

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

SLOVENSKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
Společnost klinické biochemie – Sekce pro aterosklerosu

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

4. INTERNÍ KLINIKA 1. LF UK

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

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

2 0 1 9

diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku

P r a h a 11. - 12. září 2019

Hlavní název: ATHEROSKLEROSA 2019

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 2019

Cena: neprodejné

ISBN 978-80-905595-6-1

ČESTNÉ PŘEDSEDNICTVO

Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

Děkan 1. LF UK Praha

doc. MUDr. Milan Kuchta, CSc.

Lékařská fakulta UPJŠ, Košice, Slovensko

Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Předseda Oborové rady biochemie a patobiochemie 1. LF UK Praha

PROGRAMOVÝ VÝBOR

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

ADRESA SYMPOSIA

Lékařský dům

Sokolská 490/31, Praha 2

O B S A H

Autor	Str.
Dostálová	1
Hüttl	6
Hyánek	11
Chrpová	13
Lejsková	16
Macášek	22
Malínská	29
Marková	33
Metelcová	37
Pánek	39
Sitko	42
Široká	49
Šmíd	57
Vecka	60
Zeman	67
Žák	73

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

POTRAVINOVÉ ZDROJE RIZIKOVÝCH ŽIVIN – CUKRŮ, SODÍKU, NASYCENÝCH A *TRANS*-NENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN

FOOD SOURCES OF RISK NUTRIENTS - SUGARS, SODIUM, SATURATED AND *TRANS*-UNSATURATED FATTY ACIDS

J. Dostálová

University of Chemistry and Technology Prague, Czech Nutrition Society

Abstract

At present, high intake of salt, sugar, saturated fatty acids and trans fatty acids is considered the greatest nutritional risk in developed countries. Salt and sugar intake is roughly twice the recommended amount. The lecture will present the main sources of these risk nutrients. Most of the salt is consumed from food products (75 - 80 %), the rest falls on meals. The most important sources are bakery products, meat products and cheeses due to the high amount consumed. Other rich sources of salt are: some fish products, ready meals, dehydrated soups, instant noodles, sterilized vegetables, marinades and flavorings, soy (up to 18 %) and other sauces, finished pasta sauces, potato chips, salted sticks, salted nuts etc. In addition to commonly known sources of sugar (confectionery, pastry, processed fruit, sweetened beverages, etc.), some types of cereal breakfasts, flavored fermented milk products, natural fruit juices, etc. have high sugar content. The main sources of saturated fatty acids are fats from palms and animal fats and products contained them. Trans fatty acids contain food products only exceptionally. In many products, both salt and sugar content could be reduced from a technological standpoint, and therefore the reformulation program is very beneficial.

Úvod

V odborné literatuře se uvádí, že výživa je nejvýznamnějším faktorem zevního prostředí, který ovlivňuje zdraví člověka a následně délku jeho života i délku tzv. aktivního života. Literární údaje uvádějí rozmezí vlivu 40 - 60 %. Je to jeden z důvodů současného velkého zájmu o výživu a potraviny. Nesprávná výživa se významně podílí na řadě onemocnění, které ovlivňují aktivitu člověka a zvyšují riziko jeho předčasného úmrtí. Jsou to především:

- vysoký krevní tlak
- nemoci srdce a cév (infarkt, cévní mozková příhoda)
- některé druhy nádorových onemocnění
- cukrovka 2. typu
- obezita
- nemoci ledvin
- osteoporóza

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) většina hlavních faktorů, které se nepříznivě uplatňují na zdraví člověka, souvisí s výživou. V pořadí závažnosti jsou to:

- nadbytečný příjem soli
- vysoký příjem alkoholu
- nevhodné složení tuku – vysoký obsah nasycených mastných kyselin a trans mastných kyselin.
- vyšší konzumace přidaných cukrů
- vysoký příjem energie
- nedostatečný příjem ovoce a zeleniny

Příjem soli

V ČR je příjem kuchyňské soli téměř **trojnásobný** než příjem doporučený WHO (5 g/den) a je jeden z nejvyšších v Evropě. Společnost pro výživu doporučuje snížení spotřeby **kuchyňské soli (NaCl)** na 5 - 6 g za den a preferenci používání soli obohacené jodem. U starších lidí snížení příjmu soli pod 5 g na den. V kojeneckém věku stravu zásadně nesolíme, v pozdějším dětském věku užíváme sůl úměrně potřebám dítěte.

Nejvíce soli je přijímáno z potravinářských výrobků (75 - 80 %), zbytek připadá na pokrmy.

Obsah soli ve vybraných potravinářských výrobcích

- některé **rybí výrobky** až 14 %
- **bílé sýry** např. sýry typu balkán, jadel až 6 % (8 %)
- **modré sýry** (plísňové) – 4 - 5 %
- **masné výrobky** – doporučeno přidávat do 2,5 % soli, obvykle mají do 3 %, ale i více např. uzená masa cca 4 %, Salami minis Walnuss 5,8 % (dětská šunka mívá méně např. 1,7 %)
- **pekařské výrobky**, zvláště sypané solí. Pekařské výrobky se podílejí na příjmu soli z 20 - 30 % vzhledem k vysokému konzumovanému množství
- **poděbradka** 1,25 g/l

Další významné zdroje soli

- hotové pokrmy průmyslově vyrobené
- dehydratované polévky, instantní nudle
- sterilovaná zelenina
- marinády a dochucovadla (i více než 50 %)
- sójová (až 18 %) a další omáčky
- hotové omáčky na těstoviny
- bramborové chipsy (až 2 %)
- slané tyčinky (až 7 %)
- solené ořechy (až 2,5 %)

Některé z výše uvedených bohatých zdrojů soli se konzumují jako pochutiny (mezi jídly např. při televizi, posezení s přáteli apod.), takže konzument přijímané množství většinou ani nevnímá.

Výsledky průzkumu KHS v Ostravě v roce 2018

Krajská hygienická stanice v Ostravě sledovala obsah soli v pečivu podávaném v mateřských školách v Moravskoslezském kraji. Doporučení WHO pro pekařské výrobky je 1,2 g soli/100 g. Tuto hodnotu splnila nebo jen mírně překročila přibližně polovina z 20 vzorků odebraných v mateřských školách. Příspěvek pečiva do denního příjmu soli není při obvykle dietě zanedbatelný.

Dále sledovala příjem soli z obědů v zařízeních poskytujících stravovací služby. Pracovníci KHS odebrali 54 vzorků obědů v 18 provozovnách závodního stravování. Zjištěné hodnoty obsahu soli se pohybovaly od 4,84 g do 14,95 g soli/oběd (průměr 7,84 g/oběd), což znamená více než 2 až 7 násobné překročení doporučené dávky EFSA pro oběd. Ani v jednom případě nebyla doporučená dávka soli 2,1 g soli/oběd dodržena, a to ještě nebylo zohledněno dosolování u stolu, neboť obědy byly odebrány přímo v kuchyni.

Opatření ke snížení příjmu soli v ČR

- snížit obsah soli v potravinářských výrobcích (75 - 80 % příjmu soli je z potravin)
- zaměřit se především na výrobky s vysokou spotřebou (pekařské a masné výrobky, některé sýry)
- omezit příjem většiny vysoce zpracovaných potravinářských výrobků
- omezit solení pokrmů, zejména „dosolování“ pokrmů na talíři
- osvětová činnost pro spotřebitele.

Příjem cukrů

WHO doporučuje preferovat ve stravě polysacharidy (škroby), cukrů (např. cukr řepný a třtinový (sacharóza), ovocný (fruktóza), hroznový (glukóza, dextróza), mléčný (laktóza) aj. konzumovat denně maximálně 90 g, přidaných cukrů pouze 50 g (výhledově 25 g/den). Z hlediska výživového je konzumace větších množství cukrů riziková. Při nedostatečném výdeji energie se ukládají ve formě tuku a mají další nežádoucí účinky. Nezanedbatelné nejsou ani kariogenní účinky cukrů. Vlákna je naopak pro organismus prospěšná a měli bychom zvýšit její příjem na 30 g.

Zdroje cukrů

Cukry používané ke slazení nápojů a pokrmů

- **cukr řepný** (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) nebo **třtinový** (*Sacharum officinarum*) - **sacharóza**
- **cukr přírodní (hnědý)** musí podle vyhlášky obsahovat nejméně **97,5 % sacharózy**
- **sirupy** – glukózový, glukózo-fruktózový a fruktózo-glukózový sirup
- **javorový sirup** - ze šťávy javoru cukrodárného (*Acer saccharum*) - **sacharóza**
- **kokosový cukr** – z kokosovníku ořechoplodého (*Cocos nucifera*) – z mízy **sacharóza**, z květů 45 % **fruktózy**, inulin aj.
- **palmový cukr** – ze šťávy palmy rodu *Borassus* - **sacharóza**
- **datlový cukr** – z plodů datlovníku pravého (*Phoenix dactylifera*) - **sacharóza**
- **agávový sirup** – **fruktóza** (cca 75 %)
- z dalších méně známých zdrojů

Nejvýznamnější potravinové zdroje cukrů

- **nealkoholické nápoje** – většinou 10 % i více
- **zpracované ovoce** – džemy, rosoly, marmelády, povidla, proslazené ovoce, sušené ovoce aj. – vysoký obsah cukrů – **sacharóza, fruktóza, glukóza**
- **cukrovinky** – většina je složena téměř výhradně z cukru, glukózového nebo maltózového sirupu
- **čokoláda a čokoládové bonbony** – obsah cukru závisí na obsahu kakaové sušiny, může být i vyšší než 50 %
- **výrobky z obilovin** - cereální snídaně (i přes 30 %), cukrářské výrobky, jemné pečivo, některé druhy trvanlivého pečiva (přes 30 %)
- **kysané mléčné výrobky** – neochucené (4,6 %),
ochucené – běžně až 16 %, výjimka až 23 %
- **mražené krémy a zmrzliny** - velmi různý obsah
- **med** – téměř 80 % cukrů (**fruktóza, glukóza**)

Sladká chuť je většinou lidí oblíbená (její obliba je člověku vrozená). V současnosti však příjem cukrů převyšuje výrazně doporučené dávky (sacharózy téměř dvojnásobně), a proto bychom měli jejich příjem omezit. Není nutné cukry zcela vyloučit, ale konzumovat potraviny s jejich nižším obsahem – je nutné sledovat tabulku výživových hodnot údaj: sacharidy, z toho cukry.

Příjem nasycených a trans-nenasycených mastných kyselin

Obsah trans mastných kyselin v potravinách již v současnosti není problematický. Pozornost se nyní soustřeďuje na obsah nasycených mastných kyselin, jejichž vysoký příjem podporuje vznik zejména nemocí srdce a cév. Ve Výživových doporučeních USDA (Ministerstvo zemědělství USA) je na snížení příjmu nasycených MK kladen obzvláštní důraz. Ke snížení příjmu vyzývá i WHO, výživová doporučení jednotlivých států včetně České republiky.

Zdroje nasycených mastných kyselin

Složení MK nejběžnějších tuků a olejů

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

Potraviny v ČR s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin

- maso a masné výrobky s výjimkou masa drůbežního
- mléko a mléčné výrobky, sýry
- pekařské výrobky z listového těsta a s náplněmi
- čokoláda, čokoládové bonbony, některé cukrovinky
- müsli tyčinky a mražené krémy s polevami
- mražené krémy s rostlinným tukem
- cukrářské výrobky, hlavně s polevami a náplněmi
- rostlinné náhrady smetany a šlehačky
- jíšky, dehydrované polévky aj.

Z hlediska výživy, zejména srdečně-cévních onemocnění jsou velmi rizikové trans mastné kyseliny. Doporučení k příjmu WHO je „as low, as possible“, max. do 1 % z RHP tj. 2,5 g/den. V našich potravinách se v současnosti vyskytují pouze ojediněle (většinou potraviny z dovozu) – tuky částečně ztužené vodíkem se nahrazují tuky ztuženými jinou technologií, nejčastěji tuky z palem. Na obalu se jejich přítomnost nesmí značit, signálem jejich přítomnosti může být „částečně ztužený tuk“ uvedený v surovinovém složení

Závěr

V řadě výrobků by bylo z technologického hlediska obsah soli i cukru možné snížit, a proto program reformulací je velice prospěšný. Obsah soli i cukru je nutné snižovat postupně, aby si spotřebitel zvykl na nižší intenzitu slané nebo sladké chuti. Důležité je nezvykat děti na příliš slané nebo sladké potravinářské výrobky a pokrmy. Omezit obsah nasycených mastných kyselin je obtížnější, protože jsou součástí nezbytných surovin nebo zajišťují texturu výrobků. Je tedy nutné, konzumovat výrobků majících jejich vyšší obsah menší množství.

Literatura

Bastlová M., Letošník R., Remešová M. Sledování kuchyňské soli v pečivu a v pokrmech. *Výživa a potraviny* 2019; 74: 64-66.

Dostálová J., Kadlec P. Potravinářské zbožíznalství. Ostrava: KEY Publishing s.r.o., 2014.

Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M. Přehled tradičních potravinářských výrob. Ostrava: KEY Publishing s.r.o., 2012.

Kudlová E.: Vysoce průmyslově zpracované potraviny a zdraví, *Výživa a potraviny*, v tisku. Dohledat: www.szu.cz

Velišek J., Hajšlová J. Chemie potravin I. a II. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009.

Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky. <http://www.vyzivaspol.cz/vyzivo-va-doporuceni-dokumenty/>, 4. 8. 2019.

WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>, 4. 8. 2019.

Údaje na obalech potravin.

Vlastní analýzy.

PŘÍZNIVÉ ÚČINKY TROXERUTINU NA DYSLIPIDÉMII, OXIDAČNÍ STRESS A ZÁNĚT U MODELU POSTMENOPAUZÁLNÍHO METABOLICKÉHO SYNDROMU

BENEFICIAL EFFECTS OF TROXERUTINE ON DYSLIPIDAEMIA, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN A POSTMENOPAUSAL METABOLIC SYNDROME MODEL

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

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

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

Abstract

Metabolic syndrome (MetS) elevates cardiovascular diseases and type 2 diabetes risk. Its incidence increases dramatically in women after the menopause. Recent evidence suggests that troxerutin exhibits beneficial effects on diabetes-related symptoms. The possible positive effects of troxerutin on metabolic disturbances associated with postmenopausal MetS in an experimental model was examined. Wistar rats were ovariectomized or sham-operated at 8 weeks of age and fed a standard diet for 4 month, in order to fully develop MetS disorders associated with the menopausal transition. Thereafter rats were fed a standard diet without or with troxerutin supplementation at doses 150 mg/kg/day for 4 weeks. Troxerutin has not mitigated menopause-induced visceral adiposity increase as well as an impaired insulin sensitivity. Troxerutin favourably affected lipid metabolism and liver impairment in postmenopausal MetS model. Oxidative stress amelioration, positive changes in CypP450 influencing endogenous substrate metabolism and anti-inflammatory effect may be involved in the mechanism.

Úvod

Prevalence metabolického syndromu (MetS) u žen po menopauze je 60 % v porovnání s 20 % u žen v premenopauze. Přítomností MetS stoupá u lidí riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění a diabetu 2. typu. Kardiovaskulární onemocnění je častější u mužů než u žen v premenopauzálním období, ale po menopauze incidence onemocnění dramaticky stoupá (Blum & Blum, 2009). Ztráta ovariálního cyklu, která je doprovázena výrazným poklesem hladin estrogeneru, vede k nárůstu tělesné hmotnosti, viscerální adipozity, inzulinové rezistenci, jaterní steatóze, poruchám lipidového a glukózového metabolismu.

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

Cíl práce

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

Metodika

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

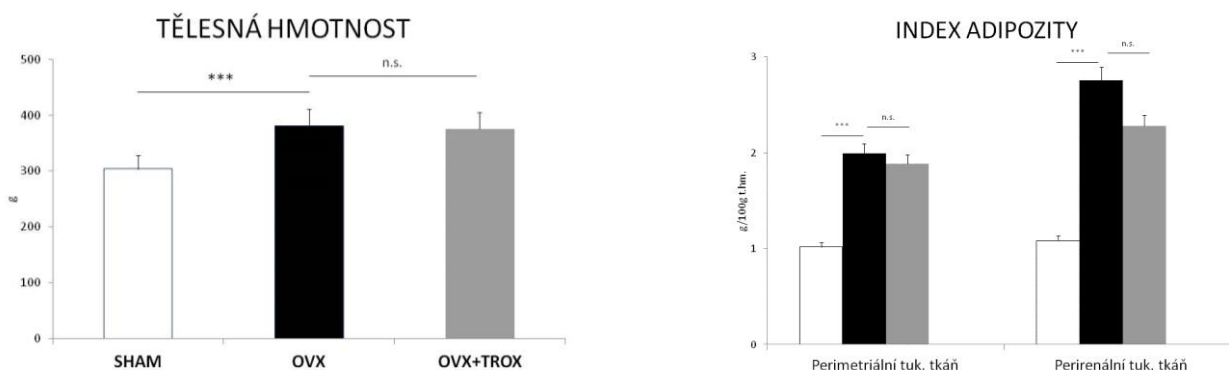
Hladiny sledovaných látek byly stanoveny pomocí komerčních/ELISA souprav: glukóza, triglyceridy, cholesterol Erba-Lachema (ČR), neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) Roche Diagnostic (Germany), inzulin Mercodia (Sweden), HMW adiponektin MyBiosource Inc. (USA), interleukin-6 komerčně dostupnými kity. Genové exprese byly stanoveny kvantitativní PCR. Ke stanovení obsahu triacylglycerolů v játrech, resp. svazech byla tkáň rozdrčena v kapalném dusíku a extrahována ve směsi chloroformu a methanolu. Po přidání 2% KH_2PO_4 byla směs centrifugována. Po odpaření byl obsah triglyceridů stanoven pomocí analytické soupravy Erba-Lachema (ČR).

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

Výsledky

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

Graf 1 a 2



U sledovaných skupin se výrazně nelišily hladiny glukózy a inzulinu samic v sytém stavu. Naproti tomu HOMA-IR index, který vyjadřuje vztah mezi hladinami lačného inzulinu a lačné glukózy v séru a vykazuje silnou korelaci s hyperinzulinemickým euglykemickým glukózovým klempem, byl výrazně negativně zvýšen ovariectomií a podávání troxerutinu

jeho hodnoty průkazně snížilo. Troxerutin působil v cirkulaci mírně protizánětlivě. Podle předpokladů byly léčbou bioflavonoidem troxerutinem zlepšeny parametry oxidačního stresu v séru – významně se zvýšily hladiny glutation-dependentních enzymů a poklesly hladiny produktů lipoperoxidace. Pozitivním účinkem léčby postmenopauzálních samic byl významný pokles krevních lipidů, jejichž profil byl po ovariektomii zhoršený (celkový cholesterol +52 %) v porovnání s kontrolami (viz tab. 1).

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

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

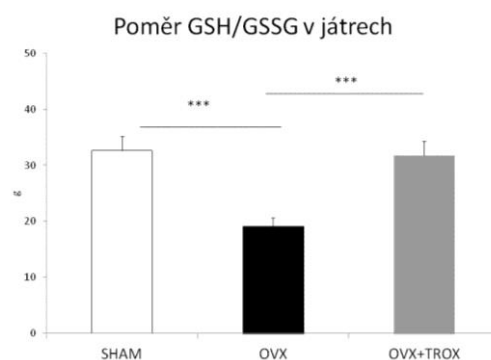
U samic ovariektomie zvyšovala ektopickou akumulaci lipidů v jaterní tkáni: obsah triacylglycerolů byl o 57 % a obsah cholesterolu o 31 % vyšší v porovnání s premenopauzálními samicemi. Léčba troxerutinem depozici lipidů ve tkáních nesnížila (viz tab. 2).

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

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

Citlivost viscerální tukové tkáně a kosterních svalů k účinku inzulinu byla významně zhoršena (p < 0,05) u modelu postmenopauzy a 4-týdenní podávání troxerutinem citlivost tkání u postmenopauzálních samic nezlepšilo.

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



Graf 3

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

Tab. 3 p1 = vliv ovariektomie, p2 = vliv léčby troxerutinem, p < 0,5 =*, p < 0,01=**, p < 0,001=***

V játrech postmenopauzálních samic troxerutin zvýšil expresi Abc transportérů (ATP-binding Cassette) (p < 0,001), které jsou zodpovědné za eflux cholesterolu z jater do žluče a jsou tudíž důležitou složkou eliminace cholesterolu. Intervence troxerutinem snižovala ovariektomií zvýšenou expresi Cyp2e1 (p2 < 0,01). Zvýšená exprese tohoto membránového proteinu přispívá k patogenezi metabolických onemocnění tím, že zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v organismu (Porubsky et al., 2008). Troxerutin v našem experimentu chránil před zvýšením exprese Cyp4a1, Cyp4a2 a Cyp4a3, kteří hrají důležitou roli v metabolismu mastných kyselin, zejména kyseliny arachidonové, a jsou úzce spojeni s inzulinovou rezistencí. Hormonální změny u ovariektomovaných samic vedly v játrech až k sedminásobnému zvýšení exprese lipoproteinové lipázy (p1 < 0,001), přičemž je známo, že overexprese tohoto enzymu vedou u experimentálních modelů k inzulinové rezistenci a obezitě (Delezie et al., 2012). Podávání troxerutinu exprese Lpl významně snižovalo (p1 < 0,001). Exprese Hmgcr (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase), jehož hlavním úkolem je regulace rychlosti biosyntézy cholesterolu a který stojí na počátku jeho endogenní syntézy, nebyly léčbou ovlivněny. Příznivé působení troxerutinu v játrech dokládá i zlepšení spektra mastných kyselin ve fosfolipidech. Antiinflamační index (SHAM: 20,9 ± 2,2 vs OVX: 15,4 ± 0,5 vs OVX + TROX: 22,4 ± 1,5; p1 < 0,01; p2 < 0,01), který ukazuje na protizánětlivé působení mastných kyselin, byl po 4-týdenní intervenci troxerutinem v játrech ovariektomovaných samic významně zvýšen.

Diskuse

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

Závěr

Výsledky experimentu s chirurgicky navozenou menopauzou u potkanů naznačují, že troxerutin by mohl být vhodným terapeutickým doplňkem v léčbě žen po menopauze nejen pro své pozitivní účinky na mikrovaskulární komplikace, ale i díky svému příznivému působení na lipidový metabolismus a jaterní tkáň. Zmírnění oxidačního stresu, pozitivní změny v cytochromu P450, který ovlivňuje endogenní metabolismus substrátů, a protizánětlivé účinky mohou být zahrnuty v mechanismu účinků troxerutinu.

Studie byla podpořena grantem GAČR 17-08888-S

Literatura

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

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

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

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

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

SITOSTEROLEMIE ZACHYCENÉ V RUTINNÍ PRAXI METABOLICKÉ AMBULANCE PRO DĚTI A DOROST

SITOSTEROLEMIAS DETECTED IN ROUTINE PRACTICE OF METABOLIC SURGERY FOR CHILDREN AND ADOLESCENTS

**J. Hyánek, F. Pehal, V. Dubská, B. Miková, T. Honzík, J. Brtnová, V. Martiniková,
J. Mullerová, L. Macháčková, M. Průcha**

*Metabolická ambulance a Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice
na Homolce, Praha*

Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK Praha

Abstract

Authors discuss the findings of hereditary and arteficial sitosterolemias in metabolic surgery for children and adolescents among patients with positive hypercholesterolemias detected by obligatory screening among children born in families suffering from high risk of CVD. 1 homozygote and 3 heterozygotes for hereditary form and 5 patients for arteficial form of sitosterolemia have been observed. Clinical cases, descriptions, treatment with ezetimib and pedigrees have been documented in details.

Cíl

Autoři popisují detekované sitosterolemie - dědičná či arteficiální metabolická onemocnění, která pozorovali za uplynulých 20 let při diferencování dyslipidemií v rutinní metabolické ambulanci Nemocnice na Homolce (NNH), tj. od doby co umíme vyšetřovat hladiny necholesterolových sterolů v krvi.

Úvod

Dědičná sitosterolemie je relativně vzácné onemocnění metabolismu sterolů spojené s omezeným odbouráváním sitosterolu v játrech a ve střevě pro porušený transportní protein ABCG5/ABCG8. Zvýšená hladina sitosterolu je pro člověka stejně aterogenní jako vysoká hladina cholesterolu, a proto se musí včas diagnostikovat a léčit. Výskyt v evropské populaci 1 : 1 mil.

Pacienti a metodika

Metabolickou ambulancí NNH prochází ročně cca 1000 dětí a dorostenců s rizikových rodnin pro KVO odeslaných na základě povinného pozitivního screenigového vyšetření cholesterolu dětskými lékaři, aby se provedlo diferenciálně diagnostické metabolické vyšetření k upřesnění detekované hypercholesterolemie v 5. a 13. r. života. Rutinní lipidové spektrum, hematologické a imunologické vyšetření prováděno na automat. analyzátoch Beckman Coulter a Cobas system. Molekulárně genetické vyšetření deficitu cholesterolových receptorů a sitosterolových mutací se provádí v MedPed Brno. Stanovení základních necholesterolových sterolů v krvi (sitosterol, kampesterol, lathosterol a desmosterol) se provádí GC/MS metodou na FinniganMat120b (int. standard epicoprostenal).

Výsledky

Při diferenciálně diagnostickém vyhodnocení výsledků byly zachycovány a diferencovány za uplynulých 20 let v 70 % vyšetřovaných pacientů tzv. alimentární hypercholesterolemie, v 10 % familiární hypercholesterolemie molekulárně geneticky potvrzené, nefamiliární hypercholesterolemie ve 20 % a při tom byly nalezeny i 3 sitosterolemie dědičné molekulárně

geneticky potvrzené a 5 sitosterolemií arteficiálních (dietních či polékových?). Podrobně jsou uvedeny kazuistiky pacientů tj. rodokmeny, klinické příznaky, laboratorní nálezy včetně necholesterolových sterolů, a výsledky dietní či ezetimibové léčby dětí jak dědičnou tak arteficiální etiologií onemocnění. Pacienti vykazovali jen mírné klinické příznaky a maximální hladina sitosterolu dosahovala u hereditární formy 86 umol/l a u arteficiální 27 umol/l.

Závěr

V naší slovanské populaci se vyskytují jak dědičné tak arteficiální (alimentární či lékové) sitosterolemie, kterým je třeba také věnovat diferenciálně diagnostickou pozornost.

Klíčová slova: sitosterolemie dědičná, sitosterolemie získaná, fytosterolemie, necholesterolové steroly

Key words: sitosterolemia hereditary, sitosterolemia arteficial, fytosterolemia, non cholesterol sterols

NÁHRADNÍ SLADIDLA

SWEETENERS

D. Chrpová*, J. Pánek**

* VOŠZ a SZŠ 5. května, Praha a Ústav analýzy potravin a výživy VŠCHT Praha

** Ústav analýzy potravin a výživy VŠCHT Praha

Abstract

From the nutritional point of view, substitute sweeteners can be divided into energy and non-energy sweeteners. Energy sweeteners (various glucose and fructose syrups, glucose, fructose, alditols - sorbitol, xylitol, erythritol etc.) have a sweetness comparable to sucrose and, with the exception of erythritol, a comparable amount of usable energy (somewhat less energy has polyols - about 60 %). Non-energy sweeteners (saccharin, aspartame and others) have a significantly higher sweetness (30 - 30000 times) than sucrose. The amounts used are therefore considerably smaller (e.g. tenths to tens of mg per cup of tea) and the amount of theoretically received energy is insignificant. Non-energy sweeteners do not interfere with glucose metabolism and are not cariogenic. Development in this area is very fast, in recent years have been developed 4 new sweeteners with a very interesting technological use. While energy sweeteners are (in most cases) legislative food, non-energy sweeteners are considered as additives.

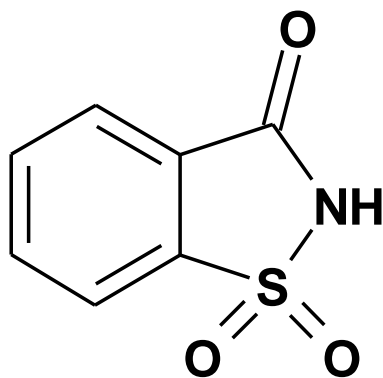
Souhrn

Náhradní sladidla lze z nutričního pohledu dělit na energetická a neenergetická sladidla. Energetická sladidla (různé glukózy a fruktózy sirupy, glukóza, fruktóza, alditoly – sorbitol, xylitol, erythritol aj.) mají sladivost srovnatelnou se sacharózou a, s výjimkou erythritolu, i srovnatelné množství využitelné energie (o něco méně energie mají polyoly – asi 60 %). Neenergetická sladidla (sacharin, aspartam a další) mají výrazně vyšší sladivost (30 - 30000krát) než sacharosa. Používaná množství jsou proto podstatně menší (např. desítky až desítky mg na šálek čaje) a množství teoreticky přijaté energie je zanedbatelné. Neenergetická sladidla neinterferují s metabolismem glukózy a nejsou kariogenní. Vývoj v této oblasti je velmi rychlý, v posledních letech se objevila hned 4 nová sladidla s velmi zajímavým technologickým využitím. Zatímco energetická sladidla jsou (ve většině případů) legislativně potraviny, neenergetická sladidla jsou považována za přídatné látky.

Náhradní sladidla

Náhradní sladidla lze rozdělit podle původu na a) přírodní; b) syntetické látky identické s přírodními nebo modifikované přírodní látky; c) syntetické. Z nutričního hlediska pak na energetická a neenergetická. K energetickým náhradním sladidlům se řadí cukerné alkoholy. Do této skupiny sladidel se často zařazují i alternativní sladidla používaná místo cukru – sacharózy. Legislativně patří k potravinám. Jsou to sirupy vyráběné z cereálií, z ovoce nebo z ovocných šťáv. Díky různému obsahu jednotlivých cukrů může být jejich použití výhodné pro pacienty, kteří musí některý z cukrů omezovat.

Náhradní neenergetická sladidla smí být používána ke slazení potravin (kromě těch, které se zpracovávají pro dětskou výživu) a k přípravě stolních sladidel. Tato musí být označena textem, který uvádí, od kterých náhradních sladidel jsou odvozena. Pro jednotlivá sladidla jsou určena nejvyšší povolená množství. Stolní sladidla a potraviny obsahující aspartam musí mít sdělení, že obsahují zdroj fenylalaninu.

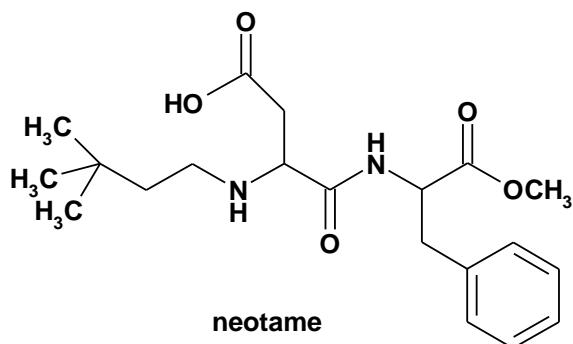
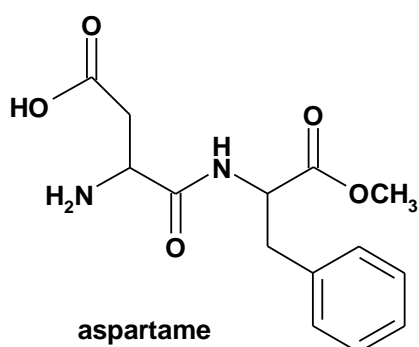
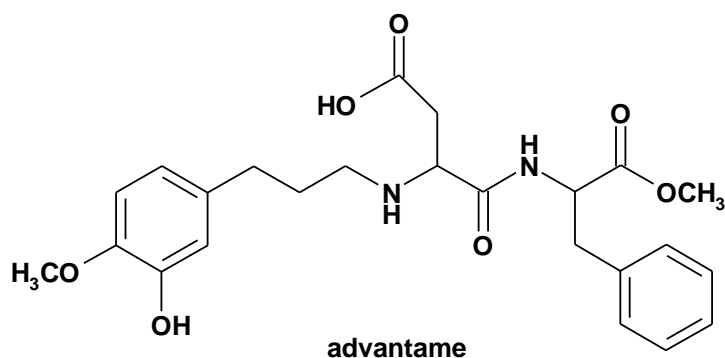
**sacharin**

K náhradním syntetickým neenergetickým sladidlům patří např. sacharin, syntetizován v USA v roce 1879 původně jako konzervant a antiseptikum, jako sladidlo je v USA používán od roku 1900. Je cca 400krát sladší než sacharóza. Vykazuje lehce kovovou a nahořklou pachut', proto se kombinuje např. s aspartamem nebo jinými neenergetickými sladidly. Při tepelném zpracování potravin je stabilní, stejně tak při nízkém pH. Dobře se absorbuje GITem a prakticky beze změny se vylučuje močí, neabsorbovaný podíl pak stolicí. Dosud přetrvávají pochybnosti o jeho karcinogenitě (ADI 5 mg.kg⁻¹); v 70. letech 20. stol. byl na seznamu potenciálních karcinogenů v souvislosti s vyšším výskytem karcinomu močového měchýře u pokusných zvířat, toto bylo nepotvrzeno z důvodu problematického designu pokusu, proto je od roku 2000 ze seznamu odstraněn. Používá se množství 80 mg.kg⁻¹ do limonád, nealkoholického piva a mléčných nápojů s nižším obsahem energie, a 1250 mg.kg⁻¹ do vitaminových přípravků.

Aspartam byl náhodně objeven při vývoji léku na žaludeční vředy. Je poměrně dobře sensoricky hodnocen, protože nevykazuje vedlejší pachutě. V prostředí s velmi nízkou aktivitou vody, jako např. ve žvýkačkách, instantních nápojích v prášku, instantní kávě je velmi stabilní. V kyselých vodných roztocích v závislosti na pH a teplotě hydrolyzuje esterová vazba, vzniká příslušný dipeptid – derivát dioxopiperazinu a metanol. Další hydrolyzou dipeptidu vznikají konečné produkty – aminokyseliny: asparagová a fenylalanin. Tyto reakce jsou spojené s poklesem sladké chuti. Proto aspartam není vhodný pro kyselé potraviny a pro tepelnou úpravu potravin. V některých potravinách může být až 5 % degradováno na dioxopiperazin, o jehož zdravotní nezávadnosti byly jisté pochybnosti. Nynější studie ukazují, že normální konzumace aspartamu s ADI 40 mg.kg⁻¹ a 7,5 mg.kg⁻¹ pro dioxopiperazin není riziková. Další problematickou látkou vznikající při hydrolyze aspartamu se zdá být metanol. Toto množství je tak malé, že se jeho toxicita na člověka nemůže projevit. Stejně množství metanolu vzniká po konzumaci cca 200 g jablek nebo vypití odpovídajícího množství ovocného džusu, ve kterých se metanol také vyskytuje. Metanol vzniká v organismu i vlivem střevních bakterií. Aspartam je povolen v množství 300 mg.kg⁻¹ pro sladkokyselé konzervované výrobky z ovoce, zeleniny a ryb a také až v množství 5500 mg.kg⁻¹ do žvýkaček bez cukru.

K „tradičním“ neenergetickým sladidlům patří, vedle aspartamu a sacharinu, cyklamáty, které jsou ještě stále poměrně často používány, a některá, prakticky zapomenutá sladidla, např. neohesperidin dihydrochalcon nebo thaumatococcus.

V posledních letech se objevila čtyři nová sladidla, která jsou pro konzumenty velmi zajímavá jak z hlediska sensorického, tak pro možnosti užití. Patří sem steviolglykosidy, sukralóza a dva deriváty aspartamu – neotam a advantam.



Právě nejnovější advantam je jednou z nejzajímavějších sloučenin. Jeho sladivost je přibližně 30 000krát vyšší než sladivost sacharosu, takže pro oslazení nápoje/pokrmu je potřeba množství odpovídající desetinám mg. Při těchto množstvích pak ztrácí na významu i to, že toto sladidlo je zdrojem fenylalaninu.

NOVÁ DOPORUČENÍ VE FARMAKOTERAPII DIABETU 2. TYPU (EASD 2018)**NEW RECOMMENDATIONS IN PHARMACOTHERAPY FOR TYPE 2 DIABETES (EASD 2018)****M. Lejsková***TN Interní klinika 3. LF UK, IPVZ Praha*

Na podzim r. 2018 proběhl kongres EASD (European Association for the Study of Diabetes), v jehož závěru bylo vydáno společné doporučení EASD a ADA pro postupy v péči o pacienty s diabetem na základě systematického hodnocení literatury od r. 2014. V doporučených postupech pro diabetes 2. typu (T2DM) s obezitou se kromě zdůraznění významu snahy o zhubnutí a optimálního životního stylu projevil i významný posun v doporučeních pro výběr antidiabetika 2. volby při selhání monoterapie metforminem¹. Na základě výsledků studií, které sledovaly vliv nových antidiabetik na **kardiovaskulární endpointy (MACE, Major Adverse Cardiovascular Events)** bylo vydáno doporučení vybrat u pacienta s klinickým kardiovaskulárním onemocněním (tj. v sekundární prevenci) jako lék 2. volby inhibitor sodíko-glukózoového kotransportéru² (SGLT2), zejména empagliflozin, nebo agonistu receptoru GLP-1 (GLP-1RA), zejména liraglutid. Výsledky dalších kardiovaskulárních studií, které byly publikovány v posledním roce, **potvrzují** především skupinový efekt inhibitorů SGLT2 v nefroprotektivě^{2,3} a kardioprotektivě z hlediska rizika srdečního selhání, ale u s.c. aplikovaných GLP-1RA nalezla významný skupinový kardiovaskulární prospěch až recentní metaanalýza⁴. Na rozdíl od předchozích nejméně dvou desítek let, kdy cílem byl výběr antidiabetik bez rizika hypoglykemie při těsné kompenzaci, je nyní randomizovanými studii u dvou skupin antidiabetik nalezena kardioprotektivita (obr. 1, obr. 2) a nefroprotektivita. Proto je doporučováno individualizovat výběr léku podle anamnézy resp. komorbidit.

Cílem práce je podat aktuální přehled výsledků kardiovaskulárních randomizovaných studií všech tří skupin nových antidiabetik – kromě zmíněných inhibitorů SGLT2 a GLP-1RA i výsledky inhibitorů dipeptidylpeptidázy⁴ (DPP4) a závěrem shrnout takto odůvodněná doporučení výběru antidiabetika 2. volby u T2DM.

Skupina **inhibitorů DPP-4** s ukončenými kardiovaskulárními studii (saxagliptin⁵, alogliptin⁶, sitagliptin⁷ a linagliptin⁸) se celkově jeví jako **kardiovaskulárně neutrální**. Výjimkou je neočekávané zvýšení srdečního selhání u saxagliptinu a hraniční výsledky u alogliptinu⁹, které vedlo k varování FDA před srdečním selháním u těchto léků u pacientů s prokázanou KVO a/nebo chronickým onemocněním ledvin (u alogliptinu bylo varování přechodné).

Všechny 3 **inhibitory SGLT-2** s randomizovanými KV studii prokázaly konzistentní příznivý kardiovaskulární efekt především ve snížení rizika **hospitalizace pro srdeční selhání (HHF)** (obr. 2). Redukce kardiovaskulárního kompozitu 3P-MACE byla dosažena dvěma ze tří gliflozinů (empagliflozinem¹⁰ a kanagliflozinem¹¹) a empagliflozinem dokonce i redukce KV i celkové mortality, která je mezi inhibitory SGLT-2 zatím unikátní. Studie však není možno plně porovnávat, protože se rizikovost souborů liší (tab. 1) - unikátní je i plně sekundárně preventivní kohorta ve zmíněné studii s empagliflozinem. Navíc ve studii s dapagliflozinem¹² na převážně primárně preventivní kohortě s vysokým KV rizikem byla nalezena unikátní redukce nejen HHF ale i kompozitu (KV mortalita, HHF).

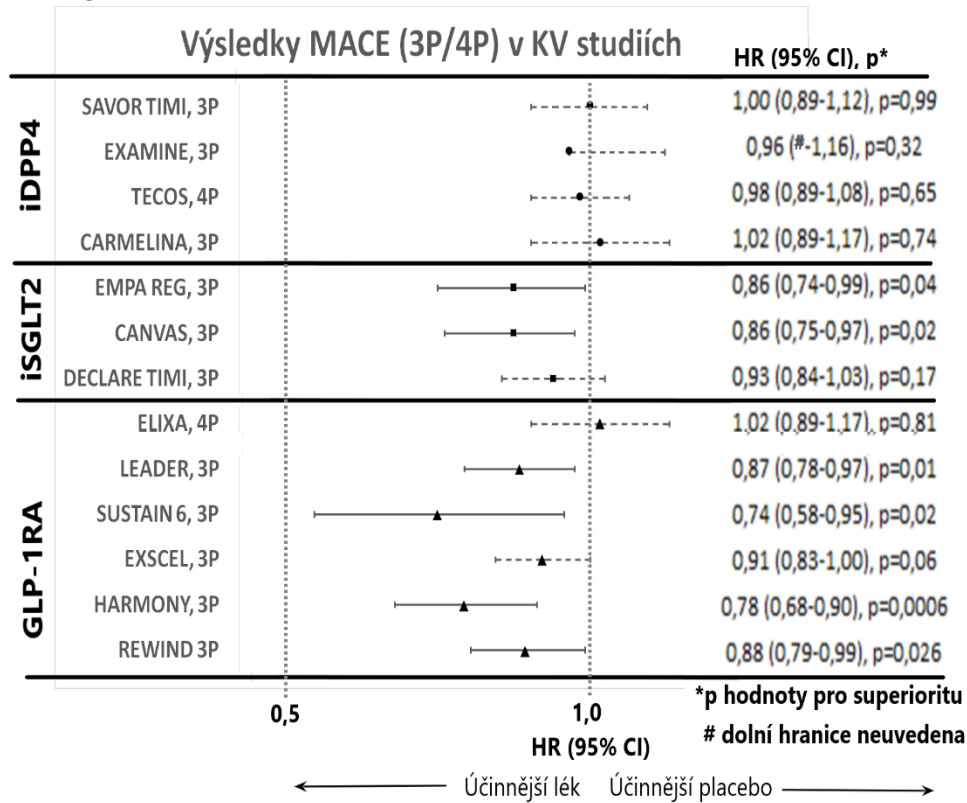
GLP-1RA postrádají podobně výrazný skupinový efekt jako zmíněné inhibitory SGLT2, protože u každého sledovaného kardiovaskulárního parametru dosáhly na významnost pouze některé léky. Nicméně recentně publikovaná metaanalýza v Lancetu ukazuje významný

kardiovaskulární i renální přínos¹³, především **snížení MACE o 12 %** (HR 0,88; 95 % CI 0,82 - 0,94; **p < 0,0001**), ve zkoumaných podskupinách nebyla statisticky významná heterogenita. Navíc bylo nalezeno snížení **kardiovaskulární mortality rovněž o 12 %** (95 % CI 0,81 - 0,96; p = 0,003), podobně i **celkové mortality o 12 %** (95 % CI 0,88, 0,83 - 0,95; p = 0,001). Snížení iktů fatálních i nefatálních o 16 % (95 % CI 0,76 - 0,93; p < 0,0001) a 9 % snížení infarktů myokardu (0,84 - 1,00; p = 0,043). V této metaanalýze dosáhlo významnosti i snížení HHF o 9 % (95 % CI 0,83 - 0,99; p = 0,028), i když v tomto směru je prospěch z léčby inhibitory SGLT2 určitě výraznější (obr. 2). Velmi významně, o 17 % (95 % CI 0,78 - 0,89; p < 0,0001) byl léčbou GLP-RA zlepšen – redukován i výsledek širokého renálního kompozitu, především snížením albuminurie, ale i v tomto směru je efekt inhibitorů SGLT2 ještě výraznější.

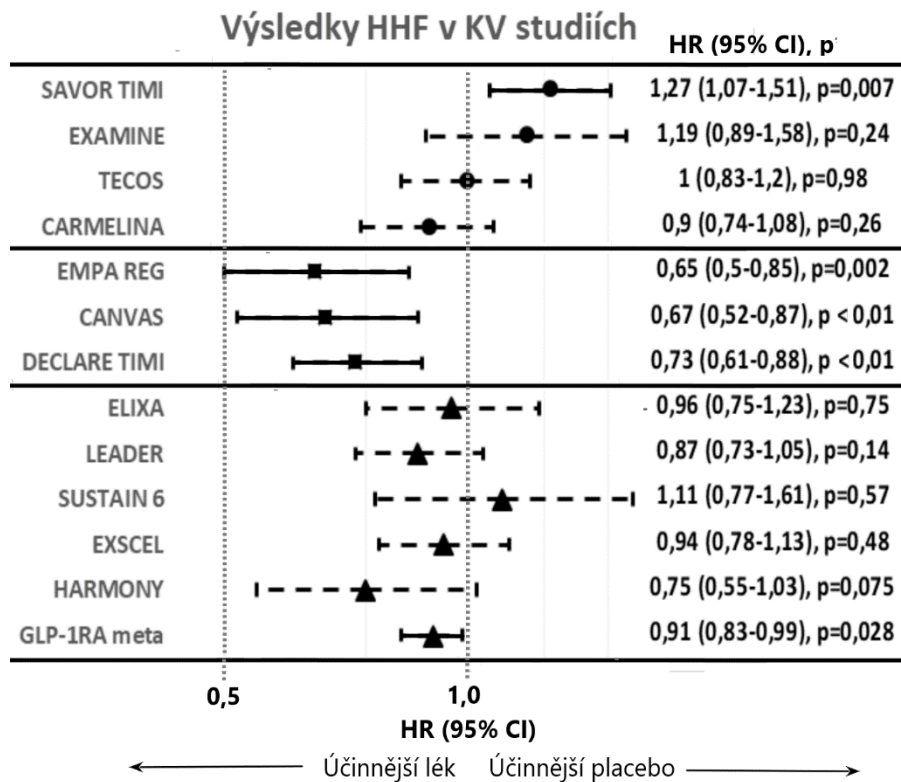
Při interpretaci detailů výsledků kardiovaskulárních studií je nutno postupovat opatrně a odlišit nižší validitu sekundárních endpointů a post-hoc analýz (EXAMINE), které nemají, na rozdíl od primárních endpointů, validitu plně zajištěnou uspořádáním studie.

Doporučení z kongresu EASD pro volbu antidiabetika 2. volby po selhání monoterapie metforminem jsou zmíněnými výsledky studií za rok 2019 podpořena: je-li cílem snížení rizika HHF, je nejvýhodnější volbou inhibitor SGLT2, u něhož je navíc přítomen i skupinový nefroprotektivní efekt (potvrzený renální studií CREDENCE s kanagliflozinem i u osob se závažnější nefropatií). U osob v sekundární prevenci kardiovaskulárních příhod je nejvýhodnější vybrat lék ze skupiny GLP-1RA, popř. inhibitorů SGLT2, který má tyto výsledky kardiovaskulární studií potvrzeny (tab. 2).

Obrázek 1 MACE



Obrázek 2 HHF



Tabulka 1 Uspořádání kardiovaskulárních studií s antidiabetiky

Parametr	SAVOR-TIMI	EXAMINE	TECOS	CARMELINA	EMPA-REG	CANVAS Program	DECLARE-TIMI	ELIXA ¹⁴	LEADER ¹⁵	SUSTAIN-6 ¹⁶	EXSCEL ¹⁷	HARMONY ¹⁸	REWIND ¹⁹
n	16492	5380	14735	6979	7020	10142	17160	6068	9340	3297	14752	9463	9901
Trvání diabetu (průměr-roků)	10,3	7,3	11,6	15	>10 (57%)	13,5	11,0	9,3	12,8	13,9	12	14	?
CVD (%)	78	100	100	57	100	65,6	40,6	100	81	72,2	73,1	100	100
Srdeční selhání (%)	13	28	18	27	10,1	14,4	10	22,4	17,9	23,6	16,2	20	?
eGFR <60 ml/min (%)	16,6	29,1	9,3	62,3	25,9	20,1	7,4	23,2	21,7	24,1	18,6	23	?
Trvání studie (roků)	2,1	1,5	3,0	2,2	3,1	2,4	4,2	2,1	3,8	2,1	3,2	1,6	5,4
Počet příhod (n)	1222	621	1690	854	772	1011	1559	805	1302	254	1744	766	1257
Primární endpoint	3P-MACE	3P-MACE	4P-MACE	3P-MACE	3P-MACE	3P-MACE	3P-MACE/CV Death + HHF	4P-MACE	3P-MACE	3P-MACE	3P-MACE	3P-MACE	3P MACE

HbA1c: Glykovaný hemoglobin, BMI: Body mass index, HTN: Hypertenze, CVD: Kardiovaskulární příhoda v an., 3P-MACE: 3-složkový endpoint (kompozit kardiovaskulárního úmrtí, nefatálního IM, nefatální CMP), 4P-MACE: 3P-MACE plus hospitalizace pro nestabilní anginu pectoris, HHF: Hospitalizace pro srdeční selhání

Zpracováno podle Singh *et al.* Indian J Endocrinol Metab. 2019; 23: 175–183. Gerstein HC *et al.* Lancet. 2019; 394: 121-130.

Tabulka 2 Výběr léku 2. volby u T2DM

Preference	St.p.manifestaci IM nebo iktu	Prevence progresse srdečního selhání	Redukce hmotnosti	Minimalizace rizika hypoglykemií	Cena (např. samoplátce s omezenými prostředky)
Inhibitor SGLT2	empagliflozin /EMPAREG-OUTCOME	skupinový efekt (+ nefro-protektce)	ano	ano	ne
GLP-1RA	liraglutid /LEADER	noninferiorní, +-nefro-protektce	ano	ano	ne
Inhibitor DPP4	noninferiorní	noninferiorní lina- a sitagliptin	neutrální	ano	zatím ne
Agonista PPARγ pioglitazon	sek.prev.iktu /IRIS	↑rizika!	ne - ↑hmotnosti	ano	zatím částečně
Sekretagoga	ne (studie nejsou)	ne (studie nejsou)	ne - ↑hmotnosti	ne!!!	ano

Zpracováno podle Davies et al. Diabetologia 2018; 61: 2461-2498.

Literatura

1. **Davies MJ., D'Alessio DA., Fradkin J., et al.** Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetologia 2018; 61: 2461-2498.
2. **Perkovic V., Jardine MJ., Neal B., et al.** Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. CREDENCE Trial Investigators. N Engl J Med 2019; 380: 2295-2306.
3. **Kluger AY., Tecson KM., Lee AY., et al.** Class effects of SGLT2 inhibitors on cardiorenal outcomes. Cardiovasc Diabetol 2019; 18: 99.
4. **Kristensen SL., Rørth R., Jhund PS., et al.** Cardiovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. Lancet Diabetes Endocrinol 2019; S2213-8587(19)30249-9, in press.
5. **Scirica BM., Braunwald E., Raz I., et al.** Heart failure, saxagliptin, and diabetes mellitus: observations from the SAVOR-TIMI 53 randomized trial. Circulation 2014; 130: 1579-1588.
6. **White WB., Cannon CP., Heller SR., et al.** Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. N Engl J Med 2013; 369: 1327-1335.
7. **Green JB., Bethel MA., Armstrong PW., et al.** Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. N Engl J Med 2015; 373: 232-242.
8. **McGuire DK., Alexander JH., Johansen OE., et al.** Linagliptin Effects on Heart Failure and Related Outcomes in Individuals With Type 2 Diabetes Mellitus at High Cardiovascular and Renal Risk in CARMELINA. Circulation 2019; 139: 351-361.

9. **Zannad F., Cannon CP., Cushman WC., et al.** Heart failure and mortality outcomes in patients with type 2 diabetes taking alogliptin versus placebo in EXAMINE: a multicentre, randomised, double-blind trial. *Lancet* 2015; 385: 2067-2076.
10. **Zinman B., Wanner C., Lachin JM., et al.** Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2015; 373: 2117-2128.
11. **Neal B., Perkovic V., Mahaffey KW., et al.** Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2017; 377: 644-657.
12. **Wiviott SD., Raz I., Bonaca MP., et al.** Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2019; 380: 347-357.
14. **Pfeffer MA., Claggett B., Diaz R., et al.** Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med* 2015; 373: 2247-2257.
15. **Marso SP., Daniels GH., Brown-Frandsen K., et al.** Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2016; 375: 311-322.
16. **Marso SP., Bain SC., Consoli A., et al.** Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2016; 375: 1834-1844.
17. **Holman RR., Bethel MA., Mentz RJ., et al.** Effects of Once-Weekly Exenatide on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2017; 377: 1228-1239.
18. **Hernandez AF., Green JB., Janmohamed S., et al.** Albiglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease (Harmony Outcomes): a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2018; 392: 1519-1529.
19. **Gerstein HC., Colhoun HM., Dagenais GR., et al.** Dulaglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes (REWIND): a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2019; 394: 121-130.

MASTNÉ KYSELINY U KARCINOMU PRSU

FATTY ACIDS IN BREAST CANCER

J. Macášek, B. Staňková, M. Vecka, M. Zeman, E. Tvrzická, M. Kocík, L. Petruželka*,
M. Zimovjanová¹, A. Žák

4. interní klinika; *Onkologická klinika 1. LF UK a VFN Praha

Abstract

Breast cancer has well documented risk factors. Obesity and changes in lipid metabolism are important parts of them, especially in postmenopausal women. There is a change in the metabolism of cancer cells. Higher *de novo* synthesis of fatty acids (FA) predominates. This process leads to an increased amount of monounsaturated fatty acids (MUFA) in membranes of cancer cells with other consequences like change of membrane fluidity and change of membrane's rafts. It influences signalling pathways resulting in protumorigenic processes. There are also many epidemiologic studies on influence of dietary interventions using polyunsaturated fatty acids (PUFA) n-3 and n-6 on a risk of development of breast cancer. Polyunsaturated fatty acids n-3 modulate processes reducing breast cancer cell growth. Polyunsaturated n-6, saturated and monounsaturated FA have rather opposite effects on cancer growth and development. Our study on patients with breast cancer has shown typical results in that there is an increase of saturated fatty acids and a decrease of PUFA n-3 in patients with breast cancer. This finding support a hypothesis about the significance of an increased dietary intake of PUFA n-3 for the prevention of breast cancer development.

Úvod

Karcinom prsu (KP) patří mezi nádorová onemocnění, u kterých byla prokázána asociace zvýšeného rizika vzniku s obezitou a nevhodným životním stylem (vysoký kalorický příjem, nedostatek fyzické aktivity, strava bohatá na nasycené a trans-mononenasycené tuky a rafinované cukry, nedostatek vlákniny). Bylo prokázáno, že restrikce kalorického příjmu a zvýšení fyzické aktivity, ale i bariatrické operace, které vedou ke snížení tělesné hmotnosti, snižují riziko vzniku nádorových onemocnění včetně KP (Wolin et al., 2008). Tyto poznatky byly potvrzeny i v experimentu na zvířecích modelech (Cowen et al., 2015). V roce 1989 Kuhajda a spol. prokázali u osob s karcinomem prsu zvýšenou expresi proteinu, asociovaného s jeho nepříznivou prognózou, který nazvali „haptoglobin-related protein (Hpr)“ (Kuhajda et al., 1989). Později bylo zjištěno, se jedná o cytosolickou syntázu mastných kyselin (fatty acid synthase, FASN). Karcinom prsu patří k nádorům, jejichž incidence stoupá v západních zemích paralelně se vzrůstající epidemií obezity (Eheman et al., 2012). Obezita přítomná v době stanovení diagnózy karcinomu prsu zhoršuje i prognózu tohoto (Potani et al., 2010).

Obecně v buňkách nádorových tkání dochází ke stimulaci lipogeneze, což má význam pro zajištění vysokých metabolických nároků, výstavbu biomembrán atd. Klíčovou roli v těchto pochodech hrají mastné kyseliny (fatty acids, FA), které se účastní i buněčné signalizace a některé jsou prekursory řady pro- i protizánětlivých působků. Pro maligní nádory, včetně karcinomu prsu, je typická dysregulace mastných kyselin

Mění se aktivita enzymů, např. monoacylglycerol lipázy, jejíž nadměrná exprese monoacylglycerol lipázy byla prokázána u agresivních forem karcinomu prsu, vaječnicků a melanomu (Nomura et al., 2010). V biomembránách maligních buněk je snížený obsah exogenních MK, zatímco obsah monoenových mastných kyselin (MUFA), syntezovaných *de novo* je zvýšen. V membránách buněk karcinomu prsu byl ve srovnání s buňkami zdravé prsní

tkáně prokázán vedle zvýšeného obsahu MUFA pokles obsahu vícenenasycených MK (PUFA) (Chajes et al., 1995). Tyto změny významně ovlivňují vlastnosti Tyto změny profilu MK ve fosfolipidech biomembrán mají vliv na její vlastnosti. Biomembrána obsahující vyšší podíl MUFA a nižší podíl PUFA má nižší fluiditu. Změna fluidity ovlivňuje vlastnosti membránových raftů, které hrají důležitou úlohu v signálních dráhách buněk.

Vedle zvýšené lipogeneze *de novo*, provázené zvýšením obsahu nasycených MK (SFA) i MUFA je u nádorových onemocnění změněno spektrum PUFA, Významně se na těchto změnách uplatňuje dysregulace enzymů desaturáz, které zavádějí do řetězce MK dvojně vazby a jejichž aktivita tak ovlivňuje profil syntezovaných PUFA (Žák et al., 2016). Tyto enzymy jsou označovány jako delta-5 (D5D, FADS1), delta-6 (D6D, FADS2) a delta-9 desaturázy (D9D, stearoyl CoA desaturase 1, SCD-1). Delta-6 desaturáza je ve zvýšené míře exprimována v nádorové tkáni a její aktivita je spjata se zvýšenou syntézou arachidonové kyseliny a následných proinflatorně působících prostaglandinů a leukotrienů (Pender-Cudlip et al., 2013). V experimentu na myších bylo zjištěno, že inhibice D6D vede ke zmenšení velikosti tumoru v důsledku inhibice zánětlivé odpovědi a angioneogeneze (He et al., 2012), což ukázalo na možnost užití inhibitorů D6D jako slibná léčebné modality, a že obecně vhodné ovlivnění metabolických přeměn MK může mít význam v prevenci vzniku a růstu maligních nádorů.

Hilvo a spol. prokázali vyšší množství kyseliny palmitové v membránovém fosfatidylcholinu buněk karcinomu prsu (Hilvo et al., 2012), které bylo asociováno i s kratší dobou přežití a vyšší malignitou nádorů. Další autoři prokázali zase zvýšené množství MUFA v dalších fosfolipidových třídách a potvrdili, že za tímto efektem stojí zvýšená *de novo* syntéza MK (Cifcova et al., 2015). Chajes et al. v roce 1999 publikovali práci, ve které na základě analýzy poměru MK 18:0/18:1 n-9 prokázali, že ženy s nižší aktivitou stearoyl-CoA desaturázy (měřenou jako výše uvedený poměr MK) mají nižší riziko vzniku KP. Tento fakt potvrdily i další studie. U pacientek s KP byl prokázán nižší obsah kyseliny stearové jako důsledek vyšší aktivity SCD-1, která katalyzuje její desaturaci na kyselinu olejovou (Chajes et al., 1999). Aktivita SCD-1 je ovlivněna mnoha faktory, včetně působení MK a inzulínu. Inzulín stimuluje expresi SCD-1 a chronická hyperinzulinémie může být rizikovým faktorem pro rozvoj karcinomu prsu.

Problematika vztahu konzumace tuku k riziku rozvoje nádorových onemocnění je složitá. Recentní data ukazují na zvýšené riziko karcinomu prsu u evropských žen konzumujících zvýšené množství tuků, a zvláště nasycených MK (Sieri et al., 2014). Nasycené MK mají i negativní vliv na přežití pacientů s karcinomem prsu dle jedné metaanalýzy (Brennan et al., 2015). Chajes et al. neprokázali u švédských žen asociaci PUFA n-3 a rizika vzniku karcinomu prsu, ale našli, že vyšší obsah zástupce nasycených MK kyseliny stearové v plasmatických fosfolipidech snižuje riziko vzniku karcinomu prsu (Chajes et al., 1999). Fay et al. (1997) postuloval na základě studia zvířecích modelů, že dieta bohatá na PUFA n-6 podporuje kancerogenezi a metastazování KP, naproti tomu PUFA n-3 působí na stejné procesy inhibičně. Epidemiologická data o vlivu konzumace PUFA řady n-6 a n-3 nejsou konzistentní. Možným vysvětlením je obtížný sběr přesných dat o složení požívaných tuků prostřednictvím dietních dotazníků. Vatten a spol. prokázali negativní asociaci mezi sérovou hladinou PUFA n-6 a relativním rizikem vzniku karcinomu prsu u premenopauzálními a perimenopauzálními ženami (Vatten et al., 1993). Chajes a spol. neprokázali žádný vztah mezi hladinou PUFA n-6 či PUFA n-3 a rizikem vzniku karcinomu prsu (Chajes et al., 1999). Jiní autoři prokázali vyšší riziko vzniku KP u indických žen, které konzumovaly zvýšené množství sacharidů a snížené množství obou tříd PUFA (Bannikopa et al., 2017). Obecně je známo, že PUFA n-3 jsou prekurzory antiinflatorně působících prostaglandinů, které mají antitumorigenní působení, a PUFA n-6 jsou prekurzory proinflatorních a protumorigenních mediátorů. Francouzská studie ukázala negativní korelaci mezi množstvím PUFA n-3

v tukové tkáni a rizikem vzniku KP (Maillard et al., 2002). Ve studii provedené v USA byla prokázána pozitivní korelace mezi množstvím PUFA n-6 v tukové tkáni a rizikem KP (Bagga et al., 2002). U karcinomu prsu bylo prokázáno zvýšené množství nasycených MK kyseliny palmitové a stearové (Shannon et al., 2007), ovšem jiní autoři tento náleznepotvrdili (Bannikopa et al., 2017). Při porovnání vlivu dvou zástupců PUFA n-3 EPA a DHA na karcinom bylo zjištěno, že DHA může mít větší efekt na potlačení metastáz u KP než EPA (Rahman et al., 2013). V této studii jsme zjišťovali složení mastných kyselin v esterech cholesterolu plasmy u nemocných s karcinodem prsu konsekutivně vyšetřených na ambulanci Onkologické kliniky VFN Praha v období 2 let.

Materiál a metody

Do pilotní studie jsme zařadili 173 žen s karcinodem prsu, průměrného věku 54 let a průměrným BMI 27,7 kg/m², které byly konsekutivně vyšetřeny na Onkologické klinice 1. LF UK a VFN. Kontrolní skupina zahrnovala 46 kontrolních osob, žen průměrného stáří 55 let a BMI 26,5 kg/m², vyšetřených ve stejném období v lipidové ambulanci IV. interní kliniky 1. LF UK a VFN, u kterých byl vyloučen diabetes mellitus 2. typu a nebyl prokázán metabolický syndrom. Rozdíly ve věku a BMI nebyly statisticky významné. Odběr žilní krve byl prováděn po celonočním 12 hodinovém lačnění do dvou odběrových zkumavek BD Vacutainer® EDTA pro separaci plazmy. Koncentrace celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu, triacylglycerolů, kyseliny močové byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickými metodami (CHOD/PAP, přímá homogenní enzymaticko-kolorimetrická reakce bez precipitace, GPO/PAP, urikáza/PAP, GOD-PAP, Lachema a.s. Brno). Analýza mastných kyselin byla provedena metodou plynové chromatografie (Tvrzická et al, 2002). Ke statistickému zpracování dat byl použit software STATISTICA 12.0 (Stat Soft, ČR).

Výsledky

Základní data o sledovaných skupinách jsou uvedena v tab. 1 a 2. Celková bílkovina, albumin, CRP, kreatinin a urea se u obou skupin statisticky významně nelišily. U pacientů s KP byla významně vyšší hodnota kyseliny močové ($P < 0,01$).

Lipidové parametry jsou uvedeny v tab. 3. Hladina celkového cholesterolu ($P < 0,01$) a LDL cholesterolu ($P < 0,001$) byla signifikantně vyšší u skupiny osob s KP. Hodnoty triacylglycerolů ani HDL cholesterolu se mezi skupinami významně nelišily.

Koncentrace jednotlivých FA ve formě esterů cholesterolu jsou uvedeny v tab. 4. Ve skupině žen s KP jsme pozorovali významně zvýšený obsah celkových SFA ($P < 0,01$) jako výsledek zvýšeného obsahu kyselin palmitové a myristové ($P < 0,001$). Ve skupině KP byl zaznamenán nesignifikantně snížený obsah celkových PUFA n-6. Podíl kyseliny linolové byl u pacientek s KP signifikantně snížený ($P < 0,001$). Celkový obsah PUFA n-3 ($P < 0,001$) i koncentrace EPA ($P < 0,01$) byly signifikantně sníženy u pacientek s KP. Obsah MUFA se u obou skupin statisticky významně nelišil.

Diskuze

Hlavním nálezem v této pilotní studii byl zvýšený obsah celkových SFA, především kyseliny myristové a palmitové, a pokles obsahu celkových PUFA n-3, zejména kyseliny α -linolenové, dokosapentaenové a eikosapentaenové v esterech cholesterolu u pacientek s karcinodem prsu. V naší práci jsme prokázali zvýšení obsahu SFA i jednotlivých zástupců SFA jako jsou kyselina myristová a palmitová. Zvýšené množství SFA je obvykle spojováno se zvýšením rizika se vznikem KP (Turner, 2011). Pozitivní asociace mezi plasmatickými SFA a rizikem KP byla zjištěna v práci case-control autorů Bassett et al. z r. 2016, podobně jako v práci metaanalýze provedené autory Saadatian-Elahi et al. 2004. Vztah SFA v potravě k riziku KP

je zřejmě závislý také na zdroji SFA (Dong et al., 2011). Koncentrace MUFA byli v naší práci nevýznamně vyšší u skupiny KP. Data v dostupné literatuře se rozcházejí. V některých pracích nebyla prokázána asociace mezi příjmem MUFA a KP (Turner, 2011). V jiných však byla prokázána asociace mezi vyšší hladinou MUFA a KP (Saadatian-Elahi et al., 2004). Nižší celkové hladiny PUFA n-6 jsme zjistili u pacientů s KP. Toto snížení bylo způsobeno především poklesem obsahu kyseliny linolové. Tento snížený obsah PUFA n-6 jsme pozorovali i u karcinomu pankreatu (Macášek et al., 2012). V celkovém obsahu PUFA n-3 jsme u pacientek zaznamenali statisticky významný pokles. Byl zjištěn pokles prakticky všech zástupců PUFA n-3 byl snížený obsah kyseliny dokosaheptaenové a eikosapentaenové u skupiny s KP. U starších žen byla nalezena negativní asociace mezi příjmem PUFA n-3 v dietě a KP (Bassett et al, 2016).

Závěr

U nemocných s KP byly prokázány specifické změny ve složení FA. Nejvýraznějšími změnami u pacientů s KP v plasmatických esterech cholesterolu byly statisticky významně zvýšené koncentrace celkových SFA, na kterých se podílela především kyseliny palmitová. V kontrastu s našimi předešlými studii i některými literárními zdroji nebyla zjištěna významný rozdíl v obsahu MUFA, za které bývá zodpovědná zvýšená syntéza FA *de novo* a vyšší aktivita $\Delta 9$ -desaturázy kyseliny palmitové a olejové. Současně mají nemocní s KP významně snížené koncentrace celkových PUFA n-3 i většiny jednotlivých členů řady n-3. Tyto změny mohou být způsobeny zvýšeným oxidačním stresem, který přispívá ke snížení hladiny PUFA cestou zvýšené peroxidace lipidů, ovšem podíl vlivu složení diety nemůže být vyloučen. V každém případě výsledky podporují hypotézu o významu příjmu PUFA n-3 pro snížení rizika vzniku karcinomu prsu.

Tabulka 1 Základní klinické charakteristiky sledovaných skupin

Proměnná	KON	KP
Věk	55,08 ± 10,30	54,46 ± 11,49
BMI	26,47 ± 3,00	27,66 ± 6,16
Váha	72,04 ± 8,23	73,28 ± 16,53

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

Tabulka 2 Základní biochemická data

Proměnná	KON	KP
Celková bílkovina	72,63 ± 5,27	73,72 ± 5,70
Albumin	45,69 ± 2,33	45,02 ± 2,71
CRP	3,82 ± 3,58	6,00 ± 14,17
Kreatinin	71,93 ± 12,91	68,77 ± 13,95
Urea	522 ± 1,24	4,97 ± 1,57
Kyselina močová	245,10 ± 54,18	268,60 ± 67,26**
Bilirubin	9,22 ± 3,79	8,87 ± 5,23
Hemoglobin	136,10 ± 7,75	133,69 ± 10,36

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

Tabulka 3 Lipidové parametry

Proměnná	KON	KP
Celkový cholesterol	5,04 ± 0,78	5,48 ± 1,01**
Triacylglyceroly	1,16 ± 0,45	1,47 ± 1,40
HDL cholesterol	1,69 ± 0,42	1,63 ± 0,43
LDL cholesterol	2,68 ± 0,57	3,25 ± 0,89***

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

Tabulka 4 Mastné kyseliny v esterech cholesterolu plazmy

Proměnná	KON	KP
C14:0	0,51 ± 0,13	0,93 ± 0,09***
C14:1n5	0,05 ± 0,01	0,053 ± 0,003
C16:0	9,39 ± 3,22	13,22 ± 3,63 ***
C16:1n9	0,39 ± 0,03	0,29 ± 0,02 ***
C16:1n7	2,52 ± 1,17	3,20 ± 1,07***
C18:0	0,96 ± 0,80	0,98 ± 2,31
C18:1n9	19,43 ± 2,77	19,07 ± 2,58
C18:1n7	1,16 ± 0,25	1,11 ± 0,27
C18:2n6	56,37 ± 4,58	55,92 ± 5,59
C18:3n6	0,88 ± 0,42	0,70 ± 0,29***
C18:3n3	0,62 ± 0,17	0,48 ± 0,13***
C20:0	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,02
C20:1n9	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,03***
C20:2n6	0,11 ± 0,11	0,05 ± 0,03***
C20:3n6	0,71 ± 0,18	0,69 ± 0,14
C20:4n6	6,13 ± 2,04	5,43 ± 2,23
C20:5n3	0,39 ± 0,29	0,26 ± 0,22**
C22:4n6	0,03 ± 0,04	0,01 ± 0,01***
C22:5n6	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,01***
C22:5n3	0,04 ± 0,05	0,02 ± 0,02***
C22:6n3	0,21 ± 0,17	0,17 ± 0,12
Σ SFA	10,29 ± 2,26	12,50 ± 4,30**
Σ MUFA	23,56 ± 3,19	23,75 ± 3,35
Σ PUFA n-6	64,27 ± 4,22	62,81 ± 6,11
ΣPUFA n-3	1,26 ± 0,55	0,94 ± 0,39***

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

Práce byla podporována výzkumným záměrem RVO-VFN64165/2012, PROGRES Q25/ILF

Literatura

- Bagga D., Anders KH., Wang HJ., Glaspy JA.** Long-chain n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratios in breast adipose tissue from women with and without breast cancer. *Nutr Cancer* 2002; 42: 180-185.
- Bassett JK., Hodge AM., English DR., et al.** Plasma phospholipids fatty acids, dietary fatty acids, and breast cancer risk. *Cancer Causes Control* 2016; 27: 759-773.
- Brennan SF., Woodside JV., Lunny PM., et al.** Dietary fat and breast cancer mortality: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015; 57: 1999-2008.
- Cifcova E., Holcapek M., Lisa M., et al.** Determination of lipidomic differences between breast cancer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407: 991-1002.
- Cowen S., McLaughlin S., Hobbs G., et al.** Highfat, high-calorie diet enhances mammary carcinogenesis and local inflammation in MMTV-PyMT mouse model of breast cancer. *Cancers (Basel)* 2015; 7: 1125-1142.
- Dong JY., Zhang L., He K., Qin LQ.** Dairy consumption and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 127: 23-31.
- Eheman C., Henley J., Ballard-Barbash R., et al.** Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2008, featuring cancers associated with excess weight and lack of sufficient activity. *Cancer* 2012; 12: 2338-2366.
- Fay MP., Freedman LS., Clifford CK., Midthune DN.** Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res* 1997; 57, 3979-3988.
- He C., Qu X., Wan J., et al.** Inhibiting delta-6 desaturase activity suppresses tumor growth in mice. *PLoS One* 2012; 7: e47567.
- Hilvo M., Denkert C., Lehtinen L., et al.** Novel theronostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res* 2011; 71: 3236-3245.
- Chajes V., Lanson M., Fetissov F., et al.** Membrane fatty acids of breast carcinoma: contribution of host fatty acids and tumor properties. *Int J Cancer* 1995; 63: 169-175.
- Chajes V., Hultén K., Van Kappel AL., et al.** Fatty-acid composition in serum phospholipids and risk of breast cancer: an incident case control study in Sweden. *Int J Cancer* 1999; 83: 585-590.
- Kuhajda F., Piantadosi S., Pasternak G.** Haptoglobin-related protein (Hpr) epitopes in breast cancer as a predictor of recurrence of the disease. *N Engl J Med* 1989; 321: 636-641.
- Maillard V., Bougnoux P., Ferrari P., et al.** N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. *Int J Cancer* 2002; 98: 78-83.
- Nomura D., Long J., Niessen S., et al.** Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network the promotes cancer pathogenesis. *Cell* 2010; 140: 49-61.
- Pender-Cudlip MC., Krag KJ., Martini D., et al.** Delta-6-desaturase activity and arachidonic acid synthesis are increased in human breast cancer tissue. *Cancer Sci* 2013; 104: 760-764.
- Potani M., Coory M., Martin J.** Effect iof obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123: 627-635.
- Rahman MM., Veigas JM., Williams PJ., Fernandes G.** DHA is a more potent inhibitor of breast cancer metastasis to bone and related osteolysis than EPA. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 141: 341-352.
- Saadatian-Elahi M., Norat T., Goudable J., Riboli E.** Biomarkers of dietary fatty acid intake and the risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2004; 111: 584-591.

Sieri S., Chiodini P., Agnoli C., et al. Dietary fat intake and development of specific breast cancer subtypes. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: dju068.

Shannon J., King IB., Moshofsky R., et al. Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 1090-1097.

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

Turner LB. A meta-analysis of fat intake, reproduction, and breast cancer risk: an evolutionary perspective. *Am J Hum Biol* 2011; 23: 601-608.

Vatten LJ., Bjerve KS., Andersen A., Jellum E. Polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and risk of breast cancer: a case-control study from the Janus serum bank in Norway. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 532.

Wolin KY., Colditz GA. Can weight loss prevent cancer? *Br J Cancer* 2008; 99: 995-999.

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

METABOLICKÉ ÚČINKY EMPAGLIFLOZINU U MODELU PREDIABETU INDUKOVANÉHO METHYLGLYOXALEM A VYSOKOSACHARÓZOVOU DIETOU

METABOLIC EFFECT OF EMPAGLIFLOZIN IN METHYLGLYOXAL- AND HIGH SUCROSE DIET-INDUCED RAT MODEL OF PREDIABETES

H. Malínská, M. Hüttl, I. Marková, D. Mikláňková, J. Trnovská, O. Oliyarnyk, L. Kazdová, M. Haluzík

Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Abstract

The EMPA-REG OUTCOME study demonstrated cardiovascular benefits of empagliflozin treatment in diabetics with established macrovascular complications. The antidiabetic effect alone does not explain its positive impact on cardiovascular mortality. In our study, we investigated metabolic effect of empagliflozin in rats with serious vascular complications associated with metabolic syndrome and prediabetes. Empagliflozin administration decreased body weight, plasma glucose and insulin, increased adiponectin and improved skeletal muscle insulin sensitivity. In myocardium, empagliflozin treatment switched the substrates utilization: empagliflozin-treated rats exhibited decreased glucose oxidation and increased fatty acid oxidation. To favorable effect of empagliflozin can contribute decreased plasma level of uric acid and reduced oxidative and dicarbonyl stress. Our results revealed important systemic effect of empagliflozin on the alterations in substrates utilization, where glucose oxidation was diverted to the preferences of fatty acid oxidation.

Úvod

Léky s antidiabetickým účinkem se mohou významně lišit v ovlivnění vzniku a rozvoje kardiovaskulárních komplikací. Přední místo mezi antidiabetiky s pozitivním vztahem na kardiovaskulární bezpečnost zaujímají glifloziny, zejména empagliflozin po zveřejnění výsledků studie EMPA-REG-OUTCOME (Empagliflozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Type 2 Diabetes Mellitus Patients). Tato studie jako první demonstrovala kardiovaskulární a renální benefit empagliflozinu u diabetiků s již přítomnými makrovaskulárními komplikacemi. Výskyt kardiovaskulárních onemocnění (nefatální infarkt myokardu, nefatální cévní mozkové příhody) se snížil o 14 %, kardiovaskulární mortality o 38 % a celkové mortality o 32 %. Primárně byla studie zaměřena na kardiovaskulární cíle, ale pozornost se v této studii věnovala i renálním efektům, když empagliflozin prokazatelně zpomalil progresi chronického onemocnění ledvin.

Pozitivní vliv gliflozinů na kardiovaskulární komplikace byl po studii EMPA-REG-OUTCOME potvrzen také pro canagliflozin ve studii CANVAS a částečně i pro dapagliflozin ve studii DECLARE. Metaanalýza randomizovaných studií na 34322 respondentech hodnotící efekt gliflozinů potvrdila, že celkově glifloziny u pacientů s aterosklerotickým postižením snižovaly kardiovaskulární riziko o 11 % a kardiovaskulární mortalitu o 23 %. Kardiovaskulární benefit gliflozinů by tedy mohl být skupinový, i když důkazy jsou silnější pro empagliflozin.

Od zveřejnění pozitivních výsledků studie EMPA-REG-OUTCOME se pozornost zaměřila na objasnění mechanismů kardio- i renoprotektivních účinků empagliflozinu. Přesný mechanismus znám není, ale samotný, často zmiňovaný antidiabetický efekt pozitivní vliv na snížení kardiovaskulární mortality nevysvětluje. Nejčastější vysvětlení poukazují na možný hemodynamický nebo komplexní metabolický efekt.

Cíl

Cílem studie bylo sledovat metabolický vliv podávání empagliflozinu u potkanů, kterým byly indukovány závažné vaskulární komplikace spojené s metabolickým syndromem a inzulinovou rezistencí.

Metodika

Experimenty byly provedeny u potkanů kmene Wistar, kterým byl vyvolán závažný dikarboxylový stres intragastrickým podáváním methylglyoxalu v dávce 0,5 mg/kg po dobu 4 měsíců odpovídající chronickým vaskulárním komplikacím (s histologicky potvrzenou chronickou progresivní nefropatií). Potkanům byla podávána standardní nebo vysokosacharózová dieta (70 cal%) bez nebo s empagliflozinem (10mg/kg/den) po dobu 6 týdnů.

Výsledky

Intragastrické podání methylglyoxalu v kombinaci s vysokosacharózovou dietou vedlo u Wistar potkanů k poruchám glukózové tolerance (AUC_{0-120} : 763 ± 17 vs 705 ± 13 , $p < 0,05$) a rozvoji závažné mikroalbuminurie ($102,02 \pm 10,20$ vs $14,11 \pm 1,41$ mg/g, $p < 0,001$). Podávání empagliflozinu u experimentálnímu modelu prediabetu s chronickými vaskulárními komplikacemi snížilo tělesnou hmotnost ($p < 0,05$), sytou glykémii ($p < 0,05$) i inzulinémi ($p < 0,05$) (tabulka), ale sérové koncentrace glukagonu nebyly ovlivněny. Zvýšené hladiny adiponektinu ($p < 0,01$) spolu se sníženými koncentracemi triacylglycerolů ve svalu ($p < 0,05$) po podání empagliflozinu byly spojeny se zlepšenou inzulinovou senzitivitou v kosterním svalu, měřenou podle inkorporace ^{14}C -glukózy do glykogenu (glykogeneze stimulovaná inzulinem: 2550 ± 427 vs 1882 ± 359 nmol glukózy/g/2 hod, $p < 0,05$). Hladina krevních lipidů – triacylglycerolů i NEMK ($p < 0,05$) byla zvýšena spolu s mírným zvýšením lipolýzy. V myokardu podání empagliflozinu vedlo ke snížené utilizaci glukózy a naopak ke zvýšené oxidaci mastných kyselin, měřené podle inkorporace ^{14}C -pamitátu (+25 %, $p < 0,05$). Snížení plazmatických hladin kyseliny močové (-20 %, $p < 0,05$) i zvýšení koncentrace ketolátů (β -hydroxybutyrát $p < 0,05$) by se mohlo uplatnit v mechanismu příznivého účinku empagliflozinu. V kůře ledvin došlo podáním empagliflozinu k výraznému zlepšení parametrů oxidačního i dikarboxylového stresu, které bylo spojeno se zvýšením relativní exprese transkripčního faktoru Nrf2. Ke zlepšení mikrovaskulárních komplikací v ledvinách mohou přispět snížené hladiny methylglyoxalu (-24 %, $p < 0,05$) i zvýšení redukováného glutationu (+35 %, $p < 0,01$). Podání empagliflozinu rovněž vedlo ke snížení hodnot mikroalbuminurie ($71,6 \pm 7,2$ vs $98,1 \pm 9,8$ mg/g, $p < 0,05$) i koncentrace NGAL v moči ($0,510 \pm 0,054$ vs $0,902 \pm 0,111$ μ g/ml, $p < 0,05$). Histologické vyšetření ledvin prokázalo snížení zánětlivých infiltrátů i známek fibrózy po podání empagliflozinu.

Tabulka Metabolické parametry v séru a tkáních u kontrolní skupiny (W), u skupiny s prediabetem a vaskulárními komplikacemi (W+MG+VS) a po podání empagliflozinu (W+MG+VS + empa)

	W	W+MG+VS	W+MG+VS + empa
tělesná hmotnost, g	684 ± 23	710 ± 26	651 ± 24 [#]
glukóza sytá, mmol/l	6.4 ± 0.3	7.0 ± 0.2	6.4 ± 0.1 [#]
inzulin, nmol/l	0.398 ± 0.084	0.586 ± 0.087**	0.400 ± 0.043 ^{##}
TAG, mmol/l	1.93 ± 0.34	2.60 ± 0.29	4.20 ± 0.93 [#]
NEMK, mmol/l	0.28 ± 0.03	0.36 ± 0.04*	0.47 ± 0.07 ^{##}
HDL-C, mmol/l	1.84 ± 0.13	1.36 ± 0.17*	1.33 ± 0.16
β-hydroxybutyrát, μmol/l	0.479 ± 0.072	0.441 ± 0.071	0.734 ± 0.097 [#]
k. močová, mmol/l	106.5 ± 2.3	92.1 ± 3.9	79.4 ± 2.3 [#]
adiponektin, μg/ml	4.06 ± 0.54	4.03 ± 0.42	5.65 ± 0.70 ^{##}
TAG sval, μmol/g	4.81 ± 1.12	7.39 ± 0.74*	5.57 ± 0.64 [#]

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

* p < 0.05 W vs W + MG + VS (vliv kmene)

p < 0.05 W + MG + VS vs W + MG + VS + empa (vliv léčby empagliflozinem)

Diskuze

Kardiovaskulární riziko bylo ve studii EMPA-REG-OUTCOME sníženo bez ohledu na jeho vliv na glykémii. Mechanismus účinku empagliflozinu tedy přímo nesouvisí se snížením glykémie. V naší studii byl použit model prediabetu bez přítomnosti lačné hyperglykémie, s chronickými vaskulárními komplikacemi a poškozením renálních funkcí.

Naše výsledky odhalily významné změny v preferenci utilizace energetických substrátů, kdy na systémové úrovni došlo k odklonu od oxidace glukózy k preferenci oxidace mastných kyselin. Dále zvýšené hladiny NEMK dané zvýšenou stimulací lipolýzy jsou použity pro vyšší tvorbu ketolátek. Utilizace ketolátek snižuje spotřebu kyslíku a snižuje hromadění acetylCoA v mitochondriích, proto se stávají výhodnějším energetickým substrátem pro kardiomyocyty. Navíc β-hydroxybutyrát vykazuje antioxidační a antiarytmické vlastnosti, které se rovněž mohou uplatnit v mechanismu kardioprotektivního účinku empagliflozinu. Významný pro mechanismus empagliflozinu může být také pokles plazmatických hladin kyseliny močové, který souvisí se zlepšením endoteliálních dysfunkcí. Kyselina močová je schopna zabránit depleci NO a tím zvyšuje jeho biodostupnost.

Podle našich výsledků v mechanismu protektivních účinků empagliflozinu se rovněž může uplatnit zmírnění oxidačního i dikarboxylového stresu, které hrají významnou roli v rozvoji vaskulárních komplikací. V naší studii empagliflozin výrazně zlepšil parametry oxidačního stresu a snížil koncentraci methylglyoxalu v ledvinách. Ochranný vliv empagliflozinu na renální funkce byl pozorován pro markery glomerulárního (mikroalbuminurie) i tubulárního (NGAL) poškození. Podle tubulární hypotézy empagliflozin ovlivňuje tlak v glomerulech a může snižovat hypoxii. Mechanismus příznivého účinku empagliflozinu se tedy zdá být multifaktoriální a probíhá na systémové, renální i vaskulární úrovni.

Závěr

Výsledky odhalily vliv podávání empagliflozinu na změnu v utilizaci substrátů, kdy dochází k odklonění od oxidace glukózy k preferenci oxidace mastných kyselin v myokardu. V mechanismu nefro- i kardioprotektivních účinků empagliflozinu se může uplatnit snížení oxidačního stresu a methylglyoxalu v ledvinách i snížení kyseliny močové v plazmě.

Podpořeno projektem MZ rozvoje výzkumné organizace 0023001 IKEM a grantem GAČR 19-06199S

Literatura

Ferrannini E., Mark M., Mayoux E. CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME Trial: A “Thrifty Substrate” Hypothesis. *Diabetes Care* 2016; 39: 1108-1114.

Filippatos TD., Lontos A., Papakitsou I., Elisaf MS. SGLT2 inhibitors and cardio-protection: a matter of debate and multiple hypotheses. *Postgrad Med* 2019; 131: 82-88.

Inzucchi SE., Zinman B., Fitchett D., et al. How Does Empagliflozin Reduce Cardiovascular Mortality? Insights From a Mediation Analysis of the EMPA-REG OUTCOME Trial. *Diabetes Care* 2018; 41: 356-363.

Perrone-Filardi P., Avogaro A., Bonora E., et al. Mechanisms linking empagliflozin to cardiovascular and renal protection. *Int J Cardiol* 2017; 241: 450-456.

Verma S., Rawat S., Ho KL., et al. Empagliflozin Increases Cardiac Energy Production in Diabetes: Novel Translational Insights Into the Heart Failure Benefits of SGLT2 Inhibitors. *JACC Basic Transl Sci* 2018; 3: 575-587.

Thomas MC., Cherney D. The actions of SGLT2 inhibitors on metabolism, renal function and blood pressure. *Diabetologia* 2018; 61: 2098-2107.

KOMBINACE ATORVASTATINU SE SILYMARINEM ZVYŠUJE HYPOLIPIDEMICKÉ, ANTIOXIDAČNÍ A PROTIZÁNĚTLIVÉ ÚČINKY U NEOBÉZNÍHO MODELU METABOLICKÉHO SYNDROMU

THE COMBINATION OF ATORVASTATIN WITH SILYMARIN ENHANCES HYPOLIPIDEMIC, ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECT IN A NON-OBESE MODEL OF METABOLIC SYNDROME

I. Marková¹, M. Hüttl¹, H. Malínská¹, D. Mikláňková¹, O. Oliyarnyk¹, M. Poruba²,
L. Kazdová¹, R. Večeřa²

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

² *Ústav farmakologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc*

Abstract

Hypolipidemic and cardioprotective effects of statins can be associated with development of myopathies and disorders of insulin secretion. Plant extract silymarin (SM) is known for its anti-inflammatory and hepatoprotective actions. The aim of the study was to investigate whether the combination of atorvastatin (ATV) with SM can favorably influence metabolic disorders in the model of metabolic syndrome. Hereditary hypertriglyceridemic rats (HHTg) were fed a standard diet for four weeks without supplementation; supplemented with ATV and ATV with SM (ATV+SM). ATV increased serum levels of HDL cholesterol and decreased triacylglyceroles (TAG). In the combination ATV+SM, the hypolipidemic effect was increased. ATV increased hepatic and skeletal muscles TAG accumulation but the combination ATV+SM diminished this negative effect. ATV slightly increased levels of MCP-1 and hs CRP in circulation, but its combination with SM suppressed this effect. In the liver of HHTg rats, only the combination of ATV+SM increased the activities of the antioxidant enzymes and reduced lipid peroxidation. The combined administration of ATV with SM potentiated hypolipidemic effect, reduced ectopic lipid accumulation, increased antioxidant and anti-inflammatory actions. The results suggest that SM may favorably influence side effects of statin therapy.

Úvod

Metabolický syndrom (MS) je souborem metabolických poruch, které významně zvyšují riziko rozvoje diabetu 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění. Závažnost MS spočívá v jeho vysoké prevalenci, ve vyspělých zemích postihuje až čtvrtinu populace a procento výskytu stoupá s věkem (1). V patogenezi MS a jeho komplikací hrají významnou úlohu dyslipidémie, inzulinová rezistence, hypertenze, oxidační stres i mírný chronický zánět. V současné době neexistuje lék, který by příznivě ovlivnil všechny poruchy asociované s MS. Farmaceutická terapie je zaměřená na léčbu jednotlivých komponent MS, jako jsou antihypertenziva, statiny a metformin.

Statiny jsou vysoce účinné hypolipidemické léky. Blokují syntézu cholesterolu v játrech inhibicí enzymu 3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzym A reduktázy, což vede ke zvýšení LDL-receptorů v játrech a zvýšenému vychytávání LDL-cholesterolu z krve (2). Mezi nejhojněji užívané statiny patří atorvastatin, který významně snižuje kardiovaskulární riziko, nicméně může mít i vedlejší nežádoucí účinky jako jsou myopatie nebo poruchy sekrece inzulinu (3).

Pozitivní přínos při léčbě MS mohou mít také některé přírodní látky – flavonoidy, různé polyfenolické látky a také silymarin. Použití silymarinu, extraktu ze semen ostropestřce mariánského, má v medicíně dlouholetou tradici, zejména v léčbě jaterních onemocnění jako podpůrná léčba chronických zánětlivých stavů. Silymarin obsahuje směs flavolignanů a

polyfenolů s antioxidačními, protizánětlivými a hepatoprotektivními účinky (4, 5). O vzájemném působení atorvastatinu a silymarinu neexistují dostatečné poznatky.

Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit, zda kombinace atorvastatinu a silymarinu může příznivě ovlivnit oxidační stres a metabolické poruchy u modelu geneticky podmíněné hypertriglyceridémie spojené s MS.

Materiál a metody

Pokusy jsme prováděli na pětíměsíčních samcích kmene hereditárně hypertriglyceridického potkana (HHTg), který je využíván jako neoběžný model MS. HHTg potkani jsou charakterizováni inzulínovou rezistencí, dyslipidemií, zhoršenou glukózovou tolerancí, mírnou hypertenzí a jaterní steatózou. Potkani byli krmeni po dobu čtyř týdnů standardní dietou a) bez suplementace (K); b) suplementovanou atorvastatinem (ATV) v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti/den (Mylan, Generics, UK) nebo c) kombinací ATV s 1% mikronizovaného silymarinu (ATV+SM) (Favea, Kopřivnice, ČR). V každé skupině bylo 8 zvířat.

Koncentrace triacylglycerolů (TAG) a inzulínu v séru, antioxidačních enzymů a obsah TAG ve tkáních byly stanoveny komerčně dostupnými enzymatickými kity. Zánětlivé adipocytokiny byly analyzovány ELISA kity. Hladina glutathionu v játrech byla měřena HPLC s fluorescenční detekcí (Chromservis, Německo). Rezistence svalové (bránice) a epididymální tukové tkáně k účinku inzulínu byla sledována podle bazální a inzulínem stimulované inkorporace (250 μ U/ml) 14 C-U-glukózy do glykogenu a lipidů *ex vivo*. Výsledky byly zhodnoceny statistickým testem Two-way ANOVA (p statin – statistická významnost mezi K a ATV, p kombinace – statistická významnost mezi ATV a ATV+SM).

Výsledky

Léčba ATV neovlivnila příjem potravy ani tělesnou hmotnost (tabulka 1). ATV zvýšil HDL-cholesterol a snížil koncentrace TAG v plasmě o 50 %, v kombinaci se SM byl hypolipidemický účinek zvýšen (-62 %). ATV mírně zvýšil glykémii a inzulínemii, ale kombinace ATV+SM hladinu inzulínu snížila a mírně zlepšila glukózovou toleranci měřenou orálním glukózovým tolerančním testem. V průběhu studie jsme nepozorovali negativní účinky léčby statinem na kosterní sval, aktivita kreatinkinázy se mezi skupinami nelišila.

ATV mírně zvýšil ektopické ukládání TAG v játrech (+15 %) a v kosterním svalu (+49 %), ale kombinace ATV+SM tento negativní efekt výrazně zmírnila (tabulka 2).

Zatímco samotný ATV neovlivnil bazální ani inzulínem stimulovanou senzitivitu tukové tkáně, kombinovaná intervence ATV+SM bazální i stimulovanou lipogenezi zvýšila (bazální lipogeneze K vs. ATV: 562 ± 28 vs. 626 ± 46 , p statin NS; inzulínem stimulovaná lipogeneze K vs. ATV: 624 ± 50 vs. 688 ± 54 nmol glukózy/g/2 hod, p statin NS, bazální lipogeneze ATV vs. ATV+SM: 626 ± 46 vs. 781 ± 70 , p kombinace < 0,05; inzulínem stimulovaná lipogeneze ATV vs. ATV+SM: 688 ± 54 vs. 955 ± 71 , p kombinace < 0,05). Léčba ATV neovlivnila bazální inzulínovou senzitivitu svalové tkáně.

Dále jsme se v naší studii zaměřili na účinek léčby na parametry zánětu. ATV mírně zvýšil hladinu hs CRP (+28 %) a MCP-1 v cirkulaci, ale jeho kombinace se SM negativní efekt potlačila (tabulka 3). Také hladina prozánětlivého cytokinu IL-6 byla příznivě ovlivněna kombinovaným podáváním ATV+SM.

Tabulka 1 Hmotnost a sérové parametry u kontrolní skupiny (K), po léčbě atorvastatinem (ATV) a kombinované léčbě atorvastatinem a silymarinem (ATV+SM)

	K	ATV	ATV+SM	p statin	p kombinace
Hmotnost (g)	409 ± 7	420 ± 7	416 ± 8	NS	NS
TAG (mmol/l)	4,29 ± 0,21	2,11 ± 0,16	1,61 ± 0,11	<0,0005	<0,05
Cholesterol (mmol/l)	1,77 ± 0,04	1,85 ± 0,02	1,85 ± 0,05	NS	NS
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,01 ± 0,04	1,21 ± 0,03	1,24 ± 0,05	<0,005	NS
Inzulin (nmol/l)	0,207 ± 0,031	0,301 ± 0,076	0,157 ± 0,013	<0,05	<0,05
Glykémie sytá (mmol/l)	8,59 ± 0,17	9,50 ± 0,16	9,80 ± 0,13	<0,01	NS
AUC_{0-120 min}	729 ± 17	733 ± 10	690 ± 23	NS	<0,05
Kreatinkináza (μkat/l)	3,85 ± 0,28	3,11 ± 0,32	3,48 ± 0,25	NS	NS

AUC_{0-120 min} – plocha pod glykemickou křivkou při orálním glukózovém tolerančním testu (nmol/l/120 min). Hodnoty udávají průměr ± SE, počet zvířat ve skupině 8.

Tabulka 2 Ektopické ukládání triacylglycerolů

TAG (μmol/g)	K	ATV	ATV+SM	p statin	p kombinace
Játra	9,44 ± 0,62	10,89 ± 0,76	7,59 ± 0,47	NS	<0,005
Sval <i>m. gastrocnemius</i>	3,52 ± 0,44	5,74 ± 0,82	4,05 ± 0,29	<0,05	<0,05
Ledvina	5,68 ± 0,57	5,84 ± 0,40	5,84 ± 0,35	NS	NS

Tabulka 3 Účinek léčby na parametry zánětu

Plasma	K	ATV	ATV+SM	p statin	p kombinace
hs CRP (mg/ml)	0,83 ± 0,51	1,07 ± 0,07	0,87 ± 0,06	<0,05	<0,05
MCP-1 (pg/ml)	3632 ± 241	5075 ± 789	4745 ± 314	NS	NS
IL-6 (pg/ml)	97,4 ± 4,3	93,7 ± 6,1	72,8 ± 3,9	NS	<0,05

V játrech HHTg potkanů pouze kombinace ATV+SM zvýšila aktivity antioxidantních enzymů superoxidodismutázy a katalázy. Hladina redukováného glutathionu, významného intracelulárního antioxidantu, byla v játrech u skupiny léčené kombinací ATV+SM významně zvýšená, což svědčí o zlepšení oxidačního stresu. Na zmírnění oxidačního stresu v játrech po kombinované intervenci ATV+SM ukazuje i snížené množství produktů lipidové peroxidace měřených jako TBARS (látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, -34 %, $p < 0,01$).

Diskuse

Kombinované podávání ATV+SM příznivě ovlivnilo metabolické poruchy doprovázející MS. Přídavek SM k léčbě ATV snižoval u řady parametrů negativní účinky statinové terapie, nebo se jejich kombinace ukázala jako mnohem účinnější než samotná léčba ATV. Kombinace ATV+SM ještě zvýšila hypolipidemické účinky ATV, snížila TAG ve svalu i játrech a zvýšila inzulinovou senzitivitu tukové tkáně. Samotný ATV zvýšil glykémii a inzulinemii, ale

přídavek SM k léčbě statinem tento negativní efekt potlačil. Je známo, že statiny mohou zvyšovat riziko rozvoje diabetu. Metaanalýza 13 randomizovaných kontrolovaných studií zahrnující 19 140 osob zaznamenala o 9 % vyšší riziko rozvoje diabetu mellitu u pacientů léčených statiny v porovnání s pacienty léčenými placebem či standardní léčbou (6).

Kombinace ATV+SM dále zlepšila oxidační stres v játrech a snížila koncentraci zánětlivých markerů v plasmě. SM má díky svému složení bohatému na polyfenoly, flavonoidy a flavonolignany protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Ovlivňuje aktivitu a expresi antioxidačních enzymů prostřednictvím nukleárního transkripčního faktoru Nrf2, má schopnost vychytávat volné radikály a potlačuje zánět ve tkáních inhibicí signální dráhy NFκB. SM díky svému protizánětlivému působení také snižuje inzulinovou rezistenci (7). V naší studii jsme navíc použili mikronizovaný SM, jehož biodostupnost je zvýšená o 85 % oproti normální formě SM, a tím je výrazně zvýšen jeho terapeutický potenciál.

Závěr

Kombinace atorvastatinu se silymarinem v porovnání se samotným atorvastatinem potencovala hypolipidemický vliv, snížila ektopickou akumulaci triacylglycerolů ve tkáních, zvýšila antioxidační a protizánětlivé účinky. Výsledky naznačují, že silymarin může příznivě ovlivnit vedlejší účinky statinové terapie.

Studie byla podpořena grantem GAČR 17-08888-S

Literatura

- 1. Rochlani Y., Pothineni NV., Kovelamudi S., et al.** Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2017; 11: 215-225.
- 2. Goláň L.** Chyby a úskalí terapie statiny. *Inter Med* 2013; 11: 552-553.
- 3. Robinson JG.** Statins and diabetes risk: how real is it and what are the mechanisms? *Curr Opin Lipidol* 2015; 26: 228-235.
- 4. Frassová Z., Rudá-Kučerová J.** Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) jako podpůrný fototerapeutický prostředek v onkologii. *Klin Onkol* 2017; 30: 426-432.
- 5. Neha, Jaggi AS., Sinhg H.** Silymarin and its role in chronic diseases. *Adx Exp Med Biol* 2016; 929: 25-44.
- 6. Sattar N., Preiss D., Murray HM., et al.** Statins and risk of incident diabetes: a collaborative metaanalysis of randomized statin trials. *Lancet* 2010; 375: 735-742.
- 7. Guo Y., Wang S., Wang Y., et al.** Silymarin improved diet-induced liver damage and insulin resistance by decreasing inflammation in mice. *Pharm Biol* 2016; 54: 2995-3000.

SPEKTRUM MASTNÝCH KYSELIN U ČESKÝCH ADOLESCENTŮ VE VZTAHU KE GENETICKÉMU POZADÍ

SPECTRUM OF FATTY ACIDS IN CZECH ADOLESCENTS, THEIR RELATIONSHIP TO GENOTYPE

T. Metelcová^{1,3}, M. Vaňková¹, H. Zamrazilová¹, M. Hovhannisyan¹, B. Staňková², E. Tvrzická², M. Hill¹, M. Kunešová^{1,2}

¹Endokrinologický ústav Praha, ²4. interní klinika 1. LF UK Praha, ³1. LF UK Praha

Abstract

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) regulate inflammatory signalling pathway in adipose tissue. There are associations between single nucleotide polymorphism (SNP) in *FADS1* and percentage of PUFA in serum lipids (Klingel et al., 2018). Schaeffer et al. (2006) report strong associations between variants in the human delta-5 and delta-6 desaturase genes *FADS1* *FADS2* and fatty acid composition in serum phospholipids. In our study, we investigated the influence of SNP (rs174546) in *FADS1* gene on fatty acid composition in serum lipids in adolescents.

Úvod

S obezitou roste riziko rozvoje diabetu mellitus 2. typu, hypertenze a dyslipidémie. Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) ovlivňují zánětlivou signalizační kaskádu v tukové tkáni. Předchozí studie poukazují na asociaci mezi polymorfismy *FADS1* genu a změnou složení PUFA. V naší studii se zabýváme vlivem SNP (rs174546) v genu *FADS1* na složení mastných kyselin v lipidech v séru u adolescentů.

Metodika

Použili jsme vzorky DNA z projektu Childhood Obesity Prevalence And Treatment (COPAT). Vzorky byly odebrány od více jak 2 000 dětí ve věku 13 - 18 let (intervenční skupina – cca 600 subjektů, epidemiologická skupina cca 1500 subjektů). U 754 dětí (378 chlapců a 376 dívek) bylo stanoveno složení mastných kyselin. Genomická DNA byla extrahována z periferní krve. Pro analýzu genotypu bylo použito real time PCR (LC480, Roche). Plynová chromatografie byla použita ke stanovení zastoupení mastných kyselin v lipidech séra (fosfolipidy, estery cholesterolu, triglyceridy). Polymorfismus byl rozdělen na dvě skupiny – riziková alela T a ostatní (alela C, heterozygot).

Pro statistickou analýzu jsme použili následující testy: ANOVA, vícenásobná regrese a OPLS.

Výsledky

Vztah mezi komponentami metabolického syndromu a rizikovou alelou není statisticky významný (tab. 1). Zjistili jsme signifikantní vztah rizikové alely a WHtR ($p = 0,045$). Ve všech lipidových třídách v séru se uplatnila významná asociace se zastoupením kyseliny arachidonové a gama-linolenové (tab. 2)

Tabulka 1 Vztah mezi komponentami metabolického syndromu a rizikovou alelou SNP (rs174546) genu *FADS1*.

Složky metabolického syndromu	p-value
Systolický tlak	0,992
Diastolický tlak	0,816
Glukóza v krvi	0,739
Triacylglyceroly	0,939

Tabulka 2 Vztah SNP (rs174546) genu *FADS1* k mastným kyselinám (ve všech lipidových třídách). Testováno OPLS a vícenásobnou regresí.

Vztah	OPLS	Vícenásobná regrese
<i>FADS1</i> (rs174546)_T a CE 18:3(n-6)	(-0.306)**	(-3.60)**
<i>FADS1</i> (rs174546)_T a PL 18:3(n-6)	(-0.338)**	(-4.22)**
<i>FADS1</i> (rs174546)_T a TG 18:3(n-6)	(-0.390)**	(-4.29)**
<i>FADS1</i> (rs174546)_T a CE 20:4(n-6)	(-0.399)**	(-3.97)**
<i>FADS1</i> (rs174546)_T a PL 20:4(n-6)	(-0.592)**	(-10.98)**
<i>FADS1</i> (rs174546)_T a TG 20:4(n-6)	(-0.454)**	(-3.98)**

*p < 0.05, **p < 0.01

Závěr

U vyšetřovaného souboru adolescentů byl zjištěn statisticky významný vztah mezi stanoveným SNP a WHtR. Signifikantní asociaci jsme nezjistili mezi složkami metabolického syndromu a rizikovou alelou SNP. Zastoupení kyseliny arachidonové (20:4n-6) a kyseliny γ -linolenové (18:3n-6) významně negativně asociuje s polymorfismem (rs174546) genu *FADS1* v lipidech v séru.

Podpořeno grantem: MZ ČR - RVO EÚ 00023761, AZV MZ ČR 17-31670

Literatura

- **Klingel SL., Valsesia A., Astrup A., et al.** *FADS1* genotype is distinguished by human subcutaneous adipose tissue fatty acids, but not inflammatory gene expression. *Int J Obes* (Lond) 2019; 43: 1539-1548.
- **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.

SACHARIDY A JEJICH REAKTIVITA

CARBOHYDRATES AND THEIR REACTIVITY

J. Pánek*, D. Chrpová, M. Sluková*****

Ústav analýzy potravin a výživy VŠCHT Praha; **VOŠZ a SZŠ 5. května, Praha a Ústav analýzy potravin a výživy VŠCHT Praha; *Ústav sacharidů a cereálií VŠCHT Praha*

Abstract

Carbohydrates are a very diverse group of compounds of great physiological importance. Their structure and binding possibilities are very variable. The structural variability is given by the occurrence of cyclic and acyclic forms, by optical isomerism, and by the type of monomer unit bonding of disaccharides, higher oligosaccharides and glycosides. These factors (with the exception of optical isomerism) have a very significant effect on the reactivity of the carbohydrate. In nature, only non-reactive, very stable carbohydrates (starch, cellulose, trehalose, etc.) are used as storage and structural saccharides. Reactive carbohydrates (eg glucose, fructose, lactose, etc.) are present in organisms in limited amounts. Acyclic forms are extremely reactive and occur in very low concentrations in nature (usually hundredths of a percent).

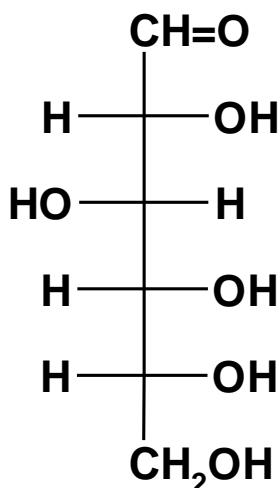
Souhrn

Sacharidy jsou velmi rozmanitou skupinou sloučenin s velkým fyziologickým významem. Jejich struktura a vazebné možnosti jsou velmi variabilní. Variabilita struktury je dána výskytem cyklických a acyklických forem, optickou isomerií a u disacharidů, vyšších oligosacharidů a glykosidů typem vazby monomerních jednotek. Tyto faktory (s výjimkou optické isomerie) mají velmi výrazný vliv na reaktivitu daného sacharidu. V přírodě jsou jako zásobní a strukturní sacharidy využívány výhradně nereaktivní, velmi stabilní sacharidy (škrob, celulóza, trehalosa aj.). Reaktivní sacharidy (např. glukosa, fruktosa, laktosa aj.) jsou v organismech přítomny v omezeném množství. Acyklické formy jsou extrémně reaktivní a v přírodě se vyskytují ve velmi malých koncentracích (obvykle setiny %).

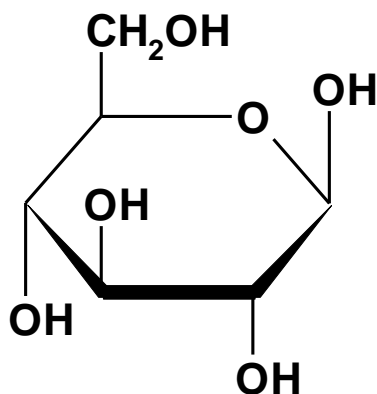
Sacharidy a jejich reaktivita

Fyzikální, chemické a fyziologické vlastnosti sacharidů závisí na jejich struktuře a na velikosti molekuly. Polysacharidy (např. škrob, inulin, glykogen a další), které obsahují v molekule více než 10 cukerných jednotek, jsou (z důvodu velikosti molekuly) prakticky nereaktivní a v rostlinné i živočišné říši slouží z toho důvodu jako nejčastější zásobní zdroj energie.

Naproti tomu, monosacharidy (glukosa, fruktosa a další) jsou vždy reaktivní (což je pro organismus velmi nevýhodné), a proto se v rostlinné i živočišné říši udržuje jejich koncentrace pouze na hodnotách, které jsou fyziologicky nezbytně nutné (viz např. glykémie). Monosacharidy se reálně vyskytují ve dvou formách – lineární a cyklické (cyklických forem bývá obvykle několik).



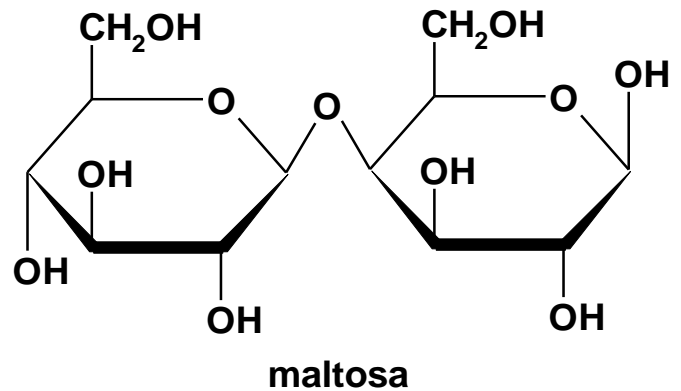
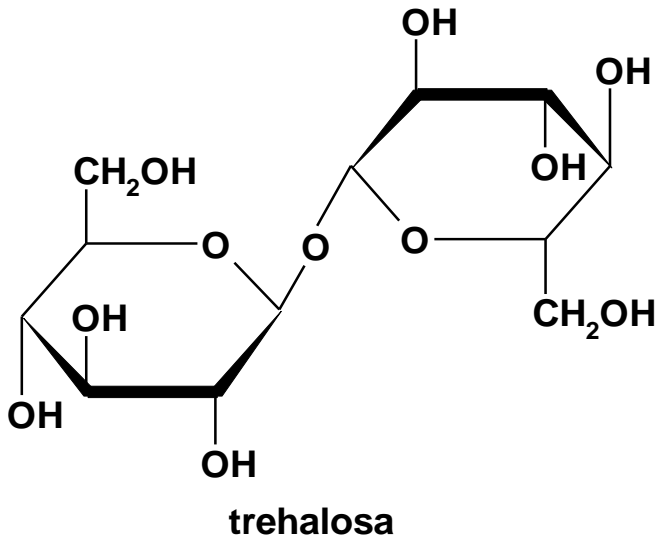
D-glukosa



beta-D-glukopyranosa

Rovnováha mezi těmito dvěma formami je vždy výrazně posunuta ve prospěch méně reaktivní cyklické formy. Lineární forma je velmi reaktivní (vysoká reaktivita je dána dostupnou karbonylovou skupinou na prvním uhlíku; hlavně se zapojuje do sledu Maillardovy reakce). Rovnováha mezi reaktivní lineární a cyklickou formou se neustále obnovuje, což může vést ke vzniku velkého množství reakčních produktů. V potravinách jsou tyto reakce většinou chápány pozitivně – vytváří se tím žádoucí barva a aroma řady potravin – chléb a pečivo, pečené maso, pivo a další. Za zmínku stojí i to, že některé Maillardovy produkty (tzv. reduktony) vykazují velmi vysokou antioxidační aktivitu. V některých případech jsou ale i v potravinách tyto reakce nežádoucí, např. při skladování sušeného mléka a dalších produktů obsahujících laktosu. Ke stejným reakcím (s menší reakční rychlostí) dochází i v organismu, kde se potom hovoří o tzv. glykacích (glykosylacích). Produkty glykací jsou ze zdravotního hlediska hodnoceny velmi negativně – prokazatelně akcelerují průběh aterosklerosy a hovoří se o nich i v souvislosti s procesem stárnutí, rozvojem nádorových onemocnění aj.

Velmi zajímavou skupinou jsou disacharidy (a případně i vyšší oligosacharidy), u kterých struktura a reaktivita spolu velmi úzce souvisejí. U tzv. redukujících sacharidů (laktosa, maltosa, isomaltosa aj.) dochází ke vzniku glykosidické vazby mezi uhlíkem č. 1 jednoho monosacharidu a obvykle uhlíkem č. 4 (méně často uhlíkem č. 6, 3 nebo 2). Tyto sacharidy mají tedy na uhlíku č. 1 druhého monosacharidu dostupnou hydroxylovou skupinu, která je velmi reaktivní. Reaktivita redukujících sacharidů je srovnatelná s reaktivitou monosacharidů. V přírodě se volné redukující oligosacharidy vyskytují poměrně málo, výjimkou je laktosa. Naproti tomu, tzv. neredukující disacharidy vytvářejí glykosidickou vazbu mezi uhlíky č. 1 obou monosacharidů (někdy se vazba označuje jako „face to face“). Tyto sacharidy mají potom volné hydroxylové skupiny na uhlících 2 až 6, tyto skupiny jsou prakticky nereaktivní. Proto se tyto nereaktivní sacharidy využívají také jako zásobní zdroj energie (typicky sacharosa) nebo jako stabilní ochranné filmy různých tkání, mikroorganismů a nižších živočichů (typicky trehalosa).



Travitelné (digestibilní) oligo- a polysacharidy (hlavně škrob a maltodextriny, sacharosa, laktosa, maltosa, isomaltosa, trehalosa) se v organismu tráví působením amylas a isoamylas, produkovaných vnější sekrecí pankreatu a slinnými žlázami a disacharidas (laktasa, maltasa, isomaltasa, sacharasa a trehalasa), produkovaných kartáčovým lemem sliznice tenkého střeva. Deficity disacharidas (vrozené nebo získané) mohou být potom příčinou problémů gastrointestinálního traktu.

Netravitelné (indigestibilní) polysacharidy (hlavně celulosa, arabinoxylany a další hemicelulosa, pektiny, glukany aj.) a oligosacharidy (např. laktulosa, fruktooligosacharidy aj.) se (z menší či větší části) tráví až mikrobiotou tlustého střeva. Vedle své funkce potravní vlákniny vykazují některé z nich i prebiotický efekt.

PREVALENCIA DYSLIPIDÉMIE U PACIENTOV SO SYSTÉMOVÝM LUPUS ERYTHEMATOSUS

PREVALENCE OF DYSLIPIDEMIA IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

J. Sitko^{1,2}, S. Blažíčková^{1,2}, L. Rapantová^{1,3}

¹*Faculty of Health Care and Social Work, University of Trnava, Trnava, Slovakia*

²*Laboratória Piešťany s.r.o., Slovakia*

³*National Institute of Rheumatic Diseases, Piešťany, Slovakia*

Abstract

Cardiovascular disease (CD) is a major cause of morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. Risk factor for CVD in SLE include markers of inflammation (raised levels of acute phase reactants and TNF- α), dyslipidaemia (raised of triglyceride and low high-density lipoprotein) anti-phospholipid antibodies; lupus anticoagulants, antibodies to oxidized low-density lipoprotein and high levels of homocysteine. Several cohort studies have mainly suggested that accelerated atherosclerosis is associated with traditional risk factors such as hypertension and hyperlipidemia. In adults with SLE, dyslipoproteinemia occurs in the range of 30 - 73 %. In our study were 196 patients (24 males, 172 females) with SLE with an average age of 46 years and were measured average level of Total cholesterol was 5.23 mmol/L, HDL 1.55 mmol/L, LDL 3.28 mmol/L and Triglyceride 1.47 mmol/L. Based on criteria for dyslipidemia, in our study dyslipidemia was reported up to 58.16 % of patients (18 men, 96 women). Triglyceride values were elevated in 79 females (28 %) and 8 males (33 %). From the observed levels of LDL, ApoA, ApoB and Lp(a), we observed a significant increase in ApoB with a prevalence of 21 % in female sex and 33 % in male and LpA in 19 % of SLE patients. Control of levels parameters of lipid metabolism and acute phase reactant may be useful in treatment strategies and may favorably affect patient survival.

Introduction

Systemic lupus erythematosus is a multisystem autoimmune disease that mainly affects premenopausal women with a maximum onset age of 20 - 30 (1). SLE is a serious disease, patient survival 10 years after disease diagnosis is at 80 - 90 % (2), which is significantly more than 50 % survival for patients 2 years after diagnosis 40 years ago (3). In fact, the diversity of presentation, the accumulation of manifestations over time, and the changing course of the disease sometimes cause delay in diagnosis of SLE in patients (4). In SLE patients, bimodal mortality prevails (5, 6). Patients who have died within 5 years of diagnosis of the disease usually have an active form of the disease requiring high doses of corticosteroids, intense immunosuppression and frequent occurrence of concurrent infections. On the other hand, early deaths are due to cardiovascular disease. Cardiovascular disease (CD) is a major cause of morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. Overall, the excess risk for CD has been reported to be 2 - 10 fold enhanced compared to the general population (7). Accelerated atherosclerosis is often considered a general feature of SLE and is, in similarity to the general population, assumed to be the main cause of premature CVD. Risk factor for CVD in SLE include markers of inflammation (raised levels of acute phase reactants and TNF- α), dyslipidemia (raised of triglyceride and low high-density lipoprotein) anti-phospholipid antibodies; lupus anticoagulants, antibodies to oxidized low-density lipoprotein and high levels of homocysteine. Several cohort studies have mainly suggested that accelerated atherosclerosis is associated with traditional risk factors

such as hypertension and hyperlipidemia. Although SLE is considered an incurable disease, patients experience remission of the disease with virtually no clinical activity (4). It is assumed that accelerated atherosclerosis in SLE patients includes Virchow's lipid theory and Ross's endothelial injury hypothesis. Because hyperlipoproteinaemia is one of the influential risk factors, the aim of our study was determined prevalence of dyslipidemia for Slovak SLE patients as major risk factor of CD depending on inflammatory parameters (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8) and CRP.

Material and Methods

The patient group consisted of 196 patients (24 men and 172 women) with SLE diagnosed by ACR SLE Criterion (8) in National Institute of Rheumatic Diseases in Piešťany, Slovakia with average age 46 years.

In patient samples we measured total cholesterol (TC), high-density lipoprotein HDL, low-density lipoprotein (LDL), very low density lipoproteins (VLDL), Triglyceride (TG), Apolipoprotein A (ApoA), Apolipoprotein B (ApoB) and Lipoprotein A (Lpa) levels. The determined parameters were analyzed for Cobas Integra and as was used reagents from Roche Diagnostics (Germany).

From given values we calculated non-HDL and atherogenic index (IA).

Formulas used:

non-HDL = total cholesterol - HDL

Atherogenic index (IA) = (total cholesterol-HDL) / HDL

To determine multiple cytokines in a single sample was used Cytokines array by Randox Laboratories. We used the correlation analysis method to determine the statistical dependence between the measured parameters.

Results

Dyslipidemias were traditionally classified by patterns of elevation in lipids and lipoproteins (Fredrickson phenotypes). A more practical system categorizes dyslipidemias as primary or secondary and characterizes them by

- Increases in cholesterol only (pure or isolated hypercholesterolemia)
- Increases in TGs only (pure or isolated hypertriglyceridemia)
- Increases in both cholesterol and TGs (mixed or combined hyperlipidemias)

This system does not take into account specific lipoprotein abnormalities (eg, low HDL or high LDL) that may contribute to disease despite normal cholesterol and TG levels (9).

In our study measured average level of TC was 5.23 mmol/L, HDL 1.55 mmol/L, LDL 3.28 mmol/L and TG 1.47 mmol/L (Table 1).

Based on the above criteria (1 increased TC, 2 increased LDL, 3 increased TG, 4 decreased HDL), we evaluated patients.

Four of the four criteria for dyslipidemia were matched by 6 patients (3.06 %) (1 man, 5 women), at least three criteria we analyzed in 38 patients (19.39 %) (6 men, 32 women), at least two criteria we matched by 114 patients (58.16 %) (18 men, 96 women).

Lipid metabolism disorder as recommended by the European Atherosclerosis Society (EAS) is characterized as:

- TC greater than 5.22 mmol/L and HDL less than 0.9 mmol/L or
- TC greater than 7.77 mmol/L and TG greater than 2.26 (10)

Based on criteria EAS were matched only by 2 men and 3 women.

Table 1. Average measured values of parameters and percentage of patients with elevated values for parameters

Parameter	Total		Women		Men		Reference values
Age (year)	46		47		44		-
N	196		172		24		-
TC (mmol/L)	5,23	96/196 (48,97%) ↑	5,19	81/172 (47,09%) ↑	5,48	15/24 (62,5%) ↑	< 5,2
HDL (mmol/L)	1,55	84/196 (42,86%) ↑ 29/196 (14,80%) ↓	1,58	76/172 (44,19%) ↑ 28/172 (16,27%) ↓	1,35	8/24 (33,3%) ↑ 3/24 (12,5%) ↓	M 0,9-1,6 W 1,15-1,6
Non-HDL	3,68	87/196 (44,39%) ↑	3,61	69/172 (40,12%) ↑	4,07	18/24 (75%) ↑	1,5-3,8
LDL (mmol/L)	3,28	126/196 (64,29%) ↑	3,22	105/172 (61,05%) ↑	3,66	21/24 (87,5%) ↑	< 3,34
TG (mmol/L)	1,47	57/196 (29,08%) ↑	1,46	49/172 (28,49%) ↑	1,53	8/24 (33,3%) ↑	< 2,3
ApoA (g/L)	1,66	6/155 (3,87%) ↑	1,68	6/131 (4,58%) ↑	48,9 3	0/24 (0%) ↑	M 1,04-2,02 W 1,08-2,25
ApoB (g/L)	1,09	52/155 (33,55%) ↑	1,06	47/131 (38,88%) ↑	51,7 2	5/24 (20,8%) ↑	M 0,66-1,33 W 0,6-1,17
LpA (nmol/L)	48,93	32/191 (16,75%) ↑	51,72	32/167 (19,16%) ↑	28,9 2	0/24 (0%) ↑	< 75

Table 2. Mean values of measured cytokine levels in SLE patients

Parameter	Average values
IL-1β (pg/ml)	1,59
IL-6 (pg/ml)	2,81
IL-10 (pg/ml)	1,75*
TNF (pg/ml)	2,50
CRP (ng/ml)	33,68

*p < 0,05 statistical significance, negative correlation between IL-10 and TG □ IL-10 and LDL

Discussion

The most studied autoimmune diseases related to atherotrombosis are those with a higher incidence, such as systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipidsyndrome (APS). The development of cardiovascular disease in these disorders involves genetic factors as well as other acquired risk factors (e.g. hypercholesterolemia, diabetes mellitus and hypertension) (11). In prospective population-based study named Nurses' Health Study (n = 119332), was found a statistically significant > 2-fold increased risk of cardiovascular disease among participants with SLE (10).

The basic definition of dyslipidemia is a disorder of lipoprotein metabolism, including lipoprotein overproduction or deficiency. Dyslipidemias may be manifested by elevation of the total cholesterol, the low-density lipoprotein cholesterol and the triglyceride concentrations, and a decrease in HDL concentration in the blood.

In most studies in SLE patients dyslipidemia refers to elevated TC, TG, and LDL and decreased HDL. By this definition, the prevalence of dyslipidemia in SLE ranges from 36.3 %, at the time of diagnosis, to 60 % or even higher after 3 years of follow up in the SLICC cohort of 918 patients (12). Based on these criteria, dyslipidemia was reported in our study in up to 58.16 % of patients, which is comparable to 60 % dyslipidemia Szabó et al., 2017, Hungary (n = 918) (13), 57.40 % dyslipidemia, Dakua et al., 2017, India (n = 101) (14) and 63.33 % dyslipidemia Kakati et al., 2003 (n = 30) (15). The results of dyslipidemia in our study are comparatively lower than 73.4 % dyslipidemia Atta et al., 2018, Brazil (n = 94) (16).

The other most common abnormality is the decreased HDL (17). Similar to the study Cardoso et al. (18) which showed that among 185 Brazilian SLE patients, approximately 48 % suffered from hypercholesterolemia, 30 % hypertriglyceridemia and 60 % both. In Slovak patients with SLE there were 48.98 % with hypercholesterolemia and 29.08 % with hypertriglyceridemia.

The average results of ApoA level (1.66 g/L) and ApoB level (1.09 g/L) in our study are comparatively higher than ApoA (1.45 g/L) and ApoB (0.94 g/L) Kwankaew et al., 2014 (n = 87) (19). The average results of Lpa levels (48.93 nmol/L) are comparatively higher than (44.40 nmol/L) Sari et al., 2002 (n = 24) (20).

Moreover, the prevalence of the metabolic syndrome is estimated at almost one-third (32.1 %) of SLE patients, whereas low HDL levels were reported in 61.1 % and high TG levels in 29 % of those patients (21).

Of note, dyslipidemia (increased TC, TG, and LDL or decreased HDL) was also more prevalent in patients with discoid lupus (compared to healthy individuals) (22). Besides the basic lipid profile, other lipid biomarkers with, yet, unspecified significance have also been studied. Apolipoprotein E (ApoE) has been found elevated in lupus patients (as compared to normal controls) and was correlated to disease activity (23). On the contrary, serum apoA1 (a cholesterol transport protein with anti-atherogenic properties) was significantly decreased, probably due to the presence of specific anti-apoA1 antibodies (24). In our group of SLE patients, we also recorded reduced values in only 2.60 %.

Nevertheless, no atherogenic (including lipoprotein B, apoC, apoD, apoE, etc.) or atheroprotective lipoprotein (including apo-AI and LpA-I) was associated with subclinical atherosclerosis in SLE (25).

SLE patients with a high risk profile have 28-fold increased chances of plaque and increased progression of intima media thickness. The association between SLE activity and atherosclerosis is not fully understood. Accelerated atherosclerosis has devoted considerable attention and puts the high importance because it is an important cause of morbidity and mortality in patients with SLE. It was found out, that myocardial infarction mortality is approximately 10-fold higher in patients with SLE than in the healthy population corresponding to age and gender (5, 6, 26). Studies are supported by clinical data such as, coronary artery atherosclerosis is present in up to 40 % of SLE patients with only 2 % of the same age control group at the time of death (27). Studies have identified hypercholesterolemia, hypertension, and lupus itself as a risk factor (28). In our study hypercholesterolemia occurred in 38 % of women versus 36 % in the control group, but in the male population of SLE patients it occurred 1.5-fold as the control group (83 % vs 58 % in healthy subjects).

Inflammatory mediators like ESR and CRP are proved to suppress HDL and increase TG levels. There were no elevated CRP values in our SLE group. LDL activity is reduced, which may be governed by TNF- α and IL-6 and antibodies against LDL. Lower LDL activity results in the accumulation of TG-rich particles. The inflammatory mechanisms in SLE result in an intensified oxidative stress which can trigger a broad range of pro-atherogenic lipid changes including conversion of anti-inflammatory HDL to pro-inflammatory one and the production

of oxidized LDL. TNF is a critical mediator of inflammation with an important role in the development of atherosclerosis. Most experimental data are derived from genetic models showing that disrupted TNF signaling is associated with reduced atherosclerosis development without affecting plasma lipid levels (29). In some studies elevated circulating TNF levels are strongly associated with high TG and low HDL in SLE patients (30). There was no statistically significant correlation between cholesterol, HDL, TG and IL-6 and TNF in our group.

Interleukin 10 (IL-10) is a cytokine with inhibitory effect on proinflammatory T helper 1 cell, endothelial cells, monocytes/macrophages and also can be immune stimulatory, by promoting antibody production and B-cell activation. It was demonstrated a positively associated with CVD in SLE (31). We observed a correlation between IL-10 and TG and LDL. IL-10 levels were elevated in patients with lower TG levels. It follows that, that IL-10 is an antiatherogenic cytokine (32).

Conclusions

Inflammatory mediators like ESR and CRP are proved to suppress HDL and increase TG levels. LDL activity is reduced, which may be governed by TNF- α and IL-6 and antibodies against LDL. Lower LDL activity results in the accumulation of TG-rich particles. The inflammatory mechanisms in SLE result in an intensified oxidative stress which can trigger a broad range of pro-atherogenic lipid changes including conversion of anti-inflammatory HDL to pro-inflammatory one and the production of oxidized LDL.

The aforementioned data clearly indicate that dyslipidemia strongly correlates with SLE-related accelerated atherosclerosis. Due to the variety and severity of comorbidities in SLE, traditional CV risk factors, such as dyslipidemia, may often be overlooked. Dyslipidemia represents a modifiable risk factor; prompt and adequate treatment can minimize unnecessary burden in lupus patients, thus reducing hospitalizations and their overall morbidity and mortality.

This study was supported by VEGA 1/0244/17

References

1. **Cardoso CR., Signorelli FV., Papi JA., Salles GF.** Prevalence and factors associated with dyslipoproteinemias in Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatol Int* 2008; 28: 323-327.
2. **Boumpas DR., Fessler BJ., Austin HA., et al.** Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 2: Dermatologic and joint disease, the antiphospholipid antibody syndrome, pregnancy and hormonal therapy, morbidity and mortality, and pathogenesis. *Ann Int Med* 1995; 123: 42-53.
3. **Ginzler EM., Schorn K.** Outcome and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1988; 14: 67-78.
4. **Tan EM., Cohen AS., Fries JF., et al.** The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-1277.
5. **Urowitz MB., Bookman AA., Koehler BE., et al.** The bimodal mortality in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1976; 60: 221-225.
6. **Urowitz MB., Gladman DD.** Accelerated atheroma in lupus--background. *Lupus* 2000; 9: 161-165.
7. **Hak AE., Karlson EW., Feskanich D., et al.** Systemic lupus erythematosus and the risk of cardiovascular disease: results from the nurses' health study. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1396-1402.

8. <https://www.rheumatology.org/Practice-Quality/Clinical-Support/Criteria/ACR-Endorsed-Criteria>
9. **Gladman DD.** Systemic lupus erythematosus: Clinical features. In: Klippel JH., Weyand CM., Wortmann RL., eds. Primer on the rheumatic diseases. 11th ed. Atlanta: Arthritis Foundation, 1997, 267-272.
10. **Study Group, European Atherosclerosis Society.** Strategies for the prevention of coronary heart disease: A policy statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 1987; 8: 77-88.
11. **Lopez-Pedrerera C., Aguirre MA., Buendia P., et al.** Differential expression of protease-activated receptors in monocytes from patients with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 869-877.
12. **Urowitz MB., Gladman DD., Ibanez D., et al.** Clinical manifestations and coronary artery disease risk factors at diagnosis of systemic lupus erythematosus: data from an international inception cohort. *Lupus* 2007; 16: 731-735.
13. **Szabó MZ., Szodoray P., Kiss E.** Dyslipidemia in systemic lupus erythematosus. *Immunol Res* 2017; 65: 543-550.
14. **Dakua S., Behera M., Panda JK., Padhi PK.** Lipid profile in systemic lupus erythematosus: study from a tertiary teaching hospital of eastern India. *Int J Res Med Sci* 2017; 5: 4749-4753.
15. **Kakati S., Doley B., Devee A., et al.** Serum Lipid profiles in patients with systemic lupus erythematosus. *J Indian Rheumatol Assoc* 2003; 11: 5-7.
16. **Atta AM., Silva JPCG., Santiago MB., et al.** Clinical and laboratory aspect of dyslipidemia in Brazilian women with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2018; 37: 1539-1546.
17. **Tolozá SM., Uribe AG., McGwin GG. Jr., et al.** Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXIII. Baseline predictors of vascular events. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3947-3957.
18. **Cardoso CR., Signorelli FV., Papi JA., Salles GF.** Prevalence and factors associated with dyslipoproteinemias in Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatol Int* 2008; 28: 323-327.
19. **Kwankaew J., Leelawattana R., Saignam A., et al.** Apolipoprotein B as an independent predictor of arterial stiffness in systemic lupus erythematosus patients. *Int J Rheum Dis* 2015; 18: 447-451.
20. **Sari RA., Polat MF., Taysi S., et al.** Serum Lipoprotein(a) Level and its Clinical Significance in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Rheumatol* 2002; 21: 520-524.
21. **Telles R., Lanna C., Ferreira G., Ribeiro A.** Metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: association with traditional risk factors for coronary heart disease and lupus characteristics. *Lupus* 2010; 19: 803-809.
22. **Lagogianni I., Papapanagiotou A., Piperi C., et al.** Evidence of reduced plasma HDL subfractions in patients with cutaneous discoid lupus erythematosus. *Clin Biochem* 2005; 38: 286-290.
23. **Zong LJ., Liu WW., Fan YC., et al.** The positive correlations of apolipoprotein E with disease activity and related cytokines in systemic lupus erythematosus. *Diagn Pathol* 2013; 8: 175.
24. **Lahita RG., Rivkin E., Cavanagh I., Romano P.** Low levels of total cholesterol, high-density lipoprotein and apolipoprotein A1 in association with anti cardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1566-1574.

25. **Kiani AN., Fang H., Akhter E., et al.** Apolipoprotein - containing lipoprotein subclasses and subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res* 2015; 67: 442-446.
26. **Rosner S., Ginzler EM., Diamond HS., et al.** A multicenter study of outcome in systemic lupus erythematosus. II. Causes of death. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 612-617.
27. **Haider YS., Roberts WC.** Coronary arterial disease in systemic lupus erythematosus: quantification of degree of narrowing in 22 necropsy patients (21 women) aged 16 to 37 years. *Am J Med* 1981; 70: 775-781.
28. **Petri M.** Detection of coronary artery disease and the role of traditional risk factors in the Hopkins Lupus Cohort. *Lupus* 2000; 9: 170-175.
29. **Kleemann R., Zadelaar S., Kooistra T.** Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 360e76.
30. **Svenungsson E., Fei GZ., Jensen-Urstad K., et al.** TNF-alpha: a link between hypertriglyceridaemia and inflammation in SLE patients with cardiovascular disease. *Lupus* 2003; 12: 454-461.
31. **Fei GZ., Svenungsson E., Frostegard J., Padyukov L.** The A-1087IL-10 allele is associated with cardiovascular disease in SLE. *Atherosclerosis* 2004; 177: 409-414.
32. **Mallat Z., Besnard S., Duriez M., et al.** Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 85: e17-e24.

OMEGA-3 POLYUNENASÝTENÉ MASTNÉ KYSELINY A ZÁPALOVÉ MARKERY PRI ATEROSKLERÓZE

OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND INFLAMMATION MARKERS IN ATHEROSCLEROSIS

M. Široká, Z. Hertelyová*, V. Tomečková

Institute of medical and clinical biochemistry, Faculty of medicine, Pavol Jozef Šafárik University in Košice

**Institute of experimental medicine, Faculty of medicine, Pavol Jozef Šafárik University in Košice*

Abstract

This study deals with omega-3 (ω -3) polyunsaturated fatty acids and inflammation markers in atherosclerosis with hard and soft atherosclerotic plaques in patients with stenosis of *arteria carotis interna*. The aim of study was to evaluate the ω -6: ω -3 polyunsaturated fatty acids ratio and concentrations of inflammation markers in blood plasma of probands and evaluate cardiovascular risk based on this markers. Results showed that C-reactive protein (CRP), fibrinogen, interleukin-4 (IL-4), leptin and especially phospholipase A2 associated with lipoproteins (Lp-PLA2) are reliable predictors of stroke risk. Moreover, Lp-PLA2 concentrations are strongly correlating with ω -6: ω -3 ratio and stage of atherosclerosis. This indicate protective role of ω -3 polyunsaturated fatty acids in atherosclerotic process.

Ateroskleróza veľkých extra a intrakraniálnych ciev patrí medzi najčastejšie stavy podmieňujúce vznik ischemickej cievnej mozgovej príhody (Vestenicá, 2002). Približne 40 % ischemických príhod má priamy súvis s výskytom závažnej aterosklerotickej stenózy *arteria carotis interna* (Kuročka et al., 2016). Epidemiologické štúdie naznačujú, že ω -3 polynenasýtené mastné kyseliny získané z rýb a rybieho oleja znižujú riziko koronárnych ochorení srdca, hypertenzie, cievnej mozgovej príhody a ich komplikácií (Simopoulos, 2002). Dostupné poznatky zdôrazňujú význam zápalového procesu vo vývoji, progresii a destabilizácii aterosklerotických plátov (Chen et al., 2018). Cieľom tejto práce bolo zhodnotiť profil mastných kyselín so zameraním na ω -3 a ω -6 polynenasýtené mastné kyseliny u pacientov s aterosklerózou s mäkkým alebo tvrdým aterosklerotickým plátom a kontrolnou skupinou. Sledovať zmeny koncentrácie fosfolipázy A2 asociovanej s lipoproteínmi vo vybranom súbore pacientov s aterosklerózou. Popísať zápalové markery v sledovaných skupinách pacientov a na základe získaných výsledkov vyhodnotiť kardiovaskulárne riziko u pacientov s rôznymi aterosklerotickými plátmi.

Účastníci experimentu nemali počas experimentu akútne infekčné alebo zápalové ochorenia a boli rozdelení do troch výskumných skupín. Skupina 1 pozostávala z 15 pacientov (11 mužov, 4 ženy, priem. vek 70 rokov) so stenózou *arteria carotis interna*, u ktorých bol ultrasonografickým vyšetrením krčných tepien (USG prístroj Philips HD 11 XE) potvrdený mäkký aterosklerotický plát. Do skupiny 2 bolo zaradených 15 pacientov (10 mužov, 5 žien, priem. vek 70 rokov) so stenózou *arteria carotis interna*, u ktorých ultrasonografické vyšetrenie krčných tepien potvrdilo prítomnosť tvrdého aterosklerotického plátu. Skupina 3 bola kontrolná skupina 15 zdravých dobrovoľníkov (6 mužov, 9 žien, priem. vek 37 rokov) bez akútnych a chronických ochorení. Venózna krv bola účastníkom odoberaná ráno po 12 hodinovom hladovaní do vákuových heparínových skúmaviek (BD Vacuainer, LH 170 I.U.

Plymouth, United Kingdom), centrifugovaná pri 2500 rpm počas 10 minút a následne získaná krvná plazma bola uskladnená v mikroskúmavkách pri -80°C až do vykonania určených biochemických analýz. Zastúpenie jednotlivých mastných kyselín v lipidoch krvnej plazmy účastníkov experimentu bolo analyzované pomocou plynového chromatografu s plameňovo-ionizačným detektorom (GC-FID). Vzorky pre meranie na GC-FID boli pripravené Folschovou metódou s následnou transesterifikáciou metanolátom sodným a extrakciou do heptánu (Tvrzická a kol., 2002). Analýzou získaných chromatogramov mastných kyselín z jednotlivých vzoriek krvnej plazmy v programe Clarity IM offline a pomocou výpočtov v programe Microsoft Excel 2007 boli získané údaje o hmotnostných zlomkoch mastných kyselín vyjadrené v molárnych percentách. Pomery mastných kyselín boli vypočítané ako pomery súčtu daných skupín mastných kyselín. Koncentrácie CRP a fibrinogénu v krvnej plazme boli stanovené biochemickým analyzátorom Daytona RX 3901 (Randox, Slovensko, Bratislava). Pomocou ELISA metód boli stanovené koncentrácie nasledujúcich troch markerov: Lp-PLA2 (Human lipoprotein associated phospholipase A2, Cusabio, USA), IL-4 (Human IL-4 platinum ELISA, eBioscience, San Diego, USA), leptín (Human Leptin ELISA Kit, BioVendor, Czech Republic). Na vyhodnotenie koncentrácií markerov bol použitý spektrofotometrický analyzátor Synergy H4 multiplate reader (BioTek Vermont, USA) pri odporúčanej vlnovej dĺžke pre každý ELISA kit. Výsledky meraní boli vyhodnotené metódami deskriptívnej štatistiky (početnosť, aritmetické priemery \pm štandardná odchýlka priemeru (SEM), percentuálne zastúpenie). Vzťahy medzi experimentálnymi skupinami boli hodnotené Tukey testom (MINITAB Inc. verzia 11.24, Coventry, United Kingdom), kde odlišné písmená (a,b,c) znamenajú štatisticky významné vzťahy pri $p < 0,05$. Korelácie medzi mastnými kyselinami a Lp-PLA2 boli popísané pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu.

Výsledky ukázali, že pomer ω -6: ω -3 mastným kyselinám bol najvyšší v krvnej plazme pacientov s mäkkým aterosklerotickým plátom (obr. 1). Dosahoval priemernú hodnotu až $16,75 \pm 1,12$, čo bola hodnota signifikante vyššia oproti ďalším dvom skupinám. Pacienti s tvrdým aterosklerotickým plátom mali priemerný pomer ω -6: ω -3 mastným kyselinám $12,45 \pm 0,24$ a zdraví jedinci $10,54 \pm 0,14$. V skupine pacientov s mäkkým aterosklerotickým plátom (skupina 1) bola nájdená koncentrácia CRP v krvnej plazme $11,43 \pm 3,58$ mg/l. Táto hodnota bola signifikantne vyššia oproti pacientom s tvrdým aterosklerotickým plátom (skupina 2, $3,62 \pm 0,96$ mg/l) aj oproti kontrolnej skupine (skupina 3, $0,97 \pm 0,28$ mg/l). Medzi skupinou 2 a 3 bol rozdiel len malý a nesignifikantný (obr. 2). V skupine 1 bola nameraná koncentrácia fibrinogénu v krvnej plazme pacientov $4,53 \pm 0,28$ g/l, skupine 2 to bola koncentrácia $3,92 \pm 0,25$ g/l a v skupine 3 bola stanovená koncentrácia $2,79 \pm 0,17$ g/l. Pacienti s mäkkým aj pacienti s tvrdým aterosklerotickým plátom (skupiny 1 a 2) mali signifikantne zvýšenú koncentráciu fibrinogénu v krvnej plazme oproti zdravým jedincom (obr. 3). U hodnôt koncentrácií IL-4 bol pozorovaný rovnaký trend ako u koncentrácií CRP (obr. 4). Signifikantne vyššia koncentrácia $72,07 \pm 3,39$ ng/l bola nameraná v skupine 1 u pacientov s mäkkým aterosklerotickým plátom. V skupine 2 u pacientov s tvrdým aterosklerotickým plátom bola nameraná nižšia koncentrácia $35,63 \pm 1,16$ ng/l a v kontrolnej skupine 3 to bola stanovená najnižšia koncentrácia $31,13 \pm 0,59$ ng/l. Najvyššiu koncentráciu leptínu (obr. 5) v krvnej plazme mali pacienti s tvrdým aterosklerotickým plátom ($7,52 \pm 0,87$ $\mu\text{g/l}$), ktorá bola signifikante vyššia ako v kontrolnej skupine 3 ($4,13 \pm 0,23$ $\mu\text{g/l}$), ale nie v porovnaní s experimentálnou skupinou 1 ($6,29 \pm 0,68$ $\mu\text{g/l}$). Ani rozdiel medzi skupinou 1 a skupinou 3 nebol štatisticky významný. Koncentrácia biochemického markera Lp-PLA2 (obr. 6) vykazovala štatisticky významné rozdiely medzi všetkými tromi skupinami. Najvyššia priemerná hodnota $291,72 \pm 1,84$ $\mu\text{g/l}$ bola nájdená u pacientov skupiny 1, nižšia $258,3 \pm 1,31$ $\mu\text{g/l}$ u pacientov skupiny 2 a najnižšia $220,96 \pm 1,39$ $\mu\text{g/l}$ u zdravých jedincov v skupine 3. Koncentrácia Lp-PLA2 silne pozitívne korelovala s pomerom ω -6: ω -3 polynenasýteným

mastným kyselinám čo vyjadruje Pearsonov korelačný koeficient, ktorého získaná hodnota bola 0,705 (obr. 7).

Vyvážený pomer ω -6: ω -3 polynenasýteným mastným kyselinám prispieva k prevencii mnohých zápalových ochorení ako je ateroskleróza (Hansson, 2005). U pacientov s mäkkým aterosklerotickým plátom bol nájdený najvyšší pomer ω -6: ω -3 mastným kyselinám (16,7:1), ktorý bol signifikante vyšší aj v porovnaní s pacientmi s tvrdým aterosklerotickým plátom (12,5:1), aj oproti kontrolnej skupine (10,5:1). Horšie štádium rozvoja aterosklerózy teda koreluje so zvýšeným pomerom ω -6: ω -3 mastným kyselinám. Výsledky štúdií (Chen et al., 2018; van Dijk et al., 2019; Puz et al., 2013) ukazujú, že existuje vzťah medzi aktivitou vybraných zápalových markerov v krvnom sére a nestabilitou aterosklerotických plátov. Naša štúdia priniesla podobné výsledky, kde koncentrácia CRP v krvnej plazme bola signifikatne vyššia u pacientov s mäkkým plátom (11,43 mg/l) v porovnaní s pacientmi s tvrdým plátom (3,62 mg/l) a zdravými jedincami (0,97 mg/l). Koncentrácie fibrinogénu boli signifikatne zvýšené u pacientov s mäkkým (4,53 g/l) aj tvrdým plátom (3,92 g/l) oproti zdravým jedincom z kontrolnej skupiny (2,79 g/l). Hoci interleukín 4 (IL-4) bol tradične považovaný za protizápalový cytokín, nedávne *in vitro* a *in vivo* štúdie poskytli dôkazy o tom, že IL-4 vykazuje prozápalové účinky na cievny endotel a môže hrať kľúčovú úlohu pri rozvoji aterosklerózy (Lee et al., 2010). Koncentrácie IL-4, ktoré sme stanovili, preukázali signifikante zvýšený IL-4 v krvnej plazme pacientov s mäkkým aterosklerotickým plátom (72 ng/l) v porovnaní s pacientmi s tvrdým aterosklerotickým plátom (35,6 ng/l) aj zdravými jedincami (31 ng/l). Tento trend bol rovnaký ako u koncentrácií CRP, čo opäť potvrdzuje spojenie markeru IL-4 so zápalom. U leptínu, ako u jediného z nami sledovaných parametrov závažnosti aterosklerózy, sme pozorovali horší výsledok u pacientov s tvrdým aterosklerotickým plátom (7,5 μ g/l), teda s menším zdravotným ohrozením ako u pacientov s mäkkým aterosklerotickým plátom (6,3 μ g/l), ale tento rozdiel nebol štatisticky významný. Medzi proaterogénne účinky leptínu patrí indukcia endotelovej dysfunkcie, spustenie zápalovej reakcie, oxidačný stres, zvýšenie agregácie krvných doštičiek, hypertrofia a proliferácia buniek hladkého svalstva ciev, čo z neho robí pleiotropnú molekulu (Gairolla et al., 2017). Na základe súčasných dôkazov hlavné vedecké spoločnosti zahrnuli meranie aktivity Lp-PLA2 do svojich usmernení medzi biomarkery, ktoré sú užitočné v stratifikácii rizika u dospelých asymptomatických pacientov so stredným a vysokým srdcovocievny rizikom. (Maiolino et al., 2017). Najvyššiu koncentráciu Lp-PLA v krvnej plazme sme pozorovali u pacientov s mäkkým aterosklerotickým plátom (292 μ g/l). Aj pacienti s tvrdým aterosklerotickým plátom mali štatisticky významne zvýšenú koncentráciu Lp-PLA2 (252 μ g/l) oproti kontrolnej skupine (220 μ g/l). Zároveň rozdiely medzi skupinami 1 a 2 boli signifikantné. Pomocou určenia Pearsonovho korelačného koeficientu bola pozorovaná silná pozitívna koncentrácií Lp-PLA2 s pomerom ω -6: ω -3 polynenasýteným mastným kyselinám. Naše výsledky súhlasia so zisteniami skorších štúdií, keď bol preukázaný inverzný vzťah medzi ω -3 polynenasýtenými mastnými kyselinami a zápalovými markermi a pozitívny vzťah medzi pomerom ω -6: ω -3 polynenasýteným mastným kyselinám a zápalovými markermi (Kalogeropoulos et al., 2010).

Sledovanie profilu mastných kyselín a zápalových markerov u pacientov so stenózou *arteria carotis interna* viedlo k poznatku, že tieto parametre sú hodnovernými ukazovateľmi vyššieho zdravotného rizika u pacientov s mäkkým aterosklerotickým plátom v porovnaní s pacientmi s tvrdým aterosklerotickým plátom. Jediný zo sledovaných markerov, ktorý nezodpovedal tomuto trendu, bol leptín. Skoršie štúdie ukázali, že zvýšený príjem ω -3 polynenasýtených mastných kyselín vo forme rybieho oleja rýchlo vedie k ich zvýšenému zabudovaniu do aterosklerotických plátov a k zvýšeniu stability týchto plátov, čím sa zmierňuje zdravotné riziko pacientov a predlžuje ich život (Thies et al., 2003). Vzhľadom na tieto výsledky je zvýšená konzumácia ω -3 polynenasýtených mastných kyselín vo forme výživových doplnkov

alebo priamo v strave vhodnou metódou na zníženie rizika vzniku cievnej mozgovej príhody alebo ďalších srdcovocievnych ochorení u pacientov s rôznymi štádiami aterosklerózy a tiež vhodnou prevenciou pred vznikom aterosklerózy u zdravej populácie.

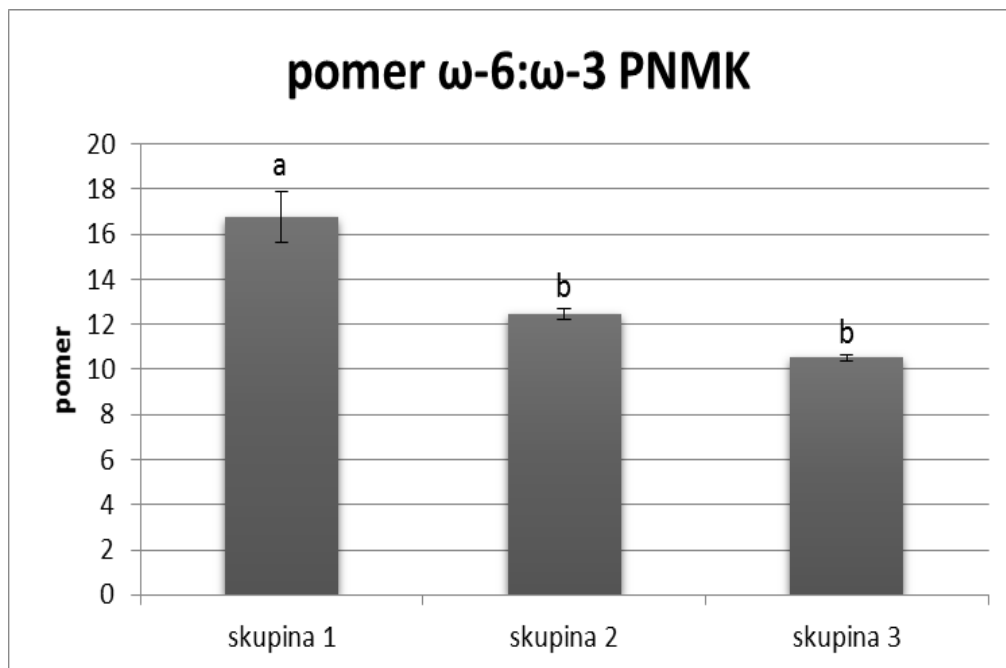


Fig. 1 ω -6: ω -3 PUFAs ratio

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer \pm SEM

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

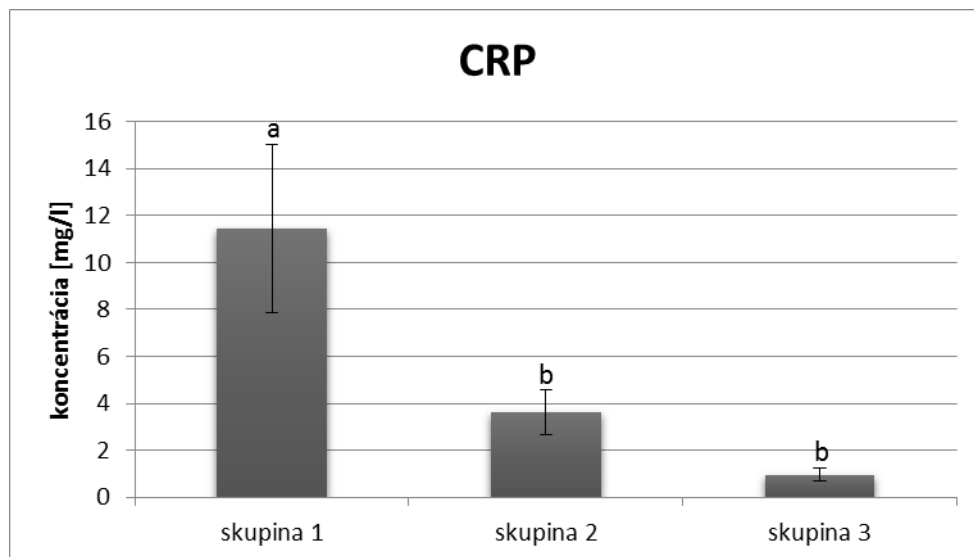


Fig. 2 CRP concentrations in blood plasma

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer \pm SEM

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

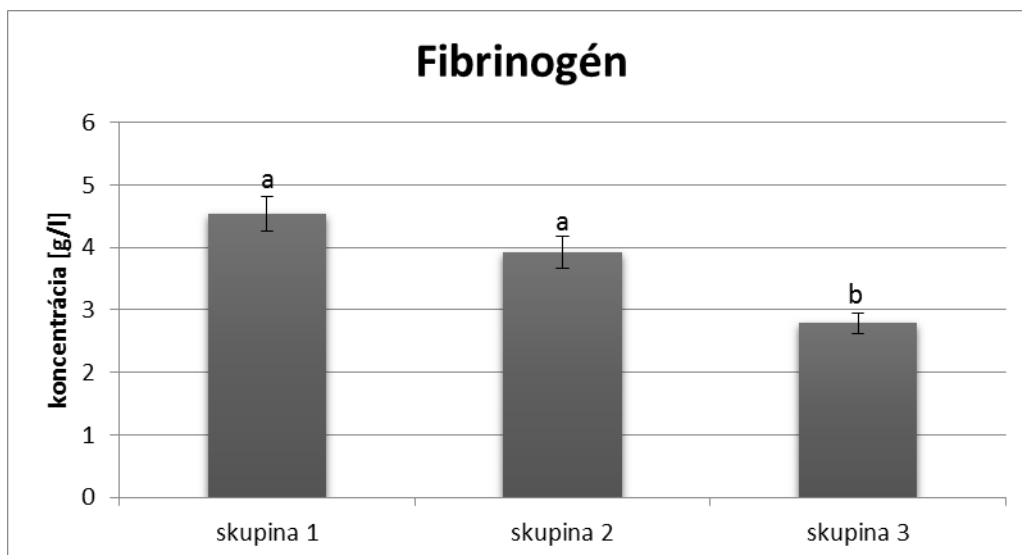


Fig. 3 Fibrinogen concentrations in blood plasma

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer \pm SEM

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

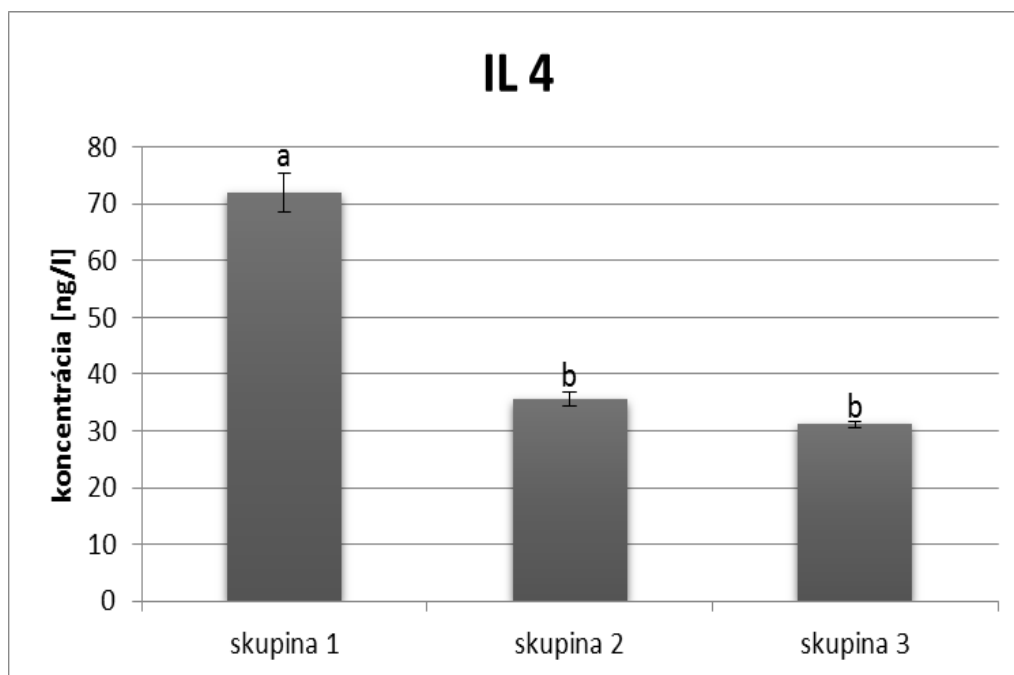


Fig. 4 IL-4 concentrations in blood plasma

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer \pm SEM

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

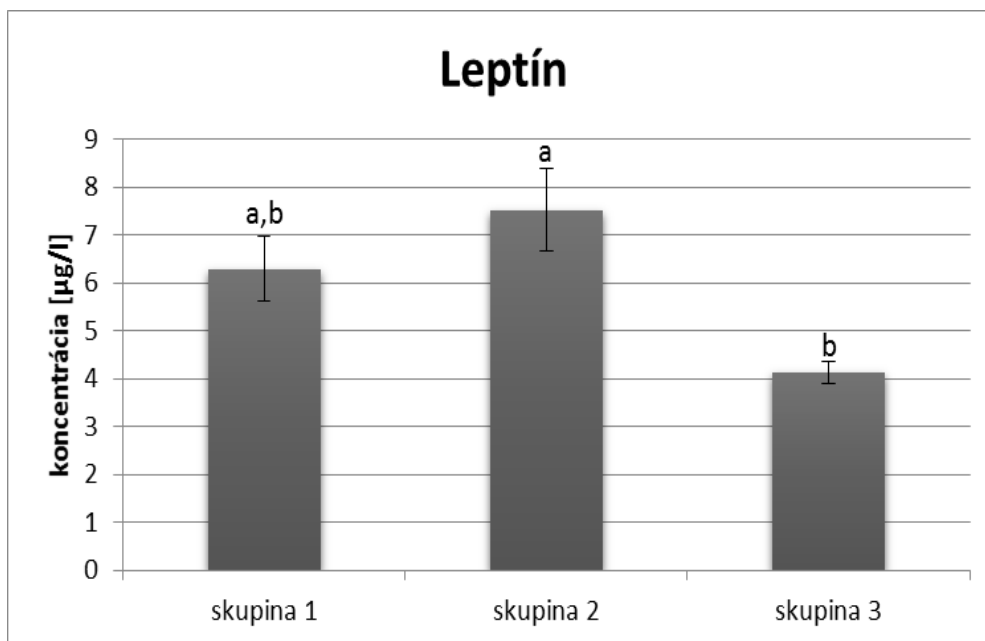


Fig. 5 Leptin concentrations in blood plasma

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer \pm SEM

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

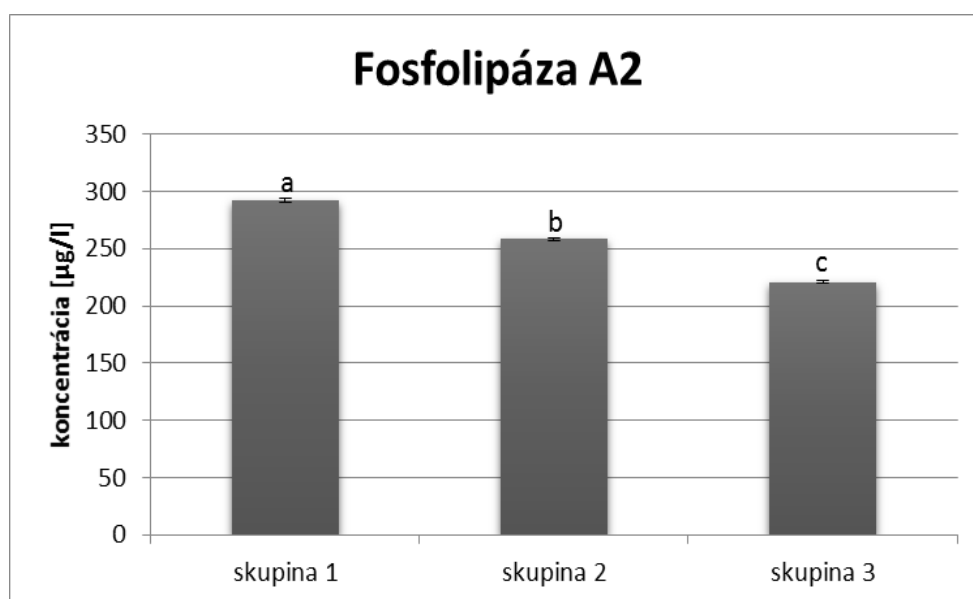


Fig. 6 Concentrations of Lp-PLA2 in blood plasma

Hodnoty reprezentujú aritmetický priemer \pm SEM

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

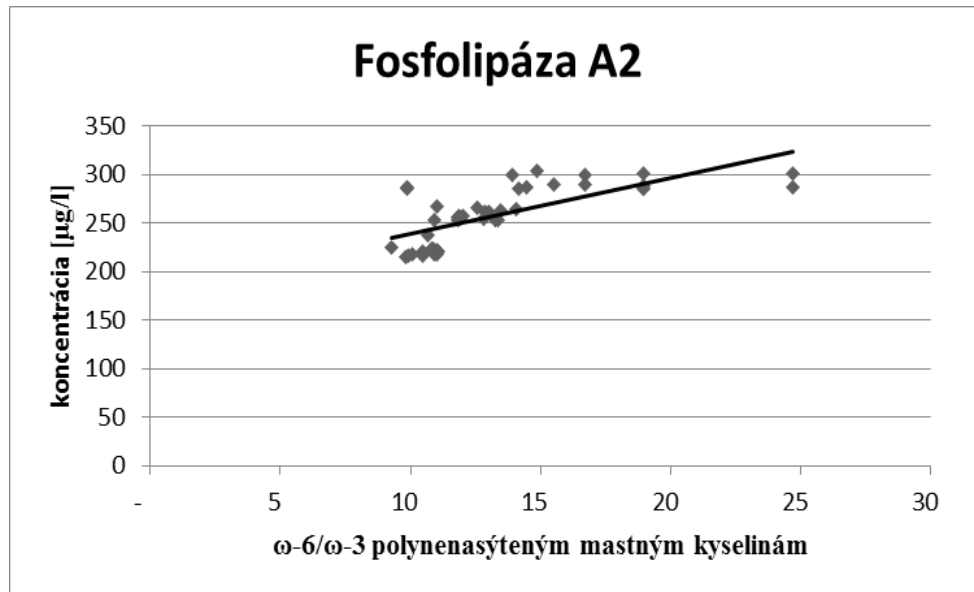


Fig. 7 Correlation of Lp-PLA2 concentration with ω -3 polyuns

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

Literatúra

Gairolla J., Kler R., Modi M., Khurana D. Leptin and adiponectin: pathophysiological role and possible therapeutic target of inflammation in ischemic stroke. *Rev Neurosci* 2017; 28: 1-12.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695.

Chen L., Yang Q., Ding R., et al. Carotid thickness and atherosclerotic plaque stability, serum inflammation, serum MMP-2 and MMP-9 were associated with acute cerebral infarction. *Exp Ther Med* 2018; 16: 5253-5257.

Kalogeropoulos N., Panagiotakos DB., Pitsavos C., et al. Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 584-591.

Kuročka M., Rusňák F., Beňo P., et al. Urgentné a emergentné operácie karotických artérií. *Vask med* 2016; 8: 17-20.

Lee YW., Kim PH., Lee WH., Hirani AA. Interleukin-4, Oxidative Stress, Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Biomol Ther (Seoul)* 2010; 18: 135-144.

Maiolino G., Bisogni V., Rossitto G., Rossi GP. Lipoprotein-associated phospholipase A2 prognostic role in atherosclerotic complications. *World J Cardiol* 2015; 7: 609-620.

Puz P., Lasek-Bal A., Ziaja D., et al. Inflammatory markers in patients with internal carotid artery stenosis. *Arch Med Sci* 2013; 9: 254-260.

Simopoulos AP. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: The Epidemiological Evidence. *Environ. Health Prev Med* 2002; 6: 203-209.

Thies F., Garry JM., Yaqoob P., et al. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361:477-485.

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.

van Dijck AC., Donkel SJ., Zadi T., et al. Association between fibrinogen and fibrinogen γ' and atherosclerotic plaque morphology and composition in symptomatic carotid artery stenosis: Plaque-At-RISK study. *Thromb Res* 2019; 177: 130-135.

Vestenická V. Cievne mozgové príhody. *Neurol praxi* 2002; 6: 294-298.

NAFLD JAKO MANIFESTACE METABOLICKÉHO SYNDROMU – SONOGRAFICKÁ DIAGNOSTIKA

NAFLD AS A MANIFESTATION OF METABOLIC SYNDROME – SONOGRAPHIC DIAGNOSTICS

V. Šmíd

*IV. interní klinika - klinika gastroenterologie a hepatologie
Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova Praha*

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a spectrum of potentially progressive liver disease that comprises of simple steatosis, non-alcoholic steatohepatitis, variable degree of fibrosis, and cirrhosis. NAFLD is closely associated with type 2 diabetes and abdominal obesity and is recognized as the hepatic manifestation of the metabolic syndrome. NAFLD has emerged a leading cause of chronic liver diseases worldwide, as its incidence in adult population (~ 30 %) parallels the epidemics of type 2 diabetes, obesity and is becoming one of the most frequent causes of cirrhosis and liver transplantation worldwide. Moreover, its prevalence is rising due to unhealthy dietary habits and sedentary lifestyle and NAFLD is associated with increased cardiovascular and cancer risk. The methods with good diagnostic accuracy for non-alcoholic fatty liver are a cornerstone in proper management of patients with NAFLD.

Abstrakt

Nealkoholové postižení jater při steatóze (NAFLD) je spektrum potenciálně progresivních onemocnění, které zahrnuje prostou steatózu, nealkoholovou steatohepatitidu (tzv. NASH), různý stupeň fibrózy a cirhózu. NAFLD představuje nejčastější chronické onemocnění jater současnosti s prevalencí v dospělé populaci kolem 30 %. Je považováno za jaterní manifestaci metabolického syndromu a nepochybně souvisí s epidemiemi diabetu mellitu 2. typu a obezity. Celosvětově se NAFLD stává jednou z nejčastějších příčin jaterní cirhózy a též stále častější indikací k jaterní transplantaci. Jeho incidence navíc roste v důsledku nezdravých stravovacích návyků a sedavého životního stylu. NAFLD je také spojeno se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních a onkologických onemocnění. Základním předpokladem správné péče o pacienty s NAFLD jsou kvalitní diagnostické nástroje, mezi které nezpochybnitelně patří také sonografie.

Se vzrůstající incidencí obezity a metabolického syndromu stoupá také incidence nealkoholového jaterního postižení při steatóze (non-alcoholic fatty liver disease – NAFLD), které představuje jaterní manifestaci metabolického syndromu (Marchesini et al., 2003). Jedná se o vůbec nejčastější chronické jaterní onemocnění současnosti postihující minimálně 25 % dospělé populace vyspělých zemí (Vernon et al., 2011). Většina pacientů má prostou steatózu. U nemalé části pacientů však nemoc progreduje rozvojem nealkoholové steatohepatitidy (non-alcoholic steatohepatitis – NASH), přičemž hrozí další progresse charakterizovaná vznikem jaterní fibrózy až do stádia jaterní cirhózy s jejími závažnými komplikacemi (portální hypertenze, hepatocelulární karcinom). V současné době neexistuje kauzální terapie tohoto onemocnění, což ruku v ruce s nízkou mírou informovanosti laické i odborné veřejnosti a nedostatečným screeningem rizikových skupin představuje významný zdravotně-ekonomický problém. Vyjma předcházení rizikovým faktorům vzniku metabolického syndromu tak adekvátní screening a stratifikace pacientů představují hlavní

výzvy v boji se vzrůstající incidencí tohoto onemocnění včetně jeho pokročilých stádií (Anstee et al., 2013).

Diagnostika prosté jaterní steatózy se opírá o ultrazvukové vyšetření, které je nejdostupnějším nástrojem a nezatěžuje pacienta radiací. Typickými nálezy jsou: zvýšená echogenita („zesvětlení“) jaterního parenchymu ve srovnání s kúrou přilehlé pravé ledviny, dorzální oslabení akustického signálu a také rozmazání okrajů větších cév (tzv. „vessel blurring“). Ačkoli je histologická definice jaterní steatózy spojena s více než 5% postižením hepatocytů, senzitivita a specificita ultrazvuku se pohybuje přes 90 % až při postižení více než 30 % hepatocytů steatózou (Hernaes et al., 2011). Proto byly vyvinuty další diagnostické nástroje k její detekci. Jedná se především o tzv. CAP (Controlled Attenuation Parameter) implementovaný do přístroje FibroScan®, kterým lze steatózu nejen diagnostikovat, ale také kvantifikovat (Myers et al., 2012). K diagnostice prosté steatózy by nemělo být využíváno CT mj. vzhledem k neadekvátní radiální zátěži. Magnetická rezonanční spektroskopie je v našich podmínkách prakticky nedostupná ačkoli představuje velmi přesný, ne-li nejpřesnější diagnostický nástroj.

Prosté ultrazvukové vyšetření jater není schopno odhalit pokročilé stádium onemocnění (NASH), a proto se jeho diagnostika nadále opírá o jaterní biopsii, která představuje zlatý standart (Bravo et al., 2001). Její roli však částečně přebírají některé sérové /neinvazivní/ diagnostické nástroje, které jsou v poslední době v širší míře implementovány do běžné praxe (Dvorak et al., 2014).

Přítomnost, a především pokročilost jaterní fibrózy představuje klíčový prognostický faktor a její tíže koreluje s rizikem vzniku jaterní cirhózy a následných komplikací. Včasná diagnostika a kvantifikace jaterní fibrózy má zásadní význam pro stratifikaci rizik, zvolení správného postupu léčby a je nejpodstatnější informací týkající se prognózy konkrétního pacienta s pokročilou formou NAFLD. Navíc rozpoznání jaterní cirhózy umožňuje zařadit pacienta do ultrazvukového screeningu hepatocelulárního karcinomu a screeningu jícnových varixů. V současné době se v diagnostice a kvantifikaci jaterní fibrózy stále častěji uplatňují ultrazvukové metody měření tuhosti jaterní tkáně, tzv. elastografie. Nejlépe validovanou metodou je transienční elastografie (FibroScan®), dále se v klinické praxi používají metody založené na ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) – point shear-wave elastografie (pSWE) a 2D-SWE. Dle současně dostupných dat jsou tyto metody srovnatelné a význam pro praxi umocňuje kromě neinvazivity také jejich jednoduchost a reproducibilita. Magnetická rezonanční elastografie (MRE) poskytuje pravděpodobně nejdetailejší obraz, avšak pro svoji cenu je v klinické praxi téměř nedostupná. Běžné zobrazovací metody jako ultrazvuk, CT a MR dokáží rozpoznat pokročilou jaterní fibrózu a cirhózu často až tehdy, pokud mají játra nerovný povrch nebo jsou již přítomny známky portální hypertenze (ascites, splenomegalie, portosystémové kolaterály, dilatace portální žíly ad.).

Pro správné klinické využití elastografie je však zapotřebí splnit 2 základní předpoklady: bezchybné provedení samotného měření a správnou interpretaci získaného výsledku v klinickém kontextu. Pro tyto účely byly vytvořeny doporučené postupy pro klinické využití elastografie (Dietrich et al., 2017), (www.efsumb.org). Mezi nejdůležitější předpoklady patří dostatečná erudice vyšetřujícího (teoretická i praktická), ačkoli k jejímu získání bývá považováno za dostatečné provedení již cca 100 – 200 měření pod odborným dohledem. Dále je kladen důraz na adekvátní přípravu pacienta (min. 2hodinové lačnění a 10minutový fyzický klid před vyšetřením, poloha pacienta) (Berzigotti et al., 2013). Průběh samotného měření vyžaduje spolupráci pacienta (zadržení dechu), neméně důležitým faktorem je také volba vyšetřované oblasti jater (vzdálenost od okraje jater) a počet jednotlivých měření (minimálně 10). Interpretace výsledků může být navíc ovlivněna celou řadou faktorů. Předně se jednotlivé metody liší at' již používanými jednotkami, tak referenčním rozmezím tíže fibrózy pro jednotlivé etiologie jaterního onemocnění. Stejně tak je kladen důraz na možné falešně

pozitivní výsledky v důsledku nejrůznějších především akutních stavů jaterního parenchymu (cholestáza, kongesce, akutní zánět, v případě TE ascites, u MRE může být limitací akumulace železa v játrech apod.).

Znalost významu a respektování všech pravidel správné klinické praxe provádění ultrazvukového (a také elastografického) vyšetření jater je nezbytným předpokladem umožňujícím poskytování maximálně kvalitní péče pacientům s chronickým jaterním onemocněním. Detailně seznámení by s těmito zásadami měli být všichni lékaři starající se o pacienty s jaterními chorobami stejně jako všichni lékaři pečující o pacienty s některou z komponent metabolického syndromu.

Literatura

Anstee QM., Targher G., Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 330-344.

Berzigotti A., De Gottardi A., Vukotic R., et al. Effect of meal ingestion on liver stiffness in patients with cirrhosis and portal hypertension. *PLoS One* 2013; 8: e58742.

Bravo AA., Sheth SG., Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344: 495-500.

Dietrich CF., Bamber J., Berzigotti A., et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version). *Ultraschall Med* 2017; 38: e16-e47.

Dvorak K., Stritesky J., Petrtyl J., et al. Use of non-invasive parameters of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in daily practice--an exploratory case-control study. *PLoS One* 2014; 9: e111551.

Hernaiz R., Lazo M., Bonekamp S., et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology* 2011; 54: 1082-1090.

Marchesini G., Bugianesi E., Forlani G., et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917-923.

Myers RP., Pollett A., Kirsch R., et al. Controlled Attenuation Parameter (CAP): a noninvasive method for the detection of hepatic steatosis based on transient elastography. *Liver Int* 2012; 32: 902-910.

Vernon G., Baranova A., Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274-285.

STEROLY A MASTNÉ KYSELINY VE VZORCÍCH OLEJNATÝCH SEMEN OŘECHŮ

STEROLS AND FATTY ACID IN NUTS, SEEDS AND KERNEL

M. Vecka^a, B. Staňková^a, S. Kutová^a, P. Tomášová^{a,b}, E. Tvrzická^a, A. Žák^a

^aIV. interní klinika I. LF UK a VFN v Praze, ^bMBÚ AV ČR Praha

Abstract

Oils present in nuts and seeds are important nutritional constituents with beneficial health claims. These oils contain mainly fatty acyls in lipid classes and phytosterols, therefore we analyzed profiles of these lipid classes in several nuts, seeds and kernel commonly available in the Czech Republic. Nuts and seeds contained predominantly oleic (18:1n-9) and linoleic (18:2n-6) acids, rich sources of α -linoleic acid (18:3n-3) were linseed, chestnut, walnuts and hempseed, the last being the best source of stearidonic acid (18:4n-3). The phytosterol analyses revealed majority of β -sitosterol and campesterol except for pumpkin and melon seeds, rich in $\Delta 7$ sterols. In summary, our study revealed the wide profile of fatty acids and phytosterols between different nuts and seeds. Further studies are needed to confirm the positive effect of each nut and seeds for health.

Úvod

Ořechy a olejnatá semena patří mezi nejvýznamnější zdroje nenasycených mastných kyselin (FA), jejichž zvýšený dietní příjem je v současné době spojován s příznivými účinky na hladinu cholesterolu, stav kardiovaskulárního systému, incidenci rakoviny, inzulínovou rezistenci, projevy metabolického syndromu nebo stav imunitního systému (Wang, 2018; Stuchlík, 2002; Chen, 2008; Kornsteiner-Krenn, 2013).

Obyčejně je v semenech a ořeších přítomno malé zastoupení satureovaných FA (4 - 16 % tuků), asi polovina obsahu tuků připadá na nenasycené FA (Ros, 2015) vázaných obvykle v molekulách triacylglycerolů, důležitých energetických substrátů a zdrojů uhlíku (Millar, 2000). Nenasycené FA mají jak pro-, tak i protizánětlivé účinky, hrají roli v regulaci genové exprese, enzymatických aktivit a glukoneogeneze.

Steroly jsou důležitou součástí živočišných i rostlinných membrán, v rostlinách jsou zastoupeny hlavně fytosteroly, které se od cholesterolu liší hlavně strukturou postranního řetězce (Moreau, 2002). Mezi hlavní fytosteroly patří β -sitosterol, kampesterol, a stigmasterol, jež tvoří až 98 % molekul fytosterolů (Moreau, 2018). Minoritní fytosteroly zahrnují různé C30 steroly-lanosterol, amyirin, lupeol, C29 steroly fukosteroly, avenasteroly, sitostanol, C28 steroly jako brassikasterol, crinosterol, a také C27 steroly-cholesterol, lathosterol a desmosterol (Bolling, 2011; Moreau, 2002; Stuchlík, 2002). Zastoupení fytosterolů je tkáňově specifické (Moreau, 2018), přičemž mohou být součástí esterů, volných alkoholů nebo glykosidů (Moreau, 2018). Fytosteroly v rostlinách plní funkce podobné jako cholesterol v živočišných membránách (Hartmann, 1998) - ovlivňují membránovou fluiditu, jsou prekurzory steroidních hormonů (Moreau, 2018), brassinolidů, které chrání rostliny před patogeny i oxidačním stresem (Zullo, 2002). Fytosteroly jsou nasycená analoga fytosterolů, obvykle přítomná ve větších množstvích v obilovinách (Gylling, 2015).

Na druhou stranu jsou hladiny některých sterolů (obzvláště cholesterolu) u člověka někdy spojovány s některými typy rakoviny (Raicht, 1980), ischemickou chorobou srdeční, metabolickým syndromem, stavem imunitního systému (Harper, 2005; Moreau, 2002). Fytosteroly v dietě příznivě ovlivňují střevní absorpci cholesterolu (Fumeron, 2017) a plazmatické hladiny fytosterolů (kampesterol a β -sitosterol) jsou navíc považovány

za nepřímé markery absorpce cholesterolu. Jako indikátory endogenní biosyntézy cholesterolu lze využít stanovení některých jeho prekurzorů, např. lathosterolu. Zajímavé je, že lathosterol je také přítomen v menších množstvích u některých rostlin (Benetti, 2013).

Steroly jsou analyzovány pomocí kapalinové chromatografie spojené s různými typy detekce, jako hmotnostní spektrometrie nebo UV/VIS (Kornsteiner-Krenn, 2013). Hmotnostní detekce izobarických molekul se někdy spoléhá na pomoc chromatografické separace před vstupem do detektoru, méně často na specifickou fragmentaci původní molekuly. Obsah FA v nutričních doplňcích je standardně analyzován pomocí plynové chromatografie spojené s plamenionizačním detektorem (Mo, 2013; Lagarda, 2007; Staňková, 2013). Mastné kyseliny současně se steroly v nutričních doplňcích zkoumalo jen málo autorů (Esche, 2013), proto jsme se rozhodli tyto lipidové třídy stanovit ve vzorcích vybraných olejnatých semen a ořechů dostupných v České republice.

Metody a příprava vzorků

Standardy sterolů včetně vnitřního standardu epikoprostanolu (IS) byly zakoupeny od firmy SigmaAldrich (USA) a směs methyl esterů FA (FAME) (GLC-566) dodala firma Nu-Chek (Elysian, U.S.A.). Měřili jsme celkem 11 druhů ořechů (burský oříšek, kešu, vlašský ořech, kokosový ořech, lískový ořech, makadamový ořech, pekanový ořech, piniová semínka, pistácie, jedlý kaštan a para ořech), 7 druhů semen (mandlové, konopné, lněné, dýňové/tykvové, sezamové, slunečnicové a meruňkové jádro). Vzorky byly extrahovány v tripletech metodou dle Folche (Folch, 1956): zváženy a homogenizovány ve směsi dichlormethan/methanol (2/1 v/v), suspence zfiltrována a po přidání vody byla spodní fáze alikvotována, odpařena a uchovávána pro další analýzy při -20 °C.

Analýzy sterolů a mastných kyselin

V rámci práce byla validována metoda pro stanovení sterolů pomocí LC-MSMS. Vzorky byly nejprve saponifikovány modifikovanou metodou podle Jonkera (Jonker, 1985) a získané steroly derivatizovány na karbamáty (Aycirieux et al., 2012). Mastné kyseliny ve vzorcích byly přímo převedeny na FAME (Tvrzická et al., 2002) a stanoveny pomocí plynové chromatografie. Data jsou uváděna jako průměr ± směrodatná odchylka (SD). Analýzy byly provedeny v prostředí MetaboAnalyst 4.0.

Výsledky a diskuze

V měřených vzorcích jsme přímo stanovili 14 různých sterolových lipidů (cholesterol, lathosterol, kampesterol, β -sitosterol, stigmasterol, lupeol, α -amyrin, erythrodiol, ursolová kyselina, desmosterol, brasikasterol, lanosterol, fukosterol, a cholestanol). Koncentrace lupeolu, erythrodiolu a kyseliny ursolové byly pod mezí stanovení; na druhou stranu byly v některých vzorcích detekovány neobvyklé steroly jako Δ^7 -stigmasterol, $\Delta^7,25$ -stigmastadienol, Δ^7 -stigmastenol, nebo Δ^7 -kampesterol. Získaná data byla pro větší přehlednost sloučena do skupin, protože způsob úpravy neovlivnil množství sterolů ani zastoupení FA (tabulky 1 a 2).

Většina studií uvádí při analýzách sterolů pouze obsah β -sitosterolu, kampesterolu a stigmasterolu (Bolling, 2011). Obsah sterolů se pohyboval od 6590 $\mu\text{g/g}$ oleje v sezamových semínkách nebo 5850 $\mu\text{g/g}$ oleje (pistácie) do 1570 $\mu\text{g/g}$ oleje v dýni/tykvi (350 $\mu\text{g/g}$ oleje pro kokos). Vysoký obsah sterolů byl potvrzen i jinými autory (Kornsteiner-Krenn, 2013), pro kokos byla publikována data o obsahu sterolů v rozmezí 300-333 $\mu\text{g/g}$ oleje (Appaiah, 2014).

Obsah majoritní složky sterolů, β -sitosterolu (Amaral, 2003; Savage, 1997; Kajiser, 2000; Rico, 2016; Kornsteiner-Krenn, 2013), se pohyboval mezi 55 mol% (ln) a 86 mol% (pistácie) (tabulka 1). Zvláštním případem byly vzorky tykve, melounů nebo dýně,

u kterých je β -sitosterol pouze minoritní složkou (přibližně 9 mol%). Vysoký obsah β -sitosterolu v převážné většině vzorků odráží jeho důležitou roli pro membránovou fluiditu, v případě semen a ořechů ještě jako důležité součásti buněčné diferenciaci a proliferaci (Piironen, 2000). Další důležité steroly, stigmasterol a kampesterol, byly nejvýše zastoupeny hlavně v sezamových semínkách a lněných semínkách. Nízký obsah kampesterolu byl zaznamenán v dýňových semínkách a para ořeších (Phillips, 2005).

Zvláštní skupinou sterolů jsou $\Delta 7$ steroly (s dvojnou vazbou na C7 místo C5, jako $\Delta 7$ -stigmastenol, $\Delta 7$ -avenasterol, spinasterol, $\Delta 7,22$ -stigmastadienol, a $\Delta 7,22,25$ -stigmastatrienol. Sterolové $\Delta 5/\Delta 7$ izomery reprezentují např. dvojice kampesterol/ $\Delta 7$ -kampesterol, β -sitosterol/ $\Delta 7$ -stigmastenol a avenasterol/fukosterol, které jsou přítomny v rostlinných matricích v různých poměrech. Typickými zdroji $\Delta 7$ sterolů jsou dýně, melouny a tykve, u kterých jsou tyto steroly zastoupeny ve značném nadbytku (5 až 10 více než u ostatních testovaných matic). Ve vzorcích burských ořechů a slunečnicových semen jsme našli poměrně vysoké zastoupení avenasterolů a fukosterolů (6 - 9 mol% sterolů).

V olejnatých semenech je více než 95% obsahu oleje zastoupeno neutrálními lipidy, obzvláště triacylglyceroly (TAG). Jako nejbohatší zdroj satureovaných FA se ukázal kokosový olej (93 mol%), ostatní vzorky obsahovaly hlavně mononenasyčené FA a vícenasyčené FA (PUFA). Významným zdrojem PUFA n-3 je lněné (51 mol%) nebo konopné (17 mol%) semeno, případně vlašský ořech (13 mol%) či jedlý kaštan (10 mol%). Více než 40 mol% jako PUFA n-6 obsahovaly oleje ze semen dýně/tykve, jedlý kaštan, konopná, slunečnicová semena, vlašský ořech i piniová semínka. Olej z makadamového ořechu obsahuje vysoký podíl mononenasyčených FA (Kajiser, 2000), obzvláště kyseliny palmitoolejové (16:1n-7) (Maguire, 2004), což může stát za hypolipidemickými a protizánětlivými účinky tohoto oleje. Zvýšené zastoupení PUFA n-3, hlavně kyseliny α -linolenové (ALA, 18:3n-3) a stearidonové (SDA, 18:4n-3) bylo pozorováno u lněných semínek (cca 50 mol% jako ALA) a dále jedlého kaštanu, vlašského ořechu a konopných semínek; dostupnost (a oblíbenost) vlašského ořechu ve střední Evropě jej činí důležitým zdrojem PUFA n-3 (Burdge, 2005). Jediným významným zdrojem SDA v analyzovaných matricích bylo konopné semeno (0.1 - 1.0 mol%).

Závěr

V této studii bylo analyzován obsah mastných kyselin a sterolů v celkem 19 typech olejnatých semen a ořechů s odlišným a někdy i jedinečným zastoupením těchto lipidových tříd. Vysoký obsah PUFA n-3 jsme našli ve vzorcích lněných a konopných semen, vlašského ořechu a jedlého kaštanu. Dýně a tykve se od ostatních vzorků lišily vysokým obsahem neobvyklých $\Delta 7$ fytosterolů, které bylo nutné oddělit od $\Delta 5$ izobarických sloučenin. Vysoký obsah mononenasyčených mastných kyselin, fytosterolů a PUFA n-3 může mít pozitivní vliv na hladiny cholesterolu a také může přispívat k udržování příznivého poměru PUFA n-3/n-6 v dietě. Při vysokém příjmu těchto doplňků by měla být respektována dietní doporučení pro snižování hladin cholesterolu.

Tabulka 1 Obsah sterolů ve vzorcích

vzorek	sitostanoly	β -sitosterol	stigmasterol	fukosteroly*	avenasteroly*	kampesterol	jiné steroly	obsah sterolů (mg/g oleje)
burský ořech	2.7±0.8	70.3±3.5	5.4±0.8	1.4±1.1	8.1±1.6	7.6±2.0		2.25±0.58
dýně/ tykev/ meloun	3.0±1.9	8.9±2.5	5.6±2.5	11.1±12.9	9.2±10.3	0.9±0.5	16.1±18.6 ¹ , 28.6±3.7 ² , 5.8±8.3 ³	1.57±0.07
kešu	3.1±0.7	83.7±2.9	3.7±0.9	0.3±0.6	<0.2	3.0±1.3		2.34±0.38
kokos		62.9±0.8	11.6±0.9		<0.2	5.1±1.7		0.31±0.07
jedlý kaštan		69.4±0.1	16.0±0.0		0.5±0.7	5.9±0.3		4.54±0.86
konopí	3.4±0.7	79.4±0.1	3.4±0.9	0.3±0.4	2.0±0.3	7.4±0.6		2.82±0.26
len	2.3±0.9	55.0±8.1	6.8±1.5	1.0±1.8	4.5±2.2	11.2±3.4		3.59±0.61
líška	4.8±1.2	85.0±0.7	1.8±0.4	<0.2	0.6±0.1	2.5±0.4		2.30±0.49
makadam	2.5±0.7	82.2±5.1	5.4±2.9	1.2±1.1	<0.2	2.6±0.8		2.46±0.38
mandle	3.9±0.4	82.8±2.0	5.8±1.0	2.5±0.6	0.6±0.8	1.5±0.4		3.77±0.52
meruňka		91.5±0.2	0.2±0.1	<0.2		2.7±0.0		4.62±0.35
para ořech	6.3±0.3	77.9±3.1	1.4±0.3		3.9±0.1	0.8±0.2	amyryny 4.9±3.7	1.80±0.61
pekan	2.9±0.5	80.3±1.8	7.2±0.8	1.0±1.7	0.9±0.3	2.1±0.4		1.94±0.21
pinie	3.1±1.5	74.1±6.7	7.5±2.0	1.5±2.6	0.7±0.2	5.1±2.3		4.38±1.04
pistácie	3.4±0.4	85.8±4.6	4.0±1.1	0.7±1.3	0.5±0.8	1.8±0.5		5.86±2.22
sezam	2.4±0.1	72.8±2.4	8.0±1.6	0.9±1.5	4.3±0.7	8.3±0.8		6.59±1.83
slunečnice	2.6±0.3	72.5±6.9	3.1±1.0	<0.2	6.2±1.1	4.2±1.0	3.3±4.6 ²	3.70±0.89
vlašský ořech	3.1±1.3	81.0±1.7	4.4±1.6	0.9±0.9	<0.2	2.1±0.9		2.02±0.17

Data jsou ve formátu průměr mol% ± SD. Jsou uvedeny pouze relevantní steroly. * - tyto steroly obsahují $\Delta 5$, $\Delta 7$ a $\Delta 8$ izomery vzniklé kyselou hydrolyzou; 1 - spinasterol ($\Delta 7$ -stigmasterol); 2 - $\Delta 7,25$ -stigmastadienol; 3 - $\Delta 7$ -stigmastenol <0.2 – zanedbatelný obsah (průměrně 0.05-0.20 mol%)

Tabulka 2 Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích

	burský ořech	dýně/ meloun tykev	kešu	kokos	kaštan jedlý	konopí	len	líška	makadam	mandle	meruňka	para ořech	pekan	pinie	pistácie	sezam	slunečnice	vlašský ořech
8:0				8.3±0.1														
10:0				6.1±0.2														
12:0				42.5±1.4							<0.2							
14:0		<0.2		14.0±0.6	1.4±0.1		<0.2		0.7±0.3	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2		<0.2	
16:0	11.4±3.8	13.2±1.7	10.6±2.5	16.0±0.4	15.7±0.3	6.1±0.5	6.1±1.6	6.4±0.4	9.0±0.9	7.2±0.3	4.1±0.1	16.1±2.1	7.3±1.0	6.8±1.0	11.2±2.4	10.1±1.6	6.6±1.6	8.2±1.4
16:1n-7	<0.2	<0.2	0.4±0.1	2.9±0.1	0.4±0.0	<0.2	<0.2	0.4±0.5	17.2±4.9	0.5±0.0	0.6±0.1	0.4±0.2	<0.2	<0.2	1.5±0.7	<0.2	<0.2	<0.2
18:0	3.9±1.2	7.1±1.4	8.6±1.6	2.3±0.1	2.2±0.0	3.8±0.4	4.2±0.9	2.6±0.8	3.4±0.9	1.9±0.5	0.8±0.1	9.7±1.3	3.0±0.2	3.3±0.7	1.3±0.2	6.3±0.5	4.0±0.7	2.6±0.5
18:1trans	0.7±0.3	0.5±0.1	0.7±0.2	0.4±0.2	0.4±0.1	<0.2	0.4±0.1	0.8±0.3	0.6±0.1	0.8±0.3	<0.2	0.5±0.1	0.7±0.2	0.6±0.1	0.7±0.3	0.6±0.1	0.4±0.3	0.3±0.1
18:1n-9	58.7±12.8	35.3±8.9	61.7±6.6	3.1±0.3	17.5±0.0	16.0±6.2	19.8±5.2	77.1±8.1	57.7±5.6	73.0±2.6	67.0±0.2	38.4±7.5	60.5±7.3	32.8±5.5	55.0±5.7	43.7±4.6	29.2±17.7	17.8±3.2
18:1n-7	0.6±0.0	0.8±0.1	0.4±0.1	<0.2	1.7±0.1	0.8±0.1	0.8±0.2	1.2±0.2	3.5±1.3	1.4±0.2		1.1±0.3	1.2±0.1	0.7±0.1	2.3±0.0	1.1±0.1	0.7±0.1	1.0±0.3
18:2n-6	18.0±8.6	41.9±9.3	16.2±4.2	0.3±0.1	49.0±0.2	54.5±4.1	16.6±1.2	10.7±8.6	2.5±1.5	14.7±2.4	26.8±0.1	32.4±3.9	25.7±7.8	45.2±2.2	26.5±8.3	36.6±6.0	57.1±17.4	56.8±1.7
18:3n-6							<0.2		<0.2					4.9±8.5				
20:0	1.5±0.4	0.5±0.1	0.6±0.1	<0.2	0.3±0.0	0.8±0.1	<0.2	<0.2	2.3±0.8	<0.2		0.3±0.1	<0.2	0.4±0.1	<0.2	0.6±0.1	0.3±0.1	<0.2
18:3n-3	<0.2	<0.2	<0.2		9.7±0.1	16.3±4.0	51.2±7.4	<0.2	<0.2		<0.2	0.7±0.5	0.9±0.3	2.9±2.9	0.3±0.1	0.4±0.2	0.4±0.6	12.8±2.8
18:4n-3						0.5±0.5												
20:1n-9	1.0±0.4	<0.2	<0.2		0.7±0.0	0.4±0.1	<0.2	<0.2	1.8±0.4	<0.2	<0.2	<0.2	0.3±0.1	1.2±0.3	0.5±0.1	<0.2	<0.2	<0.2
20:2n-6		<0.2	<0.2		<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2			<0.2	<0.2	0.7±0.1	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
22:0	2.5±0.6	<0.2	<0.2		0.6±0.1	0.3±0.1	<0.2		0.6±0.2	<0.2		<0.2		<0.2	<0.2	<0.2	0.7±0.1	<0.2
24:0	1.3±0.3	<0.2	<0.2		<0.2	<0.2	<0.2		<0.2							<0.2	<0.2	
∑SFA	20.6±5.7	21.1±2.6	20.1±3.5	93.1±0.4	20.3±0.1	11.1±0.7	10.8±2.4	9.2±1.2	16.2±1.8	9.4±0.5	5.2±0.1	26.3±3.3	10.6±1.2	10.8±1.8	12.9±2.6	17.3±2.0	11.8±2.5	11.0±1.1
∑MUFA	60.6±13.2	36.3±8.8	62.7±6.6	6.6±0.3	20.5±0.1	17.3±6.2	20.9±5.4	79.0±7.7	80.4±0.7	75.0±2.5	67.9±0.1	40.1±7.0	62.1±7.4	34.9±5.5	59.4±6.2	45.1±4.8	30.2±17.7	19.2±3.4
∑PUFA n-6	18.0±8.6	42.0±9.3	16.3±4.2	0.3±0.1	49.1±0.3	54.6±4.2	16.8±1.1	10.8±8.7	2.7±1.8	14.8±2.4	26.8±0.1	32.4±3.9	25.8±7.8	50.8±10.0	26.6±8.4	36.7±6.1	57.2±17.3	56.9±1.7
∑PUFA n-3	<0.2	<0.2	<0.2		9.7±0.1	16.7±4.4	51.2±7.3	<0.2	<0.2		<0.2	0.7±0.5	0.9±0.3	2.9±2.9	0.3±0.1	0.4±0.2	0.4±0.6	12.8±2.8
TFA	0.7±0.3	0.5±0.1	0.7±0.2	0.4±0.2	0.4±0.1	<0.2	0.4±0.1	0.8±0.3	0.6±0.1	0.8±0.3	<0.2	0.5±0.1	0.7±0.2	0.6±0.1	0.7±0.3	0.6±0.1	0.4±0.3	0.3±0.1

Data jsou ve formátu průměr mol% ± SD. Zkrácená notace pro mastné kyseliny počet atomů uhlíku: počet dvojných vazeb, n – pozice uhlíkového atomu nesoucího první dvojnou vazbu od methylového konce; ∑ – suma, SFA – satureované mastné kyseliny, MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny, PUFA n-6 – polynenasycené mastné kyseliny třídy n-6, PUFA n-3 polynenasycené mastné kyseliny třídy, TFA – trans izomery nenasycených mastných kyselin. <0.2 – zanedbatelný obsah (průměrně 0.05-0.20 mol%)

Tato práce byla podpořena projekty RVO-VFN64165, PROGRES-Q25/LF1/2, SVV 260370-2019 a Národním Programem Udržitelnosti (NPU I Lo1509)

Literatura

- Abidi SL.** Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J Chromatogr A* 2001; 935: 173-201.
- Amaral JS., Casal S., Pereira JA., et al.** Determination of Sterol and Fatty Acid Compositions, Oxidative Stability, and Nutritional Value of Six Walnut (*Juglans regia L.*) Cultivars Grown in Portugal. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 7698-7702.
- Appaiah P., Sunil L., Prasanth Kumat PK., et al.** Composition of Coconut Testa, Coconut Kernel and its Oil. *JAACS* 2014; 91: 917-924.
- Ayciriex S., Regazzetti A., Gaudin M., et al.** Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: application to a neuroinflammation rat model. *Anal Bioanal Chem* 2012; 404: 3049-3059.
- Benetti A., Del Puppo M., Crosignani A., et al.** Cholesterol metabolism after bariatric surgery in grade 3 obesity: differences between malabsorptive and restrictive procedures. *Diabetes Care* 2013; 36: 1443-1447.
- Bolling BW., Chen C-Y., McKay DL., Blumberg JB.** Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutr Res Rev* 2011; 24: 244-275.
- Bullo M., Juanola-Falgarona M., Henández-Alonso P., Salas-Salvadó J.** Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. *Br J Nutr* 2015; 113(Suppl): S79-S93.
- Burdge GC., Calder PC.** Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acid in human adults. *Reprod Nutr Dev* 2005; 45: 581-597.
- Chen C-YO., Blumberg JB.** Phytochemical composition of nuts. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008; 17(Suppl 1): 329-332.
- Delgado-Zamarreño MM., Fernández-Prieto C., Bustamante-Rangel M, Pérez-Martín L.** Determination of tocopherols and sitosterols in seeds and nuts by QuEChERS-liquid chromatography. *Food Chem* 2016; 192: 825-830.
- Esche R., Muller L., Engel KH.** Online LC-GC-Based Analysis of Minor Lipids in Various Tree Nuts and Peanuts, *J Agric Food Chem* 2013; 61: 11636-11644.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley GH.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
- Gylling H., Simonen P.** Phytosterols, Phytostanols, and Lipoprotein Metabolism. *Nutrients* 2015; 7: 7965-7977.
- Harper CR., Jacobson TA.** Usefulness of omega-3 fatty acids and the prevention of coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2005; 96: 1521-1529.
- Hartmann M.** Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci* 1998; 3: 170-175.
- Jonker D., van der Hoek GD., Glatz JFC., et al.** Combined determination of free, esterified, and glycosylated plant sterols in foods. *Nutr Rep Int* 1985; 32: 943-951.
- Kajiser A., Dutta A., Savage G.** Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand. *Food Chem* 2000; 71: 67-70.
- Kornsteiner-Krenn M., Wagner K-H., Elmadfa I.** Phytosterol Content and Fatty Acid Pattern of Ten Different Nut Types. *Int J Vitam Nutr Res* 2013; 83: 263-270.
- Lagarda MJ., García-Llatas G., Farré R.** Analysis of phytosterols in foods. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41: 1486-1496.

- Maguire LS., O'Sullivan SM., Galvin K., et al.** Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr* 2004; 55: 171-178.
- Millar AA., Smith MA., Kunst L.** All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. *Trends Plant Sci* 2000; 5: 95-101.
- Mo S., Dong L., Hurst WJ., van Breemen RB.** Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Lipids* 2013; 48: 949-956.
- Moreau RA., Whitaker BD., Hicks KB.** Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progr Lipid Res* 2002; 41: 457-500.
- Moreau RA., Nyström L., Whitaker BD., et al.** Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health promoting uses. *Prog Lipid Res* 2018; 70: 35-61.
- Phillips KM., Ruggio DM., Ashraf-Khorassani M.** Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J Agr Food Chem* 2005; 53: 9436–9445.
- Piironen V., Lindsay DG., Miettinen TA., et al.** Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agricult* 2000; 80: 939-966.
- Racette SB., Lin X., Ma L., Ostlund RE. Jr.** Natural dietary phytosterols. *J AOAC Int* 2015; 98: 679-684.
- Raicht RF., Cohen BI., Fazzini EP., et al.** Protective Effect of Plant Sterols against Chemically Induced Colon Tumors in Rats. *Cancer Res* 1980; 40: 403-405.
- Rico R., Bullo M., Salas-Salvado J.** Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale L.*) kernels from different origin. *Food Sci Nutr* 2016; 4: 329-338.
- Ros E.** Nuts and CVD. *Brit J Nutr* 2015; 113(Suppl.): S111-S120.
- Savage GP., McNeil DL., Dutta PC.** Lipid composition and oxidative stability of oils in hazelnuts (*Corylus avellana L.*) grown in New Zealand. *JAOCS* 1997; 74: 755-759.
- Staňková B., Kremmyda L-S., Tvrzická E., Žák A.** Fatty acid composition of commercially available nutrition supplements. *Czech J Food Sci* 2013; 31: 241-248.
- Stuchlík M., Žák S.** Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2002; 146: 3-10.
- 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.
- Zullo MAT., Adam G.** Brassinosteroid phytohormones – structure, bioactivity and applications. *Braz J Plant Physiol* 2002; 14: 143-181.

ELONGÁZY A DESATURÁZY MASTNÝCH KYSELIN U PREDIABETU**ELONGASES AND DESATURASES OF FATTY ACIDS IN PREDIABETES****M. Zeman, J. Macášek, M. Vecka, B. Staňková, E. Tvrzická, A. Žák***IV. interní klinika, 1. LF UK a VFN, Praha***Abstract**

The prevalence of the prediabetes is increasing worldwide and it is expected that > 470 million people will suffer from prediabetes in 2030. In Czech republic it is estimated that about 5 % of the population has prediabetes. The prediabetic state is known to be associated with an increased risk of both cardiovascular diseases and some cancers. In all these conditions the dysregulation of fatty acids has been recognized. In this study we investigated fatty acid (FA) composition in plasma phosphatidylcholine in a group of 38 (20M/18F) persons (mean age 62 yrs, BMI 31 kg/m²) with prediabetes and in a control group (30M/39F) of healthy probands of the same age and BMI. The prediabetes group was characterized by a significantly higher concentrations of stearic (P < 0.001), palmitoleic (P < 0.05), gammalinolenic, eicosadienic (both P < 0.01) and total saturated FA (P < 0.001, as well. On the contrary, significantly lower concentrations (P < 0.001) of cis-vaccenic, linoleic (P < 0.001), adrenic (P < 0.05), docosapentaenic (P < 0.05), docosahexaenoic (P < 0.01) acids, and total PUFA n-6 (P < 0.001) were found in prediabetes group. Moreover, the estimated activities of delta-9-desaturase (D9D16) (P < 0.05), D6D (P < 0.001), and elongase 6 (ELOVL6) (P < 0.001) were significantly higher in prediabetes group, while estimated activities of ELOVL2/5 significantly lower (P < 0.001). These changes could be associated with a risk of glucose homeostasis disturbance.

Úvod

Jako prediabetes je označován stav, který předchází manifestaci diabetes mellitus. Patří sem hraniční lačná glykémie (IFG), (nález glykémie v žilní plasmě v rozmezí 5,6 - 6,9 mmol/l) a porušená tolerance glukózy (IGT), která je definována glykemií ve 120. minutě glukózového tolerančního testu v rozmezí 7,8 - 11,0 mmol/l. Prevalence prediabetu celosvětově stoupá a očekává se, že v r 2030 bude na světě 470 milionů lidí s prediabetem (Tabák et al., 2012). V České republice se odhaduje, že asi 5 % osob trpí prediabetem (Musil, 2014). Udává se, že u 3 – 10 % osob s prediabetem se každým rokem vyvine diabetes mellitus typu 2 (Twiggg et al, 2007). Přítomnost prediabetu je spojena také se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních a některých nádorových onemocnění (Huang et al., 2014a, Huang et al., 2014b). Kardiovaskulární i nádorová onemocnění jsou provázena dysregulací mastných kyselin (Warensjö et al., 2008; Macášek et al., 2012) podobně jako metabolický syndrom (Žák et al., 2007) a diabetes mellitus typu 2 (Kröger a Schulze, 2012). U těchto stavů je prokazována přítomnost inzulínové rezistence, spojené se zvýšenou lipogenezí *de novo* a odchylným profilem vícenasycených mastných kyselin (PUFA). Spektrum mastných kyselin (MK) v různých tělesných oddílech (plasma, játra, tuková tkáň a další) je dáno příjmem ve stravě, endogenní syntézou a následnými metabolickými pochody (beta-oxidace, desaturace a elongace). Postupně vznikají MK s delším řetězcem a více dvojnými vazbami (LC-PUFA s více než 18 uhlíky a VLC-PUFA s více než 22 uhlíky. Desaturaci MK katalyzují enzymy desaturázy. Klíčovým regulátorem oxidace lipidů a lipogeneze *de novo* je stearyl-CoA desaturáza (delta-9-desaturáza, D9D), která katalyzuje tvorbu mononenasycených MK, specificky kyseliny olejové a palmitolejové ze stearyl-CoA a palmitoyl-CoA (Sampath a Ntambi, 2006). Dále působí delta-5 desaturáza (D5D) a D6D, které katalyzují postupnou

přeměnu MK na vícenenasycené (PUFA). Tyto desaturázy zavádějí dvojnou vazbu mezi již existující dvojnou vazbu a karboxylový konec PUFA (Meesapyodsuk a Qiu, 2012). Prodlužování řetězce mastných kyselin s více než dvanácti uhlíky je realizováno postupnou adicí dvouuhlíkatých jednotek působením enzymů elongáz, kódovaných skupinou genů na chromozomu 6 (Guillou et al., 2010). Je známo sedm elongáz (ELOVL), které s různou substrátovou specificitou prodlužují řetězec MK ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6 a ELOVL7 preferují nasycené a monoenoové MK jako substráty, zatímco ELOVL2 a ELOVL5 jsou specifické pro PUFA (Guillou et al., 2010). Cílem této práce bylo zjistit profil MK v plasmatickém fosfatidylcholinu a odhadované aktivity desaturáz a elongáz MK u osob s hraniční glykemií nalačno.

Materiál a metody

Vyšetřili jsme 38 osob (20 mužů/ 18 žen) s prediabetem (glykémie nalačno 5,6 - 6,9 mmol/l), kteří měli navíc přítomnu maximálně jednu komponentu metabolického syndromu, průměrného věku $61,9 \pm 4,6$ let a BMI $30,9 \pm 4,6$ kg/m². Kontrolní skupina zahrnovala 69 osob (30 mužů/39 žen) stejného věku. Základní klinické a antropometrické údaje jsou uvedeny v tabulce 1. Rutinní biochemické parametry byly analyzovány konvenčními metodami na automatickém analyzátoru. Koncentrace celkového plasmatického cholesterolu a triglyceridů v plasmě byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickými metodami (Boehringer, Mannheim, Germany). HDL-C byl stanoven v supernatantu po precipitaci lipoproteinů B s použitím kitů stejného výrobce. Koncentrace apolipoproteinu B byly vyšetřeny imunoturbidimetricky, inzulin užitím RIA (Insulin IRMA, Imunotech Prague, Czech Republic), glykovaný hemoglobin (HbA1c) metodou HPLC. Koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickou metodou (NEFA, Randox Laboratories, UK). Složení mastných kyselin v plasmatickém fosfatidylcholinu bylo vyšetřeno plynovou chromatografií (Tvrzická et al., 2002). Odhadované aktivity desaturáz a elongáz mastných kyselin byly vypočteny jako poměr produkt / substrát (Warensjö et al., 2009). Hodnoty indexu inzulinové rezistence (HOMA-IR) byly vypočteny (Matthews et al., 1985).

Statistika. Kontinuální proměnné byly vyjádřeny jako průměr \pm SD nebo median (interkvartilové rozpětí) podle rozložení proměnné. Kategorické proměnné byly vyjádřeny jako počet případů. Normální rozložení kontinuálních proměnných bylo ověřováno Shapiro-Wilk testem. Srovnání kategorických proměnných bylo provedeno Pearsonovým χ^2 testem. Rozdíly kontinuálních proměnných mezi skupinami byly hodnoceny Studentovým t-testem, v případě nenormálního rozdělení Wilcoxonovým testem. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $P < 0,05$. Zjištěné hodnoty P byly adjustovány za použití Benjamini-Hochbergovy korekce pro vícečetné srovnávání. Statistické hodnocení dat bylo provedeno za užití R softwaru, verze 3.2.1.

Výsledky

Studované skupiny se významně nelišily průměrným věkem ani poměrem muži/ženy. Osoby s prediabetem měly významně vyšší BMI, obvod pasu, systolický a diastolický krevní tlak i procento tuku (P vždy $< 0,001$) – viz tabulka 1. V tabulce 2 jsou uvedeny základní metabolické parametry vyšetřených souborů. Osoby s prediabetem měly statisticky významně vyšší koncentrace plasmatických triglyceridů, lačné glukosy a inzulinu, kyseliny močové (P vždy $< 0,001$) a neesterifikovaných mastných kyselin ($P < 0,05$). Měly též významně vyšší hodnoty indexu HOMA-IR ($P < 0,001$) a nižší koncentrace HDL-C ($P < 0,01$). Skupiny se významně nelišily v koncentracích celkového a LDL-cholesterolu plasmy.

V tabulce 3 je uvedeno zastoupení mastných kyselin ($x \pm SD$, mol%) v plasmatickém fosfatidylcholinu (PC) u vyšetřených skupin. Skupina osob s prediabetem měla

v plasmatickém PC významně vyšší zastoupení kyseliny stearové ($14,67 \pm 1,6$ vs. $13,36 \pm 1,02$; $P < 0,001$), palmitolejové ($0,60 \pm 0,24$ vs. $0,50 \pm 0,15$; $P < 0,05$), gammalinolenové ($0,10 \pm 0,05$ vs. $0,08 \pm 0,03$; $P < 0,01$), eikosadienové ($0,44 \pm 0,16$ vs. $0,36 \pm 0,10$; $P < 0,01$), a celkových nasycených mastných kyselin ($45,57 \pm 3,32$ vs. $43,45 \pm 1,98$; $P < 0,001$). Osoby s prediabetem měly naopak v PC významně nižší zastoupení kyseliny cis-vakcénové ($1,44 \pm 0,22$ vs. $1,55 \pm 0,22$; $P < 0,001$), linolové ($21,72 \pm 2,73$ vs. $24,28 \pm 2,22$; $P < 0,001$), adrenové ($0,22 \pm 0,10$ vs. $0,31 \pm 0,08$; $P < 0,05$), dokosapentaenové, 22:5 n-6 ($0,15 \pm 0,07$ vs. $0,20 \pm 0,06$; $P < 0,05$), dokosaheptaenové ($2,64 \pm 1,40$ vs. $3,31 \pm 1,16$; $P < 0,01$) a celkových n-6 PUFA ($37,95 \pm 3,07$ vs. $38,79 \pm 2,52$; $P < 0,001$).

Hodnoty odhadovaných aktivit desaturáz a elongáz mastných kyselin jsou uvedeny v tabulce 4. Skupina osob s prediabetem měla významně vyšší hodnotu D9D16 (o 11 %; $P < 0,05$), vyšší hodnotu D6D (o 66 %; $P < 0,001$), hodnotu kombinovaného ukazatele aktivity D6D + ELOVL5 (o 17 %; $P < 0,01$). Dále byly osoby s prediabetem charakterizovány statisticky významně nižší hodnotou indexu ELOVL2/5, vyjádřenou poměrem 22:5n-3/20:5n-3 (o 39 %; $P < 0,001$), poměrem 22:4n-6/20:4 n-6 (o 28 %; $P < 0,001$). Významně nižší byla i hodnota indexu 22:6 n-3/20:5 n-3 (o 36 %; $P < 0,001$). Statisticky významně nižší byl ve skupině s prediabetem také index ELOVL5, vyjádřený poměrem 18:1 n-7/16:1 n-7 (o 29 %; $P < 0,001$) a ELOVL3 (20:0/18:0) (o 25 %; $P < 0,001$). Osoby s prediabetem měly statisticky významně vyšší index aktivity ELOVL6, vyjádřený poměrem 18:0/16:0 (o 8 %; $P < 0,001$).

Závěry

V této práci byly u osob s prediabetem prokázány významné změny v profilu MK plasmatického fosfatidylcholinu ve srovnání se skupinou zdravých kontrolních osob. Skupina osob s prediabetem měla v plasmatickém PC významně vyšší zastoupení celkových nasycených mastných kyselin, zejména kyseliny stearové, dále vyšší podíl kyseliny palmitolejové, gammalinolenové a eikosadienové. Naopak významně nižší podíl kyseliny cis-vakcénové, linolové, adrenové, dokosapentaenové, dokosaheptaenové a celkových n-6 PUFA. Na těchto změnách se může podílet zvýšená lipogeneze *de novo* a současná dysregulace desaturáz a elongáz mastných kyselin. U osob s prediabetem jsme našli významně vyšší odhadovanou aktivitu delta-6-desaturázy, elongázy ELOVL6 a nižší aktivitu elongáz ELOVL2/5. Je možné, že tyto změny mohou souviset s rizikem rozvoje poruchy glukózové homeostázy, a že indexy ELOVL6 a ELOVL2/5 by mohly sloužit jako biomarkery tohoto rizika.

Tabulka 1 Klinická charakteristika vyšetřených osob

	Kontrolní skupina (n = 69)	Prediabetes (n = 38)
Pohlaví (M/F)	30/39	20/18 ^b
Věk (roky)	60,9 ± 8,2 ^a	61,9 ± 4,6
BMI (kg.m ⁻²)	24,3 ± 3,1	30,9 ± 5,5 ^{***}
Obvod pasu (cm)	83 ± 10	103 ± 12 ^{***}
Systol TK (mm Hg)	122 ± 8	136 ± 4 ^{***}
Diastol TK (mm Hg)	78 ± 5	86 ± 7 ^{***}
Procento tuku ^c	26,9 ± 6,8	40,3 ± 8,1 ^{***}

^aPrůměr ± SD (mol%); ^b χ^2 test: 0,820, $P = 0,364$; významnosti rozdílů: ^{*} $p < 0,001$; ^cpodle Durnin a Womersley 1974

Tabulka 2 Metabolické ukazatele vyšetřených osob

	Kontrolní skupina (n = 69)	Prediabetes (n = 38)
Celkový cholesterol (mmol/l)	5,46 ± 1,00 ^a	5,56 ± 1,19
Triglyceridy (mmol/l)	0,96 ± 0,33	2,37 ± 2,56 ^{***}
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,71 ± 0,35	1,33 ± 0,30 ^{**}
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,27 ± 0,86	3,29 ± 0,87
f-Glykémie (mmol/l)	4,86 ± 0,43	6,05 ± 0,37 ^{***}
f-Inzulín (mU/l)	6,46 ± 3,06	14,03 ± 7,88 ^{***}
HOMA-IR (index)	1,385 ± 0,676	3,770 ± 1,173 ^{***}
Apolipoprotein B (g/l)	0,99 ± 0,24	1,18 ± 0,32 ^{***}
NEFA (mmol/l)	0,53 ± 0,26	0,64 ± 0,23 [*]
Kyselina močová (μmol/l)	282,3 ± 78,6	343,5 ± 76,1 ^{***}

^aPrůměr ± SD; významnosti rozdílů: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; HOMA-IR - Homeostasis model assessment for insulin resistance; NEFA – neesterifikované mastné kyseliny

Tabulka 3 Mastné kyseliny plasmatického fosfatidylcholinu u vyšetřených osob

	Kontrolní skupina (n = 69)	Prediabetes (n = 38)
16:0	29,7 ± 1,88 ^a	30,6 ± 3,67
16:1n-7	0,50 ± 0,15 ^b	0,60 ± 0,24 [*]
18:0	13,36 ± 1,02	14,67 ± 1,60 ^{***}
18:1n-9	10,08 ± 1,46	10,56 ± 1,57
18:1n-7	1,55 ± 0,22	1,44 ± 0,22 ^{***}
18:2n-6	24,28 ± 2,22	21,72 ± 2,73 ^{***}
18:3n-6	0,08 ± 0,03	0,10 ± 0,05 ^{**}
18:3n-3	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,05
20:2n-6	0,36 ± 0,10	0,44 ± 0,16 ^{**}
20:3n-6	2,85 ± 0,52	3,00 ± 0,68
20:4n-6	10,71 ± 2,02	11,31 ± 1,91
20:5n-3	1,02 ± 0,88	1,10 ± 0,55
22:4n-6	0,31 ± 0,08	0,22 ± 0,10 [*]
22:5n-3	1,02 ± 0,21	1,10 ± 0,32
22:5n-6	0,20 ± 0,06	0,15 ± 0,07 [*]
22:6n-3	3,31 ± 1,16	2,64 ± 1,40 ^{**}
ΣSFA	43,45 ± 1,98	45,57 ± 3,32 ^{***}
ΣMFA	12,38 ± 1,67	12,84 ± 1,79
ΣPUFA n-6	38,79 ± 2,52	37,95 ± 3,07 ^{***}
ΣPUFA n-3	5,42 ± 2,01	4,64 ± 2,09

^aPrůměr ± SD (mol%); ^b uvedeny pouze relevantní mastné kyseliny; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; korekce podle Benjamini-Hochberg

Tabulka 4 Indexy desaturáz a elongáz mastných kyselin u vyšetřených osob

	Kontrolní skupina (n = 69)	Prediabetes (n = 38)
D9D16 (16:1n-7/16:0)	0,017 ± 0,005 ^a	0,019 ± 0,006 ^{*b}
D9D18 (18:1n-9/18:0)	0,762 ± 0,151	0,724 ± 0,108
D6Dn6 (18:3n-6/ 18:2n-6)	0,003 ± 0,002	0,005 ± 0,003 ^{***}
D6Dn6 (20:3n-6/18:2n-6)	0,119 ± 0,026	0,140 ± 0,037 ^{**}
D5Dn3 (20:5n-3/18:3n-3)	5,889 ± 6,146	5,971 ± 4,185
ELOVL2/5 (22:5n-3/20:5n-3)	1,076 ± 0,452	0,656 ± 0,286 ^{***}
ELOVL2 (22:6n-3/20:5n-3)	3,903 ± 1,600	2,482 ± 1,111 ^{***}
ELOVL2/5 (22:4n-6/20:4n-6)	0,028 ± 0,006	0,020 ± 0,008 ^{***}
ELOVL3 (20:0/18:0)	0,004 ± 0,001	0,003 ± 0,001 ^{***}
ELOVL5 (20:5n-3/18:3n-3)	5,889 ± 5,611	5,971 ± 4,397
ELOVL5 (18:1n-7/16:1n-7)	3,330 ± 1,030	2,739 ± 0,977 ^{***}
ELOVL6 (18:0/16:0)	0,451 ± 0,047	0,489 ± 0,102 [*]
ELOVL6 (SA+OA/PA)	0,791 ± 0,095	0,840 ± 0,125

^aPrůměr ± SD; korekce podle Benjamini-Hochberg; * $p < 0,05$; * * $p < 0,01$; * * * $p < 0,001$;
SA – kyselina stearová, 18:0; PA – kyselina palmitová, 16:0; OA – kyselina olejová, 18:1 n-9

Práce byla podporována výzkumným záměrem RVO-VFN64165/2012, PROGRES Q25/ILF

Literatura

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

Guillou H., Zadavec D., Martin PG., Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 2010; 49: 186-199.

Huang Y., Cai X., Chen P., et al. Associations of prediabetes with all-cause and cardiovascular mortality: a meta-analysis. *Ann Med* 2014; 46: 684-692.

Huang, Y., Cai X., Qiu M., et al. Prediabetes and the risk of cancer: a meta-analysis. *Diabetologia* 2014; 57: 2261-2269.

Kröger J., Schulze MB. Recent insights 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.

Macásek 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.

Matthews DR., Hosker JP., Rudenski AS., et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.

Meesapyodsuk D., Qiu X. The front-end desaturase: structure, function, evolution and biotechnological use. *Lipids* 2012; 47: 227-237.

Musil F. Farmakoterapie prediabetu. *Prakt lékař* 2014; 10: 130-132.

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

Tabák AG., Herder C., Rathmann W., et al. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet* 2012; 379: 2279-2290.

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

Twigg SM., Kamp MC., Davis TM., et al. Australian Diabetes Society; Australian Diabetes Educators Association. Prediabetes: a position statement from the Australian Diabetes Society and Australian Diabetes Educators Association. *Med J Aust* 2007; 186: 461-465.

Warensjö E., Rosell M., Hellenius ML., et al. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids Health Dis* 2009; 8: 37.

Warensjö E., Sundström J., Vessby B., et al. Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 203-209.

Žák A., Tvrzická E., Vecka M., et al. Severity of metabolic syndrome unfavorably influences oxidative stress and fatty acid metabolism in men. *Tohoku J Exp Med* 2007; 212: 359-371.

LIPIDOVÉ PRORESOLUČNÍ MEDIÁTORY: TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL U ATEROSKLERÓZY

LIPID PRERESOLUTION MEDIATORS: THEIR THERAPEUTIC POTENTIAL IN ATHEROSCLEROSIS

A. Žák, A. Slabý, E. Tvrzická, M. Vecka, M. Zeman

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

Abstract

The resolution of acute inflammation is an active process necessary to tissue repair, regeneration and maintenance of homeostasis. Biologically active derivatives of polyunsaturated fatty acids, referred to as lipid or specialized pro-resolving mediators (SPM), play an important role in the resolution of acute inflammation. Based on stereospecific analysis, four groups of these compounds are identified, namely lipoxins, resolvins, protectins, and maresins. Pro-resolving mediators are characterized by a broad spectrum of effects: they inhibit the production of pro-inflammatory cytokines, inhibit recruitment of PMN to injured tissues, and stimulate macrophages to efferocytosis (i.e. the clearance of apoptotic PMN). These steps are followed by repair and regeneration of inflamed tissue. From the pharmacobiologic point of view is important that the anti-inflammatory and pro-resolution effects of SPM are not associated with immunosuppression. The absolute or relative deficiency of the pro-resolving mediators may cause the unresolved inflammation and the transition of acute inflammation to chronic form. Low-grade, unresolved inflammation underlies numerous chronic diseases and conditions such as atherosclerosis, obesity, diabetes mellitus type 2 and their clinical complications. It is currently under investigation to what extent atherosclerosis can be favorably influenced by lipid pro-resolving mediators. Results of experimental studies in animal models revealed that SPM attenuated the progression of vascular lesions and stabilize vulnerable atherosclerotic plaques. In patients with advanced atherosclerosis, low to immeasurable plasma concentrations of some lipid pro-resolving mediators, mainly resolvins of the D series, have been reported. The local formation of these mediators and their blood concentrations increase significantly during the dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids of the n-3 series.

Souhrn

Resoluce akutního zánětu je aktivní proces nezbytný k obnově tkáňové homeostázy. Významnou úlohu v něm mají biologicky aktivní deriváty vícenenasycených mastných kyselin označované jako lipidové nebo specializované proresoluční mediátory. Na základě stereospecifické analýzy se rozeznávají čtyři skupiny těchto sloučenin, a to lipoxiny, resolviny, protektiny a maresiny. Proresoluční mediátory se vyznačují širokým spektrem účinků: inhibují tvorbu prozánětlivých cytokinů, ukončují přívod neutrofilních granulocytů do tkání a stimulují makrofágy, které odklízejí apoptotické a nekrotické buňky. Na tyto kroky navazuje reparace zánětem poškozených tkání. Z hlediska farmakobiologie je důležitá skutečnost, že protizánětlivé a proresoluční účinky lipidových mediátorů nejsou spojeny s imunosupresí. Absolutní nebo relativní deficit proresolučních mediátorů může být příčinou selhání resolučního procesu a přechodu akutního zánětu do chronické formy. Mezi závažná onemocnění, v jejichž patogenezi zaujímá chronický, subklinický (low-grade) zánět centrální postavení, patří ateroskleróza a její klinické komplikace. V současné době je předmětem výzkumu, do jaké míry mohou aterosklerózu příznivě ovlivnit lipidové proresoluční

mediátory. Výsledky experimentálních studií na zvířecích modelech se shodují v tom, že proresoluční mediátory zpomalují progresi cévních lézí a stabilizují vulnerabilní aterosklerotické pláty. U pacientů s pokročilou aterosklerózou byly zjištěny nízké až neprůkazné plasmatické koncentrace některých lipidových proresolučních mediátorů, zvláště resolvinů řady D. Lokální tvorba těchto mediátorů i jejich koncentrace v krvi se výrazně zvyšuje během suplementace vícenenasycených mastných kyselin řady n-3 ve stravě.

Úvod

Během posledních dvaceti let přinesl biomedicínský výzkum zánětu nové poznatky, které podstatně změnily dřívější představy a naznačily směr budoucího vývoje farmakologické léčby. Zatímco ukončení zánětové reakce bylo dlouho považováno za pasivní, automaticky probíhající proces, v současné době se zřetelně ukazuje aktivní charakter složitých mechanismů vedoucích k resoluci zánětu a k obnově původního stavu tkání – restituci *ad integrum* (Žák et al., 2014). Selhání resolučních mechanismů má za následek přechod akutního zánětu do chronické formy. Chronický zánět spolu s akumulací modifikovaných lipidů představuje hlavní patofyziologický faktor při vzniku a rozvoji aterosklerózy. K charakteristickým rysům zánětu cévní stěny patří exprese adhezních molekul, infiltrace subendoteliálního prostoru monocyty a diferenciací makrofágů v závislosti na mikroprostředí (fenotypy M1, M2, Mox, Mhem, M4). Makrofágy fagocytující lipidy se mění v pěnové buňky. Na vzniku a udržování zánětu se významně podílejí prozánětové cytokiny. Progrese zánětu má za následek vznik vulnerabilního sklerotického plátu, který se vyznačuje objemným nekrotickým jádrem a ztenčeným fibromuskulárním krytem; eroze nebo ruptura vulnerabilního plátu s následnou trombózou může mít za následek život ohrožující kardiovaskulární příhodu (Fredman et al., 2017; Fredman a Spite, 2017; Fredman a Tabas, 2017). K prevenci a léčbě aterosklerózy se doporučují režimová opatření a farmakologické metody, jejichž primárním cílem je příznivé ovlivnění modifikovatelných rizikových faktorů. Význam chronického zánětu v rozvoji aterosklerózy potvrdila studie CANTOS. Biologická léčba monoklonální protilátkou proti interleukinu IL-1 β (canakinumab) prokázala pokles rekurentních kardiovaskulárních příhod nezávisle na hladinách lipidů. Nicméně tato léčba byla spojena s rizikem neutropenie (Ridker et al., 2017). Pacienti s revmatoidní artritidou (RA) mají zvýšené riziko aterosklerotického kardiovaskulárního onemocnění, které je nezávislé na tradičních rizikových faktorech. Léčba RA methotrexátem je asociována s menší tloušťkou intima-medie a výskytu aterosklerotických plátů *arteria carotis communis* (Pinto et al., 2019). Nicméně, klasická nesteroidní antiflogistika mají protizánětlivý účinek, ale zpomalují resoluci zánětu. Proto se farmakologický výzkum v současné době zaměřuje na terapeutický potenciál lipidových proresolučních mediátorů.

Proresoluční mediátory

Na resoluci zánětu se podílejí signální molekuly různé chemické povahy; velká pozornost se právem věnuje sloučeninám odvozeným od polynenasycených mastných kyselin, označovaným jako **lipidové** nebo **specializované proresoluční mediátory (SPM)**. Díky moderním analytickým metodám, zvláště vysokoúčinné kapalinové chromatografii a hmotové spektrometrii, je dnes známo více než čtyřicet přirozeně se vyskytujících SPM (Maskrey et al., 2013). Podle stereospecifické chemické struktury se rozlišují čtyři základní skupiny, a to **lipoxiny (LX)**, **resolviny (Rv)**, **protektiny (P)** a **maresiny (MaR)** (Serhan et al., 2014; Žák et al., 2014). Lipoxiny vznikají metabolickou přeměnou kyseliny arachidonové, kdežto resolviny, protektiny a maresiny jsou deriváty vícenenasycených mastných kyselin řady n-3, a to kyseliny eikosapentaenové (EPA), dokosapentaenové (n-3 DPA) a dokosahexaenové (DHA). Biosyntéza SPM probíhá především v krevních buňkách bílé řady (neutrofilních i eosinofilních granulocytech, monocytech) a v tkáňových buňkách imunitního systému

(makrofágy, dendritické a žírné buňky, mikroglie). V poslední době se uskutečnily kompletní laboratorní syntézy některých SPM a rovněž jejich analog s prodlouženým účinkem. Přítomnost jednotlivých SPM a jejich specifických skupin lze u lidí prokázat v krvi (plazmě nebo séru) i v jiných tělesných tekutinách, např. v mateřském mléce nebo slzách. Koncentraci SPM v krvi významně zvyšuje suplementace vícenenasycených mastných kyselin řady n-3 ve stravě (Doyle et al., 2018; Norris et al., 2018). Zjednodušený přehled lipidových mediátorů zánětu a jejich prekurzorů ukazuje **tabulka**.

Proresoluční mediátory účinkují prostřednictvím receptorů spřažených s G-proteiny, které jsou exprimovány na povrchu cílových buněk a po navázání ligandu aktivují nitrobuněčné signální kaskády. Tyto receptory nejsou specifické pro SPM; např. na receptor ALX/FPR2 se mohou vázat nejen lipoxiny (LXA₄ a ATL) a resolvinu (RvD1 a RvD3), ale též annexin A1 a jeho deriváty. Rovněž receptory DRV1, DRV2 a ERV1 mohou být stimulovány různými mediátory. Homodimerizace receptorů indukuje tvorbu dalších SPM ve smyslu dopředné vazby (Pirault a Bäck, 2018).

Účinky proresolučních mediátorů

Protizánětlivé a proresoluční účinky SPM jsou součástí vrozených obranných mechanismů. Jednotlivé mediátory mají specifické spektrum účinků a výsledné působení závisí na složení komplexu (metabolomu) v daném mikroprostředí. Protizánětlivé účinky, k nimž patří inhibice prozánětlivých cytokinů (např. TNF α , IL-6, IL-18) a chemokinů (skupiny CC a CXC), nejsou spojeny se snížením imunitní odpovědi organismu vůči mikroorganismům a nádorovým buňkám, na rozdíl od protizánětlivého působení kortikosteroidů a imunosupresiv (Serhan a Levy, 2018). SPM příznivě ovlivňují vrozený i adaptivní imunitní systém. Receptory pro SPM jsou exprimovány na všech imunokompetentních buňkách. SPM kontrolují diferenciaci T-lymfocytů a stimulují tvorbu regulačních T-lymfocytů, zvyšují produkci imunoglobulinů IgG a IgM v B-lymfocytech, kdežto IgE inhibují; v lymfatických uzlinách a slezině zvyšují počty fagocytujících buněk. S protizánětlivým působením souvisejí analgetické účinky SPM, zvláště resolinů a neuroprotektinů secernovaných v centrálním i periferním nervovém systému. V tukové tkáni se vlivem SPM zvyšuje tvorba adiponektinu a jiných protizánětlivých adipokinů. Navíc, dochází k příznivé změně fenotypu makrofágů (z M1 na M2) infiltrujících tukovou tkáň (Doyle et al., 2018).

Proces kompletní resoluce zánětu zahrnuje ukončení přívodu neutrofilních granulocytů do zanícené tkáně a odstranění apoptotických buněk včetně buněčného detritu, tzv. eferocytózu. SPM zvyšují schopnost neutrofilních granulocytů fagocytovat a likvidovat patogenní mikroorganismy a stimulují apoptózu těchto buněk ve fázi jejich nadměrného nahromadění. K posouzení účinnosti SPM v tomto směru se sleduje doba, za kterou se maximální infiltrace tkáně neutrofilními granulocyty sníží na polovinu (tzv. resoluční interval). Eferocytóza je důležitou funkcí makrofágů, jejichž speciální receptory (např. MerTK, CD222) rozpoznávají apoptotické buňky; signalizace těchto receptorů též zvyšuje biosyntézu SPM. Vlivem intenzivního zánětu a oxidačního stresu dochází k rozštěpení receptorů MerTK, za vzniku neúčinné solubilní frakce (Cai et al., 2017; Capó et al., 2018). Poškozené makrofágy nejsou schopny eferocytózy a vzniká postapoptotická nekróza tkáně (Tabas, 2010). Popsaný sled událostí je typický pro vývoj aterosklerotických cévních plátů, v nichž se postupně zvětšuje nekrotické jádro na úkor fibromuskulárního krytu (Virmani et al., 2000). Protektivní vliv SPM se uplatňuje ve všech fázích vývoje aterosklerózy (Fredman a Spite, 2017; Serhan et al., 2015). Příмым účinkem na dysfunkční endotelové buňky SPM stimulují syntézu oxidu dusného, syntézu a uvolňování prostacyklinu, indukují syntézu hem-oxygenázy (HO-1) i syntézu adiponektinu. Tlumí tvorbu adhezních molekul a reaktivních kyslíkatých látek, potlačují interakce endotelu s leukocyty. Některé SPM brání agregaci destiček, snižují aktivaci hladkých svalových buněk destičkovým růstovým faktorem, snižují aktivitu

myeloperoxidázy a inhibují signalizační kaskádu nukleárního faktorů kapa B (NF κ B) (Serhan et al., 2015; Serhan et al., 2018). V aterosklerotických plátech dochází vlivem SPM ke snížení oxidačního stresu, úpravě eferocytózy (tj. vychytávání buněčných produktů apoptózy, především neutrofilních granulocytů), zmenšení nekrotického jádra a zpevnění fibromuskulárního krytu stimulací tvorby kolagenu. Naproti tomu v medii tepen a v myokardu mají SPM antifibrotické účinky (Jadapalli a Halade, 2018).

Experimentální studie

První studie, která prokázala terapeutický potenciál proresolučních mediátorů, byla provedena na hypercholesterolemických králících, jimž byla indukována periodontitida (Hasturk et al., 2015). Podávání resolvinu RvE1 (per os a lokálně) mělo příznivý vliv na rozvoj cévních změn i na zánět dásní. Léčená zvířata vykazovala ve srovnání s kontrolní skupinou významně nižší počet aterosklerotických plátů v aortě, menší množství lipidů a pěnových buněk v plátech, menší tloušťku intimy-medie a nižší stupeň fibrózy v medii. Hodnoty plazmatické koncentrace C-reaktivního proteinu se během podávání resolvinu normalizovaly. Protektivní účinky resolvinu RvE1 potvrdila studie experimentální aterosklerózy u geneticky modifikovaných myší (*apoe*^{-/-}) krmených dietou s vysokým obsahem cholesterolu (Salic et al., 2016). V aortách zvířat, jimž byl podáván resolvin, vzniklo významně méně plátů s pokročilou nekrózou v poměru k časným fibrózním lézím. Autoři též prokázali, že resolvin má podstatně vyšší účinek, je-li podáván spolu s atorvastatinem. Vysvětlení tohoto nálezu spočívá v tom, že některé statiny (atorvastatin a pravastatin, ne však simvastatin) indukují endogenní tvorbu proresolučních mediátorů, a to 15-epimeru lipoxinu LXA4 (Birnbbaum et al., 2006) a resolvinů série 13 (Dalli et al., 2015; Walker et al., 2017). Díky zdokonaleným analytickým metodám bylo možno prokázat, že pokročilé aterosklerotické pláty v aortách geneticky modifikovaných myší (*ldlr*^{-/-}) obsahují významně menší množství RvD1 než časné pláty malého rozsahu a vyznačují se sníženým poměrem RvD1 k prozánětlivému mediátoru LTB4. Podávání resolvinu RvD1 mělo za následek zmenšení nekrotického jádra a zesílení fibromuskulárního krytu, poměr RvD1:LTB4 se zvýšil (Fredman et al., 2016). Paralelní studie účinků proresolučních mediátorů provedená na transgenních myších prokázala, že také resolvin RvD2 a maresin MaR1 zpomalují progresi aterosklerotických plátů v aortě a přispívají ke stabilizaci plátů (Viola et al., 2016). Vulnerabilita plátů vyjádřená souhrnným indexem zohledňujícím několik ukazatelů (velikost nekrotického jádra, počet makrofágů, nepřítomnost buněk hladkého svalu) korelovala negativně s koncentrací resolvinu v plazmě, pozitivně s LTB4. Další studie (Petri et al., 2017) hodnotila proresoluční účinky aspirinem indukovaného 15-epimeru LXA4 (ATL); také tento mediátor u transgenních myší účinně blokoval progresi aterosklerotických plátů, snižoval infiltraci plátů makrofágy a podporoval apoptózu granulocytů. Příznivé účinky ATL zcela chyběly u zvířat, jimž byly vyřazeny příslušné receptory. Všechny uvedené studie se shodují v tom, že progresi aterosklerotických cévních lézí souvisí s deficitem proresolučních mediátorů a podání SPM tento proces zpomaluje. V experimentu na ob/ob myších bylo prokázáno, že funkční poruchu makrofágů přítomných v aterosklerotickém plátu lze upravit dietou s vysokým obsahem vícenenasycených mastných kyselin řady n-3 (Li et al., 2009).

Jiné experimentální studie prokázaly příznivý účinek SPM na ischemicko-reperfuční poškození myokardu. Ve studii provedené na potkanech bylo pozorováno zmenšení infarktu vlivem resolvinu RvE1 podaného nitrožilně před reperfuzí, a to v závislosti na dávce (Keyes et al., 2010). Účinek SPM na vývoj srdečního selhání po infarktu myokardu byl sledován v experimentu na myších; zvířata, jimž byl po ligaci koronární tepny opakovaně aplikován resolvin RvD1, měla ve srovnání s kontrolami lepší kontraktilitu myokardu. V myokardu a též ve slezině se zvýšila exprese receptorů ALX/FPR2 (Kain et al., 2015). U zvířat s neurogenní

hypertenzi se předpokládá inhibiční vliv SPM na aktivaci neuroglie v paraventriculárním jádru hypotalamu (Mowry a Biancardi, 2019).

Velký počet studií byl věnován účinkům SPM u různých typů experimentálních cévních lézí (Wu et al., 2017). Systémové podání resolvinu RvD1 nebo RvD2 významně zpomalilo progresi aneurysmatu břišní aorty u myši a po operaci výdutě urychlilo průběh hojení. Endotel poškozený při angioplastice karotické tepny u potkanů se rychleji obnovil, jestliže byl lokálně aplikován resolvin RvD1 pomocí biodegradabilního filmu, a podstatně se zmenšila následná neointimální hyperplazie. Rovněž zánětové změny probíhající v žilním štěpu byly příznivě ovlivněny lokální aplikací resolvinu RvD1.

Nálezy u lidí

Vyšetřením tkáňových vzorků získaných při karotické endarterektomii byla prokázána v oblastech s pokročilými sklerotickými pláty velmi nízká koncentrace SPM, zvláště resolvinů série D (RvD), ve srovnání s oblastmi méně postiženými. Rovněž byl zjištěn výrazný nepoměr mezi SPM a prozánětlivým leukotrienem B4 (LTB4) (Fredman et al., 2016; Fredman a Tabas, 2017). Někteří autoři se domnívají, že stanovení RvD2 a LTB4 ve slinách by mohlo sloužit k nepřímému posouzení závažnosti aterosklerotického postižení cév u asymptomatických jedinců. V rámci preventivní kardiologické studie byl poměr RvD2 k LTB4 ve slinách vyšetřen u velkého souboru respondentů a potvrdila se předpokládaná korelace s tloušťkou intimy a medie v karotických tepnách (Thul et al., 2017). Po intenzivním vytrvalostním cvičení se v krvi zvyšuje koncentrace proresolučních mediátorů, podání ibuprofenu tuto odpověď snižuje a zpomaluje (Markworth et al., 2013). Průkaz solubilní frakce receptorů MerTK v plazmě pacientů po akutní koronární příhodě svědčí o poruše makrofágů (Virmani et al., 2000). U pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční bylo zjištěno, že mají ve srovnání se zdravými jedinci nízké až neprůkazné plazmatické koncentrace některých SPM (zvláště resolvinů série D). Dlouhodobé podávání mastných kyselin EPA a DHA (jeden rok v denní dávce 3,6 g) mělo za následek významné zvýšení deficitních SMP. Navíc autoři prokázali, že právě tyto deficitní SPM zvyšují schopnost lidských makrofágů fagocytovat úlomky trombů (Elajami et al., 2016).

Závěr

Terapeutický potenciál proresolučních mediátorů je v současné době intenzivně studován nejen ve vztahu k ateroskleróze, ale též se zřetelem na možné využití u jiných onemocnění, zvláště v revmatologii, imunologii a onkologii. Mezi důležité úkoly pro další výzkum patří syntéza analogických sloučenin rezistentních vůči metabolické inaktivaci a hledání nových způsobů, jak dopravit lék k cílové tkáni pomocí humanizovaných nanočástic (Norling et al., 2011). U jednotlivých preparátů je nutno ověřit bezpečnost, snášenlivost a případné lékové interakce. Dosud nelze předvídat, zda a do jaké míry se proresoluční mediátory stanou součástí terapie zánětlivých onemocnění v lékařské praxi. V každém případě dosavadní výzkum podstatně obohatil biomedicínské poznatky o průběhu resoluční fáze zánětu.

Tabulka Zjednodušený přehled lipidových zánětových mediátorů

n-6 PUFA	n-3 PUFA	
AA	DHA	EPA
<i>Prostaglandiny</i>	Protektiny Maresiny Resolviny (řady D)	Resolviny (řady E)
<i>Tromboxany</i>		
<i>Leukotrieny</i>		
Lipoxiny		

Legenda a zkratky: *Kurzívou* – prozáněťové mediátory; tučně – protizáněťové a prorezoluční mediátory; PUFA – vícenenasycené mastné kyseliny, AA – kyselina arachidonová, DHA – kyselina dokosaheptaenová, EPA – kyselina eikosapentaenová.

Práce byla podpořena výzkumnými projekty RVO VFN64165/2012 (MZ ČR) a PROGRES Q25 (1. lékařská fakulta Karlovy Univerzity)

Literatura

- Birnbaum Y., Ye Y., Lin Y., et al.** Augmentation of myocardial production of 15-epi-lipoxin-a4 by pioglitazone and atorvastatin in the rat. *Circulation* 2006; 114: 929-935.
- Cai B., Thorp EB., Doran AC., et al.** MerTK receptor cleavage promotes plaque necrosis and defective resolution in atherosclerosis. *J Clin Invest* 2017; 127: 564-568.
- Capó X., Martorell M., Busquets-Cortés C., et al.** Resolvins as proresolving inflammatory mediators in cardiovascular disease. *Eur J Med Chem* 2018; 153: 123-130.
- Dalli J., Chiang N., Serhan CN.** Elucidation of novel 13-series resolvins that increase with atorvastatin and clear infection. *Nat Med* 2015; 21: 1071-1075.
- Doyle R., Sadlier DM., Godson C.** Pro-resolving lipid mediators: Agents of anti-ageing? *Semin Immunol* 2018; 40: 36-48.
- Elajami TK., Colas RA., Dalli J., et al.** Specialized proresolving lipid mediators in patients with coronary artery disease and their potential for clot remodeling. *FASEB J* 2016; 30: 2792-2801.
- Fredman G., Hellmann J., Proto JD., et al.** An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. *Nat Commun* 2016; 7: 12859.
- Fredman G., Spite M.** Specialized pro-resolving mediators in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 2017; 58: 65-71.
- Fredman G., Tabas I.** Boosting inflammation resolution in atherosclerosis. *Am J Pathol* 2017; 187: 1211-1221.
- Hasturk H., Abdallah R., Kantarei A., et al.** Resolvin E1 (RvE1) attenuates atherosclerotic plaque formation in diet and inflammation-induced atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 1123-1133.
- Jadapalli JK., Halade GV.** Unified nexus of macrophages and maresins in cardiac reparative mechanisms. *FASEB J* 2018; 32: 5227-5237.
- Kain V., Ingle KA., Colas RA., et al.** Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 84: 24-35.
- Keyes KT., Ye Y., Lin Y., et al.** Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: H153-H164.
- Li S., Sun Y., Liang CP., et al.** Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet. *Circ Res* 2009; 105: 1072-1082.
- Markworth JF., Vella L., Lingard BS., et al.** Human inflammatory and resolving lipid mediator responses to resistance exercise and ibuprofen treatment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013; 305: R1281-R1296.

- Maskrey BH., Megson IL., Rossi AG., et al.** Emerging importance of omega-3 fatty acids in the innate immune response: Molecular mechanisms and lipidomic strategies for their analysis. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 1390-1400.
- Mowry FE., Biancardi VC.** Neuroinflammation in hypertension: the renin-angiotensin system versus pro-resolution pathways. *Pharmacol Res* 2019; 144: 279-291.
- Norling LV., Spite M., Yang R., et al.** Cutting edge: Humanized nano-proresolving medicines mimic inflammation-resolution and enhance wound healing. *J Immunol* 2011; 186: 5543-5547.
- Norris PC., Skulas-Ray AC., Riley I., et al.** Identification of specialized pro-resolving mediator clusters from healthy adults after intravenous low-dose endotoxin and omega-3-supplementation: a methodological validation. *Sci Rep* 2018; 8: 18050.
- Petri MH., Laguna-Fernandez A., Arnardottir H., et al.** Aspirin-triggered lipoxin inhibits atherosclerosis progression in ApoE ^{-/-} mice. *Br J Pharmacol* 2017; 174: 4043-4054.
- Pinto MRC., Kakehasi AM., Souza AJ., et al.** Methotrexate use, not interleukin 33, is associated with lower carotid intima-media thickness in patients with rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol* 2019; 59: 15.
- Pirault J., Bäck M.** Lipoxin and resolvin receptors transducing the resolution of inflammation in cardiovascular disease. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1273.
- Ridker PM., Everett BM., Thuren J., et al.** Antiinflammatory therapy with Canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med* 2017; 377: 1191-1131.
- Salic K., Morrison MC., Verschuren L., et al.** Resolvin E1 attenuates atherosclerosis in absence of cholesterol-lowering effects and on top of atorvastatin. *Atherosclerosis* 2016; 250: 158-165.
- Serhan CN.** Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 2014; 510: 92-101.
- Serhan CN., Chiang N., Dalli J.** The resolution Code of Acute Inflammation: Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Resolution. *Semin Immunol* 2015; 27: 200-2015.
- Serhan CN., Chiang N., Dalli J.** New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration. *Mol Aspects Med* 2018; 64:1-17.
- Serhan CN., Levy BD.** Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest* 2018; 128: 2657-2669.
- Tabas I.** Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 36-46.
- Thul S., Labat C., Temmar M., et al.** Low salivary resolvin D1 to leukotriene B4 ratio predicts carotid intima media thickness: a novel biomarker of non-resolving vascular inflammation. *Eur J Prev Cardiol* 2017; 24: 903-906.
- Viola JR., Lemnitzer P., Jansen Y., et al.** Resolving lipid mediators maresin 1 and resolvin D2 prevent atheroprogession in mice. *Circ Res* 2016; 119: 1030-1038.
- Virmani R., Kolodgie FD., Burke APOD., et al.** Lessons from sudden coronary death: A comprehensive morphological classification schema for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1262-1275.
- Walker ME., Souza PR., Colas RA., et al.** 13-series resolvins mediate the leukocyte-platelet actions of atorvastatin and pravastatin in inflammatory arthritis. *FASEB J* 2017; 31: 3636-3648.
- Wu B., Mottola G., Schaller M., et al.** Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications. *Mol Aspects Med* 2017; 58: 72-82.
- Žák A., Vecka M., Zeman M., et al.** Nové lipidové mediátory: jejich patofyziologie a klinický význam. In: *Atherosklerosa 2014. Diagnostika, léčba, prevence v dětském i dospělém věku.* Praha: IV. interní klinika 1. LF UK, 2014, S19-S25.