 $\mu\text{mol/g}$, $p < 0.05$). Hypocholesterolemic effect of troxerutin in liver was associated with inhibited relative expression of HMGCR and SCD1.

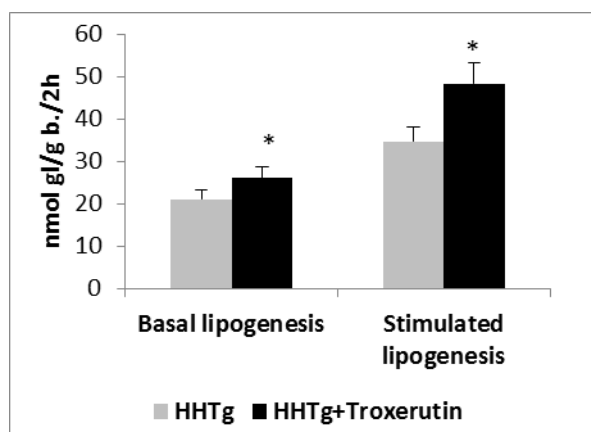


Fig 1. Basal and insulin-stimulated ^{14}C -U glucose incorporation into lipids in epididymal adipose tissue (lipogenesis), *denotes $p < 0.05$

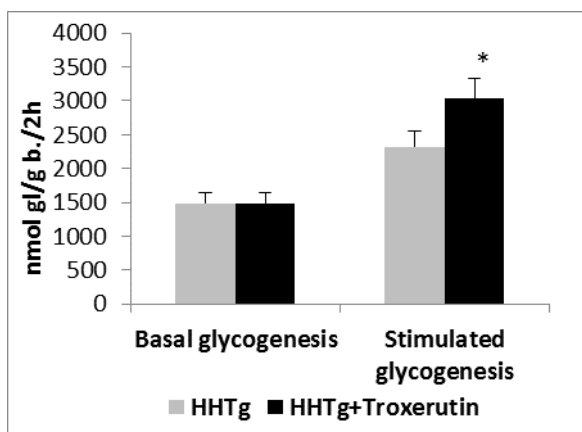


Fig 2. Basal and insulin-stimulated ^{14}C -U glucose incorporation into diaphragmal glycogen (glycogenesis). *denotes $p < 0.05$

Supplementation with troxerutin inhibited lipoperoxidation in liver in HHTg rats (Table 1). We have shown decreased concentration of intermediate products – conjugated dienes and final products-TBARS. Suppression of oxidative stress might be due to enhanced antioxidant defense. Although concentration of important intracellular antioxidant reduced glutathione (GSH) remained unchanged, the level of oxidized glutathione (GSSG) significantly decreased. As a consequence, GSH/GSSG ratio elevated, which might positively influence the activities of GSH-dependent antioxidant enzymes. Only glutathione peroxidase was activated after troxerutin administration, activities of glutathione reductase and glutathione transferase had a tendency to increase, but the difference with control group was not significant. In addition, troxerutin activated liver superoxide dismutase, activities of catalase and paraoxonase 1 remained unchanged. In spite of activated antioxidant enzymes we have not

shown increased expression of Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 is a key transcription factor responsible for constitutive and inducible expression of ARE-regulated genes of antioxidant enzymes).

Table 1. Metabolic and oxidative stress parameters in HHTg rats supplemented with troxerutin

	HHTg	HHTg+troxerutin
Plasma		
Non-fasting glucose, mmol/l	8.55 ± 0.28	7.75 ± 0.26*
Insulin, nmol/l	0.29 ± 0.05	0.16 ± 0.03*
HMW adiponectin, µg/ml	4.00 ± 0.17	4.68 ± 0.09**
Liver		
Triacylglycerols, µmol/g	8.92 ± 0.66	8.95 ± 0.35
Total cholesterol, µmol/g	6.55 ± 0.18	5.51 ± 0.22**
HMGCR, relative expression	1.00 ± 0.19	0.41 ± 0.06**
SCD, relative expression	2.08 ± 0.54	0.56 ± 0.21**
Lipid peroxidation products		
TBARS, nmol/mg _{prot}	1.69 ± 0.18	1.14 ± 0.01*
Conjugated dienes, nmol/mg _{prot}	31.5 ± 2.4	23.0 ± 1.5*
Glutathione forms and ratio		
GSH, µmol/ mg _{prot}	42.2 ± 2.0	42.3 ± 6.2
GSSG, µmol/ mg _{prot}	3.89 ± 0.19	2.80 ± 0.18**
GSH/GSSG	11.2 ± 1.0	15.0 ± 1.2*
Activity of antioxidant enzymes and Nrf2 expression		
Superoxide dismutase (SOD), U/mg _{prot}	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01*
Glutathione peroxidase (GSH-Px), µmol NADPH/min/mg _{prot}	307 ± 13	373 ± 22*
Nrf2, relative expression	1.04 ± 0.13	1.01 ± 0.11

**p < 0.01, *p < 0.05 vs. HHTg rats without supplementation

Discussion

Current study was obtained to clarify the curative effect of troxerutin on disorders associated with metabolic syndrome. HHTg rats is a non-obese strain with genetically fixed hypertriglyceridemia, accompanied with other features of metabolic syndrome like hyperglycemia, impaired glucose tolerance, hypertension, hyperinsulinemia and insulin resistance. We have found hypoglycemic effect of troxerutin in HHTg rats, decreased plasma insulin concentration, increased adiponectin contributing to improved tissues insulin sensitivity. Our results concurred with previous studies carried out on high fat diet [1] or high sucrose diet fed rodents [4]. The most important our finding is increased glucose incorporation into adipose tissue and glycogen synthesis in diaphragm after troxerutin treatment. Increased muscle glycogenesis can be a consequence of inhibited SCD1 expression which was already demonstrated in SCD1 knockout mice [10]. Current results confirm previous published findings showed increased whole body insulin sensitivity measured as HOMA value [5].

We demonstrated hypolipidemic effect of troxerutin as decreased total cholesterol in liver, which might be attributed to suppressed HMGCR expression. Hypocholesterolemic effect of troxerutin was shown in plasma, myocardium and liver in experimental models of diabetes

type 2 and metabolic syndrome in rodents [4,5,11], but results were not correlated to HMGCR expression or activity. In addition we found decreased triacylglycerols accumulation in skeletal muscle. Lipid-lowering effect of troxerutin might exert through upregulation of PPAR- α following induced expression of genes involved in fatty acids oxidation as well as down-regulated expression of sterol regulatory element-binding protein 1c resulting in reduced fatty acids and triacylglycerols synthesis [4]. Other mechanism of lipid-lowering effect of troxerutin might be attributed to decreased expression of SCD-1. High expression of SCD-1 is associated with the development of obesity, hypertriglyceridemia, atherosclerosis, and diabetes [12]. SCD-1 deficiency was shown to reduce ceramide synthesis and to elevate fatty acid oxidation in skeletal muscle [10].

Consistent with previous reports we have shown inhibited lipoperoxidation after troxerutin treatment [7], which might be due to scavenging of oxygen-derived free radicals [13] as well as increased antioxidant defense. Present study demonstrated elevated activities of liver antioxidant enzymes: SOD, GSH-Px, and increased GSH/GSSG ratio. Many investigators suggested, that activation of these enzymes is a common mechanism of the hepatoprotective effect of flavonoid compounds including troxerutin [7,13]. Our results correspond with study showed activated liver SOD, catalase and increased GSH level in high fat diet fed mice [1]. In recent published study troxerutin activated expression and protein concentration of transcription factor Nrf2 in hippocampus in streptozotocine- induced diabetic rats [14], but we have not shown any elevated expression of Nrf2 in liver in HHTg rats. It might be a reason, why activities of catalase, glutathione reductase, glutathione transferase and paraoxonase 1 did not increase after troxerutin treatment. However, troxerutin can activate hepatic antioxidant enzymes SOD and GSH-Px via Nrf2 independent mechanism.

Conclusions

In addition to well described antioxidant effect troxerutin has hypoglycemic and hypolipidemic effect in HHTg rats. Moreover, it improves adipose tissue and muscle insulin sensitivity. Therefore, this flavonoid can be proposed for addition therapy of disorders associated with metabolic syndrome.

Supported by grant GAČR 17-08888-S

References

1. Zhang Z, Wang X, Zheng G, et al. *Int J Mol Sci* 2016; 18: pii: E31.
2. Gohel MS, Davies AH. *Curr Vasc Pharmacol* 2009; 7: 303-308.
3. Tomycz ND, Friedlander RM. *Neurosurgery* 2011; 68: N15-17.
4. Sampath S, Karundevi B. *Mol Cell Biochem* 2014; 395: 11-27.
5. Geetha R, Yogalakshmi B, Sreeja S, et al. *Mol Cell Biochem* 2014; 387: 123-134.
6. Najafi M, Noroozi E, Javadi A, Badalzadeh R. *Biomed Pharmacother* 2018; 102: 385-391.
7. Zhang ZF, Fan SH, Zheng YL, et al. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 7731-7736.
8. Thomas NS, George K, Arivalagan S, et al. *Eur J Nutr* 2017; 56: 2353-2366.
9. Malinska H, Oliyarnyk O, Skop V, et al. *PLoS One* 2016; 11: e0150924.
10. Rahman SM, A. Dobrzyn A, P. Dobrzyn P, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11110-11115.
11. Zhang ZF, Fan SH, Zheng YL, et al. *Biochem Pharmacol* 2014; 91: 74-86.
12. Mar-Heyming R, Miyazaki M, Weissglas-Volkov D, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1193-1199.
13. Geetha R, Sathiya Priya C, Anuradha CV. *Chem Biol Interact* 2017; 278: 74-83.
14. Zhang S, Yuan L, Zhang L, et al. *Behav Neurol* 2018; 2018: 8678539.

VLIV KOMBINACE FENOFIBRÁTU A SILYMARINU NA VYBRANÉ ENZYMY A TRANSPORTNÍ SYSTÉMY U MODELU METABOLICKÉHO SYNDROMU

EFFECT OF COMBINATION OF FENOFIBRATE AND SILYMARINE ON SELECTED ENZYMES AND TRANSPORT SYSTEMS IN MODEL OF METABOLIC SYNDROME

M. Poruba¹, Z. Matušková¹, M. Hüttl², H. Malínská², O. Oliyarnyk², I. Marková², L. Kazdová², R. Večeřa^{1*}

¹Farmakologický ústav, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc

²Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Abstract

There are not many known about possible involving of fenofibrate in combination with micronized silymarin on genes that may play a role in metabolic syndrome. In this, *in vivo* study, we evaluated the effects of fenofibrate, micronized silymarin, or its combination on following genes: Abcb1a, Abcb1b, Cyp7a1, Cyp2e1, and Hmgcr.

A total of 25 male hereditary hypertriglyceridemic rats were fed standard laboratory diet (STD), or STD with an addition of 1 % micronized silymarin, or STD with micronized fenofibrate, or STD with a combination of both. Following four weeks animals were sacrificed and tissues and organs were collected for a subsequent real-time PCR analysis.

Fenofibrate with, or without silymarin significantly decreased the mRNA expression of Abcb1a, Abcb1b, Cyp7a1, and Hmgcr. Cyp2e1 was significantly decreased following the only combination of both (fenofibrate and silymarin). In this case, the micronized silymarin has an additive effect to fenofibrate.

Our finding suggests that fenofibrate in combination with silymarin may involve the distribution and metabolism of many drugs and lipids.

Úvod

Fenofibrát je léčivo ze skupiny hypolipidemik užívaných pro zvýšenou hladinu triacylglycerolů (TAG). Pacienti trpící metabolickým syndromem, tedy pacienti se zvýšenou triacylglycerolémií, nízkým HDL cholesterolem, diabetem a obezitou mohou z užívání fenofibrátu profitovat. Fenofibrát je znám svým působením na receptory aktivované proliferátory peroxisomů alfa (PPAR α). Aktivace těchto receptorů vede ke zvýšení transkripce genů kódujících zejména enzym lipoproteinovou lipázu, která účinně snižuje plasmatickou koncentraci TAG (Steals et al., 1998). Silymarin je látka polyfenolické povahy, která je především užívána jako hepatoprotektivum, ale jsou mu připisovány také pozitivní účinky u metabolických chorob, zejména dyslipidemií a diabetu (Škottová et Krečman, 1998; Vargas-Mendoza et al., 2014; Voroneanu et al., 2016). V našich předchozích studiích jsme zjistili, že výraznější účinky se projevují u mikronizované formy silymarinu než v případě standardizovaného extraktu (Poruba et al., 2016).

Ačkoliv účinky na lipidové spektrum jednotlivých látek i kombinace jsou známy, málo je známo o vlivu jednotlivých látek či kombinace na transkripci jednotlivých genů. V rámci této studie jsme chtěli zjistit, zda jednotlivé látky anebo jejich kombinace mohou ovlivňovat geny kódující potkaní P-glykoprotein, tedy enzym, který má důležitou úlohu zejména v distribuci léčiv, včetně léčiv užívaných při terapii metabolického syndromu, ale také lipidů (Vranckx et al., 2018; Aya et al., 2009). Dalšími sledovanými geny byly ty, které kódují cytochromy P450, konkrétně CYP2E1, který může přispívat ke steatóze jater a podílí se na metabolismu zejména malých molekul, která mohou být působením enzymu aktivovány a vést k poškození

organismu (Wong et al., 1998). CYP7A1 je zástupcem cytochromů, které metabolizují výhradně endogenní látky. CYP7A1 katalyzuje první a velmi důležitý krok v syntéze žlučových kyselin z cholesterolu, tedy jednu z cest jeho eliminace. Posledním sledovaným enzymem je klíčový enzym endogenní syntézy cholesterolu 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktáza. Tento enzym je cílem jiné skupiny hypolipidemik - statinů.

Pro studii byl zvolen unikátní zvířecí model hereditárně hypertriglyceridemického (HHTg) potkana. Tento neobézní potkan s hypertriacylglycerolémií byl vyšlechtěn z kmene Wistar na základě zvýšené citlivosti k přívodu sacharózy v dietě (Vrána et al., 1990; Zicha et al., 2006).

Materiál a metody

Zvířata a diety

Pro studii bylo vybráno celkem 25 hereditárně hypertriglyceridemických (HHTg) samců potkana, kteří měli zajištěný volný přístup k potravě a vodě. Zvířata byla rozdělena na základě rozdílných diet. Kontrolní zvířata (Ctrl) byla po celou dobu experimentu krmena standardní laboratorní dietou (STD). V případě experimentálních skupin (celkem tři) byla STD obohacena o mikronizovaný silymarin (1 % v STD), fenofibrát (100 mg/kg hm.) a kombinace fenofibrátu a mikronizovaného silymarinu. Po čtyřech týdnech experimentu byla zvířata dekapitována, exsanguinována a byly odebrány vzorky krve a orgány pro následnou analýzu. Silymarin byl zakoupen od firmy Favea s.r.o. (Kopřivnice, Česká Republika), fenofibrát byl zakoupen od firmy Ingers Industrial Solution s.r.o. (Brno, Česká Republika).

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

Stanovení mRNA

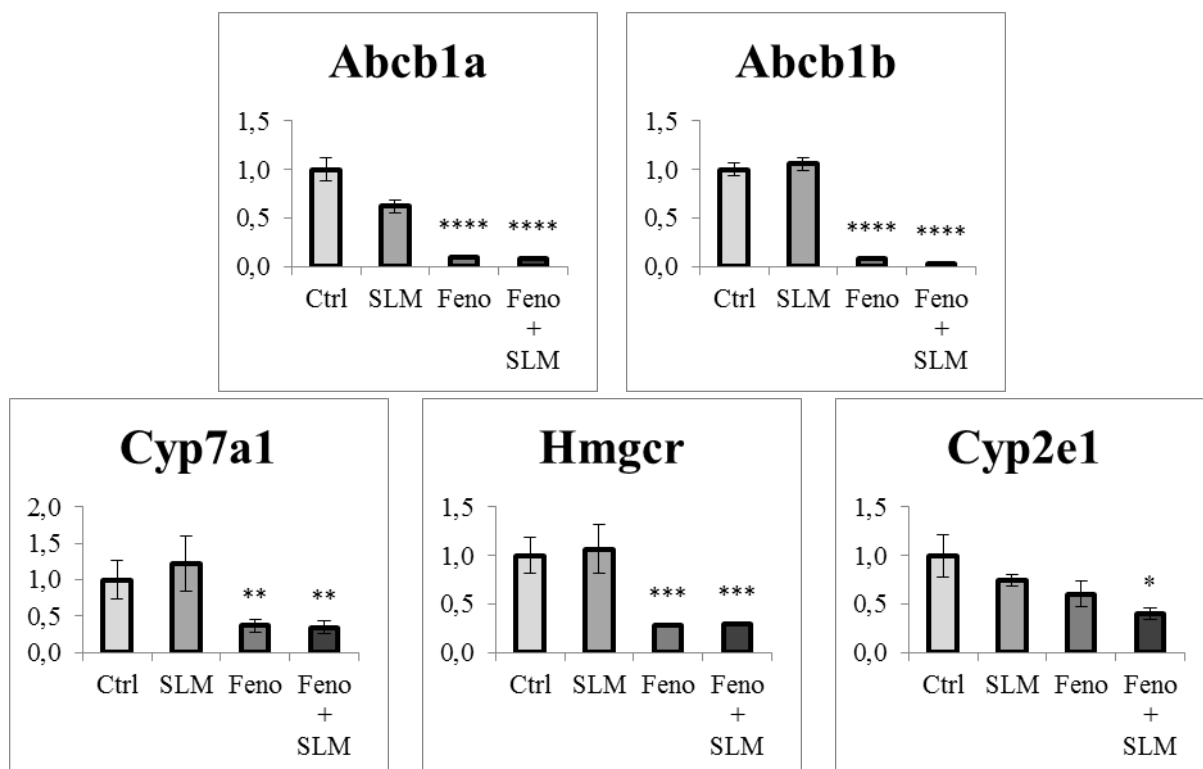
Pro izolaci celkové mRNA byl použit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Pro syntézu cDNA bylo použito 1 µg mRNA za použití Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). RT-PCR analýza byla provedena na 1536 jamkových destičkách za použití Automate Labcyte Echo (Dublin, Ireland) a LightCycler 1536 Instrument (Roche). Pro stanovení byly použity sondy TaqMan Gene Expression Assays. Výsledky byly zpracovány metodou „Delta-Delta Ct“ a veškeré výsledky byly normalizovány a vztaženy ke genům Hprt (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Statistické zpracování

Pro statistické vyhodnocení byla použita metoda ANOVA s následným Bonferroniho testem za použití programu Statistica CZ 12 (StatSoft, Praha, Česká Republika).

Výsledky

Na obrázku 1 jsou uvedeny změny v mRNA jednotlivých sledovaných genů. Samotný mikronizovaný silymarin neměl statisticky významný vliv na expresi mRNA vybraných genů. V případě Abcb1a kódujícího potkaní P-gp a genu pro CYP2E1 byl pozorován mírný pokles mRNA. Na druhou stranu fenofibrát v dávce 100 mg/kg hm. významně snížil mRNA u experimentálních zvířat v případě Abcb1a (o 90 %; $p < 0,0001$), Abcb1b (o 92 %; $p < 0,0001$), Cyp7a1 (o 63 %; $p < 0,01$), Hmgcr (o 72 %; $p < 0,001$) a Cyp2e1 (o 39 %; bez statistické významnosti). Obdobné výsledky byly také získány v případě kombinace fenofibrátu a mikronizovaného silymarinu. Konkrétně došlo po podání kombinace ke snížení mRNA o 92 % v případě Abcb1a ($p < 0,0001$), o 97 % v případě Abcb1b ($p < 0,0001$), o 65 % v případě Cyp7a1 ($p < 0,01$), o 70 % v případě Hmgcr ($p < 0,001$) a o 59 % v případě Cyp2e1 ($p < 0,05$).



Obrázek 1: Změny v mRNA u jednotlivých sledovaných genů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Ctrl - kontrola (STD), SLM - 1 % mikronizovaný silymarin v STD, Feno - fenofibrát 100 mg/kg hm., Feno + SLM - kombinace fenofibrátu a mikronizovaného silymarinu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. kontrola, *** $p < 0,001$ vs. kontrola, **** $p < 0,0001$ vs. kontrola.

Diskuze

Změny v mRNA u sledovaných genů naznačují, že fenofibrát i v kombinaci se silymarinem může významně ovlivňovat metabolismus i distribuci různých endogenních látek i xenobiotik. V rámci sledovaných genů *Abcb1a* a *Abcb1b*, tedy dvou genů kódujících potkaní P-glykoprotein, došlo k významnému snížení jejich exprese. P-glykoprotein je transportní protein patřící do rodiny ATP-Binding Cassettes (ABC), který se nachází významně distribuován po celém organismu. Jeho role je zejména v exkreci a omezení absorpce a distribuce různých látek, např. digoxinu či dabigatranu. Jelikož játra mají významnou roli v tzv. first pass efektu, tedy presystémové eliminaci, může významné snížení P-glykoproteinu vést ke zvýšení biologické dostupnosti jeho substrátů. Významné snížení P-glykoproteinu může také vést k rozvoji jaterní steatosisy a obesitě (Foucaud-Vignault et al., 2011). Ačkoliv fenofibrát není považován za inhibitor či substrát P-glykoproteinu, existují studie popisující jeho mírný inhibiční vliv na P-glykoprotein zejména na buněčných liniích (Yamazaki et al., 2006). Naše výsledky naznačují, že vliv fenofibrátu je pravděpodobně závislý na podané dávce a významně se může projevit v případě předávkování.

V případě změn v expresi genu pro CYP7A1 nejsou změny způsobené fenofibrátem pravděpodobně pozitivní. Vzhledem k tomu, že CYP7A1 se významně podílí na eliminaci cholesterolu na žlučové kyseliny, může inhibice tohoto CYP450 způsobovat snížení jedné z cest cholesterolové exkrece. Na druhou stranu se neprojevil příznivý vliv silymarinu, který v předcházející studii zvýšil množství proteinu, tohoto sledovaného enzymu (Poruba et al., 2016). Tento efekt mohl být způsobený zvolenou vysokou dávkou fenofibrátu. Na druhou

stranu fenofibrát také významně inhiboval expresi mRNA pro HMGCR, tedy enzymu, který je klíčový pro endogenní syntézu cholesterolu. Zdá se tedy, že syntéza i eliminace cholesterolu mohla být fibráty inhibována, i přes to, že fibráty nejsou považovány za inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktázy.

V rámci sledovaného genu pro CYP2E1 bylo v případě diety obohacené o silymarin či fenofibrát pozorováno mírné ale statisticky nevýznamné snížení mRNA. Na druhou stranu, k významnému snížení exprese mRNA došlo v případě kombinace těchto dvou látek. Ačkoliv samotný silymarin není považován za inhibitor CYP2E1, výrazně zvýšil inhibiční vliv fenofibrátu. Kombinace obou látek se zdá být pozitivní, protože zejména indukovaný CYP2E1 je zodpovědný za produkci různých reaktivních látek. A právě metabolický syndrom zahrnující obezitu, diabetes a případně steatosu jater může přispívat ke zvýšené aktivitě tohoto enzymu.

Závěr

Ve studii se podařilo prokázat, že fenofibrát samotný anebo v kombinaci s mikronizovaným silymarinem může ovlivňovat expresi mRNA pro jaterní P-glykoprotein, CYP7A1, 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktázu. Fenofibrát pouze v kombinaci s mikronizovaným silymarinem signifikantně snížil expresi mRNA pro CYP2E1.

Autoři děkují za podporu grantu č. 17-08888S Grantové agentury ČR a grantu IGA_LF_2018_011 interní grantové agentury University Palackého v Olomouci.

Literatura

Aye IL, Singh AT, Keelan JA. Transport of lipids by abc proteins: Interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chem Biol Interact* 2009; 180: 327-339.

Foucaud-Vignault M, Soayfane Z, Ménez C, et al. P-glycoprotein dysfunction contributes to hepatic steatosis and obesity in mice. *PLoS One* 2011; 6: e23614.

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

Skottová N, Krecman V. Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. *Physiol Res* 1998; 47: 1-7.

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998; 98: 2088-2093.

Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González A, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol* 2014; 27; 6: 144-149.

Voroneanu L, Nistor I, Dumea R, et al. Silymarin in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Diabetes Res* 2016; 2016: 5147468.

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

Vranckx P, Valgimigli M, Heidbuchel H. The significance of drug-drug and drug-food interactions of oral anticoagulation. *Arrhythm Electrophysiol Rev* 2018; 7: 55-61.

Wong FW, Chan WY, Lee SS. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 153: 109-118.

Yamazaki M, Li B, Louie SW, et al. Effects of fibrates on human organic anion-transporting polypeptide 1B1-, multidrug resistance protein 2- and P-glycoprotein-mediated transport. *Xenobiotica* 2005; 35: 737-753.

Zicha J, Pechánová O, Cacányiová S, et al. Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiol Res* 2006; 55(Suppl.1): S49-S63.

POLYENASÝTENÉ MASTNÉ KYSELINY PRI CHRONICKÝCH OCHORENIACH**M. Široká, Z. Hertelyová*, E. Tvrzická**, B. Staňková****

Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

** Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach*

*** Laborať pro výzkum aterosklerózy, společné pracoviště IV. interní kliniky a Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN v Praze*

Abstrakt

This study deals with relationship between amount of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and some chronic diseases. The aim of study was to evaluate the ω -6/ ω -3 ratio and activity of delta-5- and delta-6-desaturases in human blood plasma of people with cardiovascular disease and metabolic syndrome in comparison with healthy people. Lipids from blood plasma were isolated by Folsch method, which were transesterificated by sodium methanolate. Polyunsaturated fatty acids were detected by gas chromatography (GC-FID). Increased ω -6/ ω -3 ratio was observed in patients with metabolic syndrome, obesity and cardiovascular diseases. These diseases were associated also with higher desaturase activity in favor to ω -6 PUFAs and decline level of ω -3 PUFAs.

Polynenasýtené mastné kyseliny (PNMK) sú pre ľudí esenciálne, pretože sú prekurzormi tvorby eikozanoidov, zvyšujú fluiditu bunkových membrán, modulujú bunkovú signalizáciu a génovú transkripciu (Mori, 2014). Bunky ľudského organizmu syntetizujú z prijatých kyselín α -linolénovej (ALA, ω -3) a linolovej (LA, ω -6) elongačnými a desaturačnými reakciami ďalšie PNMK (EPA, DHA alebo AA). ω -3 a ω -6 PNMK súťažia o rovnaké enzýmy. Zápal, kardiovaskulárne, metabolické, neurologické ochorenia, rakovina aj ďalšie ochorenia modulujú aktivity delta-5 a delta-6-desaturáz (Žák et al., 2016). Naša diéta obsahuje oveľa vyšší ($\geq 15:1$) pomer ω -6/ ω -3 PNMK ako mali ľudia v minulosti (1:1) (Hodgson, Mori, Wahlqvist, 2005). Zistilo sa, že zápal a vznik rôznych ochorení sa významne znížil po zmene pomeru PNMK v našej strave v prospech omega-3 PNMK (Johnson a Bradford, 2014; Kiecolt-Glaser et al., 2013).

Cieľom tejto práce bolo kvantitatívne analyzovať PNMK v krvnej plazme (kontrolnej skupiny zdravých jedincov (K); skupiny pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami (KVO), ktorí už boli farmakologicky liečení a skupiny pacientov s metabolickým syndrómom (MS), ktorí neboli liečení ale boli zaradení do programu na zníženie telesnej hmotnosti) pomocou plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom (GC-FID), stanoviť aktivity delta-5 a delta-6-desaturáz a vyhodnotiť pomer ω -6/ ω -3 PNMK. Vzorky krvi boli centrifugované 5 minút, pri 3500 rpm. Výsledkom boli erytrocyty a krvná plazma, ktoré boli uložené pri -80° C. Lipidy krvnej plazmy boli izolované Folchovou metódou pomocou zmesi dichlormetánu a metanolu v pomere 2:1 a následne boli mastné kyseliny transesterifikované metanolátom sodným (Tvrzická et al., 2002), extrahované do heptánu a analyzované pomocou GC-FID. Z nameraných výsledkov bolo vypočítané množstvo každej mastnej kyseliny v molárnych percentách (mol%), ich sčítaním bol určený pomer ω -6/ ω -3 mastným kyselinám v jednotlivých skupinách a bola vypočítaná aktivita jednotlivých desaturáz. Výsledky boli hodnotené popisnou štatistikou (aritmetický priemer \pm štandardná odchýlka, percentuálne zastúpenie). Na určenie štatistických rozdielov bol použitý Tukey test. Porovnanie výsledkov medzi všetkými tromi skupinami ukázalo významné rozdiely. Výsledky ukázali, že v skupine K bolo najnižšie zastúpenie ω -6 PNMK, najväčšie zastúpenie ω -3 PNMK, kým

v skupine MS bolo pozorované najnižšie zastúpenie ω -3 PNMK. Najnižší pomer ω -6/ ω -3 PNMK (10,3:1) bol pozorovaný v skupine K a najvyšší v skupine MS (17:1). Signifikantné rozdiely v pomere ω -6/ ω -3 PNMK boli zaznamenané medzi všetkými skupinami. Strednú hodnotu (13:1) nadobúdal v skupine KVO (fig. 1). Vypočítaná aktivita delta-6-desaturázy (fig. 2) pre ω -6 PNMK (bola získaná ako pomer množstva GLA/LA) bola signifikantne vyššia v skupine MS (0,13 \pm 0,06), kým aktivita delta-5-desaturázy pre ω -6 PNMK (bola získaná ako pomer množstva AA/DGLA) bola najvyššia v skupine K (6,51 \pm 2,55) a najnižšia v skupine MS (5,72 \pm 2,85, fig. 3).

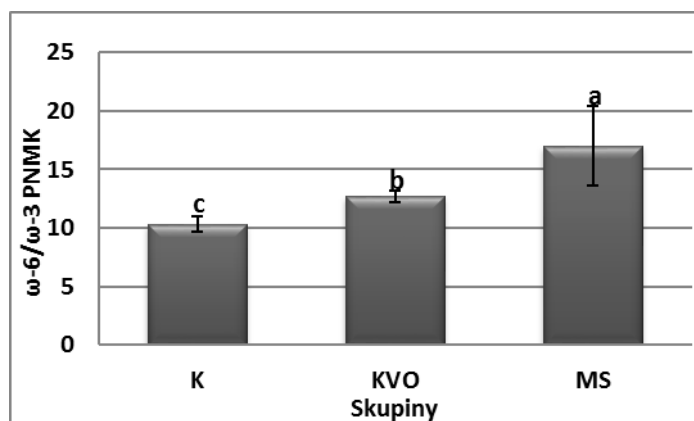


Fig. 1 ω -6/ ω -3 PUFAs ratio

K - kontrolná skupina, KVO – skupina pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami, MS – skupina pacientov s metabolickým syndrómom

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer \pm SD

a, b reprezentujú štatisticky významné rozdiely medzi skupinami; za štatisticky významné boli považované hodnoty $P < 0,05$ (Tukey test)

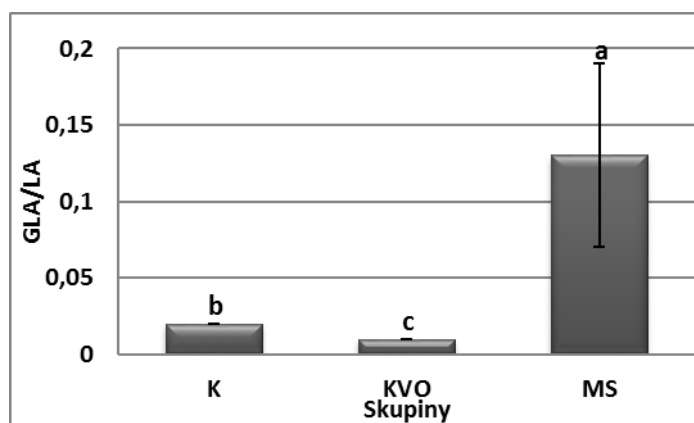


Fig. 2 Desaturase activity for ω -6 PUFAs (delta-6-desaturase)

K - kontrolná skupina, KVO – skupina pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami, MS – skupina pacientov s metabolickým syndrómom

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer \pm SD

a, b reprezentujú štatisticky významné rozdiely medzi skupinami; za štatisticky významné boli považované hodnoty $P < 0,05$ (Tukey test)

Aktivita desaturáz pre ω -3 PNMK (vypočítaná ako pomer EPA/ALA spoločne pre delta-6 a delta-5-desaturázy) mala najnižšiu hodnotu v skupine MS (0,29 \pm 0,09) a najvyššiu hodnotu v skupine C (0,57 \pm 0,26). Rozdiely medzi týmito dvoma skupinami boli štatisticky významné.

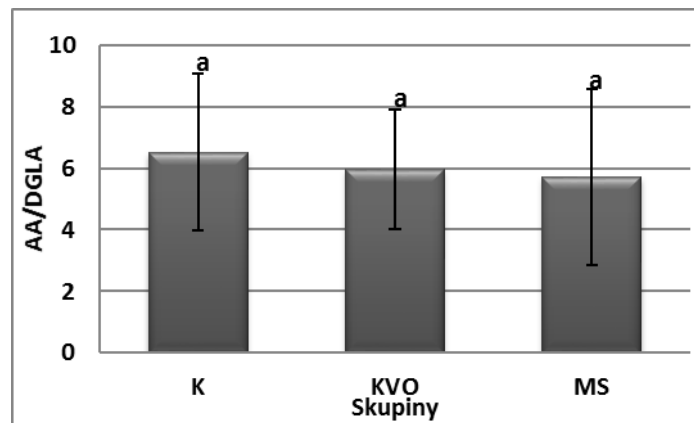


Fig. 3 Desaturase activity for ω-6 PUFAs (detla-5-desaturase)

K - kontrolná skupina, KVO – skupina pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami, MS – skupina pacientov s metabolickým syndrómom

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer ± SD

a, b reprezentujú štatisticky významné rozdiely medzi skupinami; za štatisticky významné boli považované hodnoty $P < 0,05$ (Tukey test)

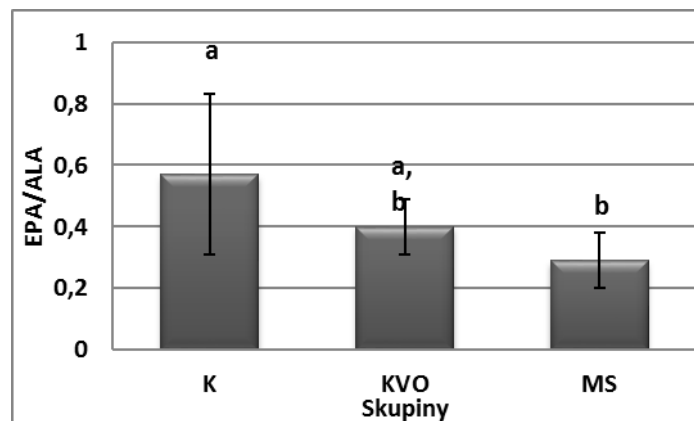


Fig. 4 Desaturase activity for ω-3 PUFAs

K - kontrolná skupina, KVO – skupina pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami, MS – skupina pacientov s metabolickým syndrómom

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer ± SD

a, b reprezentujú štatisticky významné rozdiely medzi skupinami; za štatisticky významné boli považované hodnoty $P < 0,05$ (Tukey test)

Kardiovaskulárne ochorenia a metabolický syndróm sú sprevádzané vyššou desaturázovou aktivitou v prospech ω-6 PNMK, čo môže prispieť k zvýšeniu pomeru ω-6/ω-3 PNMK. Pomer ω-6/ω-3 PNMK v rozmedzí 10-4:1 v potrave znížil výskyt aterosklerózy, kardiovaskulárnych ochorení aj metabolického syndrómu (Reiner et al., 2011; Simopoulos, 2008). Tieto výsledky ukázali nepriaznivý profil PNMK u pacientov s metabolickým syndrómom v porovnaní s pacientmi s KVO. Tieto výsledky môžu byť následkom farmakologickej liečby pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami zatiaľ čo pacienti s metabolickým syndrómom neboli liečení, a preto ukázali vyššiu aktivitu desaturáz pre ω-6 PNMK než pre ω-3 PNMK čo je v súlade s výsledkami predchádzajúcich štúdií (Žák et al., 2016).

Práca bola podporená grantom Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky: VEGA1/0584/16

Literatúra

Hodgson JM, Mori TA, Wahlqvist ML. Omega-6 polyunsaturated. In: Caballero B. Encyclopedia of human nutrition. 2nd edition. Oxford: Elsevier, 2005. 219-224.

Johnson M, Bradford CH. Omega-3, Omega-6 and Omega-9 Fatty Acids: Implications for Cardiovascular and Other Diseases. J Glycomics Lipidomics 2014; 4: 1-8.

Kiecolt-Glaser JK, Epel ES, Belury MA, et al. Omega-3 fatty acids, oxidative stress, and leukocyte telomere length: A randomized controlled trial. Brain Behav Immun 2013; 28: 16-24.

Mori TA. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: epidemiology and effects on cardiometabolic risk factors. Food Funct 2014; 5: 2004-2019.

Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemia. Eur Heart J 2011; 32: 1769-1818.

Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Exp Biol Med 2008; 233: 674-688.

Tvrzická E, Vecka M, Staňková B, Žák A. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography–flame ionization detection Quantitative aspects. Anal Chim Acta 2002; 465: 337-350.

Žák A, Slabý A., Tvrzická E., et al. Desaturázy mastných kyselin: patofyziologie a klinický význam. Čas Lék čes 2016; 155: 15-21.

THE EFFECT OF n-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ON THE DEVELOPMENT OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME (A DOUBLE-BLIND RANDOMISED PLACEBO-CONTROLLED STUDY)

VLIV n-3 POLYNENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN NA VÝVOJ NEALKOHOLOVÉHO JATERNÍHO POSTIŽENÍ U PACIENTŮ S METABOLICKÝM SYNDROMEM

V. Šmíd^{1,2}, K. Dvořák¹, P. Šedivý³, M. Drobný³, M. Hájek³, R. Hainer¹, L. Vitek^{1,2}, R. Brůha¹

¹ 4th Department of Internal Medicine, Clinic of Gastroenterology and Hepatology,

² Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Charles University, Prague, Czech Republic,

³ Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic,

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) represents the most common chronic liver disease in western countries with a global prevalence of 25% in adults. It encompasses a wide spectrum of liver damage ranging from benign simple steatosis, to non-alcoholic alcoholic steatohepatitis (NASH), liver fibrosis and cirrhosis. The detailed pathogenic mechanisms involved in the development of NAFLD remain unclear. There is no established pharmacological treatment of NAFLD. Weight reduction and lifestyle modification with increased physical activity stay the only effective therapeutic measures, but they are difficult to achieve and sustain. It has been reported that n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) are able to ameliorate hepatic steatosis and insulin resistance, whereas a diet deficient in PUFA with a high n-6/n-3 ratio could induce fatty liver. Up to date published papers using PUFA have yielded contradictory results. The aim of the study was to assess the effects of administration of PUFA in development of NAFLD in patients during one year follow-up.

We have examined 60 patients with metabolic syndrome and NAFLD in different stage of disease [simple steatosis/NASH (n = 55) / liver cirrhosis (n = 5)]. Patients were randomized into two groups: 30 used PUFA in daily dose 1.8 g of eicosapentaenoic acid and 1.36 g of docosahexaenoic acid in four divided doses; 30 patients used placebo in the same scheme. During one year follow-up were patients periodically examined - anthropometry (weight, waist circumference, BMI), biochemistry (liver enzymes, glucose metabolism etc.), blood count, abdominal ultrasound, liver stiffness measurement using ARFI[®], nuclear magnetic resonance spectroscopy (MRS; at the start and end of follow-up). After one year follow-up results were evaluated and statistically processed.

Of the 60 patients enrolled in the study were 45 men and 15 women, the mean age was 51.9 ± 12.2 years, the weight was 97.1 ± 15.2 kg and the mean BMI was 31.25 ± 4.25 . There was no significant difference in any of these parameters among the monitored groups (PUFA versus placebo) at the beginning of the study. Similarly, between both groups there was no significant difference in other key parameters - ALT, GGT, or the percentage of fat in the liver tissue determined by MRS.

After one year follow-up, no changes in anthropometric data (weight, waist circumference, or BMI) were observed in the patients enrolled in the study. On the other hand, there was a significant decrease in GGT activity in the PUFA group (2.27 ± 2.71 vs. 1.43 ± 1.55 ukat/L, $P = 0.0397$), without any change in the placebo group (2.31 ± 3.37 vs. 2.03 ± 2.8 ukat/L, $P = 0.064$). Other observed biochemical parameters (ALT, AST, ALP, and bilirubin) remained unchanged in both groups. During the follow-up liver elastography did not change in either group, as well as percentage of fat in hepatic tissue measured by MRS in both groups (PUFA 13.44 ± 7.7 %, placebo 13.24 ± 9.1 %).

We observed significant decrease in GGT serum activity after 12 months of PUFA administration, the total amount of liver fat remained unchanged. We conclude that PUFA could represent a potential agent in preventing the development of NAFLD in patients with metabolic syndrome.

This work was supported by grants: AZV 15-28745A a SVV 260370/2018

VZTAH NECHOLESTEROLOVÝCH STEROLŮ A KARDIOMETABOLICKÝCH RIZIKOVÝCH FAKTORŮ

ASSOCIATION OF NONCHOLESTEROL STEROLS WITH CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS

M. Vecka^{1,2}, A. Žák¹, E. Tvrzická^{1,2}, M. Dušejovská¹, B. Staňková^{1,2}, M. Zeman

^{1/}IV. interní klinika, ^{2/} Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze

Abstract

Cardiometabolic/metabolic syndrome (MetSy) represents cluster of cardiovascular risk factors and insulin resistance. We examined 243 patients with present MetSy and 204 individuals without MetSy with similar distributions of gender and age for plasma surrogate markers of cholesterol homeostasis (lathosterol, campesterol and β -sitosterol). The MetSy group exhibited higher concentrations of cholesterol biosynthesis and lower values for markers of cholesterol absorption. The components of MetSy are in close relationship with all the markers, insulin being more tightly bound than glucose and TAG than HDL-C with these markers.

Úvod

Kardiometabolický, respektive metabolický syndrom (MetSy) je jedním z nejvýznamnějších zdravotních problémů v průmyslově rozvinutých zemích Severní Ameriky a Střední a Západní Evropy (Deen, 2004). Jeho prevalence u osob středního věku dosahuje až 1/3, přičemž v roce 2035 by mohlo toto číslo dosáhnout více než 50% (Gierach, 2014). Kardiometabolický syndrom představuje cluster kardiovaskulárních (KV) rizikových faktorů (RF) ve spojení s inzulínovou rezistencí (IR). Jednotlivé složky MS [dyslipidémie, hypertenze, IR, hyperkoagulace, oxidační stres a chronický zánět] splňují kritéria nezávislých RF ICHS a jejich ekvivalentů (NCEP 2002) (Gotto, 2003). Etiologie MetSy je multifaktoriální. Hlavními příčinnými faktory jsou zvýšený energetický přísun a fyzická inaktivita a z nich rezultující nadváha a obezita; významné jsou dietní vlivy, stárnutí i genetické faktory.

Patogeneze MetSy i jeho jednotlivých komponent není zcela jasná. Usuzuje se, že centrální obezita a inzulínová rezistence tukové tkáně a dalších tkání (kosterní svalstvo, játra, pankreas) jsou hlavní příčinné faktory MetSy, přičemž možným spojovacím článkem mezi obezitou, IR a poruchou sekrece inzulínu je dysregulace metabolismu mastných kyselin (McGarry, 2002, Lewis, 2002).

S MetSy je spojována i snížená intestinální resorpce cholesterolu (Simonen, 2000). U MetSy, ale i u DM 2. typu byly prokazovány zvýšené koncentrace prekurzorů cholesterolu (skvalen, $\Delta 8$ -cholestenol, desmosterol a lathosterol), které jsou ukazatelem syntézy cholesterolu *de novo*, a snížené koncentrace cholestanolu a fytosterolů (kampesterol, β -sitosterol), které jsou markerem resorpce exogenního cholesterolu (Gylling, 2002).

Cílem této studie bylo zjistit vliv komponent kardiometabolického syndromu na ukazatele homeostázy cholesterolu. Jako ukazatel syntézy cholesterolu *de novo* byla měřena koncentrace prekurzoru - lathosterolu (resp. poměr k celkovému cholesterolu (TC)), nepřímým ukazatelem resorpce cholesterolu byly koncentrace fytosterolů – kampesterolu a β -sitosterolu (resp. jejich poměry k TC).

Materiál a metody

Soubor nemocných

Do studie byli zařazeni probandi vyšetření v lipidové a diabetologické ambulanci IV. interní kliniky 1. LF UK a VFN. Jednalo se o osoby s podezřením na metabolickou poruchu

(dyslipidémie, obezita, poruchy glukózové homeostázy). Dále byly vyšetřeny zdravé (kontrolní) osoby získané z okruhu zdravotnického personálu kliniky a dobrovolníků. Základní klinické, antropometrické a biochemické charakteristiky nemocných jsou uvedeny v tabulce 1. Diagnostika MetSy byla provedena podle kritérií Mezinárodní diabetologické federace (International Diabetes Federation, IDF, 2009) (Alberti, 2009). Dále jsme jako kontinuální proměnnou odrážející kardiometabolické riziko vypočítali dva druhy MetSy skóre vycházející ze všech 5 komponent definice MetSy (Wiley, 2016, Gurka, 2014).

Klinické a antropometrické vyšetření

Základní klinická data a antropometrické parametry byly vyšetřeny u všech osob dříve doporučenými postupy (Lochman, 1989). Tělesná hustota a podíl tělesného tuku byly určeny ze součtu tloušťky kožních řas (Durnin, 1974). Součástí vyšetření byl výpočet ukazatelů inzulinové senzitivity – HOMA (homeostasis model assessment) index inzulinové rezistence (Matthews, 1985).

Laboratorní analýzy

Koncentrace základních biochemických parametrů byly měřeny enzymaticko-kolorimetrickými metodami, imunoreaktivní inzulin (IRI) byl stanoven RIA metodou, koncentrace C-peptidu byly určeny chemiluminiscenční metodou. Koncentrace konjugovaných dienu v precipitovaných LDL byly stanoveny spektrofotometricky (Ahotupa, 1996). Ke stanovení koncentrací necholesterolových sterolů jsme použili kapilární plynovou chromatografii (Ågren, 2001). Subfrakce LDL byly analyzovány pomocí diskontinuální gelové elektroforózy na polyakrylamidovém gelu (Lipoprint® LDL/HDL System, Quantimetrix, U.S.A.)

Statistické hodnocení

Kontinuální veličiny jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Kategorické veličiny jsou vyjádřeny počty případů, resp. podílem z celkového počtu. Statistické zpracování (u každého hodnocení je uveden typ statistického testu) bylo prováděno s pomocí STATISTICA® CZ ver.12 pro Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, U.S.A.).

Výsledky

Tabulka 1 ukazuje základní klinické a antropometrické údaje vyšetřeného souboru rozděleného na jedince s MetSy a kontrolní skupinu. Skupina osob s MetSy je zhruba o 2 roky starší ($p < 0,05$). Proto byla provedena adjustace všech sledovaných dat na věk. I po adjustaci na věk přetrvávají ve skupině osob s MetSy charakteristické ukazatele typické pro MetSy: zvýšený výskyt arteriální hypertenze, vyšší průměrné hodnoty obvodu pasu, systolického a diastolického TK, hmotnosti (resp. procentuálního zastoupení) tělesného tuku. Rozdíly průměrů vybraných biochemických ukazatelů a parametrů glukózové homeostázy jsou konzistentní s diagnózou MetSy, který ještě nemá porušenou sekreci inzulinu. Osoby s MetSy mají známky subklinického zánětu a oxidačního stresu. V tabulce 1 jsou dále uvedeny koncentrace lipidů v plazmě. Po adjustaci na věk významnost rozdílů koncentrací TC v plazmě již nepřetrvává.

Table 1: Basic clinical, anthropometric and biochemical data

	Non MetSy	Metabolic syndrome ¹	Statistical significance
Number of cases	204	243	-
Males/females	90/114	126/114	0,0782 ^b
age (years)	55,4 ± 11,6 ^a	57,7 ± 10,3	0,0256 ^c
body mass (kg)	75,5 ± 14,3	88,2 ± 16,6 ***	0,0001
waist circumference (cm)	89,3 ± 11,8	102,1 ± 11,4 ***	0,0001
BP-systolic (mm Hg)	128 ± 15	138 ± 16 ***	0,0001
BP-diastolic (mm Hg)	82 ± 10	87 ± 10 ***	0,0001
body fat (% of body weight)	33 ± 8	36 ± 8 ***	0,0001
uric acid (µmol/l)	295 ± 76	348 ± 87 ***	0,0001
glucose (mmol/l)	4,9 ± 0,9	5,7 ± 1,6 ***	0,0001
insulin (mU/l)	7,5 ± 3,4	14,6 ± 10,1 ***	0,0001
HOMA index ²	1,69 ± 1,31	3,81 ± 3,16 ***	0,0001
Conjugated dienes in LDL (µmol/l)	57,3 ± 16,8	68,9 ± 20,6 ***	0,0001
Total cholesterol (mmol/l)	5,78 ± 1,19	6,08 ± 1,91	0,0460
Triacylglycerols (mmol/l)	1,36 ± 1,00	3,13 ± 4,03 ***	0,0001
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,62 ± 0,41	1,32 ± 0,35 ***	0,0112
VLDL (% of chol)	23,1 ± 6,9	27,1 ± 6,6 ***	0,0001
total LDL (% of chol)	52,5 ± 7,5	53,6 ± 7,3	NS
- IDL (IDL _{A-C}) ^d (% of chol)	26,0 ± 5,9	26,0 ± 5,3	NS
- large LDL (LDL ₁₋₂) ^d (% of chol)	24,9 ± 5,7	24,3 ± 5,4	NS
- small LDL (LDL ₃₋₇) ^d (% of chol)	1,7 ± 2,2	3,2 ± 3,2 ***	0,0015
sum of HDL fractions (% of chol)	24,2 ± 6,2	19,3 ± 5,7 ***	0,0001

^{a/} average ± SD; ^{b/} χ^2 test; ^{c/} unpaired t-test; Significance after age adjustment: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANCOVA); ^{1/} Metabolic syndrome: 3 or more of following factors: waist > 102 (resp. 88) cm in M (resp. F); TAG > 1,70 mmol/l; HDL-C < 1,00 (resp. 1,30) mmol/l in M (resp. F); BP > 130/85 mm Hg (or antihypertensive treatment), fs glucose > 5,60 mmol/l (or presence of 2 type DM); ² - index HOMA = glucose(mmol/l)*insulin(mU/l)/22.5; ^d - subscripts denote the respective fraction of the lipoprotein class determined using the Lipoprint kit;

Analýza dvou faktorů - vlivu MetSy (faktoru 1) a vlivu pohlaví (faktoru 2), která byla hodnocena analýzou rozptylu (ANOVA), je uvedena v tabulce 2. Koncentrace lathosterolu (resp. poměru lathosterol/TC) a poměry kampesterol/TC a β -sitosterol/TC jsou ovlivněny pouze faktorem MetSy, faktor pohlaví se zde neuplatňuje. Jako jednotlivé komponenty MetSy jsme uvažovali faktory podle definice IDF (Alberti, 2009); dále jsme zkoumali vztah koncentrací necholesterolových sterolů k hyperurikémii, jež je také spojována s MetSy (Cohn, 2005) a apoB. Korelace všech těchto faktorů s koncentracemi necholesterolových sterolů vztažených na TC je uvedena v tabulce 3. Mimo glukózy se u všech komponent MetSy podařilo prokázat korelační vztah; závislost poměrů necholesterolových sterolů/TC na počtu komponent MetSy ukazuje obrázek 1.

Table 2 Gender and MetSy effect on the concentration of noncholesterol sterols

parameter	group				Factor effect ^c		
	males		females		gender	MetSy	interaction
	MetSy-no	MetSy-yes	MetSy-no	MetSy-yes			
lathosterol/TC (µmol/mmol)	1,2 ± 0,7	1,3 ± 0,6	1,1 ± 0,4	1,3 ± 0,7	0,2377	0,0031	0,5425
kampesterol/TC (µmol/mmol)	1,9 ± 0,7	1,8 ± 0,7	2,0 ± 0,9	1,7 ± 0,8	0,4727	0,0128	0,5775
β-sitosterol/TC (µmol/mmol)	1,8 ± 0,9	1,6 ± 0,9	1,8 ± 1,1	1,7 ± 0,8	0,7090	0,0308	0,6346

^{a/} average ± SD; ^{c/} ANOVA (analysis of variance); there was no difference between average values in males and females in the MetSy and control group (t-test with Bonferroni correction). Abbreviation: TC – total cholesterol

Diskuze

Osoby s MetSy měly charakteristické klinické a antropometrické parametry (vyšší obvod pasu, vyšší relativní podíl tuku i hodnoty TK) ve srovnání s kontrolní skupinou. Konzistentním nálezem s MetSy jsou rovněž vyšší koncentrace glukózy, inzulínu i HOMA indexu (Matthews, 1985). Vyšší koncentrace konjugovaných dienu v LDL jsou ukazatelem subklinického (systémového) zánětu a oxidačního stresu. Tyto parametry jsou rovněž součástí patofyziologie MetSy (Grundy, 2006; Gotto, 2003). Obě skupiny se významně lišily věkem; je známo, že věk je faktorem, který se podílí na rozvoji MetSy a zhoršuje inzulínovou rezistenci (Grundy, 2006). Adjustací na věk vymizela již tak nízká významnost rozdílů u TC. Charakteristické složení lipidů plazmy pro MetSy je rovněž ovlivněno věkem a s ním souvisejícími faktory (BMI, inzulínemie a IR), které se významně podílejí na rozvoji dyslipidémie u IR (Gotto, 2003).

U obézních jedinců s DM2 byla popsána snížené střevní vstřebávání cholesterolu a zvýšená syntéza cholesterolu. U MetSy, DM 2. typu, ale i u zdravých osob, byly prokazovány zvýšené koncentrace prekurzorů cholesterolu, které jsou ukazatelem syntézy cholesterolu *de novo*, a snížené koncentrace fytoosterolů, které jsou markerem resorpce exogenního cholesterolu (Gylling, 2002; Chan, 2003). Je známo, že tělesná hmotnost (resp. BMI), inzulínemie a metabolická clearance glukózy pozitivně korelují se syntézou cholesterolu (hodnocenou koncentracemi jeho prekurzorů) a negativně s jeho resorpcí (hodnocenou koncentracemi fytoosterolů) (Simonen, 2002a; Pihlajamäki, 2004).

Absorpci cholesterolu u MetSy, diabetiků i zdravých osob ovlivňují genetické vlivy řídící transportéry cholesterolu v enterocytech a hepatocytech (ABCG5/G8, NPC1L1, ABCA1) (Chan, 2004; Gylling, 2004). Významné jsou také faktory nutriční a metabolické, jako je energetický přísun, tělesná hmotnost (resp. BMI), koncentrace inzulínu, glykémie (Pihlajamäki, 2004; Simonen, 2002b) a obsah tuků (resp. jejich charakter) v potravě. Zdá se, že vlastním mechanismem, který zprostředkovává spojení mezi zvýšenou syntézou cholesterolu (resp. jeho potlačenou absorpcí) a inzulínovou rezistencí (Gylling, 2004) jsou koncentrace inzulínu (Pihlajamäki, 2004). V našem souboru jsme prokázali, že parametry syntézy i absorpce cholesterolu (koncentrace lathosterolu, kampesterolu, β-sitosterolu resp. jejich poměry k TC) ovlivňuje faktor MetSy, vliv pohlaví se zde neuplatnil.

Table 3 Correlation of MetSy components with noncholesterol sterols

MetSy component	lathosterol/TC ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	campesterol/TC ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	β -sitosterol/TC ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)
waist circumference (cm)	0,1756 ***	-0,1731 ***	-0,2102 ***
uric acid ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	0,2157 **	-0,1853 ***	-0,1604 ***
glucose (mmol/l)	0,0493	-0,0349	-0,0226
insulin (mU/l)	0,1344 **	-0,0778	-0,1006 *
TAG (mmol/l)	0,1187 *	-0,1959 ***	-0,1170 *
HDL-C (mmol/l)	-0,1050 *	-0,0139	-0,0039
apo B (g/l)	0,1969 ***	-0,2636 ***	-0,1513 **
MAP (mmHg) ^{a/}	0,1337 **	-0,0644	-0,0700

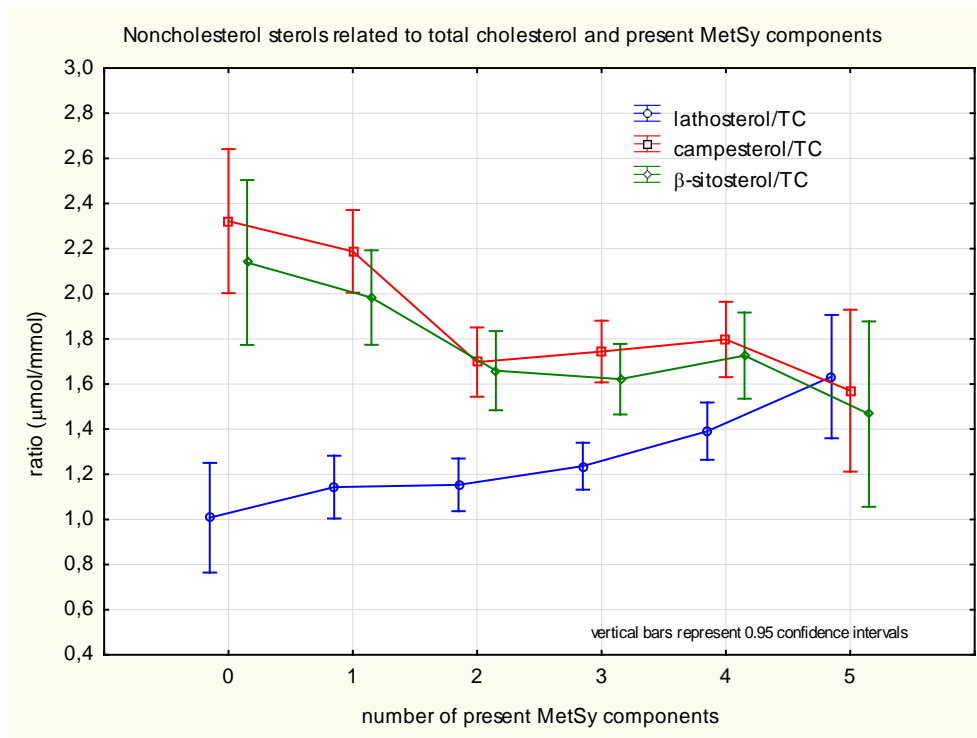
^{a/} MAP = mean arterial pressure [$= \text{dBp} + 1/3*(\text{sBP} - \text{dBp})$], TC – total cholesterol, TAG – triacylglycerols; the values in the Table represent Pearson coefficient of linear correlation R for N = 447, * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

Pro hodnoty korelací v tabulce 3 je charakteristická obrácená závislost pro parametry biosyntézy (poměr lathosterol/TC) a absorpce cholesterolu (poměry campesterol/TC a β -sitosterol/TC). Negativní vztah absorpce a biosyntézy cholesterolu je tedy u sledovaného souboru zachován, i když výsledné nastavení parametrů homeostázy cholesterolu může způsobit vyšší hladinu TC u pacientů s MetSy. Pozitivní korelace hodnot obvodu pasu s parametry biosyntézy cholesterolu odráží vztah tělesné hmotnosti (hmotnosti biosyntetických tkání) a koncentrace lathosterolu (Turley, 1986). Kyselina močová je pokládána za komponentu MetSy (Cohn, 2005). Patofyziologicky by mohl vztah kyseliny močové k necholesterolovým sterolům být podobný jako vztah inzulínu, protože inzulín ovlivňuje přes reabsorpci sodíku clearanci kyseliny močové (Facchini, 1991); vzájemná korelace inzulínu a kyseliny močové je charakterizována $R = 0,2596$ a $p < 0,001$.

U koncentrací glukózy se nám nepodařilo prokázat významnost korelací. Hladiny glukózy jsou ovlivňovány primárně hormonálními vlivy a pro koncentrace inzulínu už jsou korelace významné (tabulka 3). Hladiny plazmatických lipidů jako komponent MetSy (tj. TAG a HDL-C) ukázaly významný vztah s parametry biosyntézy cholesterolu, i když jejich korelace s parametry absorpce byla významná pouze pro TAG. Pouze jedna třetina jedinců s vysokými koncentracemi TAG má zvýšenou koncentraci lathosterolu (Asplund-Carlson, 1999) a reverzní transport cholesterolu sice v jedné studii koreloval záporně s biosyntézou cholesterolu, ale bez obráceného vztahu k absorpci cholesterolu (Assmann, 2007).

Pro jedince splňující kritéria MetSy jsme pozorovali vyšší zastoupení cholesterolu v částicích VLDL. Obézní jedinci mají vyšší koncentrace plazmatického lathosterolu a vyšší sekreci částic VLDL a také apo B (Riches, 1997). Absorpce cholesterolu bývá nižší u mírně hypercholesterolemických pacientů s non-inzulín dependentním DM, u kterých je biosyntéza cholesterolu vyšší (Gylling, 1997); diabetická komponenta má silnější vliv než tělesná hmotnost (Simonen, 2002c). Jaterní sekrece apo B v částicích VLDL je snížena pravděpodobně díky nižšímu portálnímu zásobení lipidy. Vliv na koncentrace apo B v částicích LDL není jistý (Riches 1999). Akutní restrikce přísunu energie, fytosterolů a cholesterolu u obézních má podobný účinek (Simonen, 2002b).

Obrázek 1



S přibývajícím počtem komponent se snižuje absorpce cholesterolu (poměry kampesterolu i β -sitosterolu k TC) a zároveň se zvyšuje hodnota poměru lathosterol/TC, která reflektuje úroveň biosyntézy cholesterolu (obrázek 1). Zvýšení jaterní syntézy cholesterolu je možné vysvětlit stimulací transkripčního faktoru SREBP2 působením nitrobuňkové deplece cholesterolu (Brown, 2009). Transportéry ABCG8/G5, NPC1L1 i ABCA1 se účastní procesů exkrece cholesterolu do žluče i resorpce sterolů střevem a mohou tak modifikovat „bazální nastavení“ metabolismu cholesterolu u zdravé populace i MetSy (Chan, 2004). Expresi transportního heterodimeru ABCG8/G5 je pod kontrolou inzulínu a IR má vliv i na expresi NPC1L1 (Tomkin, 2015). U IR může dojít k poruše regulačních mechanismů mezi syntézou cholesterolu a jeho absorpcí ve střevě tím způsobem, že zvýšená syntéza cholesterolu *de novo* je zkombinována s jeho zvýšeným vstřebáváním, jak naznačují změny trendů pro skupiny s více než 2 faktory MetSy.

Parametry glukózové homeostázy vyjádřené jako indexy HOMA naznačují postupný rozvoj inzulínové rezistence (data neuvedena, index HOMA stoupal). Všechny trendy jsou u mužů i žen podobné, pro popis průměrů hodnot skupin je všude vhodný lineární trend (všechna $p < 0.001$). Podobně jsou pro hodnocení kardiometabolického rizika pomocí ordinální proměnné (MetSy N) nebo kontinuálních proměnných (MetSy score I a II) charakteristické signifikantní vztahy mezi necholesterolovými steroly a hodnotami skóre (tabulka 4). Síla těchto závislostí je vyšší než pro samotné vztahy mezi NCS a jednotlivými složkami skórovacích systémů (tabulka 3). Oba skórovací systémy dosahují poměrně vysoké úspěšnosti při zařazení jedinců v naší studii do skupin non MetSy a MetSy (analýza ROC křivek (senzitivita/specificita), systém I: 82 %/67 %; systém II 90 %/77 %).

Table 4 Correlation of MetSy scores with noncholesterol sterols

MetSy severity score	lathosterol/TC ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	campesterol/TC ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	β -sitosterol/TC ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)
MetSy N ^a	0,1945 *** ¹	-0,1626 ***	-0,1062 *
MetSy score I ^b	0,1772 *** ²	-0,1953 ***	-0,1781 ***
MetSy score II ^c	0,1799 *** ²	-0,1735 ***	-0,1421 **

^a number of present MetSy components used for the definition of MetSy; ^b MetSy score I according to the matrix data from PCA analyses (Wiley, 2016); ^c MetSy score II according to the equations based on for non-Hispanic white adult population (Gurka, 2014); ¹ Spearman rank order coefficient, ² Pearson coefficient of linear correlation; * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

Závěr

U MetSy jsme zjistili zvýšenou syntézu cholesterolu a pokles jeho střevní absorpce, přičemž tyto trendy se prohlubovaly se zvyšujícím se počtem komponent MetSy. Koncentrace lathosterolu, resp. poměr lathosterol/TC (které reflektují syntézu cholesterolu) a poměry kampesterol/TC a β -sitosterol/TC (které odrážejí střevní absorpci cholesterolu) jsou ovlivněny pouze faktorem MetSy, faktor pohlaví se zde neuplatňuje. Jednotlivé komponenty MetSy mají významný vztah k parametrům jak biosyntézy, tak absorpce cholesterolu, přičemž z hlediska vztahu parametrů homeostázy lipidů a glukózy mají koncentrace inzulínu těsnější vztah než glukóza a TAG než HDL-C.

Studie byla podporována výzkumným záměrem RVO-VFN64165/2012, PROGRES Q25/1LF a MPO-FV10380

Literatura

Ågren JJ, Tvrzická E, Nenonen MT, et al. Divergent changes in serum sterols during a strict uncooked vegan diet in patients with rheumatoid arthritis. *Brit J Nutr* 2001; 85(2): 137-139.

Ahotupa M, Ruutu M, Mantyla E. Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem* 1996; 29(2): 139-144.

Alberti KG, Eckel RH, Zimmet PZ, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120(16): 1640-1645.

Asplund-Carlson A, Lund E, Björkhem I, Carlson LA. Studies in hypertriglyceridaemia. VI: Serum lathosterol concentration is raised in hypertriglyceridaemic non-diabetic males with hyperinsulinaemia. *J Int Med* 1999; 245(3): 247-252.

Assmann G, Cullen P, Kannenberg F, Schulte H. Relationship between phytosterol levels and components of the metabolic syndrome in the PROCAM study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14(2): 208-214.

Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lip Res* 2009; 50(Suppl.): S15-S27.

Cohn GS, Kittleson MM, Blumenthal RS. Toward an improved diagnosis of the metabolic syndrome other clues to the presence of insulin resistance. *Am J Hypertens* 2005; 18(8): 1099-1103.

Deen D. Metabolic syndrome: time for action. *Am Fam Physician* 2004; 69(12): 2875-2882.

Dixon WJ. BMDP Statistical Software Manual. Vol. 1-2. Los Angeles, CA, USA: University of California Press, Berkeley 1992.

Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Brit J Nutr* 1974; 32(1): 77-97.

Facchini F, Chen Y-D, Hollenbeck CB, Reaven GM. Relationship between resistance to insulin-mediated glucose uptake, urinary uric acid clearance, and plasma uric acid concentration. *J Am Med Assoc* 1991; 266(21): 3008-3011.

Gierach M, Gierach J, Ewertowska M, et al. Correlation between Body Mass Index and Waist Circumference in Patients with Metabolic Syndrome. *ISRN Endocrinol* 2014; 2014: 514589.

Gotto AM, Jr, Pownall HJ. Manual of lipid disorders. 3rd ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

Gurke MJ, Lilly CL, Oliver MN, DeBoer MD. An examination of sex and racial/ethnic differences in the metabolic syndrome among adults: a confirmatory factor analysis and a resulting continuous severity score. *Metab Clin Exper* 2014; 63(2): 218-225.

Gylling H, Miettinen TA. Cholesterol absorption, synthesis, and LDL metabolism in NIDDM. *Diabetes Care* 1997; 20(1): 90-95.

Gylling H, Miettinen TA. Inheritance of cholesterol metabolism of probands with high or low cholesterol absorption. *J Lipid Res* 2002; 43(9): 1472-1476.

Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamäki J, et al. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 2004; 45(9): 1660-1665.

Chan DC, Watts GF, Barrett PH, et al. Plasma markers of cholesterol homeostasis and apolipoprotein B-100 kinetics in the metabolic syndrome. *Obesity Research* 2003; 11(4): 591-596.

Chan DC, Watts GF, Barrett HR, et al. ATP-binding cassette transporter G8 gene as a determinant of apolipoprotein B-100 kinetics in overweight men. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2004; 24(11): 2188-2199.

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23(2): 201-229.

Lochman T, Roche A, Martorel R. (eds). Standardization of anthropometric measurements. Champaign: Human Kinetics Publishers, 1989, 39-80.

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. *Diabetologia* 1985; 28(7): 412-419.

McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(1): 7-18.

Pihlajamäki J, Gylling H, Miettinen TA, Laakso M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. *J Lipid Res* 2004; 45(3): 507-512.

Riches FM, Watts GF, Naoumova RP, et al. Direct association between the hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 and plasma mevalonic acid and lathosterol concentrations in man. *Atherosclerosis* 1997; 135(1), 83-91.

Riches FM, Watts GF, Hua J, et al. Reduction in visceral adipose tissue is associated with improvement in apolipoprotein B-100 metabolism in obese men. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; 84(8): 2854-2861.

Simonen PP, Gylling H, Howard AN, Miettinen TA. Introducing a new component of the metabolic syndrome: low cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(1): 82-88.

Simonen PP, Gylling H, Miettinen TA. Body weight modulates cholesterol metabolism in non-insulin dependent type 2 diabetics. *Obesity Research* 2002a; 10(5): 328-335.

Simonen PP, Gylling H, Miettinen TA. Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless of obesity. *Diabetes Care* 2002b; 25(9): 1511-1515.

Simonen PP, Gylling H, Miettinen TA. Acute effects of weight reduction on cholesterol metabolism in obese type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2002c; 316(1-2): 55-61.

Tomkin GH, Owens D. Dyslipidaemia of diabetes and the intestine. *World J Diabetes* 2015; 6(7): 970-977.

Turley SD, Hansen CT. Rates of sterol synthesis in the liver and extrahepatic tissues of the SHR/N-corpulent rat, an animal with hyperlipidemia and insulin-independent diabetes. *J Lipid Res* 1986; 27(5): 486-496.

Wiley JF, Carrington MJ. A metabolic syndrome severity score: A tool to quantify cardio-metabolic risk factors. *Prev Med* 2016; 88, 189-195.

ELONGÁZY MASTNÝCH KYSELIN – VÝZNAM VE FYZIOLOGII A KLINICE**ELONGASES OF FATTY ACIDS – PHYSIOLOGICAL AND CLINICAL SIGNIFICANCE****M. Zeman, J. Macášek, M. Vecka, B. Staňková, A. Žák***Univerzita Karlova Praha, 1. lékařská fakulta, IV. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze***Abstract**

Fatty acids serve not only as an energy source, but they significantly influence metabolism of human cells and tissues. Fatty acids in organism come both from the diet and from endogenous synthesis *de novo*. At first, saturated fatty acids are endogenously synthesized up to palmitic acid. By sequential elongation and desaturation the long-chain or very long-chain saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids are created. Elongation of fatty acids is catalyzed by elongases enzymes (*elongation of very long-chain fatty acids*), coded in chromosome 6. In mammals, seven elongases are known, acting on specific spectrum of substrates. The article deals with the influence of individual elongases on the metabolic fate of fatty acids and on the ensuing pathophysiological consequences, which have been recognized up to now. The significance of some genetic variants of elongases for the development of diseased states and the influence of hypolipidemic drugs on the activities of elongases are mentioned, as well.

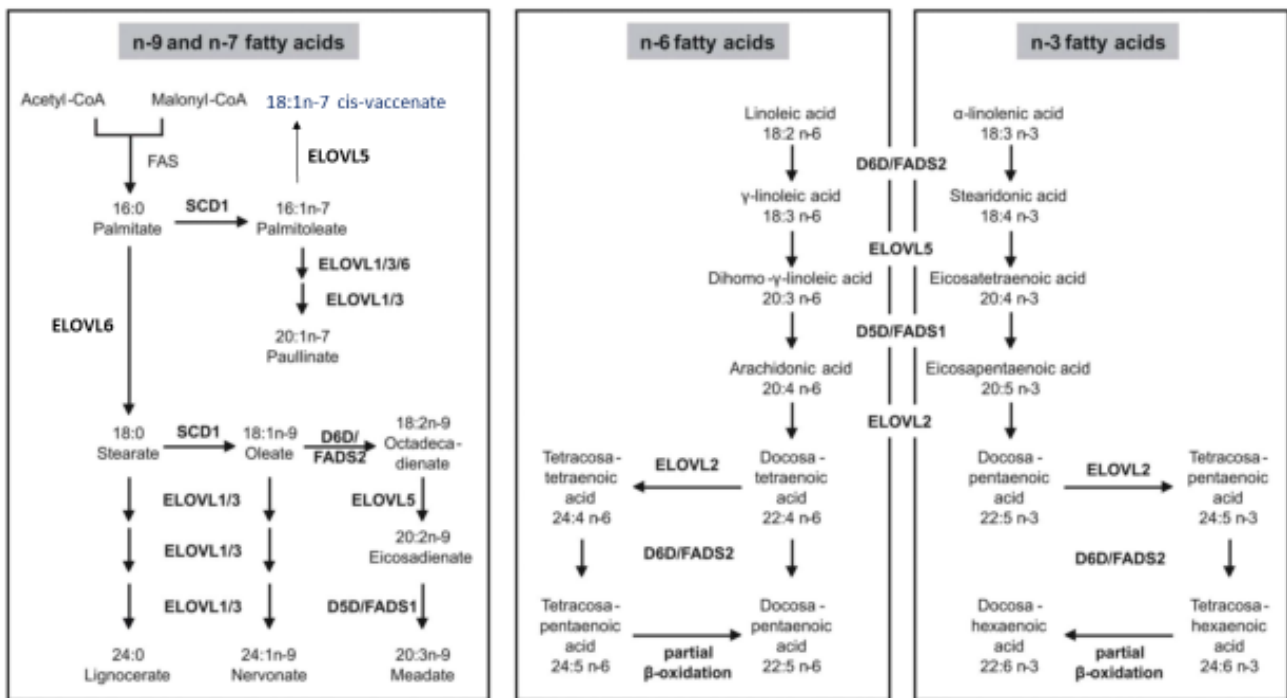
Abstrakt

Mastné kyseliny jsou v organismu zdrojem energie, ale také významným způsobem ovlivňují metabolismus buněk i tkání člověka. Mastné kyseliny jsou jednak přijímány ve stravě nebo jsou v organismu produkovány endogenní syntézou *de novo*. Endogenní syntézou jsou vytvářeny nasycené MK až ke kyselině palmitové. Postupnou elongací případně desaturací molekul MK jsou pak vytvářeny nasycené, monoenoové a polyenoové MK s dlouhým nebo velmi dlouhým řetězcem. Elongaci MK katalyzují enzymy elongázy (ELOVL, *elongation of very long-chain fatty acids*), kodované na chromozomu 6. U savců je známo 7 těchto elongáz, které působí na specifické spektrum substrátů. Článek podává přehled o vlivu jednotlivých elongáz na metabolický osud mastných kyselin i o dosud známých patofyziologických důsledcích těchto pochodů. Zmíněn je také význam některých genetických variant elongáz pro vznik chorobných stavů a popsány zatím známé vlivy působení hypolipidemik na aktivitu elongáz mastných kyselin.

Úvod

Mastné kyseliny (MK) jsou v organismu zdrojem energie, ale také významným způsobem ovlivňují metabolismus buněk i tkání člověka. Účastní se regulace struktury i funkce buněčných membrán, intracelulárních signálních cest, regulují aktivitu transkripčních faktorů a expresi genů (Calder, 2015). Mastné kyseliny vykonávají své funkce přímo, po aktivaci acyl koenzymem A, nebo ve formě různých derivátů. Např. se mohou jako ligandy vázat na transkripční faktory nebo ve formě oxidovaných produktů modulovat G-proteinové receptory buněčných povrchů a aktivovat příslušné signální kaskády (Jump a Clarke, 1999). Mastné kyseliny jsou jednak přijímány ve stravě nebo jsou v organismu produkovány endogenní syntézou *de novo*. Endogenní syntézou jsou vytvářeny nasycené MK až ke kyselině palmitové (16:0). Další MK [monoenoové a polyenoové s dlouhým (LCFA) nebo velmi dlouhým (VLCFA) řetězcem] jsou tvořeny postupnou desaturací a elongací molekul

MK. Substrátové MK jsou elongovány postupnou adicí dvouuhlíkatých jednotek elongázami kodovanými skupinou genů na chromozomu 6 a desaturovány zaváděním dvojných vazeb do molekuly desaturázami (jako delta-5 desaturáza, D5D a D6D), které jsou kodovány clusterem genů FADS (fatty acid desaturase) na chromozomu 11 (Žák et al., 2016; Barman et al., 2015; Zhang et al., 2016). Výsledné spektrum MK v různých tělesných oddílech (plasma, játra, tuková tkáň a další) je tedy dáno příjmem ve stravě, endogenní syntézou a následnými metabolickými pochody (beta-oxidace, desaturace a elongace). Postupně vznikají MK s delším řetězcem a více dvojnými vazbami (LC-PUFA s více než 18 uhlíky a VLC-PUFA s více než 22 uhlíky. Delta-9-desaturáza, D9D (synonym stearoyl-koenzym A-desaturáza-1, SCD-1) katalyzuje syntézu monoenových MK (MFA), zejména kyseliny palmitolejové (16:1n-7) a olejové (18:1n-7). MFA mají význam pro udržování lipidových struktur, pro signální transdukci, buněčnou diferenciaci i pro apoptózu. SCD-1 je považována za klíčový regulátor oxidace lipidů a de novo lipogeneze (Sampath a Ntambi, 2006). D5D a D6D katalyzují postupnou přeměnu MK na vícenenasycené MK (PUFA). U člověka desaturázy PUFA zavádějí dvojnou vazbu mezi dvojnou vazbu již existující a karboxylový konec PUFA (Meesapyodsuk a Qiu, 2012). Vliv desaturáz a elongáz na spektrum mastných kyselin v lidském organismu je znázorněn na obr.1.



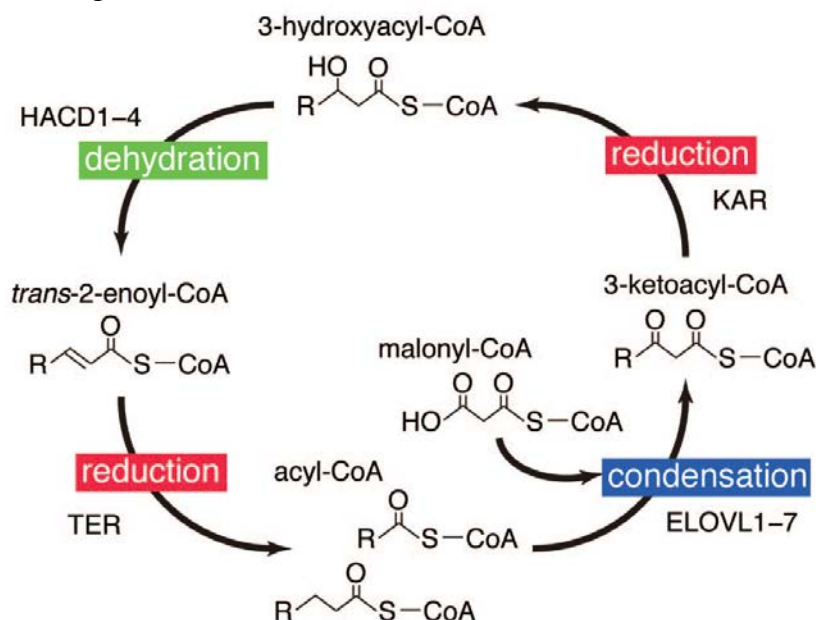
Sigruener 2014

Obr. 1. Vliv desaturáz a elongáz na spektrum mastných kyselin v organismu. *n-9 mastné kyseliny jsou odvozeny ze stearátu. n-7 mastné kyseliny jsou endogenně syntezovány z palmitátu. Výchozími články řady n-6 a n-3 řady mastných kyselin jsou kyselina linolová (18:2 n-6), resp. kyselina α -linolenová (18:3n-3), které nejsou syntezovány endogenně, ale musí být jako tzv. esenciální mastné kyseliny získány ve stravě (Podle Sigruener et al., 2014). D5D: delta-5 desaturáza; D6D: delta-6 desaturáza; ELOVL: elongázy (elongation of long chain fatty acids); FAS: syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase); SCD: stearoyl-CoA desaturáza (= delta-9 desaturáza).*

Elongázy mastných kyselin

Elongace MK probíhá v cytosolu, mitochondriích, a zejména v mikrosomech. Mikrosomální elongace MK probíhá ve 4 cyklech – kondenzace, redukce, dehydrace a redukce za účasti MK s 12 nebo více uhlíky jak z endogenních, tak z exogenních zdrojů (Guillou et al., 2010), viz též obrázek 2.

U savců je klíčová první, kondenzační reakce katalyzována enzymy elongázami (ELOVL, *elongation of very long-chain fatty acids*) (Denic a Weissman, 2007). Je známo sedm elongáz. ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6 a ELOVL7 katalyzují elongaci zejména SFA a MFA, zatímco ELOVL2, ELOVL4 a ELOVL5 preferují jako substrát PUFA (Guillou et al., 2010). ELOVL1, 3, 4, 6 a 7 se podílejí na elongaci SFAs a MFAs. ELOVL6 působí při elongaci C16:0-CoA nebo kratších nasycených MK. Distribuce jednotlivých elongáz v tkáních je typická a rozdíly v zastoupení jednotlivých MK v různých tkáních jsou alespoň zčásti podmíněny různou expresí ELOVLs. Geny pro ELOVL 1, 5 a 6 (*Elovl1*, *Elovl5* a *Elovl6*) jsou exprimovány ubikvitně, zatímco exprese *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl4* a *Elovl7* je výrazně tkáňově specifická. Produkty ELOVL 1, 5 a 6 jsou proto přítomny téměř ve všech tkáních (pro ELOVL1 charakteristické C24 sfingolipidy, pro ELOVL5 arachidonová kyselina, C20:4n-6 a pro ELOVL6 kyselina stearová, C18:0 (Guillou et al., 2010). Exprese ELOVL2 je nejvyšší v játrech a varlatech, ELOVL3 v tukové tkáni, kůži a játrech a ELOVL4 v sítnici, kůži, mozku a varlatech (Mandal, 2004). Tkáňově specifické exprese jednotlivých elongáz pravděpodobně souvisejí s požadavky příslušných tkání na specifické VLCFA, které jsou produkty určitých elongáz.



Obr. 2 Elongace mastných kyselin u savců. Je zobrazen elongační cyklus mastných kyselin a příslušné enzymy. Při každém cyklu acyl-CoA inkorporuje dvouuhlíkaté jednotky z malonyl CoA. ELOVL = *elongation of very long-chain fatty acids*; KAR = 3-ketoacyl-CoA reductase; HACD = 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase; TER = trans-2-enoyl-CoA reductase. (Sassa a Kihara, 2014).

Elongázy mastných kyselin u patologických stavů

ELOVL1 elonguje nasycené MK s 18-22 uhlíky, a monoenoové 20:1 n-9 a 22:1 n-9 acyl-CoA (Guillou et al., 2010) a je odpovědná za syntézu MK s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA). Elonguje mastné kyseliny s 22 uhlíky na (C22 MK) na C24 a 26 MK. ELOVL1 je exprimována ve všech tkáních, včetně nadledvinek, mozku a testis (Ohno et al., 2010). V savčích buňkách se nacházejí relativně velká množství sfingolipidů, obsahujících C24:0 nebo C24:1n-9. Tyto sfingolipidy jsou charakterizovány specifickými fyzikálními vlastnostmi, které umožňují v membránách vznik lipidových mikrodomén a ovlivňují i signální transdukcii. ELOVL1 se na syntéze sfingolipidů podílí a je hlavní elongázou, odpovídající za produkci sfingolipidů C 24 (Guillou et al., 2010). Vysoká exprese ELOVL1 je v myelinu CNS a nálezy u experimentálních myšičích modelů myelinizační deficeience ukazují na význam tvorby VLC-SFA a sfingolipidů pro myelinizaci (Guillou et al., 2010).

ELOVL2 (podobně jako ELOVL5) je specifická elongáza vícenenasycených MK. Expres ELOVL2 je nejvyšší v játrech a testes, ale je prokazována také v tukové tkáni, ledvinách, mozku a v plicích. ELOVL2 elonguje kyselinu arachidonovou (20:4 n-6), eikosapentaenovou (EPA, 20:5 n-3) adrenovou (dokosatetraenovou, DTA, 22:4n-6) a dokosapentaenovou (DPA, 22:5 n-3) (Guillou et al., 2010). U *Elovl2* konckoutovaných myší jsou zvýšené hladiny DTA a DPA, zatímco jejich deriváty jsou výrazně sníženy, což ukazuje, že aktivita ELOVL2 je rozhodující pro elongaci MK s 22 C, jak n-6, tak i n-3 řady. Navíc, chybění aktivity ELOVL2 působí až chybění PUFA s „ultra“ dlouhým řetězcem (ULC-PUFA), jako jsou např. kyseliny 26:5n-6 nebo 30:5n-6 ve varleti s následnou zástavou spermatogeneze a neplodností (Zadravec et al., 2011). V játrech má ELOVL2 význam pro tvorbu DHA a inhibici akumulace tuků v hepatocytu u NAFLD, přičemž důsledky poklesu endogenní syntézy DHA mohou být zmírněny exogenním přívodem DHA ve stravě (Pauter et al., 2014).

ELOVL3 je první elongázou MK identifikovanou u savců. Je exprimována v tukové tkáni, kůži, sebaceozních žlázkách, vlasových folikulech a játrech. Elonguje nasycené a monoenoové MK s 16 až 22 uhlíky, přičemž s nejvyšší aktivitou působí na elongaci aktivovaných MK s 18 uhlíky (Guillou et al., 2010). Z hlediska rozdílnosti metabolických vlastností jednotlivých tělesných depot tukové tkáně je zajímavé, že ELOVL3 je zvláště exprimována v hnědých a „běžových“ adipocytech a její exprese mnohonásobně stoupá v hnědé tukové tkáni po indukci chladem, což ukazuje na možnou funkční specificitu ELOVL3 (Westerberg et al., 2006). Delece genu pro ELOVL3 u myší působí poruchu tvorby srsti, hyperplastické sebaceozní žlázy a abnormality kožní bariéry. V lipidech srsti postižených hlodavců se hromadí kyselina gondoová (20:1 n-9), proto gondonyl-CoA by mohla být hlavním substrátem ELOVL3.

ELOVL4. Elonguje jak nasycené, tak nenasycené mastné kyseliny, je však specializována pro syntézu ULCFA, tedy MK s více než 26 uhlíky v řetězci (Ohno et al., 2010) a nachází se proto ve tkáních, které tvoří ULCFA tvoří. Patří sem zejména fotoreceptorové buňky v sítnici, v mozku a varlatech, kde jsou koncentrovány ULC-PUFA a také v kůži, kde se nacházejí ULC-SFA (Agbaga et al., 2010). ULC-PUFA v rozvíjejícím se i v dospělém mozku mají významné, dosud ne zcela známé funkce. Myši, homozygotní pro chybění *ELOVL4*, umírají za několik hodin po narození. Mutace genu pro ELOVL4 odpovídá za autosomálně dominantní formu Stargardtovy makulární degenerace (STGD). Makulární degenerace je charakterizována degenerativními změnami fotoreceptorů a atrofií retinálních pigmentových epitelů (Karan et al., 2005). Tyto nálezy ukazují na to, že pro normální funkci sítnice není důležitá jen DHA, ale také ULC-PUFA.

ELOVL5. Nejvyšší exprese ELOVL5 byla zjištěna v Purkyňových buňkách, plicích, testes, nadledvinkách, ale nachází se i v dalších tkáních. ELOVL5 je specifická pro PUFA s 18 a 20 uhlíky. Její funkce se částečně překrývá s ELOVL2, neelonguje však PUFA s 22 a více uhlíky. V nadledvinkách a varleti její aktivita působí akumulaci kyseliny adrenové (22:4n-6) a dokosapentaenové (22:5n-3). U *ELOVL5* *-/-* myší nedochází v mikrozomech k elongaci 18:3n-6 na 20:3n-6 a 18:4n-3 na 20:4n-3, což vede na jedné straně k akumulaci substrátů (18:3n-6 a 18:4n-3) a na druhé straně k poklesu výsledných produktů, tj. 20:4n-6 a 22:6n-3. Deplece těchto MK v hepatocytech pravděpodobně souvisí s rozvojem jaterní steatózy u těchto myší. Je zde také pozorována upregulace transkripčního faktoru SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein-1c*) a jeho cílových genů (Guillou et al., 2010). ELOVL5 kromě PUFA elonguje také některé MFA, jako kyselinu palmitolejovou (16:1n-7) za vzniku kyseliny cis-vakcénové (18:1n-7) (Wang et al., 2006; Tripathy a Jump, 2013). V experimentu vedla restaurace aktivity ELOVL5 v játrech obézních myší s porušenou glukozovou tolerancí k vzestupu koncentrace 18:1n-7 a několika PUFA s C 20-22 v játrech i v plasmě a současně k úpravě inzulinové rezistence, glukozové tolerance a k poklesu glykémie (Tripathy et al., 2010).

ELOVL6. ELOVL6 elonguje SFA a MFA s 12 - 16 uhlíky (Matsuzaka et al. 2002). Gen pro ELOVL6 je považován za klíčový gen, který se významně podílí na kontrole celkového profilu mastných kyselin v lidském organismu (Corominas et al., 2015; Matsuzaka et al., 2002) a ve spojení s funkcí syntázy mastných kyselin (FAS) a SCD-1 hraje zásadní roli pro syntézu nasycených i monoenoových mastných kyselin s dlouhým řetězcem (Matsuzaka et al., 2009). U myši je gen exprimován v nadledvinkách, játrech, bílé tukové tkáni, mozku, testes, a v kůži, tedy ve tkáních, kde dochází k aktivní lipogenezi a steroidogenezi (Matsuzaka et al., 2009). Expres ELOVL6 mRNA jak v játrech, tak v tukové tkáni je výrazně vyšší postprandiálně než nalačno, což ukazuje na význam ELOVL6 při syntéze LCFA (Corominas et al., 2015). Příjem vícenenasycených mastných kyselin v dietě expresi genu suprimuje, naopak u leptin-deficientních ob/ob myši je gen up-regulován (Matsuzaka et al., 2002). Expres ELOVL6 je upregulována současným působením SREBP-1c a ChREBP (*carbohydrate-responsive element-binding protein*) (Linden et al., 2018). Myši s delecí ELOVL6 byly chráněny před hyperinzulinémií, hyperglykemií a hyperleptinémií, indukovanou dietou s vysokým obsahem tuku (Matsuzaka et al., 2009). V játrech těchto zvířat je vyšší hladina MK C16:0 a 16:1, zatímco koncentrace 18:0 a 18:1 jsou sníženy. Úprava inzulinové rezistence byla spojena se zlepšením funkce jaterního inzulinového receptorového substrátu-2 a inhibicí aktivity jaterní protein kinázy C epsilon, což vedlo k obnově fosforylace Akt. Ve studii u mužů, kteří absolvovali rutinní koloskopii bylo zjištěno, že vzestup podílu kyseliny palmitolejové a elaidové v plasmatických fosfolipidech, aktivita SCD-1 a ELOVL6 jsou asociovány s výskytem adenomů tlustého střeva i po adjustaci na rizikové faktory spojené s obezitou (Pickens et al., 2016). Ve vzorcích tkáně hepatocelulárního karcinomu (HCC) u nemocných s kratším přežitím byla nalezena vyšší aktivita ELOVL6 než u osob s delším přežitím. Současně inhibice ELOVL6 v buňkách HCC u myši vedla k poklesu růstu tumoru a delšímu přežití (Su et al., 2018). ELOVL6 by mohla sloužit jako nový časný biomarker rizika některých nádorů, možná i jako terapeutický cíl.

ELOVL7 je exprimována v prostatě, ledvinách, pankreasu a v nadledvinkách (Tamura et al., 2009). ELOVL7 elonguje jak nasycené, tak nenasycené MK s 16 až 22 uhlíky, přičemž s nejvyšší aktivitou působí na 18:3n-6 a 18:3n-3 (Guillou et al., 2010). ELOVL7 je výrazně exprimována u karcinomu prostaty, kde se VLC-SFA a jejich deriváty podílejí na růstu a vitalitě nádorových buněk (Tamura et al., 2009).

Genetické varianty elongáz mastných kyselin

Jednotlivé elongázy mastných kyselin působí na mastné kyseliny na více úrovních, elongace probíhá u nasycených, monoenoových a polyenoových MK, a proto geneticky podmíněné odchylky aktivit jednotlivých ELOVL mohou výrazně ovlivnit výsledné spektrum MK v různých tkáních. V současné době je ovšem k dispozici jen málo informací o vlivu polymorfismů genů pro ELOVL na výskyt a průběh lidských onemocnění, i když výzkum této problematiky je intenzivní.

ELOVL6. Mezi nejvýznamnější geny z hlediska kontroly lipogeneze a profilu mastných kyselin u člověka je řazen gen pro ELOVL6. Zatím však bylo publikováno jen málo studií o významu polymorfismů ELOVL6 pro patogenezi chorobných stavů u člověka. Ve studii u populace jižního Španělska nosiči minoritních alel jednoduchých nukleotidových polymorfismů (SNP) rs9997926 a rs6824447 ELOVL6 měli nižší riziko inzulinové rezistence, vyjádřené jako HOMA-IR a naopak u nosičů minoritní alely SNP rs17041272 bylo toto riziko vyšší (Morcillo et al., 2011). Současně byla v této studii zaznamenána interakce mezi polymorfismem rs6824447 a příjmem slunečnicového oleje při ovlivnění inzulinové rezistence. Podle autorů studie by gen pro ELOVL6 mohl být terapeutickým cílem při léčbě diabetes mellitus typu 2 a přidružených onemocnění (Morcillo et al., 2011). V čínské *case-control* studii (Liu et al., 2013) u nově zjištěných diabetiků 2. typu a zdravých osob byly

studovány tři SNP ELOVL6 genu a v případě SNP rs12504538 byla zjištěna asociace CT genotypu s inzulinovou rezistencí ve srovnání s genotypem TT; homozygoti s minoritní alelou C nebyli nalezeni. U dalších dvou SNP (rs17041272 a rs6824447) nebyly zjištěny žádné asociace mezi genotypy či frekvencemi alel s inzulinovou rezistencí.

ELOVL2. U nosičů minoritních alel *ELOVL2* genu byla zaznamenána nižší úroveň elongace PUFA a v důsledku toho zvýšené koncentrace substrátů a snížené koncentrace produktů příslušných metabolických cest (de la Garza Puentés et al., 2017). U osob, zúčastněných ve studii InCHIANTI (populační studie u osob s průměrným věkem 68 let, žijících v Toskánsku v oblasti Chianti) byla zjištěna významná asociace polymorfismu *ELOVL2* (rs953413 G>A) s koncentrací EPA, zatímco ve studii GOLDN (*Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network*) byl SNP *ELOVL2* asociován s koncentrací kyseliny dokosapentaenové (22:5 n-3, DPA) a s DHA (vyšší hladiny DPA a nižší DHA u nosičů minoritní alely A) (Tanaka et al. 2009). Ve studii MARINA (*Modulation of Atherosclerosis Risk by Increasing doses of N-3 fatty Acids*) ve Velké Británii bylo zjištěno, že nosiči minoritních alel tří sledovaných SNP *ELOVL2* genu (rs3734398, rs2236212 and rs953413) měli významně nižší plasmatické koncentrace DHA. Podávání EPA + DHA (1,51:1) v dávce 1.8 g/den po dobu 6 měsíců významně zvýšilo jejich hladiny u nosičů minoritních alel ve srovnání s ostatními (Alsaleh et al., 2014).

ELOVL5. Aktivita *ELOVL5*, podobně jako *ELOVL2*, determinuje spektrum syntezy PUFA a tím i jejich následně tvořených derivátů. V čínské studii bylo zjištěno, že polymorfismy *ELOVL5* ovlivňují spektrum MK v mateřském mléce. Nosičky minoritních alel SNPs (rs2397142 a rs9357760) v *ELOVL5* měly vyšší hladiny kyseliny linolové (LA, 18:2n-6), dihomog- γ -linolenové (DGLA, 20:3n-6), dokosatetraenové (DTA, adrenové, 22:4n-6) a dokosaheptaenové (DHA, 22:6n-3) zatímco v případě polymorfismu rs209512 *ELOVL5* byla přítomnost minoritních alel spojena s nižší hladinou DTA než u homozygotů majoritních alel. Podíl geneticky podmíněné variability kolísal od 3,2 % u kyseliny eikosapentaenové k 6,0 % u kyseliny linolové (Li et al., 2017). Mutace genu pro *ELOVL5* působí spinocerebelární ataxii (SCA), což je heterogenní skupina autosomálně dominantních neurodegenerativních onemocnění. V jedné studii u SCA38 byla identifikována u *ELOVL5* mutace (c.689G > T [p.Gly230Val]) na 6. chromozomu. V séru postižených jedinců byly nalezeny snížené koncentrace kyseliny arachidonové (AA, 20:4 n-6) a DHA (Di Gregorio et al., 2014). Polymorfismy genu *ELOVL5* jsou asociovány s náchylností ke vzniku glaukomu (Petty, 2018), zvažuje se vztah nedostatku DHA k poškození neuronů oxidačním stresem. Na druhé straně v jedné studii nebyly u variací *ELOVL2*, *ELOVL4* a *ELOVL5* nalezeny asociace s mastnými kyselinami tukové tkáně, kardiovaskulárními rizikovými faktory (hsCRP, HDL-cholesterol, triacylglyceroly) nebo rizikem infarktu myokardu (Aslibekyan et al., 2012).

ELOVL4. Funkce *ELOVL4* a výsledné produkty jejího působení jsou nezbytné pro správnou funkci neuronů v sítnici i CNS. V současné době je identifikováno devět polymorfismů *ELOVL4*, které působí neurologická onemocnění. Heterozygotní formy různých mutací *ELOVL4* působí např. spinocerebelární ataxii typ 34 nebo Stargardt-like (STGD) makulární dystrofii. U pacienta s kombinací dvou variant v promotoru genu *ELOVL4*, c.-236 C > T (rs240307) a c.-90 G > C (rs62407622), byl nalezen významný pokles aktivity genu. Následný deficit VLC-PUFA vede k poruše funkce a životnosti tyčinek, podílející se na patogenezi STGD (Donato et al., 2018).

Možné ovlivnění elongáz mastných kyselin farmakoterapií

Vztahem léčby diabetes mellitus typu 2, dyslipidemií či jiných metabolických onemocnění k aktivitě elongáz mastných kyselin se zabývaly jen ojedinělé studie. V jedné práci Heemskerk et al. (2014) našli, že dlouhodobé podávání niacinu hyperlipidemickým myším

zvyšovalo syntézu PUFA n-3 v tukové tkáni (nikoliv v játrech) v důsledku zvýšené exprese genů pro ELOVL5 a ELOVL6. Aktivita genů pro desaturázy nebyly v této studii ovlivněny. Ve studii na buněčné kultuře myších adipocytů 3T3-L1 bylo zjištěno, že podávání atorvastatinu zvýšilo expresi mRNA FADS1, FADS2 a ELOVL5 v důsledku ovlivnění geranylgeranyl pyrofosfát (GGPP)-dependentní Rho kinázy (Ishihara et al., 2017). To koresponduje s nálezy z epidemiologických studií u lidí, kde léčba statiny vedla ke vzestupu koncentrací kyseliny arachidonové (AA) a poklesu poměru DHA/AA (Nozue et al., 2013). V experimentu na buněčných kulturách fibroblastů nemocných s adrenoleukodystrofií, vázanou na chromozom X, CoA estery bezafibrátu a gemfibrozilu inhibovaly ELOVL1, s následným poklesem patologicky vysokých koncentrací VLCFA (Schackmann et al., 2015).

Závěr

Působení jednotlivých mastných kyselin na metabolické aktivity organismu je mnohostranné a spektrum mastných kyselin tkáňově specifické. Profil mastných kyselin v jednotlivých tkáních je výsledkem jejich příjmu ve stravě, jejich endogenní syntézy, katabolismu a přeměny desaturačními a elongačními pochody, katalyzovanými enzymy desaturázami a elongázami. Genetické polymorfismy genů *FADS* i *ELOVL* ovlivňují hladiny LC-PUFA na všech úrovních syntézy. Elongázy hrají zásadní roli také při syntéze mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem - VLCFA (délka řetězce ≥ 22 uhlíků), jak nasycených, tak nenasycených. VLCFA jsou součástí membránových lipidů i prekursory lipidových mediátorů, zúčastněných v regulaci zánětu. Poruchy regulace mastných kyselin jsou spojeny s řadou chorobných stavů (např. diabetes mellitus, ateroskleróza a její komplikace, arteriální hypertenze, neuropsychiatrická i nádorová onemocnění). Elongázy mastných kyselin by mohly sloužit jako významné klinické biomarkery a v některých případech by modulace jejich aktivit mohla být i terapeutickým cílem.

Práce byla podporována výzkumným záměrem RVO-VFN64165/2012, PROGRES Q25/1LF a MPO-FV10380

Literatura

- Agbaga MP, Mandal MN, Anderson RE.** Retinal very long-chain PUFAs: new insights from studies on ELOVL4 protein. *J Lipid Res* 2010; 51(7): 1624-1642.
- Alsaleh A, Maniou Z, Lewis FJ, et al.** ELOVL2 gene polymorphisms are associated with increases in plasma eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid proportions after fish oil supplement. *Genes Nutr* 2014; 9(1): 362.
- Aslibekyan S, Jensen MK, Campos H, et al.** Genetic variation in fatty acid elongases is not associated with intermediate cardiovascular phenotypes or myocardial infarction. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66(3): 353-359.
- Barman M, Nilsson S, Torinsson Naluai Å, et al.** Single Nucleotide Polymorphisms in the FADS Gene Cluster but not the ELOVL2 Gene are Associated with Serum Polyunsaturated Fatty Acid Composition and Development of Allergy (in a Swedish Birth Cohort). *Nutrients* 2015; 7(12): 10100-10115.
- Calder PC.** Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2015; 39(1 Suppl): 18S-32S.
- Corominas J, Marchesi JA, Puig-Oliveras A, et al.** Epigenetic regulation of the ELOVL6 gene is associated with a major QTL effect on fatty acid composition in pigs. *Genet Sel Evol* 2015; 47: 20.

- de la Garza Puentes A, Montes Goyanes R, Chisaguano Tonato AM, et al.** PREOBE team. Association of maternal weight with FADS and ELOVL genetic variants and fatty acid levels- The PREOBE follow-up. *PLoS One* 2017; 12(6): e0179135.
- Denic V, Weissman JS.** A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* 2007; 130: 663-677.
- Di Gregorio E, Borroni B, Giorgio E, et al.** ELOVL5 mutations cause spinocerebellar ataxia 38. *Am J Hum Genet* 2014; 95(2): 209-217.
- Donato L, Scimone C, Rinaldi C, et al.** Stargardt Phenotype Associated With Two ELOVL4 Promoter Variants and ELOVL4 Downregulation: New Possible Perspective to Etiopathogenesis? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59(2): 843-857.
- Heemskerk MM, Dharuri HK, van den Berg SA, et al.** Prolonged niacin treatment leads to increased adipose tissue PUFA synthesis and anti-inflammatory lipid and oxylipin plasma profile. *J Lipid Res* 2014; 55(12): 2532-2540.
- Ishihara N, Suzuki S, Tanaka S, et al.** Atorvastatin increases Fads1, Fads2 and Elovl5 gene expression via the geranylgeranyl pyrophosphate-dependent Rho kinase pathway in 3T3-L1 cells. *Mol Med Rep* 2017; 16(4): 4756-4762.
- Jump DB, Clarke SD.** Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 63-90.
- Guillou H, Zadavec D, Martin PG, Jacobsson A.** The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 2010; 49: 186-199.
- Karan G, Lillo C, Yang Z, et al.** Lipofuscin accumulation, abnormal electrophysiology, and photoreceptor degeneration in mutant ELOVL4 transgenic mice: a model for macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(11): 4164-4169.
- Li X, Gan ZW, Ding Z, et al.** Genetic Variants in the ELOVL5 but not ELOVL2 Gene Associated with Polyunsaturated Fatty Acids in Han Chinese Breast Milk. *Biomed Environ Sci* 2017; 30(1): 64-67.
- Linden AG, Li S, Choi HY, et al.** Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice. *J Lipid Res* 2018; 59(3): 475-487.
- Liu Y, Wang F, Yu XL, et al.** Genetic analysis of the ELOVL6 gene polymorphism associated with type 2 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46(7): 623-628.
- Mandal MN, Ambasudhan R, Wong PW, et al.** Characterization of mouse orthologue of ELOVL4: genomic organization and spatial and temporal expression. *Genomics* 2004; 83: 626-635.
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, et al.** Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res* 2002; 43(6): 911-920.
- Matsuzaka T, Shimano H.** Elovl6: a new player in fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87(4): 379-384.
- Meesapyodsuk D, Qiu X.** The front-end desaturase: structure, function, evolution and biotechnological use. *Lipids* 2012; 47: 227-237.
- Morcillo S, Martín-Núñez GM, Rojo-Martínez G, et al.** ELOVL6 Genetic Variation Is Related to Insulin Sensitivity: A New Candidate Gene in Energy Metabolism. *PLoS One* 2011; 6(6): e21198.
- Nozue T, Yamamoto S, Tohyama S, et al.** Comparison of effects of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acid ratios on coronary atherosclerosis in patients treated with

pitavastatin or pravastatin undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2013; 111(11): 1570-1575.

Ohno Y, Suto S, Yamanaka M, et al. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(43): 18439-18444.

Pauter AM, Olsson P, Asadi A, et al. Elovl2 ablation demonstrates that systemic DHA is endogenously produced and is essential for lipid homeostasis in mice. *J Lipid Res* 2014; 55: 718-728.

Petty HR. Frontiers of Complex Disease Mechanisms: Membrane Surface Tension May Link Genotype to Phenotype in Glaucoma. *Front Cell Dev Biol* 2018; 6: 32.

Pickens CA, Lane-Elliot A, Comstock SS, Fenton JI. Altered Saturated and Monounsaturated Plasma Phospholipid Fatty Acid Profiles in Adult Males with Colon Adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016; 25(3): 498-506.

Sampath H, Ntambi JM. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor- α : independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9(2): 84-88.

Schackmann MJ, Ofman R, Dijkstra IM, et al. Enzymatic characterization of ELOVL1, a key enzyme in very long-chain fatty acid synthesis. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851(2): 231-237.

Sigruener A, Kleber ME, Heimerl S, et al. Glycerophospholipid and sphingolipid species and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *PLoS One* 2014; 9(1): e85724.

Su YC, Feng YH, Wu HT, et al. Elovl6 is a negative clinical predictor for liver cancer and knockdown of Elovl6 reduces murine liver cancer progression. *Sci Rep* 2018; 8(1): 6586.

Tamura K, Makino A, Hullin-Matsuda F, et al. Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. *Cancer Res* 2009; 69(20): 8133-8140.

Tanaka T, Shen J, Abecasis GR, et al. Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI Study. *PLoS Genet* 2009; 5(1): e1000338.

Tripathy S, Jump DB. Elovl5 regulates the mTORC2-Akt-FOXO1 pathway by controlling hepatic cis-vaccenic acid synthesis in diet-induced obese mice. *J Lipid Res* 2013; 54(1): 71-84.

Tripathy S, Torres-Gonzalez M, Jump DB. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity corrects dietary fat-induced hyperglycemia in obese C57BL/6J mice. *J Lipid Res* 2010; 51(9): 2642-2654.

Wang Y, Botolin D, Xu J, et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res* 2006; 47(9): 2028-2041.

Westerberg R, Månsson JE, Golozoubova V, et al. Elovl3 Is an important component for early onset of lipid recruitment in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 2006; 281(8): 4958-4968.

Zadravec D, Tvrdik P, Guillou H, et al. ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J Lipid Res* 2011; 52: 245-255.

Zhang JY, Kothapalli KS, Brenna JT. Desaturase and elongase-limiting endogenous long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016; 19(2): 103-110.

Žák A, Slabý A, Tvrzická E, et al. [Desaturases of fatty acids (FADS) and their physiological and clinical implication]. *Cas Lek cesk* 2016; 155(2): 15-21.

ANTILIPOLYTICKÉ ÚČINKY KYSELINY NIKOTINOVÉ A JEJÍCH METABOLITŮ: PILOTNÍ STUDIE

ANTILIPOLYTIC EFFECTS OF NICOTINIC ACID AND ITS METABOLITES: A PILOT STUDY

A. Žák¹, M. Vecka¹, B. Staňková¹, M. Zeman¹, R. Hromádka², F. Perlík³, A. Slabý¹, M. Burda⁴

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

²Centrum pro výzkum a vývoj, C2P s.r.o. Chlumec/n Cidlinou

³Farmakologický ústav I. LF UK a VFN v Praze

⁴Ústav pro výzkum a aplikace fuzzy modelování, Centrum excelence IT4Innovations, Ostravská Univerzita

Abstract

Elevated plasma concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA) have been associated with lipotoxicity, ectopic fat deposition in organs and tissues (liver, skeletal muscle, pancreas), chronic heart failure, suppressed growth hormone secretion, and ventricular arrhythmias. A long-term clinical experience indicates that niacin (nicotinic acid) produces beneficial effects on dyslipidemias and slows down progression of atherosclerotic cardiovascular disease. One of the mechanisms of the hypolipidemic effect of niacin is reduction of NEFA release from adipose tissue into free circulation, which is mediated by activated HCA2 receptors in adipocytes. To study plasma concentrations of niacin and its metabolites in relation to plasma NEFA changes. Plasma concentrations of niacin, its metabolites, and NEFA were assessed in 12 healthy subjects (5 M/7 F) of middle age (44.2 ± 12.5 years), after a single oral dose of 500 mg of niacin (Niaspan[®]), applied on three successive days. After the third dose, niacin and its metabolites were determined by a HPLC-MS method, NEFA by an enzymatic-colorimetric method. The dependency of changes in niacin, niacin metabolites and NEFA concentrations was studied using a stepwise multiple linear regression analysis. The relationship of the cutaneous flushing with the effects of niacin was assessed using and a linear mixed-effects model and a stepwise linear regression analysis. Plasma concentrations of NEFA have significantly decreased between the first and sixth hour after niacin administration ($P < 0.001$). The variance of the declines in NEFA depended by 81.4 % on the variance of three compounds, namely N-methyl-nicotinamide (48.0 %), nicotinic acid (21.8 %), and 2-methyl-2-pyridon-carboxamide (11.6 %). Cutaneous flushing has occurred in four subjects (25 %). The occurrence of flushing was associated with lower concentrations of nicotinuric acid (-60 %, $P < 0.05$). Subjects with flushing revealed the higher decrease in NEFA in comparison with subjects without skin toxicity ($P < 0.05$). The antilipolytic effect of niacin (decrease in NEFA) was mainly mediated by the metabolite N-methyl-nicotinamide; its relation to undesirable skin changes is controversial.

Úvod

Niacin (*synonymum* kyselina nikotinová, NA) byl zaveden do léčby dyslipidemií v polovině 50. let dvacátého století, kdy bylo prokázáno, že NA ve farmakologických dávkách snižuje u lidí cholesterolémii (Guyton et al., 2015). V r. 1975 publikovaná multicentrická, placebem kontrolovaná randomizovaná studie Coronary Drug Project (CDP) prokázala, že šestileté podávání NA s okamžitým nástupem účinku (IR Niacin) snížilo rekurenci nefatálního infarktu myokardu o 26 % a cerebrovaskulární příhody o 24 %, přičemž po 15 letech bylo zaznamenáno snížení celkové mortality o 11 % (CDP Research Group 1975; Canner et al.,

1986). V r. 1988 publikovaná Stockholm Ischemic Heart Disease Study prokázala, že pětileté podávání NA s klofibrátem snížilo celkovou mortalitu o 26 % a mortalitu na ischemickou chorobu srdeční o 36 % (Carlson et al., 1988). U niacinu byl prokázán příznivý účinek na plasmatické lipoproteiny – snižoval koncentrace triglyceridů, LDL-cholesterolu, lipoproteinu (a) a zvyšoval koncentrace HDL-cholesterolu. Navíc, niacin příznivě ovlivňoval patologickou distribucí velikosti částic LDL (Shepherd et al., 2005). Řada menších randomizovaných studií (CLAS, UCSF-SCOR, FATS, HARP, HATS, AFREGS, ARBITER-2, ARBITER-3, THONES CIMT, ARBITER6-HALTS, Oxford Niaspan Study) prokázala, že NA v monoterapii i v kombinaci s jinými hypolipidemickými léky (sekvestranty žlučových kyselin, statiny, fibráty) může zpomalit progresi či navodit regresi koronární aterosklerózy a zmenšit tloušťku komplexu intima-media, jak bylo dokumentováno zobrazovacími metodami (koronarografií, UZ vyšetřením karotid) (Blankenhorn et al., 1987; Brown et al., 1990; Guyton et al., 2015; Zeman et al., 2015).

Od konce 80. let minulého století se rozšiřovaly poznatky o příznivých i nežádoucích účincích NA, která byla podle doporučení národních i mezinárodních odborných společností indikována u všech dyslipidemií s výjimkou familiární chylomikronémie. NA ve srovnání s ostatními skupinami hypolipidemik se vyznačuje nižší tolerancí. Mezi nejčastější a nejzávažnější nežádoucí účinky léčby niacinu patří kožní zrudnutí (flush), insulinová rezistence a hepatotoxicita. V r. 2003 byl identifikován specifický receptor pro NA, který je spřažen s G-proteiny a byl označen jako GPR109A (*synonyma* HCA2, HM74) (Soga et al., 2013; Zeman et al., 2016).

V současnosti se předpokládá, že příznivé ovlivnění lipidového spektra a rizika aterosklerotických kardiovaskulárních chorob (ASCVD) je důsledkem pleiotropního anti-aterogenního působení niacinu. Příznivé účinky niacinu jsou uvedeny v tabulce 1.

Niacin nezávisle na změnách lipidového spektra zlepšuje endoteliální dysfunkci, snižuje oxidační stres, potlačuje subklinický zánět a urychluje eflux cholesterolu z makrofágů ateromových plátů (Zeman et al., 2016).

Ačkoliv statiny jsou lékem volby pro terapii dyslipidémie a ASCVD, odhaduje se, že až u 10 % léčených se vyskytuje statinová intolerance (Zhang et al., 2013; Colivicchi et al., 2007). Metaanalýza 26 klinických studií odhaduje, že při léčbě statiny přetrvává u 25 – 35 % osob významné reziduální kardiometabolické riziko (Baigent et al., 2010).

Dosud však nebylo dosaženo jednoty v názorech, zda přidání NA k léčbě statiny sníží u pacientů s ASCVD reziduální kardiovaskulární riziko. Negativní odpověď přinesly dvě velké randomizované studie (AIM-HIGH a HPS2-THRIVE) (Boden et al., 2011; Haynes et al., 2013; Landray et al., 2014). Kritické vyhodnocení těchto studií však upozornilo na závažné metodické chyby, týkající se především výběru nemocných, velikosti dávky niacinu i načasování jeho podávání (s jídlem během dne nebo před spaním), takže by nebylo správné negativní výsledky zobecňovat (Zeman et al., 2015; Zeman et al., 2016; Dunbar a Goel 2016; Superko et al., 2017).

Přestože ovlivnění lipoproteinového spektra je důsledkem komplexních účinků na metabolismus lipidů a lipoproteinů, zdá se, že základním a nejvýznamnějším účinkem niacinu je potlačení bazální a stimulované lipolýzy tukové tkáně a snížené uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) z tukové tkáně do krevního oběhu (Goel a Dunbar, 2016).

Bylo prokázáno, že zvýšené koncentrace plasmatických NEFA jsou jedním z významných faktorů lipotoxicity a ektopické akumulace tuků u obezity, diabetes mellitus 2. typu, metabolického syndromu i nealkoholové steatózy jater (Lottenberg et al., 2012; Saponaro et al., 2015; Tan et al. 2015). Navíc zvýšené koncentrace NEFA jsou dávány do příčinné souvislosti se vznikem endoteliální dysfunkce (Ghosh et al., 2017), diastolického srdečního selhání obézních a diabetiků (Fukushima a Lopaschuk, 2016) i maligních

komorových arytmií v průběhu akutního infarktu myokardu (Oliver, 2015). Elevace NEFA je asociována se sníženou syntézou a sekrecí růstového hormonu u obézních dětí a adolescentů (Galescu et al., 2018).

Aktivace GPR109A je spojena nejen anti-lipolytickými a protizánětlivými účinky niacinu v adipocytu a makrofázích, ale i s nežádoucími kožními projevy. Nejčastějším nežádoucím účinkem niacinu je kožní toxicita (NAST, niacin-associated toxicity) projevující se zarudnutím (flush), otokem, pruritem až bolestí v důsledku nadměrné kožní vazodilatace (Dunbar et al., 2017). Vznik NAST je dáván do souvislosti se syntézou kyseliny nikotinurové. Na obrázku 1 je schématicky znázorněna metabolická přeměna niacinu v játrech (Guyton et al., 2015; Menon et al., 2007).

Cíl práce

Cílem naší studie bylo: (1) sledovat změny plazmatických koncentrací NEFA v průběhu 24 hodin po třetí dávce jednorázového podání niacinu v množství 500 mg/den (Niaspan®) a stanovit jejich vztah k plazmatickým koncentracím kyseliny nikotinové (NA) a jejích metabolitů: nikotinamidu (NAM), 1-methyl-nikotinamidu (MNA), N-methyl-2-pyridon-5-karboxamidu (2-Pyr), N-methyl-4-pyridon-5-karboxamidu (4-Pyr) a kyseliny nikotinurové (NUA); (2) zjistit, zda se koncentracemi niacinu (resp. jeho metabolitů) a NEFA lišily osoby, u kterých došlo k rozvoji kožních změn (flush), od osob bez nežádoucích kožních projevů.

Materiál a metody

Vyšetřované osoby a uspořádání studie

Studie byla schválena Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Klinické hodnocení proběhlo podle zásad správné klinické praxe. Od všech osob byl získán písemný informovaný souhlas.

Farmakokinetická analýza niacinu a jejích metabolitů byla provedena na souboru 12 zdravých dobrovolníků. Jejich základní demografická data jsou uvedena v tabulce 2. Před započítím studie byly všechny pokusné osoby klinicky a laboratorně vyšetřeny. U žádného z dobrovolníků nebyly zjištěny klinické ani laboratorní nálezy, které by kontraindikovaly podání niacinu a zařazení do studie. Žádná z osob nebyla léčena na chronické onemocnění.

Ve studii byl sledován průběh změn plazmatických koncentrací niacinu (resp. jeho metabolitů) a NEFA po opakovaném jednorázovém perorálním podání niacinu (přípravek Niaspan®) v denní dávce 500 mg niacinu, aplikované ve třech po sobě následujících dnech. Farmakokinetika niacinu byla sledována po třetí dávce niacinu.

V den vyšetření byl po zavedení žilního katetru odebrán první vzorek krve nalačno (12 hodin po posledním jídle) a pak podána jedna tableta Niaspanu® s malým množstvím vody (100 ml). Další vzorky krve byly odebírány v průběhu 24 hodin (0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 3 - 4 - 6 - 8 - 12 a 24 hodin). Během vyšetření byla podána snídaně (za 1,5 hodiny po prvním odběru) a lehký oběd (za 4 hodiny po prvním odběru). Byly zaznamenány subjektivní i objektivní údaje o nežádoucích příznacích. Intenzita flushu byla klasifikována jako 1 (mírný flush obličeje), 2 (středně výrazný na obličeji a krku) nebo 3 (výrazný na obličeji, pažích a trupu, spolu se svěděním kůže).

Tabulka 1 Pleiotropní antiaterogenní účinky kyseliny nikotinové

Ovlivnění dyslipidémie
<p>Snížení koncentrace TG</p> <ul style="list-style-type: none"> - inhibice bazální i stimulované lipolýzy → ↓ koncentrace NEFA → ↓ syntézy TG - inhibice PGC-1β (spolu se SREBP1c) → ↓ lipogeneze - zvýšená degradace apoB100 → pokles sekrece VLDL - inhibice DGAT2 → inhibice terminálního kroku syntézy TG → ↓ sekrece VLDL <p>Snížení koncentrace LDL-cholesterolu</p> <ul style="list-style-type: none"> - ↓ produkce VLDL → ↓ produkce LDL - ↑ degradace apoB100 - inhibice PCSK9 a ↑ katabolismus LDL v játrech <p>Zvýšení koncentrace HDL-cholesterolu</p> <ul style="list-style-type: none"> - aktivace RCT (cestou aktivace PPARγ → LXRα → ABCA-1) - stimulace jaterní biogeneze HDL (aktivace LXRα → DR4 dependentní transkripce ABCA1 a lipidace apoA-I v hepatocyty) - ↓ katabolismu HDL v játrech (inhibice receptorů degradujících celé částice HDL)
Ovlivnění funkce tukové tkáně
<ul style="list-style-type: none"> - ↑ syntézy n-3 PUFA v tukové tkáni - up-regulace genů syntézy nenasycených FA v tukové tkáni (Elovl5,-6, Tecd) - zvýšení exprese genu pro adiponektin
Protizánětlivé působení
<ul style="list-style-type: none"> - redukce syntézy MCP-1, RANTES, fractalkin (makrofágy, T-lymfocyty) → potlačení infiltrace tkáni makrofágy a T-lymfocyty - inhibice syntézy TNFα → ↓ exprese iNOS → ↓ produkce ROS - stimulace exprese PPARγ → ↑ syntéza protizánětlivých PG
Ovlivnění adipogeneze
<ul style="list-style-type: none"> - stimulace adipogeneze (zvýšení exprese PPARγ, FABP4, adiponektinu a leptinu) - potlačení exprese COX-2 (snížení syntézy PGF2α - antiadipogenním faktor)

(podle Guyton et al., 2015; Goel a Dunbar, 2016; Zeman et al., 2016; Dias et al., 2018)

Zkratky a vysvětlivky: NEFA – neesterifikované mastné kyseliny; TG – triglyceridy; PPAR – receptory aktivované peroxisomálními proliferátory; PGC-1 β – PPAR γ -koaktivátor-1 β ; apoB – apolipoprotein B; VLDL – lipoprotein o velmi nízké hustotě; DGAT2 – acyl-CoA: diacylglycerolová acyltransferáza 2; LDL – lipoprotein o nízké hustotě; PCSK9 – proprotein convertase subtilisin-like/kexin-type 9; HDL – lipoprotein o vysoké hustotě; RCT – reverzní transport cholesterolu; LXR α – jaterní X receptor typ α ; ABCA – ATP dependentní kazetový transportér typ A1; PUFA – vícenenasycené mastné kyseliny; FA – mastná kyselina; Elovl – elongáza mastných kyselin; Tecd – trans-2,3-enoyl CoA reduktáza; MCP-1 – monocytární chemoatrakční protein 1; RANTES – (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted), selektivní chemoatraktant paměťových T-lymfocytů a monocytů; TNF α – tumor nekrotizující faktor; iNOS – inducibilní syntáza NO, ROS – reaktivní kyslíkové sloučeniny; PG – prostaglandin; FABP4 – bílkovina vázající mastné kyseliny; COX – cyklooxygenáza

Tabulka 2 Základní klinická data pokusných osob

Počet osob (muži/ženy)	12 (5/7)
Věk (roky)	41,5 [36,8 – 46,5] ^a
Hmotnost (kg)	78,0 [64,5 – 82,8]
Systolický TK (mm Hg)	128 [124 – 131]
Diastolický TK (mm Hg)	80 [74 – 80]
Hmotnostní index (kg/m ²)	26,2 [23,0 – 28,2]

^a hodnoty představují medián a interkvartilový rozsah [25. – 75. percentil]

Laboratorní analýzy

Plazmatické koncentrace niacinu a jejích metabolitů byly stanoveny námi modifikovanou metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS), (Žantová et al., 2015). Plazmatické koncentrace NEFA byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickou metodou (NEFA, Randox Labs. Velká Británie). Před (čas 0 hodin) a za 24 hodin po podání preparátu byly ve vzorcích krve dále vyšetřeny koncentrace minerálů (Na, K, Cl), urea, kreatinin, kyselina močová, funkční jaterní testy (bilirubin, ALT, AST, GGT, ALP), CB, albumin, glykémie a krevní obraz s diferenciálním leukogramem. Tyto parametry byly analyzovány rutinními laboratorními metodami.

Statistická analýza

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka (SD), resp. jako střední chyba průměru (SEM), případně jako medián a interkvartilový rozsah (25. – 75. percentil).

Statistické zpracování dat bylo provedeno s použitím statistického programu R verze 3.4.3 (R Core Team 2017). K výpočtům závislosti změn NEFA (závisle proměnná) na změnách niacinu a jeho metabolitů (nezávisle proměnné) během opakovaných odběrů (v čase 0 – 6 hodin) byl použit: (1) lineární smíšený model pro opakovaná měření (linear mixed-effects model); (2) kroková lineární regrese; (3) parciální korelační koeficienty. Koncentrace NEFA (resp. jejich rozdíly mezi časem 0 a dalšími odběry do 6. hodiny) byly před výpočtem logaritmičticky transformovány. Jako nezávisle proměnné vstupovaly do vyšetření logaritmy ploch pod křivkou koncentrací niacinu a jeho metabolitů v jednotlivých časových intervalech. Pro určení koncentrací niacinu (resp. jeho metabolitů) u osob s přítomností NAST a jeho chyběním byl použit lineární smíšený model pro opakovaná měření, přičemž statistická významnost NAST byla určena pomocí Waldova χ^2 testu. Stejná metoda byla použita k analýze rozdílů antilipolytického účinku niacinu u osob s a bez přítomností NAST.

Výsledky

Za 1 hodinu po podání niacinu došlo k významnému poklesu koncentrace NEFA a jejich signifikantní snížení přetrvávalo do 12. hodiny po jeho aplikaci. Za 24 hodin po podání niacinu se koncentrace NEFA zvyšovaly zhruba na úroveň před podáním preparátu. Nicméně, v žádném z analyzovaných časových intervalů jsme nezaznamenali zvýšení koncentrace NEFA nad hodnoty získané v čase 0 (obrázek 2).

Po 3. jednorázové dávce niacinu jsme zjistili v plasmě pokusných osob měřitelné koncentrace niacinu (NA) a jeho (hlavních) metabolitů – kyseliny nikotinurové (NUA), nikotinamidu (NAM), N-metylnikotinamidu (MNA), N-metyl-2-pyridon-5-karboxamidu (2-Pyr) a N-metyl-4-pyridon-5-karboxamidu (4-Pyr). Ostatní metabolity niacinu tj. 6-hydroxynikotinamid, nikotinamid N-oxid a nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) nebyly detekovány. V důsledku podávání niacinu v předchozích dvou dnech byly v čase 0 (před podáním léku) zjištěny plazmatické koncentrace niacinu přesahující mez stanovitelnosti (LOQ) u čtyř osob, koncentrace MNA u devíti a koncentrace ostatních metabolitů u všech osob.

Časový průběh individuálních hodnot niacinu a jeho metabolitů vykazoval značné inter-individuální rozdíly s více vrcholovým průběhem, jak je patrné z hodnot mediánů a interkvartilového rozsahu, které jsou uvedeny na obrázcích 3 až 8. Medián koncentrací niacinu vykazoval křivku se dvěma vrcholy, čase 1,5 a 4 hod, (obrázek 3). Mediány hladiny kyseliny nikotinurové mají maximum za 1,5 hod po podání niacinu a poté se její koncentrace exponenciálně snižují k 24 hod (obrázek 4). Střední koncentrace nikotinamidu měla dva vrcholy – v čase 1,5 hod a 12 hod, ve 24 hod byly jeho koncentrace identické jako v čase 0 (obrázek 5). Medián hladiny N-metylnikotinamidu (MNA) kopírují průběh koncentrace nikotinamidu a mají rovněž dva vrcholy – v čase 1,5 a 12 hod (obrázek 6). Konečně, po podání niacinu jsme zaznamenali změny střední koncentrace 2-Pyr s vrcholy v čase 0,5 hod, mezi 1,5 – 2 hod, v časech 6 a 12 hod. Hladina 4-Pyr měla vrchol za 1,5 hod a mezi 12-24 hod (obrázek 7 a obrázek 8).

Závislost poklesu koncentrace NEFA na změnách koncentrace niacinu a jeho metabolitů byla analyzována lineární krokovou analýzou. Významná závislost poklesu NEFA (resp. rozdílů logaritmu koncentrací NEFA mezi časem 0 a dalšími časovými intervaly) ukazuje tabulka 3. Z výsledků vyplývá, že změna variance koncentrace NEFA (mezi 0 – 6 hod) byla závislá na změnách koncentrace N-metylnikotinamidu (MNA), kyseliny nikotinové (NA) a N-metyl-2-pyridon-5karboxamidu (2-Pyr). Rozptyl změn koncentrace NEFA byl vysvětlen rozptylem MNA (48 %), NA (21,5 %) a 2-Pyr (11,6 %).

Tabulka 3 Kroková regresní analýza závislosti poklesu neesterifikovaných mastných kyselin na změnách koncentrace niacinu a jeho metabolitů v čase 0 – 6 hodin

Zdroj rozptylu	F	P	R ²	adj. R ²	Příspěvek
1. MNA	3,99	0,0769	0,31	0,23	48,0
2. 2-Pyr	0,43	0,5307	0,05	-0,06	11,6
3. NA	0,62	0,4528	0,06	-0,04	21,5
4. 1 + 2	3,76	0,0706	0,48	0,36	59,6
5. 4 + 3	7,39	0,0142	0,76	0,66	81,1

Zkratky a vysvětlivky: y (závisle proměnná) = rozdíl logaritmu koncentrace NEFA; x (nezávisle proměnné) = logaritmus plochy pod křivkou dané sloučeniny (niacin, resp. jeho metabolity); MNA – N-metylnikotinamid; NA – kyselina nikotinová, 2-Pyr – N-metyl-2-pyridon-5-karboxamid; NEFA – neesterifikované mastné kyseliny; Příspěvek – příspěvek proměnné k rozplytu (v %); R² – mohnásobný korelační koeficient

V tabulce 4 jsou uvedeny parciální korelační koeficienty závislosti změn koncentrace NEFA na změnách koncentrace niacinu a jeho metabolitů. Z výsledků vyplývá, že existuje statisticky významná závislost změny NEFA na MNA (P < 0,0011), NA (P < 0,0023) a 2-Pyr (P < 0,0263), přičemž pokles NEFA a velikost ploch koncentrací MNA a kyseliny nikotinové jsou konkordantní a závislost poklesu NEFA na koncentraci 2-Pyr je opačná. Parciální korelační koeficient popisuje závislost změny NEFA s konkrétní sloučeninou, přičemž se eliminuje vazba NEFA s ostatními sloučeninami

Do 6. hodiny a v delším časovém úseku významnou závislost mezi změnami NEFA a koncentracemi NA a jejich metabolitů jsme nepozorovali (data neuvedena).

Snášlivost perorálního preparátu Niaspan® byla dobrá. U čtyř osob jsme pozorovali s niacinem asociovanou kožní toxicitu (skupina I, NAST+); u dvou žen se rozvinul flush intenzity 3, u 2 mužů flush intenzity 1; zbývajících 8 osob (skupina II, NST-) nemělo nežádoucí kožní příznaky.

Při srovnání poklesu koncentrace NEFA ve skupině I se skupinou II měla skupina I větší plochu poklesu NEFA. Dvouvýběrovým t-testem nebyl zjištěn signifikantní rozdíl logaritmu ploch pod křivkou NEFA (skupina I vs skupina II: průměr ± SD; 0,774 ± 0,326 vs

0,441 ± 0,135, NS). Pokles ploch logaritmu koncentrací NEFA v obou skupinách byl dále analyzován lineárním smíšeným modelem pro opakovaná měření, který počítá s jednotlivými měřeními od času 0 do času 6 hod, avšak bere v úvahu variabilitu jednotlivých osob i lineární vývoj v čase. Tímto testem byl prokázán větší pokles NEFA ve skupině I ve srovnání se skupinou II (Waldův $\chi^2 = 4,752$; $P = 0,0293$).

Stejným testem jsme analyzovali velikost plochy kyseliny nikotinurové (NUA) u obou skupin. Logaritmus plochy pod křivkou měla skupina II (bez kožních nežádoucích příznaků) ve srovnání se skupinou I významně vyšší (Waldův $\chi^2 = 4,311$; $P = 0,0379$).

Rozdíl poměrů kyseliny nikotinurové ke kyselině nikotinové (NUA/NA) mezi oběma skupinami nebyl statisticky významný (Waldův $\chi^2 = 0,00228$; $P = 0,9619$).

Tabulka 4 Parciální korelační koeficienty závislosti změn neesterifikovaných mastných kyselin na změnách koncentrace kyseliny nikotinové a jejích metabolitů v čase 0 – 6 hodin

y	x	r	P	r_p	P_p
NEFA	NAM	0,5283	NS	0,5106	NS
NEFA	NA	0,2631	NS	0,8132	0,0023
NEFA	MNA	0,5542	NS	0,844	0,0011
NEFA	2-Pyr	0,2124	NS	-0,6625	0,0263
NEFA	4-Pyr	0,3961	NS	-0,5390	NS
NEFA	NUA	0,4473	NS	-0,1093	NS

Zkratky a vysvětlivky: y (závisle proměnná) = rozdíl logaritmu koncentrace NEFA; x (nezávisle proměnné) = logaritmy plochy pod křivkou kyseliny nikotinové (respektive jejích metabolitů); r – Pearsonův korelační koeficient; r_p – parciální korelační koeficient; P – statistická významnost korelačního koeficientu; P_p – statistická významnost parciálního korelačního koeficientu; 4-Pyr – N-metyl-4-pyridon-5-karboxamid, ostatní zkratky viz tabulka 3.

Diskuze

Studium niacinu je stále aktuální pro jeho komplexní působení na spektrum plasmatických lipidů i příznivé ovlivnění kardiovaskulárního rizika. Z tohoto důvodu se věnuje opětovně pozornost farmakokinetice mateřské látky, jejím metabolitům i agonistům niacinového receptoru (HCA2R) v souvislosti s optimalizací lékových forem, studiem nežádoucích účinků i podrobnější analýzou farmakokinetiky.

Jednorázové perorální podání niacinu (NA) s okamžitým účinkem v dávce do 1000 mg vede k jeho téměř úplné absorpci v žaludku a tenkém střevě. Maximálních koncentrací v plasmě je dosaženo během 30 – 60 min. Významnější podíl léku se vylučuje močí v nezměněné formě, či po konjugaci jako kyselina nikotinurová. Renální vylučování přispívá k rychlé eliminaci niacinu, který mizí z oběhu zpravidla do 6 hod po podání. Prodloužené uvolňování niacinu je charakteristické pro námi použitý přípravek Niaspan®, u něhož absorpce účinné látky probíhá zhruba 8 – 12 hod. (Carlson, 2005; Guyton et al., 2015; Talbert, 2004). Během prvního průchodu se různě velký podíl niacinu absorbuje v játrech (v závislosti na dávce); z velkého oběhu je niacin predilekčně absorbován v tukové tkáni. Vzhledem k tomu, že v metabolismu niacinu významně uplatňuje metabolická přeměna v játrech, efekt prvního průchodu (first pass effect), byl před vlastním experimentem přípravek Niaspan® podáván vyšetřovaným osobám dva dny po sobě v dávce 500 mg/den za účelem stabilizace efektu prvního průchodu (Pond a Tozer, 1984).

Niacin je metabolizován dvěma drahami (obrázek 2). V metabolické dráze I je niacin konjugován s glycinem na kyselinu nikotinurovou, v dráze II je sledem oxidačně redukčních reakcí konvertován na nikotinamid a pyrimidinové metabolity. Metabolická dráha I má nízkou afinitu a vysokou kapacitu a uplatňuje se, jakmile je dráha II, která je vysokoafinitní a

nízkokapacitní, nasycena. Přípravky niacinu s bezprostředním nástupem účinku, rychle saturují metabolickou dráhu II a většina niacinu je metabolizována v dráze I na kyselinu nikotinurovou (NUA), která je vyloučena do moče. Tomu odpovídá průběh koncentrací kyseliny nikotinurové (NUA) (obrázek 4). Koncentrace NUA nebyly v plasmě vyšetřovaných osob patrné v čase 0, dosahují maxima za 1,5 hod po podání přípravu a pak se exponenciálně snižují. Vrchol koncentrace NUA se časově kryje s prvním vrcholem niacinu (v čase 1,5 hod), kdy po podání se zvýší jeho koncentrace, a poté klesají až k 24 hod (obrázek 3). Po jednorázovém perorálním podání niacinu je veškerý niacin a jeho metabolity vyloučen především do moči; ze 4,65 % se niacin vylučuje v nezměněné formě, 16,7 % jako NUA, 54,5 % jako 2-Pyr, 23 % jako MNA; NAM, nikotinamid N-oxid (NNO) a 4-Pyr byly v moči přítomny pouze ve stopách. Podle literárních údajů činil biologický poločas 0,9 hod pro niacin, 4,58 hod pro NUA, 8,58 hod pro NAM a 11 hod pro nikotinamid-N-oxid (Menon et al. 2007). Metabolická konverze niacinu na NUA je dáována do souvislosti s kožní toxicitou asociovanou s niacinem (NAST, niacin associated skin toxicity). Naproti tomu metabolity II dráhy – nikotinamid (NAM), N-metylnikotinamid (MNA) a jeho pyridonové produkty (2-Pyr, 4-Pyr) – jsou asociovány s nežádoucími účinky charakteru hepatotoxicity (Neuvonen et al., 1991; Guyton et al., 2015).

Metabolické účinky niacinu jsou zprostředkovány jeho vazbou na specifický receptor – HCA2 (resp. GPR109A), který je exprimován v adipocytech, neutrofilních leukocytech, makrofázích, Langerhansových buňkách a keranocytech (Dunbar et al., 2016, 2017; Zeman et al., 2016). Aktivace HCA2 (resp. GPR109A) inhibuje adenylcyklázu, snižuje koncentrace cAMP a aktivitu proteinové kinázy A s následným poklesem aktivity hormonálně senzitivní lipázy a potlačením lipolýzy, poklesem koncentrací neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA, synonymum volné mastné kyseliny, FFA). Přirozeným ligandem HCA2 (resp. GPR109A) je β -hydroxybutyrát, který tak může zpětnovazebně inhibovat vlastní syntézu. Zvýšená lipolýza a tok NEFA do jater, zesilují syntézu ketolátek v krvi (β -hydroxybutyrát, acetoacetát). Zvýšené plasmatické koncentrace β -hydroxybutyrátu pak zpětnovazebně inhibují přísun NEFA jako substrátu pro syntézu ketolátek (Guyton et al., 2015).

Vliv niacinu na plasmatické koncentrace NEFA byl studován u experimentálních zvířat již v šedesátých letech minulého století. Po podání nikotinové kyseliny dochází k poklesu koncentrace NEFA, po němž následuje jejich vzestup nad výchozí hodnoty, označovaný jako **rebound fenomén**. Zvyšování dávek NA má za následek opoždění rebound fenoménu, po adrenalektomii a hypofyzektomii rebound fenomén zcela vymizí (Pereira, 1967). Rebound fenomén je možné chápat jako regulační pochod, do kterého je zavzata hypotalamo-pituito-adrenální osa. Pokles koncentrací NEFA aktivuje a zvyšuje hladiny ACTH a kortikosteronu, které napomáhají restauraci hladin NEFA (Oh et al., 2012). Ve zpětnovazebné regulaci se uplatňuje především kyselina palmitová; nenasycené FA (kyselina olejová a linolová) mají stimulační účinek na sekreci ACTH vyjádřený méně (Oh et al., 2014). Nicméně, dlouhodobá aplikace niacinu ovlivňuje rebound fenomén také zásahem do biologie tukové tkáně – dojde k poklesu exprese enzymů odpovědných za lipolýzu – hormonálně senzitivní lipázy (HSL), perilipinu 1, a niacinového receptoru a dalších (Oh et al., 2011).

V naší studii jsme našli významný pokles NEFA mezi 1 – 6 hodinou po podání niacinu. Pokles koncentrace NEFA byl významně závislý na koncentraci N-metylnikotinamidu (NAM), kyseliny nikotinové (NA) a 2-metylpyridon-5-karboxamidu (2-Pyr), přičemž pokles NEFA pozitivně koreloval s koncentrací NAM a NA a negativně s 2-Pyr. Změny NEFA bylo možné vysvětlit z 81 % rozptylem koncentrace NA a jejích metabolitů. Z našich výsledků usuzujeme, že antilipolytický účinek niacinu je dán molekulou kyseliny nikotinové a N-metylnikotinamidem; naopak je oslaben koncentracemi 2-Pyr, který je hlavním produktem metabolické konverze niacinu (Menon et al., 2007).

Starší farmakokinetické studie u lidí prokázaly, že pro přípravky niacinu s řízeným uvolňováním je charakteristický výrazný účinek prvního průchodu (first pass effect). Ve srovnání s přípravky s okamžitým uvolňováním, činila relativní biologická dostupnost niacinu pouze 1 %, plocha pod křivkou koncentrace (AUC) 15 % a kumulativní exkrece 18 %. Plazmatické koncentrace niacinu nekorelovaly s velikostí antilipolytického účinku (Neuvonen et al., 1991).

Bylo prokázáno, že agonisté receptoru GPR109A (HCA2) jsou aromatické karboxylové kyseliny jako je acipimox a acifran (Goel a Dunbar 2016). V posledních letech jsou vyvíjena nová farmaka odvozená od molekuly niacinu: 1-metylnikotinamid nebo mimetika niacinových receptorů jako je GSK256073 (GlaxoSmithKline) s antilipolytickým a hypotriglyceridemizujícím účinkem. Do nové generace agonistů GPR109A patří také sloučeniny SCH 900271 (Schering-Plough) M1903 a MK0354 (Merck) (Goel a Dunbar, 2016). Názory na závislost poklesu plasmatických triglyceridů na snížení koncentrace NEFA se různí. Někteří autoři kauzalitu tohoto mechanismu zpochybňují (Lauring et al., 2012). Jiní autoři předpokládají (Goel a Dunbar, 2016), že pokles NEFA je nezbytný pro iniciaci hypotriglyceridemického účinku niacinu a později, s nástupem rebound fenoménu se uplatňují i jiné mechanismy (tabulka 1).

Nejen úprava lipidogramu, ale i snížení koncentrace patologicky zvýšených hladin NEFA by mohly mít příznivé konsekvence u řady chorobných stavů. Zvýšené koncentrace NEFA jsou dávány do souvislosti lipotoxicitou a ektopickým ukládáním tuků v játrech, kosterním svalstvu a pankreatu u osob s obezitou, diabetes mellitus 2. typu a metabolického syndromu. Elevace NEFA deterioruje energetický metabolismu myokardu, zvyšuje jeho insulinovou rezistenci a podílí se na diastolickém srdečním selhání u těchto pacientů (Fukushima a Lopaschuk, 2016). Zvýšení koncentrace NEFA má také kauzální vztah k endoteliální dysfunkci (Ghosh et al., 2017). Zvýšená hladina NEFA v důsledku insulinové rezistence tukové tkáně přispívá minimálně z 60 % k akumulaci lipidů v játrech u osob s nealkoholovou steatózou jater (Saponaro et al., 2015). U nemocných s akutním infarktem myokardu, jsou zvýšené koncentrace NEFA dávány do souvislosti se vznikem maligních komorových arytmií (Oliver, 2015). U obézních dětí a adolescentů vysoké koncentrace NEFA korelovaly s nízkými koncentracemi růstového hormonu (GH). Na malé skupině obézních dětí podávání niacinu snížilo koncentrace NEFA v průměru o 0,2 mmol/l spolu se zvýšením hladin GF (Galescu et al., 2018).

Nejčastějším nežádoucím účinkem léčby niacinem byly kožní změny, dnes označované jako s niacinem asociovaná kožní toxicita (NAST, niacin associated skin toxicity), která zahrnuje zarudnutí (flush, otok, bolest a pruritus). Podávání niacinu vede až u 70 % osob přítomnosti NAST. Dlouhodobá léčba niacinem pak byla spojena se snížením prevalence NAST v důsledku rozvoje tolerance (tachyfylaxe). Předpokládá se, že NAST je důsledkem vazby niacinu na HCA2 (resp. GPR109A) v Langerhansových kožních buňkách s následnou aktivací dráhy β -arestin 1, která aktivuje cytoplasmatickou fosfolipázu A2. Uvolnění kyseliny arachidonové a její přeměna (působením cyklooxygenázy 1) na prostaglandin D2 (PGD2) a PGE2 (v Langerhansových buňkách a keratinocytech) indukují kožní vasodilataci (Guyton et al., 2015; Zeman et al., 2016). V populaci schizofreniků byla prokázána abnormální (chybění nebo potlačení) kožní reakce na niacin. U schizofreniků absence NAST (resp. flush) pravděpodobně souvisí s odlišným metabolismem kyseliny arachidonové, aktivitou fosfolipáz a syntézou vasoaktivních prostaglandinů (PGD2, PGE2) (Messamore, 2003; Messamore, 2017).

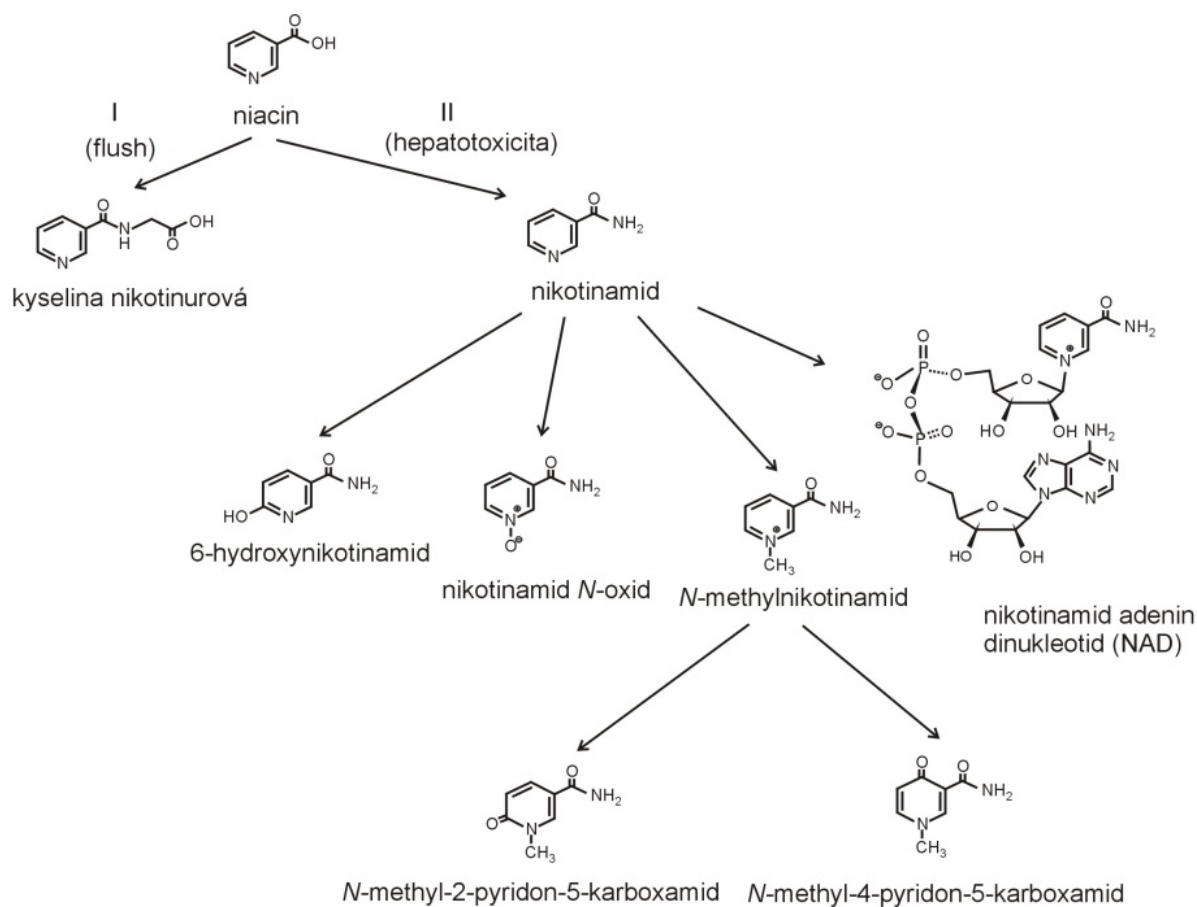
Ve skupině vyšetřovaných osob jsme u 4 dobrovolníků prokázali flush. Tato podskupina 4 osob měla, ve srovnání s 8 vyšetřovanými bez kožních změn významně vyšší pokles NEFA a nižší plochu pod koncentrací kyseliny nikotinurové (NUA), přičemž poměrem NUA k niacinu se obě skupiny nelišily. I když antilipolytický účinek i NAST jsou zprostředkovány aktivací

stejného receptoru (GPR109A), tak někteří autoři pozitivní asociaci antilipolytického působení s NAST nepotvrzují (Dunbar et al., 2017). Velikost antilipolytického účinku i aktivace GPAR přípravky niacinu s řízeným uvolňováním (ER, extended release) jsou ovlivněny rasovými a etnickými faktory. U Afro-Američanů byl po podání niacinu ER nižší antilipolytický účinek (Usman et al., 2012). Genetické vyšetření polymorfismu genu pro *HCA2R* (niacinový receptor, GPR109A) na participantech studie AIM-HIGH prokázala, že podávání ER niacinu vedlo k signifikantně vyššímu poklesu lipoproteinu (a) u homozygotů alely 317M (rs245727). Polymorfismus *HCA2R* neovlivňoval změny po podávání koncentrace triglyceridů, LDL-cholesterolu a HDL-cholesterolu (Tuteja et al., 2017). Asociaci přítomnosti flush a vyššího antilipolytického účinku v současnosti nejsme schopni interpretovat. Další experimenty budou zaměřeny na rozšíření počtu sledovaných osob, analýzu močové exkrece niacinu a jeho metabolitů ve vztahu k plasmatickým hladinám a jejich rozdíly u osob s a bez přítomnosti kožních nežádoucích účinků.

Závěrem můžeme konstatovat, že (1) antilipolytický účinek niacinu (pokles koncentrace NEFA) je asociován s plasmatickými koncentracemi kyseliny nikotinové a jejího metabolitu – N-metylnikotinamidu a rychlosti jeho konverze na N-metyl-2-pyridon-5 karboxamid; (2) antilipolytický účinek niacinu je pravděpodobně vyšší u osob s přítomností flush.

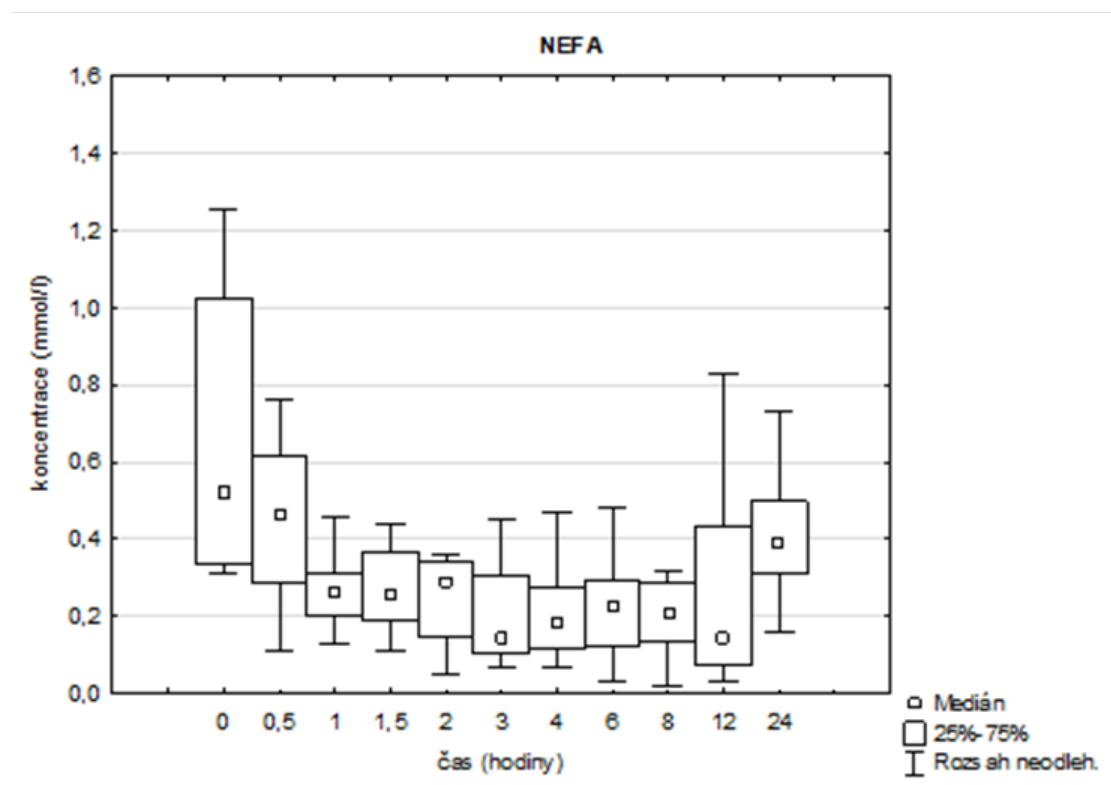
I když výsledky dvou kontroverzních randomizovaných, multicentrických, placebem kontrolovaných studií (AIMH-HIGH, HPS-2-THRIVE) vedly pozastavení preskripce léčivých přípravků obsahujících niacin v zemích EU, niacin je nadále používán k léčbě dyslipidemií a ASCVD v USA a Kanadě (Jackevicius et al., 2013). Navíc, některé národní a mezinárodní odborné společnosti jej doporučují k léčbě středně těžké a těžké hypertriglyceridémie (Ito, 2015). Dále, by niacin mohl být indikován v případech intolerance na statin a fibráty, případně k léčbě specifických skupin nemocných – jako je dyslipidémie ve spojení nealkoholovou steatózou jater, dyslipidémie u chronického onemocnění jater a dalších (Tiwari a Khokhar, 2014; Bitto et al., 2016; Karazniewicz-Lada et al., 2016; Reiner, 2014; Streja et al., 2015). Niacin, jeho metabolity i agonisté niacinových receptorů jsou sloučeniny, které jsou předmětem zájmu pro vývoj nových léků cílených na úpravu lipidogramu i léčbu kardiovaskulárních chorob a potlačení zvýšených koncentrací NEFA.

Obrázek 1 Jaterní metabolismus niacinu

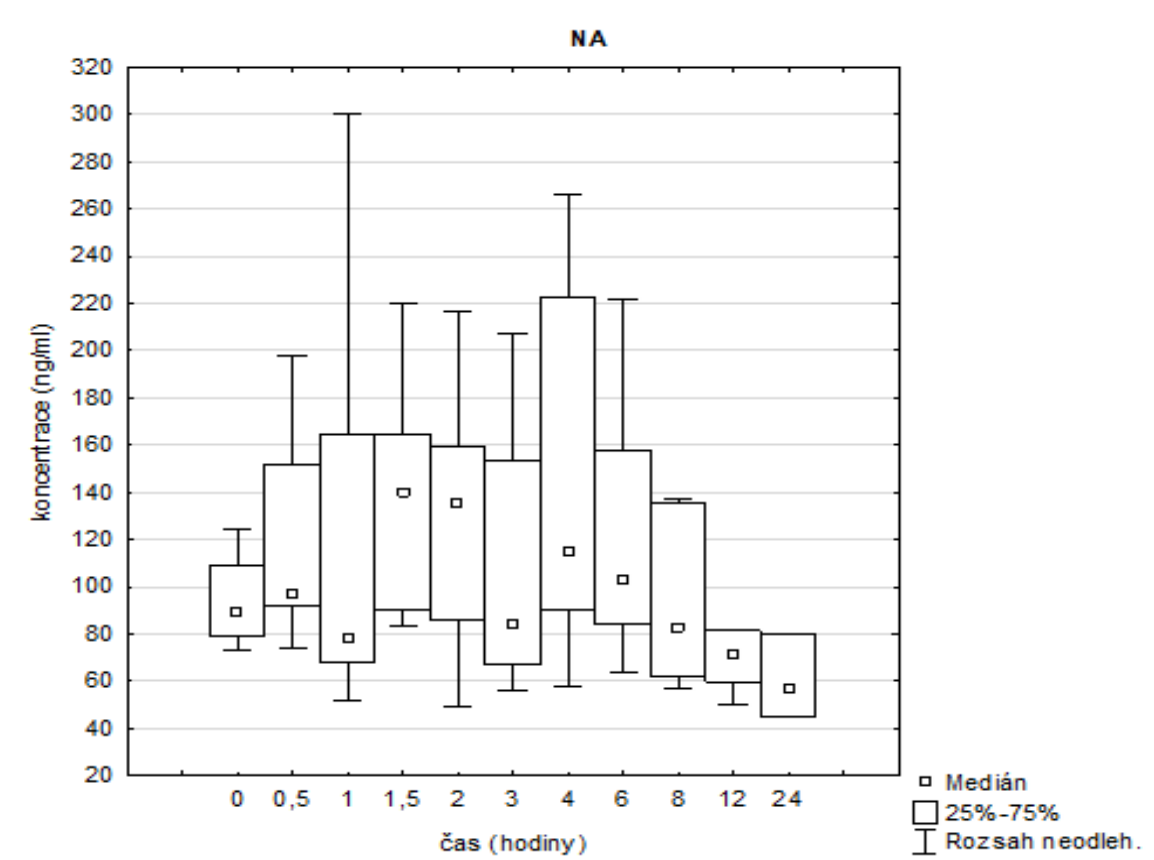


Komentář: V metabolické dráze I je kyselina nikotinová (NA) konjugována s glycinem za vzniku kyseliny nikotinurové (NUA), dráha I je nízko-afinitní a vysoko-kapacitní a je asociována s kožními nežádoucími účinky (flush, pruritus). V metabolické dráze II, která je vysoko-afinitní a nízko-kapacitní, vzniká jako hlavní metabolit nikotinamid (NAM) a z něj 6-hydroxynikotinamid (6HN), nikotinamid N-oxid (NNO), N-metylnikotinamid (MNA) a nikotinamid adenin dinukleotid (NAD). MNA je terminálně konvertován na N-metyl-2-pyridon 5-karboxamid (2PY) a N-metyl-4-pyridon 5-karboxamid (4PY). Metabolitům dráhy II se přisuzuje potenciální hepatotoxicita (podle Menon et al., 2007; Guyton et al., 2015)

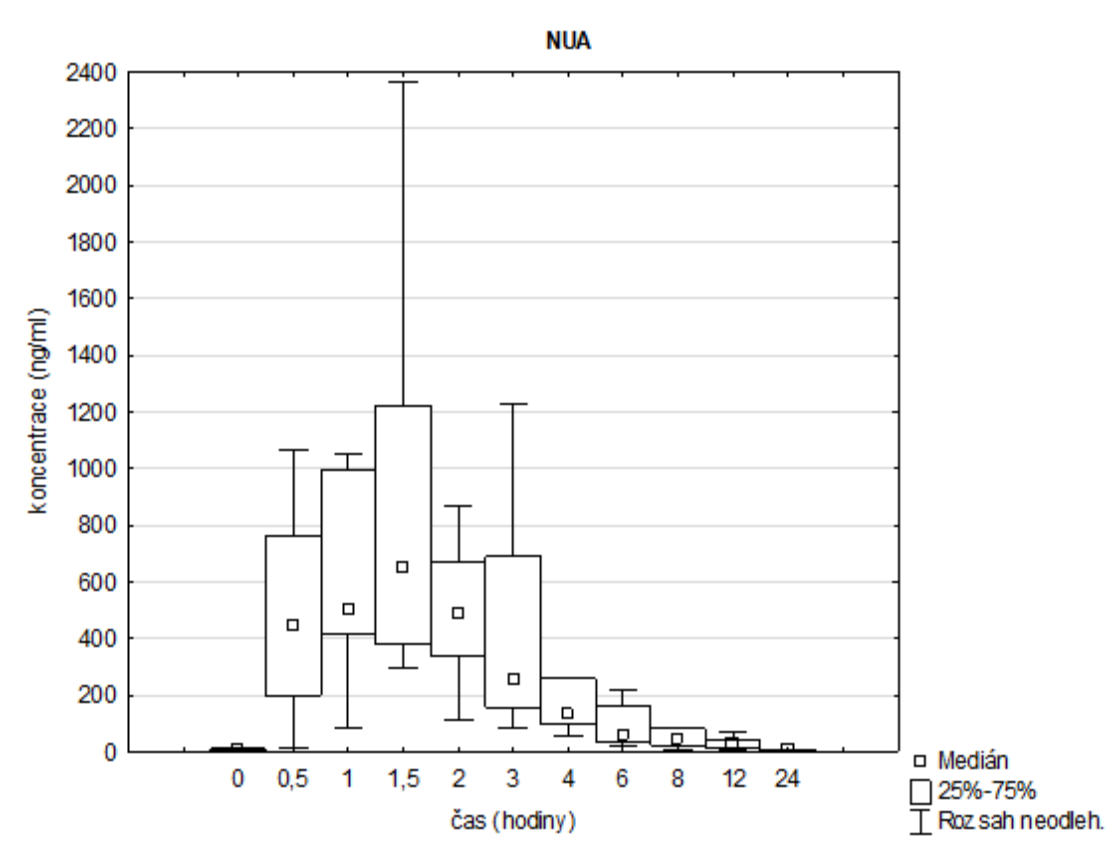
Obrázek 2 Hladiny NEFA po podání niacinu



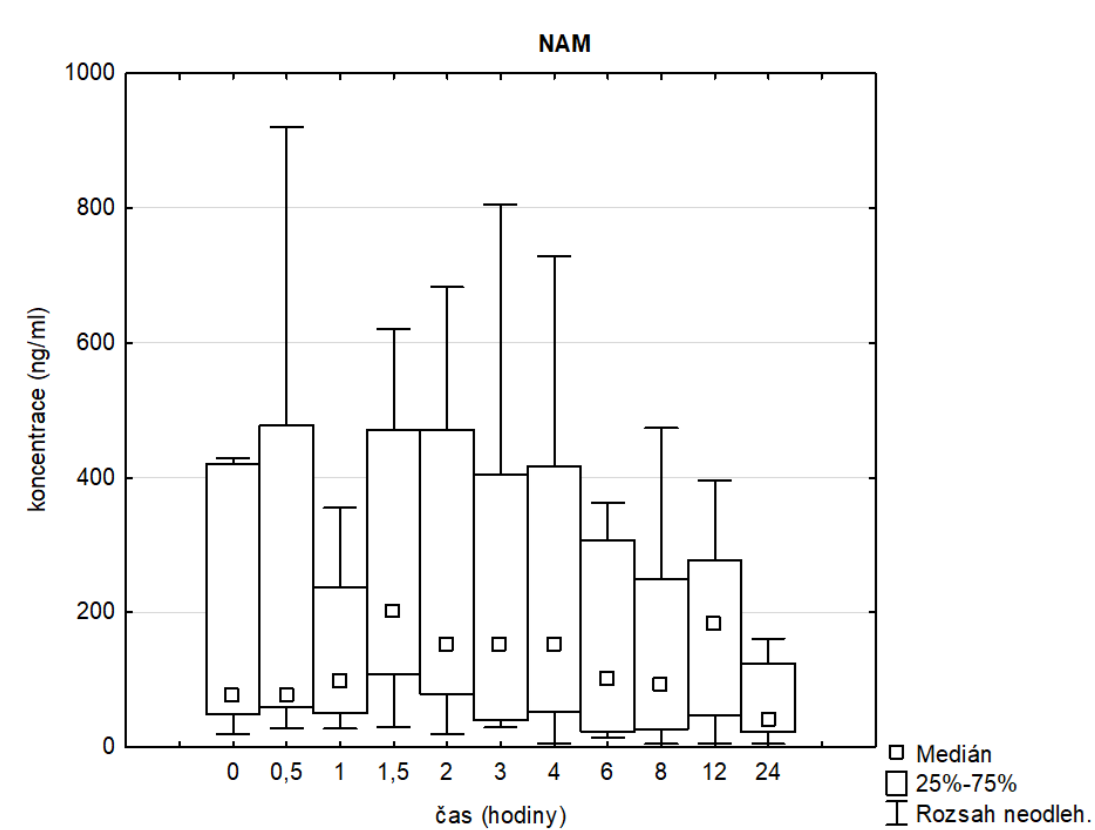
Obrázek 3 Koncentrace niacinu po jednorázovém podání



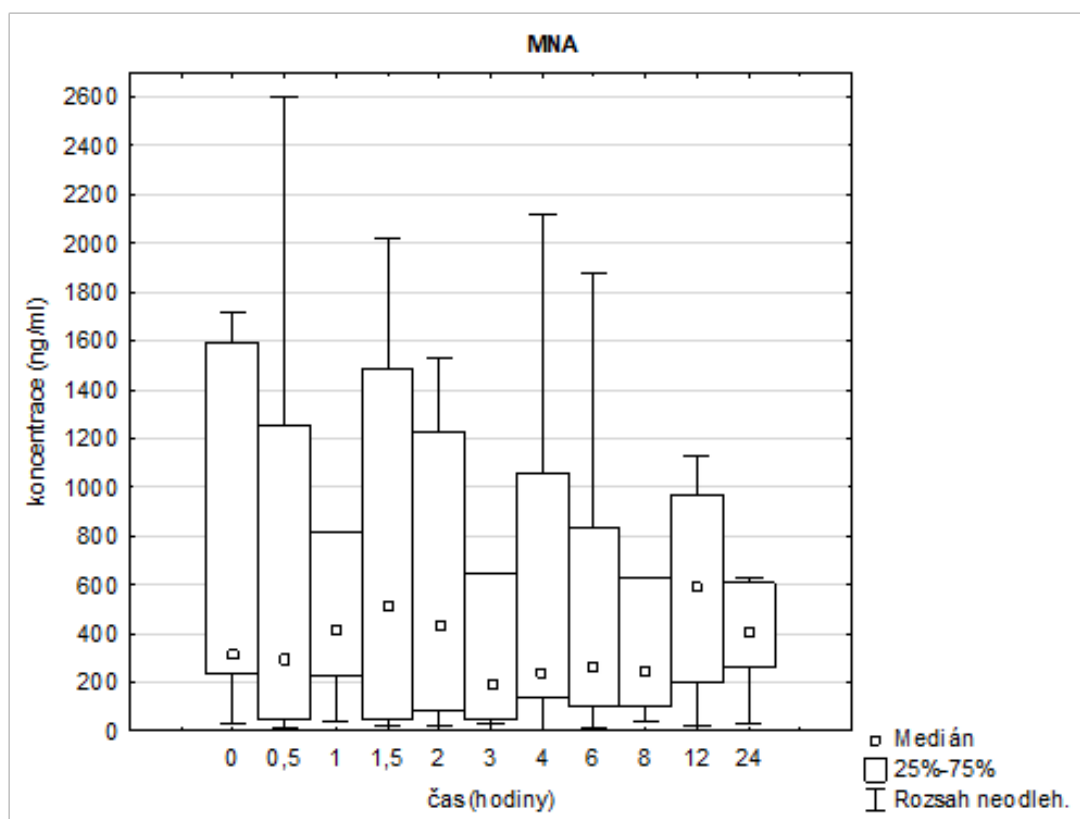
Obrázek 4 Koncentrace nikotinuové



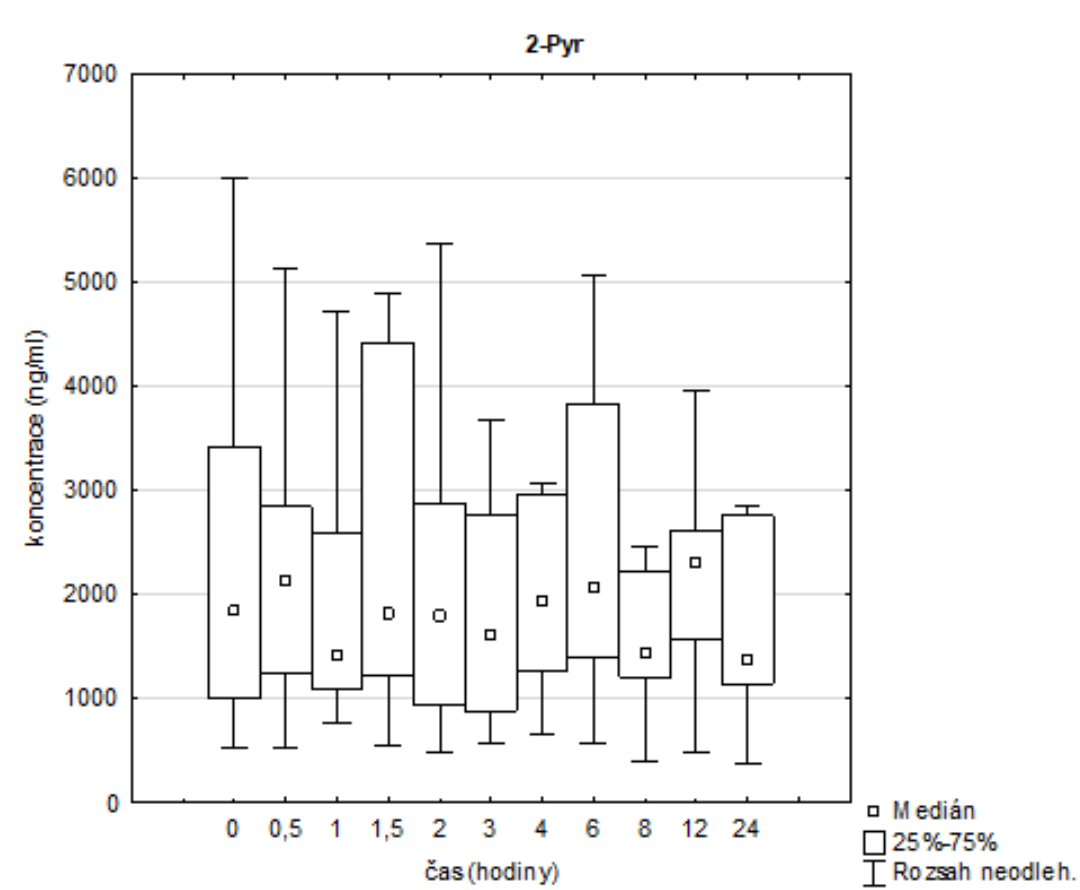
Obrázek 5 Průběh koncentrace nikotinamidu



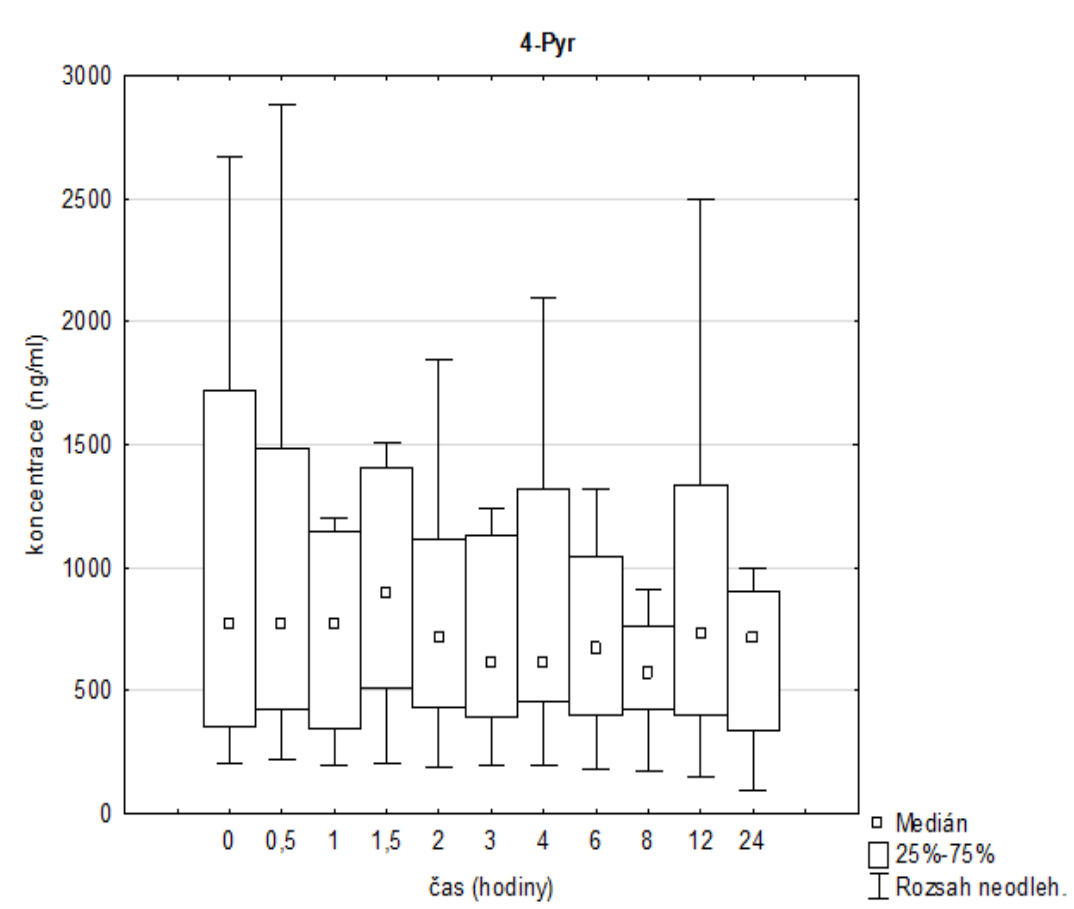
Obrázek 6 Koncentrace N-metylnikotinamidu



Obrázek 7 Koncentrace N-metyl-2-pyridon-5-karboxamidu (2-Pyr)



Obrázek 8 Koncentrace N-metyl-4-pyridon-5-karboxamidu (4-Pyr)



Studie byla podpořena projekty RVO-VFN 64165/2012, PROGRES Q25/LF1/2, MPO FRTI4/638 a LQ1602 IT4 Innovations Excellence in Science

Literatura

Baigent C, Blackwell L, Emberson J, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: A meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 2010; 376: 1670-1681.

Bitto A, Pallio G, Messina S, et al. Genomic variations affecting biological effects of statins. *Curr Drug Metab* 2016; 17: 566-572.

Blankenhorn DH, Nessim SA, Johnson RD, et al. (AIM HIGH Investigators). Beneficial effects of combined colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts. *JAMA* 1987; 257: 3233-3240.

Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* 2011; 365: 2255-2267.

Boekholdt SM, Hovingh GK, Mora S, et al. Very low levels of atherogenic lipoproteins and the risk for cardiovascular events: a meta-analysis of statin trials. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64: 485-494.

Brown G, Albers JJ, Fisher LD, et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 1990; 323: 1289-1298.

- Canner PL, Berge KG, Wenger NK, et al.** Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. *J Am Coll Cardiol* 1986; 8: 1245-1255.
- Carlson LA, Rosenhamer G.** Reduction of mortality in the Stockholm Ischemic Heart Disease Secondary Prevention Study by combined treatment with clofibrate and nicotinic acid. *Acta Med Scand* 1988; 223: 405-418.
- Carlson LA.** Nicotinic acid: the broad spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J Intern Med* 2005; 258: 94-114.
- Colivicchi F, Bassi A, Santini M, et al.** Discontinuation of statin therapy and clinical outcome after ischemic stroke. *Stroke* 2007; 38: 2652-2657.
- Coronary Drug project Research Group.** Clofibrate and niacin in Coronary Heart disease. *JAMA* 1975; 231: 360-381.
- Dias S, Paredes S, Ribeiro L.** Drugs involved in Dyslipidemia and obesity treatment: focus on adipose tissue. *Int J Endocrinol* 2018; 2018: 2637418.
- Dunbar RL, Goel H.** Niacin alternatives for dyslipidemia: Fool's gold or gold mine? Part I: Alternative niacin regimens. *Curr Atheroscler Rep* 2016; 18: 11.
- Dunbar RL, Goel H, Tuteja S, et al.** Measuring niacin-associated skin-toxicity (NASTy) stigmata along with symptoms to aid development of niacin mimetics. *J Lipid Res* 2017; 58: 783-797.
- Fukushima A, Lopaschuk GD.** Cardiac fatty acid oxidation in heart failure associated with obesity and diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1861: 1525-1534.
- Galescu OA, Crocker MK, Altschul AM, et al.** A pilot study of the effects of niacin administration on free fatty acid and growth hormone concentrations in children with obesity. *Pediatr Obes* 2018; 13: 30-37.
- Ghosh A, Gao L., Thakur A, et al.** Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J Biomed Sci* 2017; 24: 50.
- Goel H, Dunbar RL.** Niacin alternatives for dyslipidemia: Fool's gold or gold mine? Part II: Novel niacin mimetics. *Curr Atheroscler Rep* 2016; 18: 17.
- Guyton JR, McGovern ME, Carlson LA.** Niacin (Nicotinic Acid). In: *Clinical Lipidology. A Companion to Braunwald's Heart Disease.* Ballantyne CM. (Ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015, 274-284.
- Haynes R, Jang L, Hopewell JC, et al.** HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specific muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. *Eur Heart J* 2013; 34: 1279-1291.
- HPS2-THRIVE Collaborative Group, Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, et al.** Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. *N Engl J Med* 2014; 371: 203-212.
- Ito MK.** Long-chain omega-3 fatty acids, fibrates and niacin as therapeutic options in the treatment of hypertriglyceridemia: A review of the literature. *Atherosclerosis* 2015; 242: 647-656.
- Jackevicius CA, Tu JV, Ko DT, et al.** Use of niacin in the United States and Canada. *JAMA Internal Medicine* 2013; 1736: 1379-1381.
- Karazniewicz-Lada M, Glowka A, Mikolajewski J, Przyslawski J.** Genetic and non-genetic determinants of the pharmacological activity of statins. *Curr Drug Metabol* 2016; 17: 877-896.
- Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, et al.** Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. *N Engl J Med* 2014; 371: 203-212.

- Lauring B, Taggart AK, Tata JR, et al.** Niacin lipid efficacy is independent of both the niacin receptor GPR109A and free fatty acid suppression. *Sci Transl Med* 2012; 4: 148ra115.
- 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.
- Menon RM, Adams MH, Gonzelez MA, et al.** Plasma and urine pharmacokinetics of niacin and its metabolites from an extended-release niacin formulation. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007; 45: 448-454.
- Messamore E.** Relationship between the niacin skin flush response and essential fatty acids in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 413-419.
- Messamore E.** The niacin response biomarker as a schizophrenia endophenotype: A status update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2017 Jun 30. [Epub ahead of print]
- Neuvonen PJ, Roivas L, Laine K, et al.** The bioavailability of sustained release nicotinic acid formulations. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 32: 473-476.
- Oh YT, Oh K-S, Choi YM, et al.** Continuous 24-h nicotinic acid infusion in rats causes FFA rebound and insulin resistance by altering gene expression and basal lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Metab* 2011; 300: E1012-E1021.
- Oh YT, Oh K-S, Kang I, et al.** A fall in plasma free fatty acids (FFA) levels activated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis independent of plasma glucose: evidence for brain sensing of circulating FFA. *Endocrinology* 2012; 153: 3587-3592.
- Oh JT, Kim J, Kang I, et al.** Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by circulating free fatty acids in male Wistar rats: role of individual free fatty acids. *Endocrinology* 2014; 155: 923-931.
- Oliver MF.** Fatty acids and the risk of death during acute myocardial ischaemia. *Clin Sci (Lond)* 2015; 128: 349-355.
- Pereira JN.** The plasma free fatty acid rebound induced by nicotinic acid. *J Lipid Res* 1967; 8: 239-244.
- Pond SM, Tozer TN.** First-Pass Elimination. *Basic Concepts and Clinical Consequences.* *Clin Pharmacokinet* 1984; 9: 1-25.
- R Core Team, 2017.** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reiner Z.** Resistance and intolerance to statins. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24: 1057-1066.
- Saponaro C, Gaggini M, Carli F, et al.** The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients* 2015; 7: 9435-9474.
- Soga T, Kamohara M, Takasaki J, et al.** Molecular identification of nicotinic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 364-369.
- Streja E, Kovesdy CP, Streja DA, et al.** Niacin and progression of CKD. *Am J Kidney Dis* 2015; 65: 785-798.
- Superko HR, Zhao X-Q, Hodis HN, Guyton JR.** Niacin and heart disease prevention: engraving its tombstone is a mistake. *J Clin Lipidol* 2017; 11: 1309-1317.
- Talbert RL.** Current recommendation for the treatment of dyslipidemia. *Continuing Education Credits.* *P & T* 2004; 29: 104-112.
- Tan CY, Virtue S, Murfitt S, et al.** Adipose tissue fatty acid chain length and non-unsaturation increased with obesity and insulin resistance. *Sci Rep* 2015; 5: 18366.
- Tuteja S, Wang L, Dunbar RL, et al.** Genetic coding variants in the niacin receptor, *hydroxyl-carboxylic receptor 2 (HCAR2)*, and response to niacin therapy. *Pharmacogenet Genomics* 2017; 27: 285-293.

Usman MHU, Quamar A, Gadi, et al. Extended-release niacin acutely suppresses postprandial triglyceridemia. *Am J Med* 2012; 125: 1026-1035.

Zhang H, Plutzky J, Skentzos S, et al. Discontinuation of statins in routine care settings. *Ann Intern Med* 2013; 158: 526-534.

Zeman M, Vecka M, Perlík F, et al. Niacin in the treatment of hyperlipidemias in light of new clinical trials: Has niacin lost its place? *Med Sci Mon* 2015; 21: 2156-2162.

Zeman M, Vecka M, Perlík F, et al. Pleiotropic effects of niacin: Current possibilities for its clinical use. *Acta Pharm* 2016; 66: 449-469.

Žantová K, Tvrzická E, Vecka M, et al. Stanovení nikotinové kyseliny a jejích metabolitů pomocí HPLC-MS/MS. *Chem Listy* 2015; 109: 950-956.