

**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  
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 5**

**diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku**

**P r a h a 9. - 10. září 2015**

**Hlavní název: ATHEROSKLEROSA 2015**  
**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 2015**  
**Cena: neprodejné**

**ISBN 978-80-905595-2-3**

# ČESTNÉ PŘEDSEDNICTVO

**Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.**

děkan 1. LF UK Praha

**Prof. MUDr. Jozef Kollár, DrSc.**

president Sekce pro atherosklerosu SSKB

**Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.**

proděkan 1. LF UK Praha

## PROGRAMOVÝ VÝBOR

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

## ADRESA SYMPOSIA

**Lékařský dům  
Sokolská 31  
120 26 Praha 2**

**tel.: 224 266 201-4**

**O B S A H**

<b>Autor</b>	<b>Str.</b>
<b>Dostálová</b>	<b>1</b>
<b>Hertelyová</b>	<b>6</b>
<b>Hüttl</b>	<b>11</b>
<b>Hyánek</b>	<b>18</b>
<b>Kazdová</b>	<b>21</b>
<b>Macášek</b>	<b>25</b>
<b>Malínská</b>	<b>32</b>
<b>Marková</b>	<b>36</b>
<b>Oliyarnyk</b>	<b>41</b>
<b>Pánek</b>	<b>46</b>
<b>Poruba</b>	<b>49</b>
<b>Škop</b>	<b>50</b>
<b>Šmíd</b>	<b>57</b>
<b>Tohatyova</b>	<b>60</b>
<b>Trnovská</b>	<b>62</b>
<b>Zeman</b>	<b>67</b>
<b>Žák</b>	<b>82</b>

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

## MÝTY O POTRAVINÁCH A VÝŽIVĚ

### MYTHS ON FOOD AND NUTRITION

**J. Dostálová**

*Ústav analýzy potravin a výživy, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT, Praha*

#### **Abstract**

Nutrition is important factor influencing human health and therefore many people are interested in nutrition and they are looking for information. However, many wrong information and myths on food products and nutrition are presented in various information sources, especially on internet. Some of them are mentioned and explained e. g. myths on fats, additives and alternative types of nutrition.

#### **Úvod**

Výživa je nejdůležitějším faktorem z faktorů zevního prostředí, které ovlivňují naše zdraví a následně délku života. V literatuře se uvádí, že její podíl je přibližně 40 %, někdy až 60 %. V pořadí rizik z potravin je nesprávné složení stravy (riziko z nesprávné výživy) uváděno ve většině případů na prvním místě a další rizika (riziko mikrobiologické, z přírodních toxických látek, chemických kontaminantů a látek přídatných (aditivních) označovaných kódem E až na místech dalších. Výživa se proto stala nejen významným vědeckým oborem, ale i předmětem zájmu mnoha subjektů, které podávají doporučení jak se stravovat a jaké potraviny si vybírat.

Vedle doporučení, která vycházejí z výsledků výzkumu se v poslední době ve všech typech médií stále častěji objevují nepravdivé, klamavé a zavádějící informace jak o výživě obecně, tak o jednotlivých potravinách. Tyto klamavé informace pocházejí z různých zdrojů a šíří je různé zájmové skupiny. Může se jednat o konkurenční boj různých potravinářských lobby, informace, které šíří prodejci doplňků stravy s cílem zvýšit jejich prodej, ale i ctižádostiví novináři, kteří chtějí prezentovat senzační zprávy. Ti většinou nemají dostatečné odborné vzdělání ve výživě, potravinářství nebo příbuzných oborech, a tak informaci vytrhnou z kontextu nebo špatně interpretují, případně použijí informaci atraktivní, ale nepravdivou. V současné době jsou významným zdrojem mýtů i výživoví (nutriční poradci), kteří si za své rady často účtují nemalé částky. Nikdo jejich činnost nekontroluje a navíc živnost nutričního poradce je živnost volná, takže se jím může stát v podstatě kdokoli, i ten který o výživě a potravinách neví vůbec nic.

Smutným faktem pak je, že tyto mýty šíří nejen málo kvalifikovaní odborníci na výživu, ale mnohdy i lidé vzdělaní v oblasti lékařství, potravinářství a příbuzných oborech, jimž toto vzdělání dodává v očích laické veřejnosti na důvěryhodnosti. Jejich klamavé informace mají původ buď v nedostatečných znalostech, nebo patří k zastáncům alternativních směrů výživy, které jsou postaveny na nevědeckém základě. Někteří tyto zastánci se dají označit až za fanatiky.

Mýty o potravinách a výživě se vyskytují ve všech typech médií. Jejich šíření velmi přispěl internet. Jedná se o šíření poplašných, nebezpečných a řetězových zpráv tzv. hoaxů, jejichž častou součástí je žádost o předání zprávy dále co největšímu počtu adresátů. Hoaxy je v češtině možné nalézt na [www.hoax.cz](http://www.hoax.cz).

**Nejrozšířenější jsou tyto:**

- „Pangasius - je to k jídlu?“
- Nebezpečný moderní jogurt
- Recyklované mléko
- „Éčka přísady do potravin“
- „Margaríny a zdravotní riziko (Rama s nama)“ (první výskyt 12/2007)

**Nejběžnější mýty****Mýty o tucích***Rostlinné tuky jsou zdravé, živočišné nezdravé*

Z rostlinných tuků nemá z pohledu výživy vhodné složení tuk kokosový, palmojádrový a palmový, případně tuky obsahující vyšší množství *trans*-nenasycených mastných kyselin. Z živočišných tuků jsou pro zdraví prospěšné tuky z ryb. Samozřejmě záleží i na množství které konzumujeme.

*Margaríny zvyšují celkový cholesterol a LDL cholesterol a snižují HDL cholesterol*

Margaríny mají, až na ojedinělé případy, v současné době příznivé složení mastných kyselin tzn. nízký obsah nasycených mastných kyselin, vysoký obsah nenasyčených mastných kyselin a některé i nezanedbatelné množství nenasyčených mastných kyselin řady omega-3 a nízký obsah *trans* mastných kyselin a nemohou proto zvyšovat celkový cholesterol a LDL cholesterol a snižovat HDL cholesterol.

*Řepkový olej je vhodný jen na „bionaftu“*

Řepkový olej je z hlediska výživového velmi kvalitní - má nízký obsah nasycených mastných kyselin a z běžných rostlinných olejů nejvyšší obsah kyseliny linolenové, která patří k nenasyčeným mastným kyselinám řady omega-3 a velmi nízký obsah kyseliny linolové (omega-6), které přijímáme nadbytek. Má poměrně dobrou tepelnou stabilitu, a proto lze používat i ke smažení. Z olejů běžně dostupných v naší tržní síti je z hlediska výživového i tepelné stability nejkvalitnější.

*Kokosový tuk je zdravý*

Ve všech druzích médií se v poslední době často objevují informace o pozitivních účincích kokosového tuku (oleje), některé dokonce tvrdí, že je ze všech tuků pro zdraví nejlepší. Ze všech informací je pravdivá pouze ta, že kokosový tuk je tepelně stabilní. Složení mastných kyselin je z hlediska výživového nevhodné, zejména z pohledu vlivu na krevní lipidy, protože obsahuje přes 90 % nasycených mastných kyselin a poměrně velké množství kyseliny laurové, myristové a palmitové, které významně zvyšují hladinu krevního cholesterolu.

*Všechny tuky jsou špatné*

Vliv tuků na zdraví člověka je velice různý – od účinků pozitivních až po negativní. K tukům s negativním účinkem patří zejména tuky obsahující *trans* mastné kyseliny (tuky částečně ztužené, které se používají do různých potravinářských výrobků; jejich používání se výrazně snižuje) a tuk kokosový, palmojádrový a palmový. Pozitivně nepůsobí ani sádlo a máslo. Pozitivně naopak působí rybí tuky (oleje) a z rostlinných tuků – olej řepkový a olivový, méně významně i další oleje.

*Zdravá strava a konzumace tuků se vylučují*

Zdravá strava musí obsahovat tuky, protože jsou nositelem v tuku rozpustných vitaminů, rostlinných sterolů a dalších ochranných látek a jsou zdrojem esenciálních (nezbytných) mastných kyselin. Příjem tuků ve stravě by neměl klesnout pod 20 % z celkového energetického příjmu tj. pod 45 g za den.

*Když chci hubnout, nesmím jíst žádný tuk*

I při hubnutí jsou tuky důležité, protože jsou nositelem v tuku rozpustných vitaminů, rostlinných sterolů a dalších ochranných látek a jsou zdrojem esenciálních (nezbytných) mastných kyselin. Příjem tuků ve stravě by neměl klesnout pod 20 % z celkového energetického příjmu tj. cca pod 45 g za den.

*Je jedno, zda jím máslo nebo rostlinný tuk, po obojím se tloustne*

Tukové výrobky dodávají organizmu energii podle toho, kolik jich sníme a kolik tuku obsahují. Největším zdrojem energie jsou rostlinné oleje a pokrmové tuky (např. Ceres soft), protože neobsahují vodu, jsou to 100 % tuky. Z tuků, které si mažeme na chléb a pečivo má nejvyšší obsah tuku máslo – 82 % (máslo tříčtvrteční se 60 % tuku a poloviční, které má 40 % tuku se na našem trhu prakticky nevyskytují). Rostlinné roztíratelné tuky mají obsah tuku v rozmezí 20 – 70 %), běžné jsou tuky s méně než 50 % tuku. Pokud tedy konzumuje stejná množství, přijmeme méně energie z roztíratelných tuků než z másla, běžně polovinu.

*Výroba rostlinných tuků je příliš průmyslová*

V současné době se průmyslově vyrábějí téměř všechny potraviny a mezi technologiemi není z hlediska vlivu na zdraví člověka velký rozdíl. Hlavní je, aby vyrobené potraviny byly bezpečné, což kontrolují státní kontrolní orgány.

*Máslo je přírodní produkt, zatímco margaríny musí být vyráběny složitým technologickým procesem a nejsou přírodním tukem*

Pro výrobu másla i margarínů se používají přírodní suroviny. Pro výrobu másla smetana a pro margaríny rostlinné oleje a tuky. Základem výroby másla i margarínů je mechanický proces, při kterém vzniká požadovaná forma výrobku, která představuje roztíratelnou emulzi vody v tuku.

*Dnešní margaríny se neliší od margarínů, které se používaly v době krize jako náhražky másla*

Dnešní margaríny mají zcela jiné složení – příznivé složení mastných kyselin a některé jsou obohacovány o vitaminy rozpustné v tucích, případně o rostlinné steroly. I jejich senzorycké vlastnosti jsou jiné – příznivější chuť a vůně i roztíratelnost.

*Margaríny ucpávají cévy a obsahují velmi mnoho transfigurovaných mastných kyselin (některé přes 50 %).*

Dnešní margaríny naopak působí preventivně proti nemocem srdce a cév a většina z nich již trans mastné kyseliny neobsahuje.

Snad největší mýtus se objevil na internetu a byl rozeslán jako spam v několika vlnách. Je to mýtus Rama s nama, ke kterému není třeba se vyjadřovat. Způsob vyjadřování mluví již sám za sebe. Obsahuje termíny a informace jako: „Transfigurované tuky“, „Margarínu chybí pouze jediná molekula, aby z něj byla 100 % umělá hmota“, „Proč to nic živého nechce?“ „Protože to je z 99,99 % plast, který život zabíjí“, „Co takhle rozpustit si na pánvi kelímeček od jogurtu a namazat si ho na topinku, ne?, tak proč jíte margaríny?“

Do sféry mýtů patří i nesprávné interpretace informací, které jsou po odborné stránce v pořádku. Jako příklad lze uvést informaci, že tuk bio mléka obsahuje výrazně více (až o desítky procent) esenciálních mastných kyselin linolové a linolenové. Obsah těchto kyselin v mléčném tuku je běžně 2 – 3 % z celkových mastných kyselin, a tak při obsahu cca 4 % tuku v mléce je tedy toto zvýšení z hlediska výživy zcela zanedbatelné. Rovněž tvrzení, že křepelčí vejce obsahují méně cholesterolu než vejce slepičí je zavádějící. Obsah cholesterolu na jednotku hmotnosti je v podstatě stejný, ale hmotnost křepelčích vajec je 6x nižší než vajec slepičích.

### **Mýty o „éčkách“**

Řada mýtů se vztahuje k látkám přídatným, běžně nazývaným „éčka“. Všechny látky přídatné, které jsou povoleny prošly složitými hygienicko-toxikologickými testy a jsou legislativou povoleny k používání bez omezení (s doporučením „tak, jak je z hlediska technologického nezbytně nutné“), nebo jsou stanovena maximální povolená množství, která se odvíjí od ADI (Acceptable Daily Intake) látky a průměrné spotřeby příslušné potraviny. Látky přídatné se průběžně toxikologicky testují a v případě zjištění negativních účinků se může látka zakázat nebo snížit její maximální povolené množství. U 6 syntetických barviv je nutné na obalu uvádět v rámci předběžné opatrnosti „mohou způsobovat poruchy v chování dětí“. Navíc řada látek označených kódem E se přirozeně nachází v potravinách např. kyselina askorbová, kyselina citronová, lykopen, pektiny, karamel apod. a pouze když se do potravin přidají jsou označena kódem E. Přesto se můžeme setkat s tvrzeními:

- všechny přídatné látky s kódem Exxx jsou škodlivé, více nebo méně, bez ohledu na množství a bez ohledu na jejich negativní toxikologické testy.
- přestože všechna éčka prošla zdravotními testy, mají stejně mnohé z nich na zdraví člověka negativní vliv.
- konzumace pokrmů bez aditiv vede ke zlepšení zdravotních problémů řady pacientů. U dětí, které jedly stravu bez přídatných látek a nejnámějších alergenů, došlo během tří dnů k vyléčení nebo výraznému zlepšení původního onemocnění, často vymizely i další problémy dětí jako je astma či ekzémy.

Některé weby a publikace rozdělují éčka na éčka neškodná a škodlivá, někdy je rozdělují do několika skupin podle škodlivosti, přičemž jedinou oprávněnou autoritou, která se může vyjádřit ke škodlivosti nebo bezpečnosti látek používaných v potravinářství, je EFSA, Evropský úřad pro potraviny. V publikaci Éčka v potravinách je uveden obsáhlý seznam éček (dokonce je přiložen manuál "do kapsy", aby ho mohl spotřebitel použít při nákupu), kterým je dobré se vyhnout, kde jsou zahrnuty zcela neškodné látky vyskytující se v přírodě např. sorbitol, xylitol, mannitol, zahušťovadla např. karagenan, arabská guma, guma guar, mono- a diglyceridy mastných kyselin, uhličitany, dusík apod.

Velice negativní postoj je zaujímán k náhradnímu sladidlu aspartam, a proto EFSA již několik let prověřuje jeho bezpečnost, ale zatím nebyly zjištěny nějaké negativní účinky, kvůli kterým by mělo být zakázáno, a proto rozhodnutí o jeho používání neustále posunuje.

### **Mýty o výživě**

Z mýtů o výživě jsou nebezpečné zvláště ty, které doporučují alternativní směry výživy, které nemohou zajistit dostatek všech makro- a mikronutrientů. Jde o veganskou stravu, poslední stupně stravy makrobiotické, frutariánství, syrovou veganskou stravu (vitariánství), která v poslední době získává stále více příznivců a některá další výživová doporučení. Zde bych zmínila např. odmítání konzumace mléka a mléčných výrobků a jejich nahrazení výrobky rostlinnými, které je rizikové zejména pro děti a starší občany z důvodu nezajištění především dostatečného příjmu vápníku a vitamínu D. Všechny výše uvedené způsoby stravování jsou obzvláště rizikové pro děti. Moderní jsou také různé očistné diety, včetně léčby půstem. Uvedu příklad fatálního dopadu této léčby, který prezentovala MUDr. Kala Grofova na XXX. Mezinárodním kongresu SKVIMP v roce 2014. 31 letá pacientka vážící 28 kg (BMI okolo 10) byla přijata na interní oddělení PKN koncem listopadu 2013, kde po několika dnech ve stavu těžké podvýživy a dalších diagnóz zemřela. Pacientka držela různé očistné diety a podle internetu se léčila půstem, který dodržovala v roce 2013. Podle návodu celkem 224 dní hladověla, což představuje 67 % jejího života v roce 2013.

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



## Závěr

Dopad důsledného převzetí a aplikace některých těchto informací bohužel může vést až k poškození zdraví. Přesto těmto informacím řada lidí věří, často i lidé se vzděláním v příslušném oboru. Alarmující je rovněž skutečnost, že se s mýty o výživě a potravinách stále častěji setkáváme i u studentů a při diskusi s nimi se ukazuje, že někteří těmto „mýtům“ věří víc, než informacím předávaným ve škole, což velmi znesnadňuje jak úlohu učitele, tak i osvěty v oblasti výživy a potravin obecně. Boj s mýty je „boj s větrnými mlýny“. Je ale nutné, aby skuteční odborníci častěji vystupovali v médiích a tím alespoň trochu „zředili“ nepravdivé a klamavé informace. Významně by přispělo i převedení živnosti „nutriční poradce“ ze živnosti volné na živnost vázanou. Vymýtí mýty se nikdy nepodaří, ale přesto by se odborníci s přispěním státních orgánů měli snažit alespoň jejich vliv na obyvatelstvo snížit.

## Souhrn

Výživa je nejvýznamnějším faktorem z faktorů zevního prostředí, které ovlivňují naše zdraví. V literatuře se uvádí, že její podíl je přibližně 40 %, někdy až 60 %. V pořadí rizik z potravin je nesprávné složení stravy (riziko z nesprávné výživy) uváděno ve většině případů na prvním místě a další rizika (riziko mikrobiologické, z přírodních toxických látek, chemických kontaminantů a látek přídatných - aditivních označovaných kódem E až na místech dalších). Výživa se proto stala nejen významným vědeckým oborem, ale i předmětem zájmu mnoha subjektů, které podávají doporučení jak se stravovat a jaké potraviny si vybírat. Vedle doporučení, která vycházejí z výsledků výzkumu se v poslední době ve všech typech médií stále častěji objevují nepravdivé, klamavé a zavádějící informace jak o výživě obecně, tak o jednotlivých potravinách. Dopad důsledného převzetí a aplikace některých těchto informací bohužel může vést až k poškození zdraví. Přesto těmto informacím řada lidí věří, často i lidé se vzděláním v příslušném oboru. Alarmující je rovněž skutečnost, že se s mýty o výživě a potravinách stále častěji setkáváme i u studentů a při diskusi s nimi se ukazuje, že někteří těmto „mýtům“ věří víc, než informacím předávaným ve škole, což velmi znesnadňuje jak úlohu učitele, tak i osvěty v oblasti výživy a potravin obecně. Smutným faktem pak je, že tyto mýty šíří nejen málo kvalifikovaní odborníci na výživu, ale mnohdy i lidé vzdělaní v oblasti lékařství, potravinářství a příbuzných oborech, jimž toto vzdělání dodává v očích laické veřejnosti na důvěryhodnosti. V přednášce byly uvedeny příklady některých mýtů a alespoň některé uvedeny na pravou míru. Pozornost byla věnována zejména mýtům o tucích, látkách přídatných tzv. „éčkách“ a mýtům o alternativních způsobech stravování.

## Literatura

- Brát J, Dostálová J. Mýty o rostlinných tucích, Medical Tribune 2007; 9: A14.
- HOAX, dostupné na: <http://www.hoax.cz>, 16.2.2015
- Kala Grofova Z. Léčba podle internetu – poslední návratová fáze půstu (kazuistika). In: Sborník z XXX. Mezinárodního kongresu SKVIMP, 6.-8.3.2014, Hradec Králové, 91-92
- Klescht V, Hrnčířiková I, Mandelová L. Éčka v potravinách. Brno: Computer Press 2007.
- Oliveriusová L. Mýty a pověry o výživě. Praha: EB nakladatelství 2003.
- Různá tištěná media a internet

## ATEROGÉNNY INDEX PLAZMY A MASTNÉ KYSELINY V SKUPINE MLADÝCH LUDÍ

### ATHEROGENIC INDEX OF PLASMA AND FATTY ACIDS IN THE GROUP OF UNIVERSITY STUDENTS

Z. Hertelyová<sup>1</sup>, E. Tvrzická<sup>2</sup>, B. Staňková<sup>2</sup>, L. Vaško<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta UPJŠ Košice

<sup>2</sup>Laboratoľ pro výzkum aterosklerózy, IV. interní klinika, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy Praha

<sup>3</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta UPJŠ Košice

Slovakia is one of European countries with the highest cardiovascular mortality. One of the major risk factors of the development of cardiovascular diseases is dyslipidaemia, either primary or associated with hypertension, diabetes mellitus and obesity. Generally, atherogenic index of plasma (AIP) calculated as  $\log_{10}$  (triglycerides/high density lipoproteins cholesterol) is as a useful predictor of cardiovascular risk, particularly atherosclerosis. For the current study, we have randomly selected 300 subjects out of university students. The average age was  $22.42 \pm 2.32$  (all population). Correlation of AIP between sexes was very strong ( $P < 0.001$ ). Fatty acid strong correlated with oleic acid, linoleic acid, arachidonic acid, amount of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and trombogenic index of PUFA ( $P < 0.001$ ). Clinical studies showed that AIP is a predictor of cardiovascular risk. It is an easily available cardiovascular risk marker and a useful measure of response to treatment.

Diagnóze alebo prognóze kardiovaskulárnych ochorení (KVO) najnovších epidemiologických štúdií napomáhajú algoritmy alebo indexy, ktoré dávajú do súvislosti jednotlivé faktory KV rizika získané práve z výsledkov veľkých lipoproteínových (LP) subpopulácií (Campos et al. 1992). Aterogénny index plazmy, (AIP) logaritmicke transformovaný pomer molekulárnych koncentrácií triacylglycerolu (TAG) a lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL): index  $AIP = \log_{10}(TAG/HDL-C)$  (Coresh et al. 1993). Hodnotenie AIP, ktorý je viazaný na veľkosť LP častíc, je presnejšie ako klasické biochemické indikátory, ako celkový cholesterol (TC), LDL, HDL, triacylglyceroly (TAG), apoproteín B (apoB), apoproteín AI (apoAI) a takisto index pomeru TC/HDL (Dobiášová, Frohlich 2000). Regulácia veľkostí LP subpopulácií je spojená predovšetkým s TAG, kde sú pôsobením lipoproteínovej a pečenej lipázy remodelované HDL. Z aterogénneho hľadiska sú dôležité najväčšie a najmenšie častice HDL, pretože prevaha veľkých častíc HDL je protektívna, kým na druhej strane malé častice zvyšujú riziko aterosklerózy. Mastné kyseliny (MK) sú najdôležitejšou súčasťou lipidov tela a majú nezastupiteľnú úlohu vo výžive. Ako súčasť PL tvoria základnú štruktúru všetkých bunkových membrán. V TAG predstavujú významný zdroj energie, ktorý sa ukladá do tukového tkaniva. Takisto plnia úlohu tepelného izolátora (Tvrzická et al. 2009). Mastné kyseliny majú vplyv aj na obsah LP v organizme. Štúdie preukázali, že Eskimáci a ľudia, ktoríedia veľa morských rýb majú vysoké HDL a nízku hladinu TAG. Taktiež preukázali, že suplementácia rybím olejom znižuje hladinu TAG a zlepšuje pomer HDL/LDL cholesterolu (Mourek et al. 2007). Cieľom našej štúdie bolo zistiť korelačné vzťahy medzi AIP a profilom mastných kyselín v sledovanej populácii.

Do štúdie sa zapojilo 300 respondentov, z toho 90 mužov (30 %) s priemerným vekom  $22,67 \pm 2,55$  a 210 žien (70 %) s priemerným vekom  $21,90 \pm 2,43$ . Probandi boli mladí ľudia, či už študenti vysokých škôl v Košiciach alebo pracujúci. Prevažná väčšina študentov boli z LF UPJŠ Košice.

Respondetom bola odobratá vzorka krvi na analýzu TAG a HDL pre výpočet AIP a analýzu profilu mastných kyselín. Vybrané lipidové parametre krvi sme stanovili spektrofotometricky enzymatickou metódou biochemickým analyzátorom COBAS MIRA (Roche, Švajčiarsko). Pre výpočet aterogénneho indexu plazmy sme použili nasledovný vzorec:  $AIP = \log_{10} \frac{TAG}{HDL}$ .

Referenčné hodnoty AIP sú rovnaké pre mužov a ženy: fyziologické < 0,11, zvýšené riziko AIP 0,11 - 0,21 a vysoké riziko nad 0,21.

Príprava a analýza MK z krvného séra bola realizovaná na pracovisku Laboratoř pro výzkum aterosklerózy na LF UK Praha v rámci projektu Erasmus - študijný pobyt a pracovná stáž pod vedením RNDr. Evy Tvrzickéj v školskom roku 2012/2013. MK sme identifikovali a označili v programe Clarity IM offline. Okrem jednotlivých MK a ich súm sme vypočítali rôzne indexy, ktoré určujú KV riziko. V našej práci sme sledovali 4 indexy.

Indexy  $\omega$ -3 MK vypočítané podľa vzorcov (Tvrzická et al. 2009):

$$a) \text{ index } \omega 3 \text{ PNMK (1)} = \frac{EPA+DHA}{\Sigma MK} \quad b) \text{ index } \omega 3 \text{ PNMK (2)} = \frac{EPA+DHA+DPA}{\Sigma MK}$$

Aterogénny a trombogénny index vypočítané podľa vzorcov (Žák a kol., 2011):

$$AI = \frac{\{C12:0+(4 \times C14:0)+C16:0\}}{(\omega 6 \text{ PNMK} + \omega 3 \text{ PNMK} + MNMK)}$$

$$TI = \frac{(C14:0 + C16:0 + C18:0)}{\{0,5 MNMK + 0,5 \omega 6 \text{ PNMK} + (3 \times \omega 3 \text{ PNMK}) + \frac{\omega 3 \text{ PNMK}}{\omega 6 \text{ PNMK}}\}}$$

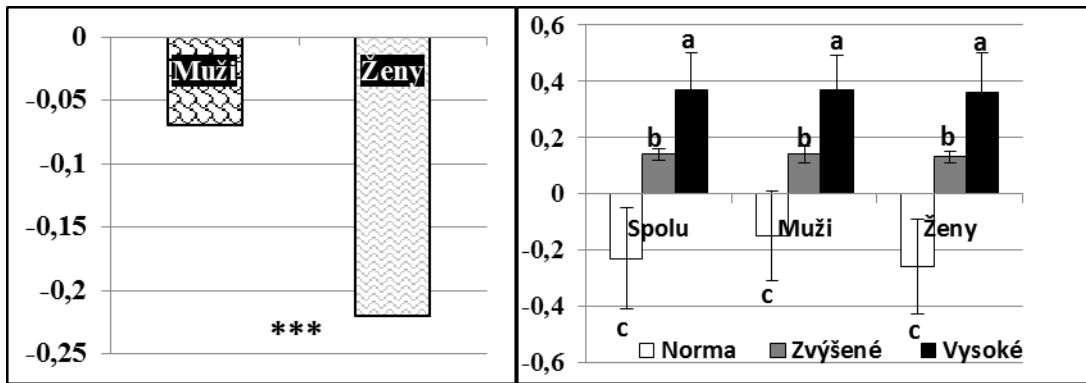
Všetky hodnoty popísané v tabuľkách a grafoch sú uvedené ako priemer±štandardná odchýlka, prípadne percentuálne zastúpenie pozorovaných skupín v celom súbore. Výsledky sme štatisticky spracovali v programe MS Excel 2007, SPSS verzia 19,0 a MINITAB for Windows 11.21 pomocou jednovýberovej Anovy a Tukey testu.

Priemerná hodnota AIP v sledovanej populácii bola  $-0,18 \pm 0,24$  (obr. 1). Muži ( $-0,07 \pm 0,24$ ) mali o 31,82% štatisticky významný vyšší pomer v porovnaní so ženami ( $-0,22 \pm 0,22$ ,  $P < 0,001$ ). Referenčné hodnoty AIP (do  $< +0,11$ ) sme zaznamenali v 89% prípadoch, o 11,27 % menej žien ako mužov. Zvýšené riziko AIP ( $0,11 \leq x < 0,21$ ), ako aj vysoké riziko AIP ( $\geq 0,21$ ) malo percentuálne viac mužov. Vo všetkých skupinách sme zaznamenali štatisticky významné rozdiely pri  $P < 0,05$  (obr. 2).

Sledovaním hodnôt AIP podľa referenčných hodnôt sme zaznamenali v skupinách s patologickými hodnotami signifikantný nárast kyseliny myristovej ( $P < 0,05$ ), kyseliny palmitovej ( $P < 0,01$ ), kyseliny olejovej ( $P < 0,001$ ) a pokles kyseliny stearovej, cervonovej (DHA) pri  $P < 0,05$ ; pokles kyseliny linolovej a arachidónovej pri  $P < 0,001$  (obr. 3 a 4).

Patologické hodnoty AIP boli aj pri zvýšených, aj pri vysokých hladinách AIP. Sledovaním rozdielu medzi sumou MK a referenčnými hladinami AIP sme sledovali nárast sumy NMK pri  $P < 0,05$ ; takisto sumy MNMK pri  $P < 0,001$  a pokles v sume PNMK  $P < 0,001$  v skupine s patologickými hodnotami AIP (obr. 5,6). Pomer  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 MK bol vyšší v skupine s vysokým rizikom AIP, avšak v skupine so zvýšenou hladinou bol nižší pomer oproti fyziologickým hladinám AIP (obr. 5).

V indexe omega-3 (1) aj (2) sme zaznamenali pokles oproti fyziologickým hodnotám AIP; signifikantný rozdiel bol v druhom spomínanom indexe. Skupiny s patologickým pomerom AIP mali takisto signifikantne nižšie hodnoty aterogénneho a trombogénneho indexu pri  $P < 0,01$  (obr. 7 a 8).



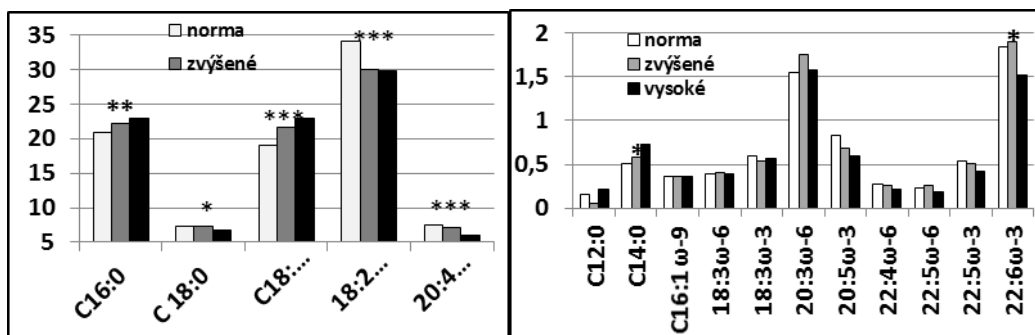
\*\*\* -  $P < 0,001$  (Anova jednosmerná)

a,b,c - hodnoty reprezentujú štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými skupinami,

Obrázok 1: Hodnoty AIP±SD u mužov a žien

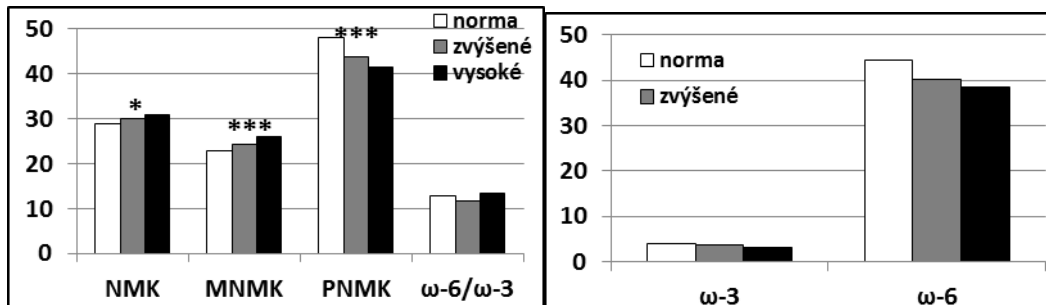
hodnoty  $P < 0,05$  boli považované za štatisticky významné (Tukey test)

Obrázok 2: Hodnoty AIP±SD podľa ref. hodnôt



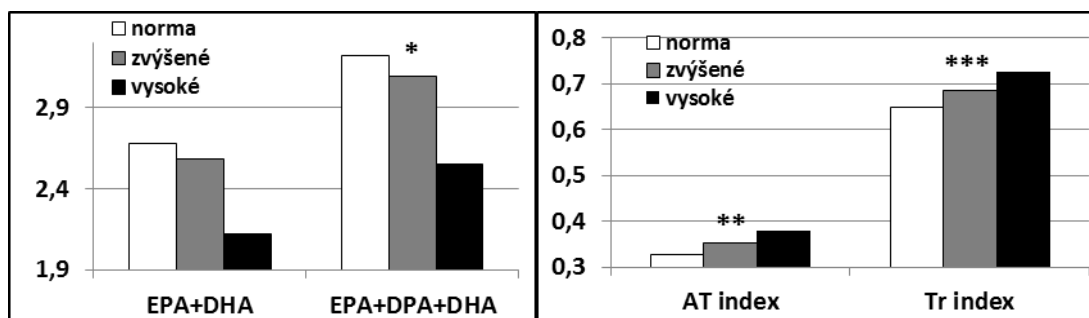
Hodnoty sú uvedené ako priemer [mol%]; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  (jednosmerná Anova)

Obrázok 3 a 4: MK podľa AIP



Hodnoty sú uvedené ako priemer [mol%]; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*  $P < 0,05$  (jednosmerná Anova)

Obrázok 5 a 6: Sumy MK a pomer ω-6/ω-3 PNMK podľa AIP



Hodnoty sú uvedené ako priemer [mol%]; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*  $P < 0,05$  (jednosmerná Anova)

Obrázok 7 a 8: Indexy podľa AIP

Vysokoškolskí študenti tvoria vekom a vzdelaním osobitnú skupinu populácie. Podľa štatistických údajov majú najnižšiu incidenciu ochorení, úrazov a úmrtí. Aj keď ide o zdravých, mladých, adaptabilných a vzdelaných ľudí, predsa nie sú uchránení od mnohých negatívnych vplyvov, často vyplývajúcich z ich spôsobu života počas 5- až 6-ročného vysokoškolského štúdia. Jedným z najvážnejších a najsilnejších zásahov v ich živote je prechod zo stredoškolského na vysokoškolské štúdium, u mnohých spojený so zmenou bydliska. Odchod z domáceho rodinného prostredia do nových podmienok a nového kolektívu prináša so sebou oslabenie rodinných väzieb a liberalizáciu osobného života – so všetkými rizikami moderného životného štýlu a vplyvov okolia (Jurkovičová et al. 2010). Obsah MK v krvnom sére v populácii je ovplyvnený množstvom faktorov, ale najvýznamnejším determinantom je množstvo prijatých tukov v potrave v sledovanej populácii. Nedietetické faktory, ako pohlavie, vek, fajčenie, obezita a pohybová aktivita takisto môžu do určitej miery ovplyvniť zloženie MK (Brandbury et al. 2011). Kyselina laurová (12:0), myristová (14:0), palmitová (16:0) a stearová (18:0) majú významný aterogénny a trombogénny potenciál. Účinok jednotlivých MK na rastúcu koncentráciu LDL klesá v rade 12:0 > 14:0 > 16:0. Účinok na pokles koncentrácií cholesterolu v HDL klesá v rade 14:0 > 12:0 > 16:0. Kyselina stearová má neutrálny účinok na koncentráciu LDL a zvyšuje koncentráciu HDL, preto jeho účinok je považovaný za antiaterogénny. Jeho trombogénny účinok je naopak považovaný za najvyšší. Kyselina olejová v diéte má antiaterogénne i antitrombotické účinky (zvyšuje pomer HDL/LDL, znižuje agregabilitu krvných doštičiek). PUFA majú výrazný antiaterogénny a antitrombotický účinok, ktorý je daný ich komplexným pôsobením a koncentráciu lipoproteínov, fluiditu membrán, funkciu membránových enzýmov a receptorov, moduláciu produkcie eikozanoidov, reguláciu krvného tlaku a metabolizmus minerálov (Žák et al. 2011). AIP je kalkulovaná hodnota, ktorú získavame z klasického biochemického vyšetrenia. Hodnoty AIP rastú s narastajúcim rizikom KVO. Veľkosť LP častíc je významným prediktorom KVO, ktorú sú výsledkom už prebiehajúcich metabolických porúch najmä lipidov. Obsah masných kyselín v krvnom sére koreluje s hodnotou AIP.

*Štúdia bola podporená projektami:*

*Štrukturálne fondy Európskej únie (Projekt č. ITMS 26220220185), VEGA 1/1236/12 a PRVOUK-P25/LF1/2*

## Literatura

1. **Brandbury KE, Skeaff CM, Crowe FL, et al.** Serum Fatty Acid Reference Ranges: Percentiles from a New Zealand National Nutrition Survey. *Nutrients* 2011; 3(1): 152-163.
2. **Campos H, Genest JJ Jr, Blijlevens E, et al.** Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1992; 12(2): 187-195.
3. **Coresh J, Kwiterovich PO Jr, Smith HH, Bachorik PS.** Association of plasma triglyceride concentration and LDL particle diameter, density, and chemical composition with premature coronary artery disease in men and women. *J Lipid Res* 1993, 34(10): 1687-1697.
4. **Dobiášová M, Frohlich J.** Nový aterogénny index plazmy (AIP) odpovedá pomeru triglyceridů a HDL-cholesterolu, veľkosti častíc lipoproteidů a esterifikační rychlosti cholesterolu: změny po léčbě lipanorem. *Vnitř Lék* 2000; 46(3): 152-156.
5. **Jurkovičová J, et al.** Prevalencia a trendy vývoja rizikových faktorov kardiovaskulárných chorôb u vysokoškolákov. *Životné podmienky a zdravie* 2010; 144-151.

6. **Mourek J. a kol.** Omega-3 mastné kyseliny. Zdraví a vývoj. Praha/Kroměříž: Triton. 2007, 174 s.
7. **Tvrzická E, Staňková B, Vecka M, Žák A.** Mastné kyseliny 1. Výskyt a biologický význam. Čas Lék čes 2009; 148(1): 16-24.
8. **Žák A. a kol.** Ateroskleróza. Nové pohledy. Praha: Grada Publ. 2011, 200 s.

## ZDRAVOTNÍ ÚČINKY ZELENÉ A PRAŽENÉ KÁVY

### HEALTH EFFECTS OF GREEN AND ROASTED COFFEE

**M. Hüttl, O. Oliyarnyk, H. Malínská, I. Marková, L. Kazdová**

*Institut klinické a experimentální medicíny - Centrum experimentální medicíny, Praha*

Káva je nejčastěji konzumovaný nápoj s farmakologickým účinkem, a kofein (purinový alkaloid), který je v ní obsažený, je nejběžněji konzumovanou psychoaktivní substancí. V povědomí lidí přetrvává mnoho ne zcela opodstatněných obav, neboť konzumace kávy bývá často spojována s nezdravým životním stylem, zejména s kouřením, nadužíváním alkoholu, neaktivním způsobem života a stresem. Současné epidemiologické i experimentální studie však stále častěji tyto omyly vyvracejí a naopak odkrývají její pozitivní účinky na lidský organismus. Rozpor v účincích kávy může být způsoben z velké části tím, zda je hodnocen vliv celého kávového nápoje nebo pouze jeho izolované nejučinnější složky kofeinu. Ten je samostatně přítomen ve vysokých dávkách v energetických nápojích nebo v léčivech, která však neobsahují ostatní v kávě přítomné pozitivně působící látky.

#### **Možné mechanismy účinku kávy na lidský organismus**

Biologicky aktivní složka kávy kofein patří společně s theobrominem, vyskytujícím se zejména v kakaových bobech, theofilinem a paraxantinem, obsažených hlavně v čaji, do skupiny tzv. metylovaných oxopurinů (metylxantinů). Pražená káva vedle kofeinu obsahuje více než 200 dalších složek, jejichž kvalita i množství se mění podle způsobu pražení kávových bobů a podle způsobu přípravy kávy. Mezi nejvýznamnější komponenty patří fenolické látky (kyselina kávová a chlorogenová), minerály (hořčík, vápník, železo, draslík), trigonelin, foláty, flavonoidy, niacin, tokoferoly, stopové prvky a mnohé další látky vykazující významnou antioxidační aktivitu. Podstatný pozitivní vliv těchto látek dokazují četné studie s podáváním kávy bezkofeinové. V kávě však byly identifikovány i látky působící negativně. Jsou to zejména diterpeny kafestol a kahweol, které se z mletých kávových zrn vyluhují varem. Lze je však snadno zachytit papírovým filtrem. Kofein se z kofeinového nápoje vstřebává přibližně za 10 - 20 minut po požití a je distribuován do všech tkání. Biologický poločas rozpadu kofeinu u zdravého jedince je 4,9 hodiny, přičemž jej protrahuje antikoncepce, gravidita, jaterní choroby, některá léčiva a delší je i u novorozenců. Zkracovat jej může např. kouření. Kofein je metabolizován v játrech cytochromem P450 zejména izoenzymem CYP1A2 na tři dimetylxantiny (paraxantin, theobromin, theofylin), které jsou dále metabolizovány a vylučovány močí.

Mechanismus účinku kofeinu je složitý děj, který není dosud přesně objasněn. Základním principem je pravděpodobně schopnost kofeinu obsadit v mozku díky své chemické stavbě adenosinový receptor a působit tím na centrální nervový systém opačně než adenosin, který uvádí organismus do klidu a spánku. Neurotransmitter adenosin dilatuje mozkové cévy a tlumí srdeční aktivitu. Kofein naopak způsobuje konstriktci mozkových cév a zvyšuje aktivitu mozku, což způsobí produkci adrenalinu z nadledvin. Zvýšené uvolňování katecholaminů má pozitivní inotropní a chronotropní efekt, způsobuje konstriktci cév na povrchu těla a zvýší tím akutně krevní tlak. Některé studie vysvětlují vztah mezi kávou a hubnutím jejím povzbuzujícím účinkem, který zvyšuje tělesnou aktivitu, energetický metabolismus a lipolýzu, čímž napomáhá redukci tukové tkáně i tělesné hmotnosti. Kofein má také pravděpodobně stejně jako ostatní metyloxantiny schopnost inhibovat fosfodiesterázu a produkovat ve zvýšené míře neurohormon dopamin, který navozuje příjemné pocity. Pozitivní dietetický vliv bývá připisován také obsahu solubilní vlákniny, neboť ten je v kávě vyšší než

ve víně či džusu. Voltz et al. (2012) ukázali, že jak káva zelená (bohatá na CGA), tak káva pražená, zesilují *in vitro* i *in vivo* transkripci Nrf2/ARE-dependentních genů. Ty se účastní ochrany buněk a tkání tím, že aktivují antioxidantní a detoxikační enzymy fáze 2.

V současnosti se pozornost obrací k tzv. **zelené kávě**, a to zejména pro její možný antiobezitologický účinek. Jelikož nápoj z těchto zrn není příliš lahodný, přistupuje se spíše k extrakci za účelem výroby potravinových doplňků nebo je extrakt přidáván do kávových směsí, nejčastěji instantní kávy. Zelená káva (neboli nepražená kávová zrna) obsahuje 10 - 15 % vody, 5 - 15 % sacharidů, 10 - 15 %, 10 - 15 % bílkovin, 20 - 25 % tříslovin, 10 % kyseliny kávové a chinové, 4 - 5 % kyseliny chlorogenové (CGA), zhruba 2,5 % kofeinu a přibližně 4 % minerálních látek. Své typické vlastnosti získává káva až pražením. Při tomto procesu klesá obsah kofeinu a s ním i obsah kyselin, na které je kofein vázán. Obsah CGA klesá o 30 - 70 %. Tato látka, náležící do skupiny polyfenolů, je jedním z nejvýznamnějších antioxidantů, jimiž káva disponuje a která se podílí na neutralizaci volných radikálů. Bylo prokázáno, že CGA inhibuje činnost glukóza-6-fosfátu, který má klíčovou úlohu v regulaci metabolismu glukózy. V současné době se stává zelená káva objektem vědeckého zájmu, neboť je hojně používána pro výrobu potravinových doplňků za účelem redukce hmotnosti. Zelená káva obsahuje kolem 1000 druhů antioxidantů, ale pražením antioxidantní kapacita ještě roste. Navíc bylo zjištěno, že pražením káva získá antibakteriální účinky.

Experiment prováděný na myších (Song et al. 2014) dokládá, že extrakt ze zelené kávy významně snižoval akumulaci viscerálního tuku a zlepšoval inzulinovou rezistenci po podávání vysokotukové diety a to i v nízkých koncentracích. Tento efekt přičítali downregulaci genů spojených s adipogenezí a zánětem v bílé tukové tkáni. Různé pilotní studie naznačují, že extrakt CGA získaný z nepražené kávy by mohl snižovat postprandiální glykémii nebo vstřebávání glukózy v tenkém střevě. Dále se v literatuře spekuluje, že by tento extrakt mohl měnit hladiny adipokinů. Velkým problémem zatím je i stanovení optimální dávky extraktu CGA i jiných látek v něm obsažených. Komplikací může být kofein, jehož vysoké dávky mohou způsobovat bolesti hlavy, diurézu, žaludeční obtíže, nervozitu, nespavost, úzkost, zvonění v uších či arytmie. Navíc by mohl kofein v potravinových doplňcích být kontraindikován s jinými, životně důležitými, léčivými.

### Účinky kávy

Názory na účinky kávy na lidský organismus se různí a to jak u laické, tak i odborné veřejnosti. V následující kapitole jsou shrnuty současné poznatky na nejčastěji sledované a diskutované působení kávy a jejích složek na zdraví člověka.

### Osteoporóza

Je metabolické onemocnění vyznačující se sníženou hustotou kostí, změnami v jejich mikroskopické stavbě, a tedy zvýšením rizika zlomenin. Příčinou může být podvýživa, nedostatek pohybu, stoupající věk nebo hormonální vlivy (menopauza nebo nadbytek glukokortikoidů). Mezi rizikové faktory je řazena také nadměrná konzumace alkoholu a kouření. Vliv kávy, resp. kofeinu byl a je často diskutován. Negativní vliv kofeinu na kosti zdravých jedinců popírají jak některé epidemiologické, tak experimentální studie. Föcking et al. (2005) ukázali na tkáňových kulturách lidských osteoblastů, že kofein v osteoblastech výrazně zvyšuje aktivitu receptoru pro glukokortikoidy, a tím až několikanásobně zvyšuje jeho účinek. Koncentrace glukokortikoidů v organismu je výrazně zvýšena při stresu, při některých poruchách hypofýzy a nadledvin, ale také se glukokortikoidů využívá jako léků v imunologii. I když některé studie ukázaly, že konzumace nápojů obsahujících kofein může být spojena s významným zvýšením rizika osteoporózy, přesná úloha kofeinu v úbytku kostní hmoty a zvýšeného rizika fraktur je kontroverzní.



Některé experimentální práce například poukazují na zhoršenou schopnost rekonstrukce kostní tkáně po extrakci zubu. Autoři doplňují, že účinnost kofeinu na úbytek kostní tkáně může být dána specifickým genotypem (např. receptor pro vitamin D), ale také koncentrací cirkulujících glukokortikoidů.

### **Riziko zubního kazu**

Je známo, že kávová zrna, ať již pražená nebo nepražená, obsahují také antibakteriální složky. Experimentálně, v podmínkách *in vitro*, bylo prokázáno, že káva zabraňovala přichycení hlavního původce zubního kazu – bakterie *Streptococcus mutans* – k zubnímu povrchu a vykazovala výrazné antibakteriální účinky. Za tyto vlastnosti nejsou odpovědné jen přirozeně se vyskytující složky kávy, ale i složky vzniklé pražením, neboť vzorky zelených kávových bobů byly výrazně méně aktivní než odpovídající vzorky kávy pražené. Instantní káva překvapivě vykazovala vyšší antibakteriální aktivitu a též úspěšněji bránila přichycení bakterií k zubnímu povrchu. Mezi kofeinovou a bezkofeinovou kávou naproti tomu nebyl v tomto směru zjištěn žádný rozdíl. Přichycení bakterií, a tím i vzniku plaku a zubního kazu, zabraňovaly velmi účinně zejména trigonellin (složka, která nejvíce přispívá k chuti i vůni kávy) a kyselina nikotinová (Daglia et al. 2002).

### **Alzheimerova a Parkinsonova choroba**

Současné experimenty ukazují, že adenosinový receptor hraje důležitou roli také v modulaci kognitivních funkcí. Prospektivní epidemiologické studie ukázaly korelaci mezi konzumací kávy a snížením rizika Parkinsonovy choroby u mužů i žen, avšak pouze u těch, které nebyly substituovány estrogenovou terapií. Káva zlepšovala kognitivní funkce i u pacientů s Alzheimerovou chorobou a u stárnoucí populace. Eskelinen et al. (2009) prokázali, že lidé, kteří ve středním věku pili denně 3 – 5 šálků kávy, mají nižší riziko demence a Alzheimerovy choroby v pozdním věku, v porovnání s těmi, kdo nepili kávu vůbec. Nárůst demence a Alzheimerovy choroby ve stárnoucí populaci se stává velkým problémem veřejného zdravotnictví a to už i proto, že chybí účinná kurativní léčba. Vzhledem k tomu, že káva nebo čaj jsou běžnou součástí denního režimu většiny lidí, stávají se objektem zájmu různých studií sledujících potenciální terapeutický efekt látek v nich obsažených. Dlouhodobá epidemiologická studie CAIDE (Cardiovascular Risk Factors, Aging and Dementia Study) potvrdila příznivý účinek kávy (3 z 5 studií) proti snížení kognitivních funkcí, demenci a Alzheimerově chorobě. Protektivní účinek čaje byl o poznání nižší. Konzumace 3 - 5 šálků za den ve středním věku snižovalo riziko vzniku demence a AD až o 65 % v pozdním věku. Studie na AD transgenních myši ukázala, že dlouhodobé podávání kofeinu chrání před kognitivními poruchami a redukuje množství  $\beta$ -amyloidu, který hraje v etiopatogenezi tohoto onemocnění významnou roli, neboť jeho ukládání v mozkové tkáni vede k tvorbě tzv. Alzheimerovských plaků. V oblasti plaků dochází k neurodegeneraci a odumíráním neuronů. Tento efekt vykazovala pouze káva s kofeinem, nikoli bezkofeinová a také podávání theofilinu (z čaje) nebylo v terapii účinné (Cao et al. 2011).

### **Diuréza**

Bylo prokázáno, že kofein má mírný diuretický účinek. Stookey (1999) zjistil, že ztráta tekutin po příjmu 1 mg kofeinu činí 1,17 ml vody. Tento fakt může být rizikový zejména u energetických nápojů, ve kterých je kofein obsažen ve vysokých dávkách a jejichž konzumace bývá častá při sportovních aktivitách, při kterých mohou zvyšovat riziko dehydratace. V moči po vysokých dávkách kofeinu (nad 400 mg/den), které jsou však spíše v energetických nápojích než v kávě, stoupá koncentrace hořčiku, sodíku, draslíku, fosfátu, kreatininu, chloridu a také vápníku, což zvyšuje riziko vzniku osteoporózy (Popkin et al. 2006). Běžná konzumace kávy (do 300 mg kofeinu/den) dehydrataci nezpůsobuje.

### **Oběhová soustava**

Častým argumentem, proč nekonzumovat kávu, je její možný vliv na zvyšování krevního tlaku (TK) a zvýšení rizika infarktu myokardu. Z experimentálních i klinických studií je prokázáno, že kofein zvyšuje koncentraci látek aktivujících sympatický nervový systém (adrenalin, noradrenalin a kortizol). Je však nutné rozlišovat vliv jednorázové dávky kofeinu, která i u normotenzních jedinců zvyšuje systolický a diastolický TK o 3 – 14 mm Hg, a vliv dlouhodobé konzumace, při níž časem dochází k jeho toleranci. Na zvýšení TK má průkazně větší vliv kofein samotný než káva, neboť kofein podávaný ve formě tablet zvyšoval TK čtyřikrát více než pití kávy se shodným obsahem kofeinu (Greenberg et al. 2006). Naproti tomu káva může mít na regulaci krevního tlaku vliv pozitivní, a to třeba díky CGA, která je v ní nejvíce zastoupeným polyfenolem s výrazným antioxidačním účinkem. Bylo prokázáno, že podávání chlorogenové kyseliny pacientům s mírnou hypertenzí snižovalo již po 12 týdnech systolický TK o 10 mm Hg a diastolický TK o 7 mm Hg, snižovalo koncentraci homocysteinu, zlepšovalo endoteliální funkce a vazodilataci. CGA zpomaluje výdej glukózy z jater a snižuje vstřebávání glukózy ze střeva, zatímco podávání samotného kofeinu má účinky opačné (Bonita et al. 2007). Dokonce bylo zjištěno, že konzumace kávy tlumila zvyšování krevního tlaku způsobené konzumací alkoholu. Epidemiologické studie ukazují, že konzumace méně než 5 šálků za den nezvyšuje riziko infarktu myokardu, avšak vyšší dávky byly se zvýšeným rizikem spojené.

Vedle oběhové soustavy působí kofein i na **respirační systém**. V nízkých dávkách (5 mg/1kg t.hm.) mírně zlepšoval až na 4 hodiny činnost dýchacích cest u astmatiků. Lze ho tedy považovat za slabé bronchodilatans, stejně jako chemicky podobný theofilin.

### **Kancerogeneze**

V literatuře bývá diskutován vliv kávy, resp. kofeinu na riziko vzniku karcinomů, ale výsledky studií jsou zatím velmi nejednotné a nejsou objasněné ani mechanismy účinků. U lidí pijících kávu v porovnání s těmi, co ji nepijí vůbec, bylo v některých studiích zjištěno mírně zvýšené riziko vzniku karcinomu močového měchýře, v jiných je ale tato teze vyvrácena. U potkanů podávání kofeinu působilo preventivně u karcinomů prsních žláz, avšak u lidí tyto asociace prokázány nebyly. Autoři těchto studií nevyklučují, že riziko vzniku karcinomů může být z velké míry ovlivněno kouřením, stresem a hlavně genetickou zátěží. Na konci 80. let bylo zjištěno, že za pozitivní účinky, jimiž zelená i pražená káva pozitivně působily, mohou diterpeny cafestol a kahweol v nich obsažené. Riziko vzniku gliomů a kolorektálního karcinomu u lidí bylo konzumací kávy naopak ovlivněno příznivě. Kofeinová i bezkofeinová káva totiž zvyšuje motilitu střev (Michels et al. 2007).

### **Cholelitiáza**

Metabolické studie ukázaly, že káva ovlivňuje hepatobiliární procesy, které se podílí na tvorbě žlučových kamenů z cholesterolu. Pití kofeinové kávy působilo preventivně před vznikem cholelitiázy u lidí i experimentálních modelů. Káva stimuluje kontrakce žlučníku, sekreci žaludeční kyseliny, motilitu kolonu a zrychluje metabolismus trávení. Na druhé straně káva způsobuje pálení žáhy a podněcuje gastroesofageální reflux, který však není asociován s dyspepsií.

### **Zrak**

V současné době probíhají studie, ve kterých je sledována schopnost kofeinu inhibovat formy reaktivního kyslíku, které indukují oxidační stres v oční čočce, a chránit tak oko před vytvářením katarakty.

### **Gravidita a laktace**

Kofein má schopnost prostupovat placentou do krevního řečiště plodu a později přechází i do mateřského mléka. Existují obavy, že kofein by mohl retardovat růst v období tzv. otevřeného okna vývoje plodu a indukovat spořivý fenotyp, který v dospělosti vyústí v metabolické poruchy spojované s diabetem 2. typu. Retardace růstu plodu byla zjištěna při po konzumaci více jak 6 šálků kávy za den. Bylo zjištěno, že spontánní potraty nejsou vázané přímo na spotřebu kávy, ale bývají dány genetickou výbavou související s metabolismem kofeinu (cytochrom P450 fenotyp CYP1A2). Ženy s geneticky zakódovaným pomalým metabolismem kofeinu mají vyšší riziko spontánních potratů a vykazují silnější statistickou vazbu mezi spotřebou kofeinu a spontánními potraty. Četné studie prokazují, že dávka 150 mg kofeinu za den (2 – 3 šálky kávy) je bezpečná, nezpůsobuje spontánní potraty, nebrzdí intrauterinní růst a nenarušuje vývoj plodu (Clauson et al. 2008). Stejná omezení platí i v případě žen, které kojí. Děti žen, jež konzumovaly větší množství kávy, byly podrážděné a trpěly nespavostí.

### **Diabetes 2. typu**

Protektivní vliv kávy byl prokázán na riziko vzniku diabetu v rozsáhlých, rozličně designovaných, studiích čítajících statisíce lidí. Ženy po menopauze reagovaly na kávu stejně jako muži. Konzumace bezkofeinové kávy bývá spojována sice s mírnějším snížením rizika diabetu, avšak i z těchto výsledků lze usuzovat, že k redukci rizika přispívají též jiné látky než kofein samotný. Pouze v malém počtu studií nebyl sice protektivní účinek kávy prokázán, ale současně nebyl pozorován ani její negativní vliv na krevní tlak nebo riziko diabetu. Zvýšené riziko zhoršené glukózové tolerance byl zaznamenán u osob konzumujících více jak 5 šálků kávy za den. Na rozdíl od kávy, která obsahuje kromě kofeinu řadu dalších látek, jednorázové podání samotného kofeinu v dávce odpovídající 2 – 3 šálkům kávy zvýšilo glykémii v důsledku sníženého využití glukózy ve tkáních. Negativní účinek kávy byl průkazně zjištěn pouze v případě, že byla káva připravovaná varem bez filtrace nebo vyluhovaná po zalití vařící vodou. Takový nápoj obsahuje diterpeny kafestol a kahweol, které snižují syntézu žlučových kyselin, zvyšují koncentraci LDL-cholesterolu v séru o 8 - 10 %, zvyšují oxidabilitu lipoproteinových LDL částic, a tím i jejich aterogenitu (Bonita et al. 2007).

U pacientů s jaterní fibrózou pití dvou šálků kávy po dobu 6 měsíců redukovalo projevy tohoto onemocnění. Kofein z jiných zdrojů než z kávy tento příznivý účinek nevykazoval. Příznivé účinky kávy byly zjištěny u pacientů s chronickou hepatitidou C, kde káva snižovala jaterní enzymy (ALT, AST), C-reaktivní protein při zvýšené konzumaci alkoholu a progresi onemocnění (Kawaguchi et Sata 2010).

### **Vlastní experiment**

S ohledem na snahu detailněji prozkoumat mechanismy, kterými by káva mohla pozitivně působit na metabolismus sacharidů a lipidů, cílem naší studie bylo sledovat účinky dlouhodobého podávání kávy u experimentálního modelu metabolického syndromu – u hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (HHTg). Tento kmen potkanů vykazuje vedle poruch lipidového metabolismu i výraznou rezistenci tkání k účinku inzulínu, hyperinzulinémií a mírnou hypertenzi. Metabolické abnormality jsou potencovány dietou s vysokým podílem sacharózy nebo fruktózy. Zvířatům byla káva podávána ve formě nápoje připraveného z mleté zrnkové kávy ve standardním překapávací s filtrem po dobu 10 týdnů v dávce odpovídající spotřebě kávy u lidí.

Glukózová tolerance byla sledována pomocí orálního glukózového tolerančního testu, koncentrace triglyceridů ve svalech a játrech byly stanoveny po extrakci z homogenátu tkání. Syntéza glykogenu byla sledována ve svalové tkáni podle inkorporace <sup>14</sup>C-U-glukózy do glykogenu. Senzitivita tukové tkáně k účinku inzulínu byla měřena podle inkorporace

$^{14}\text{C}$ -U-glukózy do lipidů v tukové tkáni inkubované bez inzulinu nebo s inzulinem (250  $\mu\text{U}/\text{ml}$ ). Oxidace mastných kyselin byla stanovena *in vitro* podle inkorporace  $^{14}\text{C}$  – palmitátu do  $\text{CO}_2$ . Lipolýza v tukové tkáni byla sledována podle uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) *in vitro* při inkubaci tkáně bez a s adrenalinem (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Koncentrace triglyceridů, inzulinu, glukózy a NEMK v séru byly stanoveny komerčně dostupnými soupravami.

Použitá dávka kávy v našich pokusech neovlivnila tělesnou hmotnost ani hmotnost viscerální tukové tkáně a naše výsledky tak nepodpořily jednu z hypotéz, podle níž je příznivý vliv kávy důsledkem poklesu tělesné hmotnosti a úbytku tukové tkáně. Naše výsledky naznačují, že pozitivní účinky kávy mohou souviset se zmenšenou velikostí adipocytů, na kterou lze usuzovat podle zvýšené koncentrace bílkovin v tukové tkáni. Menší velikost adipocytů může být důsledkem úbytku triglyceridů při zvýšené lipolýze nebo důsledkem tvorby nových metabolicky aktivnějších buněk. Svědčí pro to zvýšená bazální i inzulinem stimulovaná utilizace glukózy v tukové tkáni. Nejvýraznější změnou v naší studii bylo zvýšené bazální i adrenalinem stimulované uvolňování NEMK z tukové tkáně (bazální:  $1,18 \pm 0,13 \mu\text{mol}/\text{g}$  vs  $1,18 \mu\text{mol}/\text{g} \pm 0,13$ ,  $p < 0,001$ , stimulovaná:  $1,61 \mu\text{mol}/\text{g} \pm 0,11$  vs  $2,28 \mu\text{mol}/\text{g} \pm 0,14$ ,  $p < 0,01$ ). Možným mechanismem, kterým kofein v kávě způsobuje zvýšení lipolýzy je zvýšená sekrece katecholaminů nebo působení na adenosinové receptory. Kofein (1,3,7-trimethylxantin) je metabolizován na dimethylxantiny: paraxantin, theofylin a theobromin, jejichž podobná struktura jakou má adenosin jim umožňuje vázat se na adenosinové receptory a přes cAMP zvyšovat lipolýzu. Zvýšené uvolňování NEMK z tukové tkáně nezvýšilo sérové koncentrace NEMK, pravděpodobně v důsledku jejich zvýšené oxidace v játrech a ve svalové tkáni. S tím může souviset i nižší akumulace triglyceridů v játrech u skupiny potkanů, které byla podávána káva. V našem experimentu podávání kávy snižovalo utilizaci glukózy ve svalové tkáni pravděpodobně v důsledku zvýšené oxidace mastných kyselin. Nicméně snížená utilizace glukózy ve svalech byla zřejmě kompenzována zvýšenou utilizací glukózy v tukové tkáni, takže glukózová tolerance nebyla negativně ovlivněna a snížené hladiny sérového inzulinu svědčí pro zlepšení inzulinové rezistence.

Součástí poruch provázejících metabolický syndrom je zvýšený oxidační stres, který se může podílet na rozvoji inzulinové rezistence a jejich kardiovaskulárních komplikací. Naše nálezy pozitivního účinku kávy na aktivitu antioxidantních enzymů a produkci lipoperoxidů v séru a v myokardu naznačují jednu z možností, která se může uplatnit v účincích kávy na snížení rizika rozvoje diabetu.

Z výsledků vyplývá, že v mechanismu účinku kávy na snížení rizika rozvoje diabetu se může uplatnit zvýšená senzitivita tukové tkáně k účinku inzulinu, snížená akumulace triglyceridů v játrech a zvýšená aktivita antioxidantních enzymů.

### Shrnutí

Lze konstatovat, že káva v dávce 3 - 5 šálků o objemu 150 ml (tj.  $\leq 300$  mg kofeinu) za den, nepředstavuje zdravotní riziko pro zdravé jedince nebo ty, kterým není nutné omezit tento nápoj z jiných závažných důvodů (přecitlivělost na kofein, kontraindikace s léčivými). Negativní důsledky může mít konzumace kávy v denních dávkách přesahujících 500 mg kofeinu. Opatrnost je na místě v případě energetických „soft“ nápojů konzumovaných ve velké míře. Obsahují jak vysoké dávky samotného kofeinu, tak velké množství sacharózy, která zvyšuje riziko obezity, metabolických poruch a hypertriacylglyceridémie vedoucích k rozvoji diabetu 2. typu.

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

**Lliteratura**

- **Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J.** Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol Res* 2007; 55(3): 187-198.
- **Cao C, Wang L, Lin X, et al.** Caffeine synergizes with another coffee component to increase plasma GCSF: linkage to cognitive benefits in Alzheimer's mice. *J Alzheimers Dis* 2011; 25(2): 323-335.
- **Clauson KA, Shields KM, McQueen CE, Persad N.** Safety issues associated with commercially available energy drinks. *J Am Pharm Assoc* 2008; 48(3): e55-63.
- **Daglia M, Tarsi R, Papetti A, et al.** Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agric Food Chem* 2002; 50(5): 1225-1229.
- **Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, et al.** Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *J Alzheimers Dis* 2009; 16(1): 85-91.
- **Greenberg JA, Boozer CN, Geliebter A, et al.** Coffee, diabetes, and weight control. *Am J Clin Nutr* 2006; 84(4): 682-693.
- **Föcking M, Schmiegelt D, Trapp T.** Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337(2): 435-439.
- **Kawaguchi T, Sata M.** Importance of hepatitis C virus-associated insulin resistance: therapeutic strategies for insulin sensitization. *World J Gastroenterol* 2010; 16(16): 1943-1952.
- **Michels KB, Willett WC, Fuchs CS, Giovannucci E.** Coffee, Tea, and Caffeine Consumption and Incidence of Colon and Rectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 97(4): 282-292.
- **Popkin BM, Armstrong LE, Bray GM, et al.** A new proposed guidance system for beverage consumption in the United States. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(3): 529-542.
- **Song SJ, Choi S, Park T.** Decaffeinated green coffee bean extract attenuates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014: 718379.
- **Stookey JD.** The diuretic effects of alcohol and caffeine and total water intake misclassification. *Eur J Epidemiol* 1999; 15(2): 181-188.
- **Volz N, Boettler U, Winkler S, et al.** Effect of coffee combining green coffee bean constituents with typical roasting products on the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 2012; 60(38): 9631-9641.

## MILD HYPERHOMOCYSTEINEMIAS (>30UMOL/L) CAUSED BY FOLATE DEFICIENCY DUE TO POLYMORPHISM OF MTHFR C677T AND A1289C IN PATIENTS FROM METABOLIC UNIT WITH CARDIOVASCULAR RISK

J. Hyánek, V. Matoška, L. Dubská, B. Míková, H. Pejznochová, J. Dvořáková,  
L. Táborský, V. Martiníková, J. Privarová

*Dept. Clinical Biochemistry and Metabolic Unit in Hospital,, Na Homolce“ Prague*

### Introduction

In a cohort of patients with high cardiovascular risk and hypercholesterolemia attending within last 15 years our metabolic unit, the authors detected and metabolically distinguished the group possessing with the mild hyperhomocysteinemia (mHHC) > 30µmol/l caused by deficiency of plasmatic folate (PF) This type of deficiency is caused by decreased enzyme activity of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) due to its polymorphism in genome mutation - genotype C677T or A1298C. Supplementation with folic acid effectively increased the PF and accordingly decreased the plasmatic total homocysteine (tHcy). The frequency of MTHFR deficiency in Czech population is similar to populations Nordeuropean or Nordamerican.

### Patients and Methods

44 patients (20 - 70 yrs) were selected from 156 molec.genetically confirmed patients as homozygote or heterozygote for MTHFR polymorphism 677 C > T or 1298A > C with tHcy > 30 µmol/l and high Risk Score; out of routine biochemical and haematological analyses - accompanied following investigations were also performed: plasmatic folate (PF), folate in erythrocytes (EF), holotranscobalamin (HTC), methylmalonic acid (MMA), pyridoxal phosphate, methionine (Met), cystathionine (Cystat), adenosylmethionine (adoMet), adenosylhomocysteine (adoHcy).

Patients with increased creatinine, epileptics on barbiturates,diabetics,vegans and vegetarians and vitamins „eaters“ were excluded. Therapeutical supplementation with 5 - 10 mg Acidum folicum (Léčiva/Zentiva) / weekly. 30 healthy blood donors from transfusion bank were used as healthy control.

Lipid spectrum and tHcy performed on analysers Unicel DxC800 a LX 20 Beckman Coulter. Apo B and immunochemical estimated on analyser Image 800 Beckman Coulter. Haematological analyses on XE 5000 Sysmex, HTC immunoanalytical MEIA on Architect 2000 Abbot. PF a EF with CLIA method on analyser Cobas e411 Roche. Pyridoxal phosphate on HPLC Agilent, MMA on HPLC or GC/MS analysers of Institute for Inherited Metabolic Disorders 1st Medical Faculty, Charles University Prague. Mol. genetic analyses of MTHFR polymorphism performed with PCR amplification and High Resolution Melting analyses. Statistical evaluation on analyser STAPO with  $p > 0.001$  significance (RNDr. M. Dostál, DrSc. IEB CAV Prague).

### Results

The mutation of MTHFR C677T in TT homozygotes proved as causal for mHHC in 69 % of patients; modulatory significant in 88 % of patients. The cohort of homozygotes or heterozygotes show significantly higher tHcy concentrations and decreased levels of PF and EF ( $p > 0.001$ ). Correlation coefficient for TT: - 0,853; for CT: - 0,653; for healthy controls: + 0,235. 14 % of selected patients possessed with both mutations of MTHFR polymorphism in heterozygotic form. All patients were positively influenced by recommended doses of folic acid but the normalization of increased plasmatic level of tHcy or of decreased PF was

different and individual from patient to patient. The study is accompanied by patients case history descriptions of myocardial infarctions, strokes ,spina bifida including positive pedigrees of their families and effective therapeutic monitoring.

### Discussion

In spite of the fact that Norwegian Vitamin Trial (NORVIT), Westnorwegian Vitamin Trial (WENBIT) a Hordaland Homocysteine Studies refused without any causal or metabolic explanation hyperhomocysteinemia treated with B-vitamins as ineffective for diminishing factor of cardiovascular risk (1,2,3). The increased levels tHcy > 30 umol/l remains the strong predictor of CVD risk and needs the appropriate metabolic evaluation esp. in patients suffering from other risk factors as smoking, incipient renal disease, hypercholesterolemia, hypertension, diabetes etc. (4,5,8). The detection of TT homozygosity of MTHFR polymorphism in population is relatively common (10 - 15 %) and accelerates metabolic dysbalance, because TT individuals develop elevated tHcy more easy under conditions of impaired folate status. mHHC diagnostic significance has been proved also in recurrent early pregnancy loss, placental abruptions, neural tube defects and preeclampsias (2,3,8). Incidence of CVD complications is different in different ethnical groups esp.

Japanese or Turkish, where the strong association of TT genotype with CVD was repeatedly observed (6,7). Metaanalysis of 107 MTHFR studies by Wald et al. stress the causal effect of high tHcy on ischemic heart disease and it has not been till now explained reasonably by publication bias - for example most of patients in the above mentioned trials took aspirin which might negate the antiplatelet effect of lowering of tHcy concentration, living style has not been respected etc. (5,6).

### Conclusion

Hyperhomocysteinemias from the deficiency of plasmatic folate due to MTHFR TT homozygosity is the 3rd group of hyperhomocysteinemias detected in our Slavonic population (1st renal insuficiency, 2nd vitamin B12 deficiency). It is very easy treatable by folate supplementation and that's why it needs more diagnostic attention of physicians esp. internists, cardiologist, nephrologists, paediatricians, neurologists and perinatologists ect.

### References

1. **Bena KH, Nyolsstad I, Ueland PM, et al.** Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarcts. *N Engl J Med* 2006; 354(15): 1578-1588.
2. **Blom HJ, Smulders Y.** Overview of homocysteine and folate metabolism with special reference to cardiovascular diseases and neural tube defects. *J Inher Metab Dis* 2011; 34(1): 75-81.
3. **Ueland PM, Clarke R.** Homocysteine and coronary vascular risk: considering the evidence in the context of study design, folate fortification and statistical power. *Clin Chem* 2007; 53(5): 807-809.
4. **Nygård O, Volset SE, Refsum H, et al.** Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995; 274(19): 1526-1533.
5. **Nygård O, Refsum H, Ueland P, Vollset SE.** Major life style determinant of plasma total homocysteine distribution. The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1998; 67(2): 263-270.
6. **Ou T, Yamakaw-Kobayashi K, Arinami T, et al.** Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphism are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: a case control study. *Atherosclerosis* 1998; 137(1): 23-28.

7. **Tokgozoglul SL, Alikasifoglu M, Unsal L, et al.** Methylenetetrahydrofolate reductase genotype and their risk and extent of coronary artery disease in a population of low plasma folate. *Heart* 1999; 81(5): 518-522.
8. **Ueland PM, Refsum H, Beresford SAA, et al.** The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2): 324-332.
9. **Wald DS, Bestwick JP, Wald NJ.** Homocysteine as a cause of ischemic heart disease: The door remains open. *Clin Chem* 2012; 58(10): 1488-1490.



**TRIACYLGLYCEROLY A KARDIOVASKULÁRNÍ CHOROBY****TRIACYLGLYCEROLS AND CARDIOVASCULAR DISEASE****L. Kazdová, H. Malínská, V. Škop, J. Trnovská, I. Marková, M. Huttl***Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha***Abstract**

The specific role of triacylglycerols (TAG) in cardiovascular diseases has long been controversial. In recent years renewed interest has been stimulated by epidemiological evidence showing that raised TAG or TAG-rich lipoproteins may be involved in the pathogenesis of cardiovascular disease. It is difficult to conclude, that TAG are independent risk factor since hypertriacylglycerolemia is associated with another factors of metabolic disorders: low level of HDL, elevated levels of small dense LDL particles, obesity or insulin resistance. Complication factor is related to fasting versus postprandial measurements of TAG. Recent studies suggested that nonfasting blood TAG may be a better risk marker for cardiovascular risk. Different studies showed that chylomicron and VLDL remnant particles are able to penetrate into arterial wall and accelerate cardiovascular disorders.

Problematice hypertriglyceridémie je v posledních letech věnován značná pozornost vzhledem k přibývajícím důkazům o její účasti v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění (KVO). Je zajímavé, že již před více než 30 lety publikoval Zilversmit (1979) hypotézu o vlivu zvýšených postprandiálních hladin triacylglycerolů (TAG) a remnantních lipoproteinů na rozvoji aterosklerózy. V pozdějších letech byla v souvislosti s kardiovaskulárními chorobami pozornost věnován převážně LDL cholesterolu, který je nejvýznamnější příčinou KVO a je i cílem pro prevenci a terapii. Přispěla k tomu zejména:

- 1) identifikace mutací LDL receptorů jako příčina familiální hypercholesterolemie – což bylo oceněno udělením Nobelovy ceny v r. 1985 dr. Brownovi a Goldsteinovi
- 2) poznatky o tvorbě oxidativně modifikovaných LDL a jejich účasti na tvorbě aterosklerotických lézí
- 3) objev statinů jako účinné terapie hypercholesterolemie a jejich negativních důsledků

V průběhu let se ukázalo, že i když léčba statiny přispěla k poklesu incidence KVO, stále zůstává morbidita a mortalita na kardiovaskulární choroby vysoká, což svědčí pro účast dalších rizikových faktorů v rozvoji těchto nemocí.

Výsledky řady studií ukázaly, že významným faktorem, který přispívá ke KVO jsou zvýšené hladiny TAG (Miller et al. 2015). Otázka zda izolovaná hypertriacylglycerolemie je rizikovým faktorem KVO je po řadu let předmětem diskuzí, protože je komplikována současně zvýšenými hladinami sérových TAG, sníženými hladinami HDL cholesterolu a řadou dalších metabolických poruch včetně obezity, inzulínové rezistence, zánětem a ektopickým ukládáním lipidů. Nález z recentních studií, které zpochybnily význam nízkých hladin HDL cholesterolu jako příčiny rozvoje KVO, stimulovaly zájem o úlohu TAG a jejich degračních produktů v patogenezi kardiovaskulárních poruch.

**Jaké jsou důkazy pro úlohu TAG v rozvoji KVO?****Epidemiologické nálezy**

První meta-analýza uveřejněná v r. 1996 ukázala, že zvýšené koncentrace TAG v lačném nebo postprandiálním stavu byly asociovány se zvýšeným rizikem CHD a to i po úpravě na

HDL cholesterol (Hokanson and Austin 1996). I později publikované meta-analýzy a další klinické studie (Women's Health Study, Copenhagen City Heart Study, Emerging Risk Factors Collaboration -3320430 individuals) potvrdily zvýšené riziko ischemické choroby srdeční při zvýšené lačné a postprandiální hypertriglyceridémii. Tyto a další studie ukázaly, že zvýšené hladiny lačných TAG vyšší než 2,2 mmol/l zvyšují riziko KVO.

### **Měření TAG v lačném nebo v postprandiálním stavu?**

Tradičně jsou sérové lipidy měřeny u pacientů po nočním lačnění. V některých zemích, k nimž patří například Dánsko, kde jsou od roku 2009 měřeny hladiny plazmatických TAG v postprandiálním stavu a přesahuje-li zjištěná koncentrace hodnotu 4 mmol/l, jsou u těchto jedinců navíc měřeny TAG i v lačném stavu. Předností toho způsobu zjišťování hladin TAG jsou:

- a) větší možnosti stanovení TAG například při běžné návštěvě u lékaře
- b) postprandiální lipidy lépe jsou lepšími prediktory rizika KVO
- c) jsou lepším indikátorem průměrné koncentrace TAG, vzhledem k tomu, že lidé jsou, kromě krátké doby ráno, většinu dne v postprandiálním stavu

Příjem potravy ve formě běžné snídaně ovlivňuje hladiny TG v rozmezí 0,2 – 0,4 mmol/l, což není závažné z klinického hlediska (Langsted et al. 2008).

Stanovení krevních koncentrací TAG v lačném stavu má také opodstatnění:

- a) koncentrace TAG jsou stabilnější
- b) kalkulace LDL cholesterolu podle Friedewaldovy rovnice byla vytvořena pro stanovení lačných hodnot. Tento argument není aktuální při použití modifikované verze nebo při přímém stanovení LDL cholesterolu (Martin et al. 2013)
- c) další metabolické parametry (např. glukóza) jsou rovněž měřeny v lačném stavu. Nicméně, v současné době je pro hodnocení dávana přednost glykovanému hemoglobinu (HbA<sub>1c</sub>), který není nutné stanovit v lačném stavu
- d) měření krevních koncentrací TAG po orální tukové zátěži (75 g tuku, 25g sacharidů, 1g bílkovin) je ukazatelem spíše postprandiálních hladin, nikoliv průměrné koncentrace TAG (koncentrace TAG ≤ 2,5 mmol/l je považována za normální hodnotu).

### **Populační distribuce hypertriglyceridémie**

Normální hodnoty: < 1,7 mmol/l

Hraniční 1,7 - 2,3 mmol/l

Vysoké 2,3 - 11 mmol/l

Velmi vysoké 11 - 22 mmol/l

Velice závažné ≥ 22 mmol/l

Podle epidemiologické Kodaňské studie „Copenhagen General Population Study“ je v Dánsku u 27 % obyvatel hladina TAG 2 - 10 mmol/l, 0,1 % obyvatel má závažnou hypertriglyceridémii ≥ 10 mmol/l. (Langsted et Nordestgaard 2011).

V USA 31 % populace má TAG ≥ 1,7 mmol/l,

16 % populace má TAG ≥ 2,3 mmol/l

1,1 % populace má TAG ≥ 5,5 mmol/l

V USA byla hypertriglyceridémie zjištěna u 16 % mladistvých ve věku 18 - 19 let.

Mírně zvýšené hladiny TAG ≥ 1,7 – 5,5 mmol/l jsou spojeny s vyšším rizikem kardiovaskulárních poruch. Naproti tomu koncentrace TAG ≥ 11 mmol/l nejsou spojeny s KVO, ale zvyšují riziko pankreatitidy.

### **Příčiny hypertriacylglycerolémie**

Na mírně zvýšené koncentraci krevních TAG se podílí vlivy genetické a životního stylu. Mírně zvýšené koncentrace TAG (2,2 – 5,5 mmol/l) jsou většinou multigenní, kdy dochází k interakci faktorů životního stylu s více jak 30 geny. K tomu dochází při obezitě, snížené fyzické aktivitě, nadměrné konzumaci alkoholu, nadměrném energetickém příjmu a diabetu 2 typu nebo při lipoystrofií. (Hegele et al. 2013).

Vzácnější jsou autozomální monogenní poruchy, při kterých hladiny TAG jsou zvýšena na > 11 mmol/l a které souvisí se šesti rozdílnými geny – LPL, APOC2, APOA5, LMF1, GPIHBP1 and GPD1.

Příčinami velmi vysokých koncentrací krevních TAG (> 11 mmol/l), které mohou být asociovány s pankreatitidou mohou být faktory:

- genetické (deficience LPL, apoCII, apoAV, familiální hypertriacylglycerolémie)
- metabolické poruchy (hypothyreodismus, nedostatečně kompenzovaný insulin)
- dependentní diabetes
- farmakologické (steroidy, alfa-interferon, inhibitory proteáz a řada dalších farmak)

### **Patofyziologie hypertriacylglycerolémie**

Hypertriacylglycerolémie může být důsledkem:

- abnormální produkce VLDL v játrech a syntézy chylomikronů ve střevě
- zvýšené de novo syntézy TAG v játrech při zvýšeném příjmu sacharózy/fruktózy
- dysfunkce lipolýzy mediované lipoproteinovou lipázou
- zhoršeného odstraňování remnantních lipoproteinů

### **Metabolické důsledky hypertriacylglycerolémie**

Zvýšené hladiny cirkulujících TAG v důsledku jejich zvýšené produkce nebo sníženého katabolismu přímo ovlivňují složení a metabolismus nízkodenzitních lipoproteinů (LDL) a HDL. Příkladem mohou být zvýšené hladiny TAG při inzulinové rezistenci. V důsledku akcentované lipolýzy z adipocytů dochází ke zvýšenému transportu mastných kyselin do jater a ke zvýšené sekreci VLDL. Současně dochází k aktivaci cholesterolester transfer proteinu (CEPT), který zvyšuje obsah TAG v LDL. TAG v těchto částicích jsou hydrolyzovány jaterní triglyceridovou lipázou (HTGL) za vzniku malých LDL a modifikovaných dysfunkčních HDL částic. Malé LDL částice jsou proaterogenní – m.j. snadněji podléhají oxidativní modifikaci, Tyto změny jsou součástí mechanismu, kterým se hypertriacylglycerolémie podílí na rozvoji kardiovaskulárních poruch (Boullart et al. 2012).

### **Aterogenicita lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly (TRL)**

I když TAG nejsou klasickým rysem aterogeneze, vzhledem k tomu, že jejich hlavním působením je tvorba energetických zásob nebo jejich využití v myocytech a dalších buňkách jako zdroj energie, mohou jejich lipolytické degradační produkty – remnantní lipoproteinové částice (RLP) pronikat do arteriální stěny a tvořit pěnové buňky podobně jako aterogenní LDL částice. Aterogenicita TRL byla prokázána v řadě klinických observačních studií. Remnantní lipoproteinové částice jsou obsaženy zejména v postprandilání plazmě osob se zvýšenými hladinami TAG. Studie na experimentálních modelech - makrofázích a endoteliálních buňkách - ukázaly, že RLP podporují zánět, tím, že zvyšují expresi prozánětlivých genů (IL-6, adhezních a chemotaktických molekul), expresi koagulačních faktorů, snižují ateroprotektivní a protizánětlivé účinky HDL. Jiným příkladem mechanismu zapojení TRL v procesu aterogeneze je přítomnost apoCIII, který podporuje proaterogenní mechanismy v makrofázích a endoteliálních buňkách (Proctor et al. 2004).

V poslední době se ukázalo, že v procesu aterogeneze může hrát významnou roli lipoproteinová lipáza (LPL) v makrofázích. Makrofágy v cévní stěně jsou jejím bohatým zdrojem a exprese LPL může akcelarovat aterogenezi při interakci cirkulujícími TRL.

### Závěr

Hypertriacylglycerolémie je významný rizikový faktor KVO i když chybí pro její uznání jako nezávislého rizikového faktoru tak přesvědčivé důkazy jako je tomu v případě vysokých hladin cholesterolu. Závažnost hypertriacylglycerolémie je dána tím, že je spojena s dalšími faktory, které mohou zvyšovat proaterogenní účinky, ke kterým patří obezita, metabolický syndrom, a zejména inzulinová rezistence, která podle některých studií může postihovat až 90 % pacientů s hypertriacylglycerolémií. Řada otázek zůstává nevyřešena a patří k nim i tak jednoduché otázky jako je sledování krevních TAG v lačném nebo postprandiálním stavu. Recentní studie ukázaly, že postprandiální TAG mohou být lepším ukazatelem kardiovaskulárního rizika. Na rozvoji kardiovaskulárních poruch se mohou podílet chylomikrony a remnantní VLDL částice nebo jejich lipolytické produkty, které mohou penetrovat do cévní stěny a indukovat zánět a další proaterogenní procesy.

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

### Literatura

- **Boullart ACI, DeGraf J, Stalenhoef AF.** Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. *BBA* 2012; 1821: 867-875.
- **Hegele RA, Ginsbetg HN, Chapman MJ.** The polygenic nature of hypertriglyceridemia: implication for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013; published online Dec 23, [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70191-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70191-8).
- **Hokanson JE and Austin MA.** Plasma triglyceride level is risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996; 3: 213-219.
- **Langsted A, Freiberg JJ, Nordestgaard BG.** Fasting and nonfasting lipid levels: influence of normal food intake on lipids, lipoproteins, apolipoproteins and cardiovascular risk prediction. *Circulation* 2008; 118: 2047-2056.
- **Langsted A and et Nordestgaard BG.** Nonfasting lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in individuals with and without diabetes: 58434 individuals from the Copenhagen General Population Study. *Clin Chem* 2011; 57: 482-489.
- **Martin SS, Blaha MJ, Elzhazly MB, et al.** Comparison of novel method vs Friedwald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from standard lipid profile. *JAMA* 2013; 310: 2061-2068.
- **Miller M, Stone NJ, Ballantyne Ch, et al.** Triglycerides and Cardiovascular Disease. Scientific statement from the American Heart association. *Circulation* 2011; 123: 2292-2333.
- **Nordesgaard BG and Varbo A.** Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet* 2014; 384: 626-635.
- **Proctor SD, Vine DF, Mamo JC.** Arterial permeability and efflux of apolipoprotein B-containing lipoproteins assessed by in situ perfusion and three-dimensional quantitative confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2162-2167.
- **Zilversmit DB.** Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 1979; 60: 473-485.

**MASTNÉ KYSELINY U CHRONICKÉ PANKREATITIDY****FATTY ACIDS IN CHRONIC PANCREATITIS****J. Macášek, B. Staňková, E. Tvrzická, M. Vecka, M. Zeman, A. Žák***IV. interní klinika 1. LF UK a VFN Praha***Abstract**

Chronic pancreatitis (ChP) is a progressive inflammatory disorder characterized by the destruction of parenchyma that is replaced by fibrous tissue. There is evidence that deregulation of fatty acid (FA) metabolism is connected with a number of diseases. We decided to analyze profile of FA in plasma lipid classes in patients with ChP, with 2 type diabetes mellitus (DM) and healthy people. Pattern of FA is affected by many factors including starvation, dietary intake and various pathological states. The aim of the study was to analyze FA pattern in all lipid classes in all groups of patients, to elicit eventual deficiency of essential FA and to detect relationship between clinical or biochemical disturbances and FA profile.

Patients with ChP (n = 21), patients with ChP + DM type 3c (n = 45), and 90 healthy persons were included in the study. Anthropometric and biochemical parameters were examined by conventional methods. Profile of FA in plasma lipids was determined by capillary gas chromatography.

Increased proportion of total monounsaturated FA (MUFA) in all patient groups as well as in all plasma lipid classes was observed. We proved elevations of palmitoleic, oleic and vaccenic acids. These changes were connected with increased  $\Delta 9$ -desaturase of palmitic and oleic acids. We found decreased sum of n-6 polyunsaturated FA (PUFA), especially linoleic acid, in ChP group.

Plasma lipid FA pattern in ChP patients was changed. Changes in FA profile implicated decreased fat intake, increased lipoperoxidation and some pathophysiological mechanisms responsible for disturbed FA metabolism in diseases and importance of appropriate nutritional support.

**Úvod**

Chronická pankreatitida (ChP) je vleklé zánětlivé onemocnění, které vede k destrukci parenchymu slinivky břišní a její náhradě vazivovou tkání. Onemocnění je doprovázeno změnou složení mastných kyselin (fatty acids, FA). Složení FA v lipidech je ovlivňováno mnoha faktory včetně nutričního stavu, složení přijímané potravy a působením chorobných stavů (zánětlivá a nádorová onemocnění). Předmětem studia byla analýza složení FA v lipidových třídách plasmy u pacientů s ChP, ChP s diabetes mellitus (DM) typu 3c s cílem zjistit, se kterými klinickými a biochemickými odchylkami jsou změny FA u pacientů asociovány.

Diabetes mellitus je obecně definován jako stav metabolické dysfunkce s chronickou hyperglykémií (Ewald a Bretzel 2013). Jedná se o onemocnění s heterogenní etiologií a v současné době je diabetes dělen do několika typů (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus, 2003). V recentní literatuře je sekundární diabetes mellitus při chorobách pankreatu definován jako diabetes mellitus 3c (Ewald a Bretzel 2013). Tato klasifikace je užívána též Americkou diabetologickou asociací (American Diabetes Association, ADA) a Světovou zdravotnickou organizací (World Health Organization, WHO). Diabetes mellitus typu 3c byl označován také jako pankreatoprivní či pankreatogenní. V současné době jsou v rámci příčin tohoto typu zahrnována onemocnění exokrinní složky

pankreatu jako akutní pankreatitida, ChP, stav po pankreatektomii, hemochromatóza, cystická fibróza, karcinom pankreatu a další (American Diabetes Association 2011). Ewald a Bretzel (2013) uvádějí, že v 78,5 % je příčinou chronická pankreatitida a druhou nejčastější příčinou karcinom pankreatu. Mnoho pacientů s DM typu 3c je mylně diagnostikováno jako DM 2. typu. Byla navržena hlavní a vedlejší diagnostická kritéria (Ewald a Bretzel 2013). Hlavní kritéria, která musí být všechna splněna, jsou:

- 1) přítomnost exokrinní pankreatické insuficience
- 2) nález na zobrazovacích metodách odpovídající příslušné pankreatopatii
- 3) nepřítomnost autoimunitních markerů při diabetes mellitus 1. typu

Vedlejší kritéria zahrnují:

- 1) porušenou funkci  $\beta$ -buněk pankreatu
- 2) nepřítomnost vyšší inzulínové resistance
- 3) porušenou sekreci inkretinů
- 4) nízkou sérovou koncentrací liposolubilních vitaminů

V literatuře dosud neexistuje konzistentní práce podrobně se zabývající složením FA u tohoto typu DM.

### **Materiál a metody**

Do observační studie bylo zařazeno 156 pacientů, z toho bylo 21 pacientů s ChP + DM, 45 pacientů s ChP bez DM a 90 kontrolních osob. Diagnóza ChP byla provedena na základě klinického obrazu (bolesti břicha, dyspepsie, nechutenství, malnutrice, steatorea) potvrzeného minimálně dvěma zobrazovacími metodami (USG/ kontrastní CT; ERCP/MRCP a EUS) postupem publikovaným dříve (Kodydková et al. 2013). Do studie byli zařazeni pouze pacienti s jednoznačně potvrzenou diagnózou ChP. Měření fekální elastázy (FELA) bylo využito jako nepřímý marker exokrinní dysfunkce (koncentrace fekální elastázy < 200 ng/g) (Ewald et al. 2009). Do kontrolní skupiny byli zařazeni zdraví dobrovolníci a pacienti s funkčními zažívacími chorobami. Pro obě skupiny platila stejná vylučovací kritéria: léčba antioxidanty (farmakologické dávky vitaminu C a E, allopurinol, N-acetylcystein), suplementace PUFA n-3 a n-6, známá nefropatie (kreatinin > 150  $\mu$ mol/l), manifestní proteinurie (> 500 mg/l), hepatopatie, dekompenzovaný DM, endokrinopatie, akutní pankreatitida a akutní recidiva ChP, nestabilní angina pectoris, akutní IM, PTCA, revaskularizační operace (v době < 1 rok). Dále byli vyloučeni nemocní po prodělaném krvácení do GIT a systémovém zánětu (do 6 měsíců). Studie byla schválena etickou komisí VFN a 1. LF UK.

Běžné laboratorní parametry byly vyšetřeny rutinními metodami v Centrálních laboratořích Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN v Praze. Složení FA ve fosfolipidech plasmy bylo vyšetřeno kapilární plynovou chromatografií pojejich předchozí separaci preparativní tenkovrstevnou chromatografií (Tvrzická et al. 2002). Jako parametr oxidačního stresu byla měřena koncentrace konjugovaných dienu v precipitovaných LDL (KD/LDL) spektrofotometrickou metodou (Ahotupa et al. 1996).

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD pro parametrické veličiny a jako medián (0,25 - 0,75 percentil) pro neparametrické veličiny. Normalita byla testována prostřednictvím Shapiro-Wilkova W testu. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami a kontrolními soubory byly zkoumány pomocí jedno-faktorové ANOVY s Neuman-Keulsovým post-testem. Pro neparametrickou analýzu byla použita Kruskal-Wallisova ANOVA. Pro všechny statistické analýzy byl používán program STATISTICA 10.0 (Stat Soft, CZ). Za statisticky signifikantní byly považovány výsledky s  $p < 0,05$ .

## Výsledky

Antropometrická a základní biochemická data sledovaných skupin jsou uvedena v tabulkách 1 a 2. U pacientů s ChP + DM bylo zjištěno významné zvýšení tělesné hmotnosti a hodnoty BMI. U obou skupin ChP se zvětšil obvod pasu i poměr pas/boky, obvod boků byl snížen u pacientů s ChP. Přítomnost chronického zánětu pankreatu i DM může mít vliv na distribuci tělesného tuku, každý z faktorů však působí odlišným způsobem.

Celková bílkovina byla významně zvýšená jen u skupiny ChP + DM, koncentrace albuminu byla u obou skupin nezměněná. U pacientů s ChP jsme zaznamenali signifikantně nižší hodnotu kreatininémie, u skupiny ChP + DM byla tato hodnota významně zvýšena, stejně jako hodnota urikémie. Z dalších biochemických parametrů byly u skupiny ChP zvýšené hodnoty GGT, ALP a Hcy, zvýšení onkomarkeru CA 19-9 nedosáhlo statistické významnosti. U skupiny ChP + DM došlo k významnému zvýšení hodnot ALT, GGT, ALP a onkomarkeru CA 19-9.

Lipidové parametry a parametry glukózové homeostázy jsou uvedeny v tabulce 3. Hladiny TAG byly vyšší u obou skupin pacientů; u skupiny ChP jsme našli vyšší koncentrace apoA1 a snížené koncentrace Lp-a; u skupiny ChP + DM byly signifikantně zvýšené hodnoty neesterifikovaných FA. Hodnoty glykémie byly významně zvýšené u obou skupin, u pacientů s ChP + DM byly zvýšené i hodnoty inzulinémie, koncentrace C-peptidu a hodnota indexu HOMA-IR.

Koncentrace jednotlivých FA a jejich skupin jsou uvedeny v tabulce 4. U obou skupin jsme pozorovali významně zvýšený obsah celkových MUFA jako výsledek zvýšeného obsahu kyselin palmitolejové, olejové a vakcenové, a dále snížený obsah PUFA n-6, daný především snížením obsahu kyseliny linolové. Celkový obsah PUFA n-3 byl rovněž snížen u obou skupin, u skupiny ChP - N jako důsledek poklesu DHA, u skupiny ChP - DM díky poklesu EPA. Zvýšení obsahu SFA bylo statisticky významné pouze u skupiny ChP - N, změny v koncentracích jednotlivých SFA statistické významnosti nedosáhly.

## Diskuze

Nejdůležitější změny, které byly v naší studii zaznamenány, jsou zvýšení obsahu celkových MUFA a snížení obsahu PUFA n-6 u obou skupin pacientů.

Změny ve složení FA u ChP jsou komplexního původu. Pravděpodobně zde hraje roli změněný příjem EFA v důsledku maldigesce tuků či sníženého vstřebávání EFA. Deficience EFA v případě malabsorbčního syndromu může mít vliv na metabolismus FA (Siguel a Lerman 1996, Clandinin et al. 1995). Dále se na změnách ve složení FA uplatňují zvýšená lipoperoxidace (Zhang et al. 2008) a zvýšená syntéza eikosanoidů (Schlosser et al. 2002). Zvýšené koncentrace MUFA (kyselin olejové, palmitolejové, vakcenové) zaznamenané v naší práci souvisí se zvýšenou expresí syntázy FA, která může být zvýšeně exprimována ve tkáních slinivky břišní u ChP. Toto zjištění je v souladu s nálezy jiných autorů (Quilliot et al. 2003, Marosvolgyi et al. 2010). Walter et al. (2009) našli zvýšené sérové hladiny syntázy FA u chronické pankreatitidy i u karcinomu pankreatu. V naší studii o karcinomu pankreatu jsme rovněž našli obdobné změny jako u ChP (Macásek et al. 2012). Ve všech lipidových třídách došlo ke zvýšení obsahu MUFA, kyseliny olejové.

V další studii, analyzující složení FA u pacientů s ChP, Quilliot et al. (2003) zahrnuli i pacienty s DM 1. typu a sledovali rozdíly ve složení FA mezi pacienty s DM 1. typu, pacienty s ChP bez DM, pacienty s ChP + DM a kontrolami. Zjistili signifikantně nižší hodnoty kyseliny dokosahexaenové u pacientů s ChP+DM, což přisoudili vlivu DM a deficitu selenu (Quilliot et al. 2003), Dále zjistili vyšší hodnoty MUFA, což popisuje i naše práce.

V naší práci jsme zjistili nižší hodnoty celkových MUFA ve fosfolipidech u ChP i ChP s DM. Dále jsme zjistili zvýšený obsah kyseliny *cis*-7-hexadecenové u ChP. Tato kyselina vzniká  $\beta$ -oxidací kyseliny olejové a lze se domnívat, že u pacientů s pankreatitidou dochází k jejímu

zvýšení. V literatuře jsme nenašli práce, které by zahrnovaly i stanovení obsahu kyseliny *cis-7-hexadecenové*, existují však studie humánní i experimentální, které dávají do souvislosti  $\beta$ -oxidaci se zánětem i přítomností nádoru (Liu 2006, Russell a Tisdale 2002, Hyltander et al. 1991). Zvýšenou koncentrací kyseliny palmitolejové jsme zaznamenali u u ChP+DM. Kyselina olejová měla zvýšený obsah u obou skupin. Kyselina vakcenová byla v naší studii zvýšená u obou skupin. Marosvolgyi et al., 2010 u alkoholické ChP zaznamenali zvýšení v PL a TAG, další autoři obsah kyseliny vakcenové nesledovali.

Nižší celkové hladiny PUFA n-6 jsme zjistili u obou skupin. Marosvolgyi et al. (2010) zjistili u alkoholické ChP snížení PUFA n-6 jen ve třídě CE. Quilliot et al. (2003) v celkovém lipidu LDL změny obsahu PUFA n-6 nezaznamenali. Toto snížení bylo způsobeno především poklesem obsahu kyseliny linolové. U alkoholické ChP byl tento jev pozorován jen v CE (Marosvolgyi et al. 2010), v celkovém lipidu LDL bylo toto snížení pozorováno u skupin s ChP, statistické významnosti však dosáhlo jen u ChP s DM vůči DM 1. typu (Quilliot et al. 2003).

V celkovém obsahu PUFA n-3 jsme nezaznamenali žádné změny. Z jednotlivých PUFA n-3 byl snížený obsah kyseliny dokosahexaenové u skupiny s ChP. Obdobný nálezn byl zjištěn i v celkovém lipidu LDL u skupiny ChP s DM (Quilliot et al. 2003). U alkoholické ChP změny zjištěny nebyly (Marosvolgyi et al. 2010). V literatuře je diskutována otázka suplementace PUFA n-3 u pacientů s akutní pankreatitidou (Wang et al. 2008), kdy byla jedna skupina pacientů 5 dní suplementována sójovým olejem obsahujícím PUFA n-6 a druhá skupina rybím olejem obsahujícím PUFA n-3 0,15 - 0,2 g/kg/den. Na konci studie byla zjištěna signifikantně nižší hodnota CRP a vyšší oxygenační index u pacientů přijímajících PUFA n-3 (Wang et al. 2008). U pacientů s ChP studie o efektu suplementace PUFA n-3 chybí.

### Závěr

U nemocných s ChP byly prokázány specifické změny ve složení FA. Nejvýraznějšími změnami u pacientů s ChP ve všech lipidových třídách byly statisticky signifikantně zvýšené koncentrace celkových MUFA, na kterých se podílely především kyseliny palmitolejová, olejová a vakcenová. Zvýšení koncentrací je pravděpodobně způsobeno zvýšením syntézy FA *de novo* a vyšší aktivitou  $\Delta 9$ -desaturázy kyseliny palmitové a olejové. Podobné změny profilu FA jsou zjišťovány i u mnoha jiných patologických stavů a svědčí o aktivaci uniformních patofyziologických mechanismů.

Současně mají nemocní s ChP snížené koncentrace celkových PUFA n-6, na čemž se podílí především nižší koncentrace kyseliny linolové. Všechny tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny poruchou vstřebávání tuků a následně sníženým příjmem EFA, vlivem kouření a zvýšené konzumace alkoholu. Chronická pankreatitida je charakterizována oxidačním stresem, který rovněž přispívá ke snížení hladin PUFA cestou zvýšené peroxidace lipidů.

V našich studiích byly prokázány významné změny v profilu mastných kyselin u chronických pankreatopatií. Tyto výsledky ukazují vhodnost adekvátní suplementace těchto nemocných EFA a selénem.

*Práce byla podpořena PRVOUK-P25/LF1/2*

### Literatura

- **Ahotupa M, Ruutu M, Mäntylä E.** Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. Clin Biochem 1996; 29: 139-144.
- **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2011; 34: 62-69.
- **Clandinin MT, Zuberbuhler P, Brown NE, et al.** Fatty acid pool size in plasma lipoprotein fractions of cystic fibrosis patients. Am J Clin Nutr 1995; 62: 1268-1275.



- **Ewald N, Raspe A, Kaufmann C, et al.** Determinants of exocrine pancreatic function as measured by fecal elastase-1 concentrations (FEC) in patients with diabetes mellitus. *Eur J Med Res* 2009; 14: 118-122.
- **Hyltander A, Drott C, Körner U, et al.** Elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours. *Eur J Cancer* 1991; 27: 9-15.
- **Kodydková J, Vávrová L, Staňková B, et al.** Antioxidant status and oxidative stress markers in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreas* 2013; 42: 614-621.
- **Liu Y.** Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer.
- **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.
- **Marosvolgyi T, Horvath G, Dittrich A, et al.** Fatty acid composition of plasma lipid classes in chronic alcoholic pancreatitis. *Pancreatol* 2010; 10: 580-585.
- **Quilliot D, Walters E, Böhme P, et al.** Fatty acid abnormalities in chronic pancreatitis: effect of concomitant diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 496-503.
- **Russell ST, Tisdale MJ.** Effect of a tumour-derived lipid-mobilising factor on glucose and lipid metabolism in vivo. *Brit J Cancer* 2002; 87: 580-584.
- **Schlosser W, Schlosser S, Ramadani M, et al.** Cyclooxygenase-2 is overexpressed in chronic pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 26-30.
- **Schneider A, Löhr MJ, Singer MV.** The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease. *J Gastroenterol* 2007; 42: 101-119
- **Tvrzická E, Vecka M, Staňková B, Žák A.** Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection Quantitative aspects. *Anal Chim Acta* 2002; 465: 337-350.
- **Walter K, Hong SM, Nyhan S, et al.** Serum fatty acid synthase as a marker of pancreatic neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2380-2385.
- **Wang X, Li W, Li N, Li J.** Omega-3 fatty acids-supplemented parenteral nutrition decreases hyperinflammatory response and attenuates systemic disease sequelae in severe acute pancreatitis: a randomised and controlled study. *J Parenteral Enteral Nutr* 2008; 32: 236-241.
- **Zhang X, Cui Y, Fang L, Li F.** Chronic high-fat diets induce oxide injuries and fibrogenesis of pancreatic cells in rats. *Pancreas* 2008; 37: 31-38.

**Tab. 1** Základní antropometrické parametry

Proměnná	KON	ChP-N	ChP-DM
Věk	57,51 ± 11,67	54,35 ± 10,38	61,12 ± 9,67
BMI	23,59 ± 2,82	23,82 ± 4,66	26,26 ± 5,39
Váha	69,02 ± 12,10	69,59 ± 14,68	79,62 ± 17,95
Boky	95,84 ± 6,52	90,13 ± 14,28 *	95,71 ± 11,38
Pas	83,31 ± 8,89	88,96 ± 12,41 ***	97,86 ± 16,07 ***
Poměr pas/boky	0,90 ± 0,08	1,03 ± 0,40 ***	1,02 ± 0,06 ***
Systolický krevní tlak	122,10 ± 12,18	124,98 ± 13,60	139,76 ± 26,34 **
Diastolický krevní tlak	77,40 ± 7,46	76,71 ± 8,43	84,67 ± 16,37

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001

**Tab. 2** Základní biochemická data

Proměnná	KON	ChP-N	ChP-DM
Celková bílkovina	74,19 ± 4,22	73,12 ± 7,15	77,52 ± 7,44 **
Albumin	46,05 ± 2,78	44,95 ± 4,65	46,59 ± 2,89
CRP	4,73 ± 5,41	7,02 ± 10,47	10,42 ± 13,44 **
Kreatinin	79,54 ± 14,35	72,46 ± 14,89 *	101,52 ± 72,48 *
Urea	5,30 ± 1,43	4,89 ± 1,47	5,62 ± 1,95
Kyselina močová	282,88 ± 70,59	286,89 ± 92,72	326,9 ± 82,86 *
Bilirubin	12,27 ± 6,44	10,39 ± 6,63	12,53 ± 8,17
AST	0,44 ± 0,11	0,53 ± 0,33	0,54 ± 0,50
ALT	0,42 ± 0,16	0,53 ± 0,41	0,70 ± 0,95 *
GGT	0,44 ± 0,31	3,71 ± 11,02 *	1,94 ± 3,51 **
ALP	1,06 ± 0,24	2,02 ± 2,91 *	2,14 ± 3,16 *
CA_19_9	9,44 ± 5,32	17,44 ± 28,34	19,5 ± 13,76 **
Homocystein	15,03 ± 5,06	17,98 ± 8,70 *	15,93 ± 6,76

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001

**Tab. 3** Lipidové parametry

Proměnná	KON	ChP-N	ChP-DM
Celkový cholesterol	5,23 ± 0,88	5,06 ± 1,22	4,93 ± 1,02
Triacylglyceroly	1,03 ± 0,36	1,43 ± 1,08 *	1,65 ± 0,73 ***
HDL cholesterol	1,57 ± 0,37	1,53 ± 0,63	1,41 ± 0,34
LDL cholesterol	3,08 ± 0,64	2,96 ± 0,87	2,78 ± 0,70
Apo A1	1,43 ± 0,24	1,58 ± 0,49 *	1,53 ± 0,31
Apo B	0,96 ± 0,23	1,01 ± 0,23	1,01 ± 0,26
Lipoprotein a	0,31 ± 0,41	0,15 ± 0,22 **	0,21 ± 0,24
Neesterifikované MK	0,52 ± 0,28	0,59 ± 0,30	0,72 ± 0,50 *
glukosa	4,85 ± 0,42	5,17 ± 0,77 **	7,86 ± 2,85 ***
insulin	6,21 ± 3,08	7,23 ± 6,51	11,66 ± 10,79 *
C peptid	0,59 ± 0,14	0,66 ± 0,38	0,89 ± 0,53 *
HOMA-IR	1,34 ± 0,65	1,78 ± 2,07	3,93 ± 4,45 *

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001

**Tab. 4** Mastné kyseliny ve třídě fosfatidylcholinu

Proměnná	KON	ChP-N	ChP-DM
P12:0	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01 ***	0,01 ± 0,01
P14:0	0,28 ± 0,09	0,26 ± 0,08	0,26 ± 0,11
P14:1n5	0,005 ± 0,010	0,001 ± 0,001 ***	0,001 ± 0,001 ***
P16:0	29,36 ± 1,32	30,47 ± 3,98	31,06 ± 4,75
P16:1n9	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,04 **	0,11 ± 0,03
P16:1n7	0,47 ± 0,15	0,81 ± 0,39 ***	0,74 ± 0,49 *
P18:0	13,45 ± 0,93	13,85 ± 2,07	14,33 ± 2,35
P18:1n9	9,97 ± 1,60	12,43 ± 2,84 ***	11,86 ± 2,71 **
P18:1n7	1,56 ± 0,32	1,82 ± 0,41 ***	1,75 ± 0,35 *
P18:2n6	24,57 ± 2,24	19,92 ± 3,39 ***	19,33 ± 4,39 ***
P18:3n6	0,08 ± 0,03	0,11 ± 0,07 **	0,09 ± 0,04
P18:3n3	0,22 ± 0,09	0,22 ± 0,13	0,15 ± 0,05 ***
P20:0	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,02
P20:1n9	0,14 ± 0,04	0,16 ± 0,05 **	0,15 ± 0,04
P20:2n6	0,36 ± 0,09	0,54 ± 0,27 ***	0,34 ± 0,10
P20:3n6	2,86 ± 0,52	3,23 ± 0,81 **	3,23 ± 0,99
P20:4n6	10,84 ± 1,84	10,78 ± 3,21	11,44 ± 3,29
P20:5n3	0,90 ± 0,53	0,91 ± 0,49	0,70 ± 0,26 *
P22:4n6	0,31 ± 0,06	0,37 ± 0,11 ***	0,35 ± 0,11
P22:5n6	0,20 ± 0,05	0,27 ± 0,11 ***	0,26 ± 0,09 *
P22:5n3	0,90 ± 0,15	0,96 ± 0,29	0,89 ± 0,25
P22:6n3	3,37 ± 0,85	2,68 ± 1,06 ***	2,89 ± 1,15
Σ SFA	43,17 ± 1,12	44,65 ± 4,71 *	45,72 ± 6,21
Σ MUFA	12,24 ± 1,82	15,35 ± 3,38 ***	14,62 ± 3,41 **
Σ PUFA n-6	39,21 ± 1,98	35,22 ± 5,48 ***	35,03 ± 7,80 *
ΣPUFA n-3	5,38 ± 1,28	4,78 ± 1,62 *	4,63 ± 1,51 *

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001

## VLIV OVARIEKTOMIE NA ROZVOJ JATERNÍ STEATÓZY A AKTIVITU HNĚDÉ TUKOVÉ TKÁNĚ

### THE EFFECT OF OVARIECTOMY ON THE DEVELOPMENT OF HEPATIC STEATOSIS AND BROWN ADIPOSE TISSUE ACTIVITY

H. Malínská<sup>1</sup>, J. Trnovská<sup>1</sup>, V. Škop<sup>1</sup>, L. Kazdová<sup>1</sup>, M. Poruba<sup>2</sup>, R. Večeřa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague

<sup>2</sup>Institute of Pharmacology, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

#### Introduction

Diabetes 2 Type (T2D) and cardiovascular disease are among the leading causes of death in postmenopausal women, and their prevalence after menopause suggests that disruption of ovarian function may contribute to the incidence of these conditions. Postmenopause period is associated with increased body weight, visceral adiposity, insulin resistance, fatty liver and other disorders of lipid and glucose metabolism. However, the underlying mechanism of these disorders remains unclear.

Estrogens play key protective roles against the development of obesity and are important regulators of several metabolic processes, including glucose and lipid metabolism, body weight, adipose tissue distribution, caloric intake, and energy expenditure (6). Although estradiol deficiency slightly increases food intake, hyperphagia does not seem to be the primary cause of obesity in ovariectomized animals (OVX). The mechanism underlying the changes in energy expenditure are not well understood and could be an early event linked to the increased weight gain that occurs after ovariectomy (3).

Also alterations in glucose and lipid homeostasis could precede increased body weight gain after menopause. Postmenopausal women display increased incidence of hepatic steatosis and disrupted glucose homeostasis. Estradiol signaling in the liver is important in the prevention of diabetes and development of hepatic steatosis, because this steroid hormone suppresses the expression of enzymes involved in lipogenesis and activates fatty acid oxidation enzymes in the liver. Further evidence indicates that E2 estradiol (the major biologically active form of estrogen) down-regulates hepatic glucose production, but it is not known whether increased gluconeogenesis is secondary to lipid accumulation in the liver and whether it precedes insulin resistance. E2 also contributes to the maintenance of insulin sensitivity in white adipose tissue (WAT) possibly via preventing low-grade inflammation of WAT (5) independently of energy status.

Increasing evidence indicates that brown adipose tissue (BAT) has a critical role in the control of energy metabolism and its activity could be regulated by sexual hormones. The thermogenic ability of BAT increased the interest in the contribution of BAT to body weight regulation in humans. In this regards, one therapeutic strategy involves augmenting the oxidative metabolism of BAT (1).

Postmenopausal women as well as rodents after ovariectomy are higher susceptibility to onset the metabolic syndrome and type 2 diabetes. The independent factor for developing these disorders is nonalcoholic hepatic steatosis. According to recent studies the mechanisms, which are involved in the pathogenesis of hepatic steatosis, are hepatic insulin resistance, proinflammatory pathway, oxidative and newly carbonyl stress (increased production of dicarbonyls) in the liver. It also suggests that increased accumulation of dicarbonyls (mainly methylglyoxal) in the liver may increase oxidative stress, activate the inflammatory pathway and can play a key role in the development of other metabolic disorders associated with postmenopausal metabolic syndrome (7).

In our study, we examined the effect of ovariectomy on the utilization of energetic substrate in interscapular brown adipose tissue, liver carbonyl and oxidative stress and other parameters of glucose and lipid metabolism.

### Materials and Methods

Ovariectomized rats were used as a model for postmenopausal syndrome. Female Wistar rats were ovariectomized (OVX) or sham-operated (controls) at 8 weeks of age and fed a standard diet for 4 month, in order to fully develop disorders associated with ovariectomy. BAT activity was determined *ex vivo* according to the utilization of  $^{14}\text{C}$ -U-palmitic acid and  $^{14}\text{C}$ -U-glucose for oxidation (incorporation into  $\text{CO}_2$ ) and incorporation of  $^{14}\text{C}$ -U-palmitic acid and  $^{14}\text{C}$ -U-glucose into BAT lipids. Lipolysis in BAT was measured by the release of free fatty acids. The concentrations of methylglyoxal and glutathione in the liver were determined using the HPLC-method with fluorescence detection.

### Results

Compared with sham-operated control rats, OVX rats exhibited markedly increased body weight (+10 %,  $p < 0.05$ ) and visceral adipose tissue weight (+10 %,  $p < 0.05$ ) (Table 1). Insulin sensitivity of white visceral adipose and muscle tissue, measured according to  $^{14}\text{C}$ -U-glucose incorporation into lipids and glycogen, were significantly decreased ( $p < 0.01$ ) in OVX rats compared to controls. However, plasma glucose, insulin and triglycerides were not different between OVX and control rats (Table 1). Severe hepatic triglycerides accumulation ( $12.76 \pm 1.10$  vs  $5.44 \pm 0.85$   $\mu\text{mol/g}$ ,  $p < 0.001$ ) in OVX rats associated with significantly elevated level of methylglyoxal ( $12.78 \pm 2.7$  vs  $5.49 \pm 0.41$   $\text{nmol/mg}$ ,  $p < 0.01$ ) may have contributed to the development of liver steatosis and oxidative stress in postmenopausal metabolic syndrome. Concentrations of other dicarbonyls glyoxal and 3-deoxyglucosone were also significantly increased in the liver. Higher levels of methylglyoxal were not due to lower levels of degradation because hepatic glyoxalase activity was no changed between OVX and control rats. Ovariectomy led to impaired balance in the reduced and oxidised forms of glutathione in the liver (GSH/GSSG:  $15.4 \pm 1.3$  vs  $28.4 \pm 1.4$ ,  $p < 0.01$ ), which may increase oxidative as well as carbonyl stress. BAT of OVX rats exhibited a reduced fatty acid oxidation (-72 %,  $p < 0.05$ ), lipogenesis (-26 %,  $p < 0.05$ ) and decreased lipolysis (-25 %,  $p < 0.05$ ), despite the fact that interscapular BAT weight was significantly increased ( $p < 0.05$ ) in OVX rats compared to controls. Ovariectomy increased ectopic lipid accumulation in aorta and kidney that may contribute to postmenopausal complications.

### Discussion

We speculate that impaired insulin sensitivity that occurs in OVX rats is a consequence rather the cause of obesity. Insulin resistance in OVX rats is probably a consequence of increased body weight and ectopic lipid deposition. The results of Nigro study (3) with OVX mice show that increased glucagon receptor expression in the liver increased glucagon signaling that may partially account for the changes in the gluconeogenic enzymes. Decreased in the expression of energy expenditure-related genes in adipose tissue and skeletal muscle (PPAR $\gamma$ , SREBP1 – transcription factors important for lipogenesis, acetyl CoA carboxylase, fatty acid synthase – enzymes for fatty acid synthesis, diacylglycerol acyl transferase – enzymes for triglycerides synthesis) could be also responsible for obesity after ovariectomy. Also fatty acid oxidation is decreased in the liver of ovariectomized rats, which is likely to contribute to hepatic steatosis. Exacerbation of insulin resistance together with hepatic lipid accumulation and lower adiponectin concentration may underlie the predisposition for cardiovascular disease in women after menopause.

Dicarbonyl stress in the liver after ovariectomy may participate to the development of hepatic steatosis by several mechanisms: MG decreases GSH and induces lipoperoxidation, may impair insulin signaling by inhibiting IRS1 and activates RAGE receptors and increases AGE production. MG may also aggravate white adipose tissue function that reduces adiponectin production and elevates proinflammatory adipokines secretion (2).

Our data with ovariectomized rats also indicate that sex hormones display profound effects on BAT activity and support the possibility that BAT may contribute to the effect of several sex hormones on whole-body energy balance. BAT mediates the ability of these hormones to modulate energy balance. The modified interaction between BAT and sex hormones after menopause may contribute to the progression obesity and other metabolic disorders associated with postmenopausal metabolic syndrome (4).

**Table 1** – Metabolic parameters in serum and tissues in ovariectomized (OVX) rats compared to control (shame operated) rats

	<b>Control shame</b>	<b>OVX</b>	<b>P &lt;</b>
Body weight (g)	268 ± 22	331 ± 14	0.05
Visceral adipose tissue weight (g/100g)	1.45 ± 0.19	1.62 ± 0.20	0.05
Brown adipose tissue weight (g/100g)	0.075 ± 0.006	0.101 ± 0.009	0.05
Triglycerides in the liver (µmol/g)	5.44 ± 0.85	12.76 ± 1.10	0.001
Cholesterol in the liver (µmol/g)	9.26 ± 0.41	7.11 ± 0.80	n.s.
Triglycerides in myocardium (µmol/g)	3.51 ± 0.39	2.84 ± 0.57	n.s.
Triglycerides in aorta (µmol/g)	3.05 ± 0.67	5.61 ± 0.83	0.05
Triglycerides in kidney (µmol/g)	3.84 ± 0.61	6.42 ± 1.12	0.05
Glucose (mmol/l)	5.5 ± 0.2	5.9 ± 0.2	n.s.
Insulin (µmol/l)	0.190 ± 0.034	0.224 ± 0.027	n.s.
AUC	708 ± 14	755 ± 24	n.s.
Serum triglycerides (mmol/l)	2.01 ± 0.36	1.80 ± 0.31	n.s.
NEFA (mmol/l)	0.583 ± 0.079	0.425 ± 0.051	n.s.
CRP (µg/ml)	523 ± 59	410 ± 41	n.s.

Data are mean ± SEM, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001

### Conclusion

Our results indicate that reduced fatty acid and glucose utilization, together with lower lipolysis in brown adipose tissue in response to ovariectomy, may contribute to the development of obesity in the postmenopausal period. Severe liver steatosis induced by ovariectomy was associated with excessive formation of methylglyoxal and the reduced ratio of GSH/GSSG, which could participate in oxidative stress. Both low metabolic activity in BAT and liver dicarbonyls formation may be involved in early events in the development of postmenopausal metabolic syndrome and could be appropriate therapeutic goal.

*Study was supported by grant GACR P303/13-10813S a MHCZ –DRO (IKEM, IN 00023001)*

**References**

1. **Lee Y, Kim H, Chung J.** An antibody reactive to the Gly63-Lys68 epitope of NT-proBNP exhibits O-glycosylation-independent binding. *Exp Mol Med* 2014; 46: e114.
2. **Matafome P, Sena C, Seica R.** Methylglyoxal, obesity, and diabetes. *Endocrine* 2013; 43(3): 472-484.
3. **Nigro M, Santos AT, Barthem CS, et al.** A change in liver metabolism but not in brown adipose tissue thermogenesis is an early event in ovariectomy-induced obesity in rats. *Endocrinology* 2014; 155(8): 2881-2891.
4. **Quarta C, Mazza R, Pasquali R, Pagotto U.** Role of sex hormones in modulation of brown adipose tissue activity. *J Mol Endocrinol* 2012; 49(1): R1-R7.
5. **Shen M, Kumar SP, Shi H.** Estradiol regulates insulin signaling and inflammation in adipose tissue. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2014; 17(2): 99-107.
6. **Tawfik SH, Mahmoud BF, Saad MI, et al.** Similar and additive effects of ovariectomy and diabetes on insulin resistance and lipid metabolism. *Biochem Res Int* 2015; 2015: 567945.
7. **Wei Y, Wang D, Moran G, et al.** Fructose-induced stress signaling in the liver involves methylglyoxal. *Nutr Metab* 2013; 10: 32.

## VLIV TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU NRF2 NA METABOLISMUS LIPIDŮ PŘI METABOLICKÉM SYNDROMU

### INFLUENCE OF TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 ON LIPID METABOLISM IN METABOLIC SYNDROME

I. Marková<sup>1</sup>, H. Malínská<sup>1</sup>, O. Oliyarnyk<sup>1</sup>, L. Kazdová<sup>1</sup>, M. Pravenec<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha*

<sup>2</sup> *Fyziologický ústav AV ČR, Praha*

#### Abstract

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a key transcription factor which plays a central role in cellular defence against oxidative stress, participates in metabolic homeostasis and in lipid metabolism. To test the role of Nrf2 in lipid metabolism disturbances in the pathogenesis of metabolic syndrome, we derived a transgenic line of the spontaneously hypertensive rat (SHR) with ubiquitous expression of the mouse Nrf2 gene. Nrf2 overexpression was associated with reduced saturated fatty acids ( $p < 0.001$ ) and increased n-3 polyunsaturated fatty acids ( $p < 0.001$ ) in adipocyte membrane phospholipids in visceral adipose tissue. Transgenic expression was associated with increased activities of antioxidant enzymes and reduced levels of lipid peroxidation compared to SHR nontransgenic controls. Reduced oxidative stress in Nrf2 rats was associated with increased insulin sensitivity of adipose and muscle tissue. Nrf2 transgenic rats exhibited increased adrenalin stimulated lipolysis ( $p < 0.05$ ), which suggests higher metabolic activity of adipose tissue. These results suggest that overexpression of Nrf2 ameliorates oxidative stress and several disturbances of metabolic syndrome. Changes in membrane phospholipids of adipocytes in transgenic rats could be one of the mechanism, which is involved in these effects.

#### Úvod

Metabolický syndrom (MS) je souborem metabolických poruch, které významně zvyšují riziko rozvoje diabetu 2. typu a kardiovaskulárních příhod. Kromě poruch glukózové homeostázy, hyperinzulinémie, dyslipidémie, hypertenze, viscerální obesity a dalších symptomů je doprovázen zvýšeným oxidačním stresem, jemuž je v poslední době věnována velká pozornost (Zhai et al. 2011, Houstis et al. 2006, Maddux et al. 2001). Transkripční nukleární faktor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) má stěžejní roli v udržování oxidačně-redukční a metabolické homeostázy a hraje klíčovou úlohu v obraně proti oxidačnímu stresu. Nrf2 reguluje expresi mnoha cytoprotektivních proteinů zahrnující antioxidantní a detoxifikační enzymy a proteiny, enzymy inhibující zánět, proteiny účastnící se oprav a odstraňování poškozených proteinů, enzymy podílející se na syntéze a regeneraci glutathionu a proteiny regulující expresi dalších transkripčních a růstových faktorů (Baird et al. 2011).

Nrf2 má také důležitou roli v regulaci glukózového a lipidového metabolismu, reguluje expresi genů účastnících se metabolismu lipidů a glukózy (Tanaka et al. 2008, Hayes et al. 2014). U myši se Nrf2 podílí na ochraně proti jaterní steatóze vyvolané dietou s vysokým obsahem tuku tím, že podporuje oxidaci mastných kyselin (MK) a inhibuje lipogenezi (Okada et al. 2013), zabraňuje akumulaci lipidů prostřednictvím regulace genů metabolismu lipidů a cholesterolu a snižuje oxidační stres (Tanaka et al. 2008). Častým modelem pro studium úlohy Nrf2 jsou Nrf2-knockout myši (Nrf2-KO). Nrf2-KO vykazují zvýšený oxidační stres, zvýšenou citlivost k chemicky indukované kancerogenezi a neurodegenerativním onemocněním (Chartoumpakis et al. 2013, Chartoumpakis et al. 2011, Lee et al. 2005) a jsou



náchylné k rozvoji NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) po dietě s deficiencí methioninu a cholinu. Nedostatečná exprese a aktivita Nrf2 hraje důležitou roli v patogenezi chorob souvisejících s oxidačním stresem včetně diabetu (Aleksunes et al. 2010).

Aktivita Nrf2 a signalizační dráhy, jichž se Nrf2 účastní mohou být aktivovány řadou podnětů jako je např. oxidační stres, ale i endogenních (oxid dusnatý) a exogenní látek, často přírodního původu jako je např. sulforafan z brokolice, skořicový olej nebo kurkumin, jež je součástí koření kari. V řadě studií byl prokázán příznivý vliv těchto aktivátorů Nrf2 na parametry zánětu, obezity a zlepšení inzulínové rezistence (Aggarwal 2010). V poslední době se proto uvažuje o Nrf2 jako o možném cíli prevence a léčby obezity, MS, diabetu a s nimi spojenými komplikacemi.

Vliv transkripčního faktoru Nrf2 na metabolismus lipidů při inzulínové rezistenci není zcela objasněn. V naší práci jsme sledovali účinky Nrf2 na parametry lipidového metabolismu a složení mastných kyselin ve fosfolipidech tukové tkáně, zabývali jsme se i inzulínovou senzitivitou jednotlivých tkání a parametry oxidačního stresu.

### Materiál a metody

Pokusy byly provedeny u tříměsíčních samců kmene spontánně hypertenzního potkana (SHR) s transgenní expresí Nrf2. Transgenní linie SHR-Nrf2 potkanů byla získána mikroinjekcí zygot konstruktem obsahujícím myši Nrf2 cDNA pod kontrolou univerzálního promotoru CAGGS. Kontrolní skupinu tvořili stejně staří SHR potkani bez transgenů. Obě skupiny byly krmeny *ad libitum* standardní dietou.

Koncentrace triacylglycerolů (TAG) v plasmě a ve tkáních byly stanoveny komerčně dostupnými enzymatickými kity. Aktivity antioxidantních enzymů byly měřeny pomocí kitů (Cayman Chemicals, USA). Rezistence periferních tkání (bránice a epididymální tuková tkáň) k účinku inzulínu byla sledována podle bazální a inzulínem stimulované (250  $\mu$ U/ml) inkorporace  $^{14}$ C-U-glukózy do glykogenu a lipidů *ex vivo*. Zastoupení jednotlivých MK ve fosfolipidech tukové tkáně bylo stanoveno plynovou chromatografií s plameno-ionizačním detektorem po předchozí extrakci lipidů směsí dichlormetan/metanol a rozdělením jednotlivých lipidových tříd tenkovrstevnou chromatografií.

### Výsledky a diskuse

U SHR-Nrf2 potkanů jsme naměřili sníženou hladinu TAG v plasmě a v myokardu, koncentrace TAG a cholesterolu v játrech se mezi experimentálními skupinami nelišila (tabulka 1). Nrf2 potkani vykazovali zvýšenou adrenalinem stimulovanou lipolýzu ( $5,256 \pm 0,997$  vs  $3,174 \pm 0,331$   $\mu$ mol NEMK/g,  $p < 0,05$ ), z čehož lze usuzovat na zvýšenou metabolickou aktivitu tukové tkáně.

Transgenní exprese Nrf2 byla doprovázena zvýšenými aktivitami a hladinami antioxidantních enzymů a neenzymových antioxidantů. Z tabulky 2 je patrné, že zvýšená exprese Nrf2 zvýšila v plasmě a ve tkáních hladiny enzymů zapojených do antioxidantního systému a snížila koncentrace produktů lipidové peroxidace měřených jako TBARS (látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou) v plasmě, játrech a kůře ledvin. Aktivace antioxidantního enzymového systému nadměrnou expresí Nrf2 vedla ke zlepšení lipidové peroxidace.

**Tabulka 1** Vliv transgenní exprese Nrf2 na lipidový metabolismus

	SHR	SHR-Nrf2	p
TAG v plasmě (mmol/l)	$0,488 \pm 0,035$	$0,388 \pm 0,028$	<0,05
TAG v játrech ( $\mu$ mol/g)	$8,097 \pm 0,423$	$8,591 \pm 0,451$	NS
TAG v myokardu ( $\mu$ mol/g)	$2,101 \pm 0,147$	$1,411 \pm 0,052$	<0,01
cholesterol v játrech ( $\mu$ mol/g)	$9,838 \pm 0,492$	$9,911 \pm 0,496$	NS

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM, počet zvířat ve skupině 8.

Snížený oxidační stres u Nrf2 potkanů byl doprovázen zvýšenou citlivostí epididymální tukové tkáně k bazální ( $839 \pm 65$  vs  $480 \pm 31$  nmol/g/2 hod,  $p < 0,005$ ) a inzulínem stimulované inkorporaci  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do lipidů ( $1809 \pm 355$  vs  $1057 \pm 157$  vs nmol/g/2 hod,  $p < 0,05$ ). Také inzulínová senzitivita bránice byla u SHR transgenních potkanů za bazálního a inzulínem stimulovaného stavu významně vyšší oproti SHR kontrolám ( $p < 0,05$ ). Celkové množství satureovaných mastných kyselin ve fosfolipidech epididymální tukové tkáně bylo u SHR-Nrf2 potkanů nižší oproti kontrolám, na tomto poklesu má významný podíl snížení hladin kyseliny palmitové a stearové (tabulka 3). Transgenní exprese Nrf2 byla doprovázena výrazným zvýšením celkové hladiny n-3 PUFA (polynenasycené mastné kyseliny) v tukové tkáni. Zvýšené zastoupení n-3 PUFA u SHR-Nrf2 potkanů by mohlo příznivě ovlivňovat membránovou fluiditu buněk tukové tkáně a mohlo by být jedním z mechanismů, který se podílí na zlepšení inzulínové senzitivity u SHR-Nrf2 transgenních potkanů.

### Závěr

Transgenní exprese transkripčního faktoru Nrf2 ovlivnila parametry antioxidačního systému v plasmě a ve tkáních a zvýšila inzulínovou senzitivitu svalů u SHR potkanů. Výrazně byla zlepšena i senzitivita tukové tkáně k účinku inzulínu a k lipolytickému efektu adrenalinu. Pozitivní změny ve složení mastných kyselin – nižší podíl satureovaných mastných kyselin a zvýšený podíl polynenasycených mastných kyselin řady n-3 ve fosfolipidech tukové tkáně, mohou být jedním z mechanismů, který se podílí na těchto příznivých efektech. Naše výsledky potvrzují, že Nrf2 má důležitou roli v obraně proti oxidačnímu stresu a ukazují na možné zapojení Nrf2 do metabolismu tukové tkáně. Ovlivnění antioxidační ochrany a lipidového metabolismu prostřednictvím aktivace Nrf2 by se mohlo uplatnit v prevenci a terapii komplikací spojených s metabolickým syndromem.

**Tabulka 2** Shrnutí účinků transgenní exprese Nrf2 na parametry oxidačního stresu

	plasma	játra	myokard	ledviny
kataláza	↑	↑↑↑	↑	↑↑
glutathionperoxidáza	↑↑	↑	↑↑↑	–
glutathiontransferáza	↑	↑	↑	↑
glutathionreduktáza	–	↑	–	–
glutathion	↑↑	–	–	–
α- a γ- tokoferol			↑↑	
TBARS	↓↓	↓↓	–	↓

↓ snížení, ↑ zvýšení, – beze změn; ↑  $p < 0,05$ , ↑↑  $p < 0,005$ , ↑↑↑  $p < 0,001$

**Tabulka 3** Efekt transgenní exprese Nrf2 na složení mastných kyselin ve fosfolipidech epididymální tukové tkáně

Mastné kyseliny (% mol)	SHR	SHR-Nrf2	p
14:00	0,135 ± 0,056	0,134 ± 0,036	NS
16:00	14,526 ± 0,786	11,265 ± 1,169	<0,05
18:00	16,844 ± 1,847	9,504 ± 0,705	<0,001
<b>ΣSFA</b>	<b>31,505 ± 1,454</b>	<b>20,902 ± 1,300</b>	<b>&lt;0,001</b>
16:1n7	1,196 ± 0,167	0,925 ± 0,188	NS
18:1n9	19,475 ± 1,043	19,995 ± 1,881	NS
18:1n7	4,086 ± 0,128	4,134 ± 0,305	NS
<b>ΣMUFA</b>	<b>24,757 ± 1,189</b>	<b>25,053 ± 2,236</b>	<b>NS</b>
18:2n6	26,271 ± 1,319	24,568 ± 1,168	NS
18:3n6	0,744 ± 0,102	0,749 ± 0,094	NS
20:2n6	0,879 ± 0,074	2,413 ± 0,358	<0,002
20:3n6	0,352 ± 0,028	0,279 ± 0,045	NS
20:4n6	7,601 ± 0,805	7,543 ± 0,904	NS
22:4n6	0,118 ± 0,021	0,441 ± 0,105	<0,01
<b>Σn-6 PUFA</b>	<b>35,965 ± 0,812</b>	<b>35,992 ± 0,547</b>	<b>NS</b>
18:3n3	0,999 ± 0,077	2,370 ± 0,340	<0,002
18:4n3	0,816 ± 0,081	1,670 ± 0,389	<0,05
20:4n3	0,200 ± 0,034	0,597 ± 0,101	<0,003
20:5n3	1,191 ± 0,111	2,870 ± 0,320	<0,001
22:5n3	2,297 ± 0,110	5,765 ± 0,799	<0,001
22:6n3	2,273 ± 0,156	4,616 ± 0,567	<0,002
<b>Σn-3 PUFA</b>	<b>7,776 ± 0,332</b>	<b>17,888 ± 2,310</b>	<b>&lt;0,001</b>

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM, počet zvířat ve skupině 8. ΣSFA suma satureovaných MK, ΣMUFA suma mononenasyčených MK, Σn-6 PUFA suma polynenasycených MK řady n-6, Σn-3 PUFA suma polynenasycených MK řady n-3

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

### Literatura

- **Aggarwal BB.** Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. *Annu Rev Nutr* 2010; 30: 173-199.
- **Aleksunes LM, Reisman SA, Yeager RL, et al.** Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 deletion impairs glucose tolerance and exacerbates hyperglycemia in type 1 diabetic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 333(1): 140-151.
- **Baird L, Dinkova-Kostova AT.** The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 2011; 85(4): 241-272.
- **Hayes JD, Dinkova-Kostova AT.** The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci* 2014; 39(4): 199-218.
- **Houstis N, Rosen ED, Lander ES.** Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006; 440(7086): 944-948.
- **Chartoumpakis DV, Ziros PG, Psyrogiannis AI, et al.** Nrf2 represses FGF21 during long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 2011; 60(10): 2465-2473.

- **Chartoumpakis DV and Kensler TW.** New player on an old field; the Keap1/Nrf2 pathway as a target for treatment of type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Curr Diabetes Rev* 2013; 9(2): 137-145.
- **Lee JM, Li J, Johnson DA, et al.** Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J* 2005; 19(9): 1061-1066.
- **Maddux BA, See W, Lawrence JC Jr, et al.** Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* 2001; 50(2): 404-410.
- **Okada K, Warabi E, Sugimoto H, et al.** Deletion of Nrf2 leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet. *J Gastroenterol* 2013; 48(5): 620-632.
- **Tanaka Y, Aleksunes LM, Yeager RL, et al.** NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325(2): 655-664.
- **Zhai L, Ballinger SW, Messina JL.** Role of reactive oxygen species in injury-induced insulin resistance. *Mol Endocrinol* 2011; 25(3): 492-502.

## EFFECT OF MICRONIZED EXTRACT AND PHYTOSOMES CONTAINING SILYBIN ON INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN NON-OBESE MODEL OF METABOLIC SYNDROME

O. Oliyarnyk<sup>1</sup>, H. Malinska<sup>1</sup>, J. Trnovska<sup>1</sup>, V. Skop<sup>1</sup>, L. Kazdova<sup>1</sup>, M. Poruba<sup>2</sup>, R. Vecera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Center for Experimental Medicine, IKEM, Prague,

<sup>2</sup>Institute of Pharmacology, Palacky University, Olomouc

### Abstract

Curative effect of the major component of silymarin - silybin is well established, but its low absorption from the gastrointestinal tract and rapid excretion limit its bioavailability. Using micronized extracts (ME) and phytosomes (PhE) formulation might be beneficial for increase of its metabolic activity. We investigated the effects of these compounds and simple extract of silybin (SE) on the inflammation and oxidative stress, disorders associated with metabolic syndrome, in hereditary hypertriglyceridemic rats (HHTg). PhE treatment decreased plasma C-reactive protein concentration:  $314 \pm 24$  vs.  $373 \pm 11$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0.05$ . All forms of silybin extracts inhibited lipid peroxidation in liver (SE - 27 %, ME - 44 %, PhE - 39 %) and kidney (SE - 19 %, ME - 31 %, PhE - 26 %), in myocardium- only PhE - 28 %. Silybin improved glutathione balance in liver (GSH/GSSG ratio: SE + 54 %, ME + 54 %, PhE + 50 %), elevated GSH concentration in kidney (SE + 30 %, ME + 25 %, PhE + 62 %) and myocardium (ME + 44 %, PhE + 37 %). All forms of silybin activated antioxidant enzymes in liver, myocardium and kidney, but using ME and PhE was more effective. Results indicate, that silybin extract might be an appropriate supplement in treatment of metabolic syndrome related disorders.

### Introduction

Silymarin is a standardized extract from the fruit and seeds of the variegated milk thistle of *Silybum marianum* used in therapy of toxic liver damage including chronic inflammatory liver diseases, acute and chronic viral hepatitis, liver cirrhosis and *Amanita phalloides* poisoning. Its curative effect attributed to its membrane-stabilizing effect in hepatocytes and to the inhibition of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors [1]. Lately was found that silymarin has additional biological effects including cardioprotective, antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and hypolipidemic activity [2]. These knowledge suggest that silymarin supplementation might be useful for treatment of disorders associated with metabolic syndrome.

Silymarin is a complex of flavonolignans: silybin, isosilybin, silydianin, silychristin, flavonoids (taxifolin, quercetin) and other minority compounds. The relative abundance of each compound might be very depending on the source of botanical material, supplier, and extraction process. The most effective component of silymarin is silybin, which represents about 50% to 70% of the silymarin extract. Silybin can be resolved into two 1:1 diastereoisomers, silybin A and silybin B [3].

Unfortunately, silybin has low absorption from the gastrointestinal tract after oral supplementation due to two factors: 1) the molecules are too large to be absorbed by simple diffusion, 2) the molecules typically have poor aqueous solubility (430 mg/l) and miscibility with other lipids, severely limiting their ability to pass across the lipid-rich outer membranes of the enterocytes in the small intestine [4]. Only 20 - 50 percent of oral silybin is absorbed from the gastrointestinal tract where it undergoes extensive enterohepatic circulation. Silybin undergoes phase I and phase II biotransformation in the liver. During phase I it is metabolized

by CYP450-2C8 into o-demethylated silybin (major) and mono- and dihydroxy- silybin (minor) metabolites. During phase II multiple conjugation reactions have been observed that include the formation of silybin derivatives: monoglucuronide, diglucuronide, monosulfate, and diglucuronide sulfate [5]. Finally, oral bioavailability of silybin in rat plasma reported to be 0.73 - percent [6]. Silybin in humans and rats demonstrates rapid elimination with short half-lives (1 - 3 and 3 - 8 hours for free and conjugated forms, respectively), the major route is biliary excretion as glucuronide and sulfate conjugates [5].

Using micronized extracts and phytosomes containing silybin might be beneficial for increase of its metabolic activity. Micronization is the process of reducing the particle size of a solid to 2 - 5  $\mu\text{m}$ , which could increase silybin absorption. The effect of microsomal silybin on metabolic syndrome related disorders extract remains to be elucidated. Silybin can be combined on a molecular level with phosphatidylcholine called phytosome (initially named IdB 1016 from Indena; Italy), is patented as Siliphos®. Major advantages include increased absorption, lower therapeutic dose, and better stability profile. Barzaghi et al. have shown that Siliphos® bioavailability in humans was greater than that of non-complexed silybin, probably because complexation with phosphatidylcholine facilitating its transport across the gastrointestinal mucosa and lipid-rich biomembranes. Phosphatidylcholine is not only a “carrier” for the bioactive flavonoids of the phytosomes, but is itself a bioactive nutrient with documented clinical efficacy for liver diseases [7]. Skottova et al. administered radio-labeled silybin and their complexes 1:1 with phosphatidylcholine concurrently with unlabeled silybin in the rat. Superior bioavailability of radio-labeled silybin was observed as increased radioactivity in liver, kidney, spleen, and heart [8]. Silybin in complex with phytosomes had more hepatoprotective effect than silymarin in human studies made on patients suffering from type 2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease, chronic alcoholic and viral hepatitis [for review see 3] and in animal studies to protect against experimental liver damage induced by carbon tetrachloride, acetaminophen, and ethanol [4].

Current study aimed to compare the effects of SE, ME and PhE treatment on plasma content of C-reactive protein (CRP), oxidative stress parameters: thiobarbituric acid reactive substances - TBARS), glutathione balance (concentration of reduced - GSH and oxidized-GSSG forms), the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase - SOD, glutathione peroxidase - GSH-Px, glutathione reductase - GR, glutathione transferase - GST, catalase) in liver, myocardium and kidney in HHTg rats.

### Materials and Methods

The experiments were carried on male 4 months old HHTg rats fed a standard laboratory diet without supplementation (control group) or supplemented with non-complexed silybin extract (1 %); with microsomes (1 %) or phytosomes (1.5 %, Siliphos®, Indena, Italy) containing silybin extract. CRP level was measured using ELISA kit from ThermoFisher Scientific (MA, USA). The concentration of TBARS was determined spectrophotometrically by the reaction with thiobarbituric acid. Concentrations of GSH and GSSG were determined using HPLC kit with fluorescence detection (ChromSystems, Germany). The activity of SOD, GSH-Px, GR and GST were analyzed using Cayman Chemicals assay kits (MI, USA). Catalase activity measurement is based on the ability of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to produce with ammonium molybdate the color complex detected spectrophotometrically.

### Results

Treatment with phytosomes containing silybin decreased plasma CRP concentration, after microsomes this difference was non-significant (Table 1). All forms of silybin decreased lipid peroxidation measured as TBARS in liver and kidney, in myocardium - only after phytosomes. GSH concentration in liver was unaffected, but GSSG level decreased. As a

consequence the ratio GSH/GSSG was markedly increased. In kidney concentration of GSH elevated after treatment with all forms of silybin, in myocardium- only after microsomes and phytosomes, which contributed to tissue-specific activation of GSH-dependent enzymes. GSH-Px activity elevated significantly in liver after supplementation with phytosomes, in myocardium and kidney - after microsomes. GST was activated after treatment with microsomes and phytosomes in liver and kidney, GR-only after microsomes. In myocardium GST and GR activities did not change. Other antioxidant enzymes were activated by silybin too: liver SOD - after treatment with all silybin forms, in myocardium - only after phytosomes, in kidney - after microsomes and phytosomes. Catalase activity elevated in liver after supplementation with microsomes and phytosomes, in kidney - after all forms of silybin extract.

**Table 1** Parameters of oxidative stress in HHTg rats after silybin treatment

Tissue	Control	Simple extract	Microsomes	Phytosomes
<b>C-reactive protein, µg/ml</b>				
Plasma	373±11	398±14	335±24	314±24*
<b>TBARS, nmol/mg protein</b>				
Liver	2.28±0.22	1.64±0.15*	1.27±0.05**	1.38±0.09**
Myocardium	0.636±0.047	0.654±0.040	0.680±0.040	0.457±0.027**
Kidney	0.613±0.037	0.495±0.034**	0.423±0.044**	0.452±0.033**
<b>Glutathione, µmol/mg protein</b>				
Liver GSH	73±3	64±5	74±7	63±7
Liver GSSG	3.12±0.04	1.76±0.16***	2.09±0.32***	1.82±0.2***
Liver GSH/GSSG	24±1	37±1***	37±4***	36±1***
Myocardium GSH	18.1±1.6	18.3±1.3	26.1±0.7**	23.3±1.2*
Kidney GSH	16.5±1.5	21.4±0.8*	20.6±1.0*	26.7±0.8***
<b>Glutathione peroxidase, µmol NADPH/min/mg protein</b>				
Liver	210±19	223±25	181±19	300±26*
Myocardium	136±11	128±10	172±12*	156±15
Kidney	145±8	149±11	175±5*	133±10
<b>Glutathione reductase, nmol NADPH/min/mg protein</b>				
Liver	92±5	90±6	144±8***	89±5
Myocardium	56±3	52±3	47±4	46±7
Kidney	40±4	42±4	52±3*	46±4
<b>Glutathione transferase, nmol CDNB/min/mg protein</b>				
Liver	128±6	141±12	172±8**	156±10*
Myocardium	51±3	42±7	44±7	52±7
Kidney	48±3	46±3	60±3*	63±3*
<b>Superoxide dismutase, U/mg protein</b>				
Liver	0.143±0.006	0.191±0.011**	0.204±0.010***	0.185±0.013*
Myocardium	0.075±0.007	0.081±0.006	0.064±0.004	0.097±0.005*
Kidney	0.062±0.010	0.073±0.005	0.119±0.100**	0.101±0.004**
<b>Catalase, µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protein</b>				
Liver	1461±117	1394±67	1793±77*	1838±100*
Myocardium	556±44	657±41	580±33	529±49
Kidney	574±23	726±29**	855±43**	728±54*

\*\* and \* denote  $p < 0.001$  and  $p < 0.05$  in comparison to control, respectively. Abbreviations: CDNB, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

## Discussion

Growing evidence indicate that inflammation and oxidative stress are implicated in the pathogenesis of metabolic syndrome. Treatment with nutrition supplements with antioxidant properties could be effective to inhibit free radical processes including lipoperoxidation. We have shown reduced TBARS concentration in liver, myocardium and kidney after silybin treatment. These changes at first could be attributed to a direct silybin free radical scavenging mainly due to: a) orientation of one methoxy group responsible for enhanced electron donating ability and b) three hydroxyl groups at 3rd, 5th and 7th positions enhances the antioxidant efficacy of silybin molecule as metal chelators [9]. Current result is in accordance with our previous observation made using extracts of total silymarin in HHTg rats [11] and the study of Grattagliano et al. conducted in rats with fatty liver induced by cholin deficient and high fat diet [8]. We did not found any changes in oxidative stress parameters in plasma may be due to silybin poor water solubility and so much higher concentration of silybin in tissues in comparison to systemic circulation [9].

Antioxidant effect of silybin in tissues could be attributed to the aggravation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense. All forms of silybin improved oxido-reductive balance of important intracellular antioxidant-glutathione. Only in liver we have not shown any increase in GSH concentration, which might be attributed to the intensive using of GSH during detoxification process in the liver parenchymal cells [4]. Silybin is reported to enhance the activity of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase and demonstrated simultaneous escalation in the intracellular glutathione level. Moreover, silybin is able to protect the SH groups from the oxidative damage through the inhibition of peroxidation of membrane lipids and stabilization of the cell membrane [11]. Restoration of GSH level was already observed in NASH in patients [3] and fatty liver rats [8] treated with silybin.

We have found anti-inflammatory effect and activation of antioxidant enzymes after silybin treatment which was more effective after supplementation with microsomes and phytosomes, that could be due to increased bioavailability of silybin. Kidd et al have shown that *silybin absorption from phytosomes was 6.0 times better in rats and 4.6 times in humans* in comparison to simple extract [4]. General mechanism of the activation of antioxidant enzymes could be attributed to positive effect of silybin supplementation on their transcription. Treatment with silybin of rats after arsenic induced cytotoxicity led to stabilization of the transcription factor nuclear factor (erythroid-derived 2) - related factor 2 (Nrf2). Nrf2 is a key transcription factor responsible for constitutive and inducible expression of antioxidant response elements - regulated genes of antioxidant enzymes including SOD, GSH-Px, GST, GR, catalase, and the key enzyme of glutathione synthesis -  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase [11].

## Conclusion

Treatment with silybin decreased lipid peroxidation in liver, myocardium and kidney in HHTg rats. Silybin increased GSH/GSSG ratio in all investigated tissues and activated antioxidant enzymes. Supplementation with phytosomes and especially microsomes were more effective for the aggravation of antioxidant defense and had an anti-inflammatory effect. Results indicate that silybin in micronized form or conjugated with phytosomes might be more effective for treatment of complications associated with metabolic syndrome in comparison with simple extract.

*Supported by grant: GAČR P303/13-10813S*



**References**

1. **Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González A, et al.** Hepato-protective effect of silymarin. *World J Hepatol* 2014; 6(3): 144-149.
2. **Cacciapuoti F, Scognamiglio A, Palumbo R, et al.** Silymarin in non alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2013; 5(3): 109-113.
3. **Loguercio C, Andreone P, Brisc C, et al.** Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Free Rad Biol Med* 2012; 52(9): 1658-1665.
4. **Kidd P, Head K.** A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos). *Altern Med Rev* 2005; 10(3): 193-203.
5. **Javed S, Kohli K, Ali M.** Reassessing bioavailability of silymarin. *Altern Med Rev* 2011; 16(3): 239-249.
6. **Wu JW, Lin LC, Hung SC, et al.** Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45(4): 635-641.
7. **Barzaghi N, Crema F, Gatti G, et al.** Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1990; 15(4): 333-338.
8. **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(2): 123-130.
9. **Colturato CP, Constantin RP, Maeda AS, et al.** Metabolic effects of silibinin in the rat liver. *Chem Biol Interact* 2012; 195(2): 119-132.
10. **Grattagliano I, Diogo C, Mastrodonato M, et al.** A silybin-phospholipids complex counteracts rat fatty liver degeneration and mitochondrial oxidative changes. *World J Gastroenterol* 2013; 19(20): 3007-3017.
11. **Prabu SM, Muthumani M.** Silibinin ameliorates arsenic induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Mol Biol Rep* 2012; 39(12): 11201-11216

## NETRADIČNÍ TUKY A OLEJE JAKO ZDROJE VÝZNAMNÝCH LIPOFILNÍCH LÁTEK: GAMA-LINOLENOVÁ KYSELINA

### UNCONVENTIONAL FATS AND OILS AS A MAJOR SOURCE OF LIPOPHILIC COMPOUNDS: GAMMA-LINOLENIC ACID

J. Pánek, D. Chrpová\*, M. Sabolová, B. Pohořelá, M. Doležal

*Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha; \* VOŠZ a SZŠ 5.května, Praha 4 & ÚAPV VŠCHT Praha*

#### Úvod

Výživová doporučení většiny vyspělých zemí (Společnost pro výživu ČR, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Amer. Heart Association ...) říkají, že příjem tuků by neměl významněji převyšovat 30 % energetického příjmu a že z celkového příjmu tuků by mělo být nejvýše 33 % nasycených mastných kyselin (SFA) a poměr n-6 ku n-3 polyenových kyselin (PUFA) by neměl přesáhnout 5 : 1.

V západní dietě, včetně ČR, se v současné době odhaduje, že tuky tvoří 40 % energetického příjmu, SFA asi 50 % přijímaných tuků a poměr n-6 : n-3 PUFA je asi 15 : 1 (možná i vyšší). U n-3 PUFA se k nízkému příjmu přidává ještě obtížná tvorba esenciálních kyselin (EPA, DHA) z linolenové kyseliny. Dostatečný (někteří autoři dokonce uvádějí i výraz „nadbytečný“) příjem n-6 kyselin (daný hlavně příjmem linolové kyseliny) může být v některých případech pouze zdánlivý, protože syntéza vlastních aktivních kyselin (dihomo- $\gamma$ -linolenové a arachidonové) je komplikovaná a působí zde řada inhibičních faktorů.

#### Polyenové mastné kyseliny řady n-6

Základním členem řady je linolová [(9Z,12Z)-oktadeka-9,12-dienová] kyselina, která se přirozeně vyskytuje téměř ve všech rostlinných olejích (v řadě z nich v desítkách %). Živočišné tuky jí obsahují poměrně málo.

V organismu vzniká z linolové kyseliny působením  $\Delta$ -6 desaturasy  $\gamma$ -linolenová (6Z,9Z,12Z-oktadeka-6,9,12-trienová) kyselina (GLA). Tato reakce je ale zatížena řadou inhibičních faktorů, mezi které patří věk, kardiovaskulární nemoci, diabetes, ale i stres, kouření nebo alkohol. Zatím nejsou publikovány relevantní studie o aktuálním obsahu této kyseliny v organismu a zdravotních souvislostech. Nicméně, asi lze predikovat, že pokud se tyto inhibiční faktory budou kumulovat, může být tvorba tohoto důležitého intermediátu výrazně snížena a rozsah následných reakcí může být omezen až k nulovým hodnotám.

Zatímco člověk dokáže za normálních okolností syntetizovat  $\gamma$ -linolenovou kyselinu a rozsah syntézy ovlivňuje hlavně rozsah inhibice, u rostlin je situace složitější.  $\Delta$ -6 desaturasou s dostatečnou aktivitou disponuje je několik málo čeledí. Proto se u většiny olejů  $\gamma$ -linolenová kyselina vyskytuje pouze ve velmi nízkých až stopových koncentracích. O významných zdrojích bude pojednáno dále.

Z  $\gamma$ -linolenové kyseliny a acetylkoenzymu A vzniká působením elongasy dihomogamma-linolenová [(8Z,11Z,14Z)-eikosa-8,11,14-trienová] kyselina (DGLA). Tuto kyselinu již rostliny konvenčně prakticky vůbec nesyntetizují. U člověka je tato syntéza dosti neefektivní a pro tvorbu dostatečného množství DGLA je nutná dostatečná koncentrace substrátu GLA. Z této kyseliny již v organismu vznikají aktivní eikosanoidy, z nichž nejvýznamnější je leukotrien 15-hydroxy-eikosa-8,11,14-trienová kyselina (15-HETrE), vznikající působením 15-lipoxygenasy. Na rozdíl od leukotrienů vznikajících z arachidonové kyseliny vykazuje tento leukotrien protizánětlivý efekt.

Posledním členem kaskády je arachidonová ((5Z,8Z,11Z,14Z)-eikosa-5,8,11,14-tetraenová) kyselina, která vzniká z DGLA působením  $\Delta$ -5 desaturasy. Konvenční rostlinné lipidy ji obsahují opět jen stopy. Významným nutričním zdrojem je maso, kde je arachidonová kyselina součástí svalových lipidů (zejména fosfolipidů). Ostatní živočišné potraviny jí obsahují významně méně, obsah v rezervních tucích je spíše stopový. Z tohoto důvodu není u dospělé populace s konvenční výživou problém s příjmem arachidonové kyseliny, může to být ale jeden z problémů veganské výživy. Přípravky pro náhradní kojeneckou výživu běžně obsahují arachidonovou kyselinou. Dietární arachidonová kyselina se ukládá do plasmatických a svalových fosfolipidů, ze kterých může být potřebná koncentrace uvolněna. Problém je, že člověk není schopen zpětně syntetizovat DGLA z arachidonové kyseliny.

Eikosanoidy (leukotrieny, prostaglandiny, thromboxany) odvozené od arachidonové kyseliny se vyznačují prozánětlivým a prokoagulačním efektem, což spolu s opačným působením n-3 kyselin a DGLA vytváří rovnováhu těchto efektů v organismu.

### **Konvenční dietární zdroje gama-linolenové kyseliny**

Jak již bylo zmíněno výše, jen velmi omezený počet rostlinných čeledí disponuje enzymovou aktivitou potřebnou k významnější tvorbě  $\gamma$ -linolenové kyseliny. Jako nejvýznamnější se ukazuje čeleď Boraginaceae (brutnákovité).

Z čeledi Boraginaceae mají jako zdroj  $\gamma$ -linolenové kyseliny reálný význam dvě rostliny:

Brutnák lékařský (*Borago officinalis*) – olej ze semen této rostliny obsahuje až 24 %  $\gamma$ -linolenové kyseliny. Pěstuje se v oblastech mírného pásma, největšími produkčními zeměmi jsou Velká Británie, Nový Zéland, Polsko, Nizozemsko a Kanada.

Hadinec obecný (*Echium vulgare*) - olej ze semen této rostliny má zcela unikátní složení, obsahuje až 12 - 24 %  $\gamma$ -linolenové kyseliny a vedle toho vysoké množství linoleové kyseliny (20 - 35 %) a významné množství (5 - 13 %) stearidonové (n-3) kyseliny. Jde o teplomilnou rostlinu, hlavními produkčními oblastmi jsou Turecko, Kanárské ostrovy, Madeira a Azory. U nás se vyskytuje jako plevelná rostlina (začíná se objevovat i jako okrasná rostlina), výnosy semen a obsah tuku v nich jsou ale velmi slabé. Oleje hadince a brutnáku obsahují i vysoké koncentrace tokoferolů – až 800 mg / kg.

Rostliny čeledi Boraginaceae ale představují významný problém pro ekosystém. Typická je pro ně syntéza tzv.pyrrolizidinových alkaloidů (echimidin, thesinin aj.), které se vyznačují velmi vysokou toxicitou. Do oleje tyto látky nepřecházejí, ale jsou popsány otravy pasoucího se dobytka plevelným hadincem a kontaminace medu medonosných rostlin pylem brutnáku.

Další rostlinné čeledi již tak významná množství  $\gamma$ -linolenové kyseliny nesyntetizují. Za zmínku stojí pupalka dvouletá (*Oenothera biennis*) – olej obsahuje do 10 % GLA, konopí seté (*Cannabis sativa*) – okolo 3 % GLA (ale až k 20 % linoleové kyseliny) a semena černého rybízu (*Ribes nigrum*) – olej má podobně unikátní složení jako olej hadince – do 13 % GLA, do 17 % linolenové kyseliny a asi 3 % stearidonové kyseliny.

### **Nekonvenční dietární zdroje n-6 kyselin**

K biosyntéze arachidonové kyseliny se využívají hlavně kmeny půdní plísně rodu *Mortierella*. Proces biosyntézy a využití arachidonové kyseliny v přípravcích náhradní kojenecké výživy jsou v EU patentovány firmou Martek.

Další možností je využití transgenních rostlin. Obvyklými akceptory genové manipulace (dobře tolerují cizí gen) mohou být např. tabák virginský (*Nicotiana tabacum*), len setý (*Linum usitatissimum*), brukev sítinovitá (*Brassica juncea*; hořčice indická) aj. Donory genů pro obvyklé i neobvyklé desaturasy a elongasy (např.  $\Delta$ -15 desaturasa ( $\omega$ -3 desaturasa),  $\Delta$ -8 desaturasa,  $\Delta$ -12 desaturasa ..... ) mohou být např. známý měsíček lékařský (*Calendula*

*officinalis*), tropický rostlinný patogen *Pythium irregulare*, již zmíněná půdní plíseň *Mortierella* spp., řasa *Thraustochytrium* spp. aj.

### **Závěr**

Syntéza  $\gamma$ -linolenové kyseliny se ukazuje jako kritický bod kaskády n-6 polyenových mastných kyselin v organismu. Vhodným řešením může být (alespoň občasná) suplementace pomocí oleje s vysokým obsahem  $\gamma$ -linolenové kyseliny. K zatím známým zdrojům (brutnákový a pupalkový olej) lze přiřadit olej ze semen hadince obecného a černého rybízu. Velký potenciál poskytují v této oblasti i transgenní rostliny.

**SILYBIN AMELIORATES DYSLIPIDEMIA AND HYPERGLYCEMIA IN A RAT MODEL OF METABOLIC SYNDROME****M. Poruba<sup>1</sup>, Z. Matušková<sup>1</sup>, L. Kazdová<sup>2</sup>, O. Oliyarnik<sup>2</sup>, H. Malínská<sup>2</sup>, R. Večeřa<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Czech Republic*

<sup>2</sup>*Center of Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic*

**Abstract**

To compare the effectiveness of different drug formulations of silybin in the treatment of hypertriglyceridemia, hyperlipidemia and hyperglycemia. As a model a hereditary hypertriglyceridemic (HHTg) rats were chosen. A total of 28 rats were divided into four groups according to diet and fed for four weeks. The diets were follows: standard laboratory diet (STD) for control group, STD with addition of standardized silybin (SSB), STD with addition of micronized silybin (MSB) and STD with addition of silybin in form of phytoosomes (PSB).

Silybin treatment significantly decrease the serum triglycerides content (SSB:  $p < 0.001$ ; PSB:  $p < 0.01$ ), significantly increase the level of protective HDL-cholesterol content (SSB:  $p < 0.001$ ; MSB:  $p < 0.01$ ; PSB:  $p < 0.0001$ ). Despite our expectation, silybin treatment did not changed the total cholesterol content in serum, but silybin significantly decrease the levels of glucose (SSB:  $p < 0.001$ ; MSB:  $p < 0.0001$ ) and insulin (SSB:  $p < 0.01$ ; MSB:  $p < 0.01$ ).

Our results suggest that administration of silybin may improve the states associated with the metabolic syndrome. The main states ameliorates by silybin are hypertriglyceridemia, low level of protective HDL-cholesterol and hyperglycemia with hyperinsulinemia.

## VLIV FENOFIBRÁTU A JEHO KOMBINACE S ROSUVASTATINEM NA PARAMETRY METABOLICKÉHO SYNDROMU A OXIDAČNÍ STRES PŘI CHRONICKÉM ZÁNĚTU

### EFFECT OF FENOFIBRATE ALONE OR IN COMBINATION WITH ROSUVASTATIN ON METABOLIC SYNDROME PARAMETERS AND OXIDATIVE STRESS IN MODEL OF CHRONIC INFLAMMATION

V. Škop<sup>1</sup>, J. Trnovská<sup>1</sup>, O. Oliyarnyk<sup>1</sup>, I. Marková<sup>1</sup>, H. Malínská<sup>1</sup>, M. Kúdela<sup>3</sup>, L. Kazdová<sup>1</sup>, M. Pravenec<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague

<sup>2</sup>Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, Prague

<sup>3</sup>Department of forensic medicine, Masaryk Hospital in Ústí nad Labem

#### Abstract

Dyslipidemia and inflammation play important roles in the pathogenesis of cardiovascular complications. Fenofibrate is one of the most commonly prescribed hypolipidemic drugs, but instead of its effect on lipid metabolism, it affects inflammation. However effect of fenofibrate on metabolic parameters in chronic inflammation has not been described. In the current study, we tested anti-inflammatory and metabolic effects of fenofibrate alone or in combination with rosuvastatin in a model of inflammation and metabolic syndrome, spontaneously hypertensive rats expressing human CRP transgene in the liver (SHR-CRP). SHR-CRP rats treated with fenofibrate alone (100 mg/kg body weight) or in combination with rosuvastatin (20 mg/kg body weight) compared to SHR-CRP untreated controls showed improved several parameters associated with metabolic syndrome. But activity of brown adipose tissue, parameters of inflammation, concentrations of ALT, AST and ALP, parameters of oxidative stress in the liver and morphology of liver tissue were substantially impaired in rats treated with fenofibrate alone or in combination with rosuvastatin. These findings strongly suggest that in the presence of high levels of human CRP, fenofibrate can induce liver damage even in combination with rosuvastatin.

#### Úvod

Lipidový profil pacientů s diabetem II. typu a metabolickým syndromem je charakteristický sníženou hladinou HDL cholesterolu, zvýšeným množstvím triacylglycerolů (TAG) a přítomností malých densních LDL částic. Tyto změny v lipidovém profilu byly souhrnně označeny jako atherogenní dyslipidemie a jsou považovány za významný rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění. V současné době se jako vhodný způsob léčby atherogenní dyslipidemie ukazuje využití kombinace hypolipidemik s rozdílným cílovým účinkem, zejména kombinace statinů s fibráty. Statiny jako inhibitory hydroxymethylglutaryl-CoA reductasy zejména snižují hladiny LDL cholesterolu, při pouze malém vlivu na HDL cholesterol. Fibráty pak snižují hladiny TAG a mírně zvyšují HDL cholesterol [1].

Fenofibrát náleží do skupiny látek označovaných jako proliferátory peroxisomů. Tyto strukturně rozdílné látky jsou schopny snížit množství sérových lipidů, a v buňkách mají za následek masivní zvýšení množství peroxisomů. Mechanismus jejich účinku je zprostředkován vazbou na transkripční faktory PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), které tak aktivují. Vysoké hladiny PPAR $\alpha$ , který je receptorem fenofibrátu, se nachází zejména ve tkáních s aktivním lipidovým metabolismem, jako jsou játra, svaly nebo hnědá tuková tkáň. PPAR $\alpha$  v neaktivním stavu tvoří heterodimer s dalším transkripčním faktorem RXR (retinoid X receptor), na který je navázaný korepresor, čímž je inhibována

transkripce genů. Po vazbě fenofibrátu je korepresor nahrazen za koaktivátor a je iniciována transkripce. Tímto mechanismem fenofibrát ovlivňuje expresi genů pro  $\beta$ - a  $\omega$ -oxidaci mastných kyselin v peroxisomech, mitochondriích a endoplasmatickém retikulu, lipoproteinovou lipasu, apolipoproteiny asociované s HDL a transkripční faktory regulující lipogenesi. Kromě úlohy v metabolismu lipidů bylo také ukázáno, že fenofibrát pozitivně ovlivňuje zánětlivé parametry, k čemuž dochází pravděpodobně zvýšeným odbouráváním prozánětlivých leukotrienů procesem  $\omega$ - a  $\beta$ -oxidace a inhibicí transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B [2]. Vliv fenofibrátu na zánět však dosud nebyl jednoznačně prokázán, v některých experimentálních a klinických studiích nebyl nalezen žádný vliv fenofibrátu na hladiny zánětlivých faktorů [3,4]. Zároveň zůstává otázkou, jak zvýšený zánětlivý stav ovlivní účinek fenofibrátu na metabolismu lipidů.

Abychom studovali vliv fenofibrátu na zánětlivý proces a zároveň jeho vliv na metabolické parametry při chronickém zánětu, využili jsme jako modelový organismus kmen spontánně hypertensního potkana exprimujícího gen pro lidský C-reaktivní protein (CRP).

### **Materiál a metody**

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 [5]. Potkaní samci ve věku 6 měsíců byli rozděleni do 3 skupin – první skupině bylo podáváno placebo, druhé fenofibrát (100 mg/kg/den) a třetí stejná dávka fenofibrátu v kombinaci s rosuvastatinem (20 mg/kg/den). Ve všech skupinách bylo 7 potkanů a délka pokusu byla 4 týdny. Všechna zvířata měla neustálý přístup ke stravě a vodě a byla chována v kontrolovaných podmínkách.

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). Sérové koncentrace potkaního a lidského CRP, IL-6 a MCP-1 byly stanoveny pomocí komerčních ELISA kitů (Rat C-Reactive Protein (CRP) ELISA Kit, Alpha Diagnostics, USA; Human C-Reactive Protein (CRP) ELISA Kit, Alpha Diagnostics, USA; Rat interleukin 6 ELISA Kit, BioSource, USA; Rat MCP-1 Instant ELISA, eBioscience, Rakousko).

Koncentrace produktů lipoperoxidace (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances) byla stanovena spektrofotometricky pomocí reakce s kyselinou thiobarbiturovou. Obsah oxidovaného (GSSG) a redukovaného (GSH) glutathionu byl stanoven pomocí HPLC kitu s fluorescenční detekcí (ChromSystems, Německo). Katalytické aktivity antioxidantních enzymů superoxidodismutasy (SOD), glutathion-S-transferasy (GST) a glutathionreduktasy (GR) byly měřeny komerčními kity (Cayman Chemicals assay kits, USA). Katalytická aktivita katalasy (CAT) byla stanovena na základě schopnosti  $H_2O_2$  tvořit s molybdenem amonným barevný komplex a katalytická aktivity paraoxonasy (PON) byla určena podle rychlosti rozkladu paraoxonu na barevný p-nitrofenol.

Pro histologické vyšetření byla jaterní tkáň fixována 4% roztokem formaldehydu a zpracována standardním postupem do parafinových bločků. Z bločků byly nařezány 3  $\mu$ m silné preparáty a barveny hematoxylinem a eosinem.

Metabolické parametry bránice, bílé a hnědé tukové tkáně byly stanoveny *ex vivo*. Oxidace (inkorporace do  $CO_2$ ) glukosy a kyseliny palmitové a inkorporace těchto látek do intracelulárních lipidů byly stanoveny inkubací tkáně v s radioaktivně značenou ( $^{14}C$ ) glukosu nebo kyselinou palmitovou, v bazálním stavu nebo v přítomnosti inulinu (250  $\mu$ U/ml).

### Výsledky a diskuze

SHR-CRP potkani, kterým byl podáván fenofibrát, vykazovali v porovnání s kontrolními potkany zlepšené některé parametry asociované s metabolickým syndromem (tab. 1). Zejména byla snížena postprandiální koncentrace glukosy, sérová koncentrace insulinu, mikroalbuminurie a obsah TAG v srdci. Změny v metabolismu po podávání fenofibrátu se dále projeví ve zvýšené bazální a insulinem stimulované lipogenezi v epididymální tukové tkáni a ve zvýšené oxidaci glukosy v bránici. Zároveň však překvapivě došlo ke zhoršení některých parametrů lipidového metabolismu, byl zvýšen obsah TAG v séru a sníženo množství HDL-cholesterolu. Kombinace fenofibrátu s rosuvastatinem vedla ke snížení hladiny celkového cholesterolu, k dalšímu snížení mikroalbuminurie a ke zvýšení lipogeneze v epididymální tukové tkáni.

**Tabulka 1** Vliv fenofibrátu a jeho kombinace s rosuvastatinem na biochemické a metabolické parametry SHR-CRP potkanů

parametr	placebo	fenofibrát	fenofibrát + rosuvastatin
tělesná hmotnost (g)	336±6	349±8	324±11
glukosa postprandiální (mmol/l)	7,6±0,1	7,0±0,2 <b>a</b>	7,3±0,2
TAG postprandiální (mmol/l)	0,58±0,06	0,84±0,08 <b>a</b>	0,94±0,08 <b>c</b>
insulin (nmol/l)	0,450±0,038	0,337±0,052	0,387±0,041
celkový cholesterol (mmol/l)	1,31±0,06	1,26±0,11	1,05±0,04 <b>c</b>
HDL cholesterol (mmol/l)	1,00±0,04	0,70±0,09 <b>a</b>	0,72±0,03 <b>c</b>
mikroalbuminurie (mg/g <sub>krea</sub> )	144±18	86 ±10 <b>a</b>	49 ± 4 <b>bc</b>
TAG v srdci (μmol/g)	1,45±0,18	0,75±0,11 <b>a</b>	0,96±0,18
TAG v <i>m. gastrocnemius</i> (μmol/g)	2,78±0,53	1,86±0,3	3,09±0,44 <b>b</b>
TAG v aortě (μmol/g)	17,1±3,5	18,6±3,6	18,8±2,2
IL-6 (pg/ml)	6,5±1,2	50,3±10,4 <b>a</b>	36,4±9,7 <b>c</b>
MCP1(ng/ml)	12,2±0,7	17,7±2,6	12,6±1,6
potkaní CRP (μg/ml)	97±9	114±4	121±10
lidský CRP (μg/ml)	872±81	456±30 <b>a</b>	495±53 <b>c</b>
ETT - lipogeneze (nmol/g/2h)	bazální	440±60	1095±112 <b>a</b>
	+ insulin	1037±78	2023±189 <b>a</b>
Bránice - glykogeneze (nmol/g/2h)	bazální	782±58	677±65
	+ insulin	1326±95	1235±118
Bránice - oxidace glukosy (nmol/g/2h)	bazální	160±12	206±14 <b>a</b>
	+ insulin	190±12	254±23 <b>a</b>

Hodnoty udávají průměr ± SE; **abc**: statistická významnost rozdílu mezi skupinami - **a**: P<0,05 fenofibrát vs. placebo, **b**: P < 0,05 fenofibrát + rosuvastatin vs. fenofibrát **c**: P < 0,05 fenofibrát + rosuvastatin vs. placebo



V hnědé tukové tkáni byla v předchozích studiích nalezena exprese genu pro transkripční faktor PPAR $\alpha$ , zároveň je tato tkáň významným místem odbourávání lipidů [6]. Z tohoto důvodu by mohla být důležitým cílem pro účinek fenofibrátu. Přímý vliv fenofibrátu na hnědou tukovou tkáň však prozatím nikdo nestudoval. Naše výsledky ukázaly, že fenofibrát samotný i v kombinaci s rosuvastatinem snížil oxidaci glukosy a její inkorporaci do lipidů, zároveň snížil obsah bílkovin a zvýšil celkové množství interskapulární hnědé tukové tkáně (tab. 2). Tyto změny ukazují na přítomnost větších buněk, které jsou však méně metabolicky aktivní.

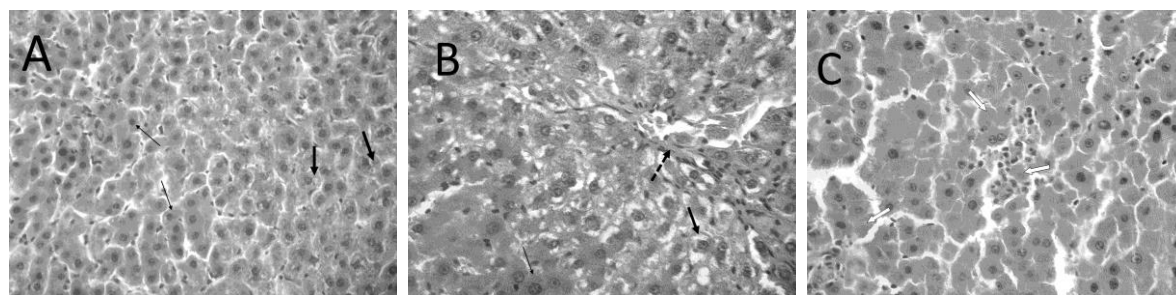
**Tabulka 2** Vliv fenofibrátu a jeho kombinace s rosuvastatinem na parametry hnědé tukové tkáně u SHR-CRP potkanů

parametr	placebo	fenofibrát	fenofibrát + rosuvastatin
hmotnost (g/100g těl. hm)	0,049±0,002	0,073±0,006 <b>a</b>	0,082±0,006 <b>c</b>
obsah bílkovin (%)	5,722±0,26	0,438±0,27 <b>a</b>	3,764±0,19 <b>c</b>
oxidace glukosy (nmol/g/2h)	414±44	266±24 <b>a</b>	292±31 <b>c</b>
lipogenese z glukosy (nmol/g/2h)	693±100	344±62 <b>a</b>	645±120

Hodnoty udávají průměr ± SE; **abc**: statistická významnost rozdílu mezi skupinami - **a**: P < 0,05 fenofibrát vs. placebo, **b**: P < 0,05 fenofibrát + rosuvastatin vs. fenofibrát **c**: P < 0,05 fenofibrát + rosuvastatin vs. placebo

Dále jsme sledovali vliv fenofibrátu a jeho kombinace s rosuvastatinem na zánětlivé parametry u SHR-CRP potkanů (tab. 1). Sérová koncentrace lidského CRP byla po podání fenofibrátu nebo jeho kombinace s rosuvastatinem snížena. Endogenní tvorba potkaního CRP však ovlivněna nebyla. Aby se rekombinantně vnesený lidský CRP exprimoval specificky v játrech, která jsou hlavním zdrojem přirozeně produkovaného CRP, byl tento gen vnesen pod kontrolou Apo-E promotoru. Protože bylo ukázáno, že fenofibrát ovlivňuje expresi genu pro Apo-E [11], je pravděpodobné, že fenofibrát snížil množství lidského CRP právě prostřednictvím interakce s Apo-E promotorem. Další stanovované zánětlivé parametry – sérová koncentrace IL-6 a MCP-1 byly vlivem fenofibrátu zvýšené. K jejich mírnému snížení pak došlo účinkem rosuvastatinu. Důvod, proč snížené množství CRP neovlivnilo pozitivně zánětlivé parametry, může být vysvětlen tím, že toto snížení nebylo dostatečné k redukci negativního vlivu lidského CRP. Částečné zlepšení negativního vlivu fenofibrátu účinkem rosuvastatinu je v souladu s předchozími výsledky, ve kterých byl pozorován pozitivní vliv rosuvastatinu na zánětlivé parametry u SHR-CRP potkanů [9].

Vzhledem k tomu, že transgenní lidský CRP je u tohoto kmene tvořen v játrech, a protože jsou játra také hlavním místem působení fenofibrátu, zabývali jsme se dále tímto orgánem. U experimentální skupiny s fenofibrátem i u skupiny s kombinací fenofibrátu s rosuvastatinem se vyskytovala hepatomegalie, dále byl v játrech výrazně snížen obsah glykogenu, cholesterolu a TAG (tab. 3). Tyto změny byly provázeny výraznými rozdíly ve struktuře jaterní tkáně (obr. 1). U skupin s fenofibrátem samotným a s fenofibrátem v kombinaci s rosuvastatinem byly pozorovány abnormality v přibližně stejném rozsahu. U těchto skupin došlo k výrazné dystrofii, která v některých místech přecházela v nekrosu spojenou s infiltrací leukocytů. U kontrolní skupiny byly pozorovány pouze malé dystrofické změny s centrilobulární reparací. Jaterní poškození se dále projevilo ve zvýšené katalytické aktivitě alaninaminotransferasy (ALT), aspartátaminotransferasy (AST) a alkalické fosfatasy (ALP) v séru. Katalytické aktivity ALT, AST a ALP však byly mírně sníženy podáváním rosuvastatinu (tab. 3).



**Obr. 1.** Histologické vyšetření jaterní tkáně u SHR-CRP potkanů, kterým bylo podáváno placebo (A), fenofibrát samotný a v kombinaci s rosuvastatinem (B,C)  
tenké šipky: zdravý hepatocyt; tlusté šipky: dystrofický hepatocyt; čárkované šipky: místo reparaace; prázdné šipky: nekrotický hepatocyt s infiltrací leukocytů.

**Tabulka 3** Vliv fenofibrátu a jeho kombinace s rosuvastatinem na parametry jaterního metabolismu, poškození a oxidačního stresu

parametr	placebo	fenofibrát	fenofibrát + rosuvastatin
<b>biochemické parametry</b>			
hmotnost (g/100g <sub>těl. hm.</sub> )	3,56±0,07	5,93±0,08 <b>a</b>	6,17±0,29 <b>c</b>
ALT v séru (μkat/l)	2,8±0,2	15,8±1,4 <b>a</b>	9,6±1,7 <b>bc</b>
AST v séru (μkat/l)	6,0±0,3	18,9±2,2 <b>a</b>	11,5±1,4 <b>bc</b>
ALP v séru (μkat/l)	3,2±0,1	11,3±0,5 <b>a</b>	9,7±0,3 <b>bc</b>
obsah TAG (μmol/g)	6,3±0,3	3,6±0,2 <b>a</b>	3,9±0,3 <b>c</b>
obsah glykogenu (mmol/g)	2,47±0,12	0,47±0,05 <b>a</b>	0,47±0,04 <b>c</b>
obsah cholesterolu (μmol/g)	8,6±0,3	6,71±0,32 <b>a</b>	6,22±0,37 <b>c</b>
<b>parametry oxidačního stresu</b>			
konjugované dieny (nmol/mg)	31,3±1,8	45,3±4,1 <b>a</b>	47,9±2,2 <b>c</b>
TBARS (nmol/mg)	1,332±0,070	2,018±0,132 <b>a</b>	1,911±0,147 <b>c</b>
GSH (μmol/mg <sub>prot</sub> )	74,94±4,7	59,4±4,6 <b>a</b>	59,3±2,6 <b>c</b>
GSSG (μmol/mg <sub>prot</sub> )	3,19±0,4	4,23±0,51	4,05±0,54
GSH/GSSG	25,16±2,8	15,33±2,41 <b>a</b>	16,15±2,07 <b>c</b>
SOD (U/mg)	0,136±0,011	0,103±0,004 <b>a</b>	0,104±0,003 <b>c</b>
GSH-Px (μmol NADPH/min/mg <sub>prot</sub> )	301±32	263±22	269±12
GR (μmol NADPH/min/mg <sub>prot</sub> )	123±9	132±8	168±8 <b>bc</b>
GST (nmol CDNB/min/mg <sub>prot</sub> )	130±6	157±9 <b>a</b>	174±8 <b>c</b>
CAT (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg <sub>prot</sub> )	1283±56	1666±124 <b>a</b>	1839±136 <b>c</b>
PON (μmol PNP/min/mg <sub>prot</sub> )	5,16±0,37	3,71±0,33 <b>a</b>	4,23±0,25 <b>c</b>

Hodnoty udávají průměr ± SE; **abc**: statistická významnost rozdílu mezi skupinami - **a**: P < 0,05 fenofibrát vs. placebo, **b**: P < 0,05 fenofibrát + rosuvastatin vs. fenofibrát **c**: P < 0,05 fenofibrát + rosuvastatin vs. placebo

Mírné zvýšení katalytické aktivity aminotransferas bylo pozorováno i u přibližně 20 % pacientů léčených fenofibrátem. Tento efekt však bývá asymptomatický a pouze transienční,

v některých případech však bylo nutné léčbu přerušit. Důvodem, proč má fenofibrát tento negativní vliv na jaterní tkáň, je nejspíše výrazné zvýšení oxidačního stresu a následné oxidační poškození, které je způsobeno zvýšenou tvorbou  $H_2O_2$ . Fenofibrát prostřednictvím aktivace PPAR $\alpha$  zvýší množství peroxisomů a peroxisomálních enzymů včetně acyl-CoAoxidasy, která produkuje  $H_2O_2$  [7]. Abychom tento předpoklad ověřili, studovali jsme v játrech i parametry oxidačního stresu (tab. 3). Fenofibrát samotný i v kombinaci s rosuvastatinem zvýšil množství konjugovaných dienu, produktů lipoperoxidace (TBARS) a snížil poměr redukovaného a oxidovaného glutathionu. Zároveň byla ovlivněna aktivita některých antioxidačních enzymů. Při odstraňování  $H_2O_2$  je nejdůležitějším enzymem peroxisomální katalasa, jejíž tvorba je fenofibrátem také stimulovaná [8]. Navýšení její katalytické aktivity (tab. 3) však nebylo dostatečné ke kompenzaci výrazně zvýšené produkce  $H_2O_2$ . Oxidační stres v játrech způsobený fenofibrátem již nebyl významně ovlivněn podáváním rosuvastatinu, přestože jsme v předchozí studii ukázali, že rosuvastatin samotný pozitivně ovlivňuje parametry oxidačního stresu u SHR-CRP potkanů [9]. Protože podobný negativní efekt na jaterní tkáň a oxidační stres u stejné dávky fenofibrátu nebyl nalezen u jiného potkaního kmene [10], předpokládáme, že zde dochází ke vzájemné potenciaci negativních vlivů způsobených nadexpresí genu pro lidský CRP a fenofibrátem. Dále předpokládáme, že negativní ovlivnění dalších parametrů, jako bylo zvýšení sérových TAG a snížení HDL-cholesterolu, byl sekundární efekt destrukce jaterní tkáně, kdy játra již nebyla schopna plnohodnotně zastávat svoji úlohu v metabolismu.

### Závěr

Přestože je fenofibrát velice často podávaným lékem na dyslipidemii, jeho účinky nemusí být vždy pozitivní. V této studii jsme na potkaním modelu ukázali, že v přítomnosti zánětlivého stavu, způsobeného zvýšenou expresí genu pro lidský CRP, má podávání fenofibrátu za následek výrazné poškození jaterní tkáně. Toto poškození se následně negativně projeví změnou dalších metabolických a zánětlivých parametrů. Při podávání fenofibrátu pacientům se zánětem a zvýšenou hladinou CRP, by z tohoto důvodu měl být brán zřetel na jeho potenciální hepatotoxické působení.

*Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT/14325-3*

### Literatura

1. **Tenenbaum A, Fisman EZ.** Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11: 125.
2. **Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK.** PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal* 2010; 8: e002.
3. **Fegan PG, Shore AC, Mawson D, et al.** Microvascular endothelial function in subjects with Type 2 diabetes and the effect of lipid-lowering therapy. *Diabet Med* 2005; 22(12): 1670-1676.
4. **Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, et al.** Differential effect of atorvastatin and fenofibrate on plasma oxidized low-density lipoprotein, inflammation markers, and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2008; 57(3): 380-386.
5. **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(4): 731-737.
6. **Iizuka K, Wu W, Horikawa Y, et al.** Feedback looping between ChREBP and PPAR $\alpha$

- in the regulation of lipid metabolism in brown adipose tissues. *Endocr J* 2013; 60(10): 1145-1153.
7. **Peters JM, Cheung C, Gonzalez FJ.** Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med (Berl)* 2005; 83(10): 774-785.
  8. **Nemali MR, Reddy MK, Usuda N, et al.** Differential induction and regulation of peroxisomal enzymes: predictive value of peroxisome proliferation in identifying certain nonmutagenic carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 97(1): 72-87.
  9. **Šilhavý J, Zídek V, Landa V, et al.** Rosuvastatin can block pro-inflammatory actions of transgenic human C-reactive protein without reducing its circulating levels. *Cardiovasc Ther* 2014; 32(2): 59-65.
  10. **Sedova L, Seda O, Krenova D, et al.** Isotretinoin and fenofibrate induce adiposity with distinct effect on metabolic profile in a rat model of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28(5): 719-725.
  11. **Ooi EM, Ng TW, Watts GF, et al.** Effect of fenofibrate and atorvastatin on VLDL apoE metabolism in men with the metabolic syndrome. *J Lipid Res* 2012; 53(11): 2443-2449.

## HEPATIC TRIACYLGLYCEROL COMPOSITION IN EXPERIMENTAL MODEL OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

### SLOŽENÍ TRIACYLGLYCEROLŮ V JÁTRECH U EXPERIMENTÁLNÍHO MODELU NEALKOHOLICKÉ STEATOHEPATITIDY

V. Šmíd<sup>1,2</sup>, K. Dvořák<sup>2</sup>, B. Staňková<sup>1</sup>, K. Hůrková<sup>3</sup>, H. Strnad<sup>4</sup>, J. Rubert<sup>3</sup>, M. Zachariášová<sup>3</sup>, A. Žák<sup>2</sup>, J. Hajšlová<sup>3</sup>, R. Brůha<sup>2</sup>, L. Vitek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics,*

<sup>2</sup> *4<sup>th</sup> Department of Internal Medicine, Clinic of Gastroenterology and Hepatology, First Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Charles University in Prague, Czech Republic,*

<sup>3</sup> *Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic,*

<sup>4</sup> *Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic.*

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) probably represent the most common chronic liver diseases in western countries with a substantial risk of liver cirrhosis and high cardiovascular morbidity and mortality (1,2).

The pathogenic mechanism involved in the development of fatty liver remains unclear. It is known that severity of steatosis is well correlated with progression to NASH in humans, and several recent reports gave suggested that accumulation of lipids in the liver, and especially disturbances in the composition of hepatic fatty acids (FA), might play a causal role in the development of NASH (3,4,5). Intricacies of the molecular and cellular mechanisms responsible for progression from simple steatosis to NASH have not been fully elucidated.

Excessive accumulation of lipid substrates in the liver has serious adverse effects on cell functions (6) and especially saturated free fatty acids are directly hepatotoxic, perhaps by mediating an endoplasmic reticulum stress response and inducing hepatocyte apoptosis referred to as lipoapoptosis or lipotoxicity (7). Recent studies suggest that excess fat accumulation in the liver associated with depletion of n-3 polyunsaturated fatty acids and disturbances in the ratio of saturated/unsaturated fatty acids may play a causal role in the pathophysiology of NASH (8).

There is also no established pharmacological treatment of NAFLD and weight reduction and lifestyle modification with increased physical activity stay the only effective therapeutic measures <sup>9</sup>. So there is an imperative need for development of new effective treatment strategies

The aim of the study was to determine the effects of administration of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the high fat methionine-choline deficient (MCD) dietary model of NASH and to assess the role of n-3 PUFA in development and pathogenesis of NASH.

Male C57BL/6 mice were fed for 6 weeks either with MCD or with chow. There were 4 groups of animals. Two groups fed with MCD and two control groups, both either with or without n-3 PUFA supplementation. Detailed liver histology and serum biochemistry were determined. Lipidomic analysis was performed by using ultra high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). Large chromatographic and spectral data sets generated by metabolic fingerprinting were used to assess the differences between groups. In all the cases, Principal Component Analysis (PCA) was initially used. BeadChip analysis was used to profile and identify the differences in liver mRNA transcriptomes.

Feeding with MCD (group M) resulted in histopathological changes of NASH and these changes were ameliorated after PUFA administration (group MP). PUFA decreased cholesterol levels ( $P < 0.001$ ), ALT ( $P < 0.01$ ) and AST levels ( $P < 0.01$ ). MP developed less pro-inflammatory cytokine profile ( $P < 0.01$ ) than controls. Administration of PUFA led to lower serum concentrations of saturated and monounsaturated free FA and to higher serum concentrations of polyunsaturated FA in MP. Total serum lipid content and intensities of TAG was significantly lower in MP compared to M ( $P < 0.001$ ).

In the liver, MCD (M) significantly increased amount of TAG compared to C ( $P < 0.001$ ). PUFA significantly decreased the content of TAG in MP compared to M ( $P < 0.001$ ). In M group the most frequent fractions of TAG were C50, C52, C54 and C56. PUFA (MP) decreased concentrations of fractions C50, C52 and C54. Contrary to it, PUFA (MP) significantly increased fractions C58 and C60. Only after PUFA administration (MP) C62 fraction appeared, which was not detected in M. PUFA administration influenced also the number of double bonds in acyl chains of TAG. After PUFA administration TAG with more double bonds were found in MP compared to M. In the liver, groups without PUFA (control and M) had the highest intensity of arachidonic acid, diets with PUFA (CP, MP) contained higher amount of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid.

Detailed BeadChip analysis revealed differences in liver mRNA transcriptomes after MCD as well as PUFA administration. 4707 gene transcripts were significantly changed ( $P < 0.05$ ) between MP and M liver specimens and 5021 between M and C groups. PUFA administration influenced e.g. expression of mRNA of enzymes of cholesterol and fatty acid biosynthesis pathways and led to significant decrease in mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-2 ( $P < 0.05$ ); IL-6 ( $P < 0.01$ ); TNF-alpha ( $P < 0.05$ ; MP vs. M).

We conclude that n-3 PUFA may play an important role in the pathophysiology of NASH. In summary, n-3 PUFA have favorable effects on histopathological changes, serum markers of liver damage, FA and TAG compound. n-3 PUFA change the metabolomic profile of liver tissue. We expect that n-3 PUFA may represent a promising way in prevention and treatment of NASH, which should be further studied in clinical trials.

*Supported by PRVOUK-P25/LF1/2; SVV 260032-2014*

## References

1. **Vernon G, Baranova A, Yanoussi ZM.** Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274-285.
2. **White DL, Kanwal F, El-Serag HB.** Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 1342-1359.
3. **Wanless IR, Lentz JS.** Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106-1110.
4. **Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, et al.** Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *J Hepatol* 2008; 48(2): 300-307.

5. **Araya J, Rodrigo R, Videla LA, et al.** Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*, 2004; 106: 635-643.
6. **Schaffer JE.** Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 281-287.
7. **Ibrahim SH, Gores GJ.** Who pulls the trigger: JNK activation in liver lipotoxicity? *J Hepatol* 2012; 56: 17-19.
8. **Malinska H, Oliyarnyk O, Hubova M, et al.** Increased liver oxidative stress and altered PUFA metabolism precede development of non-alcoholic steatohepatitis in SREBP-1a transgenic spontaneously hypertensive rats with genetic predisposition to hepatic steatosis. *Mol Cell Biochem* 2010; 335: 119-125.
9. **Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al.** The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55: 2005–2023.

## SÚVISLOSŤ MEDZI OBEZITOU A RASTOVÝM HORMÓNOM U DETÍ A ADOLESCENTOV

### RELATIONSHIP BETWEEN OBESITY AND GROWTH HORMONE IN CHILDREN AND ADOLESCENT

A. Tohatyova<sup>1,2</sup>, E. Joppova<sup>1,2</sup>, D. Stromplova<sup>1,2</sup>, N. Fatulova<sup>1,2</sup>, M. Kuchta<sup>1,2</sup>, I. Schusterova<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medicine, Pavol Jozef Safarik University in Kosice, Slovakia

<sup>2</sup>Childrens Faculty Hospital, Kosice, Slovakia

<sup>3</sup>East Slovakian Cardiovascular Institute, Kosice, Slovakia

#### Introduction

Obesity is associated with a relative low growth hormone (GH) values, which is predictive of greater visceral adiposity. Our study investigates the relationship between GH and childhood obesity.

#### Material and Methods

In 53 (median age 18) overweight and obese subjects and 171 (median age 18) lean controls anthropometric parameters, fasting plasma glucose and insulin, uric acid (UA), GH were measured.

#### Results

In patients with obesity and overweight were significantly lower GH values, higher UA, HOMA-IR, insulin. GH negatively correlated with body weight (BW), BMI, UA and HOMA-IR.

#### Discussion

Obesity is characterized by diminished GH secretion in adults (1,2) and adolescents (3). *We confirmed* the negative association between basal GH levels and anthropometric *parameters* (BW, BMI) and some of *metabolic markers* of *obesity* including hyperuricemia. Pathological GH deficiency (GHD) is characterized by increased cardiovascular risk factors and *premature atherosclerosis* (4,5), which is *attenuated* by GH replacement (6).

#### Conclusions

Obesity seems to be associated with decreased GH. GH could have some protective role against metabolic abnormalities, but further studies are required to elucidate this biological mechanism of such complex relationship.

#### References

1. Scacchi M, Pincelli AI, Cavagnini F. Growth hormone in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 260-271.
2. Franco C, Brandberg J, Lonn L, et al. Growth hormone treatment reduces abdominal visceral fat in postmenopausal women with abdominal obesity: a 12-month placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1466-1474.
3. Misra M, Bredella MA, Tsai P, et al. Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E385-E392.



4. **Maison P, Griffin S, Nicoue-Beglah M, et al.** Metaanalysis of Blinded RP-CT. Impact of growth hormone (GH) treatment on cardiovascular risk factors in GH-deficient adults: a metaanalysis of blinded, randomized, placebo-controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2192-2199.
5. **Sacca L, Atteolini A, Fazio S.** Growth hormone and the heart. *Endocr Rev* 1994; 15: 555-573.
6. **Roemmich JN, Huerta MG, Sundaresan SM, Rogol AD.** Alterations in body composition and fat distribution in growth hormone-deficient prepubertal children during growth hormone therapy. *Metabolism* 2001; 50: 537-547.

**POZITIVNÍ VLIV METFORMINU NA INZULINOVOU REZISTENCI JE SPOJEN SE ZVÝŠENOU UTILIZACÍ LIPIDŮ V HNĚDÉ TUKOVÉ TKÁNI****THE POSITIVE EFFECT OF METFORMIN ON INSULIN RESISTANCE IS ASSOCIATED WITH INCREASED LIPIDS UTILIZATION IN BROWN ADIPOSE TISSUE****J. Trnovská, V. Škop, I. Marková, H. Malínská, J. Urbanová, L. Kazdová***Institute for Clinical and Experimental Medicine Prague, Czech Republic***Abstract**

Metformin is the first-line drug for the treatment of type 2 diabetes and its antihyperglycemic properties are well-characterized. Metformin increase energy expenditure but the mechanism is still unclear. Brown adipose tissue is known for its high fuel utilization during thermogenesis. The aim of this study was investigate if metformin increase fuel utilization by BAT and ameliorate related parameters of metabolic syndrome (MS).

Treatment of Wistar rats (n=6, age: 8 months) with metformin (dose: 300 mg/kg/day) for 4 weeks significantly decreased body weight (-25 %, P < 0,001), adiposity (-61 %, P < 0,002), serum triglycerides (TAG) (-48 %, P < 0,03) and ectopic accumulation of TAG in liver (-72 %, P < 0,02), heart (-66 %, P < 0,03) and diaphragm (-80 %, P < 0,01). BAT activity was measured by lipolysis and palmitic acid (PA) or glucose oxidation and incorporation into interscapular BAT ex vivo. Metformin increased lipolysis (+47 %, P < 0,01) PA oxidation (+45 %, P < 0,03) and PA incorporation into BAT (+26 %, P < 0,01). There were not significant differences in glucose oxidation between groups but incorporation of glucose into BAT was higher after metformin treatment (basal +61 %, P < 0,004; insulin stimulated +60 %, P < 0,01). Results indicate that metformin-induced increase of lipid and glucose utilization in BAT may participate in the improvement of MS disorders.

**Úvod**

Metformin, se k léčbě diabetu 2. typu používá od konce 20. století, a v současnosti je nejčastěji používaným lékem při terapii tohoto onemocnění. Mezi jeho nejdůležitější účinky patří snižování glukoneogeneze a produkce glukózy v játrech, zároveň také zvyšuje citlivost tkání k účinku inzulínu a tím snižuje jeho plazmatické koncentrace.

U pacientů s onemocněním diabetu 2. typu léčba metforminem vedla k poklesu tělesné hmotnosti a ke zlepšení poruch lipidového metabolismu (1). Z dosavadních nálezů vyplývá, že metformin působí pozitivně nejen na metabolismus sacharidů, ale i na lipidový metabolismus, ovšem mechanismy těchto účinků zůstávají stále ne zcela objasněny.

Pokud dochází po metforminové terapii ke snižování triacylglycerolů, mastných kyselin i VLDL cholesterolu v krvi, je jednou z možností jejich snížená produkce játry. Další možností je, že se v těle nachází tkáň, která spotřebovává značné množství těchto substrátů. Za takovou tkáň můžeme považovat hnědou tukovou tkáň (HTT). V dnešní době již víme, že hnědá tuková tkáň se nachází i u dospělých jedinců. Toto bylo zjištěno s vývojem moderních zobrazovacích metod, jako jsou PET/CT. Tyto metody se využívají hlavně ke zjišťování nádorů, ovšem při těchto měřeních byla stále ve stejných oblastech (interskapulární, podklíčková, kolem velkých cév) měřena vysoce aktivní tkáň, která byla následně odhalena jako hnědá tuková tkáň (2-4). Nálezy z poslední doby ukázaly, že aktivita HTT negativně koreluje s věkem a také se stupněm obezity (2). Naopak její aktivita vzrůstá při chladové expozici, protože HTT slouží jako hlavní orgán pro tvorbu tepla během netřesové termogeneze. V HTT se energetické substráty z větší části nespotebovávají na tvorbu ATP,

ale naopak pro tvorbu tepla a to díky tzv. Uncoupling proteinu (UCP1). Tento protein je markerem adipocytů hnědé tukové tkáně a umožňuje tvorbu tepla po nervové stimulaci. Nachází se na vnitřní membráně mitochondrií, kde UCP1 „odpřahuje“ oxidační pochody mitochondriálního dýchacího řetězce od syntézy ATP (5,6). Pro tvorbu tepla a termogenezi se jako zdroj v hnědé tukové tkáni nejprve využívají uskladněné lipidy, ovšem velmi brzo dojde k jejich vyčerpání, vzhledem k velikosti hnědé tukové tkáně. Následně dochází k využití jak triacylglycerolů (TAG), tak glukózy z cirkulace (7).

Cílem této studie bylo zjistit, zda metformin aktivuje hnědou tukovou tkáň a v souvislosti s tím zlepšuje parametry spojené s metabolickým syndromem.

### Metodika

Do pokusu byli zařazeni samci potkanů kmene Wistar ve věku 8 měsíců a v počtu 6 zvířat ve skupině. Kontrolní skupina dostávala standartní dietu a pokusná skupina (Metformin) dostávala standartní dietu s přidavkem metforminu v dávce 300 mg/kg tělesné hmotnosti/ den po dobu 4 týdnů.

Množství triacylglycerolů v plazmě a po extrakci z tkání, popsané v publikaci (8), bylo stanoveno analytickou soupravou TG L 250 S (Erba-Lachema, ČR). Neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) byly měřeny komerčním kitem free fatty acids, half micro test (Roche Diagnostic, Německo), koncentrace glycerolu kitem GLY (Randox, UK). Koncentrace sérového inzulínu komerčním imunochemickým kitem RAT Insulin ELISA kit (Mercodia, Švédsko), CRP (AlphaDiagnostic, USA), HMW Adiponectin (MyBiosource, USA).

Metabolické parametry hnědé a bílé tukové tkáně byly stanoveny *ex vivo* a to podle oxidace (inkorporace do CO<sub>2</sub>) glukózy a kyseliny palmitové a zároveň jejich inkorporace do intracelulárních lipidů po inkubaci tkání v přítomnosti radioaktivně značené glukózy a kyseliny palmitové. Lipolýza byla sledována podle uvolňování NEMK a glycerolu do média.

### Výsledky a diskuze

U potkanů, kterým byl podáván metformin, došlo ke snížení tělesné hmotnosti o 18 %. Vzhledem k tomu, že metformin byl podáván nediabetickým zvířatům, nedošlo u nich k významným změnám v koncentracích plazmatické glukózy, ale významně se snížilo množství inzulínu a zvýšila se hladina vysokomolekulárního adiponektinu. Snížené množství inzulínu souvisí s působením metforminu, který zvyšuje citlivost tkání k jeho účinku. Ke zlepšení došlo u parametrů lipidového metabolismu, množství triacylglycerolů v plazmě bylo významně sníženo, u množství cholesterolu můžeme pozorovat náznak jeho snížení a to při zachování koncentrací HDL cholesterolu. Koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin byly v plazmě mírně zvýšené (tab. 1), což může souviset s jejich zvýšeným uvolňováním z bílé tukové tkáně při lipolýze (tab. 3).

Výrazným účinkem metforminu bylo snížené ektopické ukládání TAG ve tkáních. Z tabulky 2 je patrné, že v játrech, srdci, ve svalu v aortě a v menší míře i v kosterním svalu byly koncentrace TAG sníženy o 50 – 70 %. Snížení množství TG ve tkáních může být důsledkem snížených plazmatických koncentrací TAG nebo jejich zvýšenou oxidací ve tkáních.

Pro vliv metforminu na zvýšenou oxidaci lipidů svědčí výsledky uvedené v tabulce 3, které ukazují, že v hnědé tukové tkáni metformin zvýšil využití palmitátu jak pro oxidaci, tak pro inkorporaci do lipidů. Naproti tomu metformin neovlivnil bazální ani inzulínem stimulovanou oxidaci glukózy, zatímco výrazně zvýšil využití glukózy pro *de novo* lipogenezi. Jak uvádí ve studii Yoo et al. (9) v hnědé tukové tkáni dochází při její aktivaci ke zvýšenému využití glukózy pro tvorbu lipidů a glycerolu, na který se váží jednotlivé MK. Zajímavé výsledky v této souvislosti publikovala v r. 2014 Geerling et al. (10), která prokázala, že metformin snížil množství TAG v cirkulaci v důsledku jejich zvýšeného využití v hnědé tukové tkáni pro oxidaci v mitochondriích.

**Tabulka 1** Vliv metforminu na vybrané ukazatele v plazmě

	<b>Standartní dieta</b>	<b>Metformin</b>	<b>p&lt;</b>
Glukóza (mmol/l)	5,79±0,02	5,31±0,04	N.S.
TAG (mmol/l)	1,36±0,18	0,56±0,06	0,01
NEMK (mmol/l)	0,192±0,034	0,276±0,090	N.S.
Cholesterol (mmol/l)	1,72±0,10	1,53±0,11	N.S.
HDL (mmol/l)	1,24±0,03	1,20±0,15	N.S.
Inzulín (nmol/l)	0,469±0,030	0,182±0,008	0,001
CRP (µg/ml)	502±69	238±33	0,015
HMW Adiponektin (µg/ml)	0,952±0,127	1,365±0,105	0,05

**Tabulka 2** Vliv metforminu na ektopickou akumulaci TAG ve tkáních

	<b>Standartní dieta</b>	<b>Metformin</b>	<b>p&lt;</b>
Játra (µmol/g)	9,594±1,564	2,718±0,201	0,02
Srdce (µmol/g)	2,880±0,533	0,989±0,276	0,03
Bránice (µmol/g)	17,360±2,769	3,551±1,100	0,01
Aorta (µmol/g)	8,659±0,434	4,482±0,866	0,01
M. gastrocnemius (µmol/g)	3,197±0,793	1,088±0,161	0,07

**Tabulka 3** Vliv metforminu na metabolické parametry v hnědé tukové tkáni

			<b>Standartní dieta</b>	<b>Metformin</b>	<b>p&lt;</b>
<b>Kyselina palmitová (nmol palm./g/2hod)</b>	Oxidace		58±10	106±15	0,03
	Inkorporace do lipidů		1797±111	2443±129	0,01
<b>Glukóza (nmol gl. /g/2hod)</b>	Oxidace	bazální	430±60	452±82	N.S.
		inzulínem stimulovaná	820±108	881±125	N.S.
	Inkorporace do lipidů	bazální	447±61	1141±117	0,001
		inzulínem stimulovaná	1944±582	4875±345	0,01

**Tabulka 4** Vliv metforminu na lipolytickou aktivitu v bílé a hnědé tukové tkáni

		<b>Standartní dieta</b>	<b>Metformin</b>	<b>p&lt;</b>
<b>Hnědá tuková tkáň</b>	NEMK (µmol/g)	1,971±0,245	3,740±0,449	0,01
	Glycerol (µmol/g)	4,7±0,6	6,2±1,1	N.S.
	Reesterifikace	0,43	0,66	N.S.
<b>Bílá tuková tkáň</b>	NEMK (µmol/g)	1,311±0,237	2,633±0,573	N.S.
	Glycerol (µmol/g)	0,76±0,11	1,09±0,05	0,05
	Reesterifikace	1,73	1,99	N.S.

Dále jsme sledovali zda metformin ovlivní lipolýzu v bílé a hnědé tukové tkáni. Z výsledků uvedených v tabulce 4 je patrné, že metformin zvýšil uvolňování glycerolu a NEMK jak v bílé (+66 %) tak i hnědé tukové tkáni (+89 %). Z poměru uvolněných NEMK a glycerolu je možné zjistit reesterifikaci, která se počítá jako podíl uvolněných NEMK a glycerolu. V případě, že veškeré NEMK i glycerol, vzniklé hydrolyzou triacylglycerolů, jsou uvolněné z buněk, je esterifikace rovna číslu 3. Čím více je však mastných kyselin v buňkách reesterifikováno nebo oxidováno, tím nižší hodnotu bude číslo udávající reesterifikaci mít. Číslo vypočítané reesterifikace v hnědé tukové tkáni je významně nižší (0,43) oproti bílé tukové tkáni (1,73) (tab. 4). Tento výsledek je v souladu s rozdílnou funkcí těchto tkání, zatímco v hnědé tukové tkáni je většina mastných kyselin po hydrolyze intracelulárních TAG využita zejména pro oxidaci, z bílé tukové tkáně je většina mastných kyselin uvolněna do cirkulace, aby sloužily jako energetický substrát v dalších orgánech. Podání metforminu zvýšilo v bílé tukové tkáni uvolňování NEMK a glycerolu přibližně ve stejném poměru a vypočítaná reesterifikace tak nebyla významně ovlivněna. Z tohoto výsledku je možné usuzovat, že po podání metforminu je zrychlena hydrolyza zásobních TAG, nedochází však ke změně poměru mezi secernovanými a znovu využitými mastnými kyselinami. Zvýšené rychlosti hydrolyzy zásobních lipidů odpovídá také snížené množství viscerální tukové tkáně (epididymální:  $0,422 \pm 0,025$  vs.  $1,087 \pm 0,078$  g/100g tělesné hmotnosti a perirenální tuková tkáň:  $0,073 \pm 0,009$  vs.  $0,616 \pm 0,092$  g/100g tělesné hmotnosti) a zvýšená koncentrace bílkovin v tukové tkáni ( $1,103 \pm 0,191$  vs.  $0,722 \pm 0,074$  %; N.S.), která svědčí pro výskyt menších adipocytů. Rozdíly v metabolismu mezi bílou a hnědou tukovou tkání ukazuje jejich rozdílná reakce na metformin, který zvýšil hmotnost HTT ( $0,055 \pm 0,004$  vs.  $0,037 \pm 0,002$  g/100g tělesné hmotnosti;  $P < 0,01$ ), a zároveň mírně zvýšil i koncentraci bílkovin ( $5,508 \pm 0,507$  vs.  $4,045 \pm 0,458$  %,  $P < 0,07$ ). Tento efekt je možné alespoň částečně vysvětlit výrazně zvýšenou lipogenezí v HTT (tab. 3), která může být doprovázena zvýšením počtu adipocytů.

### Závěr

Metformin je vysoce účinné perorální antidiabetikum. V posledních letech přibývají nálezy o jeho komplexním působení na řadu poruch provázející rozvoj diabetických komplikací. Mechanismus působení metforminu není zcela objasněn. Z uvedených výsledků vyplývá, že jeho pozitivní účinky: zlepšení lipidového profilu, snížení ektopické akumulace lipidů ve tkáních a zlepšení dalších parametrů metabolického syndromu, mohou být alespoň zčásti zprostředkovány zvýšenou utilizací energetických substrátů v HTT.

*Podpořeno grantem GAČR P305/13-04420S.*

### Literatura

1. **Salpeter SR, Buckley NS, Kahn JA, Salpeter EE.** Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. *Am J Med* 2008; 121(2):149-157.
2. **Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al.** Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New Engl J Med* 2009; 360(15):1509-1517.
3. **Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al.** 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *New Engl J Med* 2009; 360(15):1518-1525.
4. **Lichtenbelt WDV, Vanhommerig JW, Smulders NM, et al.** Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *New Engl J Med* 2009; 360(15):1500-1508.
5. **Sell H, Deshaies Y, Richard D.** The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell B* 2004; 36(11): 2098-2104.
6. **Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, et al.** Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 2011; 17(2): 200-205.

7. **Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B.** New powers of brown fat: fighting the metabolic syndrome. *Cell metabolism* 2011; 13(3): 238-240.
8. **Qi NN, Kazdova L, Zidek V, et al.** Pharmacogenetic evidence that cd36 is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone. *J Biol Chem* 2002; 277(50): 48501-48507.
9. **Yoo H, Stephanopoulos G, Kelleher JK.** Quantifying carbon sources for de novo lipogenesis in wild-type and IRS-1 knockout brown adipocytes. *J Lipid Res* 2004; 45(7): 1324-1332.
10. **Geerling JJ, Boon MR, van der Zon GC, et al.** Metformin lowers plasma triglycerides by promoting VLDL-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice. *Diabetes* 2014; 63(3): 880-891.

## LIPIDY U NEUROPSYCHIATRICKÝCH ONEMOCNĚNÍ

### LIPIDS IN NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS

M. Zeman<sup>1</sup>, R. Jiráček<sup>2</sup>, M. Vecka<sup>1</sup>, T. Vařeka<sup>1</sup>, J. Macášek<sup>1</sup>, A. Žák<sup>1</sup>

Univerzita Karlova v Praze, <sup>1</sup>IV. interní klinika 1. LF UK, <sup>2</sup>Psychiatrická klinika 1. LF UK Praha

#### Úvod

Lipidy hrají významnou roli ve fyziologii organismu jako součást energetických zásob, jsou prekursory hormonů, součástí buněčných membrán, jejich deriváty se účastní signální transdukce. Lipidový metabolismus i jeho poruchy mají vztah k řadě významných onemocnění (ateroskleróza a její komplikace, diabetes mellitus 2. typu, chronická onemocnění ledvin i jater), ale významnou roli hrají také u onemocnění neuropsychiatrických, jako je schizofrenie, afektivní poruchy, demence a další. Poruchy lipidového metabolismu, přítomné u neuropsychiatrických onemocnění se také podílejí na patogenezi komorbidit, které jsou u nemocných s těmito onemocněními spojeny, se zvýšenou celkovou mortalitou a se zkrácením doby přežití. Léky užívané v léčbě poruch lipidového metabolismu mohou různým způsobem zasahovat do patogeneze neuropsychiatrických onemocnění. Tento článek je věnován vztahu lipidů k patogeneze nejzávažnějších neuropsychických onemocnění, jakými jsou schizofrenie, deprese a Alzheimerova demence

#### Schizofrenie

Schizofrenie je onemocnění, postihující celosvětově asi 1% populace. U tohoto onemocnění dochází k poruše myšlení, vnímání, a emotivity, která je oploštělá a neodpovídá situaci. Vědomí je přitom jasné a intelektuální kapacita zůstává dlouho zachována. Příznaky schizofrenie jsou zhruba děleny na „pozitivní“ (halucinace, bludy, porucha řeči, katatonní příznaky) a „negativní“ (oploštění emotivity, apatie, abulie). Patofyziologie schizofrenie je zřejmě multifaktoriální, byla zatím představena řada hypotéz. Jednou z nejvíce populárních je hypotéza dopaminová, která předpokládá zvýšenou dysregulaci dopaminové transmise se zvýšenou presynaptickou striatální dopaminergní aktivitou jako konečnou společnou dráhu k psychoze (Howes a Kapur 2009). Jiné hypotézy se zabývají abnormalitami glutamatergní nebo GABA-ergní neurotransmise. Podle fosfolipidové hypotézy Horrobina (Horrobin 1998) je schizofrenie spojena se změnami složení fosfolipidů buněčných membrán v důsledku se zvýšeným štěpením membránových fosfolipidů či sníženým přísunem fosfolipidů do membrán. Byla předpokládána zvýšená aktivita cytosolové fosfolipázy A2 (cPLA2). Novější hypotéza vychází z toho, že schizofrenie je spojena s chronickým stresem, provázeným desinhibicí aktivity jádra *dorsalis raphe nucleus* (DRN), která vede k nadměrné serotonergní aktivitě v mozkové kůře. Výsledkem je zvýšená aktivita cPLA2 a následně centrální i periferní deficit kyseliny eikosapentaenové (EPA) a arachidonové (AA). Protože EPA je přítomna v menším množství než AA, dochází k poruše rovnováhy mezi kaskádami druhotných posílů tvořených z EPA a AA. Podle této teorie jsou dvě hlavní příčiny neuronální dysfunkce u schizofrenie: desinhibice DRN a deficit EPA (Eggers 2012). Experimentální studie na zvířecích modelech prokázaly, že chronický deficit vícenenasycených mastných kyselin řady n-3 (PUFA n-3) ovlivňuje dopaminergní funkce ve frontální kůře a ventrálním striatu (Condray a Yao 2008); dopaminové D2 receptory mohou se účastnit aktivace cPLA2 a s uvolněním AA z fosfolipidů buněčných membrán (Bhattacharjee et al. 2005). Abnormalitám fosfolipidů a deficitu PUFA n-3 je v patogeneze schizofrenie přikládán velký význam. U nemocných se schizofrenií jsou zjišťovány abnormality v metabolismu fosfolipidů zejména

pokles koncentrace fosfatidylserinu (PS), fosfatidylcholinu (PC), fosfatidyletanolaminu (PE) v buněčných membránách v důsledku deficitu PUFA (i deficit PUFAn-3 a PUFA n-6, zejména AA, DHA a EPA) v membránách erytrocytů a post mortem v mozcích schizofreniků. V membránách erytrocytů i v mozcích nemocných schizofrenií byl popsán zejména pokles AA a DHA (Horrobin et al. 1991) našli post mortem u schizofrenních pacientů v orbitofrontálním kortexu snížený obsah DHA a zvýšené poměry AA:DHA u mužů, zatímco ne u žen. Někteří autoři zjistili za pomoci magnetické rezonanční spektroskopie (MRS) při použití značeného P31 sníženou hladinu fosfomonoesterů a zvýšenou hladinu fosfodiesterů v temporálních a frontálních lalocích schizofreniků (Fukuzaka et al. 1999, Keshavan et al. 2000). V krvi a mozcích schizofreniků byly také zjištěny zvýšené hladiny fosfolipázy A2 (PLA2), který se účastní štěpení mastných kyselin ze sn2 pozice fosfolipidů (Ross et al. 1999, Takeuchi et al. 2002). V etiopatogenezi schizofrenie se mohou uplatňovat i další mechanismy, jichž se účastní omega-3 a omega-6 PUFA (především snížením n-3 nebo zvýšením poměru n-6:n-3), špatné stravovací návyky schizofrenních nemocných, které mohou aspoň částečně vést k deficitu polynenasycených mastných kyselin. Obsah PUFA v membránách erytrocytů koreloval se sémantickou pamětí schizofreniků (Condray et al. 2008). Bylo provedeno více placebem kontrolovaných studií s podáváním PUFA n-3 schizofrenním pacientům. Výsledky jsou značně inkonzistentní, často srovnatelné s placebem (Ross et al. 2007). V RCT, trvajícím 12 týdnů, u 76 jedinců se subthreshold psychosis 13 - 25 let starých, snížilo podávání PUFA n-3 v denní dávce 1,2 g kumulativní riziko progresu do manifestní psychózy o 22,6 % ( $p = 0.007$ ) (Amminger et al. 2010).

Abnormality lipidů u schizofrenie souvisejí zejména s velmi často přítomným metabolickým syndromem (MetS). Očekávaná doba života schizofrenika je o 20 % kratší než u běžné populace. Mortalita u nemocných se schizofrenií dosahuje téměř dvojnásobku ve srovnání s údaji u běžné populace (Enger et al. 2004). Není to způsobeno jen zvýšenou incidencí sebevražd a úrazů, ale zejména vyšším výskytem diabetes mellitus typu 2 (DM2) a kardiovaskulárních onemocnění (KVO). U schizofreniků byl prokázán častější výskyt inzulínové rezistence (IR) a porušené glukózové tolerance (Ryan a Thakore 2002). V jedné americké studii měli nemocní se schizofrenií třikrát větší riziko rozvoje MetS než osoby běžné populace, přičemž hispánské pacienty měli toto riziko významně zvýšeno oproti ne-hispánským (Kato et al. 2004). V nedávno publikované studii bylo zjišťováno, jaké jsou rozdíly mezi osobami s MetS a schizofrenií na jedné straně a osobami s MetS bez duševního onemocnění a bylo zjištěno, že přítomnost schizofrenie je spojena s nižším věkem nástupu MetS, vyšší abdominální obezitou a nižším HDL-C, a podle autorů v pozadí tohoto jevu může být inzulínová rezistence (Margari et al. 2013). Mezi pacienty se chronickou schizofrenií a schizoafektivní poruchou v jižním Taiwanu byla prokázána vyšší prevalence MetS a také vyšší 10-leté riziko ICHS podle Framinghamského systému než u osob běžné populace (Tseng et al. 2014). Výskyt MetS mezi pacienty se schizofrenií byl zkoumán v Chorvatsku, kde 56,5 % pacientů se schizofrenií mělo MetS (podle NCEP ATP III) (Lasič et al. 2014). V jiné studii byly zkoumány lipidomické profily asociované se schizofrenií u dvojčecích párů diskordantních pro schizofrenii a také u nepostižených dvojčecích párů; ve srovnání se zdravými protějšky měli pacienti se schizofrenií zvýšené hladiny triglyceridů (TG), nižší hladinu lysofosfatidylcholinu (který je preferovaným nosičem PUFA přes hematoencefalickou bariéru) a byli více inzulínorezistentní (Oresič et al. 2012). Navíc, zdravá dvojčata z diskordantních párů měla vyšší HOMA-IR. Je jisté, že poruchy homeostázy glukózy, dyslipidémie a inzulínová rezistence u schizofreniků mohou být podporovány léčbou klasickými nebo atypickými antipsychotiky, kdy dochází k vzestupu hmotnosti, a k dalším vedlejším metabolickým účinkům, zejména ke snížení citlivosti na inzulín se zvýšeným rizikem vzniku MetS a DM2. Na druhou stranu zvýšená hladina TG byla u schizofreniků popisována i po korekci na antipsychotickou léčbu a na přítomnost metabolických komorbidit



(Oresič et al. 2012). Ryan et al. (2003) našli u dosud neléčených schizofreniků ve srovnání se stejně starou skupinou kontrolních osob významně vyšší podíl osob s porušenou glukózovou tolerancí, vyšší hladiny glukózy, inzulínu a kortisolu na lačno a nižší inzulínovou senzitivitu, měřenou pomocí HOMA (homeostasis model assessment). Ve finské studii byla prevalence MetS mezi osobami se schizofrenií 36,2 %, u jiných neafektivních psychóz 41,4 % a u afektivních psychóz 25 %. Nemocní se schizofrenií měli navíc významně nižší HDL-C, vyšší TG, glykémie a obvod pasu, ale současně nižší systolický TK ve srovnání s běžnou populací. Podle autorů této studie jsou neafektivní psychózy spojeny s rysy MetS nezávisle na léčbě antipsychotiky, ovšem podávání klasických antipsychotik tento stav ještě akcentuje (Suvisaari et al. 2007). Další studie prokázaly hyperinzulinémií u nově zjištěných pacientů dosud neléčených antipsychotiky (Guest et al. 2010).

## Deprese

Deprese je komplexní heterogenní onemocnění s dosud neobjasněnou patofyziologií. V rozvoji deprese se uplatňuje řada faktorů, jako deplece serotoninu, ale i jiných monoaminů ve specifických oblastech mozku, chronický stres, provázený aktivací osy hypothalamus-hypofýza-nadledvina s následnou zvýšenou tvorbou kortikotrofního hormonu, poruchy plasticity neuronů, oxidační stres a další (Belmaker a Agam 2008)

Afektivní poruchy jsou v České republice jsou po kardiovaskulárních onemocněních čtvrtou nejčastější příčinou plné invalidity. Navíc deprese že je spojena se zvýšeným rizikem diabetes mellitus 2. typu (Mezuk et al. 2008), se zvýšenou mortalitou na kardiovaskulární onemocnění i se zvýšenou celkovou mortalitou (Wulsin et al. 1999). Proto jsou vztahy deprese k metabolismu lipidů a glycidů předmětem zájmu.

Dosud zcela nebyla vyřešena otázka vztahu cholesterolu k depresivní poruše. Cholesterol je součástí biologických membrán, kde spolu s fosfolipidy je významnou determinantou jejich fluidity, která ovlivňuje aktivitu enzymů, iontových kanálů a další charakteristiky. V centrálním nervovém systému se cholesterol podílí na správné funkci neurotransmise (Ghaemi et al. 2000).

V řadě „case-control“ a průřezových studií byly zaznamenány vztahy mezi nízkou hladinou celkového cholesterolu a depresí, (Jow et al. 2006, Olusi a Fido 1996). Některé studie zjistily vztahy mezi nízkou hladinou cholesterolu a sebevražednými pokusy (Fiedorowicz a Coryell 2007) i dokonanými sebevraždami (Ellison a Morrison 2001). Na druhé straně v některých studiích byla zvýšená hladina cholesterolu spojena s menší odpovědí na léčbu antidepressivy a s větší tendencí k relapsům onemocnění (Papakostas et al. 2003, Papakostas et al. 2004). V mozcích nemocných s depresí byl snížený obsah cholesterolu spolu s poklesem synapsí (Beasley 2005). V jedné prospektivní studii koncentrace celkového cholesterolu nepředpovídala depresivní fáze u nemocných s unipolární depresí, naopak nízký sérový cholesterol u nemocných s bipolární poruchou předpovídal manické fáze (Fiedorowicz et al. 2010). Mechanismy spojení cholesterolu s afektivními poruchami a sebevražedným jednáním nejsou jasné. Někteří autoři předpokládají, že nízká hladina cholesterolu je spojena s poklesem serotonergní funkce (Papakostas et al. 2004). Předpokládá se také, že nízký sérový cholesterol mění metabolismus serotoninu, což vede k depresi, nedostatečné kontrole agresivních impulsů až zvýšenému riziku sebevraždy. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi sérovým cholesterolem a hladinou 5-hydroxyindolactové kyseliny v mozkomíšním moku. Podle Engelberga et al. (1992) je snížení hladiny cholesterolu spojeno se změnou viskozity a funkcí serotoninových receptorů. Vztah mezi cholesterolem, depresí a sebevražedností však stále není jasný. Ve velké finské prospektivní studii byla naopak vyšší hladina cholesterolu pozitivně asociována s násilnými 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). 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). Maes et al. (1997) zjistili, že nízký HDL-cholesterol je markerem pro depresi a suicidální chování u depresivních mužů, nízká hladina HDL-C je pravděpodobně důsledkem působení zánětlivého stavu u deprese, a že u depresivních jedinců dochází k poruše reverzního transportu cholesterolu.

Vzhledem k popsáným vztahům nízké hladiny cholesterolu k depresi a k suicidálnímu chování, jsou zkoumány možné vedlejší psychiatrické účinky hypolipidemické léčby, zejména léčby statiny a jednoznačné závěry také nebyly učiněny. V jedné studii bylo upozorněno na možný zvýšený výskyt psychiatrických onemocnění (např. deprese) a sebevražd v primárně preventivních studiích se statiny (Boston et al. 1996), na druhé straně v jiných studiích tyto vztahy nebyly potvrzeny (Davidson et al. 2000), naopak bylo zjištěno, že dlouhodobé užívání statinů u nemocných s ICHS snižovalo riziko deprese, úzkosti a hostility (Young-Xu et al. 2003), nezávisle na hypolipidemickým působením. V novějších studiích rovněž nebyly zjištěny zcela konzistentní výsledky. V jedné studii provedené skupině osob s afektivními poruchami, mezi kterými převládali nemocní s bipolární poruchou, byl zjištěn vyšší výskyt suicidální ideace u těch, kteří byli léčeni statiny (Davison a Kaplan 2014). Na druhé straně v rozsáhlé retrospektivní studii provedené v Taiwanu bylo nalezeno, že hyperlipidémie zvyšuje riziko deprese a užívání statinů je spojeno s poklesem rizika deprese u nemocných s hyperlipidemií (Chuang et al. 2014). V prospektivní kohortové studii u nemocných s ischemickou chorobou srdeční léčba statiny byla spojena se sníženým rizikem vzniku deprese (Otte et al. 2012).

Zajímavé jsou vztahy deprese k hladině triglyceridů, resp k metabolickému syndromu. V rozsáhlé prospektivní studii u 5232 osob středního věku, byl zjišťován vztah komponent metabolického syndromu (MetS) k rozvoji depresivní symptomatologie. Přítomnost MetS byla spojena s významně vyšším rizikem manifestace deprese v budoucnosti, přičemž z pěti komponent předpovídala depresi pouze viscerální obezita, hypertriglyceridémie a nízký HDL-C (Akbaraly et al. 2009). V prospektivní finské studii byl zkoumán vztah trajektorií hladin TG, vyšetřovaných ve skupině 824 mladých jedinců opakovaně v průběhu 20 let, k hodnotám Beckovy stupnice míry deprese, které byly též prospektivně sledovány. Bylo zjištěno, že typ strmě stoupající trajektorie TG během dětství je spojen s rizikem deprese v dospělosti (Elovainio et al. 2010). V jiné studii deprese nebyla asociována se zvýšením podílu malých denzních částic LDL, které jsou vysoce aterogenní a korelují pozitivně s hladinou TG (Lehto et al. 2010). Ve studii u Latinoameričanů byla v regresní analýze zjištěna významná asociace závažnosti symptomů deprese s BMI, přítomností diabetu, zvýšenou hladinou sérového cholesterolu a TG (Glassy et al. 2010).

### **Alzheimerova demence**

Lipidy hrají významnou roli také v patofyziologii Alzheimerovy demence. Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, charakterizované progredující atrofií neuronů zejména v oblasti mozkové kůry a hippocampu, úbytkem synapsí a snížením neuronální plasticity, nálezem extracelulárních depozit amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ) v senilních placích a přítomností intracelulárních neurofibrilárních klubek (neurofibrillar tangles, NFT). Rozlišují se dvě základní formy AD: (1) familiární forma, manifestující se mezi 40. až 60. rokem věku, u které je většina případů spojena se vzácnými, vysoce penetrantními mutacemi tří genů: gen pro amyloidový prekurzorový protein, APP, gen pro presenilin 1, PSEN1 a gen pro presenilin 2, PSEN2 a (2) pozdní („late-onset AD, LOAD“), zvaná též sporadická forma. LOAD

představuje nyní nejméně 90 % všech případů AD a její výskyt stále vzrůstá, zřejmě v souvislosti se stoupajícím významem nepříznivých faktorů zevního prostředí. Patogeneze LOAD dosud není objasněna, uplatňuje se zde oxidační stres, zánět a řada metabolických faktorů, z nichž jsou v popředí odchylky v metabolismu lipidových látek, což vzhledem k zastoupení lipidů v centrálním nervovém systému (CNS) není překvapující. Patří sem zejména poruchy přeměny sterolů, glycerofosfolipidů (Kosicek a Hecimovic 2013) a sfingolipidů (Haughey et al. 2010). U LOAD se uplatňuje složitá interakce genetických a environmentálních faktorů (Traynor a Singleton 2010). Nejvýznamnějším genetickým rizikovým faktorem spojeným s výskytem LOAD je gen APOE, resp. přítomnost alely  $\epsilon 4$ . Významnými rizikovými faktory jsou také zejména věk, dále obezita, vysoký příjem kalorií a nasycených tuků ve stravě, kouření cigaret, diabetes mellitus typu 2 (DM2), hyperhomocysteinémie nebo deprese (Reitz a Mayeux 2014, Wuwongse et al. 2010).

Lidský mozek obsahuje asi 25 % celkového cholesterolového poolu v těle, i když tvoří jen asi 2 % tělesné hmotnosti (Bjorkhem 2006, Dietschy a Turley 2004). Většina cholesterolu je uložena v myelinových pochvách a plasmatických membránách astrocytů a neuronů. Asi 70 – 80 % cholesterolu v mozku je v myelinu, tvořeného v oligodendrocytech. Po dokončení myelinogeneze je syntéza cholesterolu v CNS nízká a probíhá v astrocytech (Nieweg et al. 2009). V neuronech nedochází k významné syntéze cholesterolu, a proto jsou neurony závislé na jeho externím přísunu. Neurony přijímají cholesterol z lipoproteinů po jejich vazbě na receptory LDL receptorové rodiny. Ligandem pro tyto receptory je apolipoprotein E (Herz 2009). Stálá syntéza a obrat cholesterolu v neuronech jsou mimo jiné nezbytné pro mechanismy učení a paměti funkce neuronů, jako je long term potentiation (LTP) (Kotti et al. 2006). Katabolismus cholesterolu v mozku je zajišťován pouze jedním enzymem, cholesterol 24-hydroxylázou (CYP46A1), který přeměňuje cholesterol na 24(S)-hydroxycholesterol (Bjorkhem a Meaney 2004). 24(S)-hydroxycholesterol snadno prochází buněčnou membránou a jakmile je syntezován, přestupuje hematoencefalickou bariérou do periferního oběhu a do jater, kde je vyloučen do žluči. Enzym je téměř výlučně lokalizován v neuronech mozku a sítnice. 24(S)-hydroxycholesterol má antiamyloidní charakter, zvyšuje aktivitu  $\alpha$ -sekretázy i poměr aktivit  $\alpha/\beta$ -sekretáza. U pacientů s AD jsou plasmatické hladiny 24(S)-hydroxycholesterolu sníženy, zatímco koncentrace v mozkomíšním moku (CSF) zvýšeny. Charakteristickým rysem různých stádií AD, včetně mírné kognitivní poruchy, je nález zvýšené hladiny celkového i fosforylovaného tau proteinu v CSF, zatímco hladiny  $A\beta_{42}$  a poměru  $A\beta_{42}:A\beta_{40}$  jsou zde sníženy. Hladiny jiného metabolitu cholesterolu, 27-hydroxycholesterolu jsou u AD zvýšeny, přičemž v experimentu bylo zjištěno, že 27-hydroxycholesterol může ovlivněním funkce NMDA receptoru interferovat s paměťovou funkcí (Mateos et al. 2009). Cholesterol má velký význam pro organizaci a funkci dvojrstevných buněčných membrán, zejména pro strukturu lipidových mikrodomén, nazývaných „lipid rafts“, vyskytujících se v buněčných membránách, v membránách Golgiho systému a endosomálních membránách. „Lipid rafts“ obsahují významný podíl cholesterolu, sfingomyelinu, glykosfingolipidů. V těchto mikrodoménách jsou lokalizovány některé membránové proteiny. Významná je zde kolokalizace APP s amyloidogenními sekretázami  $\beta$ -sekretázou a  $\gamma$ -sekretázou;  $\alpha$ -sekretázy se nacházejí mimo tyto mikrodomény (Kojro et al. 2001). Bylo zjištěno, že cholesterol přímo stimuluje aktivitu  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretáz a naopak deplece cholesterolu např. působená statiny vede k poklesu jejich aktivity a zvyšuje se podíl štěpení  $\alpha$ -sekretázou (Grimm et al. 2013). Vztahy mezi hladinami plasmatického cholesterolu a rizikem vývoje AD jsou přesto dosud ještě předmětem diskuze. Zvýšené hladiny cholesterolu ve středním věku byly v jedné studii spojeny s 2 – 3 násobným rizikem rozvoje AD v pozdějším věku (Kivipelto et al. 2001). V jiné studii byly nízké hladiny HDL-C asociovány s vyšším rizikem demence, zatímco vysoký HDL-C byl spojen s větším objemem hippocampu a nižším rizikem AD (Wolff et al. 2001). Naproti tomu některé epidemiologické

studie ukázaly negativní s asociace mezi celkovým cholesterolem a AD. Např. Mielke et al. (2005) zaznamenali, že vysoký celkový cholesterol mezi 70 a 79 léty věku snižoval riziko demence mezi 79 až 88 rokem. Panza et al. (2006) vyslovili hypotézu, že několik let před nástupem demence celkový cholesterol klesá, zřejmě v souvislosti s progredující patologií AD. Na rozdíl od plasmy jsou lipoproteiny v CNS zastoupeny jen částicemi podobnými HDL (Hayashi 2011). Tyto částice jsou sekretovány z gliálních buněk, zejména astrocytů a mikroglíí, za určitých podmínek, např. v souvislosti s excitotoxickým poškozením, mohou být sekretovány i neurony (Hayashi et al. 2011).

Významná role v patogeneze AD připadá fosfolipidům. Membrány neuronů jsou složeny z glycerofosfolipidů (GP), sfingolipidů (SL), cholesterolu a proteinů, přičemž distribuce lipidů v membránové dvojvrstvě není symetrická. Neuronální aktivita je modulována souhrou mezi membránovými receptory na buněčném povrchu a intracelulárními signálními proteiny. V mozkových buňkách jsou homeostatické pochody zajišťovány komplexní sítí lipidových mediátorů odvozených z GP, SL a cholesterolu. Lipidové mediátory jsou uvolňovány po aktivaci fosfolipáz A2 (PLA<sub>2</sub>), sfingomyelináz a cytochrom P450 dependentních oxygenáz. Jejich široké spektrum zajišťuje celé spektrum účinků na homeostázu neuronů, regulaci imunitní odpovědi, oxidačního stresu a zánětu (Frisardi et al. 2011). Štěpení GP účinkem PLA<sub>2</sub> vede ke vzniku řady biologicky aktivních molekul, jako jsou eikosanoidy, lysofosfolipidy, destičky aktivující faktor - PAF, endokanabinoidy, dokosanoidy, isoprostany, neuroprostany a řada dalších (Frisardi et al. 2011). Fosfolipidy jsou důležitou součástí membrán neuronů i gliálních buněk. V membránách jsou glycerofosfolipidy, sfingolipidy a proteiny asymetricky uspořádané mezi dvěma vrstvami membrán. Fosfolipidy hrají v membránách roli v udržování strukturální integrity, ale také jsou spolu s cholesterolem součástí sítě, která zabezpečuje signální transdukcii, převádějící extracelulární signály z buněčného povrchu do buněčného jádra, kde dochází k biologické odpovědi, zajišťované druhotnými posly (second messengers), kterými jsou bioaktivní lipidové mediátory (Farooqui 2010).

**Glycerofosfolipidy** jsou amfipatické molekuly, nutné k optimální funkci integrálních membránových proteinů, receptorů, transportérů, iontových kanálů, ale slouží také jako zásobní depot lipidových mediátorů (Farooqui et al. 2010). V autoptickém materiálu, získaném z mozků osob zemřelých na AD byly nalezeny nižší koncentrace glycerofosfolipidů (GP) ve srovnání se stejně starými kontrolami (Kosicek a Hecimovic 2013). Pokles hladiny fosfolipidů není stejný u všech tříd. Deficit pPE (fosfatidyletanolamin plasmalogen) v bílé hmotě činil asi 40 % již u časného stadia AD a byl konstantní během progresu onemocnění, zatímco v šedé hmotě během progresu postupně stoupl z 10 % na 30% (Han et al., 2001). Je zajímavé, že v časném stadiu AD hladiny jiných fosfolipidových tříd hmotě (fosfatidylcholin, fosfatidylinositol, fosfatidyletanolamin) v mozku nebyly změněny v bílé ani šedé (Han et al. 2002). Je možné, že pokles hladiny GP v mozku nemocných s AD souvisí se zvýšenou aktivitou PLA<sub>2</sub>, která je u AD popisována (Frisardi et al. 2011). Příčiny vyšší aktivity nejsou jasné, může ji zvyšovat A $\beta$ , cytokiny, jež jsou u nemocných s AD uvolňovány z aktivovaných mikroglíí nebo hromadící se metabolity sfingolipidů, zejména ceramid nebo ceramid -1 fosfát (Frisardi et al. 2011). Molekula GP obsahuje na druhém uhlíku esterifikovanou kyselinu arachidonovou (AA) nebo dokosaheptaenovou (DHA), které jsou působením PLA<sub>2</sub> uvolněny za vzniku lysofosfolipidů. Další metabolismus AA a DHA vede ke vzniku řady derivátů, v případě AA jsou to eikosanoidy (prostaglandiny, leukotrieny, lipoxiny, tromboxany, nebo kyseliny hydroxyeicosatetraenové, HETE), v případě DHA dokosanoidy (resolviny, neuroprotektiny, maresiny) (Marcheselli et al. 2003, Yang et al. 2011, Serhan et al. 2011).

**Sphingolipidy** jsou heterogenní třída lipidů, jejichž základem je molekula 18 ti uhlíkatého alkoholu sfingosinu, který je syntezován z palmitoyl-CoA a serinu enzymem serin palmitoyl-CoA transferáza (SPT). Acylací sfingosinu vzniká ceramid, Cer (N-acyl-sfingosin). Mastnou kyselinou je většinou nasycená nebo monoenoová mastná kyselina. Enzym sphingomyelin syntáza (SM-syntáza) přeměňuje ceramid na sfingomyelin tak, že fosfatidylcholin reaguje s ceramidem a vedle sfingomyelinu vniká diacylglycerol. Jiný enzym, neutrální sfingomyelináza (nSMase) katalyzuje přeměnu SM na Cer. V autoptických vzorcích nemocných s AD jsou nacházeny zvýšené hladiny Cer v šedé i bílé hmotě, dokonce již u časných stádií AD. Současně byly prokázány i abnormality exprese enzymů, ovládajících metabolismus sphingolipidů a hromadění Cer, jako např. serin palmitoyltransferáza, neutrální sphingomyelináza a kyselá sphingomyelináza (Grimm et al. 2013). Nedávno byla publikována studie, ve které bylo zjištěno, že zvýšené hladiny Cer v séru jsou spojeny s několikanásobným zvýšením rizika rozvoje AD během devítiletého sledování (Mielke et al. 2012). Ceramidy indukují apoptózu a mají přímý neurotoxický účinek (Dawson et al. 1998). Cer zvyšuje produkci A $\beta$  a současně A $\beta$  zvyšuje syntézu Cer zvýšením aktivity neutrální SMázy, což vede ke vzniku bludného kruhu (Lee et al. 2004, Grimm et al. 2013).

V mozkomíšní tekutině nemocných s prodromálním stadiem AD byly nalezeny zvýšené hladiny SM, zatímco u jedinců s mírnou až střední formou AD byly koncentrace SM nevýznamně nižší (Kosicek a Hecimovic 2013). V mozcích nemocných s AD byla prokázána vyšší aktivita neutrální SMázy, vedoucí ke zvýšenému štěpení SM (Grimm et al. 2013). Vyšší sérová hladina SM nemocných s AD přitom korelovala s pomalejším rozvojem kognitivního deficitu (Mielke et al. 2011). Další lipidovou třídou s předpokládanou úlohou v patogeneze AD jsou **sulfatidy**. Sulfatidy vznikají tak, že nejprve je k Cer za účasti enzymu ceramid galaktosyltransferázy (CGT) připojena galaktóza a pak na galaktoyl připojena sulfátová skupina reakcí, katalyzovanou cerebrosid sulfotransferázou (CST). Sulfatidy jsou zastoupeny hlavně v myelinových pochvách, kde tvoří asi 5 % myelinového lipidu. Jsou tvořeny převážně v oligodendrocytech a Schwannových buňkách. V mozcích osob s AD byl prokázán významný deficit sulfatidů současně se zvýšeným obsahem Cer (Han et al. 2002). Zajímavé je, že deficit sulfatidů byl v jedné studii zjištěn v bílé hmotě frontálního laloku pouze u nemocných se sporadickou formou AD, na rozdíl jak od kontrol, tak osob s časnou formou AD (Gottfries et al. 1998). Nízká hladina sulfatidů byla zjištěna v mozkomíšním moku a mohla by být prediktorem progresu postižení bílé hmoty (Jonsson et al. 2012).

Při studiu patogeneze AD je vedle fosfolipidů věnována velká pozornost **mastným kyselinám**. 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). V tuku frontálního kortexu 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). Fosfolipidy buněčných membrán jsou potencionálními zdroji signálních molekul, působících uvnitř buňky i mezi buňkami. Fosfolipázy A2 uvolňují z fosfolipidů AA, DHA či EPA. Ty jsou pak působením cyklooxygenáz, lipoxygenáz nebo monooxygenáz cytochromu P450 přeměňovány na eikosanoidy (AA a EPA) či dokosanoidy (DHA). Eikosanoidy a dokosanoidy snadno procházejí membránami neuronů a působí jako autokrinní i parakrinní signální molekuly.

Intracelulárně mohou PUFA působit samy jako second messenger nebo jejich zastoupení v signálních strukturách ovlivňuje funkci transkripčních faktorů a genovou expresi (Deckelbaum 2006). DHA může být přeměněna na dokosanoidy, které působí protizánětlivě a chrání neurony před oxidačním stresem (Bazan 2009). Může být také opět reacylována do membrán účinkem acyltransferáz (McNamara a Carlson 2006). V experimentech na krysách bylo zjištěno, že PUFA n-3 ovlivňují expresi řady genů v mozku. Tyto geny kontrolují synaptickou plasticitu, signální transdukcí, interakci cytoskeletu s buněčnou membránou, tvorbu iontových kanálů, regulační proteiny a další faktory (např. expresi synukleinu  $\alpha$  i  $\gamma$ , kalmodulinů, aktinu, ras onkogenu a dalších (Kitajka et al. 2002). Arachidonová kyselina (AA) v mozku pochází buď z dietních zdrojů nebo je dodávána z jater, kde je vytvářena z kyseliny linolové (LA). Asi 17.8 mg AA za den je dodáváno do lidského mozku (Farooqui et al. 2007). Po vstupu do mozku je po aktivaci enzymem LC-fatty acyl CoA syntetázou (LC-FACS) esterifikována do sn-2 pozice fosfolipidů. Uvolnění z membrány zprostředkuje fosfolipáza  $A_2$ , v případě AA jde o cPLA $_2$ , která je lokalizována v postsynaptických zakončeních (Strokin et al. 2003). Volná AA je transportována do endoplasmatického retikula a pak buď zpětně esterifikována do fosfolipidu, další (menší) část je metabolizována beta-oxidací v mitochondriích nebo přeměňována na eikosanoidy. AA reguluje aktivitu řady enzymů jako protein kináza C, NADPH oxidáza nebo cholin acetyltransferáza (Farooqui et al. 2007), moduluje funkci iontových kanálů, uvolňování neurotransmitterů, i genovou expresi (Farooqui et al. 2012). Do patofyziologických procesů Alzheimerovy nemoci zasahuje AA a její deriváty řadou mechanismů. AA uvolňovaná fosfolipázou  $A_2$  z fosfolipidů ovlivňuje synaptickou transmissi zprostředkovanou glutamátem. AA amplifikuje vzestup kalciových iontů v neuronech po stimulaci NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptorů (Goracci et al. 2010). Je známo, že NMDA receptory hrají významnou roli v mechanismech dlouhodobé potenciace (long-term potentiation), která ovlivněním synaptické účinnosti ve specifických oblastech mozku, zejména v hippocampu ovlivňuje procesy paměti a učení (Bliss a Collingridge 1993) a na druhé straně nadměrná stimulace NMDA receptorů např. nadbytkem glutamátu vede k poškození neuronů (glutamátová excitotoxicita) (Zhou a Sheng 2013). Deriváty AA, jako jsou prostaglandiny (PG), leukotrieny (LT), a tromboxany (TX) po vazbě na odpovídající receptory ovlivňují řadu biologických funkcí, např. cévní tonus, imunitní a zánětlivé pochody. Modulace jejich působení by mohla mít potenciálně terapeutické účinky. Inhibice COX-2 interferuje s glutamátovou neurotoxicitou zprostředkovanou NMDA receptorem (Pepicelli et al., 2005) a antagonist receptoru prostaglandinového receptoru EP $_1$  v experimentu snižoval neuronální excitotoxicitu zprostředkovanou NMDA receptory (Kawano et al. 2006). PGE $_2$  zvyšuje expresi genu pro amyloidový prekursorový protein (APP) in vitro, což je spojeno s aktivací receptoru EP $_2$  v mikroglíích (Pooler et al. 2004). Předpokládá se, že zánětlivá aktivita v mozku je významným činitelem patofyziologie AD (Halliday et al. 2000). V mozkové kůře a hippocampech nemocných s AD byla zjištěna ve srovnání se stejně starými kontrolami zvýšená exprese COX-1 a COX-2. V experimentu PGE $_2$ -zvšoval aktivitu  $\gamma$ -sekretázy (Qin et al. 2003). Je zajímavé, že několik epidemiologických studií zjistilo, že dlouhodobé užívání nesteroidních protizánětlivých farmak (NSAIDs) může nositelům alely  $\epsilon 4$  apolipoproteinu E (APOE  $\epsilon 4$ ) chránit proti vzniku AD. Biologické mechanismy tohoto jevu nejsou jasné a mohou zahrnovat protizánětlivé účinky NSAIDs nebo jejich schopnost interferovat s kaskádou  $\beta$ -amyloidu (A $\beta$ ). Na druhé straně dlouhodobé, placebem kontrolované klimické studie s neselektivními i COX-2 selektivními inhibitory u nemocných s mírnou až střední formou AD nepřinesly pozitivní výsledky. Podávání NSAIDs by proto mohlo být prospěšné jen u velmi časných stádií AD v koincidenci s iniciální depozicí A $\beta$ , aktivací mikroglíí, a následným uvolněním zánětlivých mediátorů (Imbimbo et al., 2010). Nyní se pozornost obrací k možnosti příznivého ovlivnění AD působením na receptory PGE $_2$  (Frisardi et al. 2011).

Naproti tomu kyselina dokosaheptaenová (DHA) a její deriváty působí na patogenetické pochody u AD příznivě. Epidemiologické údaje ukázaly, že dostatečný dietní přísun PUFA n-3 (DHA) je spojen s poklesem rizika vzniku demence (Johnson a Schaefer 2006). V prospektivní studii bylo nalezeno, že jedinci, kteří mají koncentrace DHA v plasmatickém fosfatidylcholinu v horním kvartilu, mají ve srovnání s jedinci s DHA v dolním kvartilu významně nižší riziko vývoje AD během devítiletého sledování (Schaefer et al. 2006). Nemocní se sporadickou formou AD mají nižší expresi proteinu SorLA (LR11) i jeho mRNA. Tento protein snižuje štěpení APP  $\alpha$ - a  $\beta$ -sekretázami, což snižuje tvorbu  $\beta$ -amyloidu. Podávání DHA transgenním myším zvyšovalo expresi LR11 v neuronech snižovalo tvorbu  $\beta$ -amyloidu (Ma et al. 2007). DHA je podobně jako AA přeměňována oxidací. Za účasti 12- a 15-lipoxygenáz na deriváty, (resolviny, Rvs, neuroprotektiny, NP a maresiny, Mar) které mají významné biologické účinky (Serhan 2011). Resolviny (resolution-phase interaction products) a dokosatrieny antagonizují účinky derivátů AA (prostaglandinů, leukotrienů a tromboxanů) a mají významné protizánětlivé a imunoregulační vlastnosti (Serhan 2011). Resolviny blokují tvorbu IL-1 v mikroglíích a snižují infiltraci mozku polymorfonukleáry. Neuroprotektin D1 rovněž snižuje příliv leukocytů, snižuje expresi zánětlivých cytokinů a NF $\kappa$ B a indukuje expresi antiapoptotických proteinů BCL-2, snižuje expresi proapoptotických proteinů BAX a BAD (Bazan 2005) a neuroprotektivních genů, které omezují neurotoxicitu působenou amyloidem beta (Lukiw et al. 2005, Bazan 2009). Tvorba NPD1 z DHA je regulována redox stavem neuronů, takže zvýšený oxidační stres, působený A $\beta$  či hypoxií zvyšuje tvorbu NPD1 z DHA (Jicha a Markesbery 2010). NPD1 dále zvyšuje antioxidační ochranu neuronů indukci tvorby antioxidačních enzymů (Hashimoto et al. 2002) a inhibuje aktivaci kaspázy 3, indukovanou oxidačním stresem a expresi COX-2 stimulovanou interleukinem 1 (Bazan 2005). Enzym 14-lipoxygenáza v makrofázích přeměňuje DHA na maresin 1 (7,14-dihydroxy DHA), který omezuje přísun leukocytů a stimuluje odstraňování apoptotického materiálu (Serhan et al. 2009), jeho význam u AD ještě není prostudován. Neuroprotektivní účinek DHA u AD je zřejmě podmíněn i jejími fyzikálně-chemickými vlastnostmi. DHA pomáhá udržovat flexibilitu neuronálních membrán, což hraje roli při signální transdukcii, neurotransmisii, a tvorbě "lipid rafts" (Innis 2007, Cunnane et al. 2009). V autoptickém materiálu frontálních kortexů osob s AD byl prokázán významně snížený obsah DHA a také monoenoových mastných kyselin (zejména olejové) v „lipid rafts“ (Martin et al. 2010). DHA moduluje expresi řady genů interakcí s transkripčními faktory. Význam zde má hlavně interakce s PPAR $\gamma$ , jelikož uvolňování A $\beta$  je na PPAR $\gamma$  dependentní (Cunnane et al. 2009). Dalšími transkripčními faktory, na které se DHA váže, jsou liver retinoid X (LRX) receptor, hepatic nuclear factor-(HNF)4 $\alpha$  a sterol regulatory element-binding protein (SREBP) (Frisardi et al. 2011).

Jinými metabolity AA, které mají v patofyziologii neuropsychiatrických onemocnění, jsou **kanabinoidy**. Mezi nejvýznamnější kanabinoidy, které vznikají při metabolismu GP, patří anandamid (arachidonyl-ethanolamid, AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Tato látka působí na kanabinoidní receptory které byly v CNS identifikovány. V neuronech jsou exprimovány zejména CB<sub>1</sub>, kde se účastní regulace uvolňování neurotransmitterů a intensity synapse, zatímco CB<sub>2</sub> receptory byly nalezeny zejména v gliích a mikroglíích. Kanabinoidy mají v CNS řadu funkcí, účastní se na proliferaci neuronů, jejich diferenciaci, morfogenezi a synaptogenezi (Harkany et al. 2008). V několika studiích bylo zjištěno, že kanabinoidy přispívají k neuroprotekcii proti působení A $\beta$  (Aso a Ferrer 2014). Bylo popsáno odstraňování amyloidu po aktivaci CB<sub>2</sub> receptorů v makrofázích či jeho usnadněný transport přes plexus choroideus. V jiné experimentální studii bylo zjištěno, že  $\Delta$  9-THC (tetrahydrocannabinol) zvyšuje expresi neprilysinu, což je endopeptidáza degradující A $\beta$  (Chen et al. 2013). Podávání směsi kanabinoidů vedlo v experimentu u myšního modelu rovněž k výrazné redukci

neurofibrilárních klubek (Casarejos et al. 2013). Kannabinoidy zřejmě také významně interagují s neurotrofickými faktory a příznivě ovlivňují další faktory rozvoje AD, jako je zánět či oxidační stres v CNS (Aso a Ferrer 2014).

*Práce byla podpořena PRVOUK-P25/LF1/2*

## Literatura

1. **Howes OD, Kapur S.** The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull* 2009; 35: 549-562.
2. **Horrobin DF.** The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr Res* 1998; 30: 193-208.
3. **Eggers AE.** Extending David Horrobin's membrane phospholipid theory of schizophrenia: overactivity of cytosolic phospholipase A(2) in the brain is caused by overdrive of coupled serotonergic 5HT(2A/2C) receptors in response to stress. *Med Hypotheses* 2012; 79: 740-743.
4. **Condray R, Yao JK.** Cognition, dopamine and bioactive lipids in schizophrenia. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011; 3: 298-330.
5. **Bhattacharjee AK, Chang L, Lee H-J, et al.** D2 but not D1 dopamine receptor stimulation augments brain signaling involving arachidonic acid in unanesthetized rats. *Psychopharmacology* 2005; 180: 735-742.
6. **Horrobin DF, Manku MS, Hillman H, et al.** Fatty acid levels in the brains of schizophrenics and normal controls. *Biol Psychiatry* 1991; 30: 795-805.
7. **Fukuzako H, Fukuzako T, Hashiguchi S, et al.** Changes in levels of phosphorus metabolites in temporal lobes of drug naive schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 1205-1208.
8. **Keshavan MS, Stanley JA, Pettegrew JW.** Magnetic resonance spectroscopy in schizophrenia: methodological issues and findings--part II. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 369-380.
9. **Ross BM, Turenes A, Moszczynska A, et al.** Differential alteration of phospholipase A2 activities in brain of patients with schizophrenia. *Brain Res* 1999; 821: 407-413.
10. **Takeuchi T, Fukumoto Y, Farada E.** Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behav Brain Res* 2002; 131: 193-203.
11. **Condray R, Yao JK, Steinhauer SR, et al.** Semantic memory in schizophrenia: association with cell membrane essential fatty acids. *Schizophr Res* 2008; 106: 13-28.
12. **Ross BM, Seguin J, Sieswerda LE.** Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? *Lipids Health Dis* 2007; 6: 21.
13. **Amminger GP, Schäfer MR, Papageorgiou K, et al.** Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 2010; 67: 146-154.
14. **Enger C, Weatherby L, Reynolds RF, et al.** Serious cardiovascular events and mortality among patients with schizophrenia. *J Nerv Ment Dis* 2004; 192: 19-27.
15. **Ryan MC, Thakore JH.** Physical consequences of schizophrenia and its treatment: the metabolic syndrome. *Life Sci* 2002; 71: 239-257.
16. **Kato MM, Currier MB, Gomez CM, et al.** Prevalence of Metabolic Syndrome in Hispanic and Non-Hispanic Patients With Schizophrenia. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 2004; 6: 74-77.
17. **Margari F, Lozupone M, Pisani R, et al.** Metabolic syndrome: differences between psychiatric and internal medicine patients. *Int J Psychiatry Med* 2013; 45: 203-226.



18. **Tseng PT, Wang HY, Cheng YS, et al.** The metabolic syndrome and risk of coronary artery disease in patients with chronic schizophrenia or schizoaffective disorder in a chronic mental institute. *Kaohsiung J Med Sci* 2014; 30: 579-586.
19. **Lasić D, Bevanda M, Bošnjak N, et al.** Metabolic syndrome and inflammation markers in patients with schizophrenia and recurrent depressive disorder. *Psychiatr Danub* 2014; 26: 214-219.
20. **Oresič M, Seppänen-Laakso T, Sun D, et al.** Lipidomic profiles associated with schizophrenia in twin pairs discordant for schizophrenia as well as unaffected twin pairs. *Genome Med* 2012; 4: 1.
21. **Ryan MCM, Collins P, Thakore JH.** Impaired fasting glucose-tolerance in first-episode, drug-naive patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 284-289.
22. **Suvisaari JM, Sarni SI, Perala J, et al.** Metabolic syndrome among persons with schizophrenia and other psychotic disorders in a general population survey. *J Clin Psychiatry* 2007; 68: 1045-55.
23. **Guest PC, Wang L, Harris LW, et al.** Increased levels of circulating insulin-related peptides in first-onset, antipsychotic naive schizophrenia patients. *Mol Psychiatry* 2010; 15: 118-119.
24. **Belmaker RH, Agam G.** Major depressive disorder. *N Engl J Med* 2008; 358: 55-68.
25. **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.
26. **Wulsin LR, Vaillant GE, Wells V-E.** A systematic review of the mortality of depression. *Psychosom Med* 1999; 61: 6-17.
27. **Ghaemi SN, Shields GS, Hegarty JD, Goodwin FK.** Cholesterol levels in mood disorders: high or low? *Bipolar Disord* 2000; 2: 60-64.
28. **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.
29. **Olusi SO, Fido AA.** Serum lipid concentrations in patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 1996; 40: 1128-1131.
30. **Fiedorowicz JG, Coryell WH.** Cholesterol and suicide attempts: A prospective study of depressed inpatients *Psychiatry Res.* 2007 30; 152: 11–20.
31. **Ellison WF, Morrison HI.** Low serum cholesterol concentration and risk of suicide. *Epidemiology* 2001; 12(2):168-72.
32. **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.
33. **Papakostas GI, Petersen T, Sonawalla SB, et al.** Serum cholesterol in treatment-resistant depression. *Neuropsychobiology* 2003; 47: 146-151.
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.
35. **Fiedorowicz JG, Palagummi NM, Behrendtsen O, et al.** Cholesterol and affective morbidity. *Psychiatry Res* 2010; 175: 78-81.
36. **Papakostas GI, Ongür D, Iosifescu DV, et al.** Cholesterol in mood and anxiety disorders: Review of the literature and new hypotheses. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004; 14: 135-142.
37. **Engelberg H.** Low serum cholesterol and suicide. *Lancet* 1992; 339: 727-729.
38. **Tanskanen A, Vartiainen E, Tuomilehto J, et al.** High Serum Cholesterol and Risk of Suicide. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 648–650.
39. **Brunner J, Bronisch T, Pfister H, et al.** Wittchen H.U. High cholesterol, triglycerides, and body-mass index in suicide attempters. *Arch Suicide Res* 2006; 10: 1-9.

40. **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.
41. **Borgherini G, Dorz S, Conforti D, et al.** Serum cholesterol and psychological distress in hospitalized depressed patients. *Acta Psychiatr Scand* 2002; 105: 149-152.
42. **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.
43. **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.
44. **Boston PF, Dursun SM, Reveley MA.** Cholesterol and mental disorder. *Br J Psychiatry* 1996; 169: 682–689.
45. **Davidson MH, Stein EA, Hunninghake DB, et al.** Lipid-altering efficacy and safety of simvastatin 80 mg/day: worldwide long-term experience in patients with hypercholesterolemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000; 10: 253-262.
46. **Young-Xu Y, Chan KA, Liao JK, et al.** Long-term statin use and psychological wellbeing. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 690–697.
47. **Davison KM, Kaplan BJ.** Lipophilic statin use and suicidal ideation in a sample of adults with mood disorders. *Crisis* 2014; 35: 278-282.
48. **Chuang C-S, Yang TY, Muo C-H, et al.** Hyperlipidemia, statin use and the risk of developing depression: a nationwide cohort study. *Gen Hosp Psychiatry* 2014; 36: 497-501.
49. **Otte C, Zhao S, Wholley MA.** Statin use and risk of depression in patients with coronary heart disease: longitudinal data from the Heart and Soul Study. *J Clin Psychiatry* 2012, 73: 610-615.
50. **Akbaraly TN, Kivimäki M, Brunner EJ, et al.** Association Between Metabolic Syndrome and Depressive Symptoms in Middle-Aged Adults: Results from the Whitehall II study. *Diabetes Care* 2009; 32: 499–504.
51. **Elovainio M, Pulkki-Råback L, Kivimäki M, et al.** Lipid trajectories as predictors of depressive symptoms: the Young Finns Study. *Health Psychol* 2010; 29: 237-245.
52. **Lehto SM, Ruusunen A, Niskanen L.** Elevated depressive symptoms and compositional changes in LDL particles in middle-aged men. *Eur J Epidemiol* 2010; 25: 403-409.
53. **Glassy CM, Lemus H, Cronan T, et al.** Relationship between depressive symptoms and cardiovascular risk factors among selected Latino patients at a community clinic. *Psychol Health Med* 2010; 15: 117-126.
54. **Kosicek A, Hecimovic S.** Phospholipids and Alzheimer's Disease: Alterations, Mechanisms and Potential Biomarkers. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 1310-1322.
55. **Haughey NJ, Bandaru VV, Bae M, Mattson MP.** Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 878-886.
56. **Traynor BJ, Singleton AB.** Nature versus nurture: death of a dogma, and the road ahead. *Neuron* 2010; 68: 196-200.
57. **Reitz C a Mayeux R.** Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 2014; 88: 640-651.
58. **Wuwongse S, Chang RC, Law AC.** The putative neurodegenerative links between depression and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2010; 91: 362-375.

59. **Bjorkhem I.** Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med* 2006; 260: 493–508.
60. **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.
61. **Nieweg K, Schaller H, Pfrieder FW.** Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 2009; 109: 125–134.
62. **Herz J.** ApoE Receptors in the Nervous System. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 190–196.
63. **Kotti TJ, Ramirez DM, Pfeiffer BE, et al.** Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 3869–3874.
64. **Bjorkhem I, Meaney S.** Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 806–881.
65. **Mateos L, Akterin S, Gil-Bea FJ, et al.** Activity-regulated cytoskeleton-associated protein in rodent brain is down-regulated by high fat diet in vivo and by 27-hydroxycholesterol in vitro. *Brain Pathol* 2009; 19: 69–80.
66. **Kojro E, Gimpl G, Lammich S, et al.** Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 5815–5820.
67. **Grimm MO, Zimmer VC, Lehmann J, et al.** The Impact of Cholesterol, DHA, and Sphingolipids on Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 814390.
68. **Kivipelto M, Helkala EL, Hanninen T et al.** Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology* 2001; 56: 1683–1689.
69. **Wolf H, Grunwald M, Kruggel F, et al.** Hippocampal volume discriminates between normal cognition; questionable and mild dementia in the elderly. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 177–186.
70. **Mielke MM, Bandaru VV, Haughey NJ, et al.** Serum ceramides increase the risk of Alzheimer disease: the Women's Health and Aging Study II. *Neurology* 2012; 79: 633–641.
71. **Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, et al.** Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res Rev* 2006; 51: 275–292.
72. **Hayashi H.** Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 453–461.
73. **Frisardi V, Panza F, Seripa D, et al.** Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: a complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 313–330.
74. **Farooqui AA, Ong WY, Farooqui T.** Lipid mediators in the nucleus: Their potential contribution to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 906–916.
75. **Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, et al.** Novel Docosanoids Inhibit Brain Ischemia-Reperfusion-mediated Leukocyte Infiltration and Pro-inflammatory Gene Expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 43807–43817.
76. **Yang R, Chiang N, Oh SF, Serhan CN.** Metabolomics-Lipidomics of Eicosanoids and Docosanoids Generated By Phagocytes. *Curr Protoc Immunol* 2011; CHAPTER: Unit–14.26.
77. **Serhan CN, Yang R, Martinod K, et al.** Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med* 2009 Jan; 206: 15–23.
78. **Dawson G, Goswami R, Kilkus J, et al.** The formation of ceramide from sphingomyelin is associated with cellular apoptosis. *Acta Biochim Pol* 1998; 45: 287–297.

79. **Lee T, Xu J, Lee JM, et al.** Amyloid- $\beta$  peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *J Cell Biol* 2004; 164: 123–131.
80. **Han XL, Holtzman DM, McKeel DW Jr., et al.** Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 2002; 82: 809–818.
81. **Gottfries CG, Karlsson I, Svennerholm L.** Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatr* 1996; 8: 365–372.
82. **Jonsson M; Zetterberg H; Rolstad S; et al.** Low Cerebrospinal Fluid Sulfatide Predicts Progression of White Matter Lesions-The LADIS Study. *Dementia Geriatr Cognit Disord* 2012; 34: 61–67.
83. **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.
84. **Wainwright P.** Nutrition and behaviour: the role of n-3 fatty acids in cognitive function. *Br J Nutr* 2000; 83: 337–339.
85. **Deckelbaum RJ, Worgall TS, Seo T.** n-3 fatty acids and gene expression. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(6 Suppl): 1520S–1525S.
86. **Bazan NG.** Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 2009; 50: S400–S405.
87. **Kitajka K, Puskas LG, Zvara A, et al.** The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2619–2624.
88. **Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T.** Interactions between neural membrane glycerophospholipid and sphingolipid mediators: a recipe for neural cell survival or suicide. *J Neurosci Res* 2007; 85: 1834-1850.
89. **Strokin M, Sergeeva M, Reiser G.** Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca<sup>2+</sup>. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 1014-1022.
90. **Farooqui AA.** Lipid mediators and their metabolism in the nucleus: implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012; 30(Suppl 2): S163-S178.
91. **Goracci G, Ferrini M, Nardicchi V.** Low molecular weight phospholipases A2 in mammalian brain and neural cells: roles in functions and dysfunctions. *Mol Neurobiol* 2010; 41: 274-289.
92. **Bliss TV, Collingridge GL.** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31-39.
93. **Zhou Q, Sheng M.** NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology* 2013; 74: 69-75.
94. **Pepicelli O, Fedele E, Berardi M, et al.** Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus. *J Neurochem* 2005; 93: 1561-1567.
95. **Kawano T, Anrather J, Zhou P, et al.** Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med* 2006; 12: 225-229.
96. **Pooler AM, Arjona AA, Lee RK, Wurtman RJ.** Prostaglandin E2 regulates amyloid precursor protein expression via the EP2 receptor in cultured rat microglia. *Neurosci Lett* 2004; 362: 127–130.

97. **Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J.** Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 1-8.
98. **Imbimbo BP, Solfrizzi V, Panza F.** Are NSAIDs useful to treat Alzheimer's disease or mild cognitive impairment? *Front Aging Neurosci* 2010; 2. pii: 19.
99. **Johnson EJ, Schaefer EJ.** Potential role of dietary n-3 fatty acids in the prevention of dementia and macular degeneration. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(6 Suppl): 1494S-1498S.
100. **Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, et al.** Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch Neurol* 2006; 63: 1545-1550.
101. **Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N.** Novel Anti-Inflammatory -- Pro-Resolving Mediators and Their Receptors. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 629-647.
102. **Bazan NG.** Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol* 2005; 15: 159-166.
103. **Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, et al.** A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 2774-2783.
104. **Jicha GA, Markesbery WR.** Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2010; 5: 45-61.
105. **Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, et al.** Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem* 2002; 81: 1084-1091.
106. **Innis SM.** Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 2007; 137: 855-859.
107. **Cunnane SC, Plourde M, Pifferi F, et al.** Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res* 2009; 48: 239-256.
108. **Martín V, Fabelo N, Santpere G, et al.** Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J Alzheimers Dis* 2010; 19: 489-502.
109. **Harkany T, Mackie K, Doherty P.** Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18: 338-345.
110. **Aso E, Ferrer I.** Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Front Pharmacol* 2014; 5: 37.
111. **Chen R, Zhang J, Fan N, et al.**  $\Delta(9)$ -THC-caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling. *Cell* 2013; 155: 1154-116.
112. **Casarejos MJ, Perucho J, Gómez A, et al.** Natural cannabinoids improve dopamine neuro transmission and tau and amyloid pathology in a mouse model of tauopathy. *J Alzheimers Dis* 2013; 35: 525-539.

## DESATURÁZY MASTNÝCH KYSELIN: PATOFYZIOLOGIE A KLINICKÝ VÝZNAM

### DESATURASES OF FATTY ACIDS (FADS) AND THEIR PHYSIOLOGICAL AND CLINICAL IMPLICATION

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

*IV. interní klinika, \* Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, I. LF UK a VFN v Praze*

#### Souhrn

Zvýšený výskyt stavů asociovaných s insulínovou rezistencí jako je nadváha/obezita, diabetes mellitus 2. typu (DM2), srdečně-cévní onemocnění (KVO), některé nádory a neurologicko-psychiatrické choroby, je charakterizován poklesem obsahu vícenenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LC-PUFA). Množství LC-PUFA závisí jednak na exogenním příjmu jejich prekurzorů – kys. linolové a  $\alpha$ -linolenové – a dále na rychlosti jejich metabolické přeměny, na které se podílí řada enzymů – delta-6 desaturáza (D6D, FADS2), D5D (FADS1) a elongázy (Elovl2,-5,6). Změny aktivit D5D/D6D byly popsány u řady chorob, mezi něž patří neurologicko-psychiatrická onemocnění (depresivní poruchy, bipolární afektivní poruchy, demence), metabolická onemocnění (obezita, metabolický syndrom, DM2), KVO (hypertenze, ischemická choroba srdeční), chronické záněty a alergie (Crohnova nemoc, atopický ekzém) a některé nádory. Analogické výsledky byly prokázány asociačními studii mezi genotypy/haplotypy *FADS1/FADS2* a výše uvedenými skupinami onemocnění, případně interakce mezi příjmem LA a ALA výskytem minoritních alel polymorfismů *FADS1/FADS2*, které mají vesměs nižší enzymatické aktivity. Pokles aktivit DD, resp. FADS se projeví sníženou koncentrací produktů spojenou se zvýšenou koncentrací substrátu. Byly popsány asociace některých SNP *FADS* s ischemickou chorobou srdeční, koncentracemi lipidů, oxidačním stresem, glukózovou homeostázu i zánětlivou reakcí. Experimentální studie na zvířecích modelech a výskyt vzácných onemocnění spojených s chyběním, resp. výrazným poklesem aktivit D5D/D6D vyzdvihly význam desaturáz pro zdravý vývoj organismu i pro patogenezi některých chorob.

#### Úvod

Trvající vysoká mortalita a morbidita na kardiovaskulární onemocnění (KVO) ekonomicky vyspělých zemí souvisí s vysokou prevalencí stavů s insulínovou rezistencí (IR). IR je charakteristická pro nadváhu (resp. obezitu), metabolický syndrom (MS), diabetes mellitus 2. typu (DM2), kardiovaskulární choroby, neurologicko-psychiatrická onemocnění (deprese, bipolární afektivní poruchy, schizofrenie, demence) a některé nádory (Jump 2011, ÚZIS 2009, Euroaspire III 2007).

Pokles obsahu vícenenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LC-PUFA) v krvi a tkáních je jednou z charakteristických známek stavů s IR a byl popsán u výše uvedených chorobných stavů. Z nutričních rizikových faktorů k rozvoji IR přispívá pozitivní energetická bilance, zvýšený příjem nasycených mastných kyselin (SFA, saturated fatty acids), *trans*-mastných kyselin (TFA) a rafinovaných cukrů (především fruktózy a sacharózy) a nedostatečný příjem PUFA řady n-3 a n-6 (Lann a LeRoith 2007, Erkillá 2008, Jump 2011).

Množství LC-PUFA závisí na příjmu kys.linolové (LA, 18:3n-6) a kys. $\alpha$ -linolenové (ALA, 18:3n-3) potravou i aktivitě enzymů (desaturázy, elongázy) řídících jejich syntézu. V současné průměrné stravě průmyslově vyspělých zemí (MWD, modern western diet) LA

přispívá z 85 – 89 % celkovému příjmu PUFA a ALA se podílí zhruba 9 – 11 % a celkovém příjmu PUFA potravou. LA metabolizována sérií desaturací a elongací na kys. arachidonovou (AA, 20:4n-6). Limitujícím krokem přeměny LA na AA je delta-6 desaturace (D6D, *FADS2*), která konvertuje LA na kys.  $\gamma$ -linolenovou (GLA, 18:3n-6). GLA je následně elongována na kys. di-homo- $\gamma$ -linolenovou (DGLA, 20:3n-6) a poté desaturována za katalýzy D6D (*FADS1*) na AA.

ALA je desaturována působením D6D na kys. stearidonovou (SDA, 18:4n-3), která elongována na kys. eicosatetraenovou (ETA, 20:4n-3) a nakonec působením D5D vzniká kys. eikosapentaenová (EPA, 20:5n-3). Následuje další elongace (*ELOVL2*) a desaturace (D6D) s přeměnou EPA na DHA. Konverze ALA na EPA je u lidí velmi nízká, celkem se přemění pouze 6 – 10 % ALA na EPA. Přeměna ALA na kys. eikosapentaenovou (EPA, 20:5n-3) zahrnuje stejný sled enzymatických kroků (Murff a Edwards 2014). Stejným způsobem je metabolizována kys. olejová (OA, 18:1n-9) působením D5D a D6D a *ELOVL1*. Všechny 3 řady mastných kyselin kompetují o stejné enzymatické systémy, přičemž afinita k D5D a D6D je v následujícím pořadí: n-3 PUFA > n-6 PUFA > n-9 MFA (Glaser et al. 2010, Lattka et al. 2010, Merino et al. 2010).

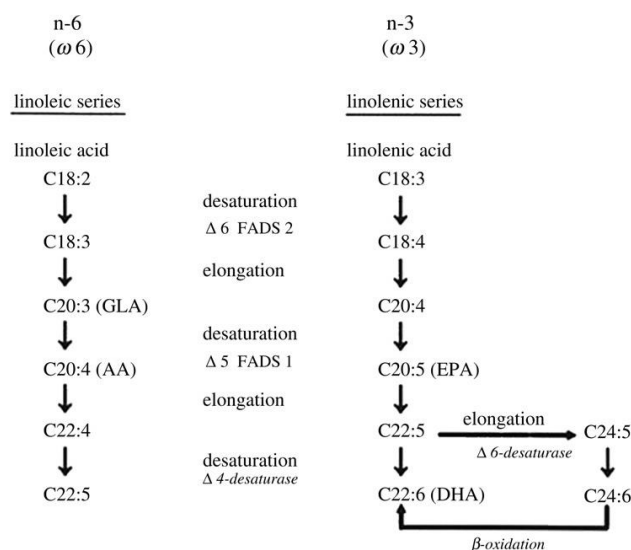
Substrátem pro D6D je celkem 5 mastných kyselin (FA, fatty acid): 18:2n-6, 18:3 n-3, 24:6n-6, 24:5n-3 a 16:0. Delta-6 desaturáza vykazuje D8D aktivitu vůči 20:2n-6 a 20:3n-3. Delta-5 desaturáza má vysokou substrátovou specifitu a jsou známy pouze dvě FA, které slouží jako substrát pro D5D – 20:3n-6 a 20:4n-3.

Desaturázovou aktivitu ovlivňují faktory genetické i vlivy negenetické jako je lačnění, realimentace, karence bílkovin, působení hormonů (insulin, kortikoidy, katecholaminy), složení diety (SFA, TFA, Zn, Mg, pyridoxin, alkohol a další) (Martinelli et al. 2009, Arbo et al. 2011).

Analýzy srovnávající 18 SNP *FADS1/FADS2* a složení FA ve fosfolipidech plasmy, resp. erytrocytárních membrán prokázaly, že genetické vlivy vysvětlí až 29 % rozptylu koncentrací AA, a rekonstruované haplotypy *FADS1/FADS2* 10 – 12 % rozptylu koncentrací prekurzorů AA (EDA, eikosadienová kyselina; DGLA) (Schaeffer et al. 2009). Studie na italské populaci prokázala silnou asociaci mezi 13 SNP clusteru *FADS/FADS2/FADS3* a koncentracemi PUFA plasmatických fosfolipidů a membrán erytrocytů. Z nich nejvýznamnější asociace byla prokázána pro AA. Homozygoti a heterozygoti minoritní alely měli vyšší koncentrace LA, ALA a eikosadienové kyseliny (20:2n-6) (Malerba et al. 2008). Podobné asociace byly prokázány i v dalších studiích u potomků evropanů, afričanů a asiátů (Zietemann et al. 2010, Merino et al. 2011, Kwak et al. 2011, Mathias et al. 2010; 2011, Sergeant et al. 2011).

Adekvátní příjem PUFA a rovnováha mezi řadou n-6 a n-3 je významným faktorem, který zajišťuje optimální vývoj plodu i zdravotní stav organismu. Účinky PUFA se vysvětlují ovlivněním buněčných funkcí, inkorporací do membránových fosfolipidů, modulací enzymů a signálních molekul i přímým ovlivněním genové exprese (Jump 2008, Jump 2011). Dostupnost volných LC-PUFA a možnost regulace genové transkripce závisí nejen na příjmu ALA a LA dietou, ale i aktivitě desaturáz a elongas, kontrolovaných příslušnými geny (*FADS1, FADS2, SCD-1, Elovl2-6*). Některé polymorfismy *FADS* nesoucí minoritní alely jsou vesměs spojeny s jejich nižší enzymatickou aktivitou. Pokles aktivit *FADS* se projeví sníženou koncentrací produktu a zvýšenou koncentrací substrátu. Přeměna LA a ALA na LC-PUFA je ukázána na obrázku 1.

Obrázek 1



Dostupnost LA, ALA a LC-PUFA (zvláště AA a DHA) je nezbytná pro zdravý vývoj a fyziologické funkce organismu. Tyto LC-PUFA ovlivňují kardiovaskulární systém a imunitu, jsou nezbytné v těhotenství pro správný růst a vývoj plodu. Některé studie nezačly, že polymorfismy FADS a dietní příjem PUFA ovlivňuje status LC-PUFA a DHA v těhotenství. Koncentrace LC-PUFA a zvl. DHA v mateřském mléce mohou kojením modulovat riziko vzniku alergických onemocnění, ekzému a rozvoj kognitivních funkcí během dospívání (Tosi et al. 2014).

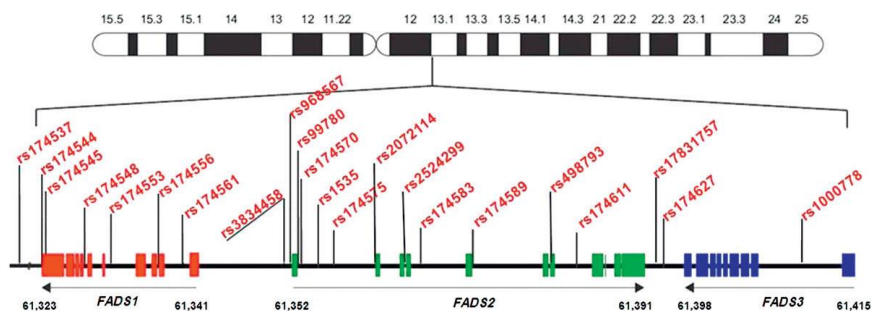
### Desaturázy mastných kyselin

Geny pro delta desaturázy mastných kyselin jsou lokalizovány na chromosomu 11 a geny pro elongázu-5 (*elongation of very long-chain fatty acid, ELOVL5*) na chromozomu 6 (Jakobsson et al. 2006). Genový cluster pro D5D a D6D je kódován na 11. chromosomu (11q12-13.1) a obsahuje geny *FADS1*, *FADS2* a *FADS3*; D5D je kódována desaturázou mastných kyselin-1 (*FADS1*), D6D pak *FADS2*. Gen pro *FADS3* má 52 – 62% sekvenční identitu s *FADS1*, resp. *FADS2*, a kóduje zatím strukturně a funkčně neidentifikované proteiny (Nakanuta et al. 2004, Blanchard et al. 2011).

Desaturázy jsou enzymy odpovědné za inserci dvojných vazeb do řetězce FA. Desaturázy mastných kyselin se vyskytují u většiny živočichů a rostlin, též u některých bakterií (Hashimoto et al. 2006). Existují dvě evolučně nepříbuzné skupiny, a to desaturázy vázané na buněčné membrány a desaturázy solubilní. Vesměs jde o metaloproteiny se dvěma atomy železa v aktivním místě, což vysvětluje velký rozsah katalytických aktivit. Delta desaturázy vyskytující se u savců jsou mikrosomální enzymy, jejich desaturázová aktivita závisí na koordinaci 3 enzymů – vlastní desaturázy, cytochromu b5 a NADPH-cytochrom b5 reduktázy. U člověka jsou *FADS1/FAD2/FADS3* exprimovány především v játrech, kosterním svalstvu, myokardu, plicích, nervovém systému a tukové tkáni. FADS genový cluster u člověka sestává z úseku velikosti 91,9 kb na 11. chromosomu. Všechny 3 geny mají podobnou strukturu (12 exonů, 11 intronů). Orientace *FADS1* a *FADS2* je „hlava-hlava“ a *FADS2* a *FADS3* „ocas k ocasu“. *FADS1* zaujímá 17,2 kb, *FADS2* 39,1 kb a *FADS3* oblast 18 kb. Celkem bylo popsáno v oblasti genového FADS clusteru více než 500 polymorfismů. Z nich u 23 polymorfismů byly popsány významné asociace s koncentracemi FA, hladinami lipidů a komplexními fenotypy. Schematická struktura genového clusteru FADS je ukázána na obrázku 2.



Obrázek 2



### Aktivity D5D/D6D za různých patologických stavů

Aktivity D5D a D6D lze analyzovat přímo *in vitro* nebo u experimentálních zvířat pomocí rychlosti konverze radioaktivně značených FA na jejich produkty. Expresie genů FADS je měřitelná u lidí ve vzorcích jaterních biopsií. Přímé určení aktivity tak není proveditelné na rozsáhlých souborech klinických a epidemiologických studiích z důvodů etických i praktických. V klinické praxi se jako surogátního markeru využívá poměru produkt/substrát řady PUFA n-6. Koncentrace EPA, resp. DHA se neuvádí, protože tyto PUFA jsou výrazněji ovlivněny jejich dietním příjmem. V písemnictví se používá několika markerů – globální (agregovaná nebo celková) desaturázová aktivita jako poměr AA/LA, dále D5D (jako poměr AA/DHGLA) nebo D6D aktivita (jako poměr GLA/LA) (Tosi et al. 2014).

V **tabulce 1** jsou schématicky uvedeny změny globální desaturázová aktivity (vyjádřená jako agregovaný desaturační index, ADI), dále pak aktivity D5D a D6D.

Onemocnění	ADI	D6D	D5D	Reference
DM2/IR	+	+	-	Kröger 2012
MS/obezita	+	+ / NC	- / NC	Vessby 2003 Waresjö 2006
Hypertenze	+	NA	NA	Russo 1997
TG, HDL-C, LDL-L, non-HDL-C	+	+	- / NC	Jacobs 2014
NAFLD/NASH	NA	+	-	Armutcu 2013
Nádory	NA	+	NA	Hansen 2002
Schizofrenie	NA	+	NA	Liu 2009
Deprese, bipolární afektivní poruchy	NA	+	NC	Vařeka 2013 Liu 2011
Demence	NA	+ / NC	- / NC	Calon 2004
Chronický zánět	NA	+	NC	Martinelli 2009 Sergeant 2012
Tepová frekvence	NA	NC	-	Ebbesson 2012

Zkratky: NA – chybění dat (not available); NC – beze změny (not changed); + – vzestup, - – pokles; ADI – agregovaný desaturační index; D6D, D5D – delta-5 (-6) desaturáza

Zvýšení celkové desaturázové aktivity bylo prokázáno u osob s arteriální hypertenzí, insulinovou rezistencí, obesitou a metabolickým syndromem (Russo et al. 1997, Vessby et al. 2003, Waresjö et al. 2006). Pacienti s DM2T mají zvýšenou celkovou desaturázovou aktivitu, vyšší D6D a nižší D5D. Vysoké aktivity D6D a nízké D5D jsou charakteristické pro stavy

asociované s IR (Kröger et al. 2011, Kröger a Schultze 2012), predikují vznik DM a metabolického syndromu (MS) (Saito et al. 2013). Podobné nálezy byly zjištěny u osob s nealkoholovou steatózou jater (Armutcu et al. 2013). U obou pohlaví korelují koncentrace LDL-C a TG negativně s D5D, a koncentrace LDL-C, TG, LDL-C a non-HDL-C korelují pozitivně s aktivitou D6D (Jacobs et al. 2014).

### **Varianty *FADS1/FADS2* a chorobné stavy**

V současné době jsou předmětem rozsáhlého experimentálního i klinického výzkumu funkční polymorfismy genů *FADS1/FADS2/FADS3*. Několik studií prokázalo významné asociace mezi některými polymorfismy *FADS* a zastoupením FA ve fosfolipidech séra a erytrocytárních membrán. Vyšetřením velkého populačního vzorku mužů a žen bylo zjištěno, že nositelé minoritních alel jedenácti jednonukleotidových polymorfismů (SNP) a příslušných haplotypů mají nižší aktivitu D6D a D5D, což se projevuje zvýšenou koncentrací substrátů - kyseliny linolové,  $\alpha$ -linolenové, dihomo- $\gamma$ -linolenové (DHGLA, 20:3n-6), a sníženou koncentrací produktů desaturace – kys.  $\gamma$ -linolenové, arachidonové a EPA v sérových fosfolipidech. Nejvýznamnější asociace s polymorfismy a největší podíl geneticky vysvětlitelné variability vykazovala kyselina arachidonová. Minoritní alely byly spojeny s nižším výskytem alergické rinitidy a atopického ekzému, neměly však vliv na celkové ani specifické koncentrace imunoglobulinu IgE v plazmě (Schaeffer et al. 2006).

Vliv stejných polymorfismů D6D a D5D na zastoupení FA v sérových fosfolipidech byl potvrzen obdobně koncipovanou studií u souboru mužů sledovaných v rámci jiného výzkumného projektu. Minoritní alely vykazovaly významné asociace s nižšími koncentracemi kyseliny arachidonové a vyšším zastoupením kyseliny linolové,  $\alpha$ -linolenové a eikosadienové (Malerba et al. 2008).

Výzkum *FADS1/FADS2* probíhal také v rámci evropské kolaborativní studie u početného souboru mladistvých, chlapců a děvčat ve věku 12,5 až 17,5 let, s výrazně odlišnými stravovacími zvyklostmi ve srovnání s dospělou populací. Aktivita D5D byla hodnocena poměrem kyseliny arachidonové (20:4n-6) ke kyselině dihomo- $\gamma$ -linolenové (20:3n-6), aktivita D6D poměrem kyseliny dihomo- $\gamma$ -linolenové ke kyselině linolové (18:2n-6). Minoritní alely většiny sledovaných polymorfismů byly významně asociovány s nižší aktivitou D5D, jeden polymorfismus s výrazně vyšší aktivitou D6D. Autoři této studie předpokládají, že u mladistvých je fenotyp ovlivněn genetickými faktory relativně více než faktory zevními (Bokor et al. 2010).

Polymorfismy genů kódujících D5D a D6D ovlivňují syntézu PUFA a jejich koncentraci ve většině tkání (Lattka et al. 2010). Vzhledem k transgeneračnímu vlivu genetické variability DD na riziko KVO a dalších závažných chorob jsou cenné výzkumné projekty, které se zaměřují na konkrétní populační skupiny. V nedávno publikované studii byly porovnány funkční polymorfismy *FADS1/FADS2* u mladých dospělých osob bělošského a asijského původu. Oba soubory se vyznačovaly obdobnou genetickou variabilitou desaturáz, ale byly zjištěny některé zajímavé rozdíly. Alela C jednoho reprezentativního polymorfismu spojená s nižší aktivitou desaturáz (nižším poměrem AA/LA) byla u mužů asijského původu minoritní, kdežto u bělošské skupiny majoritní. Asijská skupina byla tedy znevýhodněna vzhledem ke kardiovaskulárnímu riziku spojenému s geneticky podmíněnou variabilitou desaturázové aktivity (Merino et al. 2011). Autoři ze Spojených států amerických se zaměřili na geograficky izolovanou populaci evropského původu s neměnnými stravovacími zvyklostmi a potvrdili, že variabilita D5D také u ní ovlivňuje intenzitu konverze výchozích FA na potenciálně prozánětlivé PUFA řady n-6 (Mathias et al. 2010).

Vliv příjmu n-3 PUFA na rozdíly v plazmatické koncentraci LDL-C, HDL-C a triglyceridů, které souvisejí s různou expresí D5D, byl zřejmý při srovnání japonské a mongolské populace; oba soubory byly geneticky příbuzné, ale podstatně se lišily konzumací ryb

(Nakayama et al. 2010). Výsledky celogenomového sekvenování naznačují, že homozygotní zastoupení určitých alel přispívá k celkovému kardiovaskulárnímu riziku (Tanaka et al. 2009). Podle názoru některých autorů by vyšetření polymorfismů *FADS1/FADS2* mělo být součástí experimentálních a intervenčních studií zaměřených na biologické účinky vícenasycených mastných kyselin (Glaser et al. 2010).

### **Vztahy variant *FADS* k diabetes mellitus**

Celogenomové asociační studie prokázaly asociaci SNP *FADS1* rs174550 s lačnou glykemií a rizikem DM2. V „EPIC-Potsdam Study“ byla prokázána asociace *FADS1* rs174546, která je ve vazebné nerovnováze s rs174550 a aktivitami D5D a D6D. Vzhledem k opačnému vlivu D5D a D6D na vznik DM2, je možné, že oba vlivy obou polymorfismů na riziko DM2 se vzájemně ruší. Navíc, byla prokázána asociace mezi rs174550 genotypem (*FADS1*) a časnou sekrecí insulinu (Kröger a Mathias 2012). V rozsáhlé finské studii provedené na 6580 ne-diabetických mužů byla prokázána významná asociace alely rs174550 *FADS1* s koncentrací glukózy a dyslipidemií (Stančáková et al. 2011).

### **Vztahy variant *FADS* k dyslipidemií**

Statisticky významné asociace některých polymorfismů s lipidovým spektrem byly zjištěny v celogenomových studiích provedených u velkého počtu sledovaných osob. Geonomové vyšetření 40 000 Evropanů prokázalo významnou asociaci mezi alelou C polymorfismu rs174547 *FADS1* s poklesem HDL-C a vzestupem TG (Kathiresan et al. 2009).

V již zmíněné finské studii byla prokázána asociace alely rs174550 *FADS1* se zvýšenou koncentrací velkých HDL a sníženou koncentrací všech subfrakcí VLDL (Stančáková et al. 2011). V celogenomové asociační studii InCHIANTI byla prokázána asociace varianty intronů *FADS1* rs174537 s koncentrací celkového- a LDL-C (Tanaka et al. 2009). U adolescentů indoevropského původu byla prokázána asociace minoritní alely varianty *FADS2* rs174570 TG, D5D se vzestupem LA a poklesem AA (Bokor et al. 2009). V návaznosti na uvedené výsledky byl v souboru mladistvých dotazníkovou metodou vyšetřen příjem LA a ALA ve stravě a sledován jeho vliv na aktivitu D5D. Ukázalo se, že minoritní alela polymorfismu *FADS1* (rs174546) byla asociována s nižší koncentrací EPA v sérových fosfolipidech, ale pouze v podskupině s vysokým dietním příjmem kyseliny ALA. V téže podskupině byla zjištěna významná asociace této minoritní alely s nižšími koncentracemi celkového cholesterolu a non-HDL cholesterolu v séru. Vztahy mezi genetickými a nutričními vlivy jsou zřejmě složitější, než se dosud podařilo objasnit. LA a ALA pravděpodobně kompetují o D5D (Dumont et al. 2011). V korejské populaci byla prokázána asociace minoritní (T) alely varianty *FADS1* rs174537 s nižší koncentrací celkového- a LDL-C a větší průměrnou velikostí částic LDL i rizikem ischemické choroby srdeční (Kwak et al. 2011). Vyšetření 137 japonských mužů středního věku prokázalo asociaci mezi homozygotním genotypem variant clusteru *FADS* (rs174553, rs174546, rs99780 a nízkými koncentracemi LDL-C a poměrem LDL-C/celkový cholesterol (Sone et al. 2013).

### **Vztahy variant *FADS* k oxidačnímu stresu**

Ve zmíněné korejské studii byla prokázána asociace minoritní (T) alely varianty *FADS1* rs174537 s nižší úrovní oxidačního stresu vyjádřeného poklesem koncentrací malondialdehydu (MDA), oxidativně modifikovaných LDL (ox-LDL) a nižší koncentrací 8-epi-PGF<sub>2α</sub> v moči (Kwak et al. 2011). Vyšetření peroxidase lipidů v izolovaných LDL a HDL pomocí sledování kinetiky konjugovaných dienu (KD) u homozygotů s delecí v promotoru genu (-/-) *FADS2* (rs3834458) ve srovnání s nositeli T alely (TT, T-) prokázalo nižší produkci KD a maximální koncentrací KD (Solakivi et al. 2013).

### **Vztahy variant *FADS* a metabolický syndrom**

Zvýšená koncentrace ALA tukové tkáně je spojena s nízkou prevalencí metabolického syndromu (MS). Byla prokázána významná interakce mezi polymorfismem varianty *FADS2* (rs3834458) v promotoru (T/-) genu pro D6D, koncentrací ALA tukové tkáně a rizikem MS. Chybění asociace u homozygotů (-/-) naznačuje, že tato asociace je zapříčiněna, alespoň částečně, konverzí ALA na EPA (Truong et al. 2009). Je známo, že existují rozdíly ve fenotypu MS Američanů afrického a evropského původu. Afroameričané s MS mají menší prevalenci dyslipidémie (vzestup TG a pokles HDL-C) a vyšší poruch glukózové homeostázy. Při vyšetření polymorfismu *FADS1* rs174537 byla zjištěna významně vyšší frekvence genotypu GG u Afroameričanů (0,81) ve srovnání s Američany evropského původu (0,41). GG genotyp zmíněného polymorfismu má vysoké koncentrace AA a prozánětlivého stavu (Sergeant et al. 2012).

### **Vztahy variant *FADS* a ischemická choroby srdeční**

Význam genotypů D5D a D6D pro predikci kardiovaskulárního rizika se pokusila prokázat klinická studie, do níž byli zařazeni pacienti vyšetření koronární angiografií. Ve skupině se závažnou stenózou jedné nebo několika tepen (> 50% zúžení) byla zjištěna vyšší aktivita celková desaturázová aktivita stanovená jako poměr AA/LA v membránách erytrocytů. Mnohotná regresní analýza potvrdila, že vyšší hodnoty tohoto poměru (horní tercil) představují nezávislý rizikový faktor pro ischemickou chorobu srdeční. Aktivita desaturáz byla asociována s polymorfismy genů *FADS1/FADS2* (rizikovými alelami a haplotypy), které podmiňovaly prozánětlivé spektrum PUFA. Se zvýšenou aktivitou desaturáz pozitivně korelovaly hodnoty hs-CRP (Martinelli et al. 2008). V již citované korejské studii byly vyšetřeny polymorfismy genů pro D5D a D6D u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a u zdravých kontrolních osob v Jižní Koreji. U zvoleného polymorfismu (rs174537) se minoritní alela spojená s nižší desaturázovou aktivitou vyskytovala významně méně často ve skupině pacientů než u zdravých osob. Nositelé této alely měli nižší zastoupení AA v sérových fosfolipidech a větší částice LDL (Kwak et al. 2011). Srovnávací studie Číňanů (440 pacientů s ICHS a 839 kontrolních osob) prokázala interakci mezi polymorfismem rs17547 *FADS1* a rizikem ICHS. Nositelé minoritní T alely zmíněného polymorfismu s nízkým příjmem EPA/DHA je rizikovým faktorem ICHS (Liu et al. 2015).

### **Interakce variant *FADS* a příjmu PUFA**

Pro prevenci a léčbu dyslipidemií a MS je důležité osvětlit interakce mezi genetickou variabilitou desaturáz a příjmem PUFA ve stravě, popřípadě jejich zvýšeným příjmem v rámci terapie. Průřezové šetření v „Doetinchem Cohort Study“ prokázalo signifikantní asociaci mezi genotypy *FADS1* (rs174546) a celkovým – a non-HDL-cholesterolem ve skupině s vysokým dietním příjmem n-3 PUFA (> 0,51 En %), interakce mezi genotypy rs174546 a celkovým - a non-HDL-C chybí ve skupině s nízkým příjmem n-3 PUFA (< 0,51 En %). Interakce s ostatními vyšetřovanými genotypy *FADS* (rs174570, rs482548) prokázány nebyly (Lu et al. 2010). Obdobný cíl měla studie provedená na souboru respondentů ze švédské populace. Minoritní alela polymorfismu *FADS1* (rs174547) byla spojena s nižšími koncentracemi LDL-C pouze u jedinců s nízkým příjmem n-3 PUFA; významné interakce byly prokázány mezi poměrem ALA/LA ve stravě a plazmatickou koncentrací HDL-C a zmíněným polymorfismem. Vysoký příjem n-3 PUFA (vyjádřený vyšší poměrem ALA/LA) zvyšoval koncentrace HDL-C u genotypu CC a TC polymorfismu rs174547 (Hellstrand et al. 2012). Polymorfismy clusteru *FADS1/FADS2* také vysvětlují hypotriglyceridickou odpověď a deteriorace homeostázy glukózy a působení insulinu po podávání n-3 PUFA. Byla prokázána statisticky významná asociace mezi *FADS1* variantou rs174546 a koncentracemi před a po podávání n-3 PUFA (Cormier et al. 2012) Nositelé minoritní alely polymorfismu

*FADS2* rs482548 měli významně zvýšené koncentrace glukosy po suplementaci n-3 PUFA. Interakce mezi n-3 PUFA a insulinémií nalačno byly prokázány pro polymorfismus *FADS1* rs174546 (Cormier et al. 2013).

### Závěr

V budoucnu by aktivita desaturáz FA mohla být vodítkem při individuálním dávkování n-3 PUFA v rámci prevence a léčby MS a jeho jednotlivých komponent (nadváha/obezita, dyslipidémie, poruchy glukózové homeostázy, subklinická zánět).

Studium genetické variability desaturáz mastných kyselin odhaluje důležité interakce s nutričními faktory. Obě tyto dílčí oblasti výzkumu bude třeba uvést do vztahu k již známým patogenním faktorům zánětu. Ukazuje se, že intenzita systémového subklinického zánětu a chronického zánětu tukové tkáně spolurozhoduje nejen o stupni kardiovaskulárního rizika spojeného s obezitou, ale je i spojovacím článkem mezi obezitou a metabolickými odchylkami jako je inzulínová rezistence, poruchy sekrece inzulínu a dyslipidémie.

*Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT/13199*

### Literatura

- **Arbo I, Halle C, Malik D, et al.** Insulin induces fatty acid desaturase expression in human monocytes. *Scand J Clin Lab Invest* 2011; 71: 330-339.
- **Armutcu F, Akyol S, Ucar F, et al.** Markers in nonalcoholic steatohepatitis. *Adv Clin Chem* 2013; 61: 67-125.
- **Blanchard H, Legrand P, Pédrone F.** Fatty acid desaturase 3 (*Fads3*) is a singular member of *Fads* cluster. *Biochimie* 2011; 93: 87-90.
- **Bokor S, Dumont J, Spinneker A, et al.** Single nucleotide polymorphisms in the *FADS* gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. *J Lipid Res* 2010; 51: 2325-2333.
- **Calon F, Limbo, Yang F, et al.** Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 2004; 43: 633-645.
- **Cormier H, Rudkowska I, Paradis A-M, et al.** Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. *Nutrients* 2012; 4: 1026-1041.
- **Cormier H, Rudkowska I, Thifault E, et al.** Polymorphism in fatty acid desaturase (*FADS*) gene cluster: effects on glycemic controls following an omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) supplementation. *Genes* 2013; 4:485-498.
- **Dumont J, Huybrechts I, Spinneker A, et al.** *FADS1* genetic variability interacts with dietary  $\alpha$ -linolenic acid intake to affect serum non-HDL-cholesterol concentrations in European adolescents. *J Nutr* 2011; 141: 1247-1253.
- **Ebbesson SOE, Lopez-Alvarenga JC, Okin PM, et al.** Heart rate is associated with markers of fatty acid desaturation: the GOCADAN study. *Int J Circumpolar Health* 2012; 71: 17343.
- **Erkkila A, de Mello VDF, Risérus U, Laaksonen DE.** Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Prog Lipid Res* 2008; 47: 172-187.
- **Euroaspire III.** Euro Heart Survey, Vinna, September 2007; [www.escardio.org](http://www.escardio.org)
- **Glaser C, Heinrich J, Koletzko B.** Role of *FADS1* and *FADS2* polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism* 2010; 59: 993-999.
- **Hansen Petrik MB, McEntee MF, Johnson BT, et al.** Selective inhibition of delta-6 desaturase impedes intestinal tumorigenesis. *Cancer Lett* 2002; 175: 157-163.
- **Hashimoto K, Yoshizawa AC, Saito K, et al.** The repertoire of desaturases for unsaturated fatty acid synthesis in 397 genomes. *Genome Inform* 2006; 17: 173-183.

- **Hellstrand S, Sonestedt E, Ericson U, et al.** Intake levels of dietary long-chain PUFAs modify the association between genetic variation in FADS and LDL-C. *J Lipid Res* 2012; 53: 1183-1189.
- **Jacobs S, Schiller K, Jansen E, et al.** Association between erythrocyte membrane fatty acids and biomarkers of dyslipidemia in the EPIS-Potsdam study. *Europ J Clin Nutr* 2014; 68: 517-525.
- **Jakobsson A, Westernberg R, Jakobsson A.** Fatty acid elongases: their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research* 2006; 45: 237-249.
- **Jump DB.** N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 242-247.
- **Jump DB.** Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14: 115-120.
- **Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, et al.** Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009; 41: 56-65.
- **Kröger J, Zietemann V, Enzenbach C, et al.** Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, desaturase activity, and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Am J Clin Nutr* 2011; 93:127-42.
- **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.
- **Kwak JH, Paik JK, Kim OY, et al.** FADS gene polymorphisms in Koreans: association with  $\omega 6$  polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids, lipid peroxides, and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2011; 214: 94-100.
- **Lann D., LeRoith D.** Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Med. Clin. N. Am.* 2007; 91: 1063 -1077.
- **Lattka E, Illig T, Koletzko B, et al.** Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2010; 21: 64-69.
- **Liu F, Li Z, Lv X, Ma J.** Dietary polyunsaturated fatty acid intake modify the effect of genetic variation in Fatty Acid Desaturase 12 on coronary artery disease. *Plos One* 2015; 10: e0121255.
- **Liu Y, Jandacek R, Rider T, et al.** Elevated delta-6 desaturase (FADS2) expression in the postmortem prefrontal cortex of schizophrenic patients: relationship with fatty acid composition. *Schizophr Res* 2009; 109: 113-120.
- **Liu Y, McNamara RK.** Elevated delta-6 desaturase (FADS2) gene expression in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorders. *J Psychiatr Res* 2011; 45:269-272.
- **Lu Y, Feskens EJ, Dollé ME, et al.** Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid intake interacts with FADS1 genetic variation to affect total and HDL-cholesterol concentrations in the Doetinchem Cohort Study. *Am J Clin Nutr* 2010; 92: 258-265.
- **Malerba G, Schaeffer L, Xumerle L, et al.** SNPs of the FADS gene cluster are associated with polyunsaturated fatty acids in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Lipids* 2008; 43: 289-299.
- **Martinelli N, Girelli D, Malerba G, et al.** FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 941-949.
- **Mathias RA, Vergara C, Gao L, et al.** FADS genetic variants and omega-6 polyunsaturated fatty acid metabolism in a homogeneous island population. *J Lipid Res* 2010; 51: 2766-2774.
- **Merino DM, Johnston H, Clarke S, et al.** Polymorphisms in FADS1 and FADS2 alter desaturase activity in young Caucasian and Asian adults. *Mol Genet Metab* 2011; 103: 171-178.
- **Murff HJ, Edwards TL.** Endogenous Production of Long-Chain Polyunsaturated Fatty. Acids and Metabolic Disease Risk. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 2014; 8:418 (9 str).



- **Nakamura MT, Nara TY.** Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 345–376.
- **Nakayama K, Bayasgalan T, Tazoe F, et al.** A single nucleotide polymorphism in the FADS1/FADS2 gene is associated with plasma lipid profiles in two genetically similar Asian ethnic groups with distinctive differences in lifestyle. *Hum Genet* 2010; 127: 685-690.
- **Russo C, Olivieri O, Girelli D.** Increased membrane ratios of metabolite to precursor fatty acid in essential hypertension. *Hypertension* 1997; 29: 1058-1063.
- **Saito E, Okada T, Abe Y, et al.** Abdominal adiposity is associated with fatty acid desaturase activity in boys: implications for C-reactive protein and insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013; 88: 307-311.
- **Sergeant S, Hugenschmidt CE, Rudock ME, et al.** Differences in arachidonic acid levels and fatty acid desaturase (FADS) gene variants in African Americans and European Americans with diabetes or the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2012; 107: 547–555.
- **Schaeffer L, Gohlke H, Müller M, et al.** Common genetic variants of the *FADS1 FADS2* gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1745-1756.
- **Solakivi T, Kunnas O, Jaaakkola O, et al.** Delta-6-desaturase gene polymorphism is associated with lipoprotein oxidation *in vitro*. *Lipids Health Dis* 2013; 12: 80.
- **Sone Y, Kido T, Ainuki T, et al.** Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster are associated with plasma LDL cholesterol in Japanese males. *J Nutr Sci Vitaminol* 2013; 59: 325-335.
- **Stančáková A, Paananen J, Soinen P, et al.** Effects of 34 risk loci for type 2 diabetes or hyperglycemia on lipoprotein subclasses and their composition in 6,580 nondiabetic Finnish men. *Diabetes* 2011; 60: 1608- 1616.
- **Tanaka T, Shen J, Abecasis GR, et al.** Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI Study. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000338
- **Tosi F, Sartori F, Gustini P, et al.** Delta-5 and Delta-6 Desaturase: Critical Enzymes in Polyunsaturated Fatty Acid-related Pathways with Pleiotropic Influences in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol* 2014; 114: 1269-1279.
- **Truong H, DiBello JR, Ruiz-Narvaez E, et al.** Does genetic variation in the  $\Delta 6$ -desaturase promoter modify the association between  $\alpha$ -linolenic acid and the prevalence of metabolic syndrome? *Am J Nutr* 2009; 89: 920-925.
- **Vařeka T, Vecka M, Jiráček R, et al.** Plasma fatty acid profile in depressive disorder resembles insulin resistance state. *Neuroendocrinol Lett* 2012; 33 (Suppl.2): 83-86.
- **Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, et al.** Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967: 183-195.
- **Warensjö E, Öhrvall M, Vessby B.** Fatty acid composition and estimated desaturase activities are associated with obesity and lifestyle variables in men and women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; 16: 128-136.
- **Zdravotnická ročenka České republiky 2009;** ÚZIS ČR; [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz)
- **Zietemann V, Kröger J, Enzenbac C, et al.** Genetic variation of the FADS1 FADS2 gene cluster and n-6 PUFA composition in erythrocyte membranes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam study. *Br J Nutr* 2010; 104: 1748–1759.