

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 7

diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku

na počest životního jubilea 85 let Doc. MUDr. Jozefa Kollára, DrSc.

P r a h a 6. - 7. září 2017

Hlavní název: ATHEROSKLEROSA 2017

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 2017

Cena: neprodejné

ISBN 978-80-905595-4-7

ČESTNÉ PŘEDSEDNICTVO

Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

Děkan 1. LF UK Praha

Doc. MUDr. Jozef Kollár, DrSc.

Sekce pro atherosklerosu SSKB

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

1. LF UK

Na Bojišti 3

120 26 Praha 2

„Velká posluchárna“



Doc. MUDr. Jozef Kollár, DrSc. se narodil 3. dubna 1932. Medicínu studoval nejprve na Lékařské fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě, po 3 letech přešel na nově ustanovenou Univerzitu P. J. Šafaříka v Košicích, absolvoval v r. 1956. V letech 1956-67 pracoval nejprve jako praktický lékař, potom jako internista na poliklinice. V r. 1956 se stal odborným asistentem na 1. interní klinice, kde se mj. zabýval výzkumem kardiomyopatií. V r. 1974 obhájil kandidátskou dizertační práci na téma Klinika alkoholického srdce a polykardiografická studie vlivu etanolu na srdce.

V r. 1980 obhájil habilitační práci na téma Vliv etanolu na metabolismus lipidů V rámci stipendia WHO studoval v letech 1969-70 biostatiku a epidemiologii rizikových faktorů ICHS na London School Hygiene and Tropical Medicine. Tento pobyt ho nasměroval na další studium. S prof. Takáčem realizoval první epidemiologickou sondu rizikových faktorů ICHS ve vesnických i městských oblastech Východního Slovenska. Popsal též vliv minerálky s vysokým obsahem sodíku na prevalenci esenciální hypertenze u dospělých v geologicky izolovaném okrsku.

Ve spolupráci s prof. Reinišem a doc. Pokorným ze IV. interní kliniky 1. LF UK se podílel na uspořádání Symposií o aterosklerose střídavě v Praze a na Slovensku. Po rozdělení státu byla jeho zásluhou uspořádána další 4 Mezinárodní symposia o ateroskerose na Slovensku. V letech 1979-89 byl řešitelem 4 výzkumných úkolů s tematikou epidemiologie rizikových faktorů ICHS. V letech 1984-98 zastával funkci ředitele Ústavu experimentální medicíny, kde byla pod jeho vedením zkoumána problematika reperfuse myokardu po ligatuře koronárních tepen a za podmínek výrazného psychického stresu. V té době publikoval 3 monografie, které získaly cenu prof. Reiniše jako nejlepší monografie z daného oboru.

Zorganizoval 8 Mezinárodních edukačních kurzů o aterosklerose konaných za přítomnosti delegáta Mezinárodní společnosti pro aterosklerosu. Byl dlouholetým vědeckým sekretářem Slovenské sekce pro aterosklerosu v rámci Slovenské společnosti klinické biochemie, v letech 2011-14 jejím předsedou. Od roku 1992 je hlavním odborným redaktorem časopisu

Ateroskleróza, který je v evidenci Copernicus Publishing Database a vychází především jeho zásluhou.

V odborném růstu se specializoval na vnitřní lékařství, kardiologii a studium metabolismu lipidů a lipoproteinů. Atestace absolvoval v letech 1978 a 1980. Z celkových 40,5 let pracoval 12 let ve zdravotnictví, 16,5 let ve školství a 12 let ve výzkumu. Po dobu 14 let též vykonával diagnostiku srdečních onemocnění v rámci Krajské kardiologické poradny. Výsledky své vědecké práce prezentoval na domácích i zahraničních odborných akcích. Publikoval 159 původních vědeckých sdělení, z toho 21 v zahraničních časopisech, dále 233 přehledných článků a 11 monografií. Přednesl celkem 472 přednášek, z toho 55 na mezinárodních akcích. Citační ohlas doma i v zahraničí byl zaznamenán 175krát.

Za svoji plodnou práci byl oceněn zlatou medailí SLS, medailí SLS Dr. Guotha (zakladatele Slovenské medicíny v Budapešti), zlatou medailí Americké biografické společnosti za celoživotní práci, medailemi Karlovy Univerzity, University P. J. Šafaříka a ČSL vědecko-technické společnosti. Americká biografická instituce ho při příležitosti životního jubilea před 5 lety zařadila mezi pozoruhodné osobnosti světa. V r. 1984 se stal členem New Yorkské akademie věd a je členem několika vědecko-výzkumných mezinárodních společností. V r. 2002 mu bylo uděleno čestné členství Společnosti patologické a klinické fyziologie ČLS JEP. Po dobu 20 let se účastnil symposia „Atherosklerosa – diagnostika, léčba a prevence“ pořádaného touto Společností, kde přednesl celkem 44 plenárních přednášek. Při příležitosti letošního jubilea mu předsednictvo České lékařské společnosti J. E. Purkyně jako ocenění celoživotní práce udělilo čestné členství ČLS JEP.

Výbor Společnosti patologické a klinické fyziologie srdečně blahopřeje k významnému jubileu a do dalších let přeje životní optimismus, pevné zdraví a sílu k další tvořivé spolupráci.

Je velmi neobvyklé, setkat se po pěti letech s týmž jubilantem, který zůstal aktivně tvořícím vědcem ve věku, kterého se málokdo dožívá. Natož aby byl schopen publikační a přednáškové činnosti v oboru tak obtížném a proměnlivém, jako je metabolismus lipidů. Jsme si vědomi výjimečnosti osobnosti pana profesora Kollára a jsme šťastni, že máme tu vzácnou příležitost přivítat jej opět v našich řadách. Co říci závěrem Hoc est vivere bis, vita posse priore frui. Umět využít život dosud prožitý, to je jako žít dvakrát.

Mnohá další léta, Jozefe

O B S A H

Autor	Str.
Brůha	1
Dostálová	5
Dušejevská	9
Hüttl	18
Kazdová	23
Macášek	28
Malínská	33
Matušková	37
Oliyarnyk	43
Pánek	49
Pláteník	51
Pohořelá	55
Šeda	94
Vecka	58
Vítková	66
Zamrazilová	72
Zeman	73
Žák	82

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

REGRESE JATERNÍ FIBRÓZY

REGRESSION OF LIVER FIBROSIS

R. Brůha

4th internal clinic, Charles University Prague, First Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague

Abstract

Chronic liver injury (including the most frequent liver disease worldwide - non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD) is accompanied by a scarring process - fibrosis. Fibrosis is driven by chronic inflammation and an altered activity of chemokines and cytokines, resulting in increase of matrix-expressing cell types like myofibroblasts. This process usually leads to the end-stage of fibrosis - cirrhosis. Recent clinical studies showed that liver fibrogenesis and even cirrhosis may be reverted. Basic conditions to remodel scar tissue and to revert into a normal liver include the termination of chronic tissue damage, initiation of myofibroblast apoptosis or senescence and fibrinolysis of excess scar tissue. The evaluation of liver fibrosis has been based on liver biopsy previously. Recently non-invasive methods based on measurement of liver elasticity or serologic markers of fibrosis are implemented into routine praxis.

Úvod

O prognóze pacienta s jakoukoli chronickou jaterní chorobou rozhoduje proces fibrotizace jaterní tkáně, který je podkladem vývoje do stadia cirhózy (1, 2). Tato skutečnost se týká pacientů s nejčastějšími chronickými jaterními chorobami v naší populaci, kterými jsou nealkoholové jaterní postižení (NAFLD), poškození jater v souvislosti s abúzem alkoholu a chronická virová hepatitida C. Stupeň fibrózy je tak jedním z nejdůležitějších prognostických parametrů pacientů s chronickými jaterními chorobami.

Jaterní fibróza

Jaterní fibróza je obecná reakce jaterního parenchymu na chronické poškození způsobené různými etiologickými faktory a vedoucí ve svých důsledcích ke vzniku cirhózy (3). Proces fibrotizace není specifický pro játra, řada mechanismů uplatňujících se při tomto procesu je společná i pro jiné tkáně. Úvodním impulzem ve vývoji chronické jaterní choroby je poškození epiteliálních buněk v játrech (hepatocytů v případě parenchymatozní léze či žlučových epitelů při cholestatických chorobách) (4). Tyto buňky následně začnou produkovat mediátory, které jsou podkladem zánětlivé reakce i fibrózy. Mezi tyto mediátory patří volné kyslíkové radikály, ligandy tzv. hedgehog dráhy, různé nukleotidy a signální molekuly buněčné smrti. K odumření epiteliálních buněk nedochází jen klasickou nekrózou, ale uplatňuje se i apoptóza, autofagie a pyroptóza. Všechny tyto procesy se liší svými specifickými intracelulárními procesy i signály, které buňky uvolňují do svého okolí.

Klíčovým impulzem, který vede k následné fibróze je aktivace jaterních hvězdicových buněk (HSC - hepatic stellate cells). Tyto buňky získávají schopnost kontraktility a produkce extracelulární hmoty - stávají se z nich aktivní buňky - **myofibroblasty**. Na procesu aktivace jaterních hvězdicových buněk se podílí celá kaskáda změn ovlivňujících nitrobuněčnou transkripci, translaci i epigenetické faktory a probíhající mnoha paralelními dráhami. Mimo podnětů z poškozených epiteliálních buněk jsou za aktivaci HSC odpovědné i podněty ze zánětlivých buněk infiltrujících jaterní parenchym. Jedná se například o aktivaci receptoru pro PDGF (β -platelet-derived growth factor), ovlivnění farnesoid X rfeceptoru (FXR), PPAR,

receptoru pro vitamin D (VDR) a mnoha dalších. Aktivované myofibroblasty začnou produkovat velké množství extracelulární hmoty - kolagenu (především typu I a III), který se ukládá v mezibuněčných prostorech a je podkladem procesu fibrotizace. Pro vývoj jaterní choroby do stadia cirhózy je podstatný zánik původní struktury jaterních lalůčků, tvorba difuzních vazivových sept a neoangiogeneze.

Regrese fibrózy

Dříve se předpokládalo, že proces fibrotizace je zcela nevratný; v dnešní době již existuje mnoho experimentálních i klinických důkazů o tom, že i pokročilá fibróza je potenciálně vratný proces umožňující dokonce kompletní zhojení. Klinická data prokazující reverzibilitu fibrózy (a do určité fáze vývoje i cirhózy) se zprvu opírala o výsledky rozsáhlých studií v léčbě virových hepatitid B a C (5, 6). Následně byla regrese fibrotických změn v játrech prokázána i u jiných chronických onemocnění (alkoholové poškození, NAFLD, hereditární hemochromatóza, autoimunní hepatitida, biliární obstrukce) (7). Zdá se, že i proces regrese fibrózy je obecná reakce jaterní tkáně, která není příliš ovlivněna prvotní etiologií jaterní choroby, ale je jednoznačně závislá na odstranění etiologického agens. V experimentu se pro studium regrese fibrotizace využívají 2 zvířecí modely: chronické podávání CCl₄ s následným vysazením toxické látky nebo kompletní přerušování žlučových cest s následnou bilio-jejunální anastomózou. V obou případech může dojít již do 6 týdnů od vysazení CCl₄ či uvolnění žlučových cest k ústupu fibrotických změn a téměř k úplné normalizaci histologického nálezu. Zvířecí modely umožnily pochopit podstatu nejen procesu samotné fibrotizace, ale i regrese fibrózy. Ukázalo se, že hlavním a prvotním průvodním jevem při ústupu fibrotických změn je velmi rychlé snížení počtu aktivovaných jaterních myofibroblastů navozené apoptózou.

Apoptóza myofibroblastů je regulována mnoha podněty. Mimo jiné, přítomnost kolagenu I i zánětlivých cytokinů blokuje apoptózu myofibroblastů a udržuje je tak zpětnou vazbou v aktivovaném stavu (například u transgenických myši s nedegradovatelnou variantou kolagenu I nedojde po vysazení CCl₄ k poklesu aktivovaných myofibroblastů). Vymizení aktivovaných myofibroblastů a snížení (či kompletní zastavení) produkce extracelulární matrix je sice základní podmínkou regrese fibrózy, ale k odstranění extracelulární matrix nestačí. Remodelace tkáně je regulována mechanismy na molekulární úrovni, které zahrnují proteázy, jejich inhibitory a růstové faktory. Hlavní úlohu v degradaci extracelulární hmoty hrají matrix metaloproteázy (MMP), což jsou Zn- a Ca-dependentní endopeptidázy (8, 9). MMP jsou schopné kompletně degradovat extracelulární matrix (především kolagen I) a nacházejí se tak v játrech při hojení fibrózy ve zvýšené míře. Tkáňové inhibitory metaloproteáz (TIMP) jsou naopak proteázové inhibitory, které tlumí aktivitu MMP, působí proti apoptóze myofibroblastů a brání tak degradaci vaziva (při procesu fibrotizace dochází k významné upregulaci TIMP, při hojení fibrózy aktivita TIMP výrazně klesá). Posun rovnováhy mezi MMP a TIMP ve prospěch degradace vaziva je tak zásadním procesem umožňujícím regresi fibrózy.).

Výše popsaný mechanismus regrese fibrózy dává teoretický základ k úvahám o přímé antifibrotické léčbě (tabulka 1) (10). V současné době však není schválen žádný preparát, který by přímo vedl k regresi jaterní fibrózy.

Hodnocení pokročilosti fibrózy

Hodnocení jaterní fibrózy bylo dříve založeno na histologickém vyšetření jaterní biopsie, v dnešní době se uplatňují stále více neinvazivní vyšetření využívající buď hodnocení jaterní elasticity (Fibroscan[®], ARFI, SWE), nebo vyšetření různých sérových a klinických parametrů souvisejících buď přímo nebo nepřímo s procesem fibrotizace (APRI, NAFLD Fibrosis score, Hepascore, ELF test, Fibrotest[®] aj.) (11).

Závěr

Stejně jako fibróza, i změny při jaterní cirhóze jsou do určité fáze vývoje vratné. Po úspěšné léčbě virových hepatitid, dodržování abstinence u alkoholové cirhózy je popisován ústup cirhotických změn, ústup portální hypertenze i regrese jícnových varixů. Zlomem ve vývoji jaterní cirhózy, od kterého již není návratu k plné reparaci fibrotických změn je pravděpodobně kapilarizace sinusoid.

Tabulka 1. Potenciální možnosti přímé antifibrotické léčby (v současnosti není žádný preparát s přímými antifibrotickými účinky schválen pro humánní použití)

<p>Podpoření apoptózy či deaktivace aktivovaných jaterních myofibroblastů</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sulfasalazin či jeho analoga • Antagonisté cannabinoidních receptorů (CB1) • Blokáda TIMP-1 (siRNA, neutralizující protilátky či využití inaktivované MMP) • Terapie cílená specificky na jaterní hvězdicové buňky: Anti EGFR protilátky, Liposomy dodávající siRNA proti kolagenním chaperonům, Protilátky proti gliotoxinu • PPARγ agonisté • Agonisté Farnesoid X receptoru • Atorvastatin
<p>Stimulace degradace extracelulární matrix</p> <ul style="list-style-type: none"> • Blokáda TIMP-1 (siRNA, neutralizující protilátky či využití inaktivované MMP) • Genová léčba ovlivňující MMP • Halofuginon • Inhibitory Lysyl oxidázy (LoxL2) • Buněčná léčba: Mobilizace CD133 kmenových buněk kostní dřeně pomocí autologního G-CSF, Autologní CD13 makrofágy
<p>Ovlivnění imunitní odpovědi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Blokáda CCL2/CCR2 • Posílení reparativní funkce makrofágů (prostřednictvím liposomů) • Ovlivnění CXCL9/CXCR3

Studie byla podpořena projekty RVO-VFN64165, PROGRES Q25/LF1/2 a AZV reg. č. 15-28745A.

Literatura

1. Ehrmann J., Hůlek P.: Hepatologie. Praha: Grada Publishing, 2010, 616 s.
2. Rosselli M., MacNaughtan J., Jalan R., Pinzani M.: Beyond scoring: a modern interpretation of disease progression in chronic liver disease. Gut 2013; 62: 1234-1241.
3. Guo J., Friedman SL.: Hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis 2007; 27: 413-426.
4. Saffioti F., Pinzani M.: Development and Regression of Cirrhosis. Dig Dis 2016; 34: 374-381.

5. **Chang TT., Liaw YF., Wu SS., et al.:** Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010; 52: 886-893.
6. **Kweon YO., Goodman ZD., Dienstag JL., et al.:** Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; 35: 749-755.
7. **Dufour JF., DeLellis R., Kaplan MM.:** Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127: 981-985.
8. **Arthur MJ.:** Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G245-249.
9. **Consolo M., Amoroso A., Spandidos DA., Mazzarino MC.:** Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). *Int J Mol Med* 2009; 24: 143-152.
10. **Weiskirchen R., Tacke F.:** Liver Fibrosis: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Dig Dis* 2016; 34: 410-422.
11. **Stasi C., Milani S.:** Non-invasive assessment of liver fibrosis: Between prediction/prevention of outcomes and cost-effectiveness. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 1711-1720.

ROSTLINNÉ NÁPOJE (ROSTLINNÁ "MLÉKA"). JEJICH VÝŽIVOVÉ HODNOCENÍ A SROVNÁNÍ S KRAVSKÝM MLÉKEM

PLANT DRINKS (PLANT "MILKS"). NUTRITION EVALUATION AND COMPARISON WITH COW MILK

J. Dostálová, K. Matějková, Š. Smutná, M. Doležal

Department of Food Analysis and Nutrition, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague

The results of analysis of fat, proteins and carbohydrates contents of twelve plant drinks from Czech market in year 2017 are presented. Contents of nutrients in drinks were very low. Sensory evaluation of plant drinks was worse than sensory evaluation of cow milk. Fatty acids composition of fat of six liquid and six dried soya drinks and four milk substitutes is presented. From the nutrition point of view fatty acids composition of dried soya drinks and milk and cream substitutes was (with two exception) unfavorable - high content of saturated fatty acid or trans fatty acids.

V současné době se řada spotřebitelů na základě informací v mediích a reklamy rozhodla zařadit do svého jídelníčku rostlinné nápoje, často nejen jako jeho zpestření, ale jako náhradu kravského mléka. Náhrada kravského mléka rostlinnými nápoji je nevhodná, zejména u dětí, těhotných a kojících žen a starších osob, protože rostlinné nápoje nemohou dodat organizmu některé živiny v dostatečném množství a kvalitě. Náhrada kravského mléka má opodstatnění pouze v případě nesnášenlivosti laktózy (zde je ale možnost použít výrobky s nízkým obsahem laktózy) nebo alergie na mléčnou bílkovinu. Tyto nápoje nemohou z hlediska výživového kravské mléko nahradit, protože se jedná o potraviny výrazně odlišného složení. Z tohoto důvodu se od roku 1994 podle evropské legislativy nemohou nazývat „mléko“, ale „nápoj“. Rostlinné nápoje mají i horší senzoryckou jakost (chuť, vůni, plnost chuti a někdy i barvu) než kravské mléko. Rostlinné nápoje jsou výrazně dražší než kravské mléko a jejich cena neodpovídá výživovému přínosu pro organizmus a jejich senzoryckým vlastnostem.

Potravinářská komora zadala akreditované laboratoři chemickou analýzu složení dvanácti rostlinných nápojů ze současného trhu v ČR a zkušební hodnotitelé provedli jejich senzoryckou analýzu v senzorycké laboratoři VŠCHT – ke vzorkům rostlinných nápojů byla zařazena i dvě mléka (plnotučné a polotučné). Výsledky analýz rostlinných nápojů a senzoryckého hodnocení uvádíme v tabulce 1 a 2.

Plnotučné mléko bylo podle pětibodové stupnice hodnoceno nejlépe – 1,5. Nejhuře byl hodnocen nápoj makový 4,8.

Rostlinné nápoje jsou v podstatě extrakty (výluhy) surovin rostlinného původu, nejčastěji sóji, mandlí, rýže, máku, ovsu, kukuřice, kokosu, pohanky apod. V některých případech nápoje obsahují i rozptýlené částičky semen. Obsah suroviny a tím i živin v tekutém nápoji je většinou velmi malý. Obsah sušiny v tekutých nápojích se pohyboval od 4,07 do 12,04 % (obsah sušiny v mléce je průměrně 13 %). Díky nízkému obsahu sušiny mají nápoje „vodovou“ chuť, a proto se do některých přidávají látky zahušťující označené kódem E. V rostlinných nápojích můžeme najít různá „ěčka“, do mléka se však žádná „ěčka“ přidávat nesmějí.

Tabulka 1. Composition, sensory evaluation and price of plant drinks and cow milk

Složení, senzoričké hodnocení a cena rostlinných nápojů a mléka					
Výrobek	Tuk (%)	Sacharidy (%)	Bílkoviny (%)	Senzorika	Cena Kč/100 ml
Zajíc Pohankový nápoj	23	67	2,6	3,2	10,0
Alpro COCONUT original	0,9	2,7	0,1	3,5	7,7
topnatur Kokosový Nápoj sušený	27	66	0,5	3,5	9,3
Zajíc Sójový nápoj natural	27	63	3,4	3,5	10,0
topnatur Kukuřičný Nápoj sušený	25	67	0,6	3,5	8,0
Alpro Soya original	1,2	1,6	2,1	3,5	7,0
Mléko plnotučné	3,5	4,4	3,3	1,5	do 2
Mléko plnotučné sušené	27,5		25,5		do 3

* názvy tekutých nápojů jsou modré, sušených černé

** údaje pro mléko jsou, kromě senzoričkého hodnocení, údaje z literatury

Tabulka 2. Composition, sensory evaluation and price of plant drinks and cow milk

Složení, senzoričké hodnocení a cena rostlinných nápojů a mléka					
Výrobek	Tuk (%)	Sacharidy (%)	Bílkoviny (%)	Senzorika	Cena Kč/100 ml
Topnatur Rýžový Nápoj sušený	21	25	1,7	3,6	8,4
Alpro OAT original	1,5	6,6	0,3	3,8	7,0
Provamel Organic Bio Oat Hafer	1,3	7,8	0,3	3,9	6,0
Eco milk Almond Original	2,1	5,4	0,9	4,2	16,0
Provamel Organic Bio RICE	1,1	10,5	0,1	4,2	8,0
Elephanths Nápoj obsahující Mak	3,6	0,4	1,6	4,8	0,25 c
Mléko plnotučné	3,5	4,4	3,3	1,5	do 2
Mléko plnotučné sušené	27,5		25,5		do 3

* názvy tekutých nápojů jsou modré, sušených černé

** údaje pro mléko jsou, kromě senzoričkého hodnocení, údaje z literatury

Obsah bílkovin byl ve srovnání s mlékem (3,5 % i více) výrazně nižší. Pohyboval se od < 0,1 do 2,85 %, ale většinou byl menší než 1 %. Biologická hodnota rostlinných bílkovin je v důsledku nedostatku některých nezbytných (esenciálních) aminokyselin výrazně nižší než biologická hodnota bílkovin mléka, přičemž biologická hodnota bílkovin syrovátky je nejvyšší ze všech bílkovin.

Složení tuku rostlinných nápojů je, s výjimkou tuku kokosového, z hlediska výživy vhodnější než tuku mléčného. Z důvodu nízkého obsahu tuku v rostlinných nápojích je ale tato výhoda v podstatě zanedbatelná. Jiná situace je u sušených rostlinných nápojů, kde je obsah tuku poměrně vysoký (21,56 - 27,17 %) a jeho složení je z hlediska výživového nevhodné – vysoký obsah nasycených mastných kyselin a zejména trans mastných kyselin ve výrobcích Zajíc. Do sušených výrobků se tuky přidávají, v některých případech i částečně ztužené, které obsahují trans mastné kyseliny. Trans mastné kyseliny působí nepříznivě na vznik srdečně cévních onemocnění, diabetu a některých dalších onemocnění. Jejich obsah v potravinách je v řadě zemí legislativně regulován a uvažuje se, že v dohledné době bude limitován i v evropské legislativě. Analýzou složení tuku sójových nápojů značky Zajíc jsme se na VŠCHT zabývali již několikrát a vždy jsme vysoký obsah trans mastných kyselin našli. Je zvláštní, že tyto výrobky je stále obsahují, když většina výrobků na českém trhu je již neobsahuje. Nejnovější výsledky našich analýz složení tukové složky sójových nápojů včetně náhrad mléka k ochucení kávy nebo čaje jsou v tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3. Fatty acids composition of fat of six liquid and two dried soya drinks (% from all fatty acids)

	Joya	Soja Bio	DM Bio	Alnatura Bio	Alpro	Provamel Bio	Zajíc natura	Zajíc plus
SFA	17,15	17,29	16,48	17,41	16,12	17,01	24,97	23,19
USFA	82,85	82,71	83,52	82,59	83,88	82,99	75,03	76,81
MUFA	21,14	28,47	23,29	23,50	21,34	19,51	32,33	43,06
PUFA	61,59	54,11	60,12	58,98	62,42	63,35	0,00	0,00
TFA	0,12	0,13	0,11	0,11	0,12	0,13	42,70	33,75
n-6	54,15	48,00	51,97	52,24	53,57	53,88	0,00	0,00
n-3	7,39	6,08	8,12	6,70	8,81	9,43	0,00	0,00

SFA – nasycené mastné kyseliny, USFA – nenasyčené mastné kyseliny, MUFA – monoenoové mastné kyseliny, PUFA – polyenoové mastné kyseliny, TFA – trans mastné kyseliny, n-6 – mastné kyseliny řady n-6 (omega 6), n-3 - mastné kyseliny řady n-3 (omega 3)

Tabulka 4. Fatty acids composition of fat of four dried soya drinks and four milk and cream substitutes (% from all fatty acids)

	Zajíc smetana	Zajíc vláknina	Topnatur	Soya drink	Soya creamer	Cofee creamer	Soya topping creamer	Orasi
SFA	26,05	25,22	96,63	16,68	25,21	58,94	98,16	13,66
USFA	73,95	74,78	3,37	83,32	74,79	41,06	1,84	86,34
MUFA	36,99	39,51	1,20	20,33	40,45	28,02	0,74	25,30
PUFA	0,00	0,00	1,94	62,80	0,00	0,00	0,00	60,06
TFA	36,95	35,27	0,24	0,18	34,35	13,05	1,10	0,99
n-6	0,00	0,00	1,72	54,18	0,00	0,0	0,00	59,40
n-3	0,00	0,00	0,22	8,62	0,00	0,00	0,00	0,66

Složení mastných kyselin sušených sójových nápojů a náhrad mléka a smetany bylo až na dvě výjimky nevhodné (vysoký obsah nasycených nebo trans mastných kyselin).

Obsah sacharidů a cukrů nebyl příliš vysoký, takže nepříznivý vliv cukrů na zdraví i vznik zubního kazu se téměř neprojeví.

Obsah vápníku byl u většiny výrobků výrazně nižší než v mléce. Vápník v kravském mléce je navíc mnohem lépe využitelný než v potravinách rostlinného původu. V mléce je jeho využitelnost větší než 30 %, zatímco v potravinách rostlinného původu je jeho využitelnost pouze z několika procent.

Obsah vitaminů nebyl stanoven, ale vzhledem k nízkému obsahu sušiny a tuku bude obsah většiny vitaminů, pokud nejsou obohaceny, nižší než v mléce.

Vysoká konzumace sójových nápojů je spojena s rizikem příjmu různých přírodních toxických látek. Např. u dětí, žen v reprodukčním věku a u mužů je rizikový příjem fytoestrogenů, které mají strukturu podobnou ženským pohlavním hormonům a mohou je do určité míry nahradit. Na základě letošních Státního zdravotního ústavu v Brně nelze doporučit vyšší konzumaci makového mléka vzhledem vysokému obsahu kadmia. Rýžové nápoje obsahují většinou vyšší množství arsenu. Sója je také silný alergen.

Závěrem je možno shrnout, že rostlinné nápoje mohou dobře sloužit k obohacení jídelníčku, ale v žádném případě nemohou nahradit mléko. Jedná se o potraviny zcela odlišného složení. Při nákupu je vhodné sledovat surovinové složení a tabulku výživových hodnot a podle těchto údajů se rozhodnout zda výrobek koupíme. Předražené výrobky, které obsahují zanedbatelné množství suroviny, podle které se výrobek jmenuje a zbytek je voda bychom kupovat neměli. Neprospějeme tím ani svému zdraví a ani si nepochutnáme.

LIPOPROTEINOVÝ FENOTYP U PACIENTŮ S TERMINÁLNÍM SELHÁNÍM LEDVIN

LIPOPROTEIN PHENOTYPE IN HEMODIALYSED PATIENTS

M. Dušejovská^{1,2}, M. Vecka¹, B. Staňková¹, I. Rychlík², A. Žák¹

¹ 4. interní klinika, I. LFUK a VFN v Praze, Praha

² Dialyzační středisko Fresenius Medical Care, Praha 10 - Královské Vinohrady

Abstrakt

Úvod: Pacienti s terminálním renálním selháním (ESRD) vykazují vysokou mortalitu na kardiovaskulární choroby (KVCH). Aktuálně se pozornost obrací k jednotlivým složkám lipidového metabolismu - subfrakcím lipoproteinů LDL a HDL.

Cíl: U pacientů s ESRD na vysokoobjemové hemodiafiltraci (HV HDF) jsme sledovali změny velikostí subfrakcí LDL a HDL. Subfrakce byly korelovány s vybranými klinicko-biochemickými parametry vstupně a po 5 letech.

Metody: Do studie bylo zařazeno 57 pacientů a 50 kontrol bez alterace renální funkce. Vyšetřili jsme klinicko-biochemické parametry a subfrakce HDL a LDL byly separovány pomocí elektroforézy na přístroji Quantimetrix Lipoprint (TM). Data byla zpracována programem Statistica®.

Výsledky

1. pacienti na HV-HDF měli typický lipidový profil se zvýšenými koncentracemi triacylglycerolů, nízkou hladinou HDL cholesterolu, a zvýšeným obsahem cholesterolu v remnantních částicích (VLDL a IDL), který byl doprovázen snížením obsahu cholesterolu ve velkých částicích LDL. Vztah mezi velikostmi HDL a počtem rizikových faktorů KVCH jsme pozorovali pouze v kontrolní skupině
2. profil lipoproteinů se nelišil mezi skupinami přeživších a nepřeživších. Nepřeživší měli vyšší koncentrace CRP a nižší hladiny HDL-C
3. ve skupině přeživších došlo během pětiletého sledování k přesunu cholesterolu jak v HDL, tak i v apoB lipoproteinech směrem k menším částicím. Lipoproteinový profil se podobal ke konci sledování kontrolní skupině

Úvod

Pacienti s terminálním selháním ledvin (ESRD) jsou dependentní na náhradě funkce ledvin, mezi které patří hemodialýza (HD), peritoneální dialýza (PD), transplantace ledviny (TxL). Hemodialýza je pro pacienty s ESRD životně nezbytná, nicméně zároveň přispívá k rozvoji řady patofyziologických dějů, které vedou ke zvýšení oxidačního stresu, chronické zánětlivé odpovědi a progresi aterosklerotických změn. Tyto procesy vedou k rozvoji a manifestaci kardiovaskulárních komplikací, které se ve značné míře podílí na předčasném úmrtí pacientů v chronickém hemodialyzačním programu. Snahou je co nejlepší ovlivnění míry kardiovaskulárního rizika a tím ovlivnění komplikací vyplývajících z kardiovaskulárních chorob (KVCH). Důsledkem je následné zlepšení kvality života pacientů na HD.

Změny lipidového metabolismu u pacientů v chronickém HD programu

Pacienti v chronickém HD programu mají charakteristické složení lipidogramu se zvýšením VLDL, IDL. Ve VLDL je nalézána přítomnost apoB-48, který se fyziologicky vyskytuje pouze v chylomikronech. Vzestup TAG je spojen s poklesem HDL, které zároveň obsahují jejich větší podíl. LDL mívají pacienti často ve fyziologickém rozmezí nebo snížené s přesunem k sd-LDL. Dále bývá dyslipidémie modifikována u pacientů s vyjádřeným

nefrotický syndromem nebo thyreopatií jako přidruženými komorbiditami (sekundární dyslipidémie). Koncentrace apoC-II mají klesající trend a naopak apoC-III stoupají. Populace pacientů v HD programu, rovněž obsahuje zvýšené plazmatické koncentrace Lp(a), které korelují s chronickým zánětem (Žák 2010). V neposlední řadě se u pacientů s chronickým onemocněním ledvin uplatňuje tzv. cholesterolový paradox, kdy u běžné populace koreluje kardiovaskulární mortalita s TC, tak u pacientů s ESRD byl pozorovaný opačný vztah. Tedy čím nižší TC, tím vyšší mortalita na KVCH. Tento inverzní vztah je dán především chronickým zánětem ve spojení s malnutricí MIA syndrom, který je dále spojený s vaskulárními kalcifikacemi MIAC syndrom (Tesař 2010). Jak již bylo zmíněno mohutnou hybnou silou, která vede k velmi významným proaterogenním změnám u pacientů s ESRD je chronický zánět, který modifikuje změny lipoproteinů co do množství, tak i do jejich funkce. Krom narušené funkce mají HDL i rozdílnou strukturu podmíněnou schopností absorbovat TC. Popisuje se, že malé denzní HDL jsou účinnějšími příjemci TC ve srovnání s většími (zralými, HDL – HDL_{2,3}) (11). Na základě modelu Tangierské nemoci (jedinci s téměř nedetekovatelnými hladinami HDL a apoAI nevykazují významnější výskyt KVCH, který by se dal předpokládat. Naopak homozygoti (B2B2Taql) mají i přes vysoké HDL, vyšší výskyt KVCH) a tzv. cholesterolovému paradoxu pacientů s CKD. Vzhledem k této skutečnosti lze polemizovat o výhradně protektivní funkci HDL a je nutné lipoproteiny podrobit podrobné analýze včetně stanovení jejich subfrakcí, abychom se spolehlivě dokázali vyjádřit k jejich rizikovitosti u různých patologických stavů. Výsledky detailního vyšetření lipidových podtříd by tak v klinické praxi mohly být nápomocny v predikci kardiovaskulárního rizika u HD pacientů.

Metodika

Vyšetřovaný soubor

Soubor sledovaných pacientů sestával z 57 osob s ESRD (35 mužů/22 žen, věk $62,9 \pm 12,7$ roků) v pravidelném hemodialyzačním programu (Dialyzační středisko Fresenius Medical Care, Praha 10 - Královské Vinohrady) a 50 kontrolních osob bez známek CKD párovaných podle věku a pohlaví. Základní charakteristiky souboru jsou uvedeny v tabulce 1. Všechny vyšetřované parametry přeživších pacientů s ESRD se po pěti letech porovnávaly se vstupními hodnotami na počátku studie. Všichni pacienti byli ve stabilním klinickém stavu bez známek akutních kardiologických problémů. Někteří měli zavedenou hypolipidemickou léčbu [30 užívalo statiny (atorvastatin), 2 jiná hypolipidemika], 3 pacienti měli anurii, u zbývajících byla diuréza zachována. Diabetes mellitus T2 mělo 28 pacientů (ve 13 případech byla zavedena léčba analogy inzulínu). Jako vazač fosfátu byl použit Renagel® (sevelamer hydrochlorid) u 13 pacientů. Pro účely pětiletého sledování bylo nakonec vhodných celkem 14 pacientů (33 pacientů nepřežilo – 31 z nich z kardiovaskulárních příčin, 2 pro onkologické komorbidity; 10 pacientů bylo transplantováno). Jeden pacient nemohl být využit pro další účely sledování, neboť nebyl k dispozici informovaný souhlas. Celková doba dialýzy v průběhu jednoho týdne se u všech pacientů pohybovala v rozmezí 12-15 hodin během jednoho týdne. U žádného pacienta jsme nepozorovali významné odchylky od cílového hydratačního stavu (dodržení tzv. „suché váhy“ a doporučené hodnoty ultrafiltrace).

Kontrolní skupina podobného věku a poměru muži/ženy (32 mužů/18 žen, věk $61,6 \pm 7,8$ roků) sestávala z 50 pacientů lipidové ambulance na IV. interní klinice 1. LF UK a VFN v Praze. Žádný z jedinců v kontrolní skupině nevykazoval známky renální insuficience. Někteří pacienti byli léčeni hypocholesterolemickými léky (9 statiny, 1 fenofibrátem), 20 mělo hypertenzi, u 17 jedinců byl diagnostikován DM T2 (8 léčeno metforminem), a 3 pacienti měli CVD. Všichni pacienti byli ve stabilizovaném (> 1 rok) metabolickém stavu beze změn v terapii. Pacienti byli také charakterizováni podle počtu přítomných konvenčních

RF pro CVD, jako pohlaví (muži nad 55 let), přítomnost DM, hypertenze, poruch lipidového metabolismu: (LDL-C > 1,8 mmol/l a/nebo TAG > 1,7 mmol/l a/nebo HDL/C < 1,0 mmol/l), kouření a BMI nad 25 kg/m².

Analytické a statistické metody

Pro stanovení biochemických parametrů bylo použito standardních kolorimetricko-enzymatických metod. Zastoupení cholesterolu v lipoproteinových frakcích bylo stanoveno na platformě Lipoprint® s použitím LDL kitu pro apoB lipoproteinové subfrakce a kitu HDL pro subfrakce HDL (Dušejovská 2017). Výsledky jsme hodnotili v prostředí software Statistica® for Windows ver. CZ12 (Statsoft, ČR). U proměnných s normálními distribucemi bylo pro porovnání hodnot mezi oběma skupinami použito t-testů (nepárového pro porovnání s kontrolní skupinou, párového pro baseline a follow-up hodnoty), pro rozdíly mezi distribucemi χ^2 test s Yatesovou korekcí. Negaussovsky distribuované proměnné byly před statistickým hodnocením nejdříve transformovány. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

Výsledky

Porovnání skupin pacientů s terminálním renálním selháním a kontrolní skupiny

V tabulce 1 jsou uvedeny základní klinické a biochemické charakteristiky hemodialyzovaných pacientů (HV-HDF) a kontrolní skupiny (KON). Obě skupiny se nelišily v hodnotách základních antropometrických parametrů. Vliv přítomnosti DM v obou skupinách na studované parametry byl zanedbatelný. Obě skupiny měly podobný poměr muži/ženy jak u nediabetiků, tak mezi diabetiky (obě $p > 0,5$; χ^2 -test s Yatesovou korekcí). Rozdílné hodnoty parametrů lipidového metabolismu u skupiny HV-HDF, jako nižší koncentrace TC ($4,4 \pm 1,0$ vs. $5,2 \pm 1,0$ mmol/l; $p < 0,001$), byly způsobeny jak nižšími koncentracemi LDL-C ($2,3 \pm 0,8$ vs. $3,1 \pm 0,8$ mmol/l; $p < 0,001$), tak i HDL-C ($1,2 \pm 0,4$ vs. $1,4 \pm 0,4$ mmol/l; $p < 0,001$), zatímco koncentrace TAG byly u skupiny HV-HDF vyšší ($2,1 \pm 1,1$ vs. $1,5 \pm 0,8$ mmol/l; $p < 0,01$).

Profily lipoproteinových subfrakcí jsou uvedeny v tabulce 2. Mezi skupinami KON a HV-HDF jsme pozorovali rozdíly jak mezi apoB lipoproteiny, tak v subfrakcích HDL. Skupina HV-HDF měla vyšší obsah cholesterolu ve frakci VLDL a částicích IDL na úkor nižšího zastoupení cholesterolu ve velkých LDL částicích. Tyto změny byly doprovázeny velkými rozdíly mezi koncentracemi cholesterolu v non-HDL a LDL částicemi ve skupině HD. Rozdíly mezi koncentracemi cholesterolu v sdLDL částicích nedosáhly statistické významnosti. Distribuce cholesterolu mezi subfrakcemi HDL byla též rozdílná: HV-HDF pacienti měli distribuci HDL cholesterolu posunutou směrem k větším subpopulacím. Naopak obsah cholesterolu ve středně velkých částicích HDL a malých HDL byl nižší u skupiny HV-HDF.

Tabulka 1. Základní klinické charakteristiky skupin HV-HDF a KON

	HV-HDF	KON
počet	57	50
muži (%)	35 (61 %)	32 (64 %) ^{NS}
věk (roky)	62,9 ± 12,7	61,6 ± 7,8 ^a
BMI (kg.m ⁻²)	28,1 ± 6,3	29,3 ± 5,0
DM n (%)	28 (49 %)	17 (34 %) ^{NS}
součet RF pro CVD (0-4/5-7)	34/23	39/11*
hypertenze n (%)	29 (51 %)	37 (74 %)*
CVD n (%)	37 (65 %)	3 (6 %)***
dyslipidémie n (%)	51 (89 %)	49 (98 %) ^{NS}
terapie statiny n (%)	27 (47 %)	13 (26 %)*
systolický krevní tlak (mmHg)	143 ± 22	135 ± 16* ^b
diastolický krevní tlak (mmHg)	70 ± 15	88 ± 11***
optimální tělesná hmotnost (kg)	83 ± 21	86 ± 16
močovina (mmol/l)	17,8 ± 4,7	5,6 ± 1,4***
kreatinin (μmol/l)	681 ± 177	177 ± 18 ***
kyselina močová (μmol/l)	316 ± 63	320 ± 83
celkový protein (g/l)	67,1 ± 5,4	71,6 ± 4,2***
albumin (g/l)	38,1 ± 3,1	46,1 ± 1,9 ***
CRP (mg/l)	4,1 (2,5-9,9)	2,5 (1,2-5,2)**
TC (mmol/l)	4,45 ± 1,01	5,15 ± 1,05 ***
TAG (mmol/l)	2,12 ± 1,10	1,52 ± 0,79 **
HDL-C (mmol/l)	1,19 ± 0,44	1,40 ± 0,39*
LDL-C (mmol/l)	2,29 ± 0,84	3,09 ± 0,81***
glukóza (mmol/l)	7,51 ± 3,65	5,29 ± 0,81***
eGFR (ml/s)	0,13 ± 0,05	1,41 ± 0,25 ***

Zkratky: eGFR – odhadovaná rychlost glomerulární filtrace (ml/s) ; ^a – data jsou ve formátu průměr ± S.D. nebo medián (Q1-Q3), ^b – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (nepárový t-test); HV-HDF – vysokoobjemová hemodiafiltrace, KON – kontrolní skupina; CVD – kardiovaskulární nemoc, RF – rizikové faktory

Tabulka 2. Lipoproteinový profil u skupin HV-HDF a KON

	HV-HDF	KON
VLDL (% cholesterolu)	35,4 ± 5,6	24,8 ± 6,7*** ^b
suma subfrakcí LDL (% cholesterolu)	39,5 ± 8,5	53,5 ± 7,2***
- IDL (IDL _{A-C}) ^d (% cholesterolu)	30,3 ± 4,6	25,3 ± 5,2***
- velké LDL (LDL ₁₋₂) (% cholesterolu)	7,5 ± 4,6	25,6 ± 6,2***
- malé LDL (LDL ₃₋₇) (% cholesterolu)	0,0 (0,0 - 2,4)	1,4 (0,7 - 3,7)
suma HDL subfrakcí (% cholesterolu)	24,4 ± 4,9	21,4 ± 6,4*
- velké HDL (HDL ₁₋₃) (% HDL cholesterolu)	44,5 ± 10,6	21,8 ± 6,9***
- střední HDL (HDL ₄₋₇) (% HDL cholesterolu)	37,7 ± 7,0	43,1 ± 3,5***
- malé HDL (HDL ₈₋₁₀) (% HDL cholesterolu)	17,8 ± 5,3	35,4 ± 8,0***

^a – data jsou ve formátu průměr ± S.D. nebo medián (Q1-Q3), ^b – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (nepárový t-test; HV-HDF – vysokoobjemová hemodiafiltrace, KON – kontrolní skupina

Porovnání skupin přeživších a nepřeživších ve skupině pacientů s terminálním renálním selháním

Sledované období 5 let přežilo pouze 14 ze skupiny 47 pacientů na HV-HDF (nepočítaje v to pacienty podstoupivší transplantaci ledvin), což je v souladu s daty uváděnými pro Českou republiku. Dále jsme porovnávali vstupní hodnoty u skupiny přeživších a nepřeživších, abychom stanovili možné prediktory přežívání. Skupina přeživších byla charakterizována (tabulka 3) vyššími hodnotami diastolického krevního tlaku. Pouze dvě osoby ze skupiny přeživších (15 %) měly plazmatické koncentrace albuminu pod normálními hodnotami (35 g/l), zatímco u skupiny nepřeživších tato situace nastala v 8 případech (24 %), ovšem bez statistické významnosti (χ^2 -test s Yatesovou korekcí = 0,14; $p = 0,709$). U skupiny nepřeživších jsme zaznamenali vyšší koncentrace CRP a glukózy. Parametry lipidového metabolismu se lišily pouze v případě HDL-C, ani distribuce lipoproteinových subfrakcí nebyla rozdílná, a to jak u apoB, tak u HDL lipoproteinů (tabulka 4). Obě skupiny se nelišily ani věkem ani zastoupením mužů/žen. Délka hemodialyzačního programu před vstupem do studie u obou skupin byla též podobná.

Tabulka 3. Základní klinické charakteristiky skupin - přeživší a nepřeživší

	přeživší	nepřeživší
počet	14	33
muži (%)	6 (43 %)	22 (66 %) ^{NS}
věk (roky)	58,7 ± 12,1	65,6 ± 12,4 ^a
BMI (kg.m ⁻²)	28,2 ± 6,9	28,3 ± 6,4
DM n(%)	4 (29)	20 (61) ^{NS}
trvání dialyzačního programu (roky)	2,1 (0,5-6,2) ^c	2,4 (1,4-2,9)
systolický krevní tlak (mmHg)	140 ± 20	145 ± 21 ^b
diastolický krevní tlak (mmHg)	76 ± 9	65 ± 14 ^{***}
optimální tělesná hmotnost (kg)	85,1 ± 28,9	84,5 ± 18,0
močovina (mmol/l)	16,4 ± 3,9	18,3 ± 5,4
kreatinin (μmol/l)	684 ± 155	660 ± 192
kyselina močová (μmol/l)	310 ± 65	322 ± 67
celkový protein (g/l)	667 ± 6	67 ± 5
albumin (g/l)	39 ± 3	38 ± 3
CRP (mg/l)	3,3 (1,7-4,0) ^c	7,5 (3,3-15,1) ^{***}
TC (mmol/l)	4,9 ± 0,8	4,3 ± 1,1
TAG (mmol/l)	2,3 ± 2,2	1,4 ± 1,0
HDL-C (mmol/l)	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,4 [*]
LDL-C (mmol/l)	2,6 ± 0,6	2,3 ± 0,9
glukóza (mmol/l)	5,1 (4,4-6,2) ^c	7,6 (5,6-10,8) [*]
eGFR (ml/s)	0,11 ± 0,13	0,03 ± 0,07

Zkratky: eGFR – odhadovaná rychlost glomerulární filtrace (ml/s) ; ^a – data jsou ve formátu průměr ± S.D. nebo medián (Q1-Q3), ^b – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (nepárový t -test); HV-HDF – vysokoobjemová hemodiafiltrace, KON – kontrolní skupina; CVD – kardiovaskulární nemoc, RF – rizikové faktory

Tabulka 4. Lipoproteinový profil u skupin přeživších a nepřeživších

	HV-HDF	KON
VLDL (% cholesterolu)	35,1 ± 5,2	35,0 ± 5,9
suma subfrakcí LDL (% cholesterolu)	39,5 ± 4,5	40,0 ± 2,5
- IDL (IDL _{A-C}) ^d (% cholesterolu)	31,2 ± 5,2	30,2 ± 4,5
- velké LDL (LDL ₁₋₂) (% cholesterolu)	7,0 ± 4,2	7,8 ± 4,4
- malé LDL (LDL ₃₋₇) (% cholesterolu)	0,0 (0,0 – 1,9) ^c	0,6 (0,0 – 2,9)
suma HDL subfrakcí (% cholesterolu)	24,9 ± 4,7	24,2 ± 5,0
- velké HDL (HDL ₁₋₃) (% HDL cholesterolu)	44,5 ± 10,0	44,2 ± 9,2
- střední HDL (HDL ₄₋₇) (% HDL cholesterolu)	37,4 ± 6,5	37,7 ± 4,9
- malé HDL (HDL ₈₋₁₀) (% HDL cholesterolu)	18,0 ± 5,3	18,0 ± 5,4

^a – data jsou ve formátu průměr ± S.D. nebo medián (Q1-Q3), ^b – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (nepárový t-test; HV-HDF – vysokoobjemová hemodiafiltrace, KON – kontrolní skupina)

Analýza pětiletého sledování přeživších pacientů

Celkem jsme hodnotili 13 párovaných dat u skupiny přeživších. Základní charakteristika souborů pacientů je uvedena v tabulce 5. Pro močovinu, kreatinin ani kyselinu močovou jsme nezaznamenali žádné trendy, ovšem koncentrace β_2 -mikroglobulinu se zvýšily během sledovaného období. Pokles koncentrace celkové bílkoviny nebyl doprovázen úbytkem koncentrace albuminu. Koncentrace CRP stouply. Změny v parametrech lipidového metabolismu zahrnovaly pouze snížení koncentrace LDL-C, neboť úbytky koncentrací TC a TAG nedosáhly statistické významnosti, což se také projevilo v nesignifikantních změnách hodnot atherogenního indexu plazmy (AIP). Na druhé straně jsme pozorovali mnoho změn v distribucích lipoproteinových subfrakcí (tabulka 6), a to jak u apoB, tak u HDL lipoproteinů. Po 5 letech došlo ke snížení obsahu cholesterolu u lipoproteinů VLDL, zatímco u LDL došlo ke zvýšení, které bylo způsobeno vyšším obsahem cholesterolu jak u velkých subfrakcí LDL, tak i u sdLDL. Distribuce HDL subfrakcí též doznala několika změn: po pětiletém období se zastoupení HDL cholesterolu u skupiny přeživších posunulo ve prospěch malých a středně velkých HDL subfrakcí, kdežto velké HDL subfrakce obsahovaly méně cholesterolu.

Porovnání kontrolní a HV-HDF skupiny

Hodnoty biochemických parametrů stanovených v obou sledovaných skupinách odrážejí specifické rozdíly typické pro pacienty v hemodialyzačním programu, jako například změněný lipidový profil zahrnující snížené koncentrace HDL-C, LDL-C, TC a vyšší koncentrace TAG (Vaziri 2014).

Změny ve skupině HV-HDF odpovídají výsledkům jiných studií porovnávajících HV-HDF pacienty s kontrolními skupinami bez terapie statiny a známky CVD. V naší kontrolní skupině byly známky CVD přítomny pouze u několika jedinců (3 z 50). Progrese CVD u HV-HDF pacientů je spojována s vysokým zastoupením částic VLDL a IDL (Shoji 1998), což může být způsobeno jejich sníženým katabolismem díky nízké aktivitě LPL a/nebo sníženým vychytáváním remnantních částic jaterními LDL receptory a tzv. „LDL-receptor related proteins“ (Saland 2010). Lipoproteinový profil u naší HV-HDF skupiny byl v soulase s výše uvedenými údaji, tzn. vykazoval zvýšené zastoupení cholesterolu v částicích VLDL a IDL na úkor velkých LDL částic.

Tabulka 5. Porovnání základních klinických charakteristiky – 5 leté sledování

	Počátek HV-HDF (n = 13)	Konec sledování (n = 13)
BMI (kg.m ⁻²)	28,1 ± 7,1	27,6 ± 8,3
systolický krevní tlak (mmHg)	143,8 ± 19,6	136,2 ± 22,1 ^b
diastolický krevní tlak (mmHg)	74,0 ± 9,6	65,6 ± 16,4
močovina (mmol/l)	16,8 ± 4,1	16,6 ± 4,7
kreatinin (μmol/l)	749 ± 146	822 ± 181
kyselina močová (μmol/l)	309 ± 50	260 ± 107
celkový protein (g/l)	67,2 ± 6,1	62,2 ± 4,8*
albumin (g/l)	38,2 ± 2,9	38,0 ± 4,2
CRP (mg/l)	3,3 (1,7-4,0) ^c	9,1 (6,0-13,9)*
TC (mmol/l)	4,82 ± 0,98	4,24 ± 0,74
non-HDL-C – LDL-C (mmol)	0,96 ± 0,54	0,86 ± 0,52
TAG (mmol/l)	2,24 ± 1,49	1,92 ± 1,07
HDL-C (mmol/l)	1,32 ± 0,45	1,32 ± 0,44
LDL-C (mmol/l)	2,54 ± 0,65	2,06 ± 0,67*
glukóza (mmol/l)	5,0 (4,6-6,2)	5,4 (4,7-6,1)
AIP (poměr)	0,18 ± 0,35	0,13 ± 0,35
eGFR (ml/s)	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,03
doba dialýzy (hod/týden)	14,37 ± 1,00	13,74 ± 0,73
OCM (poměr)	1,62 ± 0,31	1,83 ± 0,31*
β ₂ -mikroglobulin (mg/l)	16,4 ± 2,4	21,2 ± 2,5***

Zkratky: eGFR – odhadovaná rychlost glomerulární filtrace (ml/s); ^a – data jsou ve formátu průměr ± S.D. nebo medián (Q1-Q3), ^b – * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (párový t-test); HV-HDF – vysokoobjemová hemodiafiltrace, KON – kontrolní skupina; CVD – kardiovaskulární nemoc, RF – rizikové faktory

Tabulka 6. Lipoproteinový profil – 5 leté sledování

	počátek	5 leté sledování
VLDL (% cholesterolu)	33,9 ± 6,5 ^a	18,4 ± 7,2**
suma subfrakcí LDL (% cholesterolu)	42,8 ± 7,1	61,7 ± 10,7**
- IDL (IDL _{A-C}) ^d (% cholesterolu)	32,7 ± 6,8	37,3 ± 11,5
- velké LDL (LDL ₁₋₂) (% cholesterolu)	6,9 ± 3,9	16,2 ± 7,3**
- malé LDL (LDL ₃₋₇) (% cholesterolu)	0,0 (0,0 - 2,7) ^c	4,1 (0,0 - 17)*
suma HDL subfrakcí (% cholesterolu)	24,1 ± 5,2	20,7 ± 5,8*
- velké HDL (HDL ₁₋₃) (% HDL cholesterolu)	46,5 ± 8,8	29,7 ± 8,6***
- střední HDL (HDL ₄₋₇) (% HDL cholesterolu)	36,4 ± 6,5	44,9 ± 4,5**
- malé HDL (HDL ₈₋₁₀) (% HDL cholesterolu)	17,2 ± 4,0	25,4 ± 11,2*

^a – data jsou ve formátu průměr ± S.D. nebo medián (Q1-Q3), ^b – * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (párový t-test; HV-HDF – vysokoobjemová hemodiafiltrace, KON – kontrolní skupina

Zastoupení HDL subtříd se u HV-HDF skupiny lišilo u všech tří hlavních skupin, ale stále upřednostňovalo větší částice. V současné době se stále diskutuje o vztahu jednotlivých HDL subtříd vzhledem k riziku/progresi CVD, přičemž velké HDL částice jsou často zmiňovány jako ateroprotektivní (Martin 2014). Na druhé straně, je známo, že malé HDL částice jsou účinnějšími akceptory cholesterolu než velké, na lipidy bohaté, HDL podtřídy. Zdá se tedy,

že důležitým aspektem HDL částice je její struktura/složení, nejenom její velikost (Movva 2008). U hemodialyzovaných pacientů jsou malé HDL nezávislými prediktory úmrtí na kardiovaskulární komplikace (Vekic 2011). Ve skupinách sledovaných v této práci byl vztah mezi počtem konvenčních rizikových faktorů pro CVD a podtřídami HDL pozorován pouze u kontrolní skupiny (negativní korelace s obsahem cholesterolu ve velkých HDL, $r = -0,396$, $p < 0,01$; Spearmanův pořadový koeficient korelace, kladná korelace s obsahem cholesterolu v malých HDL, $r = 0,348$; $p < 0,05$), kdežto v HV-HDF skupině jsme žádné korelace nepozorovali. Zastoupení sumy rizikových faktorů pro CVD bylo asymetrické ve prospěch vyšších hodnot (> 4) ve skupině HV-HDF (χ^2 -test s Yatesovou korekcí = 4,14; $p = 0,04$) v porovnání s kontrolní skupinou.

Porovnání skupin přeživších a nepřeživších

Skupina nepřeživších měla nevýznamně vyšší zastoupení pacientů s DM (χ^2 -test s Yatesovou korekcí; $p = 0,1$), což mohlo být spojeno s vyššími koncentracemi glukózy v této skupině a s vyšší úrovní chronického zánětu, protože koncentrace CRP byly u nepřeživších také vyšší. Vyšší hodnoty diastolického krevního tlaku pozorované u nepřeživších odpovídají známému U-typu vztahu mezi krevním tlakem a rizikem mortality u dialyzovaných pacientů (Hannedouche 2016), přičemž pro nízké hodnoty odráží tento vztah vliv srdečního selhávání. S výjimkou hodnot HDL-C, parametry lipidového metabolismu nerozlišovaly skupinu přeživších od nepřeživších. Přežívání pacientů na HV-HDF je spojeno s lepším nutričním statutem. Rozdíly v lipoproteinových profilech jsme též nepozorovali. Jedna studie s dobou sledování 36 měsíců taktéž žádné rozdíly pro subfrakce HDL mezi přeživšími a nepřeživšími nepozorovala (Vekic 2011).

Analýzy po 5 letech

Lipidové parametry se během sledovaného období neměnily s výjimkou snížení LDL-C. Lipidový metabolismus mohl reagovat na již přítomné rizikové faktory CVD u těch, kteří přežili pětileté sledované období a také období před vstupem do studie (medián 2 roky), přeuspořádáním lipoproteinových profilů. Tyto změny, patrné u apo B lipoproteinů jako přesun cholesterolu z VLDL do LDL částic za současného snížení hodnot LDL-C, naznačují remodelaci částic bohatých na TAG (i když celková koncentrace TAG v plazmě se nezměnila). Koncentrace apoB nebyly dostupné pro oba časové body, tedy nelze činit závěry ohledně změn absolutního počtu lipoproteinových částic. Někteří autoři dokonce přišli s hypotézou, že sdLDL nejsou u pacientů v HV-HDF programu spojeny s kardiovaskulárními komplikacemi (Yeo 2009). Zvýšená koncentrace β_2 -mikroglobulinu během sledování naznačuje postupné zhoršování reziduální funkce ledvin (sekundární amyloidóza spojená se stárnutím a HD). Nicméně tento protein u našich pacientů neměl žádný vztah k zastoupení cholesterolu v lipoproteinových třídách

Doba sledování dosáhla 5 let, což bylo déle než medián trvání HD programu před vstupem do studie (2 roky). Stratifikace pacientů podle mediánu trvání již proběhlého HD programu na počátku studie (poměr muži/ženy mezi skupinami se nelišil) odhalila pouze malé rozdíly v apoB lipoproteinovém profilu: u pacientů s kratším trváním HD programu jsme našli nižší obsah cholesterolu ve VLDL (34 ± 6 vs. 37 ± 5 % cholesterolu v lipoproteinech, pod medián vs. nad medián; $p = 0,023$) a IDL (32 ± 5 vs. 29 ± 4 % cholesterolu v lipoproteinech; $p = 0,018$) částicích. Ostatní analyzované parametry se mezi těmito dvěma skupinami nelišily, až na koncentrace β_2 -mikroglobulinu, které byly nižší u skupiny pod medián trvání HD programu ($15,3 \pm 2,4$ vs. $16,9 \pm 2,5$ mg/l; $p = 0,037$). Koncentrace TAG se nelišily ($2,3 \pm 1,0$ vs. $1,9 \pm 2,0$ mg/l; $p = 0,108$). Obsah cholesterolu v jednotlivých lipoproteinových subfrakcích neměl vztah k trvání HD programu na počátku studie jak v celé skupině HV-HDF, tak v podskupinách přeživších i nepřeživších.

Závěr

Pacienti s HD měli typické hodnoty lipidových parametrů doprovázené redistribucí apoB lipoproteinů do částic VLDL a IDL, spojené se zvýšeným obsahem cholesterolu v subfrakci velkých HDL částic. Vztah subfrakcí HDL k počtu rizikových faktorů CVD byl prokázán pouze u kontrolní skupiny.

Distribuce lipoproteinových tříd na počátku sledování se nelišily mezi skupinou přeživších a nepřeživších (s výjimkou hodnot HDL-C) a nebyly ve vztahu k hodnotám IMT. Na konci sledovaného období došlo u přeživších k redistribuci cholesterolu v HDL částicích do menších podtříd, která byla podobná distribuci cholesterolu v HDL částicích u kontrolní skupiny. Změny v lipoproteinech nesoucích apoB byly též výsledkem redistribuce cholesterolu z VLDL do LDL částic. Problematika týkající se lipoproteinových subfrakcí u vysokoobjemové hemodiafiltrace bude nepochybně předmětem dalších studií.

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

Literatura

Dušejská M., Staňková B., Vecka M., et al.: Lipid metabolism in patients with end-stage renal disease: a five year follow-up study. *Curr Vasc Pharmacol* 2017 (v tisku); doi: 10.2174/1570161115666170530104143.

Hannedouche T., Roth H., Krummel T., et al.: Multiphasic effects of blood pressure on survival in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2016; 90: 674-684.

Martin SS., Jones SROV., Toth PP.: High-density lipoprotein subfractions: current views and clinical practice applications. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25: 329-336.

Movva R., Rader DJ.: Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem* 2008; 54(5): 788-800.

Saland JM., Parekh RS.: Chapter 11 – Dyslipidemia in Renal Disease. In: Kwiterovich PO Jr (Ed). *The Johns Hopkins textbook of dyslipidemia*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010, s. 132-142.

Shoji T., Nishizawa Y., Kawagishi T., et al.: Intermediate-density lipoprotein as an independent risk factor for aortic atherosclerosis in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1277-1284.

Tesař V.: Metabolické aspekty nemoci ledvin. In: Svačina Š (Ed.). *Poruchy metabolismu a výživy*. Praha: Galén 2010, 137-150

Vaziri ND.: Role of dyslipidemia in impairment of energy metabolism, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2014; 18: 265-268.

Vekic J., Zeljkovic A., Bogavac-Stanojevic N., et al.: Cox proportional hazard model analysis of survival in end-stage renal disease patients with small-sized high-density lipoprotein particles. *Clin Biochem* 2011; 44: 635-641.

Yeo Y., Byun SW., Lee JY., et al.: Lack of association between small dense low-density lipoprotein levels and coronary artery diseases in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2009; 30: 310-314.

Žák A., Zeman M.: Sekundární dyslipidémie (dyslipoproteinémie). In: Svačina Š (Ed.). *Poruchy metabolismu a výživy*. Praha: Galén 2010, 147-176.

NEGATIVNÍ ÚČINKY PODÁVÁNÍ METHYLGLYOXALU NA METABOLICKÉ ZMĚNY V TUKOVÉ TKÁNI U NEOBÉZŇNÍHO MODELU METABOLICKÉHO SYNDROMU

M. Hüttl¹, H. Malínská¹, I. Marková¹, O. Oliyarnyk¹, J. Trnovská¹, J. Urbanová¹, O. Šeda², L. Kazdová¹

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

²Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Úvod a cíl

Methylglyoxal (MGO) je toxický, vysoce reaktivní dikarboxyl, který vzniká jako vedlejší produkt během peroxidace lipidů, glykolýzy, katabolismu proteinů, ketolátů a je hlavním prekursorem pro tvorbu pokročilých produktů glykace. Většina methylglyoxalu je v organismu detoxifikována glyoxalázovým systémem, avšak při metabolických poruchách spojených s diabetem, zejména s hyperglykemií a dyslipidemií, je jeho produkce vyšší než úroveň odbourávání, methylglyoxal se akumuluje v buňkách a stává se pro organismus toxickým.

Zdroje methylglyoxalu mohou být i exogenního původu. Dikarboxyly se vyskytují i v některých potravinách (med, káva, sýr, pasterizované mléko) a značně i v sycených nápojích s fruktózovým sirupem. Účinek methylglyoxalu z alimentárních zdrojů je však diskutabilní, neboť jeho stabilita ve střevním traktu i vstřebatelnost jsou velmi nízké a z těla je rychle vylučován močí (Matafome et al. 2017). Nadměrná produkce dikarboxylů přispívá k metabolickým a vaskulárním změnám v mnoha tkáních tím, že se účastní zánětlivých procesů, narušuje regulační mechanismy a přispívá k rozvoji orgánových komplikací. Methylglyoxal reaguje s funkčními skupinami proteinů (argininem, lysinem), metabolity mastných kyselin a s DNA tvoří adukty. Tyto mechanismy mohou vést k tvorbě produktů pokročilé glykace (AGEs) a k ireversibilnímu poškození buněčných funkcí. Z dosavadních výzkumů vyplývá, že methylglyoxal se podílí na rozvoji makro- i mikrovaskulárních komplikací, aterosklerózy a dysfunkce endotelu (Tikellis et al. 2014), poškozuje inzulinovou signální kaskádu, má toxický vliv na sekreci inzulinu (Fiory et al. 2011) a potencuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) (Jia et al. 2012). Je známo, že k celosvětovému nárůstu obezity přispívá nadměrná konzumace tuků a sacharidů, které jsou oboje prekurzory methylglyoxalu. Současné studie ukazují, že methylglyoxal, který se akumuluje v adipocytech může vést ke strukturálním a funkčním změnám tukové tkáně, a že tyto změny mohou zdaleka předcházet manifestaci klinické obezity (Matafome et al. 2017, Masania et al. 2016).

V našem experimentu byla použita transkriptomická analýza ke sledování vlivu exogenního methylglyoxalu na metabolické změny ve viscerální tukové tkáni hereditárně hypertriglyceridémických (HHTg) potkanů. Tento kmen představuje neobézní model metabolického syndromu s dyslipidemií, inzulinovou rezistencí a ektopickým ukládáním lipidů.

Metodika

Pokus byl proveden na dospělých (5-měsíčních) samcích kmene hereditárně hypertriglyceridémických HHTg potkanů (HHTg kontrola: n = 6, HHTg MGO: n = 7). Po dobu 4 týdnů byli potkani krmeni standardní dietou a pokusné skupině byl 3krát týdně intragastricky podáván methylglyoxal v dávce 0,5 mg/kg tělesné hmotnosti. Glukózová tolerance byla sledována pomocí orálního glukózového tolerančního testu (OGTT) po intragastrickém podání glukózy (3g/100g tělesné hmotnosti) po nočním lačnění a hodnocena výpočtem plochy pod křivkou (AUC_{0-120min}). 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).

Ke stanovení obsahu triacylglycerolů v játrech, resp. svazech 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). Koncentrace leptinu, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) a $\text{TNF}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor α) byly stanoveny pomocí Imunoassay Luminex. Složení mastných kyselin ve fosfolipidech bílé tukové tkáně bylo stanoveno plynovou chromatografií s FID detekcí. Koncentrace methylglyoxalu v séru a tkáních bylo stanoveno pomocí HPLC s fluorescenční detekcí po předchozí derivatizaci.

Transkriptomická analýza v epididymální tukové tkáni byla provedena pomocí DNA čipů Microarray (Affymetrix). Expres jednotlivých genů byly měřeny kvantitativní RT-PCR (Taq Man gene expression assay, Life Technologies).

Senzitivita tkáně k účinku inzulinu byla sledována *ex vivo* při inkubaci tkáně bez inzulinu a s inzulinem (250 $\mu\text{U/ml}$) podle inkorporace ^{14}C -U-glukózy do glykogenu kosterního svalu, resp. tukové tkáně. Lipolýza v tukové tkáni byla sledována podle uvolňování NEMK při inkubaci tkáně bez adrenalinu nebo s adrenalinem (250 $\mu\text{g/ml}$).

Výsledky a diskuse

Podávání MGO neovlivnilo tělesnou hmotnost (402 ± 9 vs $381 \pm 3\text{g}$; n.s.), hmotnost myokardu, ledvin, jater ani tukové tkáně.

Intragastrické podávání methylglyoxalu zvýšilo v cirkulaci potkanů hladiny MGO o 55,7 % v porovnání s kontrolní skupinou (tab.1), v bílé tukové tkáni byl obsah MGO vyšší o 35,5 % než u zvířat bez intervence (tab. 2). Podávání methylglyoxalu bylo u HHTg potkanů spojeno se zvýšením glykémie o 23,8 %, inzulinémie o 109,3 %, cholesterolémie o 33,6 % a se zhoršenou glukózovou tolerancí (AUC_{0-120} : + 8,2 %, $p < 0,05$). V porovnání s kontrolami, methylglyoxal zvýšil sérové hladiny prozánětlivých faktorů MCP-1 a $\text{TNF}\alpha$, zatímco hladiny adiponektinu a leptinu v cirkulaci nebyly ovlivněny (tab. 1).

Tab. 1. Metabolické parametry v séru

	HHTg kontrola	HHTg+MGO	p<
<i>MGO</i> (nM/ml)	0,237 \pm 0,021	0,369 \pm 0,015	0,003
<i>Glukóza</i> (mmol/l)	7,13 \pm 0,15	8,83 \pm 0,17	0,001
<i>Inzulin</i> (nmol/l)	0,246 \pm 0,026	0,515 \pm 0,030	0,05
<i>AUC</i> 0-120min (mmol/l)	930 \pm 26	1006 \pm 18	0,05
<i>NEMK</i> (mmol/l)	0,43 \pm 0,05	0,49 \pm 0,06	n.s.
<i>Triglyceridy</i> (mmol/l)	4,80 \pm 0,49	3,21 \pm 0,49	0,05
<i>Cholesterol</i> (mmol/l)	1,19 \pm 0,07	1,59 \pm 0,99	0,05
<i>MCP-1</i> (ng/ml)	85,25 \pm 28,40	124,88 \pm 17,12	0,05
<i>TNFα</i> (pg/ml)	0,78 \pm 0,02	2,11 \pm 0,19	0,05

U HHTg potkanů 4-týdenní podávání methylglyoxalu již dále nezvyšovalo ektopické ukládání lipidů, ani více nezhoršovalo sníženou citlivost kosterního svalu k účinku inzulinu, které jsou pro tento kmen potkanů charakteristické (tab.2).

Tab. 2. Metabolické parametry ve tkáních

		HHTg kontrola	HHTg+MGO	p<
Játra	<i>Triglyceridy</i> (μmol/g)	14,44 ± 1,58	13,02 ± 0,94	n.s.
	<i>Cholesterol</i> (μmol/g)	8,99 ± 0,51	9,01 ± 0,51	n.s.
Kosterní sval	<i>Triglyceridy</i> (μmol/g)	2,88 ± 0,21	2,20 ± 0,25	n.s.
	<i>Glykogeneze</i> : - inzulin	255,6 ± 11,3	322,1 ± 0,25	n.s.
	(mmol gl./g/2hod) + inzulin	578,0 ± 61,9	708,0 ± 34,0	n.s.
Tuková tkáň	<i>Obsah MGO</i> (nmol/ml)	0,634 ± 0,035	0,859 ± 0,058	0,004
	<i>Lipogeneze</i> : - inzulin	315 ± 2,2	317 ± 1,7	n.s.
	(mmol gl./g/2hod) + inzulin	356 ± 3,1	332 ± 1,9	0,05

Inzulinová senzitivita bílé tukové tkáně, měřená podle inkorporace radioaktivně značené glukózy do lipidů, byla po podávání methylglyoxalu zhoršena (tab.2). Úroveň lipolýzy byla u sledovaných skupin srovnatelná.

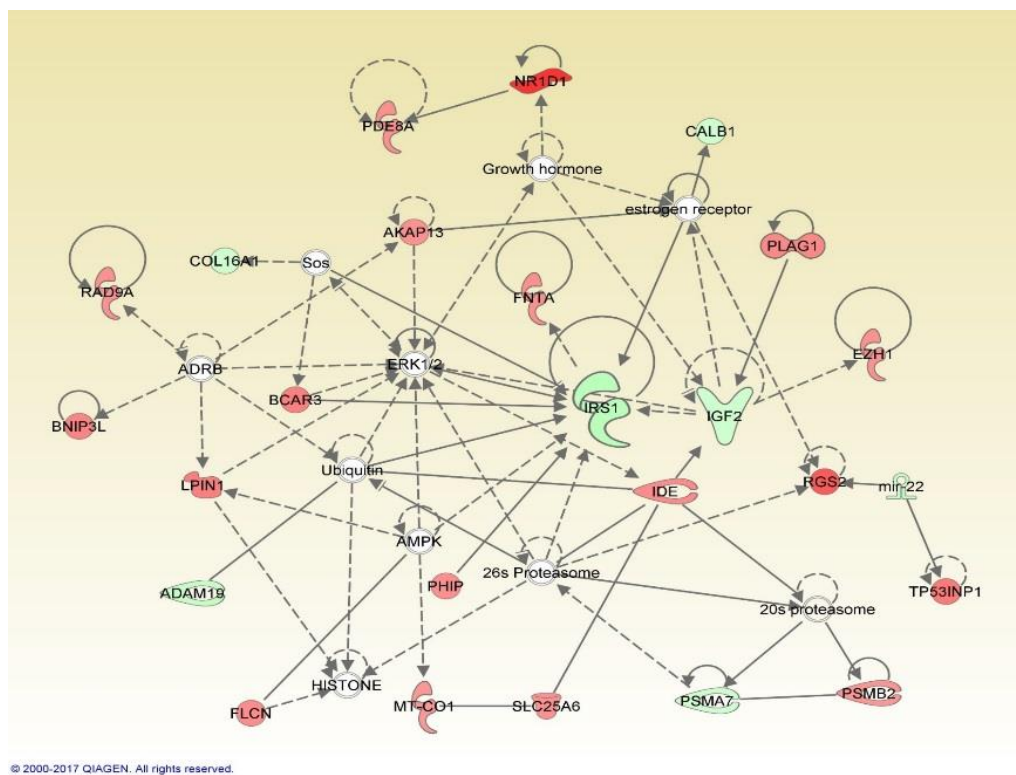
U HHTg potkanů léčených methylglyoxalem bylo zjištěno významně zhoršené složení mastných kyselin ve fosfolipidech viscerální tukové tkáně. Byl zvýšen podíl saturovaných mastných kyselin, zejména kyseliny palmitové (16:00) a myristové (14:00), a klesl podíl nenasycených mastných kyselin PUFA n-3 ($p < 0,001$), což může mít důležitý negativní dopad na fluiditu membrán a inzulinovou signalizaci.

Ve viscerální tukové tkáni methylglyoxal signifikantně snížil o 16,7 % relativní expresi mRNA a aktivitu *Nrf2* ($1,005 \pm 0,084$ vs $0,837 \pm 0,115$; $p < 0,01$). Tento nukleární transkripční faktor se účastní genové regulace antioxidantních enzymů, lipidového metabolismu a fyziologicky je významně zapojen do degradace methylglyoxalu v organismu. Podávání methylglyoxalu zvyšovalo relativní expresi mRNA prozánětlivého faktoru *Mcp-1* ($1,005 \pm 0,084$ vs $0,837 \pm 0,115$; $p < 0,05$), zatímco změny relativní exprese mRNA a aktivity glyoxalázy-1, která se účastní degradace MGO, zjištěna nebyla.

V bílé tukové tkáni komparativní transkriptomická analýza odhalila 61 transkriptů (42 upregulated, 19 downregulated), které ukázaly >1,2krát odlišnou expresi ($FDR < 0,05$) mezi HHTg kontrolní skupinou a HHTg potkany, kterým byl podáván MGO. Síťové analýzy ukázaly, že signifikantně odlišně exprimované geny se uplatňují zejména v oblasti regulace apoptózy (*Bcl6*, *Irs1*, *Tp53inp1*), zánětu (*Dusp10*, *Tp53inp1*), vaskulárních onemocnění (*Rgs2*, *Dusp10*, *Bcl6*) a inzulinové rezistence (*Nr1d1*, *Dusp10*, *Lpin1*, *Lrpap1*). Tyto výsledky, zjištěné na modelu HHTg potkanů, jsou v souladu se studiemi na buněčných liniích, které ukázaly, že methylglyoxal v různých buňkách aktivuje stresové a apoptické dráhy, a dále že je silným prekurzorem produktů pokročilé glykace (AGEs), které jsou spojeny s tvorbou vaskulárních lézí (Akhand et al. 2001, Brouwers et al. 2011, Chan et al. 2007, Du et al. 2000, Goldin et al. 2006, Negre-Salvayre et al. 2009)

Tab. 3. Geny signifikantně rozdílně exprimované mezi HHTg kontrolami a HHTg+MGO

Symbol	Gene Name	P-value	Fold Change
<i>Rgs2</i>	regulator of G-protein signaling 2	9,11E-08	1,65
<i>Nr1d1</i>	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	3,20E-07	2,90
<i>Lrpap1</i>	low density lipoprotein receptor-related protein associated p	8,86E-07	-1,13
<i>Gbe1</i>	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	1,65E-06	-1,12
<i>Cish</i>	cytokine inducible SH2-containing protein	1,89E-06	-5,53
<i>Mir22</i>	microRNA 22	5,95E-06	-1,29
<i>Irs1</i>	insulin receptor substrate 1	1,55E-05	-1,64
<i>Dusp10</i>	dual specificity phosphatase 10	3,27E-05	1,62
<i>Tp53inp1</i>	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	5,39E-05	1,34
<i>Lpin1</i>	lipin 1	7,45E-05	1,29

Obr. 1. Mechanistická síť s nejvyšším skóre

Závěr

U neoběžního modelu metabolického syndromu podávání methylglyoxalu snižovalo senzitivitu tukové tkáně k účinku inzulinu, zhoršilo složení mastných kyselin v bílé tukové tkáni a zvýšilo hladiny zánětlivých parametrů jak na metabolické, tak transkriptomické úrovni, což ukazuje na možnou úlohu methylglyoxalu v rozvoji a zvýraznění rysů metabolického syndromu. Změny v bílé tukové tkáni mohou následně přispívat k rozvoji poruch i v dalších tkáních. Výsledky podporují hypotézu, že v mechanismu dikarbonylového stresu se uplatňuje exprese genů zapojených do zánětlivých, oxidačních i regulačních procesů.

Studie byla podpořena grantem MZ ČR-RVO („IKEM, IČ 0023001“)

Literatura

Akhand AA., Hossain K., Mitsui H., et al.: Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for map family kinases and caspase activation in human endothelial cells. *Free Rad Biol & Med* 2001; 31: 20-30.

Brouwers O., Niessen PM., Ferreira I., et al.: Overexpression of glyoxalase-I reduces hyperglycemia-induced levels of advanced glycation end products and oxidative stress in diabetic rats. *J Biol Chem* 2011; 286: 1374-1380.

Chan WH, Wu HJ, Shiao NH.: Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. *J Cell Biochem* 2007; 100: 1056-1069.

Du J., Suzuki H., Nagase F., et al.: Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T cells by activating c-Jun N-terminal kinase. *J Cell Biochem* 2000; 77: 333-344.

Fiory F., Lombardi A., Miele C., et al.: Methylglyoxal impairs insulin signalling and insulin action on glucose-induced insulin secretion in the pancreatic beta cell line INS-1E. *Diabetologia* 2011; 54: 2941-2952.

Goldin et al. *Circulation* 114: 597-605, 2006

Jia X., Chang T., Wilson TW., Wu L.: Methylglyoxal mediates adipocyte proliferation by increasing phosphorylation of Akt1. *PLoS One* 2012; 7: e36610.

Matafome P., Rodrigues T., Sena C., Seiça R.: Methylglyoxal in Metabolic Disorders: Facts, Myths, and Promises. *Med Res Rev* 2017; 37: 368-403.

Masania J., Malczewska-Malec M., Razny U., et al.: Dicarbonyl stress in clinical obesity. *Glycoconj J* 2016; 33: 581-589.

Negre-Salvayre A., Salvayre R., Augé N., et al.: Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antiox & Redox Sig* 2009; 11: 3071-3109.

Tikellis C, Pickering RJ, Tsorotes D, et al.: Dicarbonyl stress in the absence of hyperglycemia increases endothelial inflammation and atherogenesis similar to that observed in diabetes. *Diabetes* 2014; 63: 3915-3925.

PŘÍZNIVÉ ÚČINKY EXTRAKTŮ Z ČERVENÉ ŘEPY NA HYPERTENZI, OXIDAČNÍ STRES A ZÁNĚT

BENEFICIAL EFFECTS OF THE RED BEETROOT EXTRATS ON HYPERTENSION, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION

L. Kazdová¹, O. Oliyarnyk¹, H. Malínská¹, I. Marková¹, M. Hüttl¹, J. Trnovská¹, M. Pravenec²

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

²Fyziologický ústav AV ČR, Praha

Úvod

Hypertenze, oxidační stres a mírný chronický zánět jsou metabolické poruchy, které zvyšují riziko rozvoje kardiovaskulárních poruch, diabetu a jeho vaskulárních komplikací. V patogenezi těchto poruch má důležitou úlohu endoteliální dysfunkce, ve které má klíčovou roli oxid dusnatý (NO).

NO je volný radikál, který vzhledem k plynné formě a poměrně dlouhému poločasu (0,05 - 1,18ms v lidské krvi) difunduje do hladké svaloviny cévní stěny, kde aktivuje solubilní adenylcyklázu, která stimuluje tvorbu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), který funguje jako signální molekula k zahájení myorelaxace. Základním biologickým významem NO je udržování cévní stěny v dilatovaném stavu a tím regulovat cévní tonus a krevní tlak. Kromě toho má úlohu i v proliferaci hladkosvalových buněk, angiogenezi a antiagregačním a antiadhesivním působením ovlivňuje integritu endotelu (Omar et al. 2016). Při snížené dostupnosti NO v důsledku jeho snížené syntézy nebo zvýšené degradaci dochází k dysfunkci endotelu. Projevuje se systémovými komplikacemi kardiovaskulárního systému – zejména hypertenzí, aterogenezi a dalšími metabolickými poruchami, které se podílejí na rozvoji metabolického syndromu a diabetu. V klinické studii bylo zjištěno, že varianta v genu pro endoteliální NOS (eNOS) byla spojena s poruchami podobnými metabolickému syndromu. Delece genu pro eNOS u myši zvýšila plazmatické koncentrace triacylglycerolů, cholesterolu, volných mastných kyselin, leptinu a množství viscerální tukové tkáně o 30 - 40 % (Cookk et al. 2003). Snížená tvorba NO byla zjištěna u obézních jedinců (Monti et al. 2003).

Zcela zásadní význam, který změnil pohled na zdravotní účinky nitrátů, bylo objevení metabolické dráhy, která metabolizuje nitráty na nitrity a nitrity na NO v roce 1990 (Lundberg et al. 1994). Tímto způsobem je produkováno značné množství NO zcela nezávisle na aktivitě NO syntáz. Za tento objev byla třem badatelům udělena v roce 1998 Nobelova cena v oboru fyziologie a lékařství.

Nitráty v potravě jako zdroje NO

Nitrát z přijímané potravy vstupuje do entero-salivárního systému a je pak absorbován v horním trávicím traktu do krve. Velká část nitrátů (přibližně 65 % je vyloučena močí a zbývajících 25 % je transportováno do slinných žláz v ústní dutině, kde nitrát reduktázy přítomné v bakteriích v ústní dutině redukuje nitrát na nitrit. Po bakteriální redukci nitrátu se zvyšuje koncentrace nitritu ve slinách až na hodnoty 10 mmol/l, které jsou přibližně 10 až 100krát vyšší než plazmatické koncentrace (20 - 40 μmol/l), které ale mohou po velké konzumaci nitrátů dosahovat až 400 μmol/l (Omar et al. 2016). Z ústní dutiny jsou nitrity absorbovány v horní části gastrointestinálního traktu a v kyselém prostředí žaludku dochází k jejich redukci na NO. Plazmatické hladiny nitrátů se zvyšují po 30 minutách od příjmu

nitrátů a dosahují maximálních hodnot po 3 hodinách (Lundberg et al. 2004). Dlouhý poločas nitrátů v plasmě 5 - 8 hodin a nitritů 20 - 45 minut zajišťuje dlouhodobý zdroj NO v organismu. Tvorba NO z nitrátů není ovlivněna přítomností hypoxie. To je rozdíl od syntézy NO pomocí eNOS, která je v podmínkách hypoxie utlumena pro nedostatek kyslíku nezbytného pro jeho syntézu. Z této skutečnosti vplývá velký význam tvorby NO z nitrátů při ischemicko-reperfučním poškození při infarktu myokardu.

Zdroje nitrátů v potravě

Největším zdrojem nitrátů v potravě je zelenina, ze které pochází u člověka přibližně 85 % přijímaných nitrátů. Zbýlých 15 % nitrátů má původ v pitné vodě. Naproti tomu zdrojem nitritů v potravě jsou uzeniny a uzené maso, kde jsou přidávány jako ochrana před botulotoxiny. Obsah nitrátů ve vodě i v zelenině může být rozdílný v závislosti na pěstitelských podmínkách, období sklizně, intenzitě slunečního svitu a dalších okolnostech. V následující tabulce jsou uvedeny tyto rozdíly u některých zelenin a u vody.

Tabulka 1. Rozsah koncentrace nitrátů v zelenině a ve vodě

Produkt	Obsah nitrátů rozsah, mg/kg	Produkt	Obsah nitrátů rozsah, mg/kg
Červená řepa	644 - 1800	Mrkev	121 - 316
Špenát	965 - 4259	Brambory	81 - 713
Hlávkový salát	970 - 2782	Cibule	23 - 235
Ředkvičky	1060 - 2500	Rajčata	17 - 70
Zelí	333 - 725	Voda povrchová	23 - 30
Okurky	151 - 384	Voda minerální	0,1 - 6,3

Zdroj: Lidder S and Webb AJ. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate – nitrite – nitric oxide pathway. *Brit J Clin Pharmacol* 2012; 75: 677-696.

V posledních letech byla pozornost zaměřena na účinky červené řepy (*Beta vulgaris rubra*) jako na zdraví prospěšnou funkční potravinu. Červená řep obsahuje kromě vysokého obsahu nitrátů i další zdraví prospěšné komponenty (Georgiev et al. 2010 – 3)

Betalainy: betainin, betacyaniny (potravinářské barvivo E162)

betaxantiny – vulgaxantin, indikaxantin

Fenolové látky: flavonoidy, epikatechin, fenolické amidy

Kyselina askorbovou

Karotenoidy

Rutin

Kyselina kávovou

Tyto komponenty potencují široké spektrum pozitivních účinků červené řepy. Řepa patří mezi pět zelenin, které obsahují skupinu vysoce bioaktivních pigmentů známých jako betalainy, **betalainy, které ovlivňují genovou expresi, enzymové reakce a mají významné antioxidační a protizánětlivé mechanismy** (Tesoriere et al. 2004). V recentních studiích byla publikována řada výsledků prokazujících příznivé ovlivnění hypertenze, diabetu 2. typu, kardiovaskulárních poruch a demence podáváním červené řepy (viz přehled: Clifford et al. 2015).

Nitráty a endoteliální dysfunkce

Experimentální studie ukázaly, že podávání nitrátu myším s delecí endoteliální NOS snížilo krevní tlak, váhové přírůstky, množství viscerální tukové tkáně, triacylglycerolémii a zlepšilo

glukózovou homeostázu. Naopak deficiencie příjmu nitrátu/nitritu u myši vedla po třech měsících k poruchám podobným metabolickému syndromu – dyslipidemií, viscerální obezitě glukózové intoleranci. Po 18 měsících deficiencie došlo u myši ke zvýšení tělesní hmotnosti, inzulinové rezistenci a ke zvýšení krevního tlaku. Po 22 měsících této diety myši hynuly na kardiovaskulární poruchy, včetně akutního infarktu myokardu. Tyto výsledky ukazují, že dlouhodobá deficiencie nitrátu vede k endoteliální dysfunkci, metabolickému syndromu a kardiovaskulárním komplikacím (Kina-Tanada et al. 2017). Rovněž v klinických studiích byl zjištěn stimulační vliv zvýšeného příjmu nitrátu hladiny cGMP v cirkulaci, zatímco nitrát-deficitní dieta snížila tkáňové koncentrace cGMP (Kapil et al. 2010).

Nitráty a kardiovaskulární poruchy

V klinické studii bylo zjištěno, že akutní podání 500 ml řepné šťávy (22 mmol nitrátu; 0,35 mmol/kg tělesné hmotnosti) snížilo systolický krevní tlak o 10,4 mmHg a diastolický tlak o 8mmHg. K maximálnímu poklesu došlo za 2,5 - 3 hodiny, což je doba, za kterou je nitrát metabolizován na nitrit a NO. Při zabránění polykání slin podobu 3 hodin po konzumaci řepné šťávy kompletně eliminovalo pokles krevního tlaku (Webb et al. 2012). Podobné účinky měla i desinfekce ústní dutiny (Govoni et al. 2008).

K příznivým účinkům šťávy z červené řepy patří i prodloužení doby před nástupem klaudikace o 18 % zjištěné u pacientů s periferní arteriální nemocí (Kenjale et al. 2011). Z hlediska sportovního výkonu jsou intenzivně studovány účinky produktů z červené řepy na zlepšení svalové výkonnosti. Akutní nebo i několikadenní konzumace řepné šťávy oddálila svalové vyčerpání a urychlila regeneraci po cvičení. V mechanismu se může uplatnit příznivý vliv nitrátů/betaininu na aktivitu mitochondriálního komplexu I, oxidativní fosforylace a tvorby oxidačních produktů – peroxidu vodíku a lipoperoxidů (Larsen et al. 2011).

Nitráty a oxidační stres

Červená řepa obsahuje betalainy a další látky, které mají prokázané antioxidační účinky. Navíc NO může potlačovat tvorbu volných radikálů a snižovat negativní účinky superoxidu a peroxidu vodíku. Antioxidační účinky byly prokázány u experimentálních modelů po aplikaci hepatotoxického CCl₄ nebo karcinogenních látek. V mechanismu účinku má důležitou úlohu aktivace nukleárního transkripčního faktoru Nrf2, který reguluje aktivitu enzymů antioxidačního obranného systému (Clifford et al. 2015).

Nitráty a zánět

Za protizánětlivé účinky červené řepy jsou podle recentních nálezů odpovědny zejména betalainy.

Studie ukázaly, že extrakty z červené řepy ovlivňují nukleární faktor-Kappa B (NF-κB), který je zapojen do genové regulace prozánětlivých cytokinů a chemokinů. V proti zánětlivých účincích se může uplatnit i inhibiční vliv betalainů na expresi cyklooxygenázy-2 (Clifford et al. 2015).

Experimentální studie

Vliv extraktů z červené řepy na sacharidový a lipidový metabolismus a na ovlivnění zánětu. Pokusy byly provedeny u spontánně hypertensního kmene potkanů, kterým byl vnesen gen pro tvorbu lidského C-reaktivního proteinu pod kontrolou Apo-E promotoru (SHR-CRP). Vlivem zvýšené exprese lidského CRP má tento kmen stimulovaný zánětlivý stav, který je doprovázen oxidačním poškozením tkání, zvýšenou mikroalbuminurií, zvýšením krevního tlaku a insulinovou resistencí (Pravenec et al. 2011).

Materiál a metody

Pokusy byly provedeny u tříměsíčních samců kmene spontánně hypertenzního potkana (SHR) s transgenní expresí lidského CRP. Kontrolní skupinu tvořili stejně staří SHR potkani bez transgenu. Obě skupiny byly krmeny *ad libitum* standardní dietou.

Množství triacylglycerolů (TAG) v séru a po extrakci z tkání pomocí směsi methanol-chloroform (1:2), bylo stanoveno analytickou soupravou TG L 250 S (Erba-Lachema, ČR). Koncentrace glukosy byla měřena analytickým kitem GLU 500 (Erba-Lachema, ČR). Koncentrace sérového insulinu byla stanovena imunochemickým kitem Rat Insulin ELISA kit (Mercodia, Švédsko). Metabolické parametry bránice, bílé a hnědé tukové tkáně byly stanoveny *ex vivo*. Oxidace (inkorporace do CO₂) glukosy a její inkorporace do glykogenu ve svalech a do lipidů v tukové kyselině byly stanoveny inkubací tkáně s radioaktivně značenou (¹⁴C) glukosou, v bazálním stavu nebo v přítomnosti insulinu (250 μU/ml).

Výsledky

Výsledky uvedené v tabulce 1 ukazují, že podávání šťávy z červené řepy po dobu 4 týdnů u transgenních potkanů v porovnání s kontrolní SHR potkany snížilo hmotnost viscerální tukové tkáně, hladiny triacylglycerolu v plazmě, obsah cholesterolu v játrech a ektopické ukládání triacylglycerolu v myokardu. Zajímavým nálezem byla zvýšená oxidace glukózy v interskapulární hnědé tukové tkáni u SHR-CRP potkanů. Naproti tomu řepná šťáva neovlivnila parametry glukózového metabolismu včetně bazální nebo inzulinem stimulované glykogenyzy v kosterním svalu.

Tabulka 2. Vliv šťávy z červené řepy na metabolické parametry SHR-CRP potkanů

	SHR-CRP kontroly	SHR-CRP + řepná šťáva
Hmotnost epid. tuk. tělesa (g/100g t.hm.)	0,686 ± 0,015	0,628 ± 0,010*
Triacylglyceroly v plazmě (mmol/l)	0,92 ± 0,04	0,60 ± 0,05**
Triacylglyceroly v myokardu (□mol/g)	1,90 ± 0,07	1,40 ± 0,16*
Cholesterol v játrech (□mol/g)	10,3 ± 0,2	8,6 ± 0,2**
Oxidace glukózy v HHT (nmol gl./g/2 h)	433 ± 48	652 ± 68*

* P<0.05 ** P<0.005 udávají statistickou významnost. HHT – hnědá tuková tkáň

Dalším zajímavým účinkem šťávy z červené řepy bylo snížení koncentrací konjugovaných dienu (30,2 ± 2,3 vs 41,5 ± 3,3 nmol/mg, P < 0.05) a TBARS (0,599 ± 0,047 vs 0,772 ± 0,543 nmo/mg, P < 0.05) v játrech, které svědčí pro příznivé ovlivnění peroxidace lipidů.

Závěr

Pro výjimečné funkce NO v intercelulární komunikaci a zapojení do mechanismů zvyšujících rozvoj metabolických poruch je tato molekula cílem studií po řadu let. Významný objev syntézy NO z nitrátů přítomných ve vysoké koncentraci v zelenině zcela změnil názory na negativní vlivy nitrátů, které byly tradované po mnoho let. Nálezy o pozitivních účincích nitrátů obrátily pozornost na možnosti jeho ovlivnění farmakologickou nebo nutriční intervencí.

Nálezy o příznivých účincích červené řepy na dysfunkci endotelu, hypertenzi, zánět a oxidační stres jsou v souladu s pozitivními působením středomořské diety obsahující vysoký podíl zeleniny zajišťující vysoký přívod nitrátů.

Studie byla podpořena grantem MZ ČR – RVO (“Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 0002300”)

Literatura

- Bryan NS., Fernandez BO., Bauer SM., et al.:** Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 290-297.
- Clifford T., Howtson G., West DJ., et al.:** The potential benefits of red beetroot supplementation in Health and disease. *Nutrients* 2015; 7: 2801-2822.
- Cook S., Hugli O., Egli M., et al.:** Clustering of cardiovascular risk factors mimicking the human metabolic syndrome X in e NOS null mice. *Swiss Med Wkly* 2003; 133: 360-363.
- Govoni M., Jansson EA., Weitzberg E., et al.:** Increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide* 2008; 19: 333-337.
- Lundberg JO., Weitzberg E., Lundberg JM., Alving K.:** Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 1994; 35: 1543-1546.
- Lundberg JO., Govoni M.:** Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 395-400.
- Kapil V., Milson AB., Okorie M., et al.:** Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrate derived NO. *Hypertension* 2010; 56: 274-281.
- Kenjale AA., Ham KL., Stabler T., et al.:** Dietary nitrate supplementation enhances exercise performance in peripheral arterial disease. *J Appl Physiol* 2011; 110: 1582-1591.
- Kina-Tanada M., Sakanashi M., Tanimoto A., et al.:** Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. *Diabetologia* 2017; 60: 1138-1151.
- Larsen FJ., Schiffer TA., Borniquel S., et al.:** Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell Metab* 2011; 13: 149-159.
- Monti LD., Barlassina C., Citterio L., et al.:** Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2003; 52: 1270-1275.
- Omar SA., Web AJ., Ludberg JO.:** Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. *J Intern Med* 2016; 279: 315-336.
- Pravenec M., Kajiya T., Zidek V., et al.:** Effects of human c-reactive protein on pathogenesis of features of the metabolic syndrome. *Hypertension* 2011; 57: 731-737.
- Tesoriere L., Allegra M., Butera D., Livrea MA.:** Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 941-945.
- Vidal PJ., López-Nicolás JM., Gandía-Herrero F., et al.:** Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *Food Chem* 2014; 154: 246-254.
- Webb AJ., Patel N., Loukogeorgakis S., et al.:** Acute blood pressure lowering vaso-protective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension* 2008; 51: 784-790.

STEAROYL-KOENZYM A DESATURASA JAKO TERAPEUTICKÝ CÍL METABOLICKÝCH CHOROB

STEAROYL-COENZYM A DESATURASE AS A TERAPEUTIC TARGET OF METABOLIC DISEASE

J. Macáček, M. Zeman, E. Tvrzická, A. Žák

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

Abstract

Stearoyl-CoA desaturase is a key enzyme in lipogenesis. This fact is crucial for its physiological and pathophysiological properties. Stearoyl-CoA desaturase is an enzyme responsible in desaturation process of saturated fatty acids changing them to monounsaturated fatty acids. Stearoyl-CoA desaturase has some isoforms, isoform called SCD-1 is the most important in processes.

Metabolic deregulation is an hallmark of many cancers. There is higher lipogenesis *de novo* and desaturation of saturated fatty acids to meet higher metabolic needs. In many cancers, there is a higher expression of stearoyl-CoA-1 gene. Stearoyl-CoA-1 contributes to cancer cell proliferation and inhibition of apoptosis, promoting cancer growth. This reason leads to effort for the development of anticancer drugs. Such anticancer drugs are targeted to inhibit SCD-1. Stearoyl-CoA-1 plays also important role in pathogenesis of metabolic diseases like diabetes mellitus type 2, obesity, fatty liver disease and atherosclerosis. Inhibition of SCD-1 improves insulin sensitivity, decreases lipid content in hepatocytes and reduces adipose tissue. For these reasons, some available inhibitors of SCD-1 are tested as a new therapeutic agents for treatment of fatty liver disease, obesity or diabetes mellitus type 2. Aramchol, a conjugate of cholic and fatty acid, is very promising in treatment of fatty liver disease.

Despite these facts, there are some controversies. Treatment targeted on inhibition of SCD-1 has not only the beneficial effects but also some adverse effects. It was proved that in mice the inhibitors of SCD-1 should worsen the atherosclerosis. There is a needed for more studies to elucidate an effect of influence of SCD-1 in diseases.

Obecné informace

Stearoyl-CoA desaturasa (SCD) patří mezi skupinu enzymů zvaných desaturasy, které se vyskytují téměř ve všech organismech. Desaturasy katalyzují přeměnu jednoduché vazby na dvojnou (desaturaci) v uhlíkovém řetězci mastných kyselin (fatty acids = FA). Procesem desaturace vznikají s nasycených FA nenasycené FA, působením SCD vznikají mononenasycené FA (monounsaturated FA = MUFA). Obecně acyl-CoA desaturasy jsou nehemové enzymy obsahující železo, tzv. smíšené oxidázy, využívající cytochrom b5 a cytochrom-b5-reduktasu+NADPH+H⁺. Savčí desaturasy jsou schopny zavádět za účasti kyslíku dvojnou vazbu v polohách C4, C5, C6 a C9 a jsou označovány jako Δ4-, Δ5-, Δ6- a Δ9-desaturasy. V rostlinách přítomné desaturasy Δ12 a Δ15 jsou zdrojem esenciálních FA (EFA), které savčí systém nedokáže vytvořit. Lidské buňky exprimují dvě isoformy - SCD-1 a SCD-5 (Paton a Ntabi 2009). Nejčastější isoformou je SCD-1, která je za fyziologických podmínek exprimována především v játrech a tukové tkáni (bílé i hnědé), dále v mozku, srdci, játrech.

Úloha stearoyl-CoA desaturasy ve fyziologických i patofyziologických procesech je v poslední době velmi diskutovaným tématem. Tento enzym se nachází na endoplasmatickém retikulu a katalyzuje biosyntézu MUFA. Přednostními substráty jsou palmitoyl- a stearoyl-CoA, které jsou přeměňovány na palmitoleoyl- a oleoyl-CoA (Chad et al. 2009).

Mononenasyčené FA hrají roli v mnoha fyziologických i patofyziologických dějích. Mononenasyčené FA jsou substráty pro syntesu triacylglycerolů, fosfolipidů, či esterů cholesterolu. Kyselina olejová hraje důležitou roli v mozku při regulaci příjmu potravy (Obici et al. 2002), kyselina palmitolejová produkovaná tukovou tkání působí jako tzv. lipokin regulující celotělový lipidový metabolismus (Cao et al. 2008). Mononenasyčené FA se také účastní signální transdukce a buněčné diferenciaci (Bradley et al. 2008, Yonezawa et al. 2008). Tento jejich vliv na procesy apoptozy a mutagenese je důležitý pro patogenesi nádorových onemocnění (Hardy et al. 2000). Z výše uvedených faktů vyplývá, že SCD-1 může být důležitým cílem léčby u řady metabolických chorob, jako jsou diabetes a obesity, či u nádorových onemocnění.

Stearoyl-CoA desaturasa-1 u nádorů

Bylo zjištěno, že SCD-1 je intenzivně exprimována u mnoha nádorových onemocnění (karcinom plic, ledvin, střeva, jícnu, prsu atd.) (Li et al. 1994, Noto et al. 2013, von Roemeling et al. 2013, Holder et al. 2013). U karcinomu prostaty byla naopak prokázána snížená exprese SCD-1 (Moore et al. 2005). Nádorové buňky vykazují alterovaný metabolismus lipidů, dochází v nich k nadměrné *de novo* syntese FA, která není inhibovatelná zvýšením příjmu exogenních FA jako za fyziologických podmínek (Scaglia et al. 2005). V nádorových buňkách je zvýšeně exprimována synthasa FA (Kuhajda 2006). Vlivem těchto metabolických změn dochází v nádorových buňkách k vzestupu množství nasycených FA kyseliny palmitové a olejové (Scaglia a Igal 2008). Toto zvýšení je však doprovázeno i zvýšením mononenasyčených FA kyseliny palmitolejové a olejové, což jsou jejich $\Delta 9$ -desaturační produkty, prokazující zvýšení aktivity SCD-1 (Scaglia a Igal 2008). Zvýšené množství mononenasyčených FA a aktivity SCD-1 je spjata s typickým fenotypem chování nádorových buněk. Mononenasyčené FA jsou nezbytné k novotvorbě biomembrán při překotné replikaci. Bylo prokázáno, že deficiencie SCD-1 je spojena s pomalejší proliferací nádorových buněk, nižší invazivitou a zvýšením na ceramidu nezávislé apoptozy těchto buněk (Scaglia a Igal 2008). Stearoyl-CoA desaturasa-1 ovlivňuje lipidové signální dráhy mající vliv na proliferaci a diferenciaci buněk. Příkladem je ovlivnění Akt signalizační dráhy. Při pokusech *in vitro*, kdy byla vyřazena SCD-1 u buněk plicního adenokarcinomu a došlo ke ztrátě jejich maligního fenotypu, nebylo dosaženo původních vlastností pouhým dodáním exogenních FA, což prokazuje nezbytnost endogenní syntesy FA (Scaglia a Igal 2008). V buňkách hepatocelulárního karcinomu byla prokázána nadměrná exprese SCD-1, která stimulovala jejich proliferaci a zároveň determinovala chemoresistenci buněk tohoto karcinomu. Tyto vlastnosti jsou zprostředkovány aktivací fosfatidylinositol 3 kinase/c-Jun N-terminal kinases. Expres SCD-1 je stimulována karcinogenně působícími látkami jako jsou dichloroctová kyselina a peroxisomové proliferátory. Všechny tyto poznatky svědčí o důležité úloze stearoyl-CoA desaturasy-1 v karcinogenesi mnoha malignit a předurčují ji jako cíl protinádorové léčby.

Stearoyl-CoA desaturasa 1 jako léčebný cíl u metabolických onemocnění

Stearoyl-CoA desaturasa 1 je důležitým faktorem regulace lipidového metabolismu. Ukázalo se, že inhibice SCD-1 vede ke snížení insulinové resistance, redukci obesity a zlepšení nealkoholové steatosy jater (Frenkel et al. 2010). V léčbě nealkoholové steatohepatitidy se ukazují jako účinné konjugáty mastných kyselin se žlučovými kyselinami (fatty acid bile acid conjugates = FABACs), které byly původně vyvíjeny jako inhibitory krystalizace cholesterolu ve žluči (Gilat et al. 2001). Velmi slibnou molekulou z této skupiny je aramchol, což je konjugát s kyselinou arachovou (arachidyl amido cholová kyselina = aramchol). Aramchol je přímým inhibitorem SCD-1 a skrz tento účinek působí preventivně před vznikem nealkoholové steatosy jater (Frenkel et al. 2010). Mezi inhibitory aktivity

jaterní SCD-1 patří i vícenenasycené FA (polyunsaturated fatty acids = PUFA). Na myším modelu bylo prokázáno, že pokud jsou myši krmeny tuk neobsahující dietou suplementovanou o triacylglyceroly obsahující PUFA, tak dochází ke snížení množství jaterní mRNA pro SCD-1 (Ntambi 1992). Tento účinek je závislý na délce uhlíkového řetězce a počtu dvojných vazeb, čím je delší řetězec a čím víc dvojných vazeb obsahuje, tím je suprese aktivity jaterní SCD-1 větší (Ntambi 1992). Účinkem PUFA je ovlivněna tuková i jaterní tkáň. Vícenenasycené FA potlačují expresi SCD-1 v tukové tkáni destabilizací mRNA pro SCD-1 ve zralých adipocytech (Sessler et al. 1996). Lidé konzumující dietu bohatou na PUFA měli nižší množství tuku v jaterní tkáni, stejně jako nižší poměr FA 16:1 n-7/16:0 v plasmatických CE (Bjermo et al. 2012). Mezi inhibitory exprese SCD-1 patří i perorální antidiabetikum metformin (Kim et al. 2011). Pro supresi exprese SCD-1 mohou být využity i antisense oligonukleotidy (Jiang et al. 2005). Léčba antisense oligonukleotidy vedla ke snížení exprese enzymů lipogeneze, snížení *de novo* synthesy FA a k redukci steatosy hepatocytů se změnou poměru FA 16:1 n-7/16:0 and 18:1 n-9/18:0 v hepatocytech (Hodson et al. 2013). Při inhibici aktivity SCD-1 byly zaznamenány i kontroverze. Při inhibici SCD-1 pomocí antisense oligonukleotidů na myším modelu s hyperlipidemií a atherosklerosou bylo pozorováno zhoršení atherosklerotického procesu v aortě, bez zlepšení po podání kyselině olejové (Brown et al. 2008). Inhibice SCD-1 také způsobila akumulaci nasycených FA v plasmě i tkáních a indukovala hypersensitivitu vůči toll-like receptoru 4 (TLR-4), (Brown et al. 2008). Tyto údaje poukazují na určité nebezpečí užívání inhibitorů SCD-1 při léčbě metabolických chorob.

Ve výčtu na aktivitu SCD-1 farmakologicky působících látek nesmíme opomenout ani její aktivátory. Jedná se o thiazolidindiony a fibráty. Thiazolidindiony zvyšují desaturaci FA prostřednictvím aktivace PPAR γ a zvyšují insulinovou sensitivitu (Hodson et al. 2013). Fibráty, které prostřednictvím aktivace PPAR α , snižují syntesu FA a zvyšují aktivitu SCD-1 (Hodson et al. 2013). Riserus et al. (2005) prokázali, že léčba rosiglitazonem zvýšila expresi genu pro SCD-1 v tukové tkáni u pacientů s diabetem mellitus 2. typu a v plasmatických triacylglycerolech bylo prokázáno zvýšení poměru FA 16:1 n-7/16:0. Klofibrát a gemfibrozil, které byly podávány myším, indukovali v hepatocytech zvýšení mRNA pro SCD-1 za 6 hodin 3krát a za 30 hodin dokonce 22krát. Tato indukce byla na vrub primárně zvýšení transkripce genu pro SCD-1 (Miller a Ntambi 1996).

Závěr

SCD-1 je jedním z ústředních enzymů metabolismu. Z tohoto postavení vyplývá velký potenciál pro léčbu nejen metabolických chorob ale například i nádorových onemocnění. Zatím však pro účinnost a bezpečnost terapie zaměřené na inhibici SCD-1 neexistuje mnoho studií a reálné využití této terapie je zatím spíše otázkou budoucnosti.

Práce vznikla za podpory MZ ČR – RVO VFN64165 a PROGRES Q25/LF1/2

Literatura

- Bjeremo H., Iggman D., Kullberg J., et al.:** Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2012; 95: 1003–1012.
- Bradley RL., Fisher FM., Maratos-Flier E.:** Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 938–944.
- Brown JM., Chung S., Sawyer JK., et al.:** Inhibition of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis. *Circulation* 2008; 118: 1467–1475.
- Cao H., Gerhold K., Mayers JR., et al.:** Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 2008; 134: 933-944.
- Falvella FS., Pascale RM., Gariboldi M., et al.:** Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) gene overexpression is associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1933-1936.
- Gilat T., Somjen GJ., Mazur Y., et al.:** Fatty acid bile acid conjugates (FABACs) - New molecules for the prevention of cholesterol crystallisation in bile. *Gut* 2001; 48: 75-79.
- Hardy S., Langelier Y., Prentki M.:** Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res* 2000; 60: 6353-6358.
- Hodson L., Fielding BA.:** Fielding. Stearoyl-CoA desaturase: rogue or innocent bystander? *Prog Lipid Res* 2013; 52: 15-42.
- Holder AM., Gonzalez-Angulo AM., Chen H., et al.:** High stearoyl-CoA desaturase 1 expression is associated with poorer survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 137: 319-327.
- Jiang G., Li Z., Liu F., et al.:** Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1. *J Clin Invest* 2005; 115: 1030–1038.
- Kim E., Liu NC., Yu IC., et al.:** Metformin inhibits nuclear receptor TR4-mediated hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression with altered insulin sensitivity. *Diabetes* 2011; 60: 1493-1503.
- Kuhajda FP.:** Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res* 2006; 66: 5977-5980.
- Leikin-Frenkel A., Gonen A., Shaish A.:** Fatty acid bile acid conjugate inhibits hepatic stearoyl coenzyme A desaturase and is non-atherogenic. *Arch Med Res* 2010; 41: 397-404.
- Li J., Ding SF., Habib NA., et al.:** Partial characterization of a cDNA for human stearoyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer* 1994; 57: 348-352.
- Miller CW., Ntambi JM.:** Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9443-9448.
- Moore S., Knudsen B., True LD., et al.:** Loss of stearoyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 114: 563-571.
- Noto A., Raffa S., De Vitis C., et al.:** Stearoyl-CoA desaturase-1 is a key factor for lung cancer-initiating cells. *Cell Death Dis* 2013; 4: e947.
- Ntambi JM.:** Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver. *J Biol Chem* 1992; 267: 10925–10930.
- Obici S., Feng Z., Morgan K., et al.:** Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 2002; 51: 271–275.
- Paton CM., Ntambi JM.:** Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E28-37.

Scaglia N., Caviglia JM., Igal RA.: High stearoyl-CoA desaturase protein and activity levels in simian virus 40 transformed-human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1687: 141-151.

Scaglia N., Igal RA.: Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol* 2008; 33: 839-850.

Sessler AM., Kaur N., Palta JP., Ntambi JM.: Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 29854–29858.

Riserus U., Tan GD., Fielding BA., et al.: Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-CoA desaturase activity in humans: link to insulin sensitization and the role of dominant-negative mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 2005; 54: 1379-1384.

von Roemeling CA., Marlow LA., Wei JJ., et al.: Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2368-2380.

Yonezawa T., Haga S., Kobayashi Y., et al.: Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367: 729-735.

ÚLOHA DIKARBONYLOVÉHO STRESU V ROZVOJI VASKULÁRNÍCH KOMPLIKACÍ NA TRANSKRIPTOMICKÉ A PROTEOMICKÉ ÚROVNI

THE ROLE OF DICARBONYL STRESS ON THE DEVELOPMENT OF VASCULAR COMPLICATIONS ON TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC LEVEL

H. Malínská¹, I. Marková¹, M. Hüttl¹, O. Oliyarnyk¹, J. Trnovská¹, J. Urbanová¹, P. Kačer², O. Šeda³, L. Kazdová¹

¹*Center for Experimental Medicine,*

Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague

²*Department of Organic Technology, University of Chemistry and Technology, Prague*

³*Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University*

Introduction

Diabetic nephropathy is a major chronic microvascular complication accompanying diabetes and is characterized by a progressive increase in albuminuria and a decline in glomerular filtration rate. Although hyperglycemia belongs to important risk factor for the development of microvascular complications in kidney, intensive glycemie control does not have to be completely sufficient for the protection of these complications (Fleming T et al 2012).

The pathophysiological connection appears to occur via multiple pathways. According to recent studies an important role in mechanism in the pathogenesis of microvascular renal complications plays dicarbonyls stress preceding advanced glycation end (AGE) products formation (Rabbani N 2014).

Dicarbonyl stress occurs as a consequence of the imbalance between the generation of reactive dicarbonyls (like methylglyoxal - MGO) and their metabolism ensured by glyoxalase system. Both dicarbonyls accumulation as well impaired glyoxalase 1 could be involved in vascular dysfunction and also both are associated with microvascular complications in kidney. Plasma MGO are elevated in diabetic patients, mainly those with nephropathy or cardiac failure (Matafome P et al 2016).

The recent published clinical study ADDITION-DK (Jensen TM et al 2016) supported the important role of methylglyoxal in pathogenesis of kidney microvascular complications and methylglyoxal was found to be associated with detrimental changes in kidney function in individuals with type 2 diabetes.

Excessive generation of dicarbonyls activates inflammatory processes, increases oxidative stress, impairs glucose tolerance and leads to the AGEs production. Dicarbonyls compounds are precursors for AGE formation. In clinical study (Saulnier PJ et al 2016) AGE products derived from methylglyoxal (carboxyethyllysine and methylglyoxal-hydroimidazolone) predicted renal function loss and correlated with the severity of diabetic kidney disease more accuracy than other renal risk factor.

In renal cells, methylglyoxal directly inhibits electron respiratory chain leading to mitochondrial dysfunction and modifies protein structure which in turn affects their function. Indirectly methylglyoxal can also affect different signaling pathways associated with vascular complications (Nigro M et al 2017). However, exact mechanism on transcriptomic level in kidney is not known yet.

The clarification pathophysiological mechanism on transcriptomic level can reveal potential pharmacological goal, because the situation in pharmacological intervention in nephropathy is not suitable solved yet. Identification of urinary proteomic and metabolomic biomarkers can help to complete and better explain mechanism of development these complications and could determined early risk markers.

In our study, we investigated the effect of methylglyoxal administration on metabolic, transcriptomic and proteomic profile in the context of the development of kidney impairment in an experimental model of metabolic syndrome.

Materials and Methods

Dicarbonyl stress was induced by intragastrical administration of methylglyoxal (3x/ week in dose 0.5 mg/kg b.wt.for 4 weeks) in a strain of hereditary hypertriglyceridaemic rats with insulin resistance and fatty liver (HHTg).

Transcriptome assessment in kidney cortex was performed using microarray (Affymetrics rat gene array), urine proteome and metabolome were evaluated by mass spectrometry methods (Immunoafinity MALDI TOF MS). Gene expression was measured by quantitative RT-PCR. The concentrations of methylglyoxal, glutathione and urine albumine were determined using the HPLC-method with fluorescence or UV/VIS detection.

Results

Methylglyoxal administration increases the concentration methylglyoxal in serum (+56 %) and in kidney (+46 %), respectively. As shown in Table 1, methylglyoxal administration did not change body weight, but aggravated glucose intolerance (AUC_{0-120} $p < 0.05$), increased plasma glucose ($p < 0.01$) and insulin ($p < 0.05$). Methylglyoxal-treated rats exhibited significantly changes in serum lipids, as serum triglycerides was reduced and total serum cholesterol and HDL-cholesterol were significantly elevated compared to controls. However, the concentrations of triglycerides in tissue were not changed between both group.

Decreased level of reduced glutathione (-30 %, $p < 0.01$) together with decreased activity of glutathione-dependent antioxidant enzymes (Table 2) worsened oxidative and dicarbonyl stress and can contribute to the impairment of kidney function. Methylglyoxal administration elevated relative expression of glyoxalase 1 in kidney cortex ($p < 0.05$), which is involves in methylglyoxal degradation. Increased expression of glyoxalase 1 have probably an compensatory effect on increased dicarbonyl stress in kidney. However, relative expression of transcriptional factor Nrf2 in kidney cortex, which is participated in antioxidant response, was not changed between both group.

TABLE 1. Metabolic parameters in serum and tissues in HHTg rats and after methylglyoxal administration (HHTg + MGO)

	HHTg	HHTg + MGO	P<
Body weight (g)	412 ± 3	397 ± 6	n.s.
Glucose (mmol/l)	7.1 ± 0.2	8.8 ± 0.2	0.001
Insulin (µmol/l)	0.246 ± 0.026	0.515 ± 0.030	0.05
AUC₀₋₁₂₀ mmol/l	930 ± 26	1006 ± 18	0.05
FFA (mmol/l)	0.43 ± 0.05	0.49 ± 0.06	n.s.
Adiponectin (µg/ml)	2.90 ± 0.34	2.78 ± 0.51	n.s.
Serum triglycerides (mmol/l)	4.80 ± 0.49	3.21 ± 0.51	0.05
Serum cholesterol (mmol/l)	1.19 ± 0.07	1.56 ± 0.99	0.05
HDL-C (mmol/l)	0.59 ± 0.03	1.06 ± 0.14	0.05
Triglycerides in the liver (µmol/g)	13.01 ± 1.58	13.02 ± 0.94	n.s.
Triglycerides in kidney (µmol/g)	8.55 ± 1.61	6.81 ± 1.16	n.s.
Methylglyoxal in serum (nmol/ml)	0.237 ± 0.021	0.369 ± 0.015	0.01
Methylglyoxal in kidney (nmol/mg)	5.87 ± 0.08	8.55 ± 0.81	0.01

Data are mean ± SEM. n = 8

TABLE 2. Oxidative stress parameters in kidney in HHTg rats and after methylglyoxal administration (HHTg + MGO)

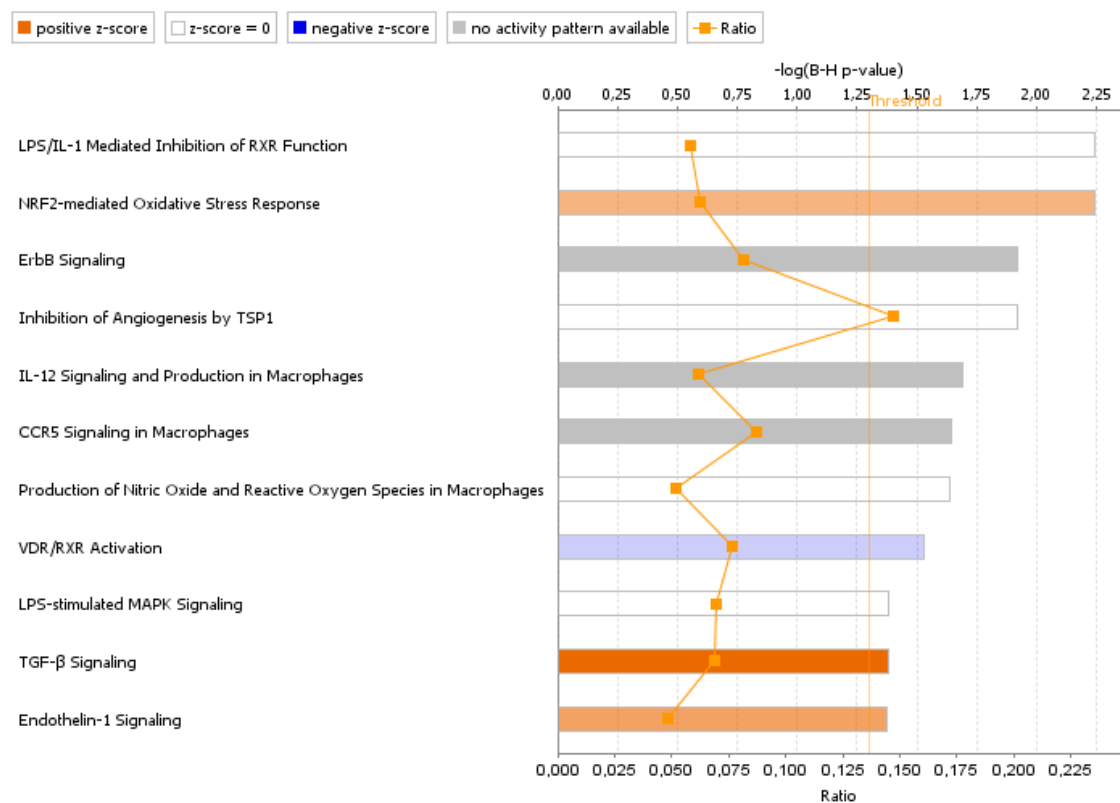
kidney	HHTg	HHTg + MGO	P<
TBARS	0.67 ± 0.04	0.79 ± 0.03	0.05
GSH	1.05 ± 0.06	0.84 ± 0.01	0.05
GSSG	0.09 ± 0.06	0.08 ± 0.06	n.s.
GSH / GSSG	13.99 ± 0.39	10.91 ± 0.16	0.01
Glutathione reductase activity	43 ± 3	35 ± 2	0.05
Glutathione transpherase activity	61 ± 2	41 ± 4	0.01

Data are mean ± SEM. n = 8

TABLE 3. Proteomic markers in urine

Proteomic markers	HHTg	HHTg + MGO	P<
IL-6 (pg/ml)	44.33 ± 2.31	91.43 ± 5.88	0.001
IL-8 (pg/ml)	18.33 ± 0.29	49.43 ± 1.60	0.001
MCP-1 (ng/ml)	1.57 ± 0.02	3.76 ± 0.21	0.001
EGF (ng/ml)	4.95 ± 0.17	2.27 ± 0.01	0.001
α-1 antitrypsin (ng/ml)	13.90 ± 2.89	24.47 ± 2.11	0.001
IgA-uromodulin (ng/ml)	60.50 ± 5.20	68.71 ± 0.80	0.05
endostatin (pg/ml)	71.50 ± 4.04	102.14 ± 5.08	0.01
heparan sulfate (µg/ml)	0.09 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.05

Data are mean ± SEM. n = 8

Figure 1. Significantly enriched canonical signaling pathways in kidney cortex

The effect of methylglyoxal on kidney at transcriptomic level

Comparative transcriptomic analysis in kidney cortex identified 96 genes differentially expressed (FDR < 0.05) after methylglyoxal administration (Figure 1). Network analysis revealed overrepresentation of genes in excessive oxidative stress and proinflammatory signaling pathways and inhibition of angiogenesis suggesting its contribution to renal fibrosis. In mechanism of renal damage after methylglyoxal administration at transcriptomic level is involved in particular significant upregulation of TGF- β signaling that is key factor connecting nephropathy and fibrosis. The oxidative stress response is mediated by Nrf2 signaling pathway and inhibition of angiogenesis by thrombospondin 1 (TSP1) signaling that also activates TGF- β profibrotic cytokine (see Figure 1). According to these results TGF- β inhibitors or antibody could have renoprotective effect on diabetic nephropathy.

The effect of methylglyoxal on urine parameters

Compared to controls, methylglyoxal-treated rats exhibited significantly higher levels of microalbuminuria (42.8 ± 7.3 vs 13.8 ± 2.9 mg/g creatinine, $p < 0.01$) and urine lactate (12.87 ± 0.90 vs 6.13 ± 0.15 mmol/ml, $p < 0.05$). Un-targeted proteomic analyses identified 509 proteins, peptides or their fragments (data not shown). As shown in Table 3, targeted proteomic analyses revealed increase in urine secretion of proinflammatory parameters (MCP-1, IL-6, IL-8), specific collagen IV fragments (endostatin), α 1-antitrypsin and extracellular matrix protein (heparan sulfate). But urine secretion of endothelial growth factor (EGF) was significantly reduced after methylglyoxal administration. Urine metabolomic biomarkers in methylglyoxal-treated rats were mainly associated with impairment of membrane phospholipids (MDA, 8-isoprostane, 4-hydroxynonenal). Metabolomic parameters of impairment of DNA (8-hydroxyguanosin), RNA (5-hydroxymethyluracil), proteins and inflammatory parameter (leukotrien D4) were also identified in urine.

Conclusion: Our results support a key role of dicarbonyl stress in the pathogenesis of renal microvascular complications in early phases of development and are consistent at transcriptomic, proteomic and metabolomic levels. In the kidney at transcriptomic level methylglyoxal activated profibrotic, proinflammatory pathway and oxidative stress response and inhibited angiogenesis. Its proinflammatory effects were further supported by urine proteomic and metabolomic analysis.

Study was supported by grant MHCZ – DRO (IKEM, IN 00023001)

References

- Fleming T., Cuny J., Nawroth G., et al.:** Is diabetes an acquired disorder of reactive glucose metabolites and their intermediates? *Diabetologia* 2012; 55: 1151-1155.
- Jensen TM., Vistisen D., Fleming T., et al.:** Methylglyoxal is associated with changes in kidney function among individuals with screen-detected Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2016; 33: 1625-1631.
- Matafome P., Rodrigues T., Sena C., Seica R.:** Methylglyoxal in Metabolic Disorders: Facts, Myths, and Promises. *Med Res Rev* 2017; 37: 368-403.
- Nigro C., Leone A., Raciti GA., et al.:** Methylglyoxal-Glyoxalase 1 Balance: The Root of Vascular Damage. *Int J Mol Sci* 2017; 18: E188.
- Rabbani N., Shaheen F., Anwar A., et al.:** Assay of methylglyoxal-derived protein and nucleotide AGEs. *Biochem Soc Trans* 2014; 42: 511-517.
- Saulnier PJ., Wheelock KM., Howell S., et al.:** Advanced Glycation End Products Predict Loss of Renal Function and Correlate With Lesions of Diabetic Kidney Disease in American Indians With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2016; 65: 3744-3753.

VLIV KOMBINOVANÉ TERAPIE SILYMARINEM A FENOFIBRÁTEM NA METABOLICKÉ PORUCHY U NEOBÉZNÍHO MODELU METABOLICKÉHO SYNDROMU

THE EFFECT OF A COMBINED THERAPY OF SILYMARIN AND FENOFIBRATE ON METABOLIC DISEASES IN NON-OBESE MODEL OF METABOLIC SYNDROME

Z. Matušková¹, L. Kazdová², I. Marková², M. Hüttl², H. Malínská², J. Trnovská²,
O. Oliyarnyk², M. Poruba¹, R. Večeřa¹

¹Ústav farmakologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc

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

Abstract

Metabolic syndrome is a serious disease that is associated with hyperglycaemia, hypertriglyceridemia, reduced HDL-cholesterol and hypertension (1). In the treatment of metabolic syndrome can be included an application of fibrates, drugs indicated primarily for the treatment of severe hypertriglyceridemia and mixed dyslipidaemia. The aim of this study was to find out, if fenofibrate (drug belonging to the group of fibrates) and concomitantly taken of silymarin (a standardised extract from Milk Thistle) can improve hypolipidemic effects without a toxic effect on hepatocytes. Adult male hereditary hypertriglyceridemic rats were divided into four groups. Control group of rats were fed a standard laboratory diet for five weeks. Experimental groups were administered a standard laboratory diet containing 1% silymarin, or fenofibrate (100 mg/kg/day), or their combination also for five weeks. For determination of parameters of saccharide and lipid metabolism as well as of a liver damage were used a blood plasma and selected organ tissues. Results show that the hypolipidemic effect of natural silymarin is not so marked such in fenofibrate itself. The decrease of concentration of liver and plasma triglycerides in fenofibrate treated rats was not further decreased by the combination of fenofibrate and silymarin. Markers of liver damage, including hepatomegaly, were not significantly affected by the combined treatment compared to the fenofibrate itself. Earlier studies have shown that silymarin is suitable for the treatment of metabolic syndrome (2,3), but it does not produce the expected results in the combination with fenofibrate.

Úvod

Metabolický syndrom je závažné onemocnění, které je spojeno s přítomností hyperglykémie, hypertriacylglycerolémie, obezity, inzulinové rezistence, hypertenze a dalších poruch, včetně chronického zánětu a oxidačního stresu (1). Tyto stavy jsou predisponujícími faktory pro rozvoj kardiovaskulárních komplikací a diabetu 2. typu (4). Léčba metabolického syndromu je v první řadě založena na změně životního stylu, z hlediska farmakologického jsou pak podávána léčiva s hypolipidemickými a antidiabetickými účinky. Jedním z nejčastěji používaných léků v terapii hypertriacylglycerolémie a smíšené dyslipidémie jsou fibráty. Mezi třetí generaci fibrátů patří fenofibrát, který se v organismu rychle metabolizuje na kyselinu fenofibrovou. Tento metabolit působí v organismu několika způsoby, např. je agonistou receptoru aktivovaného peroxisomovým proliferátorem typu alfa (PPAR α), jehož aktivací dochází ke snížení hladin neesterifikovaných mastných kyselin, a dále pak i ke snížení hladin triacylglycerolu ve VLDL částicích (5,6). Mezi nežádoucí účinky fenofibrátu lze zmínit přechodnou elevaci jaterních aminotransferáz, značící poškození jaterních buněk, a vzácný výskyt rhabdomyolýzy (5). V naší dřívější studii jsme zjistili, že

v přítomnosti zvýšených hladin lidského C-reaktivního proteinu u spontánně hypertenzních potkanů vedlo podávání fenofibrátu k hepatomegalii, zvýšení hladiny jaterních enzymů (AST, ALT, ALP) a zánětlivých markerů IL-6 a MCP-1 (7).

Cílem této studie bylo zjistit, zda kombinovaná léčba fenofibrátem a silymarinem (standardizovaný extrakt ze semen ostropestřce mariánského) může potencovat hypolipidemické účinky fenofibrátu a zároveň působit protektivně na hepatocyty. Silymarin je směs látek (obsahující zejména silybin, isosilybin, dehydrosilybin silydianin, silychristin, taxifolin), která v játrech zvyšuje aktivitu superoxiddismutázy, koncentraci glutathionu a také snižuje tvorbu lipidových peroxidů (8,9). Kromě hepatoprotektivních účinků působí silymarin také jako mírné hypolipidemikum (10). V této studii byl testován účinek fenofibrátu v kombinaci se silymarinem u neoběžního modelu metabolického syndromu - hereditárně *hypertriacylglycerolemických* (HHTg) potkanů (11,12).

Materiál a metody

Zvířata a diety

Samci HHTg potkanů ve stáří 4 měsíců byli rozděleni do čtyř skupin (n = 6-7). První skupina byla krmena standardní laboratorní dietou (STD; kontrolní skupina), druhá skupina měla STD obohacenou o 1% mikronizovaný silymarin (Favea, s.r.o., Kopřivnice, ČR), třetí skupina dostávala STD a fenofibrát (Fenofix, Ingers Industrial Solutions s.r.o., Brno, ČR) v dávce 100 mg/kg zvířete a čtvrtá skupina byla krmena STD s obsahem 1% mikronizovaného silymarinu a fenofibrátu. Zvířata byla chována za standardních laboratorních podmínek s volným přístupem ke krmivu i vodě. Po pěti týdnech byla zvířata dekapitována, byla odebrána krev, játra, aorta, srdce, epididymální a perirenální tuková tkáň a ledviny. Odebrané tkáně byly ihned uloženy do tekutého dusíku a uskladněny při teplotě - 80°C.

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

Metody stanovení

Množství triacylglycerolů (TAG) v plazmě a po extrakci z tkání bylo stanoveno analytickou soupravou TG L 250 S (Erba Lachema, Brno, ČR). Neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) byly měřeny komerčním kitem Free Fatty Acids Half-Micro test (Roche Diagnostic, Mannheim, Německo), stejně tak byly použity komerční kity pro stanovení C-reaktivního proteinu (CRP; AlphaDiagnostic, USA) a vysokomolekulárního (HMW) adiponektinu (MyBiosource, CA, USA). Relativní míra genové exprese (kvantifikace mRNA) SCD1 byla určena metodou RT-qPCR s využitím kitu TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, MA, USA).

Statistické hodnocení

Všechny výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm SD, n = 6 - 7. Získaná data byla statisticky analyzována pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu a Mann-Whitneyova U testu. Analýzy byly provedeny na hladině významnosti 0,05 s použitím programu Statistica Cz 12 (StatSoft CR, Praha, Česká Republika).

Výsledky a diskuze

HHTg potkani byli vyselektováni z potkanů kmene Wistar na základě zvýšené tvorby triacylglycerolů po podávání diety s vysokým podílem sacharózy. Tato geneticky podmíněná odchylka je u tohoto kmene spojena s rezistencí tukové a svalové tkáně k účinku inzulínu, zvýšenými hladinami CRP proteinu, přičemž tyto změny nejsou spojeny s excesivní obezitou jako je tomu při podávání vysokotukové diety nebo u oběžných kmenů potkanů a myší (11,12). V porovnání s kontrolní skupinou podávání silymarinu neovlivnilo tělesnou hmotnost, která naproti tomu byla snížena po podávání fenofibrátu a fenofibrátu v kombinaci

se silymarinem (tab. 1). Hmotnost epididymální a perirenální tukové tkáně byla mírně snížena u skupiny, které byl podáván silymarin, a výrazněji snížena podáváním fenofibrátu a jeho kombinací se silymarinem. V souladu se známými negativními účinky fenofibrátu na jaterní hepatomegalii byla hmotnost jater po podávání fibrátu zvýšena téměř dvojnásobně. Silymarin tento negativní vliv fenofibrátu neovlivnil. Zatímco silymarin neovlivnil hmotnost myokardu ani ledvin, jejich hmotnost byla výrazně zvýšena fenofibrátem. Přidání silymarinu k fenofibrátu tento negativní účinek neovlivnilo.

Tabulka 1. Vliv podávaných látek na tělesnou hmotnost a hmotnost orgánů.

	Podávaná dieta			
	Standardní laboratorní dieta (STD)	Silymarin	Fenofibrát	Silymarin + Fenofibrát
Tělesná hmotnost [g]	414 ± 10	406 ± 5	370 ± 17 ^{bb, dd}	386 ± 7 ^{cc}
Epididymální tuk. tkáň [g/ 100g t. hm.]	1,84 ± 0,12	1,63 ± 0,17	1,51 ± 0,15 ^{bb}	1,62 ± 0,20 ^c
Perirenální tuk. tkáň [g/ 100g t. hm.]	2,28 ± 0,15	1,97 ± 0,35	1,57 ± 0,26 ^{bb, d}	1,79 ± 0,30 ^c
Játra [g/ 100g t. hm.]	3,60 ± 0,16	3,43 ± 0,28	6,54 ± 0,34 ^{bb, dd}	6,48 ± 0,13 ^{cc}
Myokard [g/ 100g t. hm.]	0,24 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,28 ± 0,01 ^{bb, dd}	0,27 ± 0,01 ^{cc}
Ledviny [g/ 100g t. hm.]	0,55 ± 0,01	0,55 ± 0,03	0,66 ± 0,02 ^{bb, dd}	0,65 ± 0,02 ^{cc}

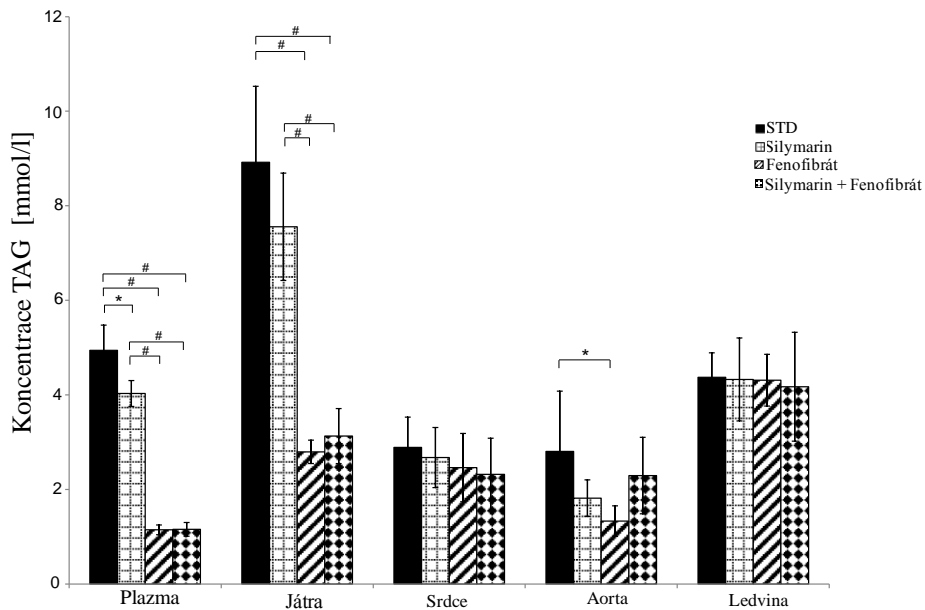
Hodnoty jsou uvedeny jako průměry ± SD; n ≥ 6; tučně zvýrazněná data jsou statisticky významná.

^b p < 0,05; ^{bb} p < 0,01; značí významnost: STD vs. fenofibrát

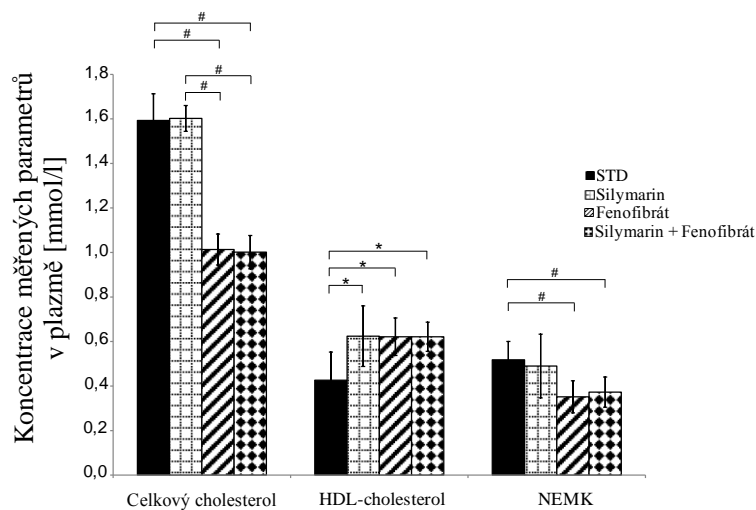
^c p < 0,05; ^{cc} p < 0,01; značí významnost: STD vs. silymarin + fenofibrát

^d p < 0,05; ^{dd} p < 0,01; značí významnost: silymarin vs. fenofibrát

Po podávání mikronizovaného silymarinu po dobu pěti týdnů došlo u HHTg potknů ke snížení plazmatické koncentrace TAG (p < 0,05). Výraznějšího snížení hladiny TAG bylo dosaženo po podávání fenofibrátu samotného nebo v kombinaci se silymarinem (p < 0,01; (graf 1). Závažným důsledkem hypertriacylglycerolémie je ektopické ukládání TAG v netukových tkáních, kde mohou negativně ovlivnit řadu metabolických funkcí a vést k orgánové dysfunkci (13). Silymarin snížil koncentrace TAG v játrech o 16 % (N.S.), naproti tomu fenofibrát nebo kombinace fenofibrátu se silymarinem měly výrazný vliv na snížení koncentrace TAG v játrech (-70 % a -65 % resp.; p < 0,01). V levé komoře srdečního svalu nebyly významně ovlivněny hladiny TAG samotným silymarinem; fenofibrát a jeho kombinace se silymarinem vedla k mírnému, ale statisticky nevýznamnému poklesu koncentrace TAG. V aortě byly koncentrace TAG sníženy pouze po podávání diety s fenofibrátem (p < 0,05). Zatímco kombinace silymarinu s fenofibrátem nevedla k významnému snížení TAG. Ani jedna z testovaných látek neovlivnila koncentraci TAG v ledvinách.



Graf 1. Koncentrace triacylglycerolů (TAG) měřených v plazmě a ve tkáních. Data byla měřena u HHTg potkanů s různou dietou (STD – standardní laboratorní dieta, STD s obsahem silymarinu, STD s obsahem fenofibrátu, STD s obsahem silymarinu a fenofibrátu). Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm SD; $n \geq 6$; * $p < 0,05$; # $p < 0,01$.



Graf 2. Plazmatické koncentrace celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu a neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK). Data byla měřena u HHTg potkanů s různou dietou (STD – standardní laboratorní dieta, STD s obsahem silymarinu, STD s obsahem fenofibrátu, STD s obsahem silymarinu a fenofibrátu). Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm SD; $n \geq 6$; * $p < 0,05$; # $p < 0,01$.

K metabolickému syndromu se řadí obecně porucha metabolismu lipidů, kam lze zahrnout kromě zvýšené hladiny TAG také vyšší hladiny celkového cholesterolu, nižší hladiny HDL-cholesterolu a vyšší hladiny neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK). V této studii bylo zjištěno, že plazmatická koncentrace celkového cholesterolu byla snížena ($p < 0,01$) u potkanů s dietou obsahující fenofibrát nebo kombinaci fenofibrátu se silymarinem (graf 2). Hladina HDL-cholesterolu byla statisticky významně zvýšena u potkanů s dietou obsahující silymarin, fenofibrát nebo kombinaci obou látek ($p < 0,05$).

Vyšší hladiny NEMK jsou rizikovým faktorem progresu inzulinové rezistence a vzniku diabetu 2. typu (13). Výsledky ukazují, že fenofibrát a kombinace fenofibrátu se silymarinem snižují u HHTg potkanů plazmatickou koncentraci těchto kyselin (-33 %; $p < 0,01$).

Klíčovým enzymem v metabolismu mastných kyselin je stearyl-CoA desaturáza (SCD1), který způsobuje vznik dvojné vazby mezi uhlíky řetězce nasycených mastných kyselin, tím ovlivňuje i jejich detoxikaci. Zvýšená aktivita je zjišťována při metabolickém syndromu, obezitě, diabetu 2. typu a při zvýšené akumulaci lipidů ve tkáních. Deficit tohoto enzymu naopak brání ukládání lipidů v tukové tkáni a zvyšuje citlivost tkání k inzulinu (14). V této studii byla stanovena exprese SCD1 na úrovni mRNA. Zjistili jsme, že samotný silymarin neovlivnil expresi mRNA SCD1. K výraznému zvýšení této exprese v porovnání s kontrolní skupinou došlo po podání fenofibrátu nebo kombinace fenofibrátu se silymarinem ($p < 0,05$; data neuvedená). Vzhledem k tomu, že silymarin neměl efekt na expresi mRNA SCD1, bylo zvýšení této exprese způsobeno podáním fenofibrátu.

Adiponektin (hormon tukové tkáně), inzulin a glukóza byly rovněž studovány v krevní plazmě HHTg potkanů. Zajímalo nás, zda silymarin samotný nebo v kombinaci s fenofibrátem může mít pozitivní vliv na tyto parametry a přispívat tak k pozitivnímu ovlivnění inzulinové rezistence u metabolického syndromu. Z výsledků však vyplývá, že ani jedna z použitých diet významně neovlivnila plazmatickou koncentraci vysokomolekulárního (HMW) adiponektinu, inzulinu a glukózy (data neuvedená). Podobné výsledky byly získány při stanovení plazmatické hladiny alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST), tedy parametrů hepatálního poškození. O fenofibrátu je známo, že může poškodit jaterní buňky (5) a naší domněnkou bylo, že kombinace fenofibrátu se silymarinem by mohla mít obecně pozitivní vliv na buňky a na snížení zánětu v organismu v porovnání se samotným fenofibrátem. Nicméně, výsledky z našeho experimentu ukazují, že kombinace silymarinu s fenofibrátem má nepatrný vliv na snížení hladin ALT a ASP v porovnání s podáváním samotného fenofibrátu.

Závěr

Z dřívějších studií je známo, že silymarin snižuje hladinu TAG a má hepatoprotektivní účinky (10,15). Fenofibrát je léčivo, které se užívá ke snížení celkového cholesterolu a TAG. Ovšem, vedlejším účinkem fenofibrátu může být poškození hepatocytů. Tyto skutečnosti vedly k hypotéze, že kombinace fenofibrátu se silymarinem by mohla posílit hypolipidemické účinky a současně by nemuselo docházet k poškození jaterních buněk. Výsledky z této studie však ukazují, že přírodní extrakt silymarinu nemá tak velký efekt na TAG v krevní plazmě ani v orgánech jako samotný fenofibrát. Snížení plazmatických a jaterních hladin TAG nebylo dále prohloubeno kombinací fenofibrátu a silymarinu. Rovněž markery zánětlivého poškození, hepatomegalie a zvýšená hmotnost myokardu a ledvin a rovněž poškození hepatocytů nebyly výrazně ovlivněny kombinovanou terapií v porovnání se samotným fenofibrátem. Z dřívějších studií víme, že silymarin je vhodný k léčbě metabolického syndromu (2,3), nicméně v kombinaci s fenofibrátem nepřináší očekávané výsledky.

Autoři děkují za finanční podporu grantu GAČR 17-08888S

Literatura

1. **Alberti KG., Eckel RH., Grundy SM., 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: 1640-1645.
2. **Poruba M., Kazdova L., Oliyarnyk O., et al.:** Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. *Xenobiotica* 2015; 45: 751-756.
3. **Gu M., Zhao P., Huang J., et al.:** Silymarin ameliorates metabolic dysfunction associated with diet-induced obesity via activation of farnesyl X receptor. *Front Pharmacol* 2016; 7: 345.
4. **Mottillo S., Fillion KB., Genest J., et al.:** The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 1113-1132.
5. **Gajdová J., Urbánek K.:** Fenofibrát a jeho lékové formy. *Interní Med* 2013; 15: 5-10.
6. **Noonan JE., Jenkins AJ., Ma J-X., et al.:** An update on the molecular actions of fenofibrate and its clinical effects on diabetic retinopathy and other microvascular end points in patients with diabetes. *Diabetes* 2013; 62: 3968-3975.
7. **Škop V., Trnovská J., Oliyarnyk O., et al.:** Hepatotoxic effects of fenofibrate in spontaneously hypertensive rats expressing human C-reactive protein. *Physiol Res* 2016; 65: 891-899.
8. **Morazzoni P., Bombardelli E.:** *Silybum marianum* (Carduus marianus), *Fitoterapia* 1995; 66: 3-42.
9. **Skottova N., Kazdova L., Oliyarnyk O., et al.:** Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacol Res* 2004; 50: 123-130.
10. **Skottova N., Vecera R., Urbanek K., et al.:** Effects of polyphenolic fraction of silymarin on lipoprotein profile in rats fed cholesterol-rich diets. *Pharmacological Research* 2003; 47: 17-26.
11. **Vrana A., Kazdova L.:** The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc* 1990; 22: 2579.
12. **Zicha J., Pechanova O., Cacanyiova S., et al.:** Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiol Res* 2006; 55(Suppl 1): S49-S63.
13. **Delarue J., Magnan C.:** Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 142-148.
14. **Garcia-Serrano S., Moreno-Santos I., Garrido-Sanchez L., et al.:** Stearoyl-CoA desaturase-1 is associated with insulin resistance in morbidly obese subjects. *Mol Med* 2011; 17: 273-280.
15. **Valenzuela A., Garrido A.:** Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biol Res* 1994; 27: 105-112.

KOMBINACE SILYMARINU S N-3 POLYNEENASYCENÝMÝ MASTNÝMI KYSELINAMI POZITIVNĚ OVLIVŇUJE METABOLICKÉ PORUCHY U HEREDITÁRNĚ HYPERTRIGLYCERIDEMICKÝCH POTKANŮ

COMBINATION OF SILYMARIN WITH N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IMPROVES METABOLIC DISORDERS IN HEREDITARY HYPERTRIGLYCERIDEMIC RATS

O. Oliyarnyk¹, H. Malínská¹, I. Marková¹, J. Trnovská¹, M. Hüttl¹, V. Škop¹, Z. Matušková², M. Poruba², R. Večera², L. Kazdová¹, M. Haluzík¹.

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

²Institute of Pharmacology, Palacky University, Olomouc

Introduction

Recent years has become nutritional intervention a promising tool as additional treatment of disorders associated with metabolic syndrome because of low toxicity compared to conventional pharmacotherapy. Silymarin (extract from the fruit and seeds of *Silybum marianum*) used for many years as a hepatoprotective drug was shown in recent studies to have additional biological effects useful in therapy of cardiac, lung, renal, viral and other disorders [1]. Silymarin is a complex of flavonolignans: silybin, isosilybin, silydianin, silychristin, flavonoids (taxifolin, quercetin) and other minority compounds. The most effective component of silymarin is silybin, which represents about 50% to 70% of the silymarin extract [2]. Previously we have shown antioxidant effect of silymarin [3] and hypolipidemic effect of silybin [4] in experimental model of metabolic syndrome - hereditary hypertriglyceridemic rats (HHTg).

Our previous experiments showed that despite many positive effects on disorders related to metabolic syndrome, effect of silymarin on dyslipidemia or ectopic triacylglycerols accumulation was small. In the current study, we test the hypothesis that combined therapy of silymarin with hypolipidemic drugs might have a synergistic positive effect. Beneficial impact of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), eicosapentanoic (EPA; C20:5 n-3) and docosahexanoic (DHA; C22:6 n-3) acids supplementation on hypertriglyceridemia, inflammation, adipose tissue insulin sensitivity and modulation of gut microbiota has been demonstrated [5]. Recent studies indicated that DHA leads to a greater reduction in specific markers of inflammation than EPA in equal dose [6]. On the other hand, n-3 PUFA due to the occurrence of double bonds in the molecule are sensitive to peroxidation that generate free radicals and reactive aldehydes and might increase oxidative stress. We investigated the effect of supplementation with silymarin alone, complex DHA+EPA alone and their combination on the parameters of insulin resistance, lipoperoxidation and activity of antioxidant enzymes in HHTg rats. Because of low absorption of simple silymarin from the gastrointestinal tract we supplemented rats with micronized silymarin extract [4].

Materials and Methods

The experiments were carried on male 4 months old HHTg rats fed a standard laboratory diet without supplementation (control group) or treated with micronized silymarin extract-1% (Favea, Kopřivnice, ČR), n-3 PUFA - 300mg/kg/day containing 50% DHA and 10% EPA, (Smart Nutrition Ltd, UK) and with combination of both substances for 4 weeks. Biochemical analysis was performed using methods described before [7].

Results

Supplementation of silymarin in combination with n-3 PUFA decreased body weight of HHTg rats and the weight of epididymal fat pads (Table 1). The weight of perirenal fat pads was reduced after treatment with n-3 PUFA alone or after co-administration with silymarin. The weight of liver, heart and kidney remained unchanged. In addition, any treatment did not affect glycemia, glucose tolerance, tissues insulin sensitivity, HMW adiponectin and ketone bodies concentration (data not shown). Treatment with n-3 PUFA alone or in combination with silymarin decreased plasmatic concentrations of triacylglycerols, total cholesterol and non-esterified fatty acids (NEFA). The level of HDL-cholesterol did not changed. Co-administration of silymarin with n-3 PUFA decreased triacylglycerols in *m. gastrocnemicus* (3.20 ± 0.31 vs. 5.29 ± 0.83 $\mu\text{mol/g}$, $p < 0.05$), but not in liver, myocardium and aorta (data not shown).

Table 1. Body and fat pads weight, plasma lipid parameters of HHTg rats after treatment with silymarin, n-3 PUFA and their combination

	HHTg	HHTg+SM	HHTg +PUFA	HHTg + SM + PUFA
Body weight, g	388 ± 3	390 ± 64	378 ± 5	$368 \pm 6^{*\$}$
The weight of fat pads				
Epididymal fat pad; g /100 g b.wt.	1.806 ± 0.069	1.649 ± 0.045	1.687 ± 0.038	$1.386 \pm 0.099^*$
Perirenal fat pad; g /100 b.wt..	1.033 ± 0.047	0.967 ± 0.029	$0.895 \pm 0.031^*$	$0.765 \pm 0.065^{***\$}$
Lipid parameters				
Triacylglycerols, mmol/l	4.73 ± 0.22	4.21 ± 0.32	$3.10 \pm 0.28^{***}$	$2.61 \pm 0.24^{***\$}$
Total cholesterol. mmol/l	1.52 ± 0.02	1.55 ± 0.01	$1.29 \pm 0.02^{***}$	$1.25 \pm 0.03^{***\$\$\$}$
HDL-colesterol, mmol/l	0.72 ± 0.03	0.69 ± 0.02	0.69 ± 0.04	0.67 ± 0.05
NEFA, mmol/l	0.43 ± 0.04	0.45 ± 0.04	$0.39 \pm 0.02^*$	$0.29 \pm 0.04^{***\$}$

Treatment with silymarin, n3-PUFA and their combination inhibited lipoperoxidation in liver determined as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration (Table 2). In addition, current drugs alone and in combination activated antioxidant enzymes - superoxidismutase (SOD) and catalase (CAT). Activity of paraoxanase 1 (PON 1) increased only after co-administration of silymarin with n-3 PUFA. Concentration of the important intracellular antioxidant - reduced glutathione (GSH) and reduced to oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) increased after treatment with n-3 PUFA alone or in combination with silymarin, which might activate glutathione-dependent antioxidant enzymes. Activation of liver glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione transferase (GST) was shown after supplementation with silymarin, n-3 PUFA and their combination.

In myocardium, only co-administration of silymarin with n-3 PUFA decreased TBARS level. SOD and CAT were activated after treatment with silymarin, n-3 PUFA and their combination. In contrast, PON 1 activity did not change. GSH concentration increased only after supplementation with n-3 PUFA or both substances, but the activity of GSH-Px and GST increased after alone silymarin, n-3 PUFA and their combination.

Table 2. Parameters of oxidative stress in HHTg rats after treatment with silymarin, n-3 PUFA and their combination

	HHTg	HHTg+SM	HHTg +PUFA	HHTg+SM +PUFA
Liver				
TBARS, nmol/mg _{prot}	1.50 ± 0.14	1.12 ± 0.07*	1.08 ± 0.03*	1.01 ± 0.07*
SOD, U/mg _{prot}	0.104 ± 0.005	0.124 ± 0.006*	0.128 ± 0.013*	0.129 ± 0.007*
CAT, µmol H ₂ O ₂ /min/ mg _{prot}	1362 ± 141	2085 ± 212*	1864 ± 154*	1834 ± 139*
PON1, µmol PNP/min/mg _{prot}	5.76 ± 0.38	6.46 ± 0.65	5.59 ± 0.37	7.85 ± 0.63*
GSH, µmol/ mg _{prot}	60 ± 1	67 ± 6	72 ± 3*	75 ± 3**§
GSSG, µmol/ mg _{prot}	3.93 ± 0.23	4.09 ± 0.28	3.50 ± 0.27	4.27 ± 0.19
GSH/GSSG	15.4 ± 1.2	16.4 ± 0.4	20.0 ± 1**	17.6 ± 0.1*
GSH-Px, µmol NADPH/min/mg _{prot}	291 ± 9	338 ± 16*	358 ± 13**	345 ± 15*
GST, nmol CDNB/min/mg _{prot}	124 ± 11	172 ± 15*	163 ± 10*	195 ± 14**§
Myocardium				
TBARS, nmol/mg _{prot}	0.66 ± 0.07	0.53 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.43 ± 0.04*§
SOD, U/mg _{prot}	0.068 ± 0.003	0.086 ± 0.005*	0.096 ± 0.004***	0.093 ± 0.006**
CAT, µmol H ₂ O ₂ /min/ mg _{prot}	524 ± 48	707 ± 46*	857 ± 45***	810 ± 52**
PON1, µmol PNP/min/mg _{prot}	21.3 ± 1.7	25.0 ± 2.0	22.2 ± 1.7	24.0 ± 1.8
GSH, µmol/ mg _{prot}	22 ± 3	26 ± 3	32 ± 6*§	32 ± 3*§
GSH-Px, µmol NADPH/min/mg _{prot}	142 ± 13	202 ± 23*	192 ± 10*	205 ± 17*
GST, nmol CDNB/min/mg _{prot}	42 ± 3	53 ± 2*	55 ± 2**	52 ± 2*

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. HHTg rats without supplementation

§p < 0.05, §§ p < 0.01 vs. HHTg supplemented with silymarin

Discussion

In the current study, we compared the effect of treatment with micronized silymarin extract alone and its combination with n-3 PUFA on disorders associated with hypertriglyceridemia, insulin resistance and oxidative stress in the model of metabolic syndrome – in HHTg rats.

Treatment with silymarin did not affect plasmatic concentrations of triacylglycerols, total cholesterol and HDL-cholesterol, which is in accordance with our previous study using a model of HHTg rats fed a high sucrose diet [3]. In contrast, silymarin supplementation in genetically normotriglyceridemic Wistar rats fed a high cholesterol diet inhibited intestinal cholesterol absorption, decreased plasma VLDL-cholesterol and triacylglycerols, increased HDL-cholesterol and prevented ectopic lipid accumulation [8]. In present study only combination of silymarin with n-3 PUFA has clear hypolipidemic effect which might be due to the activation of PPAR α and γ with consequently higher fatty acids oxidation, repressed de novo lipogenesis in liver through the inhibition of Srebp1c, increased lipid storage in adipose tissue [5]. Decreased triacylglycerols accumulation in muscle by co-administration of

silymarin with n-3 PUFA could be attributed to reduced accumulation of diacylglycerols and ceramides in myotubes [9].

Growing evidence indicate that oxidative stress is implicated in the pathogenesis of metabolic syndrome and its complications [10]. Treatment with nutrition supplements having antioxidant properties could be effective to inhibit free radical processes especially lipoperoxidation [11]. We have shown reduced TBARS concentration in liver and myocardium after treatment with silymarin and n-3 PUFA. Different mechanisms of the antioxidant effects of silymarin have been described including 1) prevention of free radical formation by inhibition of reactive oxygen species (ROS) - producing enzymes (especially NADPH-oxidase), 2) improving the integrity of mitochondria in conditions of stress, 3) decreasing inflammatory responses by inhibition of nuclear factor κ B (NF- κ B) - dependent pathways and consequent induction of proinflammatory cytokines TNF α , IFN γ IL-2, IL-6, IL-1 β , 4) activation of antioxidant enzymes [11]. Moreover, the major component of silymarin/silybin induces hepatic protein synthesis, which is important for liver regeneration and elimination of inflammation related disorders [12]. *The antioxidant effect of silymarin* was also found in others animal model of liver disease such as fatty liver induced by cholin deficient [13], or high fat diet [14], after toxic damage of liver and myocardium by *arsenic, carbon tetrachloride, or doxorubicin* [15]. Also *in patients with non-alcoholic steatohepatitis* [16] and diabetes [17] silymarin decreased serum markers of oxidative stress and inflammation. Inhibition of lipoperoxidation was accompanied with the aggravation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense. Synergistic effect of combined treatment with silymarin and n-3 PUFA we showed as the activation of PON1 and grater activation of GST in liver than after supplementation with silymarin alone. Our results indicate that the antioxidative effects of silymarin can be potentiated by supplementation with n-3 PUFA. Protective effects of n-3 fatty acids in liver and myocardium might be based on the grater effect of DHA in comparison to EPA in modulating of inflammation as well as blood lipids [6]. General mechanism of the activation of antioxidant enzymes by silymarin [18] and n-3 PUFA [19] could be attributed to positive effect of their supplementation on transcription of genes of current enzymes. Nuclear factor (erythroid-derived 2) - like 2 is a key transcription factor responsible for constitutive and inducible expression of antioxidant response elements-regulated genes of antioxidant enzymes including SOD, GSH-Px, GST and catalase [1].

In contrast, concentration of non-enzymatic intracellular antioxidant-GSH and oxidoreductive balance GSH/GSSG was positively affected only by treatment with n-3 PUFA or in its combination with silymarin. Increased liver GSH was shown in Wistar rats fed a high fat diet after silybin (the most effective component of silymarin) supplementation [13]. Our previous studies demonstrated increased GSH level in liver after treatment of HHTg rats with non-complexed silymarin extract [3], in liver and myocardium after supplementation of micronized silybin extract (in press).

Conclusions

Treatment of HHTg rats with n-3 PUFA reduced plasmatic levels of triacylglycerols, NEFA and total cholesterol, combination with silymarin potentiated synergistically beneficial effects on dyslipidemia. Both substances and their combination inhibited lipoperoxidation and activated antioxidant enzymes in liver and myocardium. Results suggest, that co-administration of silymarin with hypolipidemic drugs might be effective in therapy of complications associated with metabolic syndrome.

Supported by grants GAČR 17-08888-S and MZ ČR - RVO („IKEM, IČ 0023001“)

References

1. **Neha AS., Jaggi AS, Singh N.:** Silymarin and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol* 2016; 929: 25-44.
2. **Vargas-Mendoza N., Madrigal-Santillán E., Morales-González A., et al.:** Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol* 2014; 6: 144-149.
3. **Skottová N., Kazdová L., Oliyarnyk O., et al.:** Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Pharmacol Res* 2004; 50: 123-130.
4. **Poruba M., Kazdová L., Oliyarnyk O., et al.:** Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. *Xenobiotica* 2015; 45: 751-756.
5. **Pinel A., Morio-Liondore B., Capel F.:** n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate metabolism of insulin-sensitive tissues: implication for the prevention of type 2 diabetes. *J Physiol Biochem* 2014; 70: 647-658.
6. **Allaire J., Couture P., Leclerc M., et al.:** A randomized, crossover, head-to-head comparison of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid supplementation to reduce inflammation markers in men and women: the Comparing EPA to DHA (ComparED) Study. *Am J Clin Nutr* 2016; 104: 280-287.
7. **Škop V., Malínská H., Trnovská J., et al.:** Positive effects of voluntary running on metabolic syndrome-related disorders in non-obese hereditary hypertriacylglycerolemic rats. *PloS One* 2015; 10: e0122768.
8. **Sobolová L., Skottová N., Vecera R., Urbánek K.:** Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharmacol Res* 2006; 53: 104-112.
9. **Lam YY., Hatzinikolas G., Weir JM., et al.:** Insulin-stimulated glucose uptake and pathways regulating energy metabolism in skeletal muscle cells: the effects of subcutaneous and visceral fat, and long-chain saturated, n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1811: 468-475.
10. **Keane KN., Cruzat VF., Carlessi R., et al.:** Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2015 (2015) 181643.
11. **Saita E., Kondo K., Momiyama Y.:** Anti-Inflammatory Diet for Atherosclerosis and Coronary Artery Disease: Antioxidant Foods. *Clin Med Insights Cardiol* 2015; 8: 61-65.
12. **Hackett ES., Twedt DC., Gustafson DL.:** Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. *J Vet Intern Med* 2013; 27: 10-16.
13. **Grattagliano I., Diogo CV., Mastrodonato M., et al.:** A silybin-phospholipids complex counteracts rat fatty liver degeneration and mitochondrial oxidative changes. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 3007-3017.
14. **Haddad Y., Vallerand D., Brault A., Haddad PS.:** Antioxidant and hepatoprotective effects of silibinin in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: nep164.
15. **Surai PF.:** Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants (Basel)* 2015; 4: 204-247.
16. **Stiuso P., Scognamiglio I., Murolo M., et al.:** Serum oxidative stress markers and lipidomic profile to detect NASH patients responsive to an antioxidant treatment: a pilot study. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 169216.
17. **Ebrahimpour Koujan S., Gargari BP., Mobasseri M., et al.:** Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) extract supplementation on antioxidant status and hs-CRP in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine* 2015; 22: 290-296.

18. **Prabu SM., Muthumani M.:** Silibinin ameliorates arsenic induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 11201-11216.
19. **Zgórzyńska E., Dzedzic B., Gorzkiewicz A., et al.:** Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve the antioxidative defense in rat astrocytes via an Nrf2-dependent mechanism. *Pharmacol Rep* 2017; 69: 935-942.

NUTRIČNÍ BENEFITY KOZÍHO MLÉKA A VÝROBKŮ Z KOZÍHO MLÉKA

NUTRITIONAL BENEFITS OF GOAT'S MILK AND GOAT'S MILK PRODUCTS

J. Pánek, D. Chrpová*, B. Pohořelá, D. Vybíralová**, P. Vybíral**

Department of Food Analysis and Nutrition, University of Chemistry and Technology, Prague

**Department of Food Analysis and Nutrition, University of Chemistry and Technology,*

Prague; and Secondary Nursing School and Nursing College, Prague 4

***Polabské mlékárny a.s., Poděbrady*

Mléko savců je složitým koloidně-disperzním systémem. Ve formě pravého roztoku (ve vodě) obsahuje laktosu a minerální látky v iontové formě. Ve formě emulze jsou přítomny globule (velikosti 100 nm - 10 µm) lipidů obsahující acylglyceroly, cholesterol, lipofilní vitaminy, fosfolipidy a další látky. Micely kaseinů (velikost částic 10 - 300 nm) tvoří disperzní systém, syrovátkové (globulární) proteiny (3 - 6 nm) a lipoproteiny (okolo 10 nm) tvoří koloidní roztok.

Základní složení mléka vybraných přežvýkavců a srovnání s mlékem dvou vybraných monogastrů a mlékem lidským ukazuje následující tabulka:

Mléko	Protein	Kasein	Syrov. protein	Laktosa	Tuk	Popel
Kráva	3,2	2,6	0,6	4,6	3,9	0,7
Koza	3,2	2,6	0,6	4,3	4,5	0,8
Ovce	4,6	3,9	0,7	4,8	7,2	0,9
Velbloud	3,6	2,7	0,9	5,0	4,0	0,8
Zebu	3,2	2,6	0,6	4,7	4,7	0,7
Bizon	3,8	3,2	0,6	4,8	7,4	0,8
Sob	10,1	8,6	1,5	2,8	18,0	1,5
Kůň	2,5	1,3	1,2	6,2	1,9	0,5
Osel	2,0	1,0	1,0	7,4	1,4	0,5
Lidské	0,9-1,6	0,4-0,7	0,5-0,9	7,1	4,5	0,2

Složení kravského a kozího mléka je velmi podobné. Za zmínku stojí velmi kvalitní protein, kdy biologická hodnota spojené frakce kaseinových a syrovátkových proteinů se blíží biologické hodnotě referenčního celovaječného proteinu. Mírným handicapem je pouze o něco nižší obsah sirných aminokyselin v kaseinové frakci. Naopak, velkou výhodou je vysoký obsah lysinu, který je obecně problematickou (z hlediska nízkého obsahu v obilovinách a nestability) esenciální aminokyselinou.

Mléčný tuk obsahuje významné množství lipofilních vitaminů a jejich prekurzorů. Obsah retinolu (vitamin A) se pohybuje okolo 0,4 mg/l (25 % DDD; kromě toho asi 0,2 mg/l karotenoidních barviv), obsah vitaminu D okolo 0,7 mg/l (15 % DDD). Kozí mléko, stejně jako ostatní druhy, je významným zdrojem cholesterolu. Jeho obsah závisí na tučnosti produktu. U kozího mléka se (podobně jako u kravského) pohybuje okolo 100 mg/l, vyšší je např. u ovčího, ale i lidského mléka (až 300 mg/l). Složení mastných kyselin je podobné u všech mlék přežvýkavců, významnějším benefitem kozího mléka je snad pouze mírně vyšší obsah (ve srovnání s kravským mlékem - 17 resp. 11 % všech mastných kyselin) mastných

kyselin s krátkým řetězcem, které se nezapojují do tvorby plasmatických lipoproteinů a jejichž vliv na rozsah atherogenních procesů lze proto považovat za neutrální.

Za zmínku stojí kozí mléko jako významný zdroj některých bioaktivních látek s velmi zajímavým fyziologickým efektem. Vedle známé konjugované linolové kyseliny, fosfolipidů, lipofilních vitaminů A a D nebo laktoferrinu je možno se zmínit např. o derivátech oligosacharidů (sialyllaktosách, fukosylované laktose aj.) s výrazným prebiotickým efektem, o některých peptidech vykazujících významný antioxidační efekt, ACE inhibitech, γ -aminomáselné kyselině (GABA) a dalších. Kromě toho, kozí mléko může (díky odlišnému složení proteinové frakce) v některých případech sloužit jako alternativa kravského mléka u dětí trpících alergií na kravské mléko.

Je nutné se samozřejmě zmínit, že uvedené benefity se nevztahují pouze na mléko jako takové (jehož spotřeba je nízká), ale platí zejména pro mléčné výrobky, které jsou z hlediska lidské výživy poměrně zásadní komoditou. Z výrobků na bázi kozího mléka jsou mezi spotřebiteli zřejmě nejvíce preferované čerstvé sýry, ale roste i spotřeba jogurtů nebo tvrdých zrajících sýrů. Významným benefitem těchto výrobků je jejich lepší až úplná tolerance osobami s deficitem laktázy, která souvisí jednak se snížením obsahu laktosy při fermentaci (přibližně na 0 až 4 % podle typu výrobku) a jednak s pro- a prebiotickým efektem.

Literatura

Albenzio M., Campanozzi A., D'Apolito M., et al.: Differences in protein fraction from goat and cow milk and their role on cytokine production in children with cow's milk protein allergy. *Small Ruminant Res* 2012; 105: 202-205.

Albenzio M., Santillo A., Avondo M., et al.: Nutritional properties of small ruminant food products and their role on human health. *Small Ruminant Res* 2016; 135: 3-12.

Argov-Argaman N., Hadaya O., Glasser T., et al.: Milk fat globule size, phospholipid contents and composition of milk from purebred and Alpine-crossbred Mid-Eastern goats under confinement or grazing condition. *Intern Dairy J* 2016; 58: 2-8.

Claeys WL., Verraes C., Cardoen S., et al.: Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 2014; 42: 188-201.

Hernández-Ledesma B., Ramos M., Gómez-Rui JA.: Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Res* 2011; 101: 196-204.

Lee SY., Hur SJ.: Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chem* 2017; 228: 506-517.

Limon A., Gallegos-Perez JL., Reyes-Ruiz JM., et al.: The endogenous GABA bioactivity of camel, bovine, goat and human milks. *Food Chem* 2014; 145: 481-487.

Poutzalis S., Anastasiadou A., Nasopoulou C., et al.: Evaluation of the in vitro anti-atherogenic activities of goat milk and goat dairy products. *Dairy Sci. & Technol* 2016; 96: 317-327.

Serafeimidou A., Zlatanov S., Laskaridis K., Sagredos A.: Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. *Food Chem* 2012; 134: 1839-1846.

PALEO DIETA JAKO PREVENCE METABOLICKÉHO SYNDROMU – POHLED BIOCHEMIKA

PALEO DIET AS PREVENTION OF METABOLIC SYNDROME – VIEW OF A BIOCHEMIST

J. Pláteník

Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague

People in traditional communities of hunters and gatherers could suffer from infections and injuries, but not from obesity or metabolic syndrome. Serious attempts to reconstruct paleolithic human diet lead to adequate nutrition with moderate restriction of carbohydrate (50 - 150 g/day). Through insulin signaling the intake of carbohydrate sets the whole intermediary metabolism. There is an optimal range of carbohydrate intake; its lower limit is defined by the body's ability to avoid loss of muscle mass (sarcopenia) associated with ketosis; the upper limit by the ability to dispose excess nutrients without accumulation of body fat. The contemporary "balanced" Western diet is in fact a high-carbohydrate one and its consumption, especially if combined with excessive intake of sugar, leads to a loss of metabolic flexibility and slow development of obesity and metabolic syndrome in many people. Moderate restriction of dietary carbohydrate, as offered e.g. by the paleo diets, thus represents a causal intervention that can prevent or improve the signs of metabolic syndrome.

Paleo hnutí je dnes asi už celkem známá subkultura, možná i móda, která na nezasvěceného asi často působí jako příklad moderní zvykanosti a dekadence. Existuje ale řada medicínských důvodů, proč se o tento koncept zajímat. Lidé v tradičních komunitách živící se lovem a sběrem anebo primitivním zemědělstvím byli obecně v dobré fyzické kondici, s jistou dávkou štěstí se dožívali se i vysokého věku a trpěli především infekcemi a úrazy, zatímco civilizační choroby jako obezita, vysoký krevní tlak a diabetes mellitus II. typu se mezi nimi nevyskytovaly vůbec [1].

Seriózní pokusy o rekonstrukci lidské stravy v době před neolitickou revolucí nepodporují populární představy lovců, kteří se nárazově přejídají masem velkých zvířat. Reálně ve stravě lidí doby kamenné převládala rostlinná složka, hmyz a malá zvířata. Příkladem moderních paleo diet může být „primal“ (prvotní) dieta podle Marka Sissona [2]. Je založená na konzumaci (běžných porcí) masa, ryb, vajec, zdrojů přírodních tuků, zeleniny, ovoce a oříšků, omezeně i mléčných výrobků. Ze stravy se naopak vyřazují obiloviny, luštěniny, brambory, uzeniny, chemicky zpracované tuky, cukr, sladkosti a slazené nápoje. Součástí tohoto návodu na paleo život je i střídmost, obecný důraz na kvalitu potravin a intuitivní přístup ke stravování. Nepravidelnost (i občasné půsty) je vítána, občasná nedůslednost tolerována – dietu prý stačí držet z 80 %.

Celkově je takto sestavená dieta pestrá a biologicky hodnotná, příjem kalorií a proteinů odpovídající obvyklým doporučením, málo soli, žádný lepek, relativně málo sacharidů, poměrně hodně rostlinných i živočišných tuků včetně nasycených a cholesterolu, ale s důrazem na jejich kvalitu – co nejvíc omega-3 polynenasycených mastných kyselin, minimum trans-mastných kyselin. Je to dieta blízka „raw“ stravě, případně středomořské dietě bez pizzy a těstovin. Na pohled nejvýraznější změnou oproti běžnému stravování je náhrada škrobových příloh velkým množstvím zeleniny. Výsledné omezení sacharidů je relativně mírné – asi na 50-150 g denně, tj. sacharidy tvoří cca 15% kalorického příjmu (třetina oproti obvykle doporučenému množství), z kalorického hlediska jsou nahrazeny tuky. Nejde

o ketogenní režim - k navození ketózy je třeba omezit sacharidy do 20 g denně, pak už zeleninu nelze jíst vůbec.

Je ale takové omezení sacharidů na třetinu doporučených hodnot významné? Smyslem tohoto příspěvku je vysvětlit, že ano. Jde o základní funkční prvek paleo diety, který může zabránit rozvoji obezity a metabolického syndromu.

Z pohledu biochemika je lidské tělo chemický stroj, který může existovat ve dvou stavech – po jídle a ve stavu hladovění. Oba stavy jsou fyziologické. Po jídle tělo spaluje glukosu, její přebytek se ukládá jako glykogen do jater a svalů, případně přeměňuje na mastné kyseliny, které spolu s mastnými kyselinami z potravy odcházejí do tukové tkáně. Ve stavu hladovění tělo naopak s glukosou šetří a hlavním palivem se stávají tuky. Játra udržují minimální hladinu krevního cukru štěpením glykogenu a syntézou glukosy (glukoneogenezi) z jiných zdrojů, především z aminokyselin. Tuková tkáň uvolňuje mastné kyseliny, které se stávají hlavním zdrojem energie, buď jako takové anebo po přeměně na ketolátky.

Zcela klíčovou roli v přepínání mezi těmito dvěma stavy hraje hormon inzulín. Účinky inzulínu se rozhodně neomezují jen na regulaci glykémie. Například celý proces využití tukových zásob se spouští v tukové tkáni regulací hormon-senzitivní lipasy. Mnoho hormonů jí aktivuje, ale jen jediný inzulín jí – zato velmi účinně – inhibuje. Lze říci, že inzulín zamyká tukové zásoby a celý metabolismus nastavuje na stav po jídle. Přitom ale základním podnětem pro jeho sekreci je glukosa, živina, která byla zřejmě evolucí zvolena jako „marker“ nadbytku.

Z těchto celkem triviálních učebnicových faktů plyne netriviální závěr: množství sacharidů v potravě je v regulaci tělesné hmotnosti u člověka mnohem důležitější veličinou než kalorický příjem. Zákony termodynamiky samozřejmě platí, ale prakticky při vysoko-sacharidové dietě tělo tuky pálit nebude a spíše si přes následnou hypoglykémii vynutí další přísun sacharidů. Pro redukci hmotnosti musí inzulín jít dolů a omezení sacharidů v potravě je zřejmě nejsnazší cesta, jak regulaci metabolismu „hacknout“ a skutečně dosáhnout úbytku tukové tkáně. Úspěšnost konzervativní, režimové léčby obezity je v současnosti nízká. Nechybí zde právě tato jednoduchá a skutečně funkční rada – zaměřte se na redukci sacharidů, ne kalorií?

Glukosa pro nás představuje snadno dostupný zdroj energie – minimálně anaerobní verzi jejího metabolismu ovládá naprosto každá buňka v těle. Je nejlepším palivem pro situace akutního ohrožení a samozřejmě nervová tkáň se bez ní neobejde. Na druhé straně je ale pro nás dlouhodobě výhodnější, pokud většina tkání organismu spaluje spíše tuky než glukosu, a zřejmě je to naše původní nastavení. Glukosa sama, inzulínová signalizace i zmnožená tuková tkáň v těle navozují prozánětlivý stav a urychlují stárnutí [3,4]. Světlou stránkou téže věci je dobře známá skutečnost, že prozánětlivý stav navozený obezitou posiluje obranu proti infekcím. Tento tzv. „obesity paradox“ má asi evoluční opodstatnění: nadbytek potravy je přes glukosu a inzulín interpretován jako období vhodné k rozmnožování, tělo tvoří zásoby a zároveň posiluje protiinfekční imunitu [5]. Dlouhodobě ale tytéž mechanismy urychlují stárnutí a vedou k civilizačním chorobám. Prakticky po celou lidskou historii bylo výhodnější se „vyžrat“, v dnešním světě už ale nevýhody obezity a metabolického syndromu drtivě převažují nad výhodami.

Jediný způsob, jak v těle odbourat více živin než potřebujeme k získání energie, představuje rozpojení mitochondriální oxidace od fosforylace, tzv. uncoupling. Energie z živin se uvolní jako teplo. Z tohoto hlediska je zajímavé, že mastné kyseliny jsou dlouho známé jako rozpojovače z pokusů in vitro. Význam tohoto fenoménu v organismu je nejasný, ale možná nebude zanedbatelný – nově byl objeven enzym, který z mastných kyselin a aminokyselin vytváří deriváty s rozpojovací funkcí. Manipulace s expresí tohoto enzymu je schopná ovlivnit obezitu u myši [6].

Jak už uvedeno, po běžném jídle obsahujícím sacharidy nejsou mastné kyseliny z tuků potravy využívány jako palivo. Oxidace mastných kyselin přichází ke slovu až během přechodu ze stavu po jídle do stavu hladovění, případně při aerobní fyzické aktivitě. Jsou potřeba nejen jako zdroj energie, ale i pro šetření pyruvátu a správné nastartování glukoneogeneze. Vrozený nebo získaný defekt oxidace mastných kyselin se proto projeví jako intolerance lačnění v důsledku hypoglykemie.

V dnešním světě plném sacharidů není vůbec samozřejmé, že metabolismus moderního člověka na oxidaci mastných kyselin vůbec kdy potřebuje a umí přepnout. Postrádám rozsáhlejší výzkum na toto téma, ale i jen dle každodenní zkušenosti je zjevné, že mnoho lidí obtížně toleruje lačnění a nepravidelnost v jídle obecně. Moderní člověk ztrácí metabolickou flexibilitu.

Nízkosacharidové diety pracují s relativně dlouhým (asi 3 týdny) obdobím, kdy se tělo restrikcí sacharidů nutí do adaptace na spalování tuků. Pomoci může také karnitin, endogenní látka nezbytná pro import mastných kyselin do mitochondrií, což je kritický a limitující krok celé oxidace mastných kyselin. Ačkoliv je karnitin obsažen v červeném masu a tělo by mělo být schopno tuto látku syntetizovat, u části dnešní populace na vysokosacharidové dietě je pravděpodobný deficit, který se projeví jako intolerance lačnění nebo aerobní zátěže. Karnitin je běžně dostupný jako potravní doplněk. Zvýšením tolerance k restrikci sacharidů a k fyzické aktivitě může nepochybně pomoci v redukci nadváhy, navíc byla popsána celá řada příznivých účinků i na další projevy metabolického syndromu: karnitin snižuje krevní tlak, příznivě ovlivňuje dyslipidemii a u diabetiků zlepšuje využití glukosy [7]. Také ale existuje možnost přeměny karnitinu střevní bakteriální florou na proatherogenní trimethylamino-N-oxid [8].

K metabolismu ve stavu hladovění patří i syntéza nezbytného množství glukosy z laktátu, glycerolu a aminokyselin. Teoreticky, je-li v dietě dostatek proteinů, sacharidy nejsou třeba. Ale jinak je obvyklým zdrojem aminokyselin pro glukoneogenezi svalová tkáň a nevyhnutelně tedy nastává její úbytek – sarkopenie. Ztráta svalové hmoty přichází fyziologicky s vyšším věkem, její akcelerace hrozí při suboptimální metabolické adaptaci na dietní restrikci sacharidů, stresu a fyzické inaktivitě. Svalová hmota má přímý vztah k vitalitě člověka a kvalitě života, nakonec i k jeho délce – jak dnes rozumíme stárnutí, skutečným limitem trvání našich těl je stav postmitotických tkání, které mají vysoké energetické nároky a během života se neobnovují – tedy nervového systému, kosterního svalstva a myokardu [9]. Sarkopenie je vždy nežádoucí a představuje významné, málo zmiňované riziko každé nízkosacharidové diety, především samozřejmě drastických ketonizačních režimů. Paleo životní styl klade důraz na dostatečný příjem proteinů a fyzickou aktivitu, i tak je vhodné svalovou hmotu monitorovat.

Samostatnou kapitolou jsou jednoduché sacharidy, tedy řepný či třtinový cukr. Ve stravě lidí doby kamenné jednoduché sacharidy (nejspíš fruktosa) asi vždy byly, ovšem v malém množství – příroda prostě není sladká. A vše nasvědčuje tomu, že jsme evolučně nastaveni čelit nedostatku, nikoliv nadbytku sacharidů v potravě. Celý paleolit byl asi bojem o cukr. Lovecké štěstí je nestálé, a pokud v potravě nebyl dostatek proteinů, musely v ní být alespoň sacharidy, jinak hrozil úbytek svalové hmoty, pro přežití v přírodě fatální. Proto asi jsme tak vysazeni na sladkou chuť. Příklad příjem jednoduchých sacharidů nepochybně stimuluje dopaminergní systém odměn v mozku a může zřejmě vést k závislosti podobné těm na drogách. Kombinace této instinktivní výbavy a dnešní snadné dostupnosti cukru je samozřejmě neblahá a významně k výskytu obezity a metabolického syndromu přispívá.

Celkový denní příjem všech sacharidů v podstatě reguluje rovnováhu mezi anabolismem a katabolismem a existuje pro něj určité optimum. To je pro každého trochu jiné, ale rozsah 50 - 150 g/den [2] se jeví jako užitečné zobecnění. Horní hranici sacharidového optima (toleranci sacharidů v potravě) lze operativně definovat jako takový

příjem sacharidů, při kterém ještě nedochází k přibývání tukové tkáně. Dolní hranice by teoreticky mohla být nula, prakticky ale potřebujeme jíst zeleninu a ovoce a tak není vhodné (ani snadné) trvale držet méně než asi 50 g/den. Drastická restrikce sacharidů také vede ke ketose, která (na rozdíl od diabetické ketoacidózy) je sice fyziologická, ale z podstaty věci jakožto adaptace na hladovění jen dočasně. Navíc se při ní asi vždy ztrácí svalová hmota (nejde jen o zdroje aminokyselin, inzulín je růstový faktor i pro svalovou tkáň). Ketosa ani není pro redukci nadváhy nezbytná, restrikce sacharidů vede k hubnutí i bez ní, jen pomaleji.

Velká část umění, jak zůstat zdravý a v kondici do vysokého věku, tedy zřejmě spočívá v proplování mezi obezitou a sarkopenií. Sacharidové optimum je samozřejmě dynamické, existuje celá řada situací, kdy je možné a vlastně i nutné příjem sacharidů zvýšit, například fyzická aktivita, akutní onemocnění, příjem alkoholu, intenzivní duševní práce. Fyzicky aktivní lidé nemusí přibírat na váze ani při obvyklé stravě s obsahem sacharidů cca 300 g/den. Často je ale tato běžná strava, kterou z historických, kulturních a v neposlední řadě ekonomických důvodů považujeme za dietu tzv. „vyváženou“, pro daného jedince fakticky dietou vysokosacharidovou. Trvale vysoký příjem sacharidů v potravě pak vede dříve či později k obezitě a případně k souboru příznaků známých jako metabolický syndrom. Vše nasvědčuje tomu, že příčinou metabolického syndromu je reakce v zásadě zdravých lidí, byť s určitou, dříve evolučně výhodnou genetickou predispozicí, na dietu dlouhodobě příliš bohatou na sacharidy.

Je-li tomu tak, pak ovšem restrikce sacharidů v potravě představuje nejvhodnější prevenci metabolického syndromu, popř. kauzální léčbu. Skutečně tomu tak je, nízkosacharidové diety účinně působí na klíčové biochemické abnormality metabolického syndromu a někteří autoři dokonce navrhují odpověď na restrikci sacharidů jako diagnostické kritérium [10]. Netroufám si posuzovat, jestli je důkazů dost. Z pohledu biochemika je ale logicky zřejmé, že základní koncept je správný.

Civilizační choroby jsou nepochybně způsobeny propastí mezi současným životním stylem a tím k čemu jsme biologicky přizpůsobeni. Do paleolitu se samozřejmě vrátit nelze, ale je to užitečný koncept, jak definovat a srozumitelně formulovat, co je pro nás optimální a dle možnosti se k tomu pak alespoň přiblížit.

References

1. **Diamond J.:** Svět, který skončil včera. Brno: Jan Melvil Publishing, 2014.
2. **Sisson M.:** Primal Blueprint. Praha: Blue Vision, 2014.
3. **Richardson A., Liu F., Adamo ML., et al.:** The role of insulin and insulin-like growth factor-I in mammalian ageing. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18: 393-406.
4. **Klötting N., Blüher M.:** Extended longevity and insulin signaling in adipose tissue. *Exp Gerontol* 2005; 40: 878-883.
5. **Roth J., Sahota N., Patel P., et al.:** Obesity paradox, obesity orthodox, and the metabolic syndrome: An approach to unity. *Mol Med* 2016; 22: 873-885.
6. **Fan W., Evans R.:** Metabolism. The quest to burn fat, effortlessly and safely. *Science* 2016; 353: 749-750.
7. **Johri AM., Heyland DK., Héту MF., et al.:** Carnitine therapy for the treatment of metabolic syndrome and cardiovascular disease: Evidence and controversies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24: 808-814.
8. **Koeth RA., Wang Z., Levison BS., et al.:** Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19: 576-585.
9. **Lane N.:** Oxygen. The Molecule that made the World. New York: Oxford University Press, 2002.
10. **Volek JS., Feinman RD.:** Carbohydrate restriction improves the features of metabolic syndrome. Metabolic syndrome may be defined by the response to carbohydrate restriction. *Nutr Metab (Lond)* 2005; 2: 31.

MASTNÉ KYSELINY RYB ČELEDI SALMONIDAE**FATTY ACIDS OF THE FAMILY SALMONIDAE****B. Pohořelá, M. Kuna, M. Doležal, J. Pánek***Department of Food Analysis and Nutrition, UCT Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6*

Ryby a rybí výrobky jsou z nutričního hlediska vysoce ceněnou potravinovou komoditou. Rybí svalovina obsahuje velmi kvalitní a dobře stravitelné bílkoviny, velice hodnotný tukový podíl a řadu významných mikronutrientů, z nichž za zvláštní zmínku stojí například vitamín D. Obsah tuku v rybách je velmi variabilní, obvykle se pohybuje od 0,5 do 16 %. Z hlediska výživy nejdůležitější a nejvýznamnější složkou lipidů jsou mastné kyseliny. Složení mastných kyselin tukového podílu ryb závisí na mnoha faktorech, vedle genetických faktorů se uplatňuje hlavně výživa a teplota vody, proto je významný rozdíl ve složení mastných kyselin ryb sladkovodních a mořských. (1, 2, 3, 4, 5)

Losos obecný (*Salmo salar* L.) je původem z řek ústících v severních oblastech do Atlantského oceánu. Lososi, čeleď lososovití (*Salmonidae*), jsou dravé, anadromní ryby, které migrují ze sladké vody do oceánu a pak zpátky do sladké vody za účelem tření. V dnešní době se losos intenzivně chová v mnoha oblastech světa. Významný je chov lososa především v Norsku, Skotsku, Kanadě, Chile. Volně žijící lososi tvoří asi jen 0,5 % celkové populace (6).

Losos obecný i losos gorbuša patří do čeledi lososovití (*Salmonidae*), jsou však jiného rodu. Losos obecný spadá do rodu *Salmo* a losos gorbuša do rodu *Oncorhynchus*. Losos gorbuša žije převážně v chladných vodách o teplotě kolem 10 °C. Vykytuje se především v Tichém oceánu a na pobřežích Severního ledového oceánu.

Losos obsahuje významné množství nenasycených mastných kyselin, zejména polynenasycených mastných kyselin (PUFA) omega-3 a omega-6. Z tohoto důvodu je stále častěji doporučována jeho konzumace. Výrobky z ryb bychom (dle doporučení WHO) měli konzumovat alespoň dvakrát týdně. V ČR je dle údajů ÚZEI z roku 2015 spotřeba ryb velmi nízká – okolo 5,4 kg na osobu a rok. (1, 2, 3, 4, 5)

Dnešní ryby jsou chované především v akvakulturách a mají nižší obsah PUFA než ryby pocházející z oceánů. Složení mastných kyselin tedy do značné míry závisí na krmivu, druhu, stáří, pohlaví, podmínkách prostředí (teplota vody, zeměpisná poloha atd.). Chovaný losos obecný je převládajícím druhem na trzích díky jeho nižší ceně oproti volně žijícím lososům. (6, 7, 8)

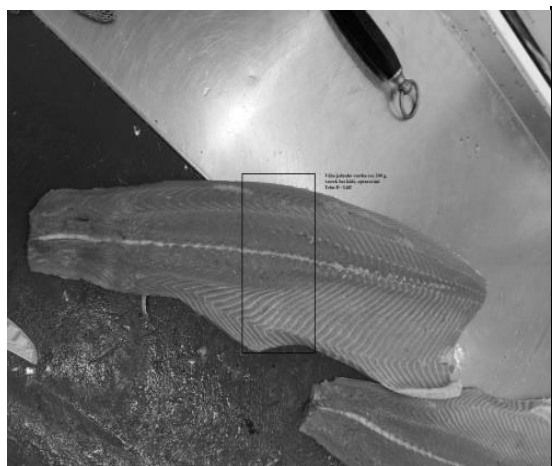
Vzorky lososa atlantického (*Salmo salar* L.) pocházely z akvakultur, ze tří oblastí norského severomořského pobřeží (sever, střed a jih), dva vzorky pocházely ze Skotska, dva z Chile a tři vzorky lososa gorbuši byli uloveny na Aljašce. K dispozici jsme tedy měli 42 vzorků. Všechny norské vzorky byly od stejné firmy. Každá ryba vážila okolo 3,5 kg. Vzorek pro analýzu měl hmotnost kolem 200 gramů a byl extrahován ze střední části ryby (bez kůže) – viz. obrázek 1.

Tab. 1. Composition of *Salmo salar* L. without skin (9)

Nutrient	Množství (gram)
Bílkoviny	22,1
Sacharidy	0
Tuky	7,8
Nasycené (SAFA)	0,8
Mononenasycené (MUFA)	2,92
Polynenasycené (PUFA)	1,27
<i>n</i> - 6	0,54
<i>n</i> - 3	0,74

Vzorky byly po přidání antioxidantu (BHT) homogenizovány. Extrakce tuku byla realizována pomocí metody dle Folche, která snižuje riziko oxidace polynenasycených mastných kyselin. Jako rozpouštědlo byla použita směs relativně polárních rozpouštědel, chloroform a methanol v poměru 2:1. Tuk byl extrahován při pokojové teplotě. Filtrát byl promyt vodou pro odstranění proteinů a dalších polárních sloučenin. Chloroformová fáze byla přesušena bezvodým síranem sodným. Po provedení tohoto kroku bylo rozpouštědlo odpařeno.

Takto získaný tuk byl použit pro stanovení složení mastných kyselin, které bylo provedeno pomocí IUPAC metody (10). Mastné kyseliny se stanovovaly metodou plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí. Kvantifikace jednotlivých mastných kyselin byla provedena pomocí vnitřní normalizace.

**Fig. 1.** Analyzed part of salmon**Fig. 2.** Farming area of Norwegian salmon

V tabulce 2 jsou uvedeny průměrné hodnoty mastných kyselin ve vzorcích. Vzorky byly rozděleny podle oblastí. Oblast Norska byla ještě rozdělena do tří samostatných souborů podle oblasti chovu (jih, střed a sever). Obsah nasycených mastných kyselin (SAFA) byl mírně vyšší u lososů gorbuša, kdežto obsah monoenoových mastných kyselin (MUFA) byl oproti ostatním vzorkům téměř poloviční. Zajímavé jsou i výsledky polyenoových mastných kyselin (PUFA). Nejvyšší obsah vykazovaly vzorky lososa gorbuši. Složení jednotlivých druhů mastných kyselin nebylo u vzorků lososa pocházejících z Norských oblastí významné.

Tab. 2. Average fatty acid content in samples by farming areas

	Norsko Jih	střed	sever	Skotsko	Chile	Gorbuša
SAFA	16,5	17,1	15,3	22,7	18,7	25,1
MUFA	47,7	47,3	49,7	39,6	50,1	23,1
n - 6	15,8	15,6	15,7	11,9	16,7	3,6
n - 3	17,4	17,4	16,6	21,6	11,3	41,8
PUFA	35,1	34,9	34,3	36,5	30,1	47,6

Složení jednotlivých mastných kyselin se mezi jednotlivými oblastmi příliš nelišilo. Významnější rozdíly byly patrné pouze u lososů gorbuša, u kterých byl vyšší podíl polynenasycených mastných kyselin, zejména řady n-3. Je však nutno brát v potaz, že losos gorbuša obsahuje mnohem méně tuku oproti lososu obecnému.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2017)

Literatura

1. **Velíšek J., Hajšlová J.:** Chemie potravin 1. díl. 3. vyd. Tábor: Osis, 2009.
2. **Pánek J., Pokorný J., Dostálová J., Kohout P.:** Základy výživy. Praha: Nakl. Svoboda Servis, 2002.
3. **Výživová doporučení** pro obyvatelstvo České republiky – Společnost pro výživu (<http://www.vyzivaspol.cz/vyzivova-doporuceni-pro-obyvatelstvo-ceske-republiky/>)
4. **Svačina Š., et al.** Hygiena výživy. In: Dietologie pro lékaře, farmaceuty, zdravotní sestry a nutriční terapeuty. 2. vyd. Praha: Triton, 2013; 16-32.
5. **Trumbo P., Schlicker S., Yates AA., Poos M.:** Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. J Am Diet Assoc 2002; 102: 1621-1630.
6. **Harris K., Fleming J., Kris-Etherton P.:** Challenges in estimating omega-3 fatty acid content of seafood from US nutrient databases: A salmon case study. Journal of Food Composition and Analysis 2001; 8: 1168-1173.
7. **Abbas KA., Mohamed A., Jamilah J.:** Fatty acids in fish and beef and their nutritional values: a review. J Food, Agriculture and Environment 2009; 7: 37-42.
8. **Naylor RL., Goldburg RJ., Primavera JH., et al.:** Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature 2000; 405: 1017-1024.
9. **Databáze složení potravin ČR** verze 6.16 (<http://www.nutridatabaze.cz>)
10. **IUPAC - Commission on Oils, Fats, and Derivatives:** Methods 2.301 – Preparation of the Fatty Acid Methyl Esters. In: Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th Edition. Paquot C., Hautfenne A. Eds. Oxford: Blackwell Sci Publ, 1987.

NECHOLESTEROLOVÉ STEROLY A MASTNÉ KYSELINY U PACIENTŮ V HEMODIALYZAČNÍM PROGRAMU

NON-CHOLESTEROL STEROLS AND FATTY ACIDS IN HEMODIALYSED PATIENTS

M. Vecka¹, M. Dušejovská^{1,2}, B. Staňková¹, I. Rychlík², A. Žák¹

¹ 4. interní klinika, I. LF UK a VFN v Praze, Praha

² Dialyzační středisko Fresenius Medical Care, Praha 10 - Královské Vinohrady

Úvod

Snižování koncentrací LDL cholesterolu je všeobecně přijímáno jako účinný nástroj pro redukci kardiovaskulární mortality, nicméně u pacientů s renálním selháním podstupujících dialyzační proces léčba statiny není tak účinná při snižování kardiovaskulárních komplikací. Dialyzovaní pacienti mívají obvykle dyslipidémii se zvýšenými hladinami VLDL a IDL cholesterolu doprovázenou nižšími koncentracemi HDL-cholesterolu a zvýšenou hladinou triacylglycerolů (TAG) (Shoji 2015).

Jen málo studií se zabývalo distribucí cholesterolu mezi jednotlivými lipoproteinovými třídami za podmínek hemodialyzačního procesu, popř. dlouhodobými účinky dialýzy na hladiny lipidů. Podobně velmi málo je známo o homeostáze cholesterolu za těchto podmínek, v dostupné literatuře existuje pouze několik prací (Fukushima 2012, Rogacev 2012, Igel-Korgacova 2003) s rozdílnými výsledky. Obecně tyto práce ukazují na sníženou nebo nezměněnou hladinu cholesterolu, markeru biosyntézy cholesterolu, a zvýšené nebo nezměněné koncentrace fytoosterolů jako markerů absorpce. U dialyzovaných jedinců se zvýšenou úrovní absorpce cholesterolu je navíc možné očekávat vyšší mortalitu (Rogacev 2012). Tento efekt pravděpodobně stojí v pozadí nízké účinnosti léčby statiny u pacientů s terminálním renálním selháním (ESRD) ve studiích AURORA nebo 4D (Felström 2009, Wanner 2005). Omezení absorpce cholesterolu ezetimibem v kombinaci se statiny již riziko vzniku aterosklerotických příhod snižovalo u pacientů s chronickým poškozením ledvin (CKD), ale ne v podskupině s ESRD (Baigent 2011).

Metabolismus cholesterolu částic LDL v játrech je závislý na dvou principiálně odlišných regulacích. První je změna v procesu sekrece a tvorby žlučových kyselin modulující absorpci cholesterolu v lumen střeva a tak nepřímou i přísun cholesterolu do jater, druhá regulační cesta spočívá v možnosti redistribuovat cholesterol mezi poolem jeho esteru a volnou formou, což závisí na typu mastných kyselin, které se dostávají do jater (Daumerie 1992). Mastné kyseliny v dietě tak mohou ovlivňovat i homeostázu cholesterolu. Protože dietní příjem cholesterolu, mastných kyselin a fytoosterolů může být variabilní, naskytá se otázka, zdali v průběhu zhoršování renální funkce není metabolický obrat cholesterolu v korelaci s dietním přísunem výše zmíněných lipidových složek, které do homeostázy cholesterolu vstupují.

U dialyzovaných osob jsou známy odchylky v zastoupení mastných kyselin v lipidech plazmy i erytrocytárních membrán ve směru vyšších hladin satureovaných mastných kyselin (SFA) a sníženého zastoupení polynenasycených mastných kyselin (PUFA) (Shoji 2015), které je podobné profilům mastných kyselin u diabetiků (Imamura 2014), navíc se známkami deficiencie esenciálních mastných kyselin. Rozvoj CKD a hladiny PUFA v plazmě spolu souvisejí (Baggio 2005), zhoršování renálních funkcí je více patrné u jedinců, kteří mají nízké koncentrace PUFA (Lauretani 2008).

Cílem této studie bylo sledovat, jak se odlišuje metabolismus mastných kyselin a sterolů u jedinců v hemodialyzačním programu a osob se zachovalou funkcí ledvin.

Metodika

Vyšetřovaný soubor

Studie byla prováděna v dialyzačním centru Vinohrady Fresenius Medical Care v Praze. Soubor sledovaných pacientů sestával z 68 osob s ESRD (44 mužů/28 žen, věk $61,2 \pm 8,2$ roků) v pravidelném hemodialyzačním programu (doba trvání 2,9 [1,0-5,6]; medián [25.-75. percentil] let), přičemž celková doba dialýzy v průběhu jednoho týdne se u všech pacientů pohybovala v rozmezí 12 - 15 hodin. Kontrolní osoby (nonHV-HDF) bez známek CKD byly párovány podle věku, pohlaví, přítomnosti diabetes mellitus 2 typ (DM2T) s podobným rozmezím hodnot BMI a byly rekrutovány z pacientů lipidové ambulance na IV. interní klinice 1. LF UK a VFN v Praze.

Všichni pacienti s ESRD byli ve stabilním klinickém stavu bez známek akutních kardiologických problémů. Někteří pacienti s HV-HDF měli zavedenou hypolipidemickou léčbu [39 užívalo statiny (atorvastatin), 2 jiná hypolipidemika], 3 pacienti měli anurii, u zbývajících byla diuréza zachována. Jako vazač fosfátu byl použit Renagel® (sevelamer hydrochlorid) u 41 pacientů. Ve skupině nonHV-HDF užívalo 27 jedinců statiny. Základní charakteristiky souboru jsou uvedeny v tabulce 1. Studie byla schválena Etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Všichni účastníci obdrželi poučení o protokolu studie a podepsali před zahájením studie informovaný souhlas.

Analytické metody

Pro stanovení biochemických parametrů bylo použito standardních kolorimetricko-enzymatických metod. Zastoupení cholesterolu v lipoproteinových frakcích bylo stanoveno na platformě Lipoprint® s použitím LDL kitu pro apoB lipoproteinové subfrakce (Dušejovská 2017). Koncentrace SAA, apoB-48 a hs-CRP byly získány komerčně dostupnými ELISA kity. Koncentrace necholesterolových sterolů v plazmě byly stanoveny po předchozí saponifikaci plynovou chromatografií (GC) s plamenoionizační detekcí (FID) (Tvrzická 1991) a profil mastných kyselin v jednotlivých lipidových třídách s použitím metody kombinující extrakci lipidů, tenkovrstevnou chromatografií a GC-FID detekci (Tvrzická 2002).

Výsledky jsme hodnotili v prostředí software Statistica® for Windows ver. CZ12 (Statsoft, ČR). U proměnných s normálními distribucemi bylo pro porovnání hodnot mezi oběma skupinami použito analýzy rozptylu s adjustací na hodnoty BMI, pro rozdíly mezi distribucemi χ^2 test s Yatesovou korekcí. Negaussovsky distribuované proměnné byly před statistickým hodnocením nejdříve transformovány. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

Výsledky

Základní biochemické a antropometrické parametry

Skupina HV-HDF se od nedialyzovaných jedinců bez známek CKD (skupina nonHV-HDF) nelišila některými konvenčními rizikovými faktory KVCH (věkem, poměrem ženy/muži, zastoupením jedinců s hypertenzí, DM2T nebo hyperlipidemií), nicméně u skupiny HV-HDF se KVCH manifestovaly výrazně častěji (68 % vs. 9 %; $p < 0,0001$). Zastoupením jedinců léčených statiny se obě skupiny nelišily (39 vs. 27; $p = 0,06$). Koncentrace celkového cholesterolu byly u HV-HDF skupiny nižší, hlavně díky nižšímu obsahu cholesterolu v lipoproteinech HDL a VLDL. Koncentracemi apolipoproteinu AI se obě skupiny nelišily, naproti tomu jsme pozorovali u HV-HDF skupiny nižší koncentrace apoB a zhruba 5násobně vyšší koncentrace apoB48. Parametry sacharidového metabolismu se skupina HV-HDF od nedialyzovaných také lišila, vyšší hodnoty glukózy a inzulínu se odrazily i ve zvýšených hodnotách indexu HOMA-IR. Porovnání hmotnostních parametrů, hladin krevních lipidů a lipoproteinů ve sledovaných skupinách ukazuje tabulka 1.

Tabulka 1. Základní antropometrické a vybrané biochemické ukazatele sledovaných skupin

	nonHV-HFD (n = 68)	HV-HFD (n = 68)	ANCOVA na BMI
věk (roky)	61,9 ± 8,2	64,8 ± 12,7	0,0913
trvání dialýzy (roky)	n.a.	2,9 [1,0-5,6]	n.a.
hmotnost (kg)	88,5 ± 18,3	76,2 ± 20,3	0,7125
BMI (kg.m ⁻²)	29,9 ± 5,2	26,7 ± 6,2	n.a.
muži/ženy	44/24	44/24	NS ^a
DM [počet(%)]	30(44)	30(44)	NS ^a
HTN [počet(%)]	54(79)	61(90)	0,1545 ^a
kouření [počet(%)]	10(15)	20(29)	0,0627 ^a
KVCH [počet(%)]	6(9)	46(68)	0,0001 ^a
eGFR (ml/min)	1,39 ± 0,27	0,13 ± 0,04	0,0001
TC (mmol/l)	5,17 ± 1,12	4,64 ± 0,95	0,0050
HDL-C (mmol/l)	1,38 ± 0,40	1,24 ± 0,43	0,0006
VLDL-C (mmol/l)*	1,30 ± 0,45	0,89 ± 0,27	0,0001
IDL-C (mmol/l)*	1,36 ± 0,44	1,44 ± 0,35	0,1888
LDL-C (mmol/l)*	1,46 ± 0,50	1,33 ± 0,52	0,1023
LDL-C (mmol/l)	3,11 ± 0,86	2,63 ± 0,82	0,0038
NEFA (mmol/l)	0,61 ± 0,28	0,43 ± 0,29	0,0016
TAG (mmol/l)	1,33 [1,05-1,92]	1,63 [1,05-2,29]	0,0044+
glukóza (mmol/l)	5,40 [4,90-5,90]	6,43 [5,31-8,04]	0,0001+
inzulín (mU/l)	11,3 [7,3-17,6]	12,6 [7,8-29,5]	0,0140+
HOMA-IR index	2,8 [1,6-4,4]	4,1 [1,9-9,9]	0,0001+
apo AI (g/l)	1,49 ± 0,32	1,36 ± 0,64	0,0381
apo B (g/l)	1,13 ± 0,26	0,94 ± 0,32	0,0027
apoB-48 (mg/l)	8 [4-13]	40 [29-54]	0,0001+
Lp(a) (nmol/l)	34 [14-93]	35 [12-73]	0,1161+
SAA (mg/ml)	26,0 ± 14,4	56,1 ± 41,6	0,0001
hs-CRP (mg/l)	3,71 ± 3,46	7,54 ± 5,08	0,0001

Data jsou ve formátu průměr ± SD nebo medián [Q1-Q3]. Zkratky – DM diabetes mellitus, TC – celkový cholesterol, HOMA index = $\text{inzulín(mU/l)} \cdot \text{glukóza(mmol/l)} / 22,5$; eGFR – odhad glomerulární filtrace (ml/s/1,73 m^2) = $186,3 \cdot [\text{kreatinin v séru (mmol/l)} / 88,4]^{-1,154} \cdot \text{věk}^{-0,203} \cdot 1/60 \cdot f$, $f = 1$ pro muže a $f = 0,742$; + - proměnné transformovány pro výpočet statistické signifikance; * - hodnoty získané gelovou elektroforézou, ^a- χ^2 test s Yatesovou korekcí

Změny v necholesterolových sterolech plazmy

Skupina dialyzovaných pacientů měla zvýšené hodnoty parametrů absorpce cholesterolu (tabulka 2), hlavně kampesterolu, přičemž u hodnot vztahených na celkovou koncentraci cholesterolu byly významně vyšší jak hodnoty podílu kampesterol/celkový cholesterol, tak i β -sitosterol/celkový cholesterol. Rozdíly v koncentracích lathosterolu, popřípadě poměru lathosterol/celkový cholesterol, nedosáhly statistické významnosti.

Tabulka 2. Koncentrace necholesterolových sterolů plazmy

	nonHV-HFD (n = 68)	HV-HFD (n = 68)	ANCOVA na BMI
lathosterol (μmol/l)	6,79 ± 4,57	6,77 ± 3,91	0,6967
kampesterol (μmol/l)	9,20 ± 3,83	11,60 ± 5,93	0,0154
β-sitosterol (μmol/l)	6,93 ± 3,06	7,85 ± 3,87	0,2293
lathosterol/TC (μmol/mmol)	1,27 ± 0,66	1,50 ± 0,90	0,1932
kampesterol/TC (μmol/mmol)	1,86 ± 0,87	2,53 ± 1,23	0,0012
β-sitosterol/TC (μmol/mmol)	1,40 ± 0,69	1,72 ± 0,82	0,0412

Data jsou ve formátu průměr ± SD. TC – celkový cholesterol.

Zastoupení mastných kyselin v lipidových třídách plazmy

Profil mastných kyselin (FA) byl stanoven ve třech majoritních lipidových třídách plazmy – fosfolipidech (PL), triacylglycerolech (TAG) a esterech cholesterolu (CE). Zastoupení nasycených mastných kyselin (SFA) bylo ve skupině HV-HDF zvýšené ve všech třídách (v TAG a CE statisticky významně), hlavně díky vyššímu podílu kyseliny palmitové (PA, 16:0), které převážilo snížené zastoupení stearové kyseliny (SA, 18:0).

Mononenasyčené mastné kyseliny (MFA) byly u skupiny HV-HDF zastoupeny méně pouze v TAG plazmy, v jiných třídách jsme v sumě MFA změny nepozorovali. Podíl majoritní MFA, kyselina olejová (OA, 18:1n-9), byl v TAG i CE snížen, z minoritních MFA jsme ve skupině HV-HDF zaznamenali zvýšený podíl kyseliny vakcenové (VA, 18:1n-7), kyseliny palmitolejové (POA, 16:1n-7) i kyseliny hypogeoové (16:1n-9) ve fosfolipidech a CE.

Vícenenasyčené mastné kyseliny byly obecně zastoupeny v lipidových třídách u skupiny HV-HDF méně v případě třídy PUFAn-6, a u PUFAn-3 jsme zaznamenali vyšší podíl. Tyto změny byly způsobeny hlavně snížením zastoupení kyseliny linolové (LA, 18:2n-6) a kyseliny dihomog-γ-linolenové (DHGLA, 20:3n-6) u dialyzovaných jedinců a vyšším zastoupením kyseliny eikosapentaenové (EPA, 20:5n-3) i dokosaheptaenové (DHA, 22:6n-3). Zastoupení kyseliny arachidonové (AA, 20:4n-6) i bylo naproti tomu ve skupině HV-HDF zvýšené.

Diskuse

Pacienti v hemodialyzačním programu měli snížené hladiny celkového cholesterolu, způsobené nižšími hladinami HDL- a VLDL-cholesterolu, spojených s vyššími hladinami TAG. V obou sledovaných skupinách převažovali jedinci s dyslipidemií (v kontrolní skupině zcela, v HV-HDF pouze 4 jedinci neměli dyslipidémii ($p = 0,127$, χ^2 test s Yatesovou korekcí). Snížení hladin v cholesterolu u skupiny HV-HDF v částicích VLDL může souviset s přesunem cholesterolu směrem k částicím IDL a LDL pozorovaným v naší předchozí studii (Dušejovská 2017). Pozorované zvýšení koncentrací markerů absorpce cholesterolu by mohlo být vysvětleno několika mechanismy: (1) reakcí na sníženou biosyntézu cholesterolu (van Himbergen 2009); (2) zhoršenou clearancí částic VLDL, IDL a chylomikronů (Vaziri 2006), které také obsahují markery absorpce cholesterolu. Fytosteroly i intermediární metabolity syntézy cholesterolu jsou ale většinou transportovány v částicích LDL (Miettinen 2003); (3) další mechanismus zvýšené absorpce cholesterolu u ESRD souvisí s možnou up-regulací proteinu NPCL1, transportní molekuly zodpovědné za přenos sterolových molekul z lumen střeva do enterocytů, následkem potlačení exprese PPAR α během urémie (Mori 2007). PPAR α je známý supresor NPC1L1, či up-regulací NPC1L1 v důsledku inzulinové rezistence spolu s down-regulací transportéru ABCG5/G8 (de Vogel van den Bosch 2008; Arca 2015).

Tabulka 3. Zastoupení mastných kyselin v lipidových třídách

FA	fosfolipidy		triacylglyceroly		estery cholesterolu	
	nonHV-HFD	HV-HFD	nonHV-HFD	HV-HFD	nonHV-HFD	HV-HFD
14:0*	0,21 ± 0,09	0,30 ± 0,09+++	1,35 ± 0,60	2,65 ± 0,79+++	0,35 ± 0,26	0,96 ± 0,24+++
16:0	31,12 ± 3,87	33,23 ± 2,25++	27,09 ± 4,20	27,57 ± 2,80	10,42 ± 2,02	14,47 ± 1,19+++
16:1n-9	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,05	0,86 ± 0,22	0,83 ± 0,17	0,47 ± 0,17	0,63 ± 0,19+++
16:1n-7	0,57 ± 0,19	0,62 ± 0,38	3,54 ± 0,81	3,85 ± 1,46	2,73 ± 1,27	3,55 ± 1,82++
18:0	14,95 ± 1,62	13,43 ± 1,30+++	3,91 ± 0,82	3,20 ± 0,56+++	1,09 ± 0,34	0,82 ± 0,32+++
18:1n-9	10,97 ± 1,13	11,13 ± 1,74	40,52 ± 3,07	38,80 ± 3,08+++	21,85 ± 2,38	20,15 ± 2,11+++
18:1n-7	1,55 ± 0,17	1,81 ± 0,36+++	2,53 ± 0,35	2,45 ± 0,42	1,33 ± 0,17	1,41 ± 0,24
18:2n-6	22,11 ± 2,65	19,40 ± 2,87+++	15,46 ± 3,20	15,03 ± 3,35	53,89 ± 4,76	46,90 ± 4,57+++
18:3n-6	0,10 ± 0,04	0,08 ± 0,03+++	0,31 ± 0,13	0,35 ± 0,15	0,89 ± 0,35	0,85 ± 0,34
18:3n-3	0,22 ± 0,09	0,21 ± 0,07	0,89 ± 0,34	1,31 ± 0,49+++	0,65 ± 0,22	0,70 ± 0,16
20:2n-6	0,44 ± 0,15	0,52 ± 0,23+	0,32 ± 0,11	0,16 ± 0,04+++	0,13 ± 0,22	0,10 ± 0,04
20:3n-6	2,95 ± 0,76	2,62 ± 0,57	0,36 ± 0,16	0,25 ± 0,07+++	0,74 ± 0,17	0,64 ± 0,12++
20:4n-6	10,12 ± 2,79	10,99 ± 2,22++	1,47 ± 0,72	1,35 ± 0,34	4,77 ± 1,65	7,01 ± 1,48+++
20:5n-3	1,09 ± 0,51	1,12 ± 0,67	0,20 ± 0,12	0,27 ± 0,25+	0,34 ± 0,23	0,76 ± 0,39+++
22:5n-6	0,14 ± 0,07	0,20 ± 0,07+++	0,07 ± 0,06	0,09 ± 0,04	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,02+
22:5n-3	0,61 ± 0,32	0,96 ± 0,30+++	0,18 ± 0,10	0,32 ± 0,15+++	0,03 ± 0,04	0,08 ± 0,04+++
22:6n-3	2,28 ± 1,26	2,67 ± 0,91++	0,35 ± 0,24	0,40 ± 0,38	0,10 ± 0,07	0,28 ± 0,11+++
Σsatur	46,35 ± 3,43	47,01 ± 1,86	32,48 ± 4,95	33,93 ± 3,38++	11,92 ± 2,40	16,33 ± 1,38+++
Σmono	13,37 ± 1,23	13,89 ± 2,34	47,79 ± 3,18	46,37 ± 3,69++	26,50 ± 3,51	26,27 ± 4,03
Σn-6	36,08 ± 2,93	34,13 ± 2,89++	18,10 ± 3,53	17,39 ± 3,44	60,46 ± 5,28	55,58 ± 4,38+++
Σn-3	4,20 ± 1,88	4,96 ± 1,60++	1,63 ± 0,53	2,30 ± 1,05+++	1,12 ± 0,35	1,82 ± 0,54+++
D9D16	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,26 ± 0,09	0,25 ± 0,13
D9D18	0,74 ± 0,11	0,84 ± 0,18+	10,8 ± 2,4	12,5 ± 2,4+	21,5 ± 5,7	27,3 ± 8,7++
D6D	0,005 ± 0,002	0,004 ± 0,002	0,021 ± 0,009	0,024 ± 0,011	0,017 ± 0,007	0,019 ± 0,010
D5D	3,50 ± 0,79	4,36 ± 1,15++	4,19 ± 1,20	5,59 ± 1,34++	6,5 ± 2,0	11,4 ± 3,3++

Data (molární procenta) jsou ve formátu průměr ± SD. Symboly a zkratky: * -zkrácená notace pro mastné kyseliny: počet uhlíkových atomů: počet dvojných vazeb, n – pozice uhlíku nesoucí první dvojnou vazbu od methylového konce; Σ – suma, satur – nasycené mastné kyseliny, mono – mononenasycené mastné kyseliny, Σn-6 – polynenasycené mastné kyseliny třídy n-6, Σn-3 – polynenasycené mastné kyseliny třídy n-3, D – desaturáza, signifikantní rozdíl (ANCOVA adjustováno na BMI) od kontrolní skupiny: + - p<0,05; ++ - p<0,01; +++ - p<0,001

Předchozí studie se často zaměřily na hemodialyzované pacienty, kteří nebyli léčeni statiny ani ezetimibem, a tedy neměli vyšší koncentrace cholesterolu. Ezetimib inhibuje nejen absorpci cholesterolu, ale i oxidovaných derivátů sterolů, které mohou mít aterogenní účinky (Plat 2014). Podle našich informací zatím žádná studie nevalidovala plazmatické koncentrace lathosterolu a fytosterolů jako indikátorů biosyntézy (resp. absorpce) cholesterolu a je možné, že u těchto pacientů budou jiné markery odrážet úroveň homeostázy cholesterolu přesněji. Například je známo, že restrikce energie a příjmu fytosterolů (a cholesterolu) u obézních pacientů s DM2T vede ke zhoršenému obrátu fytosterolů (cholestanol je jako marker absorpce zvýšen, ale kampesterol a β-sitosterol jsou sníženy) spojenému s jejich mobilizací z tukové tkáně (Simonen 2002). V naší studii nebyl stanovován cholestanol a tak nelze rozhodnout

mezi mechanismy snížení absorpce a/nebo mobilizace fytoosterolů z tukové tkáně.

Je také možné, že u osob v hemodialyzačním programu, který navíc netrval u všech osob stejnou dobu, nebyla ustanovena homeostáza cholesterolu, nebo se do vztahu absorpce – biosyntéza cholesterolu promítá ještě další efekt, například akumulace sterolů v tukové tkáni (Tilvis 1979). Tuková tkáň u pacientů s CKD obsahuje více malých adipocytů a vykazuje charakteristiky zánětlivého fenotypu (Gertow 2017).

Koncentrace LDL-C jsou pacientů s ESRD poměrně nízké (Fellström 2009, Baigent 2011, Wanner 2005) a na pokles LDL-C má vliv snižování tělesné hmotnosti (Dattilo 1992), systémový zánět a malnutrice (Liu 2004). U naší skupiny hemodialyzovaných pacientů byly významně zvýšeny koncentrace hs-CRP i SAA, významných prediktorů mortality u hemodialyzovaných pacientů (Simic-Ogrizovic 2009).

Koncentrace lathosterolu nebyly ve skupině HV-HDF odlišné. Byla tedy zachována úroveň biosyntézy cholesterolu. Některé dřívější studie dokonce naznačovaly vyšší hladinu biosyntézy cholesterolu (Scoppola 1997), jako marker biosyntézy byl ovšem analyzován mevalonát, opačný výsledek byl prezentován v práci jiných autorů. (Sutherland 1995) bez analýz fytoosterolů.

Profily mastných kyselin u ESRD jsou v literatuře často porovnávány se zdravou populací, menší množství prací se věnuje srovnání profilů mastných kyselin se skupinami jako DM (Sertoglu 2014), V naší práci jsme porovnávali molární zastoupení mastných kyselin v jednotlivých lipidových třídách plazmy. Nejvíce změn jsme našli u CE; diacylglyceroly a CE byly v práci Afshinnia a kol. (Afshinnia 2016) identifikovány jako lipidové třídy s největší predikční schopností pro progresi pacientů s CKD do ESRD.

Zastoupení EPA i DHA bylo u hemodialyzovaných pacientů vyšší nebo stejné ve všech analyzovaných lipidových třídách než u skupiny nonHV-HDF, což je v soulase s výsledky jiných studií (Sertoglu 2014, Shoji 2013), které měřily celkové koncentrace těchto mastných kyselin v plazmě nebo séru. Snížené zastoupení PUFA řady n-6 u skupiny HV-HDF, způsobené hlavně poklesem podílu LA, bylo pozorováno při porovnání dialyzovaných jedinců s diabetiky (Sertoglu 2014); zdraví jedinci mají ale proti hemodialyzovaným pacientům nižší koncentrace AA (Shoji 2013). Snížené zastoupení LA by mohlo být důsledkem vyššího oxidačního stresu, zvýšené metabolizace LA na AA nebo nižšího dietního příjmu, či zvýšenou syntézou prostanoidů.

Parametry sacharidového metabolismu byly i přes stejné zastoupení DM 2 typu v obou skupinách odlišné, vyšší hodnoty indexu HOMA-IR naznačují inzulínovou rezistenci u HV-HDF skupiny. Zvýšené zastoupení satureovaných mastných kyselin je typické jak pro pacienty s inzulínovou rezistencí (Vessby 2002), tak i ESRD (Lennon 2009) a bylo pozorováno i v naší studii ve skupině HV-HDF. Nejvýrazněji bylo zvýšeno zastoupení kyseliny palmitové (16:0), jež zabraňuje v podocytech a inzulín senzitivních buňkách vychytávání glukózy (Lennon 2009). Podíl další nasycené mastné kyseliny, stearové (18:0), byl naopak u HV-HDF skupiny snížen ve srovnání s nedialyzovanými pacienty ve všech lipidových třídách.

Zvýšené zastoupení mononenasycených mastných kyselin (MUFA) bylo u dialyzovaných pacientů popsáno v erytrocytárních membránách (Koorts 2002), jinak spíše beze změn, větší vliv na koncentrace MUFA má přítomnost inzulínové rezistence (Vessby 2002) než ESRD (Sertoglu 2014). U našich dialyzovaných pacientů byla suma MUFA snížena pouze v triacylglycerolech díky poklesu zastoupení kyseliny olejové (18:1n-9). Aktivita delta 9 desaturázy (D9D), vypočítaná jako poměr 18:1n-9/18:0, byla vyšší u HV-HDF skupiny ve všech třídách, zřejmě díky tomu, že u MUFA se více projevuje vliv IR, který tuto aktivitu zvyšuje (Vessby 2002). U stavů s IR, jako je obezita, DM2T, MS a chronická pankreatitida, je popisována zvýšená aktivita D6D spolu s poklesem D5D (Kröger

2012, Žák 2014, Zeman 2016). U osob s ESRD přes známky IR jsme našli zvýšení aktivity D5D, podobně jako u karcinomu pankreatu (Macášek 2012).

Závěr

Selhání ledvin ve spojení s hemodialyzačním procesem vyvolává změny v metabolismu cholesterolu i fytoosterolů, na kterých se podílí zvýšená absorpce cholesterolu a změněný metabolismus lipoproteinů. Změny v zastoupení mastných kyselin ukazují na kombinovaný vliv renální insuficience a přidružených onemocnění, hlavně inzulínové rezistence.

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

Literatura

Afshinnia F., Rajendiran TM., Karnovsky A., et al.: Lipidomic signature of progression of chronic kidney disease in the chronic renal insufficiency cohort. *Kidney Int Rep* 2016; 1: 256-268.

Arca M.: Alterations of intestinal lipoprotein metabolism in diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Atherosclerosis Suppl* 2015; 17C: 12-16.

Baggio B., Musaachio E., Priante G.: Polyunsaturated fatty acids and renal fibrosis: pathophysiologic link and potential clinical implications. *J Nephrol* 2005; 18: 362-367.

Baigent C., Landray MJ., Reith C., et al.: The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2011; 377: 2181-2192.

Daumerie CM., Woollett LA., Dietschy JM.: Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10797-10801.

Dušejovská M., Staňková B., Vecka M., et al.: Lipid metabolism in patients with end-stage renal disease: a five year follow-up study. *Curr Vasc Pharmacol* 2017 (*v tisku*); doi: 10.2174/1570161115666170530104143.

Fellström BC., Jardine AG., Schmieider RE., et al.: Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2009; 360: 1395-1407.

Fukushima M., Miura S., Mitsutake R., et al.: Cholesterol metabolism in patients with hemodialysis in the presence or absence of coronary artery disease. *Circ J* 2012; 76: 1980-1986.

Gertow J., Ng CZ., Brance RMM., et al.: Proteomic analysis reveals an altered protein composition of subcutaneous adipose tissue in patients with chronic kidney disease. *Transl Res* 2017 (*v tisku*); doi: 10.1016/j.ekir.2017.07.007

Igel-Korcagova A., Raab P., Brensing KA., et al.: Cholesterol metabolism in patients with chronic renal failure on hemodialysis. *J Nephrol* 2003; 16: 850-854.

Imamura S., Morioka T., Yamazaki Y., et al.: Plasma polyunsaturated fatty acid profile and delta-5 desaturase activity are altered in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2014; 63: 1432-1438.

Koorts AM., Viljoen M., Kruger MC.: Red blood cell fatty acid profile chronic renal failure patients receiving maintenance hemodialysis treatment. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 67: 13-18.

Kröger J., Schulze MB.: Recent insight into the relation of $\Delta 5$ desaturase and $\Delta 6$ desaturase activity to the development of type 2 diabetes. *Curr Opin Lipidol* 2012; 23: 4-10.

Lauretani F., Semba RD., Bandinell S., et al.: Plasma polyunsaturated fatty acids and the decline of renal function. *Clin Chem* 2008; 54: 475-481.

Lennon R., Pons D., Mathew AS., et al.: Saturated fatty acids induce insulin resistance in human podocytes: implications for diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3288-3296.

Liu Y., Coresh J., Eustace JA., et al.: Association between cholesterol level and mortality in dialysis patients: Role of inflammation and malnutrition. *JAMA* 2004; 291: 451-459.

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

- Miettinen TA., Gylling H.:** Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 976–982.
- Plat J., Theuwissen E., Husche C., et al.:** Oxidised plant sterols as well oxysterol increase the proportion of severe atherosclerotic lesions in female LDL receptor *+/+* mice. *Br J Nutr* 2014; 111: 64-70.
- Rogacev KS., Pinsdorf T., Weingärtner O., et al.:** Cholesterol synthesis, cholesterol absorption, and mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 943-948.
- Sertoglu E., Kurt I., Tapan S.:** comparison of plasma and erythrocyte membrane fatty acid compositions in patients with end-stage renal disease and type 2 diabetes mellitus. *Chem Phys Lipids* 2014; 178: 11-17.
- Shoji T., Kakiya R., Hayashi T., et al.:** Serum n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid profile as an independent predictor of cardiovascular events in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2013; 62: 568-576.
- Shoji T.:** Current focuses in serum lipid abnormalities in dialysis patients. *Blood Purif* 2015; 40: 326-331.
- Simic-Ogrizovic S., Dopsaj V., Bogavac-Stanojevic N., et al.:** Serum amyloid A rather than C-reactive protein is a better predictor of mortality in hemodialysis patients. *Tohoku J Exp Med* 2009; 219: 121-127.
- Simonen PP., Gylling HK., Miettinen TA.:** Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless to obesity. *Diabetes Care* 2002; 25: 1511-1515.
- Sutherland WH., Walker RJ., Ball MJ., et al.:** Cholesterol precursor concentration in plasma from patients with chronic renal failure or kidney grafts. *Clin Nephrol* 1995; 43: 392-398.
- Tilvis R., Miettinen TA.:** Effects of weight reduction on squalene, methyl sterols and cholesterol and on their synthesis in human adipose tissue. *Eur J Clin Invest* 1979; 9: 155-160.
- Tvrzická E., Mareš P., Písaříková A., et al.:** Simplified gas chromatographic method for the simultaneous determination of phytosterols and cholesterol. *J Chromatogr* 1991; 563: 188-192.
- Tvrzická E., Vecka M., Staňková B., et al.:** Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography–flame ionization detection: Quantitative aspects. *Anal Chim Acta* 2002; 465: 337-350.
- van Himbergen TM., Matthan NR., Resteghini NA., et al.:** Comparison of the effects of maximal dose atorvastatin and rosuvastatin therapy on cholesterol synthesis and absorption markers. *J Lipid Res* 2009; 50: 730-739.
- Vaziri ND.:** Dyslipidemia of chronic renal failure: The nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F262–F272.
- Vessby B., Gustafsson IB., Tengblat S., et al.:** Desaturation and elongation of fatty acids and insulin action. *Ann NY Acad Sci* 2002; 967: 183-195.
- de Vogel van den Bosch HM., Bunger M., de Groot PJ., et al.:** PPARalpha-mediated effects of dietary lipids on intestinal barrier gene expression. *BMC Genomics* 2008; 9: 231.
- Wanner C., Krane V., März W., et al.:** Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2005; 353(3): 238-248.
- Zeman M., Macásek J., Burda M., et al.:** Chronic pancreatitis and the composition of plasma phosphatidylcholine fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016; 108: 38–44
- Žák A., Burda M., Vecka M., et al.:** Fatty acid composition indicates two types of metabolic syndrome independent of clinical and laboratory parameters. *Physiol Res* 2014; 63(Suppl.3): S375-S385.

DIABETES MELLITUS 2. TYPU, OBEZITA A NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ**D. Vítková, M. Zeman, J. Macášek, T. Vařeka, A. Žák***Univerzita Karlova Praha, 1. lékařská fakulta, IV. interní klinika*

Alarmující vzestup incidence malignit, diabetes mellitus 2. typu a obezity v posledních desetiletích vedl ke zvýšenému zájmu nejen o problematiku těchto onemocnění, ale i o pochopení možných souvislostí. U diabetes mellitus 2. typu a řady onkologických onemocnění jsou známa některá společná rizika, podmíněná zejména současným životním stylem. Mechanismy vedoucí ke vzniku maligních nádorů u diabetiků nejsou zcela jasné, předpokládá se podíl dlouhodobé hyperinzulinémie, hyperglykémie, zvýšené hladiny inzulínu podobného růstového faktoru (*insulin-like growth factor-I, IGF-I*), dysfunkce tukové tkáně a chronického subklinického zánětu. Až 90 % diabetiků 2. Typu je obézních. Obezita je rizikovým faktorem pro vznik některých nádorů i nezávisle na přítomnosti diabetu. Z epidemiologických studií je patrné, že diabetes mellitus 2. typu je onemocnění spojené se zvýšeným výskytem některých solidních a hematologických nádorů. Jedná se o maligní nádory gastrointestinálního traktu, konkrétně jater, pankreatu a kolorekta, močového měchýře a ledvin, a některé typy non-hodgkinských lymfomů u obou pohlaví. U žen je pak zvýšen výskyt karcinomu prsu a endometria. Riziko karcinomu prostaty u mužů diabetiků je naopak o něco nižší ve srovnání s běžnou populací, zřejmě v důsledku nižších hladin testosteronu. Bylo také prokázáno, že diabetes je negativním prognostickým faktorem u pacientů s již existujícím nádorovým onemocněním. Diabetes mellitus zvyšuje mortalitu u maligních onemocnění, zejména v důsledku zhoršené tolerance protinádorové léčby včetně pooperačních komplikací (1).

Summary

The alarming rise in incidence of malignancies, type 2 diabetes mellitus and obesity in recent decades has led to increased interest in the understanding of possible contexts. For type 2 diabetes mellitus and a number of oncological diseases, some common risk factors have been identified, mainly related to the current lifestyle. Mechanisms leading to the development of malignant tumors in diabetics are not entirely clear; long-term hyperinsulinemia, hyperglycemia, elevated insulin-like growth factor-I (IGF-I), adipose tissue dysfunction and chronic subclinical inflammation are anticipated. Up to 90% of type 2 diabetics are obese. Obesity is a risk factor for some tumors, regardless of the presence of diabetes. Epidemiological studies have shown that type 2 diabetes mellitus is a disease associated with an increased incidence of some solid and hematological tumors. These are malignant tumors of the gastrointestinal tract, namely liver, pancreas and colorectal, bladder and kidney, and some types of non-Hodgkin's lymphomas in both sexes. In women, the incidence of breast and endometrial cancer is increased. The risk of prostate cancer in diabetic men is, on the contrary, slightly lower compared to the normal population, probably due to lower levels of testosterone. It has also been shown that diabetes is a negative prognostic factor in patients with pre-existing cancer. Diabetes mellitus increases mortality in malignant diseases, mainly due to impaired tolerance of anti-cancer therapy, including postoperative complications.

Epidemiologické údaje

Diabetes mellitus

Počet lidí s diabetem vzrostl celosvětově ze 108 milionů v roce 1980 na 422 milionů v roce 2014. Celosvětová prevalence diabetu u dospělých nad 18 let stoupla z 4,7 % v roce 1980 na 8,5 % v roce 2014. V roce 2015 bylo přibližně 1,6 milionu úmrtí způsobeno diabetem. WHO uvádí, že diabetes bude v roce 2030 sedmou hlavní příčinou úmrtí (2).

Počet diabetiků stoupá i v naší populaci. V roce 2010 se léčilo v ČR s tímto onemocněním více než 800 tisíc osob. To představovalo nárůst počtu registrovaných diabetiků o zhruba 20 tisíc osob v porovnání s rokem předchozím, od roku 1980 počet nemocných cukrovkou narostl 2,5krát. Pokud by počet diabetiků přibýval podobným tempem jako nyní (tj. zhruba 10 tisíc/rok), bude v roce 2035 postižen tímto onemocněním každý desátý občan ČR bez ohledu na věk.

Obezita

Počet obézních se celosvětově od roku 1980 více než zdvojnásobil. V roce 2014 mělo 1,9 miliardy dospělých starších 18 let nadváhu, z toho více než 600 milionů bylo obézních, resp. 39 % dospělých ve věku 18 let a starších mělo nadváhu a 13 % bylo obézních.

Alarmující je rychlý nárůst nadváhy a zejména obezity v naší republice. V roce 2000 mělo v ČR nadváhu nebo obezitu celkem 45 % populace, v roce 2013 již o 10 % více. Ještě více pozornosti si zasluhuje fakt, že za 13 let došlo k postupnému nárůstu podílu lidí s nadváhou pouze o desetinu, a to z 31 % na 34 %, podíl lidí s obezitou přitom vzrostl až o polovinu ze 14 % na 21 % populace (3).

Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou celosvětově jednou z hlavních příčin morbidity a mortality s přibližně 14 miliony nově diagnostikovaných případů v roce 2012 (4).

Malignity byly jako druhá nejčastější příčina úmrtí v roce 2015 odpovídá za 8,8 milionu úmrtí. Celosvětově je téměř 1 z 6 úmrtí způsobeno nádorovým onemocněním.

V ČR každoročně onemocní nádorem více než 77 tisíc lidí (data za rok 2010). V roce 2008 celkem žilo 418 887 osob, u kterých bylo v daném roce nebo dříve diagnostikováno onkologické onemocnění. Ročně zemře v ČR na nádorové onemocnění přes 27 tisíc lidí. V počtu onkologicky nemocných zaujímáme přední místa v Evropě, dlouhodobě obsazujeme 1. místo v četnosti výskytu rakoviny tlustého střeva (5).

Mechanismy spojující diabetes mellitus 2. typu, obezitu a nádorová onemocnění

V roce 1926 Warburg a kol. (6) zjistili, že nádorové buňky mají schopnost získat energii jak aerobní cestou, tak anaerobní glykolýzou s tvorbou kyseliny mléčné a to i za přítomnosti kyslíku (což je charakteristika známá jako Warburgův fenomén). V posledních letech se ukázalo, že změny absorpce glukózy a metabolismu nejsou jejich jedinou metabolickou odlišností. Přežití, proliferaci a šíření nádorových buněk ovlivňují nejen metabolické odchylky, ale i hormony, humorální a růstové faktory a parakrinní signály z jejich okolí. Interakce mezi metabolickým stavem jednotlivce a odlišnými charakteristikami nádorů jsou pravděpodobně základem pro souvislost mezi obezitou, cukrovkou a malignitami.

Abdominální obezita a diabetes typu 2 často souvisí s metabolickými abnormitami, které mohou přispět k progresi nádorů. Obezita je spojena se zánětem tukové tkáně se zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů a snížením koncentrace adipokinů, ovlivňujících inzulinovou senzitivitu v kosterním svalstvu, játrech a tukové tkáni. Tyto změny zvyšují inzulinovou rezistenci ve tkáních a vedou ke zvýšení produkce inzulínu beta buňkami pankreatu s následnou hyperinzulinémií. Inzulín zvyšuje jaterní syntézu inzulínu podobného růstového faktoru I (IGF-I), který je primárním mediátorem účinku růstového hormonu (GH). Jeho zvýšená hladina vede ke změnám v koncentraci proteinů vázajících IGF (IGFBPs) a

ke změnám lokální koncentrace biologicky dostupného IGF-I v jednotlivých tkáních. Stoupající hladina inzulínu nestačí kompenzovat inzulínovou rezistenci a dochází k hyperglykémii; někdy dojde k „vyčerpání“ pankreatických beta-buněk s následným poklesem sekrece inzulínu. Rezistence na inzulín je také spojena s abnormalitami lipidů, které jsou charakterizovány zvýšením hladin lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL) a triacylglycerolů, snížením obsahu cholesterolu v lipoproteinech s vysokou hustotou (HDL). Rezistence na inzulín vede ke snížení hepatální produkce globulinu vázajícího pohlavní hormony (SHBG) a ke zvýšení hladin volně cirkulujících hormonů (včetně estrogeneru a testosteronu). Růst hormonálně závislých nádorů může u obézních jedinců ovlivnit i zvýšená aktivita enzymu aromatázy s výslednou přeměnou androgenů na estrogeny. Tyto dva faktory zvyšují riziko vzniku hormonálně dependentních nádorů prsu a endometria (7). Podobná interakce byla pozorována mezi karcinomem endometria a okolní stromální tkání (8).

Tuková tkáň

Dlouhou dobu byla tuková tkáň považována pouze za pasivní orgán pro ukládání energetických zásob ve formě triacylglycerolů. Tuková tkáň však není složena pouze z adipocytů, ale j také z fibroblastů, endotelií a imunokompetentních buněk. Dnes je uznávána jako komplexní a vysoce aktivní metabolický a endokrinní orgán, vylučující do krevního oběhu vedle volných mastných kyselin (*free fatty acids*, FFA) celou řadu biologicky aktivních látek včetně adipokinů a cytokinů. Změny v koncentraci těchto látek mohou potenciálně přispívat k nádorovému růstu (9).

Adipocytokiny

Adipocyty v tukové tkáni syntetizují a secernují řadu molekul, které jsou souhrnně nazývány adipocytokiny nebo adipokiny. Hypertrofická tuková u obézních osob se od zdravé tukové tkáně liší spektrem produkovaných steroidních hormonů a adipocytokinů se z výšnou produkcí prozánětlivých molekul a přítomností chronického subklinického zánětu. Předpokládá se, že tyto změny se podílejí na zvýšeném riziku vzniku, progresu a metastazování maligních onemocnění u obézních jedinců (23). Výsledky současných studií ukázaly, že u experimentálních obézních zvířat dochází v adipocytech také k hypoxii, která aktivuje transkripční faktor HIF-1 (*hypoxia inducible factor-1*) s následnou aktivací buněčných mechanismů vedoucích k rozvoji inzulínové rezistence, k infiltraci tukové tkáně makrofágy, sekreci zánětlivých cytokinů (interleukin 1, IL-1, IL 6, TNF α), zvýšené tvorbě volných radikálů, k dysregulaci adiponektinu a leptinu a následnému poklesu hladin adiponektinu a vzestupu hladin leptinu. To má za následek mitochondriální dysfunkci, stres endoplasmatického retikula a zánik adipocytů (24). Všechny tyto změny, zejména stav chronického zánětu, charakterizovaný sekrecí IL-6, TNF- α and PAI-1, vytváří příznivé podmínky pro fenotypovou změnu nádorových buněk ve smyslu zvýšené invazivity a agresivity (25).

Leptin

Leptin je proteinový hormon (197 aminokyselin), který je produkován hlavně adipocyty. Hladiny leptinu pozitivně korelují s objemem tukové masy v organismu a inzulínemií. U obézních inzulínorezistentních osob i u diabetiků 2. typu jsou jeho koncentrace zvýšené, zatímco u malnutričních stavů snižené (10). Leptin účinkuje centrálně v hypothalamu, potlačuje chuť k jídlu a zvyšuje energetický výdej. Ovlivňuje také angiogenezi, imunitní funkce, fertilitu a formování kostí. Účinky leptinu jsou zprostředkovány aktivací leptinových receptorů. Tyto receptory jsou lokalizovány zejména v hypothalamu, v buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu, dále v játrech, ledvinách, plicích, v tlustém střevě,

v buňkách žaludečního fundu, v kosterních svalech, kostní dřeni a placentě (11,12). Sekrece leptinu z adipocytů je regulována zejména inzulinem, glukokortikoidy a katecholaminy (13). Leptin působí zejména na Ob-R receptory, jejichž převládající izoforma Ob-Rb je odpovědná za biologické účinky leptinu aktivací signální cesty JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*), s následnou stimulací fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K), která podporuje buněčný růst, migraci a invazivitu. Leptin moduluje i další signální cesty, např. ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinases 1 a 2*), expresi angiogenních faktorů (VEGF) a HIF-1a (*hypoxia inducible factor-1a*) a indukuje tvorbu zánětlivých cytokinů (TNF- α a IL-6) v makrofázích. Subklinický zánět u osob s inzulinovou rezistencí zvyšuje riziko onemocnění, spojených s obezitou, včetně nádorů (14). Dysregulace leptinové sekrece hraje roli v patogeneze řady nádorů, jako je karcinom prsu, štítné žlázy, gastrointestinální malignity, endometriální karcinom (15). Vysoká exprese ObR u nádorů prsu je spojena se špatnou prognózou, zvláště u pacientek se zvýšenými hladinami leptinu v oběhu (16); podobně je tomu tak i u některých gastrointestinálních nádorů.

Adiponektin

Adiponektin je proteinový hormon (244 aminokyselin), který je syntetizován v tukové tkáni. Jeho koncentrace negativně koreluje s obezitou a inzulinovou rezistencí, jsou sníženy u diabetes mellitus typu 2 (17). Adiponektin se váže na dva typy receptorů, AdipoR1 a AdipoR2. Vazba adiponektinu na tyto receptory vede k aktivaci AMP kinázy (AMPK), receptorů PPAR α (*peroxisome-proliferator activated receptor alpha*) a P38 MAP kinázy v játrech, kosterním svalu a endoteliálních buňkách (18). Zvyšuje se utilizace glukózy a transport glukózy do svalových, jaterních a tukových buněk. Adiponektin antagonizuje signalizaci leptinu a má protizánětlivé, antiapoptotické a antioxidantní účinky (19). Sérové hladiny adiponektinu negativně koreluje s rizikem karcinomu tlustého střeva, prostaty, prsu a endometria (20). Na druhou stranu vyšší koncentrace adiponektinu byly zaznamenány u karcinomu pankreatu (21) nebo non-hodgkinakého lymfomu (22). Proto otázka úlohy adiponektinu v onkogenezi zůstává kontroverzní.

Inzulín, hyperglykémie a inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1)

Inzulín, hyperglykémie a inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) významně ovlivňují kancerogenezi. Ve studiích *in vitro* bylo prokázáno, že na společné působení hyperglykémie a hyperinzulinémie vede k urychlenému růstu buněk nádorů tlustého střeva, prostaty, prsu i močového měchýře (26). Stimulace inzulinových receptorů v těchto tkáních vede ke zvýšené transkripci genů regulujících progresi buněčného dělení. Růst nádorů je také spojen s odchýlným metabolismem glukózy. Dlouho je známo, že hyperglykémie podporuje růst nádorů a hyperinzulinémie podporuje jejich metastazování. Hyperinzulinémie může také přispět k růstu a progresi nádoru prostřednictvím aktivace IR na nádorových buňkách (1). Nádorové buňky jsou charakterizovány změnami v metabolismu glukózy. Je pozorována zvýšená exprese transmembránových glukózových transportérů (27). V buňkách tkání, jako je kosterní sval nebo tuková tkáň, je glukóza absorbována v důsledku inzulinem zprostředkované translokace glukózového transportéru 4 (GLUT4) na plazmatickou membránu. Oproti tomu většina karcinomů exprimuje převážně glukózové transportéry GLUT1 a GLUT3 (31), které mají vysokou afinitu ke glukóze. Později objevený GLUT12 je exprimován u nádorů prsu a prostaty a tkáních citlivých na inzulin, včetně kostních svalů, srdce a tukové tkáně. GLUT12 hraje roli při vychytávání glukózy v nádorových buňkách odlišnou cestou od GLUT1 a GLUT3 (29). V nádorových buňkách je snížena mitochondriální respirace a zvýšená tvorba laktátu, které vedou k acidifikaci tumoru, zvýšené expresi aktivity H⁺ transportéru a ke zvýšené odolnosti vůči kyselému prostředí, na rozdíl od ostatních buněk, u kterých acidifikace vede k aktivaci kaspázového systému a k apoptóze (28). V důsledku

působení onkogenů, inzulínu a ztráty funkce nádorových supresorů je v nádorových buňkách změněna regulace enzymů ovlivňujících glykolýzu (hexokináza, fosfofruktokináza a pyruvátkináza). Zvýšení aerobní glykolýzy poskytuje prekuzory nezbytné pro syntézu nukleotidů, aminokyselin a lipidů a proliferaci rakovinných buněk (29).

Inzulín aktivuje nejen inzulínový receptor, ale také receptor pro inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-I), který vykazuje s IR 80% homologii, jeho aktivace má však větší mitogenní a transformační dopad. Většina nádorových buněk má zvýšené množství IR ve dvou izoformách A a B. Především vazba inzulínu na receptor IR-A (30), který v nádorových buňkách převažuje, vede k aktivaci růstu nádorové tkáně. Inzulínu podobný růstový faktor I (IGF-I) zprostředkuje působení růstového hormonu (GH) na buňky a tkáně a ve fetálním období a v dětství významně ovlivňuje vývoj organismu. U zvířecích modelů vysoké dávky exogenního IGF-1 zvyšují růst nádoru a metastáz. U dospělých lidí byla zjištěna významná souvislost vysoké hladiny IGF-1 se vznikem karcinomu prostaty, premenopauzálního karcinomu prsu a karcinomu tlustého střeva (32). Klinické studie zaměřené na IGF-IR však nebyly úspěšné. Důvody jejich selhání jsou četné. Za prvé, studie nebyly specificky zaměřené na osoby s nádory, které nadměrně exprimovaly IGF-IR. Kromě toho inhibice IGF-IR zvyšuje hladinu IGF-1 a aktivuje IR. Inhibice IGF-IR zvyšuje hladinu GH, které způsobují inzulínovou rezistenci a hyperinzulinemii.

Závěr

Je prokázáno, že jedinci s obezitou a diabetem typu 2 jsou vystaveni většímu riziku vzniku řady malignit i vyšší mortality na tato onemocnění. Řada metabolických abnormalit, které se u obezity a diabetes mellitus typu 2 vyskytují, je spojena s tímto zvýšeným rizikem. Jednotlivé faktory mohou mít různý význam v patogenezi různých typů nádorů. Přesné mechanismy působení metabolických abnormalit dosud nejsou známy a jsou předmětem intenzivního výzkumu, zejména s cílem najít markery časných stadií nádorů, případně nové terapeutické cíle.

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

Literatura

- 1. Gallagher EJ., LeRoith D.:** Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality. *Physiol Rev* 2015; 95: 727-748.
- 2. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR,** 2015.
- 3. STEM/MARK,** 2013. <http://www.stemmark.cz/tag/mediaprojekt/>
- 4. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., et al.:** Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: E359-386.
- 5. Statistika ÚZIS a software SVOD**
- 6. Warburg O.:** On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; 124: 269-270.
- 7. Howe LR., Subbaramaiah K., Hudis CA., Dannenberg AJ.:** Molecular pathways: adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 6074-6083.
- 8. Matsumoto M., Yamaguchi Y., Seino Y., et al.:** Estrogen signaling ability in human endometrial cancer through the cancer-stromal interaction. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 451-463.
- 9. Kershaw EE., Flier JS.:** Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 2548-2556.

10. **Kelesidis T., Kelesidis I., Chou S., Mantzoros ChS.:** Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Ann Intern Med* 2010; 152: 93-100.
11. **Margetic S., Gazzola C., Pegg GG., Hill RA.:** Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 1407–1433.
12. **Meier U., Gressner AM.:** Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Chemical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. *Clin Chem* 2004; 50: 1511-1525.
13. **Leroy P., Dessolin S., Villageois P., et al.:** Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem.* 1996;271:2365-2368.
14. **Iikuni N., Lam QL., Lu L., et al.:** Leptin and Inflammation. *Curr Immunol Rev* 2008; 4: 70-79.
15. **Garofalo C., Surmacz E.:** Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 2006; 207: 12-22.
16. **Surmacz E.:** Leptin and adiponectin: emerging therapeutic targets in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2013; 18: 321-332.
17. **Weyer C., Funahashi T., Tanaka S., et al.:** Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1930-1935.
18. **Kadowaki T., Yamauchi T.:** Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26: 439-451.
19. **Hui X., Lam KS., Vanhoutte PM., Xu A.:** Adiponectin and cardiovascular health: an update. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 574–590.
20. **Barb D., Williams CJ., Neuwirth AK., Mantzoros CS.:** Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(suppl): 858S-866S.
21. **Krechler T., Zeman M., Vecka M., et al.:** Leptin and adiponectin in pancreatic cancer: connection with diabetes mellitus *Neoplasma* 2011; 58: 58-64.
22. **Mitri J., Castillo J., Pittas AG.:** Diabetes and risk of Non-Hodgkin s lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Diabetes Care* 2008; 31: 2391-2397.
23. **Nieman KM., Romero IL., Van Houten B., Lengyel E.:** Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831: 1533-1541.
24. **Divella R., De Luca R., Abbate I., et al.:** Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipocyte-cytokines-induced chronic inflammation. *J Cancer* 2016; 7: 2346-2359.
25. **Zhang Y, Nowicka A, Solley TN, et al.** Stromal Cells Derived from Visceral and Obese Adipose Tissue Promote Growth of Ovarian Cancers. *PLoS One* 2015; 10: e0136361
26. **Masur K., Vetter C., Hinz A., et al.:** Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptom and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. *Br J Cancer* 2011; 104: 345-352.
27. **Hauptmann S., Grunewald V., Molls D., et al.:** Glucose transporter GLUT1 in colorectal adenocarcinoma cell lines is inversely correlated with tumour cell proliferation. *Anticancer Res* 2005; 25: 3431-3436.
28. **Thews O., Gassner B., Kelleher DK., et al.:** Impact of hypoxic and acidic extracellular conditions on cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Adv Exp Med Biol* 2007; 599: 155-161.
29. **Vander Heiden MG., Cantley LC., Thompson CB.:** Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029-1033.
30. **Wernoha SJ., Haluska P.:** IGF System in Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012; 41: 335-350.
31. **Macheda ML., Rogers S., Best JD.:** Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* 2005; 202: 654-662.
32. **Smith GD., Gunnell D., Holly J.:** Cancer and insulin-like growth factor-I. *BMJ* 2000; 321: 847-848.

PREVALENCE METABOLICKÝCH KOMPLIKACÍ U ČESKÝCH ADOLESCENTŮ**PREVALENCE OF METABOLIC COMPLICATIONS IN CZECH ADOLESCENTS****H. Zamrazilová¹, M. Kunešová¹, V. Hainer¹, I. Aldhoon-Hainerová^{1,2}**¹ *Centrum pro diagnostiku a léčbu obezity, Endokrinologický ústav, Praha*² *Klinika dětí a dorostu FNKV a 3. LF UK, Praha***Úvod**

Metabolickými důsledky obezity jsou ohroženi i dospívající obézní jedinci.

Cíl

Zjistit výskyt jednotlivých metabolických komplikací u obézních dospívajících.

Metoda

U 717 obézních jedinců (399 dívek: BMI 29,9 kg/m², z-BMI 2,6; 318 chlapců: BMI 30,3 kg/m², z-BMI 2,6) ve věku 13,0 - 17,9 let byl stanoven výskyt metabolického syndromu, abdominální obezity, hypertenze, porušené glukózové homeostázy, inzulinové rezistence, dyslipidémie, zvýšených jaterních enzymů a kyseliny močové.

Výsledky

Bylo zjištěno, že 14,5 % dívek a 29,9 % chlapců splňovalo kritéria metabolického syndromu a dále že 88,2 % dívek a 81,1 % chlapců vykazovalo abdominální obezitu. Jednorázové měření krevního tlaku ukázalo, že 8,7 % dívek a 17,8 % chlapců mělo hypertenzi. Porušená glykémie nalačno byla zaznamenána u 6,3 % dívek a 10,1 % chlapců, nicméně cukrovka 2. typu byla identifikována pouze u 0,5 % dívek a 0,3 % chlapců. Přítomnost inzulinové rezistence byla potvrzena u 30,2 % dívek a 44,4 % chlapců. U českých obézních adolescentů byly zaznamenány tyto poruchy lipidového spektra: nízký HDL-cholesterol (14,0 % dívek, 34,2 % chlapců), zvýšené triacylglyceroly (22,1 % dívek, 33,9 % chlapců), zvýšený celkový cholesterol (14,0 % dívek, 11,4 % chlapců) a zvýšený LDL-cholesterol (13,5 % dívek, 10,1 % chlapců). Zvýšená aktivita alaninaminotransferázy byla prokázána u 8,6 % dívek a 17,3 % chlapců. Polovina obézních dospívajících měla zvýšenou hladinu kyseliny močové.

Závěr

Výsledky ukázaly, že u obézních se vyskytuje řada metabolických komplikací již v adolescenci.

Podpořeno grantem AZV ČR 17-31670A

LIPIDOVÉ BIOMARKERY NEUROPSYCHIATRICKÝCH ONEMOCNĚNÍ**LIPID BIOMARKERS IN NEUROPSYCHIATRIC DISEASES**

M. Zeman¹, M. Vecka¹, R. Jiráček², J. Macáček¹, T. Vařeka¹, Š. Coubalová¹, D. Vítková¹, A. Žák¹

Univerzita Karlova v Praze, ¹IV. interní klinika I. LF UK, ²Psychiatrická klinika I. LF UK

Abstract

The depressive disorder (DD) is thought to become the second most important cause of disability in 2020 and affective disorders are on the fourth place in complete invalidity causes in the Czech Republic (CR). The incidence of Alzheimer's disease (AD) increases steadily with age even in the CR. In the pathogenesis of AD and DD, the metabolism of fatty acids and sterol lipids, is changed, and these changes are connected with insulin resistance, oxidative stress and inflammatory processes. Response to antidepressant treatment is unpredictable, the percentage of treatment resistant depression being up to 30% depending on the criteria. So, the risk factors (biochemical, personality, etc.) are now being searched for, which could predict success of the treatment modality. In the case of AD, nowadays, there are no disease-modifying therapies, due to the impossibility to detect the disease before the stage characterized with memory loss and functional decline. Current methods to diagnose preclinical stage of the disease are either invasive, time-consuming or expensive. Blood based biomarkers could identify the individuals at risk of the AD developing. Lipid metabolism has been implicated in the pathogenesis of both DD and AD. Accordingly, a short overview of blood lipidomic studies (e.g. liquid chromatography-mass spectrometry, direct infusion mass spectrometry) aiming to identify both early AD stages and DD subtypes, is presented.

Úvod

Epidemiologické údaje ukazují, že v rozvinutých zemích stále stoupá zátěž populace chorobami jako jsou diabetes mellitus typu 2 či deprese nebo Alzheimerova demence. Tato onemocnění významně přispívají ke zhoršování kvality života, vyjádřené jako počet let života, které byly ztraceny v důsledku disability a předčasné mortality (DALY – disability adjusted life years) (GBD 2015). Depresivní porucha bude zřejmě v roce 2020 druhou nejčastější příčinou invalidity v rozvinutých zemích (Bogavac-Stanojevic 2016) a afektivní poruchy jako celek jsou na čtvrtém místě příčin plné invalidity v České republice. Depresivní porucha je spojena se zvýšeným rizikem rozvoje diabetes mellitus 2. typu (Mezuk 2008) a zvýšené kardiovaskulární i celkové mortality (Wulsin 1999). Léčba těchto onemocnění a jejich komplikací je nákladná, stejně jako péče o nemocné s demencí, jejíž nejčastější příčinou je Alzheimerova nemoc (AD). V České republice (ČR) výskyt AD stabilně vzrůstá s věkem (postižených je 15 – 25 % osob s věkem nad 75 let a 25 – 30 % osob starších 85 let). V ČR počet nemocných s AD převyšuje 130 000 (Mátl 2015). Velká většina těchto osob je postižena pozdní (sporadická) forma, (late-onset Alzheimer's disease, LOAD), která se manifestuje po 65. roce věku. Rozvoj LOAD je spojen s působením některých rizikových faktorů, především s věkem, dále např. obezita, vysoký příjem kalorií a nasycených tuků ve stravě, kouření cigaret, hyperhomocysteinémie nebo deprese (Luchsinger a Mayeux 2004). I když tyto případy se nedědí mendelovským způsobem, je zde prokazována významná heritabilita (Avramopoulos 2009). AD je neurodegenerativní onemocnění, charakterizované progresivní atrofií neuronů zejména v mozkové kůře a v hippocampu, poklesem počtu synapsí a neuronální plasticity, přítomností extracelulárních deposit amyloidu a neurofibrilárních klubek. Je výrazně postižena episodická paměť a choroba postupně progreduje k úplné

demenci. Předpokládá se, že depozita amyloidu beta spouštějí patologické kaskády včetně neurodegenerativních změn působících atrofii mozkových struktur (např. hippocampu), jejíž stupeň koreluje s progresí do demence (Jack Jr 2011). Hlavním kritériem pro diagnózu Alzheimerovy choroby je přítomnost demence, přičemž je vyloučena jiná příčina demence (např. vaskulární demence, demence s Lewyho tělísky aj.). Ke stanovení diagnózy je možné užít biochemické vyšetření mozkomíšního moku (snížená hladina beta-amyloidu a zvýšená hladina tau-proteinu) a zobrazovací metody, zejména pozitronovou emisní tomografií (PET) a magnetickou rezonancí (MRI). Tato vyšetření jsou nákladná, časově náročná nebo invazivní. Kauzální léčba rozvinuté AD dosud není známa. Proto má velký význam snaha o včasné rozpoznání prodromální fáze AD, kde by léčebná intervence mohla ještě další rozvoj AD oddálit nebo zpomalit. Hledají se metody, jak včas diagnostikovat předchůdce rozvinuté AD, preklinické stadium AD, tzv. amnestickou formu mírné kognitivní poruchy (mild cognitive impairment, MCI) a případně jak odhadnout riziko konverze amnestické MCI (aMCI) v AD.

Depresivní porucha je heterogenní onemocnění, u kterého je popisováno několik subtypů podle přítomných příznaků, věku manifestace nebo klinického průběhu (Herbert 2016). Deprese se často objevuje u pacientů s AD a naopak, podle řady autorů je deprese spojena se zvýšeným rizikem vzniku kognitivní poruchy, zejména aMCI. (Panza 2010). Výsledky současných studií naznačují, že deprese je potenciálně preventabilní, a že by mohla být modifikovatelným rizikovým faktorem demence v pozdějším věku (Diniz 2013). V současné době však výsledky léčby deprese stále nejsou dobré. Odhaduje se, že kolem 30 % případů deprese je rezistentních na léčbu (De Sousa 2015), podle toho, jaká kritéria jsou použita (Strawbridge 2017). Skórovací systémy pro určení závažnosti symptomů deprese neumožňují snižovat subjektivitu hodnocení což dále zhoršuje potenciál pro komplexní analýzu a zavedení vhodného léčebného schématu (Mitchell 2009). Také se odhaduje, že až třetina pacientů není správně diagnostikována (Wittchen 2001).

Význam markerů neuropsychiatrických onemocnění

Ke zlepšení výsledků léčby jsou hledány rizikové faktory (např. osobnostní, genetické pozadí, atd.), které by mohly předpovědět úspěšnost léčby. Vzhledem k malé pravděpodobnosti, že jednotlivý marker má dostatečnou specificitu a senzitivitu pro klasifikaci konkrétní neuropsychiatrické poruchy, je dnes pozornost zaměřována na určení panelů biomarkerů, jejichž vyšetření by mohlo výrazněji přispět ke stanovení diagnózy (Schmidt 2011).

Obecně směry výzkumu vhodných biomarkerů vycházejí ze současných znalostí o patologických procesech, které se účastní v patogenezi neuropsychiatrických onemocnění, jako jsou oxidační stress, zánět, snížená neurogeneze, metabolické odchylky, jako inzulinová rezistence v CNS, dysregulace vícenenasycených mastných kyselin (PUFA), poruchy přeměny tryptofanu, mitochondriální dysfunkce a jiné (Strawbridge 2017, Parekh 2017, Perkovic 2017, Kodydková 2009). Všechny tyto aberace vedou k progresivním změnám v organizaci CNS ("neuroprogrese"), k jejímž klinickým korelátům patří manifestace klinických projevů onemocnění, jako je somatizace, deprese, psychotické příznaky, kognitivní poruchy vedoucí k demenci (Berk 2011). V současné době je věnována velká pozornost hledání potenciálních biomarkerů, schopných predikovat responsivitu pacientů na anti-depresivní nebo antipsychotickou léčbu (Strawbridge 2017, Uher 2014).

Pracovní skupina Národního institutu zdraví (The Biomarkers Definitions Working Group of the National Institutes of Health Group) definuje biomarker jako "charakteristika, která je objektivně měřitelná a slouží jako indikátor normálních biologických procesů, patogenních procesů a farmakologických odpovědí na terapeutickou intervenci" (Atkinson 2001). Biomarkery by měly mít vysokou senzitivitu a specificitu (> 80 %) v detekci příslušného

neuropsychiatrického onemocnění, aby byly užitečné pro klinickou praxi. Potenciálních biomarkerů je celá řada. Patří sem molekuly přímo nebo nepřímo spojené s růstovými faktory, neurotransmitery, oxidačním stresem, zánětem a dalšími charakteristikami patogeneze neuropsychiatrických onemocnění.

Předpokládá se, že biomedicínské markery bude možno využít zejména ve třech oblastech: stanovení diagnózy a prognózy onemocnění, léčba a sledování pacientů a možný vývoj nových léků. V psychiatrii a zejména v oblasti problematiky poruch nálady byla rozvinuta celá řada oblastí výzkumu, s cílem najít vhodné markery: genetické a molekulární faktory, kvantitativní elektroencefalografie (qEEG), zobrazovací metody, auditivní evokované potenciály závislé na hlasitosti (LDAEP, *loudness dependence of auditory evoked potentials*), Vedle prospěchu, spojeného s určením potenciálních cílů léčby může rozvoj biomarkerů přispět k identifikaci podskupin pacientů se specifickými vhodnými terapeutickými cíli.

Lipidové biomarkery. Podstatnou část hmoty mozku tvoří lipidy. Jde zejména o cholesterol, mastné kyseliny, zejména vícenenasycené (PUFA) a další lipidové frakce, jako glycerofosfolipidy, triglyceridy, glycerolipidy a sfingolipidy. Lipidy jsou nepostradatelné pro funkci neuronů, účastní se např. regulace membránové fluidity a permeability, tvorby vesikul a jejich transportu, buněčné integrity a neuroplasticity. Lipidy představují potenciální skupinu periferních biomarkerů, které by mohly být použity pro kvantitativně podloženou diagnózu, monitorování léčebné odpovědi a stratifikaci pacientů.

V nedávných létech došlo k rychlému technologickému rozvoji v analytické chemii, který výrazně rozšířil možnosti stanovení celé řady sloučenin, včetně různých typů lipidů. Užitím hmotové spektrometrie, napojené na vysoce efektivní systémy kapalinové chromatografie je možné izolovat a identifikovat velmi široké spektrum molekul jednotlivých lipidových tříd. Využití lipidomiky umožňuje porozumět pochodům lipidového metabolismu u významných onemocnění, jako jsou ateroskleróza, nádorová onemocnění, diabetes mellitus, a také neuropsychiatrická onemocnění, zejména deprese a Alzheimerova demence. Tento přehled je věnován problematice lipidových biomarkerů u deprese a Alzheimerovy choroby.

Lipidové biomarkery u Alzheimerovy demence

Lipidomické analýzy v mozcích nemocných s AD ukázaly na významné odchylky metabolismu lipidů. Chan et al. (2012) našli ve srovnání se stejně starými kontrolami zvýšení DAG a ceramidů v prefrontální kůře a zvýšení koncentrace lysobifosfatidové kyseliny, sfingomyelinu, gangliosidu GM3 a esterů cholesterolu v entorhinálním kortexu nemocných s AD, zatímco v cerebellu tyto změny nalezeny nebyly. Navíc zjistili v prefrontální kůře postižených osob významný pokles vícenenasycených fosfatidyletanolaminů (PE) 40:6, 38:6 a 38:4, povšechný pokles PUFA s dlouhým řetězcem ($\geq 40C$) s odpovídajícím podílem vzestupu mastných kyselin s krátkým řetězcem ($\leq 34C$), což odpovídá poklesu hladin PE nesoucích DHA v mozku nemocných s AD. Tyto nálezy ukazují nato, složení mastných kyselin, esterifikovaných v lipidech CNS zřejmě hrají významnou roli v patogenezi AD. Odlišnost změn lipidů v příslušných oblastech mozku osob s AD může souviset a různými stadii postižení těchto oblastí. V jedné starší práci byla oblast entorhinální kůry postižena dříve než neokortikální oblasti (Gómez-Isla et al. 1996). Změny v koncentracích různých lipidových tříd u AD byly nalezeny i v dalších studiích. V jedné práci 6 různých esterů cholesterolu s dlouhým řetězcem (CE 32:0, 34:0, 34:6, 32:4, 33:6, 40:4) bylo u AD sníženo a jejich koncentrace klesaly v pořadí (kontroly > MCI > AD) (Proitsi 2015). Již dříve byl popsán u malé skupiny pacientů s AD v mozkomíšním moku pokles celkových fosfatidylcholinů (PC) i pokles některých specifických tříd a současně pokles lysofosfatidylcholinu (LPC) a zvýšení hladiny produktů hydrolyzy PC, jako glycerofosfocholin a fosfocholin a autoři uzavřeli, že pro AD je charakteristická zvýšená

hydrolyza PC v mozku s následným zvýšením glycerofosfocholinu v mozkomíšni tekutině (Walter 2004). Nedávno byla publikována prospektivní studie, ve které ve skupině zdravých kontrol, u kterých později došlo ke konverzi na MCI/AD, byl na začátku sledování zjištěn pokles hladin 10 metabolitů, mezi kterými byly fosfatidylcholiny : diacyl PC 36:6, 38:0, 38:6, 40:1, 40:2, 40:6, PC acyl-alkyl 40:6, a LPC 18:2, a také acylkarnitiny (AC) propionyl AC (C3) a C16:1-OH (Mapstone 2014). Pokles tohoto panelu lipidových sloučenin spolehlivě předpovídal konverzi zdravých kontrol na MCI/AD během 2 – 3 letého intervalu s přesností 90 %). Předtím Whiley et al. (2014) identifikovali 3 molekuly PC, jejichž hladiny byly významně nižší u osob s AD ve srovnání s kontrolami PC 16:0/20:5, 16:0/22:6 a 18:0/22:6. Následná validační studie u 141 osob tento nález potvrdila. Podobné výsledky byly získány v dalších studiích, kde byl rovněž zjištěn pokles PC (38:4, 38:6 a 40:6) v periferní krvi nemocných s AD (Orešič 2011, Olazarán 2015). Vedle odchylek metabolismu PC je u nemocných s AD nalézána také dysregulace sfingolipidů, zejména pokles sfingomyelinů (SM) a vzestup ceramidů (Cer) v plasmě a sérech pacientů s AD. Zejména jde o frakce SM obsahující dlouhé (C 22 a C 24) řetězce (Han 2011), Současně jsou pozorovány u nemocných s AD zvýšení hladiny Cer (Han 2011, Mielke 2010), které jsou považovány za biomarkery časného stadia AD (Mielke 2012).

Lipidové biomarkery u deprese

Jako potenciální biomarkery byly u osob s depresivními poruchami zkoumány zejména cholesterol a jeho plasmatické frakce, vícenenasycené mastné kyseliny, ale i další lipidové sloučeniny, jako glycerofosfolipidy a sfingolipidy

Cholesterol plasmy a jeho frakce

Mezi lipidy, jejichž poruchy metabolismu, transportu a odlišné hladiny by mohly hrát roli v patogeneze deprese, patří cholesterol. Mozek obsahuje 20 % celkového cholesterolu lidského těla, přičemž 70 % se nachází v oligodendrocytech, tvořících myelin. Hladiny cholesterolu jsou úzce regulovány vzhledem k nutnosti dostatečného neurologického vývoje a funkce (Dietschy a Turley 2004). Cholesterol lokalizovaný v plasmatických membránách ovlivňuje jejich fluiditu s následným ovlivněním regulace membránově vázaných proteinů a iontových kanálů a synaptického přenosu. Cholesterol je nezbytný pro tvorbu synapsí, dendritů a axonální vodivost. Porucha kterékoliv této funkce vede k poruše neurotransmise a k poklesu synaptické plasticity. Některé práce zaznamenaly asociace mezi nízkou hladinou celkového cholesterolu a depresí (Jow et al. 2006, Olusi a Fido 1996). V mozcích nemocných s depresí byl snížený obsah cholesterolu spolu s poklesem synapsí (Beasley 2005). Některé studie zjistily vztahy mezi nízkou hladinou cholesterolu a sebevražednými pokusy (Fiedorowicz a Coryell 2007) i dokonanými sebevraždami (Ellison a Morrison 2001). Mechanismy spojení cholesterolu s afektivními poruchami a sebevražedným jednáním však dosud nejsou jasné. Ve velké finské prospektivní studii byla vyšší hladina cholesterolu pozitivně asociována se sebevraždami (Tanskanen et al. 2000). V jiné velké studii byla u depresivních nemocných zjištěna pozitivní asociace mezi cholesterolem, triglyceridy a hmotnostním indexem (BMI) se suicidálními pokusy (Brunner et al. 2006). V další studii nebyl zjištěn význam hladiny cholesterolu pro suicidální jednání u nemocných se schizofrenií, depresí i bipolární poruchou (Park et al. 2013). Některé studie zjistily vztah hladiny cholesterolu k odpovědi na léčbu antidepresivy. Např. Papakostas et al., 2003, 2004 zjistili u osob s hypercholesterolémií slabší odpověď na antidepresivní léčbu a větší tendenci k relapsům onemocnění. Pravděpodobně závisí i na typu deprese, jelikož v jedné prospektivní studii cholesterolémie nepředpovídala depresivní fáze u nemocných s unipolární depresí, zatímco nízký sérový cholesterol u nemocných s bipolární poruchou předpovídal manické fáze (Fiedorowicz et al. 2010). U nemocných s depresí jsou také nalézány snížené hladiny

HDL-cholesterolu a vysoký poměr celkového i LDL-cholesterolu k HDL-cholesterolu (Borgherini et al. 2002). U prvostupňových příbuzných depresivních pacientů byl nalezen významně nižší HDL-cholesterol ve srovnání s kontrolními osobami (Sobczak et al. 2004). Podle Maese et al. (1997) je nízký HDL-cholesterol markerem deprese a suicidálního chování u depresivních mužů, nízká hladina HDL-C je pravděpodobně souvisí s přítomností zánětlivého stavu u deprese a u depresivních jedinců dochází k poruše reverzního transportu cholesterolu. Vzhledem k stále trvajícím nejasnostem ve vztahu hladin cholesterolu a jeho plasmatických frakcí není možno cholesterol užívat jako biomarker deprese.

Vícenenasycené mastné kyseliny (PUFAs)

Asi 50 – 60 % sušiny mozku dospělého člověka tvoří lipidy. Z toho asi 35 % tvoří mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCPUFA) mezi kterými převažují kyselina arachidonová (AA, 20:4 n-6) a dokosahexaenová (DHA, 22:6 n-3). Samotná DHA představuje DHA asi 15 % –20 % tuku v lidském mozku a pokles jejího obsahu je vztažen k patogenezi deprese, v důsledku dysregulace zánětu, poklesu antioxidační kapacity a porušené neurotransmisi (Greenwood 2001). Ve frontální oblasti mozkové kůry lidí, zemřelých ve věku 25 – 45 let našli McNamara a Carlson 36 % nasycených mastných kyselin, kde byly zastoupeny téměř výlučně kyselina stearová (18:0) a palmitová (16:0). Podíl celkových omega-6 MK činil 17 % (převažovala AA) a podíl celkových omega-3 MK byl cca 14 % (prakticky pouze DHA, ostatní, tj. EPA, ALA a DPA představovaly méně než 1 %). Omega-9 mastné kyseliny byly zastoupeny 20 % (prakticky pouze kyselina olejová, 18:1 n-9 a omega-7 MK činily 8 % (McNamara a Carlson 2006). Kyselina arachidonová je obsažena ve všech tkáních, zatímco DHA převažuje v šedé hmotě mozku, v sítnici a testes. Obsah AA a DHA v mozku přibývá zejména v období největšího růstu mozku, cca 3 měsíce před porodem a krátce v postnatálním období (Wainwright 2000). Mechanismy působení PUFA v CNS jsou následující: (1) ovlivnění vlastností membrán neuronů a složek, v nich obsažených; (2) ovlivnění nitrobuněčné signalizace, genové exprese a transkripce; (3) modulace imunitních a zánětlivých pochodů; (4) ovlivnění neurogeneze; (5) ovlivnění neurotransmise, zejména serotoninové a dopaminové. Depresivní nemocní mají v séru i v různých tkáních včetně mozku nižší hladinu PUFA n-3 (Peet et al. 1998, Maes et al. 1998, McNamara et al. 2007), pravděpodobně jako důsledek zvýšeného oxidačního stresu. Koncentrace PUFA n-3 negativně korelují se závažností depresivní symptomatologie (Conklin et al. 2007). Snížený obsah PUFA n-3 je často provázen vyššími hodnotami poměru AA/DHA a AA/EPA nebo PUFA n-6/PUFA n-3 (Adams et al. 1996, Frasure-Smith et al. 2004). V experimentu na zvířatech vedl deficit PUFA n-3 k depresi a zvýšení agresivity (DeMar et al. 2006). Naopak suplementace PUFA n-3 v dietě zvyšuje obsah neurotransmitterů (noradrenalin, serotonin a dopamin) v mozku a podporuje neurogenezi v hippocampu (Calderon a Kim 2004, DeMar Jr. et al. 2006). U zdravých lidských dobrovolníků bylo prokázáno, že vysoký příjem PUFA n-3 zvyšuje objem šedé hmoty v oblastech mozku významných pro emoční a kognitivní funkce (pravý hippocampus, pravá amygdala a přední cingulum (Conklin et al. 2007).

Další lipidové biomarkery

V experimentu na myších konckoutovaných pro tryptofan hydroxylázu 2, klíčového enzymu pro syntézu serotoninu byla provedena lipidomická analýza s cílem najít biomarkery, spojené s deficitem serotoninu. Bylo nalezeno 59 lipidových sloučenin: řada glycerofosfolipidů, sfingolipidy (sphingomyeliny, ceramidy, a jejich glyko-deriváty), a volné mastné kyseliny (Weng et al. 2016). Tato práce ukázala, že lipidový metabolismus souvisí s deficiencí serotoninu, významného neurotransmitteru ovlivňujícího náladu. Otoki et al. (2017) publikovali výsledky malé exploratorní studie, která se zabývala vztahem potenciálních lipidových biomarkerů (plasmatické plasmalogeny, diacyl-fosfolipidy a mastné kyseliny

v celkových fosfolipidech, esterech cholesterolu a triglyceridech i volné mastné kyseliny) k depresivním episodám u sezónní afektivní poruchy. Během zimní deprese našli významně nižší hladinu kyseliny alfa-linolenové a vyšší hladinu kyseliny myristolejové v triglyceridech (TG), dále byl pozorován významný pokles diacyl-fosfolipidu, obsahujícího kyselinu stearovou a DHA. Naproti tomu hladiny esterů cholesterol s kyselinou olejovou a několika PUFA mezi létem a zimou stoupaly proporcionálně s manifestací symptomů deprese. Nedávno byla také publikována studie (Liu et al. 2016), ve které strategií necílené lipidomiky při užití vyspělé technologie UPLC-Q-TOF/MS (*ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry*) byl určen panel lipidů (lysofosfatidyletanolamin 20:4, fosfatidylcholin 34:1, fosfatidylinositol PI 40:4, sfingomyelin SM 39:1, 2, a triglycerid TG 44:2), jehož stanovením bylo možno s vysokou senzitivitou (> 76 %) a specificitou (> 92 %) rozlišit osoby s těžkou i mírnou depresí od zdravých kontrol.

Závěry

Výsledky pilotních studií ukazují, že použití nových analytických chemických technologií současně s vyspělými statistickými metodami umožňuje získat informace o detailech vztahů mezi odchylkami lipidového metabolismu na jedné straně a morfologickými, klinickými a psychologickými charakteristikami na a straně druhé u různých neuropsychiatrických onemocnění. Dá se očekávat, že v budoucnu tyto výsledky bude možno uplatnit jak v časně diagnostice a odlišení subtypů těchto stavů, tak i v monitoraci jejich léčby nebo při hledání nových terapeutických cílů.

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

Literatura

- Adams PB., Lawson S., Sanigorski A., Sinclair AJ.:** Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids* 1996; 31(Suppl): S157-161.
- Atkinson AJ., Colburn WA., DeGruttola VG., et al.:** Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
- Avramopoulos D.:** Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Med* 2009; 1: 34.
- Beasley CL., Honer WG., Bergmann K., et al.:** Reductions in cholesterol and synaptic markers in association cortex in mood disorders. *Bipolar Disord* 2005; 7: 449-455.
- Berk M., Kapczinski F., Andreazza AC., Dean OM., et al.:** Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35: 804-817.
- Bogavac-Stanojevic N., Lakic D.:** Biomarkers for Major Depressive Disorder: Economic Considerations. *Drug Dev Res* 2016; 77: 374-378.
- Borgherini G., Dorz S., Conforti D., et al.:** Serum cholesterol and psychological distress in hospitalized depressed patients. *Acta Psychiatr Scand* 2002; 105: 149-152.
- Brunner J., Bronisch T., Pfister H., et al.:** High cholesterol, triglycerides, and body-mass index in suicide attempters. *Arch Suicide Res* 2006; 10: 1-9.
- Calderon F., Kim HY.:** Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* 2004; 90: 979-988.
- Chan RB., Oliveira TG., Cortes EP., et al.:** Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2012; 287: 2678-2688.

- Conklin SM., Gianaros PJ., Brown SM., et al.:** Long-chain omega-3 fatty acid intake is associated positively with corticolimbic gray matter volume in healthy adults. *Neurosci Lett* 2007; 421: 209-212.
- DeMar JC. Jr., Ma K., Bell JM., et al.:** One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J Lipid Res* 2006; 47: 172-180.
- Dietschy JM., Turley SD.:** Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 2004; 45: 1375-1397.
- Diniz BS., Butters MA., Albert SM., et al.:** Late-life depression and risk of vascular dementia and Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of community-based cohort studies. *Br J Psychiatry* 2013; 202: 329-335.
- Ellison WF., Morrison HL.:** Low serum cholesterol concentration and risk of suicide. *Epidemiology* 2001; 12: 168-172.
- Fiedorowicz JG., Coryell WH.:** Cholesterol and suicide attempts: A prospective study of depressed inpatients. *Psychiatry Res* 2007; 152: 11-20.
- Fiedorowicz JG., Palagummi NM., Behrendtsen O., Coryell WH.:** Cholesterol and affective morbidity. *Psychiatry Res* 2010; 175: 78-81.
- Frasure-Smith N., Lespérance F., Julien P.:** Major depression is associated with lower omega-3 fatty acid levels in patients with recent acute coronary syndromes. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 891-896.
- GBD 2015 DALYs and HALE Collaborators*.** Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388: 1603-1658.
- Gómez-Isla T., Price JL., McKeel DW. Jr., et al.:** Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1996; 16: 4491-4500.
- Greenwood CE., Young SN.:** Dietary fat intake and the brain: A developing frontier in biological psychiatry. *J Psychiatr Neurosci* 2001; 26: 182-184.
- Han X., Rozen S., Boyle SH., et al.:** Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS One* 2011; 6: e21643.
- Herbert J., Lucassen PJ.:** Depression as a risk factor for Alzheimer's disease: Genes, steroids, cytokines and neurogenesis - What do we need to know? *Front Neuroendocrinol* 2016; 41: 153-171.
- Jack CR. Jr., Vemuri P., Wiste HJ., et al.:** Evidence for ordering of Alzheimer disease biomarkers. *Arch Neurol* 2011; 68: 1526-1535.
- Jow GM., Yang TT., Chen CL.:** Leptin and cholesterol levels are low in major depressive disorder, but high in schizophrenia. *J Affect Disord* 2006; 90: 21-27.
- Kodytková J., Vávrová L., Zeman M., et al.:** Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem* 2009; 42: 1368-1374.
- Liu X., Li J., Zheng P., et al.:** Plasma lipidomics reveals potential lipid markers of major depressive disorder. *Anal Bioanal Chem* 2016; 408: 6497-507.
- Luchsinger JA., Mayeux R.:** Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6: 261-266.
- McNamara RK., Carlson SE.:** Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75: 329-349.
- McNamara RK., Hahn CG., Jandacek R., et al.:** Selective deficits in the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 2007; 62: 17-24.

- Maes M., Smith R., Christophe A., et al.:** Lower serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in major depression and in depressed men with serious suicide attempts: Relationship with immune-inflammatory markers. *Acta Psychiatr Scand* 1997; 95: 212-221.
- Maes M., Smith RS.:** Fatty acids, cytokines, and major depression. *Biol Psychiatry* 1998; 43: 313-314.
- Mapstone M., Cheema AK., Fiandaca MS., et al.:** Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat Med* 2014; 20: 415-418.
- Mátl O., Mátlová M.:** Zpráva o stavu demence 2015. Česká alzheimerovská společnost, o.p.s. 2015.
- Mezuk B., Eaton WW., Albrecht S., Golden SH.:** Depression and type 2 diabetes over the lifespan: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2008; 31: 2383-2390.
- Mielke MM., Bandaru VR., Haughey NJ., et al.:** Serum sphingomyelins and ceramides are early predictors of memory impairment. *Neurobiol Aging* 2010; 31: 17-24.
- Mielke MM., Haughey NJ.:** Could plasma sphingolipids be diagnostic or prognostic biomarkers for Alzheimer's disease? *Clin Lipidol* 2012; 7: 525-536.
- Mitchell AJ., Vaze A., Rao S.:** Clinical diagnosis of depression in primary care: a meta-analysis. *Lancet* 2009; 374: 609-619.
- Olazarán J., Gil-de-Gómez L., Rodríguez-Martín A., et al.:** A blood-based, 7-metabolite signature for the early diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015; 45: 1157-1173.
- Olusi SO., Fido AA.:** Serum lipid concentrations in patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 1996; 40: 1128-1131.
- Orešič M., Hyötyläinen T., Herukka S-K., et al.:** Metabolome in progression to Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 2011; 1: e57.
- Otoki Y., Hennebelle M., Levitt AJ., et al.:** Plasma Phosphatidylethanolamine and Triacylglycerol Fatty Acid Concentrations are Altered in Major Depressive Disorder Patients with Seasonal Pattern. *Lipids* 2017; 52: 559-571.
- Panza F., Frisardi V., Capurso C., et al.:** Late-life depression, mild cognitive impairment, and dementia: possible continuum? *Am J Geriatr Psychiatry* 2010; 18: 98-116.
- Papakostas GI., Petersen T., Sonawalla SB., et al.:** Serum cholesterol in treatment-resistant depression. *Neuropsychobiology* 2003; 47: 146-151.
- Papakostas GI., Iosifescu DV., Petersen T., et al.:** Serum cholesterol in the continuation phase of pharmacotherapy with fluoxetine in remitted major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 2004; 24: 467-469.
- Parekh A., Smeeth D., Milner Y., Thure S.:** The Role of Lipid Biomarkers in Major Depression. *Healthcare (Basel)* 2017; 5: E5.
- Park S., Yi KK., Na R., et al.:** No association between serum cholesterol and death by suicide in patients with schizophrenia, bipolar affective disorder, or major depressive disorder. *Behav Brain Funct* 2013; 9: 45.
- Peet M., Murphy B., Shay J., Horrobin D.:** Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry* 1998; 43: 315-319.
- Perkovic MN., Erjavec GN., Strac DS., et al.:** Theranostic Biomarkers for Schizophrenia. *Int J Mol Sci* 2017; 18: E733.
- Proitsi P., Kim M., Whiley L., et al.:** Plasma lipidomics analysis finds long chain cholesteryl esters to be associated with Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 2015; 5: e494.
- Schmidt HD., Shelton RC., Duman RS.:** Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 2375-2394.
- Sobczak S., Honig A., Christophe A., et al.:** Lower high-density lipoprotein cholesterol and increased omega-6 polyunsaturated fatty acids in first-degree relatives of bipolar patients. *Psychol Med* 2004; 34: 103-112.

- de Sousa RT., Zanetti MV., Brunoni AR., Machado-Vieira R.:** Challenging Treatment-Resistant Major Depressive Disorder: A Roadmap for Improved Therapeutics. *Curr Neuropharmacol* 2015; 13: 616-635.
- Strawbridge R., Young AH., Cleare AJ.:** Biomarkers for depression: recent insights, current challenges and future prospects. *Neuropsychiatr Dis Treatment* 2017; 13: 1245-1262.
- Tanskanen A., Vartiainen E., Tuomilehto J., et al.:** High Serum Cholesterol and Risk of Suicide. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 648–650.
- Uher R., Tansey KE., Dew T., et al.:** An inflammatory biomarker as a differential predictor of outcome of depression treatment with escitalopram and nortriptyline. *Am J Psychiatry* 2014; 171: 1278-1286.
- Wainwright P.:** Nutrition and behaviour: the role of n-3 fatty acids in cognitive function. *Br J Nutr* 2000; 83: 337–339.
- Walter A., Korth U., Hilgert M., et al.:** Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging* 2004; 25: 1299-1303.
- Weng R., Shen S., Burton C., et al.:** Lipidomic profiling of tryptophan hydroxylase 2 knockout mice reveals novel lipid biomarkers associated with serotonin deficiency. *Anal Bioanal Chem* 2016; 408: 2963-2973.
- Whiley L., Sen A., Heaton J., et al.:** Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2014; 35: 271-278.
- Wittchen HU., Höfler M., Meister W.:** Prevalence and recognition of depressive syndromes in German primary care settings: poorly recognized and treated? *Int Clin Psychopharmacol* 2001; 16: 121-135.
- Wulsin LR., Vaillant GE., Wells V-E.:** A systematic review of the mortality of depression. *Psychosom Med* 1999; 61: 6–17.

PLEITROPNÍ ÚČINKY ŽLUČOVÝCH KYSELIN

PLEIOTROPIC EFFECTS OF BILE ACIDS

A. Žák, M. Zeman, M. Vecka, R. Hromádka¹, J. Macášek, E. Tvrzická, B. Staňková

IV. interní klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a VFN v Praze

¹Centrum pro výzkum a vývoj, C2P s.r.o.

Souhrn

Žlučové kyseliny, které byly pokládány za sloučeniny významné pro digesti a absorpci tuku, jsou dnes považovány za metabolické modulátory. Žlučové kyseliny jsou versatlní signální molekuly, které mají významné endokrinní a metabolické účinky, které jsou zprostředkovány interakcí s řadou nukleární a cytoplasmatických receptorů, 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 jater, jaterní fibrogenezi a karcinogenezi.

Abstract

Bile acids, which were thought to be substances important for digestion and absorption of lipids, are considered as novel metabolic regulators. Bile acids are versatile signal molecules with a plethora of endocrine as well as metabolic effects through interaction with many nuclear and cytoplasmic receptors. Among them, the most important is nuclear farnesoid X receptor (FXR) and cytoplasmic TGR5 receptor. Activation of FXR and TGR5 by bile acids influences lipid and glucose metabolism, inflammation, energy metabolism, fibrogenesis, as well as carcinogenesis.

Úvod

Žlučové kyseliny (BA, bile acid) představují skupinu molekul s podobnou chemickou strukturou a detergentními vlastnostmi. BA jsou nejvýznamnější součástí žluče. Jejich syntéza i exkrece je nejdůležitějším mechanismem katabolismu cholesterolu u savců. Prvotní produkty syntézy označované jako primární BA se liší mezi jednotlivými druhy obratlovců. U člověka jsou primární BA – kyselina cholová (CA, cholic acid) a kyselina chenodesoxycholová (CDCA, chenodeoxycholic acid). Chemická rozmanitost poolu BA i jeho velikost je podmíněna střevním mikrobiomem. Vztah mezi BA a střevním mikrobiomem je oboustranný. Mikrobiom se podílí na syntéze sekundárních (resp. terciárních) BA a tudíž na diverzitě spektra BA, na druhé straně BA ovlivňují složení střevního mikrobiomu.

Žlučové kyseliny, kterým se dříve přisuzovala pouze funkce přirozených detergentů sloužících k emulgaci, digesti a absorpci tuků (resp. v tučích rozpustných vitamínů), mají řadu pleiotropních účinků, které jsou v přehledu uvedeny v tabulce 1.

Poznatky z posledních 20 let prokázaly, že BA jsou významnými regulátory komplexních metabolických dějů. BA regulují nejen vlastní metabolismus, ale podílejí se na řízení lipidového metabolismu, glukózové homeostázy i účincích insulinu v centrálních a periferních tkáních. Účinky BA jsou spojeny také s energetickým výdejem i kontrolou hmotnosti, regulací imunity a zánětu. Předpokládá se, že BA mohou ovlivňovat aterotrombózu, neuro-protektivní procesy i karcinogenezi a zasahovat do řady dalších dějů jako je regenerace jater, stárnutí cholangiocyty, rozvoj nealkoholové steatózy jater a další (de Aguiar Vallim et al. 2013, Marin et al. 2015, Vítek a Haluzík 2016, Ackermann a Gerhard 2016).

Tabulka 1. Pleitropní účinky žlučových kyselin (podle Marin et al. 2015, Copple a Li 2016)

Funkce žlučových kyselin	Místo působení
Choleréza (sekrece žluči závislá na BA)	hepatocyt
Solubilita cholesterolu ve žluči (smíšené micely)	žlučník a žlučové cesty
Digestce lipidů pankreatickými enzymy	střevní lumen
Uvolnění CCK a GLP-1 a sekrece enzymů pankreatu	entero-endokrinní buňky tenkého střeva a pankreatu
Absorpce vitaminů rozpustných v tucích	střevní lumen
Prevence bakteriální invaze do žlučových cest a zábrana bakteriálního přerůstání tenkého střeva	střevní lumen a žlučové cesty
Zachování bariérové funkce střeva	stěna střevní

Většina nověji studovaných účinků BA je spojena s funkcí BA jako ligandů (aktivátorů) řady specifických receptorů – nukleárních i cytoplasmatických. Mezi nukleární receptory aktivované BA patří: farnesoidní X receptor (FXR), receptor vitamínu D (VDR), pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR). Do skupiny cytoplasmatických receptorů aktivovaných BA patří transmembránový receptor spřažený s G proteiny typu 5 (TGR5), receptor pro sfingosin-1-fosfát typu 2 (S1PR2) a muskarinový receptor typu (M3R) (Duboc et al. 2014, Copple a Li 2016, Vítek a Haluzík 2016).

Tyto receptory jsou exprimovány v játrech (FXR, VDR, PXR, CAR, M3R), tenkém střevě (FXR, TGR5), exokrinním a endokrinním pankreatu (FXR, TGR5, M3R), kardiovaskulárním systému (FXR, VDR, PXR, TGR5), buňkách endotelu (M3R), kardiomyocytech (TGR5), tukové tkáni (TGR5, M3R), kosterním svalstvu (TGR5), imunitním systému (PXR) a nadledvinách (FXR) (Baptissart et al. 2013, Duboc et al. 2014, Vítek a Haluzík 2016).

V tabulce 2 jsou přehledně uvedeny specifické receptory aktivované BA, jejich buněčná lokalizace, exprese v orgánu a tkáni a funkce.

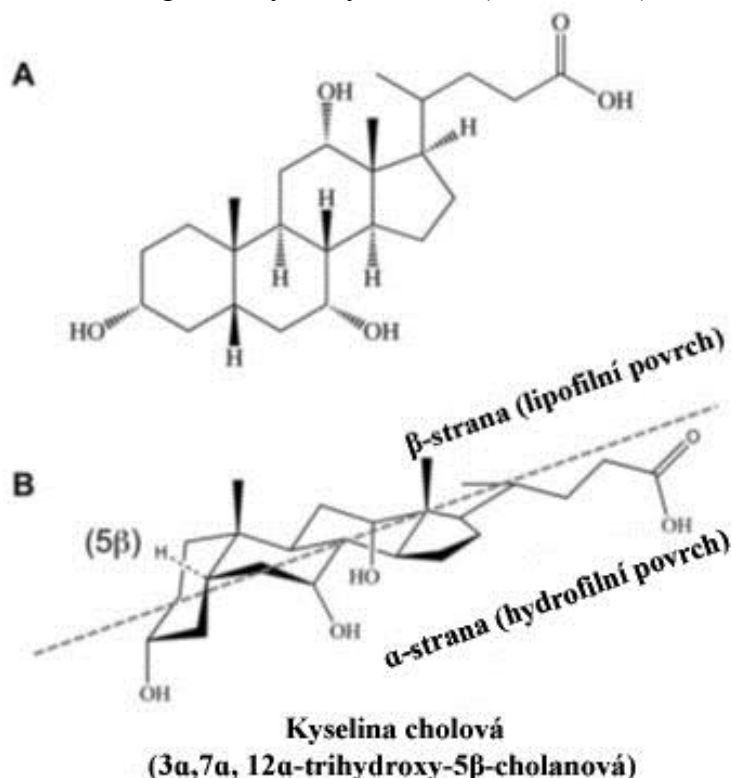
Struktura žlučových kyselin

Žlučové kyseliny jsou skupinou 24C steroidů, které je složeno ze steroidního jádra, tvořeného třemi 6C kruhy (A, B a C), jedním 5C kruhem (D) a postranního řetězce s 5C, který je zakončen karboxylovou skupinou. Molekulární rozmanitost je určena přítomností hydroxylových skupin na kruzích A i B a jejich konfigurací, která mění fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti BA. Vzhledem k tomu, že většina majoritních BA má spojení kruhů A/B v *cis* konfiguraci a H na C5 v 5 β konfiguraci, tak steroidní jádro BA má konkávní zakřivenou („zobákovitou“) strukturu. Většina OH skupin je v α konfiguraci, které jsou orientovány směrem ke konkávní části molekuly BA (obrázek 1). To zaručuje amfipatický charakter molekuly BA (Marin et al. 2015). Přítomnost hydroxylových skupin na C3, C7 a C12 i jejich orientace podle roviny steroidního jádra (α/β) ovlivňuje rozpustnost BA, která stoupá v pořadí: LCA < DCA < CDCA < CA < UDCA < kyselina muricholová (MCA) (de Aguiar Vallim et al. 2013).

Tabulka 2. Charakteristika receptorů aktivovaný BA

Receptor/lokalizace	Expres v orgánu/tkáni	Funkce
FXR/jádro	játra	homeostáza BA, lipidů, glukózy
	střevo	homeostáza BA
	β -buňky pankreatu	sekrece insulinu, apoptóza β -buněk
	KV systém	protektce KV systému
VDR/jádro	játra	homeostáza lipidů
	KV systém	protektce KV systému
PXR/jádro	játra	metabolismus lipidů a glukózy
	imunitní systém	regulace vrozené imunity
CAR/jádro	játra	metabolismus lipidů a glukózy
TGR5/cytoplasma	střevo	indukce sekrece GLP-1
	střevo	stimulace peristaltiky a sekrece
	hnědá tuková tkáň	zvýšená energetický výdej, syntéza T3I
	kosterní svalstvo	zvýšená energetický výdej, syntéza T3I
	β -buňky pankreatu	metabolismus glukózy
	kardiomyocyty	pozitivní inotropní účinek
	imunitní systém	protizánětlivé působení
M3R/cytoplasma	endotel	anti-aterogenní účinky
	tuková tkáň	regulace adipozity
	pankreas	metabolismus glukózy
	játra	metabolismus lipidů
S1PR2/cytoplasma	cévy	vasorelaxace
	játra	metabolismus lipidů a glukózy

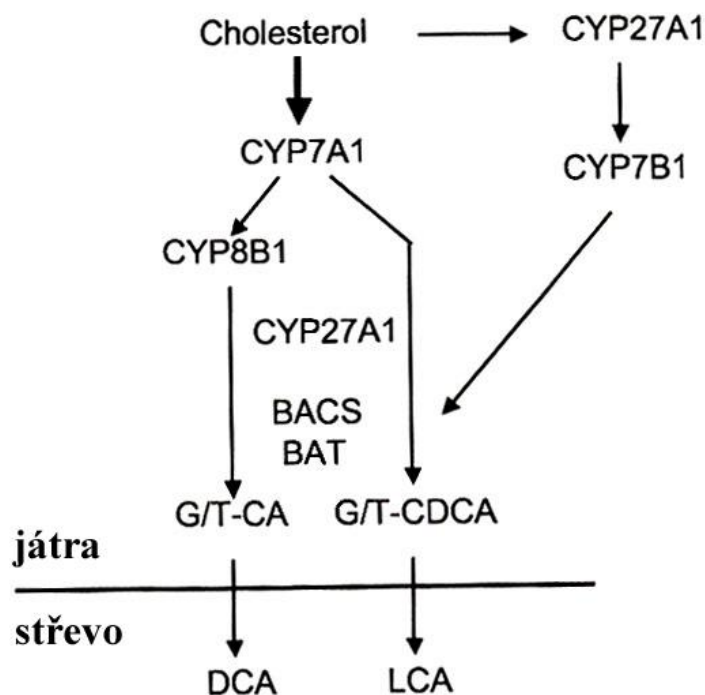
Upraveno podle Chiang 2013, Duboc et al. 2014, Vitek a Haluzík 2016

Obrázek 1. Prostorová konfigurace kyseliny cholové (Marin 2015)

Jaterní syntéza žlučových kyselin

Předpokládá se, že zhruba z 800 mg denně syntetizovaného cholesterolu, je pro syntézu BA využito 50 %, tj. 200 – 400 mg (Chiang 2009). Játra jsou jediným orgánem, který obsahuje 17 enzymů nezbytných pro syntézu *de novo* primárních BA – kyseliny cholové (CA, 3 α ,7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholanová) a kyseliny chenodesoxycholové (CDCA, α ,7 α , -dihydroxy-5 β -cholanová) a jejich konjugaci s glycinem (resp. taurinem). Existují dvě nejdůležitější metabolické dráhy syntézy BA – klasická a alternativní. Klasická metabolická dráha syntézy BA probíhá v játrech a jejími produkty jsou CA a CDCA, které jsou syntetizovány zhruba ve stejném množství. Intermediárními metabolity jsou neutrální steroly. Klasická dráha syntézy BA představuje kaskádu reakcí katalyzovaných enzymy lokalizovanými v endoplasmatickém retikulu cytosolu, mitochondriích a peroxisomech. Klíčovým enzymem je 7 α -hydroxyláza (CYP7A1); 7 α -hydroxycholesterol je konvertován na 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on (C4) pomocí hydroxysteroidní dehydrogenázy/isomerázy (HSD3B7). Syntéza CA z C4 vyžaduje hydroxylaci na C12 12 α -hydroxylázou (CYP8B1). Aktivita CYP8B1 pak určuje poměr CA ku CDCA. Následuje redukce dvojné vazby (C4-C5), oxidace postranního řetězce C27 na karboxylovou kyselinu a zkrácení postranního řetězce. V alternativní dráze, která probíhá v mitochondriích, se uskutečňuje pouze syntéza CDCA. V alternativní dráze je před změnami steroidního kruhu modifikován postranní řetězec. Jedná se o kroky zahrnující 27-hydroxylaci (CYP27A1), 7 α -hydroxylaci (CYP7B1) a vznik CDCA (obrázek 2).

Obrázek 2. Zjednodušené schéma syntézy BA klasickou a alternativní drahou (Chiang 2009)



Zkratky: G/T – glyko- (resp. tauro-) konjugáty žlučových kyselin, CA – kyselina cholová; CDCA – kyselina chenodesoxycholová, DCA – kyselina desoxycholová, LCA – kyselina lithocholová; BACS – bile acid CoA syntáza; BAT – bile acid CoA: amino acid N-acyltransferáza.

Další minoritní dráhy syntézy BA jsou iniciovány hydroxylací C25 (v játrech) a C24 cholesterolu (v CNS). Syntéza 24-hydroxycholesterolu představuje významný mechanismus transportu cholesterolu z CNS. V periferních tkáních je 24- a 25-hydroxycholesterol přeměněn nespecifickou 7α -hydroxylázou na oxysteroly, které jsou po transportu do jater, substrátem syntézy CDCA (Lund et al. 1999).

Posledním krokem před vyloučením BA z hepatocytu do žluče je konjugace terminální karboxylové skupiny s glycinem nebo taurinem za katalýzy BAAT (bile acid CoA: amino acid N-acyltransferázy) (Russell 2003, Chiang 2004). V písemnictví se udávaný poměr glyko- a tauro-konjugátů BA v poměru 3 : 1 se traktuje v odborném písemnictví od 80. let 20. století, avšak může kolísat v širokém rozmezí od 10: 1 ku 1:10 (Dawson 2010, Ma a Patti 2014). Předpokládá se, že klasická dráha přispívá ze 75 % k syntéze všech BA, zatímco příspěvek alternativní dráhy se odhaduje na 9 – 25 % (de Aguiar Vallim et al. 2013). Velikost *poolu* BA kolísá mezi 1500 – 4000 mg, z čehož připadá 38 – 40 % na CA, 16 – 25 % na DCA, 35 – 40 % na CDCA a 2 – 5 % na LCA a stejné množství na UDCA (Dawson 2010).

Střevní biotransformace žlučových kyselin

Ve střevě jsou glyko- a tauro- konjugáty BA transformovány působením enzymů střevního mikrobiomu. V tenkém střevě se odehrává dekonjugace a oxidace žlučových kyselin, v tlustém střeva dochází k dekonjugaci, 7α -dehydroxylaci a oxidaci/epimerizaci hydroxylových skupin v poloze C3, C7 a C12. Dekonjugace je katalyzována hydrolázami BA (BSH, bile salt hydrolases), které štěpí na C24 N-acyl amidovou vazbu v reakci, při které vzniká nekonjugovaná BA a glycin nebo taurin. BA jsou podrobeny oxidaci/epimerizaci 3-, 7-, 12- hydroxy skupin působením střevní hydroxysteroidní dehydrogenázy. Vznikají tak, přes oxo-deriváty žlučových kyselin, opačné epimery. Epimerizací hydroxylové skupiny z polohy 7α - na 7β - je mechanismus, kterým vzniká z CDCA kyselina ursodeoxycholová (UDCA, $3\alpha,7\beta$ -dihydroxy-5 β -cholanová). Kvantitativně nejdůležitější reakcí střevní biotransformace je dehydroxylace na C7, která dává vznik **sekundárním BA**: DCA z CA a LCA z CDCA. Dekonjugace a 7α -dehydroxylace pak snižuje hydrofilní charakter BA a umožňuje pasivní absorpci BA v tlustém střevě. Dekonjugace a oxidace je vlastní anaerobním bakteriím, naopak 7α -dehydroxylace přísluší aerobním bakteriím. Podmínkou 7α -dehydroxylace je předcházející dekonjugace BA

Sekundární BA jsou dále metabolizovány působením střevního mikrobiomu a jaterních enzymů na **terciární BA**: reakce zahrnuje jaterní sulfataci, hydroxylaci, glukuronizaci LCA, redukci 7-keto-LCA na CDCA nebo její 7β -epimer, UDCA (Dawson 2010).

Malá množství kyseliny lithocholové (LCA, $3\alpha,7\beta$ -hydroxy-5 β -cholanová) jsou po resorpci a návratu do jater konjugovány s kyselinou sírovou na C3 hydroxylové skupině. Konjugace s kyselinou sírovou (sulfatace), katalyzovaná sulfotransferázou-2A1, je hlavní metabolickou drahou přeměny toxických hydrofobních žlučových kyselin. Sulfatace BA zvyšuje jejich rozpustnost, snižuje střevní absorpci a favorizuje střevní a močovou exkreci. Sérum i žluč obsahují pouze stopová množství sulfo-derivátů BA, které jsou ale převažující formou (~70 %) BA vyskytujících se v moči (Dawson 2010, Marin et al. 2015, Long et al. 2017).

Enterohepatální cirkulace žlučových kyselin

Pool BA obsahuje 1500 – 4000 mg BA. K recyklaci BA mezi játry a střevem dochází 6 – 10krát denně, čímž se zvyšuje funkční množství BA vstupujících do střeva na 20 – 40 g. Tento proces je známý jako entero-hepatální cirkulace BA. Nicméně, denně se stolicí ztrácí průměrně 500 mg BA (200 – 600 mg), které musí být nahrazeny syntézou *de novo* z cholesterolu (Dawson 2010). Konjugované BA jsou secernovány do kanalikulární žluče pomocí BSEP (bile salt export pump, ABCB11), lokalizované na apikálním pólu hepatocytu. Zvýšení koncentrace BA v hepatocytu vede k transportu BA zpět do krevních sinusoidů.

Podobně, BA vyloučené do primární moči mohou být re-absorbovány a systémovou cirkulací se mohou vracet do jater. Močová exkrece BA se odhaduje na 0,5 mg/den (Chiang 2009). Malá množství BA secernovaná ze žlučových cest se přes cholangiocyty vrací do hepatocytů („cholangio-hepatální zkrat“). Po jídle a vyprázdnění žlučníku se vstupují BA do střeva; část BA se vstřebává pasivní difúzí v horní části tenkého střeva a většina (~ 95 %) je aktivně vstřebávána v distálním ileu pomocí ASBT (apical sodium bile acid transporter), který je lokalizovaný kartáčové lemu enterocytů. Část BA, která se dostává do tlustého střeva je dekonjugována transformována na sekundární BA, které se vstřebávají pasivní difúzí v průběhu celého tlustého střeva, a část uniká stolicí. BA vstoupivší do enterocytu se váží na IBABP (intestinal bile acid-binding protein), který usnadňuje transport BA enterocytem k basolaterální membráně, odkud jsou vyloučeny do portální cirkulace pomocí heterodimerického transportéru OST α /OST β (organic solute transporter). Portální cirkulací jsou BA transportovány do jaterních sinusoidů a vycytány pomocí NTCP (Na-dependent taurocholate cotransport peptide) (Chiang 2009, Dawson 2010, Marin 2015). Sekundární BA, především DCA, a terciární BA, jsou re-absorbovány a recyklují spolu s CA a CDCA a po vstupu do jater musí být re-konjugovány.

DCA nemůže být zpětně v játrech konvertována na CA a její podíl v poolu celkových BA kolísá v širokém (1 – 50 %) v závislosti na 7 α -dehydroxylační aktivitě střevního mikrobiomu a době průchodu tráveniny zažívacím ústrojím (intestinal transit time). Naopak LCA může být po re-absorpci ve střevě v játrech zpětně metabolizována na CA (Ajouz et al. 2014).

Vychytávání BA z portální žíly, není kompletní, koncentrace BA v portální žíle se pohybují v rozsahu 10 – 80 μ mol/l, zatímco v periferní cirkulaci jsou 5krát nižší (Angelin 1982, Zhang 2011). Relativně vysoké koncentrace BA v tkáních exponovaných v EHC BA jsou dostatečné pro aktivaci příslušných receptorů.

Regulace enterohepatální cirkulace a syntézy žlučových kyselin

BA jsou účinnými regulátory koncentrace BA v organismu. Klíčovým hráčem regulace je farnesoidní X receptor (FXR), který koordinuje syntézu BA v hepatocytu, biliární sekreci BA, absorpci BA enterocytem a jejich sekreci do portální cirkulace i vychytávání BA z portální cirkulace do jaterní buňky. Aktivace FXR (účinnost klesá v pořadí CDCA > DCA > LCA > CA) inhibuje aktivitu CYP7A1, CYP8B1 a CYP27A1. FXR zvyšuje expresi aktivací SHP (small heterodimer partner), který antagonizuje aktivační účinky LRH-1 (liver receptor homolog 1) a HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) faktorů, které pozitivně ovlivňují expresi CYP7A1 a CYP8B1. Farnesoidní X receptor je intracelulárním senzorem BA epiteliálních buněk ilea a hepatocytů. V ileocytech přímo inhibuje aktivitu ABST a aktivuje uvolnění fibroblastových růstových faktorů (FGF 15/19), které po vazbě na specifické receptory (FGFR4) inhibují v játrech aktivitu CYP7A1. SHP potlačuje vstup BA do hepatocytů inhibicí transportéru NTCP (Na-taurocholate cotransporting polypeptide). Navíc, FXR zvyšuje konjugaci BA s glycinem a taurinem a up-reguluje geny odpovědné za export BA z hepatocytů do žluče (BSEP) (Ma a Patti 2014, Copple a Li 2016). Další mechanismus inhibice syntézy BA, závislý na FXR, je FGF-19 (resp. Fgf-15) u lidí (resp. hlodavců). FGF-19 (Fgf-15). Po střevní absorpci BA dojde v enterocyту k aktivaci FXR a zvýšené expresi FGF-19, který pak v játrech, po interakci se specifickým receptorem, down-reguluje expresi CYP7A1. Množství cholesterolu řídí jeho katabolismus na BA na transkripční úrovni. Oxysteroly aktivují jaterní X receptor α (LXR α), který up-reguluje CYP7A1 (de Aguiar Vallim et al. 2013).

Žlučové kyseliny a střevní mikrobiom

Experimentální i klinické studie prokázaly, že střevní mikrobiom významně ovlivňuje zdravotní stav. Byl prokázán vztah střevního mikrobiomu k rozvoji a progresi metabolických onemocnění jako obezita, diabetes mellitus a ateroskleróza. Střevní mikrobiom ovlivňuje řada faktorů jako je věk, charakter potravy, abusus alkoholu, zdravotní stav hostitele a další (Karlsson et al. 2013, Ridlon et al. 2014, Schwan 2011, Devkota 2012). Současné poznatky se opírají o experimentální studie i o analýzy genomu střevního mikrobiomu dětí, seniorů, ze srovnání obézních osob s neobézními, diabetiků i pacientů, kteří absolvovali bariatrické operace (Haluzík a Vitek 2016). Vztah mezi metabolismem BA a střevním mikrobiomem je obousměrný. Jedním z faktorů ovlivňující velikost poolu BA a jeho složení je střevní mikroflóra a *vice versa* pertuberace střevního mikrobiomu, například podávání antimikrobiálních látek, či prebiotik (resp. probiotik) ovlivní složení BA v celkovém poolu BA (Ridlon et al. 2014, Ajouz et al. 2014). Bakteriální dysbiosis, pozorovaná u cirhotiků je spojena se sníženou koncentrací BA ve střevě a poklesem zastoupení gram-pozitivních mikroorganismů střevního ekosystému (Ridlon et al. 2013, Ridlon et al. 2015). Je známo, že BA potlačují růst střevních mikroorganismů. Tento účinek je zprostředkován přímým antimikrobiálním působením BA a antimikrobiálními peptidy secernovanými z ileocytů po aktivaci FXR působením BA. Pokles koncentrace BA ve střevě favorizuje zastoupení střevních gram-negativních mikroorganismů, které syntetizují lipopolysacharid (LPS) a jsou potencionálními patogeny. Naopak vzestup koncentrace BA favorizuje gram-pozitivní mikroorganismy schopné 7α -dehydroxylace primárních BA na potenciální toxické sekundární BA (Ridlon et al. 2014). Biotransformace primárních BA jako je CA, CDCA, resp. UDCA, cestou $7\alpha/\beta$ dehydroxylace rezultuje v tvorbu sekundárních BA – DCA a LCA. Za přeměnu BA je odpovědný především species *Clostridium* (C. cluster XVIa a cluster XI). Játra nejsou schopna 7α -hydroxylace sekundárních BA na primární BA. Sekundární BA, zejména DCA, se akumulují v poolu BA. Zvýšení koncentrace DCA a poměru tauro-/glyko-konjugátů BA je asociováno s civilizačními chorobami a stravovacími návyky průmyslově vyspělých zemí (Western diet) a je spojeno se změnou střevního mikrobiomu. Změny složení mikrobiomu střevního mikrobiomu byly popsány u cholesterolové cholelitiázy, diabetiků a kolorektálního karcinomu, karcinomu jícnu, hepatocelulárního karcinomu i zhoubného nádoru prsu (Babtissart et al. 2013, Ajouz et al. 2014, Ridlon et al. 2014). Na molekulární úrovni se předpokládá, že DCA stimuluje jaterní perisinusoidální buňky k sekreci pro-zánětlivých a pro-tumorigenních faktorů za přítomnosti chemických kancerogenů (Yoshimoto et al. 2013).

Žlučové kyseliny jako signální molekuly

Mezi nukleární receptory aktivované BA patří: farnesoidní X receptor (FXR), receptor vitamínu D (VDR), pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR). Do skupiny cytoplasmatických receptorů aktivovaných BA patří transmembránový receptor spřažený s G proteiny typu 5 (TGR5), receptor pro sfingosin-1-fosfát typu 2 (S1PR2) a muskarinový receptor M3 (M3R). Tyto receptory jsou exprimovány v játrech (FXR, VDR, PXR, CAR, M3R), tenkém střevě (FXR, TGR5), exokrinním a endokrinním pankreatu (FXR, TGR5, M3R), kardiovaskulárním systému (FXR, VDR, PXR, TGR5), buňkách endotelu (M3R), kardiomyocytech (TGR5), tukové tkáni (TGR5, M3R), kosterním svalstvu (TGR5) a imunitním systému (PXR) a nadledvinách, testes a prsní žláze (FXR) (Babtissart et al. 2013, Duboc et al. 2014, Vitek a Haluzík 2016).

Z receptorů aktivovaných BA jsou nejvíce prozkoumané dva – nukleární farnesoidní X receptor (FXR) a cytoplasmatický TGR5.

Farnesoidní X receptor

Za fyziologického stavu plní FXR řadu funkcí. Je klíčovým regulátorem jaterní homeostázy, reguluje syntézu a enterohepatální cirkulaci BA, řídí metabolismus lipidů a glukózy, je významným faktorem jaterní regenerace, potlačuje zánět i apoptózu jaterních buněk, indukuje expresi tumor-supresorových genů a inhibuje transkripci onkogenů (Huang et al. 2015). Nejúčinnějším aktivátorem FXR je CDCA, následuje LCA, DCA a CA. Hydrofilní BA – UDCA a MCA prakticky neaktivují FXR (Ma a Patti 2014).

Aktivace FXR a metabolismus lipoproteinů. Aktivace FXR snižuje obsah triglyceridů (TG) v játrech, inhibuje *de novo* lipogenezi, reguluje koncentrace apolipoproteinů (apo) C-III a A-I. Myši s KO genem *Fxr* (*Fxr*^{-/-}) měly zvýšenou insulinovou rezistenci kosterního svalstva, jater a koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin. Podání BA nebo specifických agonistů FXR snižovalo koncentrace plazmatických TG, cholesterolu i jaterních lipidů. Pokles koncentrace plasmatických lipidů a lipoproteinů je důsledkem FXR dependentní indukce jaterních genů odpovědných za katabolismus lipoproteinů jako jsou SR-B1 (HDL-receptor), VLDL-receptor, apo C-II, apo AV, LPL dalších faktorů. Aktivace FXR resultuje v potlačení jaterní SREBP-1c, transkripčního faktoru nezbytného pro syntézu mastných kyselin a TG (Sinal et al. 2000, Zhang a Edwards 2008, Calkin a Tontonoz 2012). V klinických studiích zaměřených na disoluci cholecystolitiázy podáváním CDCA byl dokumentován významný pokles koncentrace TG (Iser a Sali 1981). Bylo prokázáno, že syntéza BA koreluje pozitivně s hladinou TG. Sekvestranty BA, které přerušují enterohepatální cirkulaci BA, zvyšují syntézu jak BA, TG i sekreci VLDL. Tyto účinky jsou zprostředkovány aktivací FXR. Podání obeticholové kyseliny (OCA, 6 α -etyl-CDCA) či UDCA se snižují koncentrace plasmatického cholesterolu a TG potlačením aktivity SREBP1c a syntézy mastných kyselin v játrech. Aktivace FXR podáním BA up-reguluje receptory indukované peroxisomálními proliferátory typu α (PPAR α). Aktivace PPAR α je spojena s poklesem syntézy mastných kyselin, TG a zvýšeným katabolismem VLDL. Z dalších účinků BA, nezávislých na FXR, se uvádí potlačení adipogenese působením taurodesoxycholové kyseliny (de Aguiar Vallim et al. 2013, Ma a Patti 2014).

Aktivace FXR a metabolismus glukózy. Aktivace FXR působením BA reguluje metabolismus glukózy zlepšením insulinové rezistence a inhibuje jaterní glukoneogenezu potlačením aktivit glukoso-6-fosfatázy, fosfoenolpyruvátkinázy a fruktoso-1,6 difosfatázy. Bylo prokázáno, že FGF15/19 uvolněný v post-prandiální fázi z tenkého střeva vykazuje insulinu podobné účinky včetně inhibice jaterní glukoneogeneze. Naproti tomu FGF21, secernovaný z jater v důsledku prolouvaného lačnění má glukagonu-podobné účinky. Je známo, že myši s ablací *Fxr* (*Fxr*^{-/-}) jsou insulinorezistentní. Naopak podávání BA geneticky modifikovaným myším (obézní, diabetické) či se standardním genotypem a se zachovaným *Fxr* zlepšovalo inzulinovou senzitivitu a snižovalo glykémie (Cariou et al. 2006, Zhang et al. 2006). BA snižovaly glykémie a zvyšovaly insulinovou senzitivu aktivací receptoru TGR5 (Potthoff et al. 2012).

Aktivace FXR a další účinky. Cholestáza je spojena s akumulací cytotoxických BA, zvýšenou koncentrací prozánětlivých cytokinů a poškozením jater. Elevace jaterních BA aktivuje FXR a pregnanový X receptor (PGR). Aktivace FXR je spojena s indukcí flavinové monooxygenázy, která je zapojena do detoxifikačních mechanismů (de Aguiar Vallim et al. 2013, Ma a Patti 2014).

Pregnanový X receptor (PXR) je aktivován hepato-toxickými BA jako je LCA a 3-keto-LCA, některými farmaky a xenobiotiky. PXR je exprimován v játrech a střevě. Aktivace PXR potlačuje expresi NF κ B (Cheng et al. 2012). Vitamin D receptor (VDR) je exprimován v řadě tkání a buněk. Nejvýznamnějším aktivátorem VDR je 1,25 dihydroxy-vitamin D₃. Ze žlučových kyselin je spojen s kalcium-fosfátovým metabolismem, imunitou, růstem, a diferenciací buněk (Vítek a Haluzík 2016).

Receptor TGR5

TGR5 je cytoplasmatický receptor spřažený s G proteinem. TGR5 aktivují již nízké koncentrace BA (1-10 μ M). TGR5 je exprimován v neparenchymatosisních buňkách jater (cholangiocyty, epitelové buňky, imunitní buňky), tukové tkáni, slezině, tenkém střevě a dalších tkáních a orgánech. Nejúčinnějším aktivátorem TGR5 je LCA, následuje DCA, CDCA a nejmenší účinek má CA (de Aguiar Vallim et al. 2013, Ma a Patti 2014).

Aktivace TGR5 a imunitní systém. Aktivace TGR5 izolovaných makrofágů potlačuje uvolnění prozánětlivých cytokinů po stimulaci LPS, mechanismem zahrnujícím fosforylaci inhibitoru NF κ B s následnou redukcí transkripce cytokinů. Aktivace TGR5 u myši s vyřazeným genem pro *ldlr* potlačuje jak systémový zánět, tak projevy aterosklerózy (Kawamata et al. 2003).

Aktivace TGR5 a energetický metabolismus. Na experimentálním modelu obézních myši aktivace TGR5 zvyšuje energetický výdej a potlačuje inzulínovou rezistenci. V hnědé tukové tkáni a kosterním svalstvu aktivace TGR5 zvyšuje aktivitu dejodáz typu 2 kazalyzujících přeměnu tyroxinu na trijodtyronin, která rezultuje ve zvýšení bazálního energetického výdeje. Kromě toho, aktivace TGR5 indukuje syntézu UCP-2, který odpráhuje oxidativní fosforylaci (Watanabe et al. 2006, Maruyama et al. 2006).

Aktivace TGR5 a glukózová homeostáza. Aktivace receptoru TGR5 lokalizovaného ve střevních L-enteroendokrinních buněk vede k uvolnění GLP-1 (glucagon-like peptid 1) a GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide), které po vazbě na specifické receptory vykazují pleiotropní účinky zahrnující snížení chuti k jídlu, inhibici jaterní produkce glukózy, zvýšení insulinové senzitivity jater a kosterního svalstva, zpomalení vyprazdňování žaludku a zvýšení syntézy a sekreci insulinu z β -buněk pankreatu. Analoga BA [6 α etyl-23(S)-metylcholová kyselina (INT-777)] stimulují TGR5 bez aktivace FXR. Jejich podávání je spojeno se zvýšenou spotřebou kyslíku, zvýšením poměru ATP/ADP a cytochrom c oxidázy v L-enteroendokrinních buňkách. Celkově se zvyšuje exprese mitochondriálních enzymů, dejodáz, spotřeba kyslíku a energie, a upravuje se insulinová rezistence (Patti et al. 2009, Potthoff et al. 2013, Wu et al. 2013, Yuan a Bambha 2015).

Význam žlučových kyselin za různých patologických stavů

Zhoubné nádory GIT a jater. Předpokládá se, že celosvětový nárůst obezity a diabetes mellitus 2. typu, asociovaný se sedavým způsobem života a zvýšeným příjmem rafinovaných cukrů a tuků, je spojen se zvýšeným rizikem rozvoje některých zhoubných nádorů, zvl. jater a gastro-intestinálního ústrojí. U diabetiků a obézních jedinců byla popsána dysregulace homeostázy BA a dysbióza střevní mikroflóry. Jejich pool BA má abnormální zvýšený podíl cytotoxických sekundárních BA. V současné době se předpokládá, že interakce mezi střevní mikrobiální dysbiózou a dysregulací metabolismu BA indukuje vznik zhoubného bujení v oblasti tlustého střeva a jater. Tumorigeneze je dávana do souvislosti s indukci a udržováním chronického zánětu, poškození DNA oxidačním stresem a proliferací střevního epitelu v důsledku střevní dysbiózy a dysregulace BA (Ajouz et al. 2014, Ridlon et al. 2014, Tsue et al. 2014, Huang et al. 2015).

Nealkoholová steatóza jater. Významnou jednotkou, jejíž narůstající výskyt souvisí s pandemií obezity a diabetes mellitus 2. typu, je nealkoholová steatóza jater (NAFLD). Insulinová rezistence a dysregulace homeostázy lipidů jsou spojeny v některých případech NAFLD s pro-zánětlivou reakcí a fibrogenezí, která pak ústí v nealkoholovou steatohepatitidu (NASH). V patogeneze NAFLD/NASH hrají roli receptory aktivované BA. Mezi ně patří FXR a TGR5. Receptory FXR a TGR5 a jejich agonisté by se mohly uplatnit také v patogeneze NAFLD/NASH, protože regulují lipidovou a glukózovou homeostázu, zvyšují energetický výdej a potlačují jaterní zánět (Yuan a Bambha 2015).

Jaterní fibróza. Léčba kyselinou obeticholovou (OCA, 6 α -etyl chenodesoxycholová kyselina, INT 747), která je aktivátorem FXR, inhibuje syntézu kolagenní matrix a jejích komponent (α 1-kolagen, TGF β -1, pokles inhibitorů tkáňových metaloproteináz) (Yuan a Bambha 2015).

Regenerace jater a karcinogeneze. FXR je zapojen do regenerace jater a jaterní karcinogeneze (Yuan a Bambha 2015). Předpokládá se, že aktivace FXR podáváním CA podporuje regeneraci jater po parciální hepatektomii a je zprostředkován, mimo jiné, působením FGF15/19. Myši s vyřazeným genem *fxr*^{-/-} spontánně vyvíjejí hepatocelulární karcinom. Aktivace FXR potlačuje geny, jejichž produkty proteolyticky degradují bílkoviny s nádor-supresorovým účinkem (Huang et al. 2015). Ukazuje se, že v mechanismu regenerace jaterní tkáně hrají ústřední roli žlučové kyseliny. Po parciální hepatektomii se zvýší koncentrace BA, aktivuje se FXR a indukuje proliferace hepatocytů. Do celého mechanismu je zapojena také FGF15/19 a aktivace FGFR4 (Alvarez-Sola et al. 2017).

Modulace zánětlivé odpovědi. BA po vazbě na TGR5 potlačují zánětlivou odpověď; aktivace TGR5 inhibuje syntézu a uvolnění prozánětlivých cytokinů indukovanou LPS v Kupferových buňkách jater. U experimentální aterosklerózy aktivace TGR5 snižuje zánětlivé změny aterosklerotických plátů. Navíc, aktivace TGR5 zvyšuje produkci oxidu dusnatého (NO), klíčové antiaterogenní molekuly (Yuan a Bambha 2015).

Žlučové kyseliny, insulinová rezistence a diabetes mellitus. U diabetes mellitus 2. typu (DM2T) byl prokázán 1,6krát větší *pool* DCA a vyšší koncentrace 12 α -hydroxy-metabolitů BA (CA a CDCA a jejich konjugátů). Vyšší poměr 12-hydroxy BA ku non-12-hydroxy BA je charakteristickým rysem stavů spojených s insulinovou rezistencí, jako metabolický syndrom (MS), DM2T, hypertriglyceridémie a pokles HDL-C. U DM2T byla popsána zvýšená syntéza CA a expanze poolu DCA. U DM2T korelují koncentrace tauro-konjugátů s lačnou a postprandiální glykemií, lačnou insulinémií a insulinovou rezistencí vyjádřenou pomocí HOMA-IR. Předpokládá se, že dysregulace homeostázy BA souvisí s insulinovou rezistencí nebo metabolickým syndromem (Cariou et al. 2011, Haeusler et al. 2013, Wewalka et al. 2014).

Účinky sekvestrantů žlučových kyselin. Sekvestranty žlučových kyselin (BAS) (colestipol, cholestyramin, colestimid, colesevelam) jsou nerozpustné polymerní pryskyřice, které ve střevě vytvářejí nerozpustné komplexy s BA. Tím dochází k přerušení enterohepatální cirkulace BA a indukci řady pochodů. Terapeuticky se BAS využívaly pro svůj hypocholesterolemický účinek. Kromě konvenčních BAS (cholestyramine, colestipol) nové BAS (colesevelam, colestimid) mění velikost poolu a spektrum BA. V současnosti jsou nové BAS indikovány také u pacientům s DM2T, u kterých kromě hypocholesterolemického účinku (pokles celkového a LDL-cholesterolu), zlepšují úroveň kontroly diabetes (Insull 2006).

Žlučové kyseliny, kromě historicky známých funkcí jako je emulgace, digesce a absorpce tuků, jsou mnohostrannými signálními molekulami, které aktivují řadu jaderných a cytoplasmatických receptorů. Uplatňují se v energetickém výdeji, regulaci lipidové a glukózové homeostázy, modulaci zánětu jater, a předpokládá se vztah k jaterní fibrogenezi i karcinogenezi jícnu, jater a tlustého střeva.

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

Literatura

- Ackermann HD., Gerhard GS.:** Bile acids in neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci* 2016; 8:263.
- Ajouz H., Mukherji D., Shamseddine A.:** Secondary bile acids: an unrecognized cause of colon cancer. *World J Surg Oncol* 2014; 12: 164.
- Alvarez-Sola G., Uriarte I., Latasa MU., et al.:** Bile acids, FGF15/19 and liver regeneration: from mechanisms to clinical applications. *BBA-Molecular Basis of Disease* 2017; pii: S0925-4439(17)30222-3. [Epub ahead of print]
- Angelin B., Björkhem I., Einarsson K., et al.:** Hepatic uptake of bile acids. Fasting and postprandial concentrations of individual bile acids in portal venous and systemic blood serum. *J Clin Invest* 1982; 70: 724-731.
- Baptissart M., Vega A., Martinot E., et al.:** Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling? *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 4511-4526.
- Calkin AC., Tontonoz P.:** Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 213-224.
- Cariou B., van Harmelen K., Duran-Sandoval D., et al.:** The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem* 2006; 281: 11039-11049.
- Cariou B., Cheteveaux M., Zair Y., et al.:** Fasting plasma chenodesoxycholic acid and cholic acid concentration are inversely correlated with insulin sensitivity in adults. *Nutr Metab* 2011; 8: 48.
- Copple BL., Li T.:** Pharmacology of bile receptors: evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules. *Pharmacol Res* 2016; 104: 9-21.
- Dawson PA.:** Bile secretion and enterohepatic circulation. In: *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and liver disease* (Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, and Sleisenger LS, Eds.), Saunders Elsevier, Philadelphia 2010; pp. 1075-1088.
- de Aguiar Vallim TQ., Tarling EJ., Edwards PA.:** Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism* 2013; 17: 657-669.
- Duboc H., Taché Y., Hofmann AF.:** The bile TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application. *Dig Liver Dis* 2014; 46: 302-312.
- Cheng J., Shah YM., Gonzales FJ.:** Pregnane X receptor as a target for treatment of inflammatory bowel disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 323-330.
- Chiang JY.:** Regulation of bile acid synthesis, pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* 2004; 40: 539-551.
- Chiang JY.:** Bile acids, regulation of synthesis. *J Lipid Res* 2009; 50: 1955-1966.
- Chiang JY.:** Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* 2013; 3: 1191-1212.
- Haeusler RA., Astiarraga B., Camastra S., et al.:** Human insulin resistance is associated with increased levelsof 12 alpha-hydroxylated biile acids. *Diabetes* 2013; 62: 4184-4191.
- Huang XF., Zhao WY., Huang WD.:** FXR and liver carcinogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 2015; 36: 37-43.
- Insull Jr W.:** Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *South Med J* 2006; 55: 257-273.
- Iser JH., Sali A.:** Chenodesoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 1981; 21: 90 -119.
- Karlsson F., Tremaroli V., Nielsen J., et al.:** Assessing the human microbiota in metabolic disease. *Diabetes* 2013; 62: 3341-3349.
- Kawamata Y., Fujii R., Hosoya M., et al.:** A g protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003; 278: 9435-9440.
- Kwong E., Li Y., Hylemon PB., et al.:** Bile acids and sphingosin-1-phosphate receptor in hepatic lipid metabolism. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5: 151-157.
- Long SL., Gahan CGM., Joyce SA.:** Interaction between gut bacteria and bile in health and disease. *Mol Aspects Med* 2017; 56: 54-65.

- Lund EG., Guileyardo JM., Russell DW.:** cDNA cloning of 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7238-7243.
- Ma H., Patti ME.:** Bile acids, obesity, and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28: 573-583.
- Marin JJ., Macias RI., Briz O., et al.:** Bile acids in physiology, pathology and pharmacology. *Curr Drug Metab* 2015; 17: 4-29.
- Martinot E., Sedes L., Babtissart M., et al.:** Bile acids and their receptors. *Mol Aspects Med* 2017; 56: 2-9.
- Maruyama T., Tanaka K., Suzuki J., et al.:** Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 in mice. *J Endocrinol* 2006; 191: 197-205.
- Patti ME., Houten SM., Bianco AC., et al.:** Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 1671-1677.
- Potthoff MJ., Boney-Montoya K., Choi M., et al.:** Endocrine fibroblasts growth factor 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev* 2012; 26: 312-324.
- Potthoff MJ., Potts A., He T., et al.:** Colesevelam suppresses hepatic glycogenolysis by TGR5-mediated induction of GLP-1 action in DIO mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 304: G371-G380.
- Ridlon JM., Alves JM., Hylemon PB., et al.:** Cirrhosis, bile acids and microbiota. *Gut Microbes* 2013; 4: 382-387.
- Ridlon JM., Kang D-J., Hylemon PB., et al.:** Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 2014; 30: 332-338.
- Ridlon JM., Kang D-J., Hylemon PB.:** Gut microbiota, cirrhosis, and alcohol regulate bile acid metabolism in the gut. *Dig Dis* 2015; 33: 338-345.
- Russell DW.:** The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 137-174.
- Sinal CJ., Tohkiun M., Miyata M., et al.:** Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000; 102: 72-85.
- Vitek L., Haluzik M.:** The role of bile acids in the metabolic regulations. *J Endocrinol* 2016; 228: R85-R96.
- Watanabe M., Houten SM., Matak C., et al.:** Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 2006; 439: 484-489.
- Wewalka M., Patti MF., Barbato C., et al.:** Fasting serum taurine-conjugated bile acids are elevated in type 2 diabetes and do not change with intensification of insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 1442-1451.
- Wu T., Bound MJ., Standfield SD., et al.:** Effects of rectal administration of taurocholic acid on glucagon-like peptide-1 and peptide YY secretion in healthy humans. *Diabetes Obes Metab* 2013; 15: 474-477.
- Yoshimoto S., Loo TM., Atarashi K., et al.:** Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence of secretome. *Nature* 2013; 199: 97-101.
- Yuan L., Bambha K.:** Bile acid receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2015; 7: 2811-2818.
- Zhang YK., Guo GL., Klaassen CD.:** Diurnal variation of mouse plasma and hepatic bile acid concentrations as well as expression of biosynthetic enzymes and transporters. *PloS One* 2011; 6: e16683.
- Zhang Y., Edwards PA.:** FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett* 2008; 582: 10-18.
- Zhang Y., Lee FY., Barrera G., et al.:** Activation of nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1006-1011.

FARMAKOGENETIKA A FARMAKOGENOMIKA HYPOLIPIDEMIK**PHARMACOGENETICS AND PHARMACOGENOMICS OF LIPID-LOWERING DRUGS****O. Šeda, L. Šedová***Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN*

Farmakogenetika je obor, který studuje genetickou komponentu interindividuálních odlišností v odpovědi na terapii. Farmakogenomika studuje tuto jedinečnou odpověď na úrovni celého genomu, případně dalších „-omů“ (transkriptomu, proteomu, metabolomu, mikrobiomu atp.). Řádový nárůst množství informací různé vědecké kvality společně s trendem směřujícím k elektronizaci zdravotnické dokumentace včetně inforatické nadstavby pro podporu klinického rozhodování zakládají potřebu referenčních, manuálně spravovaných databází klinicky významných farmakogenetických interakcí. Jednou z takových znalostních databází je PharmGKB - The Pharmacogenomics Knowledge Base (www.pharmgkb.org). Zde jsou katalogizovány jak výsledky kandidátních studií farmakogenetických, tak celogenomových farmakogenomických asociačních studií.

Hypolipidemika, zejména statiny spolu s fibráty, patří k nejčastěji podávaným lékům vůbec. Mezi kandidáty s důkazy pro modulaci účinků fibrátů se opakovaně objevují polymorfismy v cílovém genu fibrátů PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), v genovém klastru *APOA1/C3/A4/A5*, polymorfismy v genu pro lipoproteinovou lipázu nebo jaterní lipázu. U ezetimibu, blokátoru absorpce cholesterolu enterocyty, jsou všechny doposud popsané farmakogenetické interakce závislé na polymorfismech v cílovém genu *NPC1L1*. Pro terapii statiny je popsána celá řada genetických variant ovlivňujících farmakokinetické a farmakodynamické aspekty jejich účinku a nově jsou k dispozici výsledky sedmi celogenomových asociačních studií, které dokládají posun od farmakogenetiky k éře farmakogenomiky hypolipidemik. Patří sem variace v enzymech zodpovědných za metabolizaci statinů (zejména *CYP3A4*, *CYP3A5*), jejich přenašečů (*SLC01B1*, *ABCB1*) a dalších genů zapojených do lipidového metabolismu (*HMGCR*, *CETP*, *LDLR*, *APOE*, *LPA*, *SORT1*, *KIF6*) Zajímavé bude sledovat i paralelní vývoj farmakogenetických aspektů zcela nových tříd hypolipidemik, které spadají do kategorie biologických (cílených) léčiv.