

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Studium molekulárních biomarkerů v etiopatogenezi  
diabetes mellitus 2. typu v biologických matricích  
metabolomickými přístupy**

**Diplomová práce**

**Jakub Šťastný  
Výživa a potraviny**

**doc. Ing. Petr Kačer, Ph.D.**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium molekulárních biomarkerů v etiopatogenezi diabetes mellitus 2. typu v biologických matricích metabolomickými přístupy" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.04.2022

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval Doc. Ing. Petru Kačerovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a vstřícnost při psaní této práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat všem, kteří se podíleli na přípravě a analýze vzorků.

# Studium molekulárních biomarkerů v etiopatogenezi diabetes mellitus 2. typu v biologických matricích metabolomickými přístupy

## Souhrn

Etiopatogenezi diabetu 2. typu lze přičíst řadě abnormalit vyskytujících se u metabolického syndromu. Metabolické abnormality jako je inzulinová rezistence, dyslipidémie a hyperglykémie, zcela jasně vede k diabetu 2. typu. Skrze metabolické odchylky je metabolický syndrom schopen podněcovat oxidační stres a zánětlivou reakci. Oxidační stres bývá zjednodušeně definován jako nerovnováha mezi produkcí a eliminací reaktivních forem kyslíku, ale zahrnuje také inaktivaci enzymatických drah. ROS mohou oxidovat také lipidy, za vzniku biologicky aktivních forem umožňujících generování dalších forem ROS. V důsledku oxidačního stresu může docházet k narušení celistvosti buněk a tím i inzulinové signalizace. Akumulace lipidů v tkáni může působit lipotoxicitu hned několika způsoby. Je prokázáno, že specifické lipidy aktivují dráhy PKC, podílejí se na vzniku diabetu 2. typu a v neposlední řadě jsou i producenty ROS.

Za pomoci neobézního hereditárně hypertriglyceridemického kmene potkana jsme byly schopni odlišit vliv obezity od ostatních komponent metabolického syndromu. HHTG potkani se vyznačovali vyššími hladinami ceramidů, triglyceridů, diacylglycerolů a fosfolipidů. Dané lipidy byly již dříve spojeny s diabetem 2. typu a inzulinovou rezistencí. Zároveň byly prokázány zvýšené koncentrace prozánětlivých biomarkerů u neobézních potkanů s metabolickým syndromem, kdy hladiny protizánětlivého interleukinu 10 byly výrazně sníženy. Podařilo se nám také prokázat zvýšený oxidační stres ve svalové tkáni HHTg potkanů.

**Klíčová slova:** biomarker; diabetes mellitus 2. typu; HPLC/MS; metabolomika; oxidační stres; záněť

# **Study of molecular biomarkers in etiopathogenesis of type 2 diabetes mellitus in biological matrices by metabolomics approaches**

## **Summary**

The etiopathogenesis of type 2 diabetes can be attributed to a number of abnormalities occurring in the metabolic syndrome. Metabolic abnormalities such as insulin resistance, dyslipidemia and hyperglycemia leads to type 2 diabetes. Through metabolic abnormalities, the metabolic syndrome is able to stimulate oxidative stress and inflammatory response. Oxidative stress can be simply defined as an imbalance between the production and elimination of reactive oxygen species, but it also involves the inactivation of enzymatic pathways. ROS can also oxidize lipids, which producing biologically active forms that allow the generation of other forms of ROS. As a result of oxidative stress, cell integrity and thus insulin signaling may be impaired. Lipid accumulation in tissue can cause lipotoxicity in several ways. Specific lipids have been shown to activate PKC pathways, contribute to type 2 diabetes and, last but not least, produce ROS.

Using a non-obese hereditary hypertriglyceridemic strain of rat, we were able to distinguish the influence of obesity from the other components of metabolic syndrome. HHTG rats were characterised by higher levels of ceramides, triglycerides, diacylglycerols and phospholipids. These lipids have been previously linked to type 2 diabetes and insulin resistance. At the same time, increased concentrations of pro-inflammatory biomarkers were shown in non-obese rats with metabolic syndrome, where levels of anti-inflammatory interleukin 10 were significantly reduced. We were also able to demonstrate increased oxidative stress in the muscle tissue of HHTg rats.

**Keywords:** biomarker; diabetes mellitus type 2; HPLC/MS; metabolomic; oxidative stress; inflammation

# Obsah

1 Úvod.....	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
<b>3.1 Metabolický syndrom.....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Inzulínová rezistencia .....	10
3.1.2 Viscerální obezita .....	12
3.1.3 Dyslipidémie.....	13
3.1.4 Hyperglykémie .....	14
<b>3.2 Biomarkery metabolického syndromu .....</b>	<b>14</b>
3.2.1 Leptin.....	14
3.2.2 Adiponektin .....	15
3.2.3 Ghrelin.....	15
3.2.4 Inhibitor plazminogenového aktivátoru -1 (PAI-1) .....	16
3.2.5 Kyselina močová .....	16
3.2.6 Interleukin-6 (IL-6).....	17
3.2.7 Interleukin-10 .....	17
3.2.8 Oxidovaný lipoprotein s nízkou hustotou (OxLDL).....	18
3.2.9 Paraoxonáza.....	18
<b>3.3 Vliv oxidačního stresu na rozvoj diabetu mellitus 2. typu .....</b>	<b>18</b>
3.3.1 Zdroje reaktivních forem kyslíku u prediabetu.....	19
3.3.1.1 Mitochondriální oxidace .....	19
3.3.1.2 NADPH oxidáza .....	20
3.3.1.3 Endoteliální syntáza oxidu dusnatého (eNOS).....	20
3.3.2 Biomarkery oxidačního stresu u prediabetického stavu .....	20
3.3.2.1 Glutathion .....	21
3.3.2.2 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.....	21
3.3.2.3 Lectin-like oxLDL receptor (LOX-1).....	21
3.3.2.4 Produkty pokročilé glykace (AGE) .....	21
3.3.3 Adipocyty jako generátory zánětu a oxidačního stresu .....	22
3.3.4 Oxidační stres vyvolaný hyperglykemií .....	23
<b>3.4 Diabetes mellitus (DM).....</b>	<b>23</b>
3.4.1 Diabetes mellitus 1. typu (T1DM).....	24
3.4.2 Diabetes mellitus 2. typu (T2DM).....	24
3.4.3 Gestační diabetes .....	24
<b>3.5 Úloha lipidů v etiopatogenezi diabetu mellitus 2. typu.....</b>	<b>24</b>
3.5.1 Fosfolipidy.....	25
3.5.2 Sphingolipidy.....	25
3.5.2.1 Sfingosin-1-fosfát (S1P) .....	25

3.5.2.2	Ceramidy .....	26
3.5.2.3	Sfingomyelin .....	27
3.5.2.4	Dihydroceramidy (dhCer) .....	27
3.5.3	Diacylglyceroly (DAG) .....	27
3.5.4	Triacylglyceroly (TAG) .....	28
4	Metodika .....	29
<b>4.1</b>	<b>Zkoumaný vzorek .....</b>	<b>29</b>
4.1.1	Kmen hereditárně hypertriglyceridemických potkanů .....	29
4.1.2	Kontrolní skupina .....	29
<b>4.2</b>	<b>Příprava vzorku .....</b>	<b>30</b>
4.2.1	Materiální vybavení .....	30
4.2.1.1	Přístrojové vybavení .....	30
4.2.1.2	Chemikálie .....	30
4.2.2	Homogenizace tkáně .....	30
4.2.3	Extrakce lipidů .....	30
4.2.4	Necílená lipidomická analýza .....	31
4.2.5	Analýza biomarkerů prozánětlivého stavu a oxidačního stresu .....	31
<b>4.3</b>	<b>Zpracování výsledků a statistická analýza .....</b>	<b>31</b>
4.3.1	SCIEX OS .....	31
4.3.2	MarkerView .....	32
4.3.3	MetaboAnalyst .....	32
4.3.4	Statistica .....	32
5	Výsledky .....	33
<b>5.1</b>	<b>Lipidomická analýza .....</b>	<b>33</b>
5.1.1	Grafické znázornění výsledků měření .....	34
5.1.2	Závěr lipidomické analýzy .....	36
<b>5.2</b>	<b>Analýza biomarkerů oxidačního stresu a zánětu .....</b>	<b>37</b>
5.2.1	Grafické znázornění výsledků měření biomarkerů .....	38
5.2.2	Vyhodnocení analýzy biomarkerů .....	41
6	Diskuse .....	42
<b>6.1</b>	<b>Lipidomická analýza .....</b>	<b>42</b>
<b>6.2</b>	<b>Vliv metabolického syndromu na hladiny biomarkerů .....</b>	<b>44</b>
7	Závěr .....	45
8	Literatura .....	47
9	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	60
10	Samostatné přílohy .....	I

# 1 Úvod

Společnými znaky metabolického syndromu a diabetu jsou inzulinová rezistence, změny lipidického spektra, prozánětlivý stav a zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku. Všechny vyjmenované znaky se svým dílem podílejí na progresi metabolického syndromu na diabetes mellitus 2. typu. Tím však role daných látek nekončí, u vzniklého onemocnění se dále podílejí na vzniku diabetických komplikací (např. diabetická retinopatie). Vzhledem k vysoké prevalenci metabolického syndromu, je značná pozornost věnována jeho složkám a tím i snaha o přesnou specifikaci jednotlivých faktorů podílejících se na jeho vzniku.

Včasnou diagnostikou pomocí signálních molekul tzv. biomarkerů jsme schopni predikovat nastupující onemocnění ještě před jeho manifestací, a to s dostatečnou přesností i předstihem. Při včasné zachytu nastupujícího onemocnění je možné nastavit vhodnou léčbu a tím nejen nemoc kompenzovat, ale předejít jejímu vzniku. S řadou nových poznatků se ukazuje jako možnost použití biologicky aktivních lipidů jako citlivých a dostatečně specifických biomarkerů. Jedním z takových biomarkerů mohou být jednotlivé skupiny sfingolipidů a fosfolipidů. Sfingolipidy a fosfolipidy jsou často součástí membránových lipidů, z čehož vyplývá jejich primární zastoupení v intracelulárním prostoru. Jejich majoritní výskyt v polopropustné plazmatické membráně byl pro nás signálem k optimalizaci extrakční metody tak, abychom docílily prasknutí buněk a tím i úplnou extrakci lipidů z nitra. Ačkoliv nízké hladiny daných lipidů jsou esenciální pro signalizační dráhy, tak jejich akumulace v tkáni má za následek lipotoxický efekt.

O nic méně není důležitý ani vliv oxidačního stresu na vznikající metabolický syndrom. Oxidační stres se odehrává v tkáních, kde může poškozovat buňky, a proto nelze z plazmatických hladin jasně posoudit příčiny a důsledky oxidačního stresu na poruchy v jednotlivých orgánech. Je tedy stěžejní použít pro analýzu oxidačního stresu cílovou tkáň jako jsou adipocyty nebo svalová tkáň. Existuje i jasná souvislost mezi obezitou, dyslipidemií a zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku.

Díky využití unikátního modelu neobézních potkanů s geneticky fixovanou triglyceridemií, jsme schopni odlišit vliv obezity od ostatních rizikových faktorů pro vznik metabolického syndromu.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem této práce je prokázat zvýšené koncentrace lipoperoxidačních produktů pozorované při zhoršené glukózové toleranci u geneticky modifikovaných hereditárně hypertriglyceridemických potkanů.

### **Hypotézy:**

1. T2DM patogeneze koresponduje s koncentračními hladinami signálních molekul-biomarkerů
2. Biomarkery reflektující patogenezi metabolického syndromu a T2DM jsou obsaženy v různých koncentracích v řadě různých biomatric (tuková tkáň, kosterní sval, plazma, moč atd.).
3. V průběhu patogeneze T2DM dochází ke změně v koncentraci zánětlivých biomarkerů a biomarkerů oxidačního stresu, které jsou indukovány stravou a stravovacími návyky

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom jinak také nazývaný jako syndrom X. Původně byl popsán Reavenem v roce 1988 a tak se někdy pojmenovává jako Raevenův syndrom (Reaven 1988). Metabolický syndrom je v dnešní době velmi běžná metabolická porucha, která je důsledkem zvyšující se prevalence obezity. Můžeme ji definovat různými způsoby, ale zjednodušeně jej lze chápat jako soubor metabolických poruch, které výrazně zvyšují riziko rozvoje diabetu 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění (Eckel et al. 2005). Reaven (1988) již tehdy odkazoval na běžně se vyskytující poruchy zahrnující viscerální obezitu, hypertenzi, inzulínovou rezistenci, aterogenní dyslipidémii, konkrétně hypertriglyceridémii se sníženou hladinou HDL cholesterolu. Velkou roli v progresi metabolického syndromu hraje inzulínová rezistence, nadměrný přísun mastných kyselin a zánětlivé procesy. Tento stav lze většinou dobře kompenzovat za pomoci správné úpravy stravy, zvýšenou pohybovou aktivitou, vhodnou medikací a cílenou úpravou hmotnosti (Eckel et al. 2005).

Globální prevalence metabolického syndromu se liší v závislosti na geografických a sociodemografických faktorech, stejně tak i na použitých diagnostických kritériích. Údaje z nutričního screeningu odhadují, že až 50 % populaci nad 60 let můžeme přidělit diagnózu metabolického syndromu, přičemž procentuální výskyt mezi Americkou populací se zdá být o málo vyšší u žen, než u mužů (Aguilar et al. 2015). Podle kritérií mezinárodní diabetologické federace se odhaduje, že metabolický syndrom se v Evropě vyskytuje u 41 % mužů a 38 % žen (DECODE Study Group 2008). Mezi rizikové faktory pro vznik metabolického syndromu můžeme zařadit např. výskyt v rodině, kouření, obezita, fyzická nečinnost, vyšší věk, nadměrná konzumace slazených a alkoholických nápojů, užívání některých druhů léčiv a v neposlední řadě také postmenopauzální stav (McCracken et al. 2018).

#### 3.1.1 Inzulínová rezistence

Inzulín je polypeptidický hormon, jenž je produkován beta buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu v reakci na zvýšenou hladinu nutrientů v krvi např. glukózy. Působí prostřednictvím glykoproteinových receptorů umístěných v hlavní cílové tkáni jako jsou játra, kosterní sval a adipocyty. Navázáním inzulínu na receptor dojde k aktivaci signální cesty jejíž funkcí je za prvé stimulovat transport živin, jako je např. glukóza, aminokyseliny a mastné kyseliny, z krevního řečiště do cílové tkáně a za druhé podporovat konverzi živin do podoby zásobní makromolekuly, jako např. glykogen, protein a lipidy (Lizcano & Alessi 2002). Jakmile je inzulín vyloučen z pankreatických  $\beta$ -buněk, cirkuluje v krevním řečišti s poločasem rozpadu přibližně 12 minut (Sonksen 2001). Inzulín účinkuje spolu s dalšími hormony, jako je glukagon nebo somatostatin jako kontrolní systém hladiny glukózy v krvi. Vylučování inzulínu probíhá v reakci na zvýšené koncentrace glukózy např. postprandiální, dále inhibuje jaterní produkci glukózy, čímž následně klesne i hladina glukózy v krvi. Zato glukagon v reakci na inzulínem indukovanou hypoglykémii zvyšuje hladinu glukózy v plazmě tím, že podporuje glukoneogenezi a inhibuje proces glykolýzy, a tak hraje důležitou roli v homeostáze glukózy. Třetím důležitým hormonem pankreatu pro kontrolu hladiny krevní glukózy je somatostatin,

který inhibuje sekreci inzulínu, ale neovlivňuje jeho biosyntézu. Celý mechanismus nejspíše funguje skrze inhibici exocytózy inzulínu z buněk sousedících s D-buňkami produkujícími somatostatin (Reichlin 1983).

Pro lepší pochopení vzniku inzulínové rezistence a diabetu mellitus si zde popíšeme základní mechanismy působení inzulínu. Inzulín způsobuje například translokaci GLUT-4 (přenašeč glukózy nacházející se převážně v kosterním svalstvu a tukové tkáni) z intracelulárního prostoru k povrchu buněčné membrány, a tak zvyšuje rychlost vstupu glukózy do cílové tkáně (Halse et al. 2001). Glukóza je poté fosforylována, aby se její přebytek mohl skladovat ve formě glykogenu, nebo je metabolizována na adenosintrifosfát (ATP). Ve stavu nalačno, kdy jsou hladiny inzulínu sníženy, je výskyt GLUT4 na plazmatické membráně snížen a místo toho je přemístěn do prostoru intracelulární membrány. Nadměrný výskyt sloučenin s aktivitou PI3-kinázy a proteinkinázy B (PKB) může způsobovat translokaci GLUT4 na buněčný povrch, a to i za nepřítomnosti inzulínu. Přičemž PI3-kináza je odpovědná za spoušť dalších fosforylačních reakcí a PKB fosforyluje a inaktivuje GSK-3, což umožní syntézu glykogenu (Saltiel & Kahn 2001). Proteinkináza A (PKA) je hlavním efektoem lipolýzy v tukové tkáni. Aktivace PKB vede k inhibici PKA, a tím i k potlačení lipolýzy (Choi et al. 2010). Metabolismus svalových bílkovin je také významně ovlivněn stimulačními vlastnostmi inzulínu a díky jeho anti katabolickému účinku je štěpení bílkovin výrazně omezeno, což spěje k lepšímu zachování kontraktálních svalových elementů. Kromě toho byly v mnoha studiích pozorovány účinky stimulující syntézu, které prokázaly anabolické vlastnosti inzulínu, avšak silně závislé na dostupnosti aminokyselin v krevním poolu (Fujita et al. 2006). Zjednodušeně můžeme tedy říci, že inzulín inhibuje glukoneogenezi a glykogenolýzu. Naopak podporuje ukládání glukózy, dále také stimuluje genetickou transkripci enzymů zapojených do glykolýzy a syntézy mastných kyselin. Přímou také inhibuje transkripci a aktivitu jaterních enzymů odpovědných za glukoneogenezi (Fujita et al. 2006; Dentin et al. 2007).

Jak již bylo uvedeno, nejrozšířenější hypotézou pro patofyziologii metabolického syndromu je inzulínová rezistence, která je do určité míry způsobena nadbytkem mastných kyselin v důsledku nevhodné lipolýzy. Snížená citlivost na normální hladiny inzulínu je zřejmým předchůdcem rozvoje diabetu 2. typu. Na začátku tohoto procesu beta buňky vylučují zvýšené množství inzulínu jako kompenzačního mechanismu k udržení normoglykémie. Nakonec stejně dochází k dekompenzaci (Eckel et al. 2005; Savage et al. 2007). Tudíž inzulínovou rezistenci můžeme definovat jako stav buňky, kdy je nutno pro normální utilizaci glukózy zapotřebí většího množství inzulínu. Pokud vezmeme v úvahu hlavní tkáně, na které je inzulín zacílen, tak inzulínová rezistence v kosterním svalstvu vede ke snížení syntézy glykogenu a transportu glukózy, zatímco inzulínová rezistence v játrech zřejmě vede ke snížení účinnosti inzulínových signálních drah. Nicméně, v rozporu s tímto pozorováním je důkaz, že jaterní lipogeneze i přesto pokračuje. Přesné mechanismy nebyly definitivně potvrzeny a výzkum v této oblasti nadále pokračuje (Savage et al. 2007). Akumulace lipidů v kosterním svalu je spojena se sníženou fosforylací tyrosinu, což inhibuje následnou aktivaci PI3 kinázy. Předpokládá se, že by za tento jev mohla být zodpovědná řada kináz a zánětlivých meziproductů. Kromě toho mohou zvýšené hladiny acyl-CoA nebo derivátů acyl-CoA snížit aktivaci PKB. Samotná akumulace lipidů může být i důsledkem zvýšeného příjmu mastných kyselin do tkání, kde příjem energie převyšuje jejich kapacitu. V potaz musíme také zahrnout alternativní hypotézu mitochondriální dysfunkce, konkrétně defekt v procesu mitochondriální

oxidativní fosforylace (Savage et al. 2007; Savage et al. 2007). V kosterním svalu mohou volné mastné kyseliny inhibovat vychytávání glukózy, které probíhá za pomoci inzulínu. V játrech volné mastné kyseliny (FFA) zvyšují produkci glukózy, triglyceridů a lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL), které jsou aterogenní. Volné mastné kyseliny pocházejí hlavně ze zásob triglyceridů v tukové tkáni, které se uvolňují působením cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) během lipolýzy. V období hladovění je tento proces iniciován katecholaminy. Postprandiálně je tento proces inhibován inzulínem, kdy dojde ke snížení aktivity cAMP. Při inzulínové rezistenci jsou účinky inzulínu sníženy, rychlost lipolýzy se zvýší, což má za následek zvýšenou produkci mastných kyselin. To negativně ovlivní i cyklus inhibice anti lipolytických vlastností inzulínu, což vede k další lipolýze (Choi et al. 2010; Jensen et al. 1989).

### 3.1.2 Viscerální obezita

Ačkoli je obezita rizikovým faktorem inzulínové rezistence, diabetu 2. typu a významným rizikovým faktorem pro vznik KVO, ne každý obézní pacient je rezistentní na inzulín nebo má vysoké riziko diabetu a KVO (Abbasi et al. 2002). To vysvětluje, proč je obezita špatně definovatelným ovlivnitelným rizikovým faktorem KVO ve srovnání s jinými, jako je hypertenze, kouření, zvýšený LDL a snížený HDL cholesterol. Pro jakékoli množství celkového tělesného tuku existuje podskupina jedinců se selektivním nadbytkem viscerální tukové tkáně, která je vystavena podstatně vyššímu riziku propuknutí inzulínové rezistence a metabolického syndromu. Ačkoli je nadměrná akumulace viscerálního tuku spojena s různými aterogenními a diabetogenními abnormalitami, důležitou otázkou je, zda je viscerální tuk kauzálním faktorem nebo jednoduše markerem narušených metabolických drah (Després 2009).

Existuje dostatek důkazů, že narušený metabolismus neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) by mohl přispět k inzulínové rezistenci pozorované u jedinců s viscerální obezitou. Hypertrofované intraabdominální adipocyty se vyznačují hyperlipolytickým stavem, který je odolný vůči antilipolytickému účinku inzulínu (Mittelman et al. 2002). Výsledný přísun NEFA do jater může narušit metabolické pochody jater, což následně vede ke zvýšené produkci glukózy v játrech. Inzulínová rezistence jater je spojena se sníženou degradací apolipoprotein B a zvýšenou produkcí lipoproteinů obsahující triacylglyceroly. Ukázalo se, že strava s vysokým obsahem tuku provedena na psím modelu s dietně indukovanou viscerální obezitou může vyvolat jaterní inzulínovou rezistenci, zatímco citlivost periferních tkání se zdá být méně ovlivněna dietně indukovanou viscerální adipozitou. Zároveň došlo k výraznému zvýšení NEFA v průběhu 24hodin u viscerálně obézních psů. Takové zvýšení NEFA by mohlo být stimulem pro sekreci inzulínu a mohlo by hrát důležitou roli v etiologii inzulínové rezistence, zejména pokud jde o metabolismus sacharidů a lipidů v játrech. (Bergman et al. 2006). I u lidí existuje korelace mezi akumulací viscerálního tuku a portálním dodáním NEFA do jater, kdy většina NEFA pochází ze systémové cirkulace.

Tuková tkáň neslouží pouze pro ukládání a mobilizaci lipidů, ale je také pozoruhodným endokrinním orgánem, který uvolňuje značné množství cytokinů, včetně prozánětlivých molekul jako je interleukin (IL)-6 a tumor nekrotizující faktor –  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). U obezity jsou do tukové tkáně přitahovány makrofágy, což přispívá k zánětlivým procesům u pacientů

s viscerální obezitou (Weisberg et al. 2003). Plazmatické hladiny C-reaktivního proteinu (CRP), zánětlivého markeru, který predikuje riziko infarktu myokardu, jsou zvýšeny u pacientů s viscerální obezitou (Lemieux et al. 2001). Adiponektin je jedním adipokinů vyskytujících se v krvi, který je produkován adipocyty. Na rozdíl od prozánětlivých adipokinů jsou hladiny adiponektinu u obézních jedinců sníženy, zejména u pacientů s nadměrnou viscerální adipozitou. V in vitro studiích bylo zjištěno, že adiponektin má mnoho účinků, které souvisí se zlepšenou inzulínovou signalizací a potenciální ochranou proti ateroskleróze. Snížené hladiny adiponektinu můžeme pozorovat u viscerálně obézních pacientů, a proto ho můžeme brát za jeden z klíčových faktorů odpovědných za aterogenní, diabetogenní a metabolické poruchy (Côté et al. 2005).

Na základě asociace mezi abdominální obezitou a metabolickým syndromem, bylo navrženo měření obvodu pasu jako hrubý antropometrický ukazatel viscerální obezity. Obecně se bere mezní hodnota obvodu pasu 102 cm u mužů a 88 cm u žen. Tyto hodnoty obvodu pasu odpovídají přibližně hodnotě BMI 30.

### 3.1.3 Dyslipidémie

Patogeneze metabolického syndromu je komplexní pojem, který pod sebe schraňuje velkou škálu látek a lipidy jsou jednou z těch, co vedou k rizikům spojeným s tímto syndromem. Dyslipidémie je stav vedoucí k vyšším hladinám plazmatických triglyceridů a volných mastných kyselin (FFA), je charakterizován lipidovými abnormalitami, které zahrnují změny aterogenních i antiaterogenních lipoproteinů (Sorani et al. 2016). Přítomnost zvýšených aterogenních lipoproteinů během těchto abnormalit je někdy označováno jako aterogenní dyslipidémie. Dyslipidémie může být způsobena zvýšenou produkcí lipoproteinů s nízkou hustotou (VLDL, LDL) a sníženou produkcí HDL. Dyslipidémie může být také výsledkem snížené clearance lipoproteinů bohatých na triglyceridy, která je způsobena relativním nedostatkem lipoproteinové lipázy citlivé na inzulín (Klop et al. 2013). Rozvoj kardiovaskulárních komplikací v důsledku poruchy lipidového metabolismu často předchází T2DM o několik let. Podobné lipidové abnormality, které pocházejí hlavně z jaterní nadprodukce VLDL, jsou pozorovány u pacientů s inzulínovou rezistencí a T2DM (Taskinen 2003). U několika metabolitů lipidů bylo prokázáno, že inaktivují inzulínovou signální dráhu a jejich hladiny jsou zvýšené u jedinců s inzulínovou rezistencí (Morino et al. 2006). Zvýšená mobilizace volných mastných kyselin z triglyceridů uložených v tukové tkáni, způsobená neschopností inzulínu potlačit lipolýzu vede ke zvýšení toku volných mastných kyselin (Bergman et al. 2007). Játra hrají hlavní roli v metabolismu lipidů. Vychytávání mastných kyselin játry není regulováno, a proto příliv mastných kyselin do jater přímo souvisí s koncentrací neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) v plazmě. Kromě mastných kyselin syntetizovaných játry jsou potenciálními zdroji mastných kyselin pro vznik lipidů a VLDL triglyceridů mastné kyseliny ze stravy transportované prostřednictvím chylomikronů a plazmatické NEFA v poolu, které pocházejí z tukové tkáně (Barrows & Parks 2006). Za normálních fyziologických podmínek inzulín zvyšuje nejen sekreci řady enzymů zapojených do biosyntézy triglyceridů, ale také snižuje a sekreci triglyceridů VLDL a apolipoproteinu B (apoB) (Wang et al. 2015). Při inzulínové rezistenci nedokáže inzulín potlačit zvýšenou lipolýzu, a tak dochází k nadbytečnému toku NEFA do krve. V důsledku toho se v játrech

jedinců rezistentních na inzulín zvyšuje syntéza a ukládání triglyceridů a nadbytek triglyceridů je vylučován jako VLDL (Goldberg & Ginsberg 2006). Apolipoprotein B je klíčovou složkou metabolismu lipidů, jeho vysoké plazmatické hladiny jsou rizikovým faktorem pro aterosklerózu, zatímco nízké hladiny mohou působit protektivně (Benn 2009).

### 3.1.4 Hyperglykémie

Hyperglykémie sama o sobě také způsobuje endoteliální dysfunkci. U diabetiků byla prokázána vazodilatace zprostředkovaná oxidem dusnatým pocházejícím z endotelu. Mechanismus této endoteliální dysfunkce vyvolané hyperglykemií zahrnuje zvýšený tok polyolovou cestou, aktivaci proteinkinázy C (PKC), pokročilou tvorbu koncových produktů glykosylace (AGE) a zvýšený tok do hexozaminové cesty. Každý z těchto mechanismů je příčinou hyperglykemií zvýšené produkce superoxidu (Juan F et al. 2005). Spojení hyperglykémie s oxidačním stresem je lépe popsáno dále.

## 3.2 Biomarkery metabolického syndromu

Metabolický syndrom je souhrn metabolických abnormalit, které jedinci podstatně zvyšují rizika vzniku dalších onemocnění. Zatímco patogeneze metabolického syndromu a jeho složek není dobře pochopena, viscerální obezita a inzulínová rezistence jsou považovány za příčinu metabolického syndromu. Většina lidí s metabolickým syndromem trpí inzulínovou rezistencí, což má za následek zvýšené riziko diabetu 2. typu. Jakmile propukne diabetes, riziko na vznik KVO prudce stoupá. Kromě KVO a diabetu 2. typu jsou jedinci s metabolickým syndromem zdánlivě náchylnější i k dalším onemocněním. Cílem je tedy vyvinout panel biomarkerů, které budou poukazovat na vznikající onemocnění ještě před jeho propuknutím. Biomarkery mohou mít více osudů v těle, takže nemůžeme říci, že jeden biomarker samotně je dostatečně citlivý a specifický pro diagnostiku metabolického syndromu.

Je známo, že adipocyty produkují bioaktivní látky, jako jsou adipocytokiny nebo adipokiny. Akumulace adipocytů vede k neřízené produkci adipokinů, což přispívá k rozvoji metabolického syndromu (Ryo et al. 2004). Zdá se, že velkou roli v dysregulaci funkce adipocytů hraje oxidační stres způsobený obezitou. Jedním z mechanismů, kterým obezita produkuje oxidační stres, je mitochondriální oxidace mastných kyselin, které mohou vytvářet reaktivní formy kyslíku (ROS) v oxidačních reakcích. Malondialdehyd (MDA) je konečným produktem peroxidace lipidů. Zvýšené hladiny MDA můžeme nalézt u obézních pacientů s inzulínovou rezistencí. MDA je schopen zvýšit produkci prozánětlivých cytokinů, což vede k systémovému stresu (Raghavan et al. 2012). Kromě MDA je produktem peroxidace polynenasycených mastných kyselin také F-2 isoprostan (F2-IsoPs). Studie ukázala, že hodnota BMI významně koreluje s koncentrací F2-IsoP. Dalším markerem oxidačního stresu je močový 8-iso prostaglandin. Bylo prokázáno, že pozitivně koreluje s obezitou a inzulínovou rezistencí (Fernández-Sánchez et al. 2011).

### 3.2.1 Leptin

Leptin je adipokin, který za normálních fyziologických podmínek působí tak, že snižuje chuť k jídlu, zvyšuje energetický výdej, zvyšuje aktivitu sympatiku, usnadňuje využití glukózy

a zlepšuje citlivost tkáně na inzulín (Dong & Ren 2014). Role leptinu jako biomarkeru metabolického syndromu byla zkoumána na různých populačních skupinách. Bez ohledu na zkoumanou populaci se ukázalo, že zvýšené hladiny leptinu jsou spojeny s metabolickým syndromem. To není překvapivé vzhledem k tomu, že zvýšené hladiny leptinu jsou spojeny s obezitou, inzulínovou rezistencí a infarktem myokardu (Ghantous et al. 2015). Studie provedena na nediabetických mužích nad padesát let, zaznamenala zvýšené hladiny leptinu spojené s metabolickým syndromem. Tato studie zaznamenala silnou korelaci leptinu s velikostí pasu, ale jen slabou korelaci s lipidovým profilem. Při úpravě BMI se hladiny leptinu zlepšily (Gannagé-Yared et al. 2006). Ačkoli v literatuře existují určité neshody o tom, zda je leptin spojen s metabolickým syndromem nezávisle na BMI, všeobecnou shodou je však, že zvýšené hladiny leptinu se vyskytovali u metabolického syndromu, proto může sloužit jako účinný biomarker na screeningovém panelu.

### 3.2.2 Adiponektin

Adiponektin je plazmatický protein odvozený od tukové tkáně s širokou škálou funkcí včetně antiaterogenní, senzibilizace inzulínové dráhy, zvýšení oxidace lipidů, a vazodilataci. Potlačuje téměř všechny procesy podílející se na aterosklerotické vaskulární změně jako je inhibice TNF- $\alpha$  a inhibice OxLDL (Matsuzawa et al. 2004). Má inzulínovou senzibilizační aktivitu, přičemž vyšší hladiny mají ochranný efekt proti diabetu 2. typu u jedinců náchylných k diabetu a nízké hladiny jsou rizikovým faktorem pro budoucí rozvoj diabetu 2. typu. Hladiny adiponektinu jsou nízké u pacientů s hypertenzí a u obézních, naštěstí lze hladiny adiponektinu zvýšit snížením hmotnosti. Studie provedena na dospělých Japoncích ukázala, že hladiny adiponektinu negativně korelují se zvýšeným obvodem pasu, viscerálním tukem, sérovými triglyceridy, plazmatickou glukózou, plazmatickým inzulínem, krevním tlakem a pozitivně korelují se zvýšenými hladinami HDL. Zjistili také, že muži měli nižší hladiny adiponektinu než ženy, což může být jedním z důvodů, proč mají ženy nižší riziko onemocnění koronárních tepen (Ryo et al. 2004).

### 3.2.3 Ghrelin

Ghrelin je neuroendokrinní hormon vylučovaný primárně žaludkem, který stimuluje chuť k jídlu přímo aktivací receptoru GHSR-1a v hypotalamu a nepřímo zvýšením exprese orexigenních peptidů, jako je neuropeptid Y (Cong et al. 2010). Může také chránit kardiovaskulární systém tím, že antagonizuje účinky vazokonstriktorů, jako je endotelin 1, a podporuje účinky vazodilatátorů, jako je oxid dusnatý (Tesauro et al. 2009). Kromě toho může pomoci podporovat lipolýzu prostřednictvím stimulace hypotalamické AMP – aktivované proteinkinázy (AMPK).

Metabolický syndrom je spojen s nižšími hladinami ghrelinu a nižší hladiny ghrelinu jsou spojeny se zvyšující se závažností metabolického syndromu. Tento trend je významný i po zohlednění věku a pohlaví, i když se ukázalo, že hladiny ghrelinu jsou vyšší u žen než u mužů (Pulkkinen et al. 2010). Souvislost mezi nízkým obsahem ghrelinu a metabolickým syndromem může být vysvětlena vztahem k obezitě, protože obézní pacienti s metabolickým syndromem mají nižší hladiny ghrelinu než neobézní. Kromě toho mezi obézními pacienty jsou hladiny ghrelinu nižší u pacientů rezistentních na inzulín ve srovnání s obézními pacienty bez

inzulinové rezistence (McLaughlin et al. 2004). Hladiny ghrelinu v plazmě jsou sníženy u zdravých potomků pacientů s diabetem 2. typu, což naznačuje genetickou složku regulace ghrelinu (Pulkkinen et al. 2010).

### 3.2.4 Inhibitor plazminogenového aktivátoru -1 (PAI-1)

PAI-1 je hlavním ze čtyř inhibitorů serinových peptidáz, které řídí remodelaci extracelulární hmoty a fibrinolýzu. Váže se na tkáňové plazminogeny a deaktivuje je. Konkrétně se jedná o tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA) a aktivátor plazminogenu urokinázového typu (uPA). Primární funkcí tPA je katalýza přeměny plasminogenu na plasmin a tím se podílí na rozpouštění krevních sraženin, přičemž jeho aktivita je regulována fibrinem. uPA je zapojena do remodelace tkáně a buněčné migrace, uPA receptory na buňkách regulují jeho aktivitu. PAI-1 tedy může inhibovat intravaskulární fibrinolýzu a proteolýzu spojenou s buňkami (Binder et al. 2002)

Za fyziologických podmínek je PAI-1 secernován do krevního oběhu a extracelulárního prostoru endoteliálními buňkami, adipocyty, buňkami hladkého svalstva cév, krevními destičkami a hepatocyty. Při patologii je sekrece PAI-1 ovlivněna mnoha prozánětlivými a prooxidačními faktory. Například při zvýšené hladině TNF- $\alpha$ , růstového faktoru (TGF- $\beta$ ), angiotensinu II, glukokortikoidů a inzulínu, jsou adipocyty stimulovány ke zvýšení hladiny PAI-1. Hypoxie a ROS také zvyšují hladiny PAI-1. Zvýšené hladiny PAI-1 následně ovlivňují cévy, zánětlivou reakci, adipozitu a inzulínovou rezistenci (Kraja et al. 2007). Vysoké hladiny PAI-1 jsou spojeny s trombotickými stavy jako je infarkt myokardu a hluboká žilní trombóza. Předpokládá se, že to souvisí s inhibicí degradace fibrinu a přestavby cévní stěny (Paganelli 1999). Hladiny PAI-1 silně korelují se složkami metabolického syndromu, jako je BMI, inzulínová rezistence a hladina triglyceridů. Zároveň hladiny PAI-1 stoupají se závažností metabolického syndromu (Kraja et al. 2007). PAI-1 nejspíše nesouvisí s dyslipidémií, ale spíše s distribučním fenotypem adipocyty, a to hlavně s viscerální tukovou tkání a tukem v játrech. Také byly zaznamenány rozdíly mezi pohlavími, přičemž vztah byl silnější u mužů než u žen (Alessi & Juhan-Vague 2006). Hladiny PAI-1 klesají s nižším příjmem kalorií, ztrátou hmotnosti, snížením tělesného tuku a při zlepšení inzulínové senzitivity (Binder et al. 2002).

### 3.2.5 Kyselina močová

Kyselina močová je degradační produkt katabolismu purinů, tvoří se v játrech a vylučována je primárně ledvinami a sekundárně střevem. Extracelulárně má kyselina močová antioxidační vlastnosti a je odpovědná až za 2/3 celkové antioxidační kapacity plazmy, kde chelatuje kovy a vylučuje kyslíkové radikály. Avšak intracelulárně má prozánětlivou a prooxidační aktivitu. Můžeme ji použít jako marker oxidačního poškození u stavů, jako je jaterní ischemie, ateroskleróza, diabetes a chronické srdeční selhání (Billiet et al. 2014). Za ischemie nebo v důsledku poškození tkáně oxiduje lipidy, což má za následek zánět, který narušuje zpětný transport cholesterolu (McGillicuddy et al. 2009). Snižuje také dostupnost oxidu dusnatého, což má za následek menší vazodilataci a vznik více forem ROS. Ve spojení s její schopností stimulovat monocyty k produkci TNF- $\alpha$  tak vytváří prozánětlivý stav vyskytující se u metabolického syndromu, což by mohlo vysvětlovat vznik systémového zánětu (Billiet et al. 2014).



Hyperurikémie je rizikovým faktorem pro aterosklerotické příhody, jako je infarkt myokardu, mrtvice, a je spojena s dalšími kardiovaskulárními rizikovými faktory, jako je hypertenze, dyslipidémie a viscerální obezita. Zjištěna byla také pozitivní korelace močové kyseliny s BMI, krevním tlakem a triglyceridy, zato negativní korelace s HDL cholesterolem (Ishizaka et al. 2005). Mezi dietní příčiny hyperurikémie patří i nadměrná konzumace fruktózy prostřednictvím sacharózy nebo kukuřičného sirupu. Metabolismus fruktózy je zprostředkován enzymem zvaným fruktokináza. Tento krok metabolismu fruktózy je závislý na přísunu ATP a postrádá mechanismus negativní zpětné vazby, takže v případě nadměrné konzumace fruktózy se ATP rychle vyčerpá, což vede ke katabolismu velkého množství defosforylovaných sloučenin adenosinu. Katabolismus značného množství defosforylovaných purinů vede ke zvýšení hladiny kyseliny močové (Khitani & Kim 2013).

Odhaduje se, že jedinci s vysokou kyselinou močovou mají 1,6krát vyšší pravděpodobnost na rozvoj metabolického syndromu (Chen et al. 2007). Využití kyseliny močové jako biomarkeru metabolického syndromu ve slinách se zdá být stejně efektivní jako séru. Jedná se tedy o neinvazivní a levnou metodu pro diagnostiku a monitorování metabolického syndromu (Soukup et al. 2012)

### **3.2.6 Interleukin-6 (IL-6)**

Interleukin-6 je prozánětlivý cytokin, který hraje roli v přirozené zánětlivé odpovědi. Je často vylučován makrofágy jako součást zánětlivé reakce na infekci nebo poranění. U metabolického syndromu je často přítomna dysfunkce adipocytů a ta je spojena se zvýšením populace makrofágů v tukové tkáni. To může vést ke zvýšené sekreci IL-6 a dalších prozánětlivých cytokinů z tukové tkáně. Tyto prozánětlivé cytokiny pak mohou působit prostřednictvím řady buněčných signálních drah, včetně mTOR a PKC, což vede k vyvolání inzulínové rezistence. Díky svým zánětlivým vlastnostem se podílí na poškození endoteliálních buněk v cévách, což vede k vaskulární dysfunkci a ateroskleróze. Kromě toho může IL-6 způsobit odchylku v aktivaci inzulínového receptoru, což má za následek abnormality v signalizaci inzulínu, účinku inzulínu a metabolismu glukózy (Aroor et al. 2013).

Zvýšené hladiny IL-6 jsou spojeny s metabolickým syndromem a zvyšující se hladiny jsou spojeny s progresí metabolického syndromu, který je spjat s hypertriglyceridemií, hypertenzí a hladinou glukózy nalačno (Weiss et al. 2013). Jako biomarker je IL-6 spojen s každou ze složek metabolického syndromu, což naznačuje, že se jedná o důležitý faktor v progresi metabolického syndromu. Ve studii na postmenopauzálních ženách byl zvýšený IL-6 spojen s abdominální obezitou, nízkým HDL a vysokými hladinami triglyceridů (Chedraui et al. 2014). In vivo studie na zvířatech prokázaly účinek IL-6 na inzulínovou signalizaci. Podávání IL-6 myším vedlo ke zhoršené inzulínové signalizaci ve svalové a jaterní tkáni, což vedlo k hyperglykémii a inzulínové rezistenci (Kim et al. 2004).

### **3.2.7 Interleukin-10**

Interleukin-10 (IL-10) je převážně protizánětlivý cytokin, který řídí průběh systémového zánětu. Je produkován monocyty a makrofágy, jednou z jeho funkcí je napomáhat podpoře normální remodelace tkáně po zánětlivé reakci. Jednou z cest, jimiž IL-10 zmírňuje zánětlivou odpověď, je inhibice NADPH oxidázy a tím i oxidačního stresu, který vzniká v důsledku tohoto

enzymu. IL-10 tak může obnovovat normální inzulínovou signalizaci za pomoci inhibice NADPH oxidázy nebo antagonickým působením proti IL-6 a TNF- $\alpha$  (Aroor et al. 2013)

Průřezová populační studie provedena na starších dospělých prokázala, že nízké hladiny IL-10 jsou spojeny s inzulínovou rezistencí a diabetem 2. typu. Studie dále zjistila, že hladiny IL-10 nepřímo úměrně korelují s hladinami celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, triglyceridy, krevní glukózou a pozitivně korelovaly s hladinami HDL cholesterolu (van Exel et al. 2002). Ve studii na myších s indukovanou inzulínovou rezistencí prokázalo podávání IL-10 ochranu před narušenou inzulínovou signalizací, která vznikla v důsledku podávání IL-6. Tím se obnovila inzulínová senzitivita i metabolismus glukózy v jaterní a svalové tkáni (Kim et al. 2004).

### 3.2.8 Oxidovaný lipoprotein s nízkou hustotou (OxLDL)

Oxidovaný LDL je produktem oxidace lipidů a můžeme ho využít jako marker oxidačního stresu. Oxidace lipidů přispívá k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Produkty oxidace lipidů, ROS a OxLDL v nízkých koncentracích slouží jako signální sloučeniny pro dráhy buněčných antioxidantů, jako je hemoxygenáza a glutathion. Pokud je však antioxidační kapacita buňky narušena, jak je často u metabolického syndromu, pak tyto sloučeniny přispívají k oxidačnímu stresu, který nakonec vede k poškození buňky a apoptóze (Landar et al. 2006). Kromě kardiovaskulárních onemocnění jsou zvýšené hladiny OxLDL u dospělých spojeny s obezitou a inzulínovou rezistencí, což jsou dvě běžné složky metabolického syndromu (Kelly et al. 2010). Ukázalo se, že hladiny OxLDL jsou významně zvýšené u pacientů s metabolickým syndromem a tyto zvýšené hladiny jsou dále spojeny se sníženou arteriální elasticitou, což je rizikový faktor pro rozvoj ICHS (Pohjantähti-Maaroos et al. 2010).

### 3.2.9 Paraoxonáza

Paraoxonáza-1 (PON-1) je víceúčelový antitoxický a antioxidační enzym, předpokládá se, že přispívá k antioxidačním a protizánětlivým vlastnostem HDL. Zejména může snižovat peroxidaci lipidů, chránit LDL a tkáň před oxidačním stresem (Yilmaz 2010). Snížené hladiny PON-1 jsou spojeny s centrální obezitou a metabolickým syndromem. Kromě toho byly nižší hladiny PON-1 spojeny s hypertenzí, hypertriglyceridemií, inzulínovou rezistencí, poruchou glukózové tolerance a zvýšeným oxidačním stresem (Krzystek-Korpacka 2013).

## 3.3 Vliv oxidačního stresu na rozvoj diabetu mellitus 2. typu

Volné radikály jsou vedlejší metabolické produkty a velmi reaktivní chemické sloučeniny obsahující jeden nebo více nepárových elektronů. Existují různé formy volných radikálů, jako jsou reaktivní formy kyslíku (ROS), kam patří hydroxylový radikál ( $\text{OH}^\cdot$ ), superoxid ( $\text{O}_2^\cdot$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a kyselina chlorná ( $\text{HOCl}$ ), stejně tak existují i reaktivní dusíkaté radikály jako je oxid dusnatý ( $\text{NO}$ ), oxid dusičitý ( $\text{NO}_2$ ) a neradikální peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), z nichž jsou všechny spojeny s diabetickými komplikacemi (Forbes et al. 2008). Nízké hladiny volných radikálů jsou nezbytné k regulaci mnoha buněčných fyziologických aktivit, zatímco nadměrné hladiny ROS a RNS vedou k oxidačnímu stresu a poškozují buněčné makromolekuly (Valko et al. 2007).

Hyperglykémie u prediabetu může vést k oxidativnímu stresu a zvýšené sekreci prozánětlivých faktorů, které v konečném důsledku vedou k vaskulární dysfunkci. Aby se zabránilo rozvoji komorbidit, je nezbytné určit mechanismy, které se podílejí na progresi z prediabetu na diabetes. Oxidační stres vede k poruše vychytávání glukózy ve svalových a tukových buňkách, čímž snižuje sekreci inzulínu z beta buněk (Rudich et al. 1998). Existuje souvislost mezi prevalencí inzulínové rezistence a koncentrací markeru oxidativního stresu, močového 8epi-prostaglandinu (Meigs et al. 2007).

### 3.3.1 Zdroje reaktivních forem kyslíku u prediabetu

#### 3.3.1.1 Mitochondriální oxidace

Mitochondriální dýchání je hlavním buněčným zdrojem ROS a tato produkce je vyvážena antioxidační kapacitou složek jako je superoxidodismutáza, glutathionperoxidáza, kataláza a dalšími. V hyperglykemických stavech se ROS mohou akumulovat a vést k nespécifickému oxidativnímu poškození DNA, proteinů a dalších molekul. Hyperglykémie vede ke zvýšené produkci ROS aktivací dráhy proteinkinázy C (PKC) prostřednictvím diacylglycerolů (DAG), hexozaminové cesty, produktů pokročilé glykace (AGE) a polyolové cesty (Chong et al. 2017). Mitochondriální oxidační stres je spojen s inzulínovou rezistencí, T2DM a jeho komplikacemi. Snížení mitochondriálního oxidačního stresu vede ke zlepšené glukózové toleranci a inzulínové rezistenci na modelu obézních myší (Jeong et al. 2016).

**Tvorba diacylglycerolu a aktivace PKC**-Proteinkináza C je serin-threonin proteinkináza sestávající z 15 izoform, které fosforylují cílové proteiny za účelem modulace buněčného růstu, stárnutí a apoptózy. Aktivitu PKC lze regulovat několika prvky, jako jsou ionty  $Ca^{2+}$ , fosfatidylserin a zejména diacylglycerol (DAG), který je schopen aktivovat 9 izoform PKC (Land & Rubin 2017). Hyperglykémie u diabetických pacientů stimuluje de-novo syntézu DAG z meziprojektu metabolismu glukózy, triosafosfátu. Zvýšená tvorba DAG vede k nadměrnému zesílení aktivace PKC. Vysoce aktivní PKC indukuje nadprodukcii ROS inhibicí glykolytického enzymu GAPDH, což zase zvyšuje dostupnost triosafosfátu pro tvorbu DAG (Brinkmann et al. 2011).

**Hexozaminová cesta**-Hexozaminová cesta se podílí na metabolismu fruktózy-6-fosfátu vzniklého v glykolýze. Hexozaminová biosyntetická signální dráha (HBP) zhoršuje diabetické komplikace vyvolané hyperglykemií tím, že snižuje produkci NO a podporuje možnou transkripci některých tkáňových růstových faktorů (TGF- $\alpha$  a TGF  $\beta$ 1). Zpočátku GFAT, enzym omezující rychlost této dráhy, katalyzuje přeměnu fruktózy-6-fosfátu na glukosamin-6-fosfát. Následně je glukosamin-6-fosfát metabolizován na uridindifosfát N-acetylglukosamin, který je primárním substrátem pro posttranslační modifikace několika proteinů. Hyperglykémie a zvýšená oxidace volných mastných kyselin stimuluje HBP zvýšením produkce fruktózy-6-fosfátu. Zvýšený HBP narušuje endoteliální funkci, protože postranslační změny na serinových a threoninových zbytcích omezují fosforylaci PKB/eNOS v endoteliálních buňkách a taky snižují produkci NO (Federici et al. 2002).

**Polyolová cesta**-Polyolová cesta je malým, ale důležitým procesem v metabolismu sacharidů, při kterém reductáza aldóz redukuje glukózu na sorbitol pomocí NADPH. Zvýšené koncentrace intracelulární glukózy spotřebovávají velké množství NADPH, který je nezbytným kofaktorem pro produkci redukovaného glutathionu (GSH). Snížená regenerace GSH způsobuje oxidační stres v důsledku nadprodukce ROS, protože GSH hraje významnou roli při vychytávání ROS. Zvýšené ROS hrají roli při diabetickém poškození koncových orgánů, zejména endoteliální dysfunkci zprostředkovanou oxidativním stresem. Mnoho tkání jako jsou nervy, glomeruly, cévy exprimují aldózoreduktázou, a tak mohou být poškozeny diabetickou hyperglykemií (Srivastava et al. 2005). Druhým enzymem je sorbitol dehydrogenáza (SDH), který katalyzuje přeměnu sorbitolu na fruktózu. Podobně jako u reductázy aldóz aktivace polyolové dráhy v hyperglykemickém stavu zvyšuje aktivitu SDH, což vede k tvorbě velkého množství fruktózy, která se snadno fosforyluje a hydrolyzuje na glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyaceton-3-fosfát. To podpoří tvorbu AGE prekurzoru (methylglyoxalu) prostřednictvím autooxidace a aktivaci PKC dráhy prostřednictvím de novo syntézy DAG (Figuroa-Romero et al. 2008).

### 3.3.1.2 NADPH oxidáza

Jak jsme si popsali již výše, tak hyperglykémie zvyšuje tvorbu ROS, což vede k zánětů cévních stěn, adhezi leukocytů, inzulínové rezistenci, glykaci proteinů, makromolekul a inhibici syntézy NO. Produkce intracelulárního superoxidu je zvýšená různými zdroji, jako je NADPH oxidáza, xantinoxidáza, cyklooxygenáza a nevázaný eNOS (Jansen et al. 2013). NADPH oxidázy hrají stěžejní roli při tvorbě ROS. Nacházejí se téměř ve všech savčích buňkách a jejich fyziologickou úlohou je produkovat ROS pro fungování vrozené imunity, redoxní signalizační kaskády a pro produkci hormonů (Drummond et al. 2011). Léčba obézních myší inhibitorem NADPH oxidázy, snížila peroxidaci lipidů a tvorbou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v tukové tkáni. Plazmatické hladiny adiponektinu se zvýšily, zatímco hladiny glukózy, inzulínu a triglyceridů byly všechny významně sníženy. To můžeme brát jako důkaz, že oxidační stres zhoršuje sekreci inzulínu z pankreatických beta-buněk a vychytávání glukózy v tkáních. Snížení oxidačního stresu tedy může vést ke zlepšení metabolismu glukózy (Furukawa et al. 2004).

### 3.3.1.3 Endoteliální syntáza oxidu dusnatého (eNOS)

eNOS je enzym s kardioprotektivními vlastnosti, zejména díky produkci NO v cévním endotelu. Ačkoli je NO známý především pro svou roli při regulaci cévního tonu, má také antioxidační aktivitu prostřednictvím zvýšené produkce superoxiddismutázy (SOD) (Fukai et al. 2000). Při poruše funkce eNOS přispívá k oxidačnímu stresu produkcí ROS místo NO. Je také známo, že eNOS mají důležité ochranné účinky na myokard. Dysfunkce eNOS tedy podpoří diabetickou kardiomyopatii. (Wan & Rodrigues 2016).

## 3.3.2 Biomarkery oxidačního stresu u prediabetického stavu

Dříve byl oxidační stres považován za jednoduchou nerovnováhu mezi syntézou a vychytáváním ROS. Není tomu tak úplně, protože současné chápání je takové, že zvýšený

oxidační stres zahrnuje také dysfunkci enzymů produkujících ROS (Schramm et al. 2012). Zvýšený oxidační stres hraje roli v patogenezi mnoha onemocnění, jako je ateroskleróza, zánětlivé stavy, endoteliální dysfunkce a má se za to, že hraje roli v progresi prediabetu k diabetu (Konior et al. 2014). Proto je důležité včas detekovat změny oxidačního stresu, aby se zabránilo progresi onemocnění. Vhodným nástrojem k včasné diagnostice se zdají být signální molekuly jako jsou antioxidační systémy, produkty pokročilé glykace, ale i některé lipidy.

### 3.3.2.1 Glutathion

Antioxidační markery by mohly být užitečné při screeningu prediabetu. Jedním z takových markerů je glutathion, může existovat ve dvou formách, redukované (GSH) a oxidované (GSSG). Redukovaná forma Glutathionu je antioxidant a hlavní vychytávač volných radikálů v červených krvinkách, jenž pomáhá předcházet poškození buněk neutralizací ROS. Působí tak, že daruje redukční ekvivalent, jako je  $H^+$ , jiným molekulám, jako jsou ROS. V tomto procesu je GSH oxidován na GSSG. Běžně používaným markerem zvýšeného oxidačního stresu je poměr GSH/GSSG (Owen & Butterfield 2010). Jedinci s prediabetem mají významně snížený poměr GSH/GSSG ve srovnání s kontrolami, což poukazuje na to, že narušený redoxní stav je již přítomen a detekovatelný dříve, než se objeví klinické projevy diabetu (Maschirow et al. 2015).

### 3.3.2.2 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

Přestože hladiny GSH v erytrocytech byly u hyperglykemických a normoglykemických pacientů podobné, sérové hladiny 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (8-OHdG), biomarkeru pro oxidativní poškození DNA a endoteliální dysfunkci, byly významně zvýšeny ve skupině s hyperglykemií. Dále byla pozorována významná korelace mezi sérovým 8-OHdG a aterogenním indexem, což ukazuje na vztah mezi aterosklerotickým rizikem a oxidačním stresem. Preklinická ateroskleróza byla spojena se zvýšeným 8-OHdG u subjektů s hyperglykemií, i když tito jedinci měli normální cholesterol a netrpěli významnou peroxidací lipidů (Al-Aubaidy & Jelinek 2014).

### 3.3.2.3 Lectin-like oxLDL receptor (LOX-1)

LOX-1 je receptor pro oxidovaný LDL, který se nachází hlavně na endoteliálních buňkách, ale vyskytuje se také na buňkách hladkého svalstva cév a makrofázích. Normálně je LOX-1 exprimován v nízkých hladinách u zdravých dospělých. Jeho zvýšený výskyt v patogenezi aterosklerózy i diabetu již byl dokumentován (Hu et al. 2003). Stimulace signálních drah LOX-1 se podílí na proliferaci buněk hladkého svalstva cév a tvorbě pěnících buněk, což jsou makrofágy v aterosklerotických plátech cév. Po navázání oxidovaného LDL na LOX-1 se aktivují membránově vázané NADPH oxidázy (Dunn et al. 2008).

### 3.3.2.4 Produkty pokročilé glykace (AGE)

Konečné produkty pokročilé glykace jsou proteiny nebo lipidy, které se tvoří neenzymatickou glykací v důsledku vystavení hyperglykemickým podmínkám. Předpokládá

se, že hrají důležitou roli při kardiovaskulárních komplikacích diabetu (Guzik et al. 2014). Jak intracelulární, tak extracelulární proteiny jsou přeměňovány na AGE se změněnou funkcí, způsobenou interakcí aminokyseliny s redukujícím sacharidem. Jakmile vzniknou AGE, mohou se vázat na různé AGE receptory (např. RAGE) nebo interagovat se složkami extracelulární matrice, aby podpořily tvorbu ROS, a tak podněcovali vznik oxidačního stresu. Například, jak bylo uvedeno dříve, akumulace glukózy v důsledku hyperglykémie může vést k její autooxidaci, což má za následek tvorbu glyoxalu (Thornalley 1999). Vazba AGE-receptor usnadňuje oxidační stres a také stimuluje další dráhy prooxidačního stresu, jako jsou dráhy PKC (Boyer et al. 2015).

### 3.3.3 Adipocyty jako generátory zánětu a oxidačního stresu

Ačkoliv vývoj metabolického syndromu není prozatím plně objasněn, tak je známo, že se na jeho patogenezi podílí centrální obezita a inzulínová rezistence. Tento stav se vyznačuje zvýšeným rizikem diabetu 2. typu a aterosklerotickým kardiovaskulárním onemocněním. Metabolický syndrom je považován jako prozánětlivý a protrombotický stav, přičemž důležitou roli v jeho patofyziologii hraje tuková tkáň, neboť je v současnosti považována za biologicky aktivní endokrinní i parakrinní orgán (Ryo et al. 2004).

Při zvýšeném energetickém příjmu podléhají adipocyty hypertrofii a hyperplazii, která může vést k přerostení buňky do stavu, kdy buňce nebude stačit vlastní krevní zásobení, což vede až k hypoxickému stavu. Hypoxie progreduje až k nekróze buněk a produkci adipocytokinů, které zahrnují prozánětlivé mediátory IL-6, TNF- $\alpha$  a stejně tak i protrombotický mediátor PAI-1 (Lau et al. 2005). Interleukin-6 je silný zánětlivý cytokin, který hraje zásadní roli v patogenezi inzulínové rezistence a diabetu 2. typu. Zvýšené hladiny IL-6 byly naměřeny v tukové tkáni u pacientů s diabetem, obezitou a zejména u pacientů s rysy metabolického syndromu. Epidemiologické studie prokázaly zvýšené koncentrace IL-6 ve spojení s hypertenzí, aterosklerózou a kardiovaskulárními příhodami. Na myším modelu vedla chronická expozice IL-6 k inzulínové rezistenci s hyperglykemií (Bao 2015). Prozánětlivý cytokin TNF- $\alpha$  pojmenovaný podle své protinádorové aktivity, je významným mediátorem řady kardiovaskulárních patologií, včetně aterosklerózy a srdečního selhání (Azzawi 1999). PAI-1 je inhibitor serinových proteáz s protrombotickým účinkem. Jeho koncentrace jsou výrazně zvýšeny u obézních subjektů s metabolickým syndromem a stejně tak i u pacientů s diabetem 2. typu, zároveň existuje pozitivní korelace mezi závažností MetS a plazmatickou koncentrací PAI-1 (Alessi & Juhan-Vague 2006).

Mechanismus, kterým dochází k narušení regulace adipocytů nebyl prozatím jasně objasněn, ale předpokládá se významná role oxidačního stresu vyvolaného obezitou. Ve studiích byla prokázána pozitivní korelace mezi akumulací tuku a vyšším výskytem ROS, zvýšenou expresí NADPH oxidázy a současně sníženou expresí antioxidantních enzymů. Studie in vitro ukázaly, že kultivované adipocyty se zvýšenými hladinami mastných kyselin vykazovaly zvýšený oxidační stres prostřednictvím dráhy NADPH (Furukawa et al. 2004). Navíc obézní myši léčené inhibitorem NADPH oxidázy vykazovaly sníženou produkci ROS se zlepšením fenotypu diabetu. Markery prooxidačního stavu, které zahrnovali OxLDL a kyselinu močovou, byly u metabolického syndromu zvýšené (Srikanthan et al. 2016).

Produkce protizánětlivého cytokinu adiponektinu je snížena u pacientů s metabolickým syndromem. Adiponektin je vylučován adipocyty a působí při senzibilizaci inzulínu, antiaterogenezi a vazodilataci (Srikanthan et al. 2016). Hladiny adiponektinu jsou negativně ovlivněny plazmatickou koncentrací glukózy, hladinou inzulínu nalačno, obvodem pasu a množstvím viscerálního tuku. Adiponektin inhibuje proaterogenní molekulární dráhy, které zahrnují adhezi monocytů k endoteliálním buňkám (Matsuzawa et al. 2004). Mnoho studií poukazuje na zvýšenou produkci OxLDL u pacientů s metabolickým syndromem, inzulínovou rezistencí a obezitou. OxLDL je jedním z produktů oxidace lipidů, při které vznikají také reaktivní formy kyslíku (ROS). Antioxidační cytokiny, které zahrnují adiponektin jsou u metabolického syndromu výrazně sníženy, což umožňuje OxLDL a ROS aktivovat oxidační kaskádu, která vede k apoptóze a poškození buněk. Při porušení integrity endoteliální buňky se spustí kaskáda, která končí až aterosklerózou (Landar et al. 2006).

### 3.3.4 Oxidační stres vyvolaný hyperglykemií

Selhání hlavních glukózových regulačních mechanismů u diabetu bylo spojeno s oxidačním stresem. Sekrece inzulínu probíhá výhradně beta buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu a zde funguje glukokináza jako senzor obsahu glukózy v oběhu. S rostoucí hladinou glukózy v krvi se zvyšuje rychlost vychytávání glukózy beta buňkami a započne sekrece inzulínu glukokinázou (Schuit et al. 2001). Jakmile je inzulín vylučován do portálního oběhu, je transportován do cílových míst, kde se váže na svůj receptor, aby mobilizoval glukózu do buněk (Stewart et al. 2015).

Ztráta funkce beta-buněk zprostředkovaná oxidativním stresem (zhoršená sekreční kapacita a zvýšená inzulínová rezistence) hraje hlavní roli v patogenezi diabetu 1. i 2. typu. Hyperfunkce mitochondriálního metabolismu vlivem hyperglykémie a produkce ROS v beta-buňkách může způsobit změnu tvaru, objemu a funkce mitochondrií, může tak oddělit K<sup>+</sup> kanály závislé na ATP, což vede k dalšímu narušení sekrece inzulínu závislé na glukóze (Prattichizzo et al. 2018). Oxidativní stres zhoršuje translokaci inzulínem stimulovaného přenašeče glukózy (GLUT4) a aktivitu proteinkinázy B v adipocytech (Rudich et al. 1999)

## 3.4 Diabetes mellitus (DM)

Diabetes mellitus je skupina metabolických onemocnění charakterizovaných chronickou hyperglykemií, která vznikla v důsledku poruchy sekrece nebo funkce inzulínu, popřípadě jako kombinace těchto dvou poruch. Metabolické zvláštnosti vyplývají z důležitosti inzulínu jako anabolického hormonu. Ačkoliv diabetes mellitus většinou probíhá jako asymptomatické onemocnění, tak nekontrolovaný diabetes může vést ke kómatu a pokud není včas léčen, tak i ke smrti v ketoacidóze (Kharroubi 2015). Časná diagnostika a klasifikace hraje významnou roli pro stanovení vhodné léčebné strategie progredujícího onemocnění. Americká diabetická asociace rozdělila diabetes na DM 1. typu, DM 2. typu, ostatní typy a gestační diabetes mellitus (American Diabetes Association 2014).

### 3.4.1 Diabetes mellitus 1. typu (T1DM)

Tento typ diabetu tvoří 5–10 % subjektů s diagnózou diabetu a je způsoben destrukcí  $\beta$  buněk pankreatu. Diabetes 1. typu tvoří 80–90 % diabetu u dětí a dospívajících. Diabetes 1. typu je způsoben hlavně autoimunitní destrukcí pankreatických  $\beta$ -buněk prostřednictvím zánětlivé reakce zprostředkované T-buňkami a také humorální reakcí. Přítomnost protilátek proti buňkám pankreatických ostrůvků je charakteristickým znakem diabetu 1. typu, i když role těchto protilátek v patogenezi onemocnění není dosud jasná (Kharroubi 2015).

### 3.4.2 Diabetes mellitus 2. typu (T2DM)

Diabetes mellitus 2. typu se vyvíjí ve spojení s mnoha genetickými faktory, které vedou ke snížené sekreci inzulínu nebo inzulínové rezistenci umocněné životními návyky, jako je přejídání (zejména dieta s vysokým obsahem tuků), nedostatek pohybu a výsledná obezita nakonec vede k nedostatečnému účinku inzulínu. Předpokládá se, že většina případů zahrnuje více genetických faktorů, přičemž některé z nich jsou již objasněny. Na vzniku diabetes mellitus 2. typu se podílí jak snížená sekrece inzulínu, tak i snížená inzulínová senzitivita, ale podíl jejich postižení se liší podle pacienta. Diabetes mellitus nezávislý na inzulínu je většinou tohoto typu. Funkce pankreatických  $\beta$  -buněk jsou do určité míry zachovány a injekce inzulínu jsou k přežití jen zřídka nutné. Komplikace, jako jsou infekce, však mohou dočasně vést ke ketoacidóze. Za počátek incidence se běžně považuje střední věk nebo starší, ale v poslední době se ukázalo, že tento typ diabetu narůstá u dětí a mladistvých. Povaha diabetu mellitu 2. typu není zjevně jednotná, ale může být dále rozdělena podle přítomnosti nebo nepřítomnosti obezity a rozdílů v míře zapojení snížené sekrece inzulínu nebo snížené inzulínové senzitivity (Seino et al. 2010).

### 3.4.3 Gestační diabetes

Jedná se o poruchu metabolismu glukózy, která je poprvé objevena nebo se rozvine během těhotenství, s výjimkou klinicky diagnostikovaného diabetu mellitus. Etiologie je pravděpodobně založena na společných patogenních mechanismech s typem 1 a typem 2, přičemž těhotenství spouští manifestaci poruchy metabolismu glukózy. Diskutuje se o tom, zda by měl být gestační diabetes mellitus považován za nezávislou etiologickou klasifikaci, ale vzhledem ke své klinické důležitosti, potřebě zvláštního zřetele a odlišným rysům od diabetu v nepřítomnosti těhotenství je považován za samostatnou kategorii. Je tomu tak proto, že těhotenství samo o sobě zhoršuje metabolismus glukózy. Dokonce i poměrně mírná porucha metabolismu glukózy během těhotenství může mít významný vliv na kojence a matku. Poruchy metabolismu glukózy v těhotenství se navíc často po porodu vrátí k normálu, ale riziko rozvoje diabetu v budoucnu je zvýšené u žen, které prodělaly v těhotenství cukrovku (Seino et al. 2010).

## 3.5 Úloha lipidů v etiopatogenezi diabetu mellitus 2. typu

Zhoršenou tkáňovou homeostázu, která je způsobena změnami v metabolismu lipidů, nebo změnami v intracelulární signalizaci, lze široce označit jako lipotoxicitu. Lipotoxicita má potenciál snížit produkci endoteliální NO syntázy (eNOS) a potlačit její katalytickou aktivitu,



což prostřednictvím různých mechanismů vede až k dysfunkci endoteliálních buněk. Mezi mechanismy působící endoteliální dysfunkci můžeme zařadit inzulínovou rezistenci, zánět, oxidační stres nebo akumulaci lipotoxických metabolitů, jako jsou ceramidy (Symons & Abel 2013).

### 3.5.1 Fosfolipidy

Nejhojnějšími fosfolipidy u savců jsou fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin, které jsou součástí membránových lipidů v buňkách. Zdá se, že udržování rovnováhy poměru fosfatidylcholinu ku fosfatidylethanolaminu má důležitou roli v prevenci T2DM. Obezita a s ní související nadbytek mastných kyselin tuto rovnováhu narušuje. Plazmatické lipidomické studie na lidech prokázali souvislost fosfatidylethanolaminu s obezitou, prediabetem a T2DM (Dong et al. 2007).

### 3.5.2 Sphingolipidy

Sfingolipidy patří do skupiny specializovaných lipidů obsahujících ve svém skeletu aminoalkohol, jsou přítomny ve všech savčích buňkách. Původně se předpokládalo, že plní pouze strukturální funkci, ale bylo zjištěno, že určité typy bioaktivních sfingolipidů se podílejí na buněčné signalizaci, zánětu a dalších procesech (Bartke & Hannun 2009). Sfingolipidy lze rozdělit podle délky řetězce, což umožňuje existenci desítek tisíc jedinečných molekul sfingolipidů v jednotlivých buňkách.

#### 3.5.2.1 Sfingosin-1-fosfát (S1P)

S1P je lysofosfolipid s různými biologickými aktivitami. Syntéza sfingolipidu S1P začíná sfingomyelinem nebo glykosfingolipidy, oba jsou lokalizovány v mikroregionech lysozomů a plazmatické membráně. Sfingomyelin a glykosfingolipid degradují za vzniku meziprojektu ceramidu, ceramid se poté přemění na sfingosin a sfingosin je nakonec fosforylován sfingosinkinázou za vzniku S1P. S1P je rozkládán na hexadecenal (Hex) a fosfoethanolamin (PE) za pomoci S1P lyázy a dalších specifických S1P fosfohydroláz. Hex a PE pak vstupují do biosyntetické dráhy triglyceridů. S1P je defosforylován a vstupuje do dráhy syntézy ceramidů. Ceramid je přeměněn přes sfingosin až na S1P, a naopak S1P je defosforylován a katalyzován ceramidsyntázou za vzniku ceramidu (He et al. 2021). S1P může indukovat inzulínovou rezistenci v játrech a svalech, ačkoli S1P stimulovaný adiponektinem je spojen se zlepšenou jaterní inzulínovou senzitivitou (Yang et al. 2018).

Extracelulární S1P může antagonizovat zánětlivé cytokiny indukované uvolňováním mitochondriálního cytochromu c a inhibovat aktivitu kaspázy-3 v buňkách pankreatických ostrůvků, což naznačuje, že S1P může antagonizovat apoptózu  $\beta$  buněk zprostředkovanou zánětlivým faktorem (Laychock et al. 2006).

S1P zlepšuje negativní účinky inzulínové rezistence ve svalech. Účinek S1P na ceramid se odráží ve sfingolipidovém reostatu, což je metabolická dráha mezi ceramidem a S1P. Jak je uvedeno v předchozích odstavcích, S1P může být degradován na ceramid a ceramid může také vytvářet S1P. Ceramid vyvolává inzulínovou rezistenci. Když se však S1P zvýší, znamená to, že se více ceramidu přemění na S1P a tím je účinek ceramidu na vyvolání inzulínové rezistence

značně oslaben. Rovnováha mezi intracelulárním ceramidem a S1P je nezbytná pro rozvoj buněčné inzulinové rezistence (He et al. 2021).

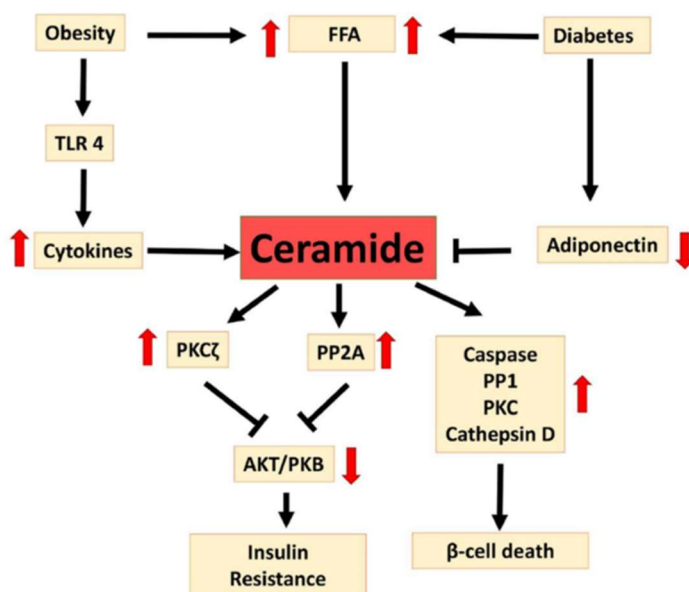
### 3.5.2.2 Ceramidy

V centru sfingolipidového metabolismu stojí ceramid, který může být tvořen třemi hlavními pochody, těmi jsou syntéza de novo, hydrolýza sfingomyelinu (SM) a záchranou cestou za využití komplexních sfingolipidů. Různé cesty syntézy ceramidů určují počáteční lokalizaci a druh vzniklého ceramidu, tím i jeho biologickou aktivitu (Chen et al. 2010).

Plazmatické analýzy obézních jedinců ukazují významně vyšší hladiny ceramidů a palmitátu, palmitoyl-CoA slouží jako prekurzor ceramidu v de novo syntéze (Newgard et al. 2009). U diabetických pacientů jsou vyšší plazmatické hodnoty ceramidů spojeny s dysfunkcí viscerální tukové tkáně a inzulinovou rezistencí, což naznačuje, že plazmatické ceramidy by mohly působit jako biomarkery nastupujícího diabetu (Borodzicz et al. 2015). Studie na modelu obézních zvířat prokázaly zvýšené hladiny serin palmitoyl transferázy a dihydroceramid desaturázy, což poukazuje na zvýšenou aktivitu de novo syntézy ceramidu (Reali et al. 2017). Byly pozorovány vztahy mezi zvýšenými markery poškození jater, obsahem tuku a poměrem CER (d18:1/16:0) / (d18:1/24:0), což bylo již v minulosti spojeno s rizikem KVO (Mucinski et al. 2020). Studie zkoumající význam nasycených mastných kyselin v postranním řetězci ceramidu by mohly poskytnout obraz o vytvoření ceramidů jako biomarkerů. Ceramidy s dlouhými postranními řetězci, jako je C16:0 nebo C18:0, indukují inzulinovou rezistenci a/nebo jaterní steatózu, zatímco ty s velmi dlouhými postranními řetězci ne (např. C24:0 nebo C24:1) (Mandal et al. 2021).

Ceramidy mohou zapříčínovat inzulinovou rezistenci hned několika mechanismy (obrázek 1). V prvním mechanismu ceramid aktivuje PKC, který fosforyluje a inhibuje translokaci PKB do plazmatické membrány. Inhibice translokace PKB interferuje s proteiny glukózového přenašeče, který je závislý na účincích inzulínu a blokuje tak vychytávání glukózy. Ceramidy také stimulují aktivaci cytosolové protein fosfatázy, která slouží pro defosforylaci PKB. Zvýšená akumulace ceramidů v endoplazmatickém retikulu a/nebo mitochondriích zhoršuje působení inzulínu a hraje svou roli v chronickém zánětu u obézních. Lipotoxicita a hyperglykémie způsobují akumulaci ceramidu v  $\beta$ -buňkách pankreatu, což ústí v destrukci  $\beta$ -buněk, které lze zabránit blokováním produkce ceramidu např. cykloserinem. To se zdá být jednou z možných prevencí rozvoje T1DM, jež je způsoben neadekvátní sekrecí inzulínu v důsledku ztráty pankreatických  $\beta$ -buněk (Mandal et al. 2021).

**Obrázek 1** – Vliv ceramidu na inzulínovou rezistenci (Mandal et al. 2021).



### 3.5.2.3 Sfingomyelin

Sfingolipid nejvíce podobný fosfatidylcholinu, je sfingomyelin, který je produkován přenosem fosfocholinové skupiny z fosfatidylcholinu na ceramidovou kostru. Sfingomyelin je nejhojnějším ze sfingolipidů a je nejrozšířenější skupinou vyskytující se v cirkulujícím LDL (Meikle et al. 2015). Sfingomyeliny obsahující nasycené acylové řetězce jsou spojovány s obezitou, inzulínovou rezistencí a sníženou funkcí jater u mladých obézních dospělých (Hanamatsu et al. 2014).

### 3.5.2.4 Dihydroceramidy (dhCer)

Epidemiologické studie zaměřené na souvislosti mezi sfingolipidy a markery diabetu ukazují, že zvýšení dhCer předchází zvýšení Cer. Se současným snížením, které lze pozorovat při dietě, cvičení a zavedení farmakologické léčby T2DM. Při srovnání se štíhlými nediabetiky jsou hladiny dhCer zvýšeny u obézních tak i neobézních diabetiků. Jako jeden z nejlepších prediktorů diabetu se zdá být dhCer C18:0, přičemž ti, kteří do 10 let progredovali z nediabetika na diabetika, měli na začátku vyšší dhCer C18:0. Zahnutí dhCer C18:0 do skóre lipidomického rizika predikovalo budoucí diabetes 2. typu nezávisle na prediabetech s přesností 76 %. Proto by profilování lipidů dhCer u obézních pacientů mohlo být nástrojem pro predikci nástupu prediabetu a diabetu v populaci (Magaye et al. 2019).

### 3.5.3 Diacylglyceroly (DAG)

DAG může být produktem hydrolýzy triacylglycerolu, hydrolýzy fosfolipidů nebo de novo syntetizován z monoacylglycerolu. Struktura a lokalizace závisí na jejich původu. 1,3-DAG a 2,3-DAG pocházejí z lipolýzy TAG a vyskytují se většinou ve formě lipidových kapiček, zatímco 1,2-DAG vznikají esterifikací a hromadí se většinou v membránách. DAG syntetizovány de novo hydrolýzou kyseliny fosfatidové jsou přítomny v endoplazmatickém retikulu (Prentki & Madiraju 2008).

Studie poukazují na potenciální mechanismy podílející se na inzulínové rezistenci vyvolané DAG. DAG aktivují isoformy PKC, které snižují fosforylaci tyrosinu, jejímž důsledkem je snížení aktivace PI3-kinázy. Ze studií na zvířecích modelech vyplývá, že obsah DAG ve svalu vysvětluje inzulínovou rezistenci u obezity a T2DM (Erion & Shulman 2010). Jednotlivé skupiny DAG ve svalu vykazují rozdílné účinky vzhledem k délkách řetězců FA a počtu dvojných vazeb. Některé skupiny DAG jsou hojně zastoupeny v lidském kosterním svalu (C16:0/C18:0, C16:0/C18:1 a C18:0/C18:0) Dohromady tyto tři druhy DAG představovaly přibližně 80 % z celkového počtu DAG (Amati et al. 2011). Ačkoliv se data o účincích jednotlivých DAG ve studiích liší, je zřejmé, že celkový obsah DAG má vzhledem k lipotoxicitě nižší vypovídající hodnotu, než jednotlivé isomery a zastoupení mastných kyselin, byť jsou zastoupeny v menší míře.

#### **3.5.4 Triacylglyceroly (TAG)**

Triglyceridy spolu s mastnými kyselinami cirkulují v krvi a poskytují zdroj energie pro srdce, kosterní svaly i další tkáně. V těle je většina hmoty tukové tkáně tvořena triglyceridy. Hypertriglyceridemické stavy mohou vznikat při nadměrné produkci VLDL a/nebo neúčinné lipolýze. V obou případech se TAG účastní výměny neutrálních lipidů (triglyceridů a cholesterylesterů) s LDL a HDL, což vede k obohacování LDL a HDL triglyceridy. Následným působením jaterní lipázy se částice LDL stávají malými, hustými a aterogenními. Při podobné lipolýze ztrácejí částice HDL část svých apolipoproteinů a podléhají katabolismu v ledvinách. Celkově to vede ke zvýšení hladin triglyceridů, LDL a nízkým hladinám HDL, které jsou součástí dyslipidémie spojené s diabetem a inzulínovou rezistencí (Alexopoulos et al. 2019).

## 4 Metodika

### 4.1 Zkoumaný vzorek

Pro analýzu lipidického spektra a oxidačního stresu ve svalové tkáni byl použit kosterní sval musculus gastrocnemius odebraný od potkaních samců. Celkem bylo analyzováno 28 vzorků kosterního svalu, z čehož 14 kontrolních vzorků bylo od potkanů kmene Wistar a 14 vzorků pocházelo z potkanů kmene HHTg. Polovina z každé skupiny měla stáří 3 měsíce a druhá polovina 12 měsíců.

Chov byl držen na pracovišti Centra experimentální medicíny IKEM Praha. Zvířata byla krmena ad libitum standardní laboratorní dietou (maintenance diet for rats and mice; Altromin, Lage, Germany). Studie probíhala v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání (311/1997 Sb.) a byla schválena etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny.

#### 4.1.1 Kmen hereditárně hypertriglyceridemických potkanů

Jedná se o unikátní neobézní kmen Hereditárně Hypertriglyceridemických potkanů (HHTg), byl použit jako experimentální model prediabetu a metabolického syndromu. Kmen HHTg potkanů byl začátkem 90. let vyšlechtěn z potkanů kmene Wistar na metabolickém pracovišti IKEM a vykazuje prakticky všechny symptomy metabolického syndromu – geneticky determinovanou hypertriglyceridémií, inzulinovou rezistenci periferních tkání, hyperinzulinémií, zhoršenou glukózou toleranci a mírnou hypertenzi (Zicha et al 2006). Vedle výrazného zvýšení hladin sérových triglyceridů jsou zvýšené hladiny NEFA a dochází k ektopické akumulaci lipidů zejména v játrech, která představuje 10% hmotnosti jater a vede k rozvoji nealkoholové jaterní steatózy. Ektopická akumulace lipidů a lipotoxických intermediátů – diacylglycerolů a ceramidů v kosterních svalech poškozuje inzulinovou signalizaci, zhoršuje účinek inzulinu a přispívá k rozvoji inzulinové rezistence svalové tkáně u tohoto kmene potkanů. Na druhou stranu zvířata nevykazují zvýšené hladiny cholesterolu. HHTg kmen neobsahuje znaky obezity ani hyperglykémii, jedná se pouze o zhoršenou glukózovou toleranci. Z těchto důvodů představuje jedinečný experimentální model vhodný pro studium prediabetických komplikací (Hüttl et al. 2021)

#### 4.1.2 Kontrolní skupina

Jako kontrolní skupina byl použit kmen potkanů Wistar (W). Potkani Wistar zahrnují řadu malých podkmenů, které byly odvozeny ze společné linie za posledních 50 let. Outbrední kmeny Wistar jsou v Evropě široce používány pro preklinické hodnocení bezpečnosti, jako jsou např. testy karcinogenity (McCormick 2017).

## 4.2 Příprava vzorku

### 4.2.1 Materiální vybavení

#### 4.2.1.1 Přístrojové vybavení

- Kapalinový chromatograf Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) s hmotnostním detektorem o vysokém rozlišení TripleTOF 5600 (AB Sciex, Ontario, Canada).
- Analytická váha (Kern ABT 220-5DNM o rozlišení 0.00001 g)
- Centrifuga
- Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem TSQ Vantage (Thermo Scientific, USA) spojený s kvarterní pumpou Accela 600 (Thermo Scientific, USA) a autosamplermem Accela Open AS (Thermo Scientific, USA).

#### 4.2.1.2 Chemikálie

- BHT
- Metanol
- Chloroform
- Demi voda
- Octan amonný
- Acetonitril
- Isopropanol

### 4.2.2 Homogenizace tkáně

Po vytažení z mrazáku byly tkáně naporcovány (příloha 1), zváženy a vloženy do tekutého dusíku ve zkumavkách Eppendorf s vytvořeným otvorem uprostřed víčka. Jednotlivé hluboce zmražené vzorky byly rozdrceny pomocí keramického tloučku na prášek v třecí misce chlazené nalitým tekutým dusíkem (příloha 2). Jemný prášek byl z třecí misky kvantitativně přemístěn do polypropylenové centrifugační zkumavky o objemu 15ml (příloha 3).

### 4.2.3 Extrakce lipidů

Okamžitě po homogenizaci byl přidán vychlazený methanol s 1mM BHT a chloroformem (v poměru 1 MeOH: 2 CH<sub>3</sub>CL) přímo ke vzorku. Celkový objem (μl) přidaného rozpouštědla odpovídal 20násobku hmotnosti navážky (mg). Vzorky byly inkubovány po dobu 30minut na ledu za občasného vortexování. Poté byla přidána ledově studená voda k docílení konečného poměru chloroform/methanol/voda (8:4:3) a opět byla ponechána inkubovat na ledu dalších 10 minut. Centrifugační zkumavka byla centrifugována 5 minut při 8000 otáčkách za minutu a 4°C. Centrifugací byla oddělena organická vrstva od vodné (příloha 4). Automatickou pipetou byla poté přenesena organická vrstva (spodní) do samostatné zkumavky Eppendorf, aniž by došlo ke kontaminaci organické fáze vrstvou proteinů. Pro zvýšení přesnosti byla provedena reextrakce zbylé vodné vrstvy extrakčními roztoky a byly zopakovány veškeré kroky. Organická

fáze byla vysušena pod dusíkem při pokojové teplotě. Vysušený lipidový extrakt byl uskladněn při -80 °C až do dne analýzy.

V den analýzy byly vzorky rekonstituovány v ACN/IPA/H<sub>2</sub>O (65:30:5) obsahujícím 5 mM octanu amonného a 5 ul bylo injikováno do systému LC-MS.

#### **4.2.4 Necílená lipidomická analýza**

Byla použita modifikace metody pro necílenou analýzu lipidů, podle dříve publikované práce. Pro chromatografickou separaci lipidů byla použita kolona Kinetex 2,6 $\mu$ m C18 100 A Column - 150 x 3 mm (Phenomenex, USA). Mobilní fáze A byla ACN/H<sub>2</sub>O (60:40) a mobilní fáze B IPA/ACN (90:10), obě obsahovaly 10 mM octanu amonného (Xuan et al. 2018).

Rychlost průtoku byla 0,26 ml/min. Teplota kolony byla nastavena na 55 °C. Eluční gradient začal s 32 % B a byl udržován po dobu 1,5 minuty, pak se lineárně zvýšil na 85 % B v 15,5 minutě a poté na 97 % B v 15,6 minutě a byl tak udržován po dobu 2,4 min. Gradient byl vrácen zpět na 32 % B v 18,1 min a udržován po dobu 1,9 min, aby se ekvilibrovala kolona. Teplota autosampleru byla nastavena na 10 °C (Xuan et al. 2018).

HPLC-MS/MS analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) s využitím hmotnostního detektoru s vysokým rozlišením TripleTOF 5600 (AB Sciex, Ontario, Canada). Hmotnostní spektrometr pracoval s kapilárním napětím 3,5 kV v kladném módu a 3,0 kV v záporném módu. Teplota kapiláry byla nastavena na 300 °C. Normalizovaná srážková energie byla nastavena na 25, 35, 45 eV, v tomto pořadí. Rozsah skenování byl nastaven na 133,4-1000 m/z (Xuan et al. 2018).

#### **4.2.5 Analýza biomarkerů prozánětlivého stavu a oxidačního stresu**

Pro analýzu oxidačních biomarkerů byl využit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem TSQ Vantage (Thermo Scientific, USA) spojený s kvarterní pumpou Accela 600 (Thermo Scientific, USA) a autosamplerem Accela Open AS (Thermo Scientific, USA).

Pro měření derivatizovaných prostanoidů byla použita HPLC kolona Gemini C18-NX, 150 x 2,0 mm, 5  $\mu$ m (Phenomenex, USA).

### **4.3 Zpracování výsledků a statistická analýza**

#### **4.3.1 SCIEX OS**

Pro pseudo cílenou byla využita data z necílené analýzy. Na základě dříve publikovaných prací byly vybrány matečné (Q1) a dceřiné ionty (Q3) lipidických látek signifikantních u pacientů s diabetem a zadány do softwaru SCIEX OS. Ten na základě hmot Q1 a Q3 vybral data požadovaných látek z necílené analýzy.

SCIEX OS je software pro hmotnostní spektrometr. Slouží ke kvantifikaci a zefektivňuje pracovní postupy v LC-MS/MS analýze. Automatizační nástroje zjednodušují manipulaci a snižují potíže s manuální interakcí a optimalizací. Nové proprietární algoritmy ušetří značné množství času při kontrole dat a zvýší přesnost získaných výsledků.

### 4.3.2 MarkerView

Lipidy jsou efektivně identifikovány a kvantifikovány v softwaru LipidView. Poté lze trendy exprese lipidů vizualizovat napříč všemi biologickými vzorky pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) v softwaru MarkerView. Hlavní komponentní variabilní seskupení sdružuje lipidy podle svých podobných kvantitativních profilů.

Obecný screening využívající necílený přístup závislý na datech umožňuje výzkumníkům profilovat velké množství komponent napříč vzorky, aby bylo možné charakterizovat rozdíly. Pomocí vyhledávání v knihovně nejprve rychle identifikuje metabolity a poté provede analýzu hlavních složek ve vzorcích. Snadno se dá také využít analýza pomocí t-testu a umožňuje seřadit významně rozdílné metabolity podle hodnoty p.

### 4.3.3 MetaboAnalyst

MetaboAnalyst je komplexní platforma určená pro analýzu metabolomických dat prostřednictvím uživatelsky přívětivého webového rozhraní. MetaboAnalyst umožňuje zpracování nevyhodnocených MS spekter, komplexní normalizaci dat, statistickou analýzu, funkční analýzu, metaanalýzu a také integrativní analýzu s dalšími omickými daty. Cílem je umožnit vysoce výkonnou analýzu pro cílenou i necílenou metabolomiku.

MetaboAnalyst v současné době podporuje analýzu metabolických drah a vizualizaci pro 26 modelových organismů, včetně člověka, myši, krysy, krávy, kuřete, kvasinek, *E. coli*. atd. s více než 1600 metabolickými cestami. Současně je schopen analyzovat geny a metabolity, které jsou předmětem zájmu, v kontextu metabolických drah.

### 4.3.4 Statistica

Statistica je analytický software obsahující prostředky pro správu dat, jejich analýzu, vizualizaci a vývoj uživatelských aplikací. Software zahrnuje řadu postupů pro analýzu dat, správu dat, vizualizaci dat a dolování dat; stejně jako různé prediktivní modelování, shlukování, klasifikace a průzkumné techniky.

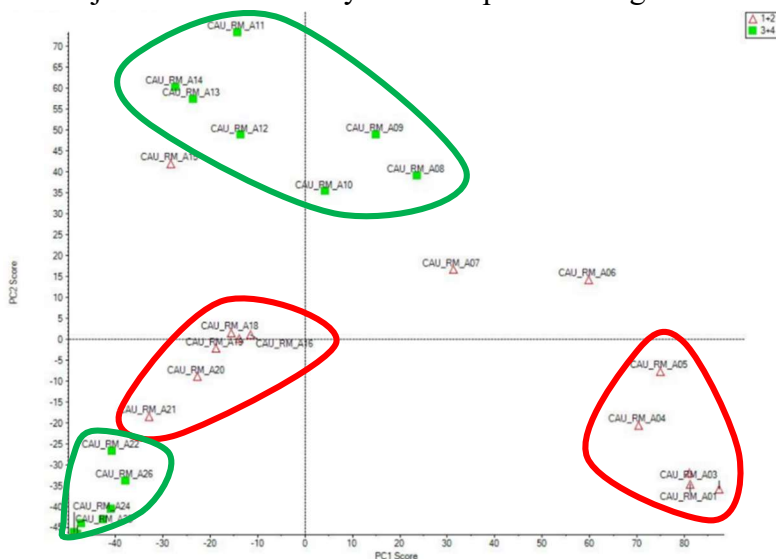
Pro vzájemné srovnávání naměřených hodnot a hledání statisticky významného rozdílu mezi potkany kmene Wistar a HHTG byly provedeny testy statistické významnosti. K tomu využitým statistickým nástrojem byl t-test. Ten lze spolehlivě použít, pokud máme dostatečný počet vzorků a ve výsledcích se nevyskytuje příliš mnoho odlehlých hodnot. Za hranici statistické významnosti jsme si stanovili  $p < 0,05$ .



## 5 Výsledky

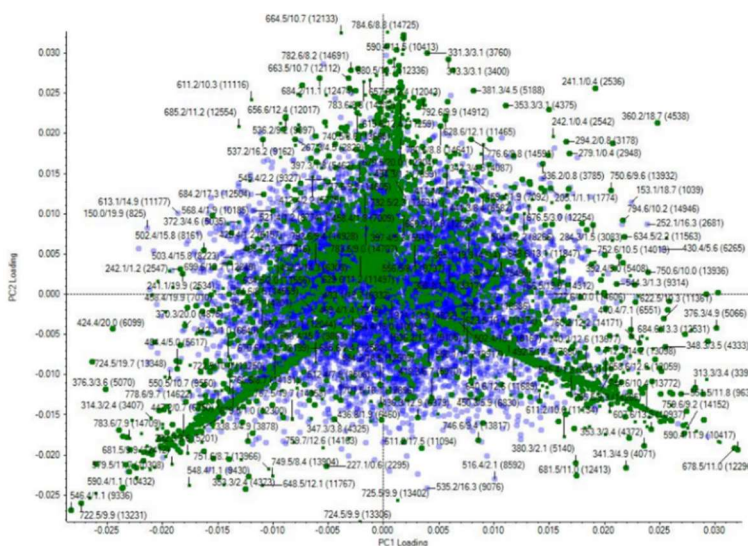
### 5.1 Lipidomická analýza

Při necílené analýze bylo nalezeno značné množství features (m/z / RT), přičemž 10 % z nich se vyskytovalo nad hladinou významnosti ( $p < 0,05$ ). Ze souhrnu potencionálně rozdílných látek naměřených při necílené analýze byla provedena analýza hlavních komponent, která prokázala jasnou segregaci daných skupin k sobě. Na obrázku 2 je vidět porovnání mladých a starých HHTg potkanů (skupina 3+4), oproti kontrolním mladým a starým potkanům kmene Wistar (skupina 1+2). Z grafického záznamu vyplývá, že jednotlivci v dané skupině si jsou podobní a zároveň jsou znatelné rozdíly mezi skupinou HHTg a Wistar.



**Obrázek 2:** grafické znázornění segregace kmene HHTg potkanů oproti kmeni Wistar

Při analýze rozložení látek ve skupině (látky jsou vyjádřeny v hodnotách m/z) se ukázala větší konzistentnost v zastoupení jednotlivých látek u kontrolní skupiny (modrá). Zato u skupiny HHTg (zelená) nebylo složení látek tak konzistentní a vyskytovali se zde ve větší míře odchýlené hodnoty (Obrázek 3).



**Obrázek 3:** Zastoupení jednotlivých analytů ve skupinách

Z potencionálně rozdílových látek ( $p < 0,05$ ) byla pomocí softwaru MetaboAnalyst vygenerována necílená metabolická analýza, která na základě porovnání dat s databází vyhodnotila jednotlivé narušené metabolické pochody. Celkově bylo nalezeno 7 významně narušených metabolických cest (obrázek 4). Vzhledem k etiopatogenezi T2DM vyhodnotil MetaboAnalyst jako narušené metabolické dráhy syntézy sfingolipidů, CoA a metabolismus tyrosinu. Dále vyhodnotil jako významně narušený metabolismus xenobiotik, syntézu ubiquinonů a glykosaminoglykanu.

Pathway Name	Total	Hits (all)	Hits (sig.)	Expected	P-value	Gamma P
Pantothenate and CoA biosynthesis	17	5	3	0.71551	0.02818	0.0010393
Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	8	2	2	0.33671	0.023701	0.0017344
Sphingolipid metabolism	9	2	2	0.3788	0.023701	0.0017344
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	9	3	2	0.3788	0.063978	0.002889
Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	21	11	3	0.88387	0.23498	0.0053589
Drug metabolism - other enzymes	27	5	2	1.1364	0.17336	0.006725
Tyrosine metabolism	42	6	2	1.7677	0.23494	0.0095475

**Obrázek 4: Narušené metabolické dráhy**

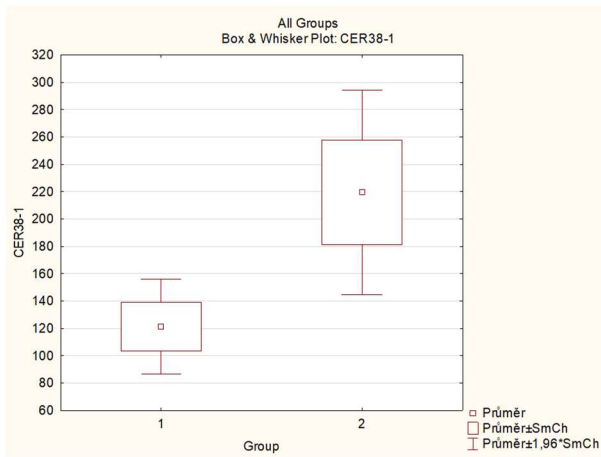
Z dat naší necílené analýzy jsme vybrali 51 potencionálně nejsignifikantnějších lipidů vzhledem k etiopatogenezi T2DM, přičemž u skupiny HHTg byly signifikantně vyšší hladiny sfinganinu (graf 7), fosfatidylethanolaminu (graf 6), triacylglycerolů (grafy 3, 4, 5), diacylglycerolu (graf 2) a ceramidu (graf 1) oproti kontrolní skupině. Skupina HHTg a kontrol se signifikantně ( $p < 0,05$ ) lišila v hodnotách 7 lipidů (tabulka 1) z 51 celkově pozorovaných, což odpovídá 13,7 %. Signifikantní lipidy byly v průměru 1,66krát zvýšeny u skupiny HHTg, což poukazuje na dyslipidémii u metabolického syndromu.

Proměnná	Průměr (W)	Průměr (HHTg)	t	p	Poč.plat (W)	Poč.plat. (HHTg)
CER38-1	121,20	219,42	-2,33494	0,027538	14	14
DAG40-5	1722,96	3525,57	-2,17384	0,039009	14	14
TG53:1	665,10	1067,51	-3,59466	0,001333	14	14
TG55:2	436,82	726,29	-2,58903	0,015557	14	14
TG56:2	304,98	476,33	-2,60514	0,014991	14	14
PE-O 36:6	58110,36	86564,68	-2,15742	0,040393	14	14
Sphinganine (d18:0)	13,78	20,09	-2,17303	0,039077	14	14

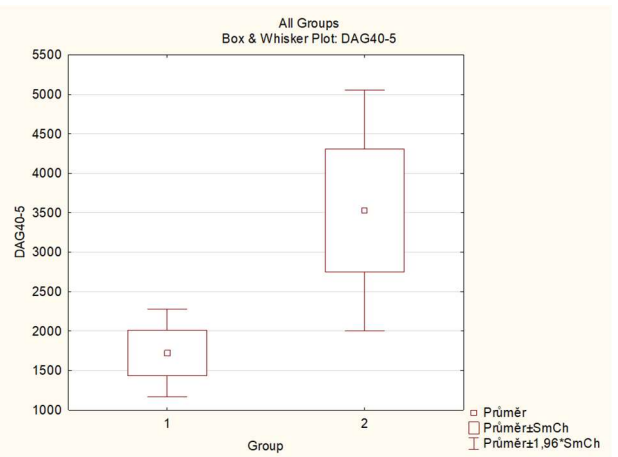
**Tabulka 1: Rozdílové lipidy mezi skupinou HHTg a kontrol**

### 5.1.1 Grafické znázornění výsledků měření

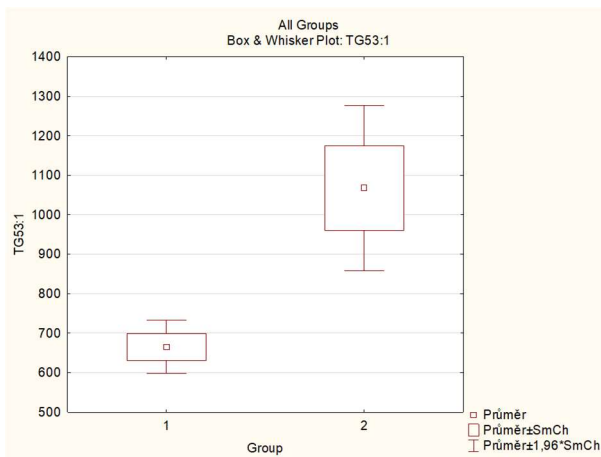
V následujících 7 grafech jsou znázorněny hodnoty všech lipidů, jejichž rozdíl mezi oběma skupinami byl statisticky významný ( $p < 0,05$ ). Každý graf je nahoře opatřen zkratkou pro daný lipid. Číslo 1 pod grafem značí kontrolní skupinu a číslo 2 potkany kmene HHTg. Na svislé ose jsou uvedeny rozptyly ploch píků. U všech grafů je viditelný rozptyl, průměr a směrodatná chyba.



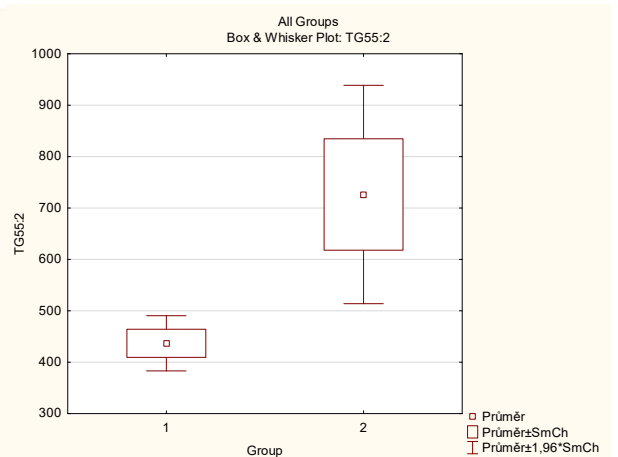
**Graf 1:** Krabicový graf Cer 38:1 ( $p=0,0275$ )



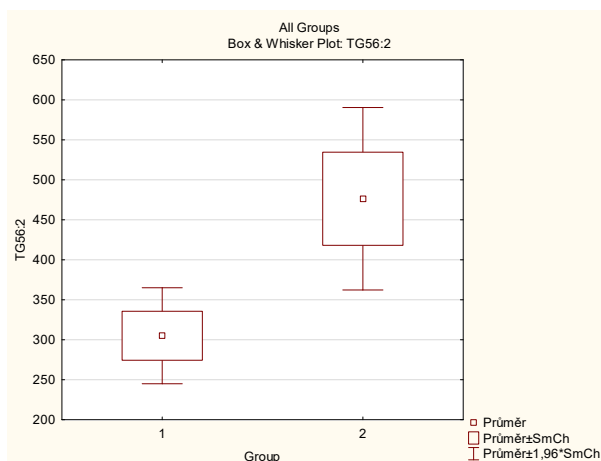
**Graf 2:** Krabicový graf DAG 40:5 ( $p=0,0390$ )



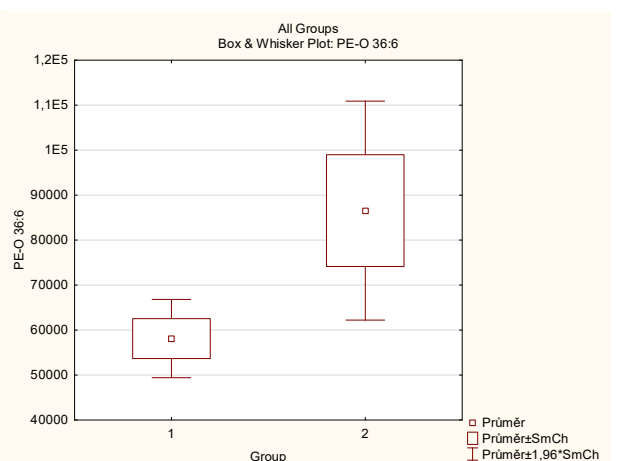
**Graf 3:** Krabicový graf TG 53:1 ( $p=0,0013$ )



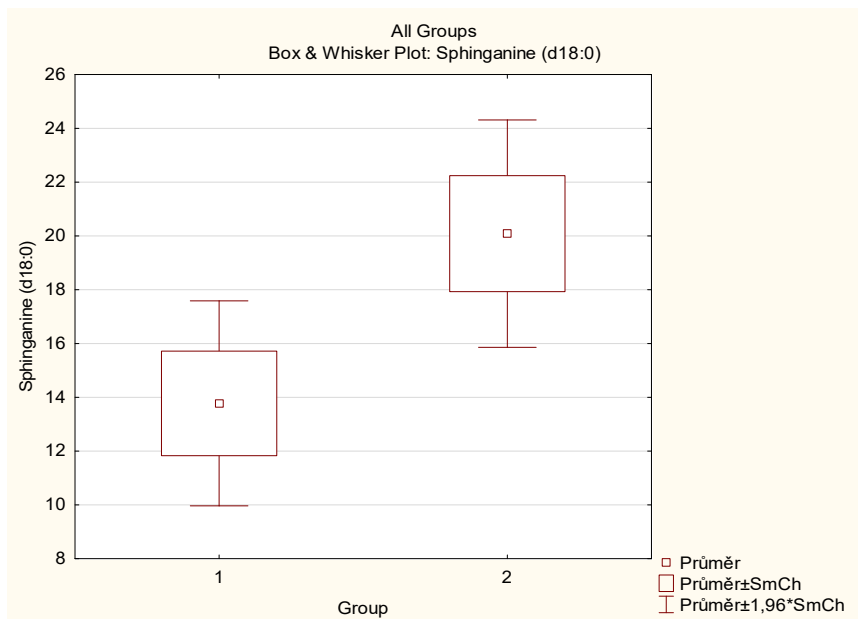
**Graf 4:** Krabicový graf TG 55:2 ( $p=0,0155$ )



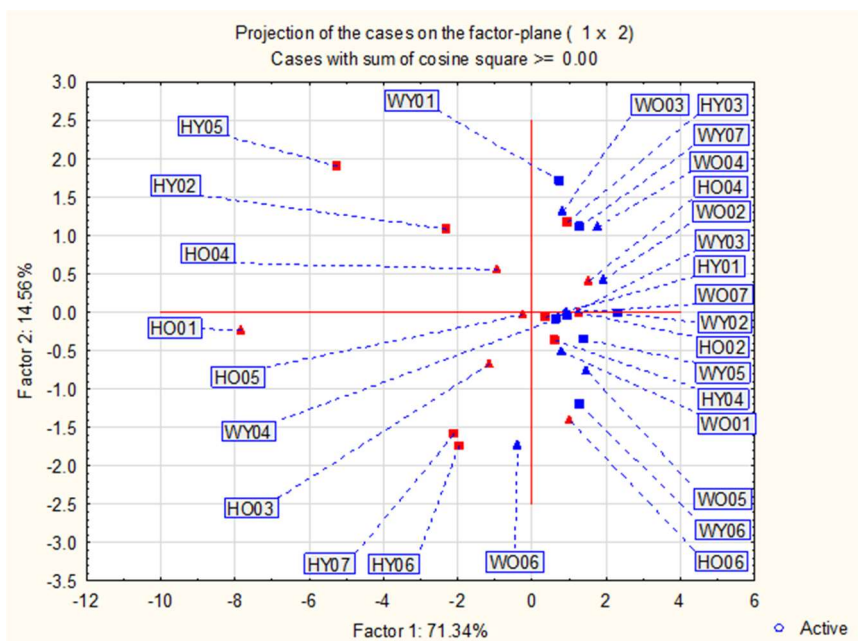
**Graf 5:** Krabicový graf TG 56:2 ( $p=0,0149$ )



**Graf 6:** Krabicový graf PE-O 36:6 ( $p=0,0403$ )



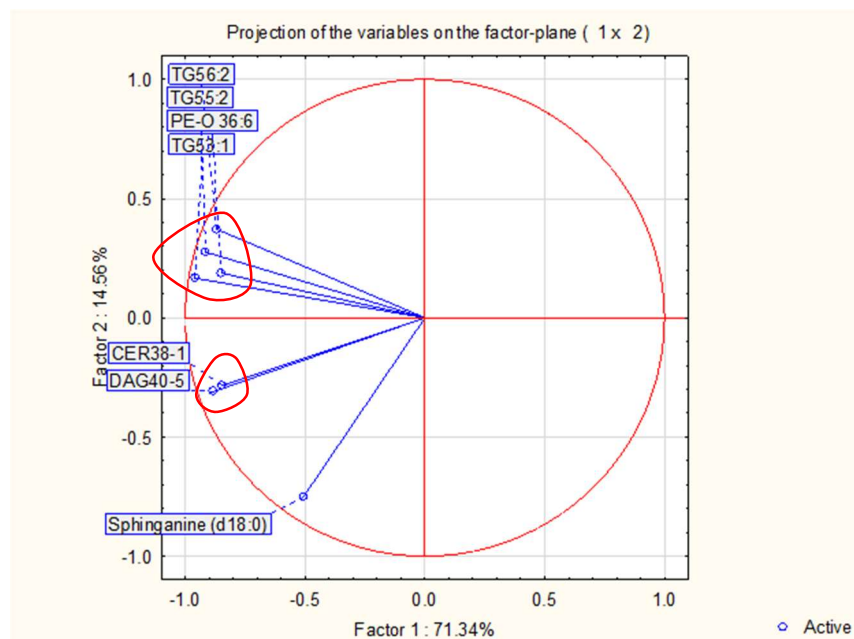
**Graf 7:** Krabicový graf Sfinganin d18:0 ( $p=0,0390$ )



**Graf 8:** PC analýza z tabulky 1

### 5.1.2 Závěr lipidomické analýzy

Ze získaných dat lze vyvodit, že existují statisticky významné rozdíly v lipidickém spektru mezi kmenem hereditárně hypertriglyceridemických potkanů a kmenem potkanů Wistar. V necílené metabolomické analýze byla nalezeny narušené metabolické dráhy směřující k diabetu. Všechny naměřené lipidy, které dosáhly hladiny statistické významnosti (Tabulka 1), byly zvýšené ve skupině s metabolickým syndromem, což odpovídá informacím z literatury o hyperlipidémii jako rizikovým faktoru inzulinové rezistence. Dané lipidy byly konzistentně více zastoupeny u skupiny HHTg (graf 9).



**Graf 9:** Segregace jednotlivých komponent z tabulky 1

## 5.2 Analýza biomarkerů oxidačního stresu a zánětu

Analýza následujících hodnot (tabulka 2) poukazuje na zvýšené hladiny biomarkerů oxidačního stresu a prozánětlivého stavu u skupiny s metabolickým syndromem oproti kontrolní. Signifikantně rozdílné koncentrace biomarkerů oxidačního stresu byly nalezeny u malondialdehydu (graf 10), kde nárůst u skupin HHTg průměrně činil 123 %, koncentrace 8-isoprostanu (graf 11) se zvedly o 133 % a u 4-hydroxynonenalu (graf 12) vzrostly koncentrace u skupiny HHTg o 159 %. Interleukin 10 (graf 13) byl v stanoven jako významný proti zánětlivý faktor, vykazoval negativní korelaci se systémovým zánětem a jeho pokles u skupiny HHTg činil 30 %. Jako markery probíhajícího zánětu byly vybrány leukotrien B4 (graf 14) a interleukin 6, který vykazoval signifikantní nárůst koncentrace (o 150 %) u HHTg potkanů.

Proměnná	Průměr W	Průměr HHTg	t	p	Poč.plat W	Poč.plat. HHTg
MDA/ng/g	25,44286	31,27857	-5,6052	0,000007	14	14
8-isoprostane pg/g	26,25000	34,90000	-8,6468	0,000000	14	14
4-hydroxynonenal ng/g	18,43571	29,33571	-9,3177	0,000000	14	14
IL-6 pg/g	39,61429	58,22857	-10,4306	0,000000	14	14
IL-10 pg/g	58,85714	41,61429	10,2048	0,000000	14	14
LTB4 pg/g	37,38571	58,42143	-9,8527	0,000000	14	14

**Tabulka 2:** Rozdíly v koncentracích biomarkerů zánětů mezi skupinami HHTg a Wistar.

Cílem následujících hodnocení (tabulka 3, tabulka 4) je prokázat závislost změny koncentrace biomarkerů na stáří potkanů. Data vždy pochází od stejného kmene potkanů. Jednu skupinu tvoří potkani o stáří 3 měsíce a druhou potkani staří 12 měsíců. Cílem bude tedy prokázat, zda majoritní roli v oxidačním stresu a systémovém zánětu hraje progradující metabolický syndrom nebo stoupající věk potkana.

V tabulce 3 jsou porovnání mladí potkani kmene Wistar (WY) oproti starým potkanům kmene Wistar (WO). Hladiny všech biomarkerů oxidačního stresu byly zvýšeny vždy u starší

populace potkanů z kontrolní skupiny. Koncentrace markerů oxidačního stresu (grafy 15, 16,17) se u starší skupiny zvýšily o 120 % a reflektovali tak přirozený pokles antioxidační kapacity organismu. I přesto, že se hladiny zvýšily, tak metabolický syndrom prokazoval větší podíl na oxidačním poškození. Zánětlivý faktor IL-6 (graf 25) se zvýšil u starší skupiny o 127 % a však hladiny LTB4 nevykazovali významné rozdíly mezi mladou a starou populací. U Koncentrace protizánětlivého IL-10 (graf 18) stouply o 7 % u starší skupiny.

Proměnná	Průměr WY	Průměr WO	t	p	Poč.plat WY	Poč.plat. WO
MDA/ng/g	23,47143	27,41429	-6,75654	0,000020	7	7
8-isoprostane pg/g	24,28571	28,21429	-4,73131	0,000487	7	7
4-hydroxynonenal ng/g	16,00000	20,87143	-4,36988	0,000912	7	7
IL-6 pg/g	34,82857	44,40000	-5,82667	0,000081	7	7
IL-10 pg/g	60,87143	56,84286	4,52355	0,000697	7	7
LTB4 pg/g	36,01429	38,75714	-1,45049	0,172555	7	7

**Tabulka 3:** Porovnání vlivu věku na změnu koncentrace biomarkerů u kontrolní skupiny.

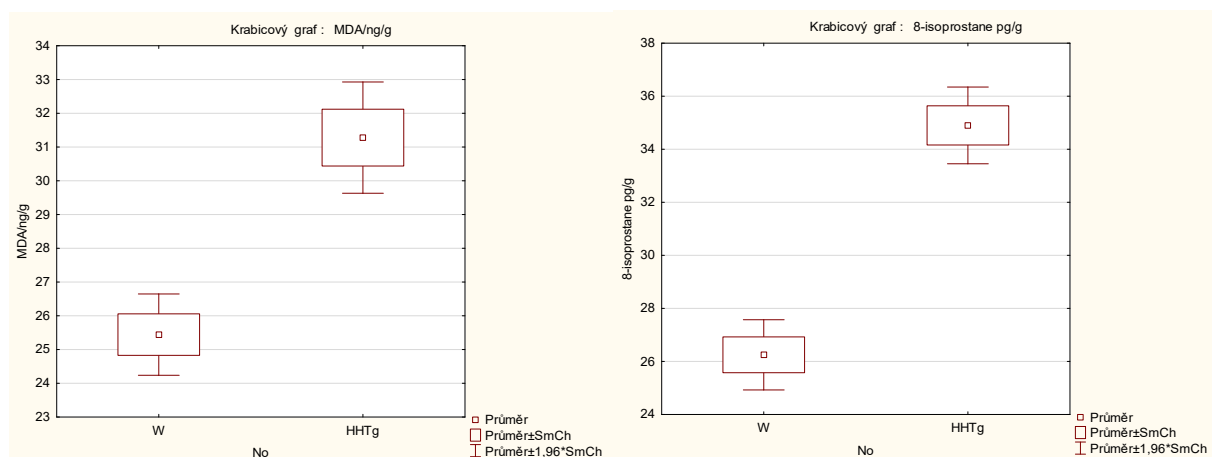
Z následujících statistik (Tabulka 4) lze vydedukovat, že již při vzniklém metabolickém syndromu hraje věk minimální roli ve zvýšení hladin biomarkerů. U markerů oxidačního stresu (grafy 19, 20) vyšly pouze 2 látky jako statisticky významné a průměrný nárůst u starší skupiny s MetS činil 119 %. Nárůst prozánětlivých markerů činil (grafy 21, 23) 115 % a protizánětlivý IL-10 (graf 22) poklesl u starší populace o 21 %.

Proměnná	Průměr HHTgY	Průměr HHTgO	t	p	Poč.plat HHTgY	Poč.plat. HHTgO
MDA/ng/g	28,52857	34,02857	-7,48314	0,000007	7	7
8-isoprostane pg/g	33,70000	36,10000	-1,74994	0,105631	7	7
4-hydroxynonenal ng/g	26,81429	31,85714	-6,56184	0,000027	7	7
IL-6 pg/g	55,65714	60,80000	-4,57483	0,000638	7	7
IL-10 pg/g	46,50000	36,72857	6,48640	0,000030	7	7
LTB4 pg/g	52,57143	64,27143	-5,74844	0,000092	7	7

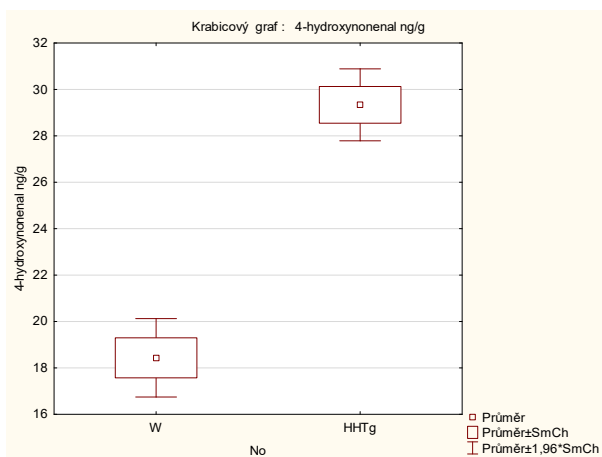
**Tabulka 4:** Porovnání vlivu věku na změnu koncentrace biomarkerů u HHTG potkanů

### 5.2.1 Grafické znázornění výsledků měření biomarkerů

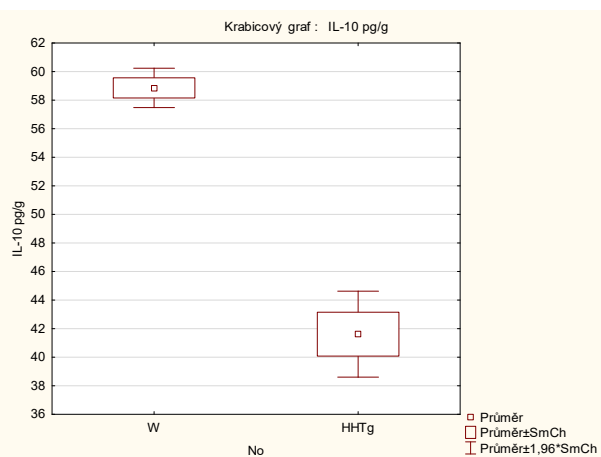
V následujících 14 grafech jsou znázorněny hodnoty všech biomarkerů, jejichž rozdíl koncentrací mezi oběma skupinami byl statisticky významný ( $p < 0,05$ ).



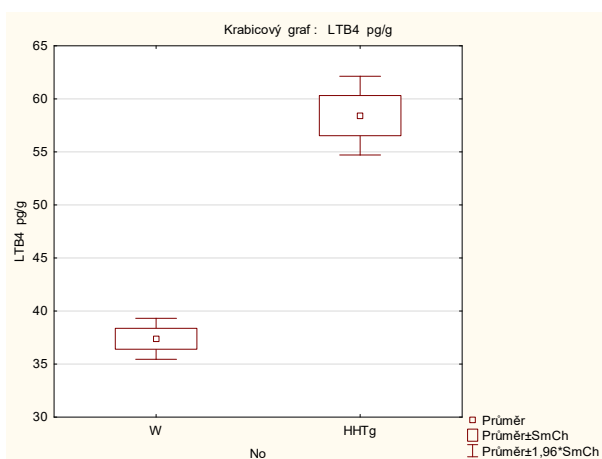
**Graf 10:** Krabicový graf MDA (HHTg/W) **Graf 11:** Krabicový graf 8-Isoprostane (HHTg/W)



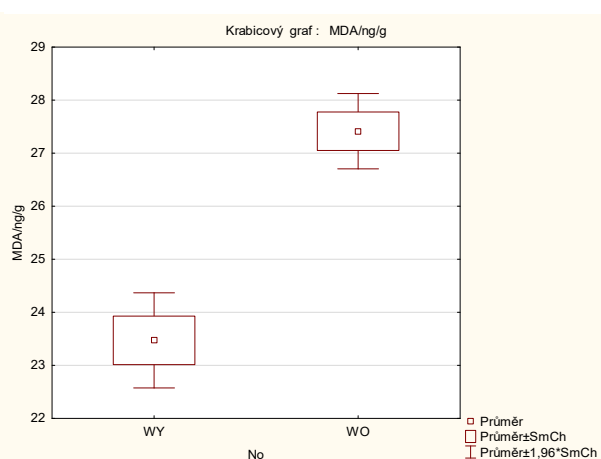
**Graf 12:** Krabicový graf 4-HNE (HHTg/W)



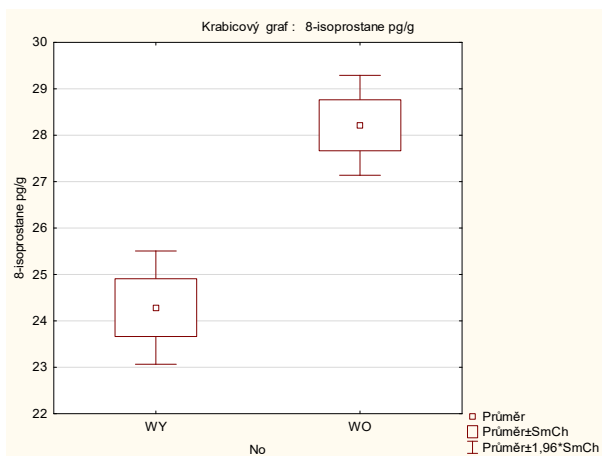
**Graf 13:** Krabicový graf IL-10 (HHTg/W)



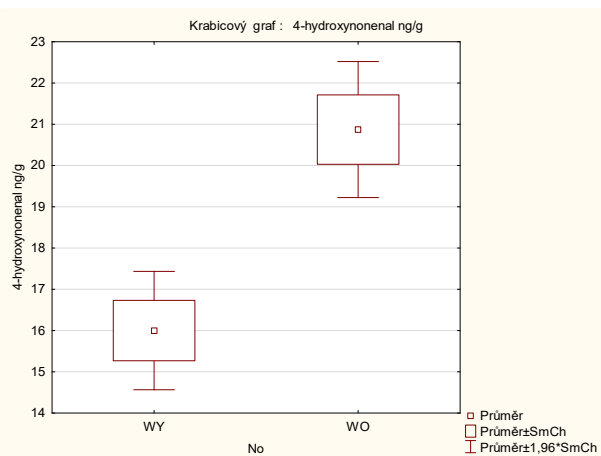
**Graf 14:** Krabicový graf LTB4 (HHTg/W)



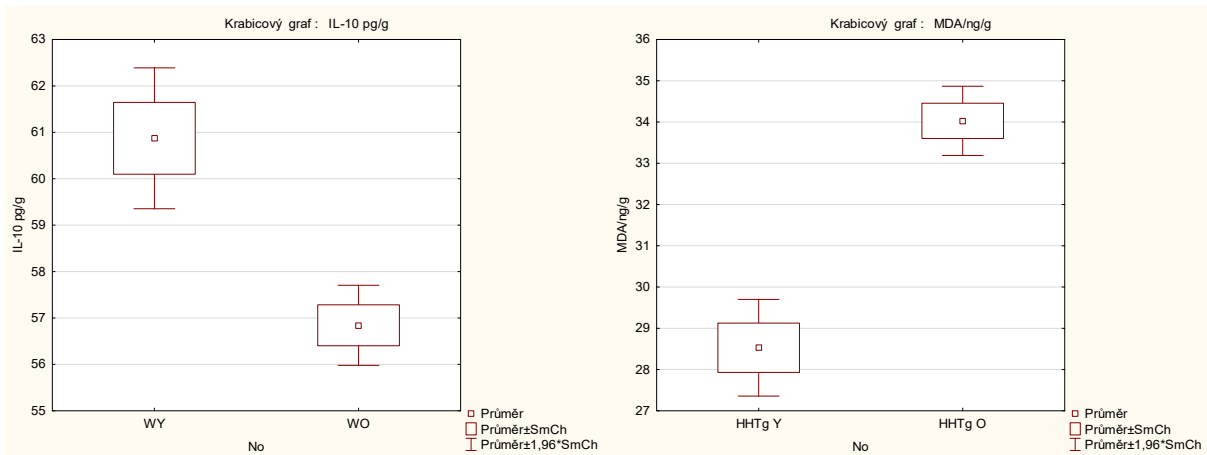
**Graf 15:** Krabicový graf MDA (WY/WO)



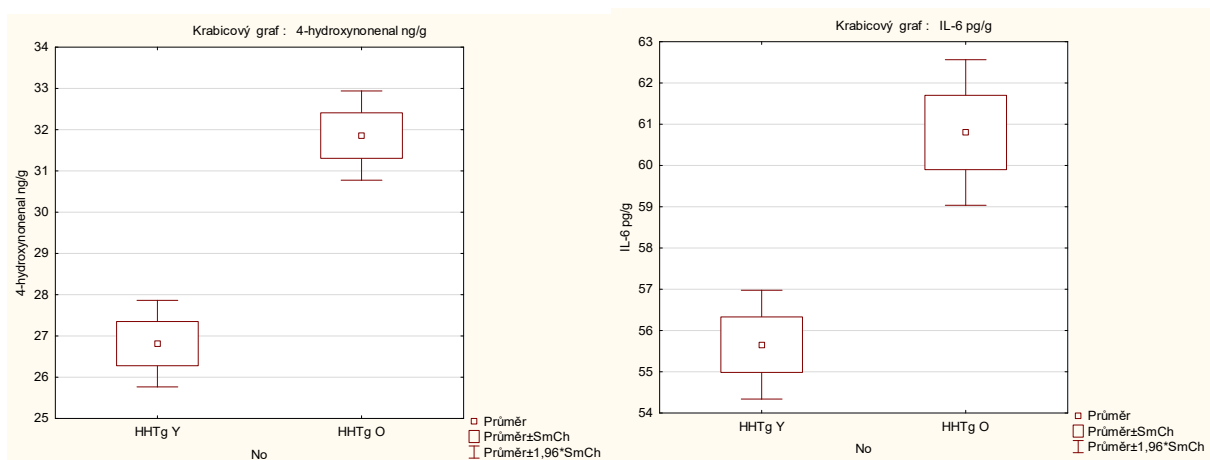
**Graf 16:** Krabicový graf 8-IP (WY/WO)



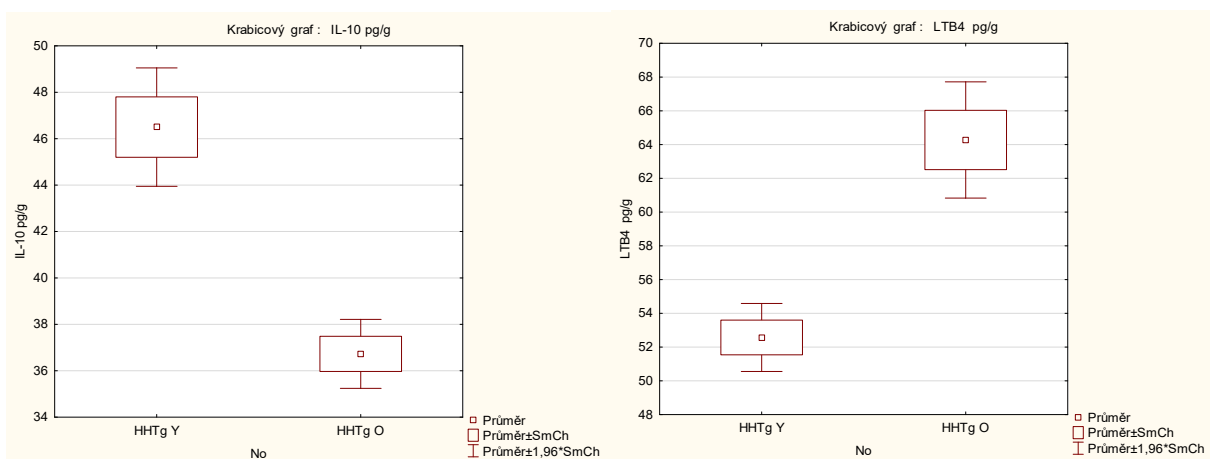
**Graf 17:** Krabicový graf 4-HNE (WY/WO)



**Graf 18: Krabicový graf IL-10 (WY/WO) Graf 19: Krabicový graf MDA (HHTg)**

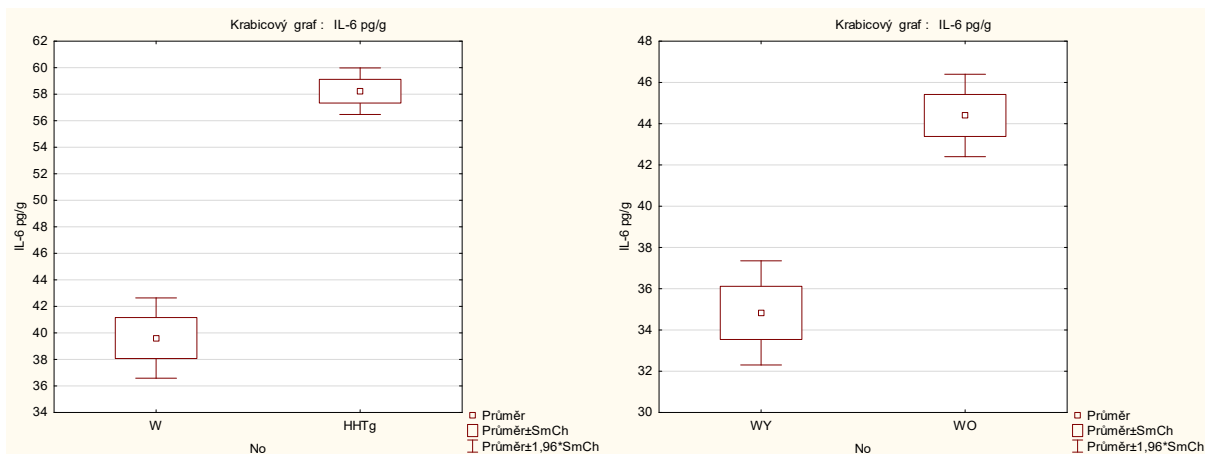


**Graf 20: Krabicový graf 4HNE (HHTg) Graf 21: Krabicový graf IL-6 (HHTg)**



**Graf 22: Krabicový graf IL-10 (HHTg) Graf 23: Krabicový graf LTB4 (HHTg)**





**Graf 24: Krabicový graf IL-6 (HHTg/W) Graf 25: Krabicový graf IL-6 (WY/WO)**

### 5.2.2 Vyhodnocení analýzy biomarkerů

Ze získaných dat můžeme prokázat vyšší prooxidační i zánětlivý stav u potkanů s metabolickým syndromem, přičemž vliv metabolického syndromu se zdá být stěžejním. Vliv věku je slabší a méně citlivý vzhledem k oxidačnímu stresu.

## 6 Diskuse

### 6.1 Lipidomická analýza

Experimentální část této diplomové práce byla zaměřena na sledování změn lipidického spektra mezi skupinou potkanů s metabolickým syndromem a kontrolní zdravou skupinou potkanů. Ze získaných dat lze vyvodit jasnou korelaci mezi progresí metabolického syndromu směrem k diabetu a zastoupením specifických lipidů ve svalové tkáni. Dané lipidy se průměrně vyskytovali v 1,66krát vyšších hladinách u skupin HHTg oproti kontrolním. Jelikož výsledky mezi vzorky byly konzistentní, dalo by se uvažovat o zařazení daných lipidů mezi biomarkery nastupujícího T2DM. Experiment byl proveden na kmeni potkanů s geneticky fixovanou hypertriglyceridémií. Jelikož se jedná o neobězní kmen potkanů s inzulinovou rezistencí jsme schopni odlišit jednotlivé faktory podílející se na progresi metabolického syndromu od vlivu obezity. Jak již bylo popsáno v teoretické části, ne vždy je výskyt metabolického syndromu spojen s obezitou.

Z počátku byl experiment zacílen na optimalizaci homogenizace a extrakce, kde jsme narazili hned na několik problémů s přípravou vzorku, které narušovaly přesnost a správnost výsledků. První, na co jsme narazili byl problém se zpracováním matrice, kdy se vazivová tkáň svalu nechtěla plně rozmělnit a kusy svaloviny zůstávaly mezi noži homogenizéru. Problém s homogenizací vzorku jsme vyřešili hlubokým zmražením svalové tkáně v tekutém dusíku a následným rozcrcením svalu v třecí misce pomocí keramického tloučku. Při homogenizaci bylo nutné dbát na minimalizaci ztrát vylitnutím vzorku z třecí misky vlivem zvýšeného tlaku par nad vroucí kapalinou a přítlaku tloučku, což vyvolalo otázku, zda je lepší brát v zřetel původní navážku, nebo vážit vzorek až po homogenizaci v tekutém dusíku. Při přípravě docházelo k nerovnoměrné kondenzaci vody ze vzduchu i přes perfektně vysušené třecí misky, což nepředvídatelně zvyšovalo navážku vzorku. Ze vzorku jsme tedy vysušily vodu lyofilizací a vztáhly poměr hmotnosti k původní navážce. Dospěli jsme k závěru, že menší chyby je dosaženo při využití původní navážky, ale pouze za předpokladu eliminace ztrát v průběhu drcení a převádění prášku do zkumavky s metanolem (přídavek BHT do metanolu zabraňuje peroxidaci lipidů).

Extrakci lipidů z buněčných membrán lze umocnit rychlou změnou teploty, tím že na chvíli přemístíme vzorek z kapalného dusíku do vodní lázně o teplotě 40°C. Pokud se tenhle proces několikrát zopakuje, dojde k popraskání buněčných membrán a tím vylití jinak chráněných lipidů před extrakcí z nitra buňky do extrakčního rozpouštědla. K získání co nejpřesnějších lipidomických výsledků je nutné dodržet správný materiál použitého nádobí, čímž je silanizované sklo (nejlepší varianta) a polypropylen. Jiné druhy plastů mohou na sebe sorbovat lipidy a také kontaminovat náš vzorek nečistotami. Jelikož metanol a chloroform jsou navzájem mísitelná rozpouštědla je nutný dostatečný přídavek vody. Metanol má vyšší potenciál přejít do vodné fáze a tak se nám po centrifugaci vytvoří tři vrstvy. Vrchní vrstvu tvoří metanol a voda, střední vrstva je tvořena proteiny svalové tkáně, které mohou gelifikovat a spodní chloroformová vrstva je pro nás nejdůležitější, protože se lipidy skrývají právě zde. Při prvním odběru spodní vrstvy pipetou necháme malý zbytek chloroformu a provedeme reextrakci znovu metanolem a chloroformem. Reextrakce nám zaručí menší ztráty při odběru vzorku, kdy nesmí dojít k nabrání proteinové vrstvy. Tak to odseparovaná vrstva je vysušena pod dusíkem (vytlačí

vzduch a tím potlačí oxidační procesy) a rozpuštěna v rozpouštědle na analýzu s přidavkem octanu amonného. Octan amonný nám umožní tvorbu  $\text{NH}_4^+$  adduktů, což je nezbytné pro pseudocílenou analýzu DAG a TAG. Diacylglyceroly i triacylglyceroly tvoří výhradně  $\text{NH}_4^+$  addukty při LC-MS analýze.

Z výsledků necílené metabolické analýzy jsou patrné narušené metabolické dráhy, poukazující na vývoj metabolického syndromu u HHTg potkanů směrem k diabetu. Výsledky nám poukázali, na co dalšího bychom se mohli v rámci našeho experimentu zaměřit. K potenciálně narušeným metabolickým drahám software vytipoval rozdílové látky, na které bude navazovat cílená analýza na LC-QQQ-MS. Zároveň bude provedena cílená analýza na vytipované látky z necílené analýzy, což povede k vyvrácení, či potvrzení předchozích výsledků. To vše bude probíhat již nad rámec diplomové práce.

V rámci diplomové práce pouze nastíníme roli jednotlivých potenciálně narušených metabolických drah. Luo et al. (2020) ve své studii zjistili, že nízké plazmatické hodnoty tyrosinu zvyšují riziko diabetické retinopatie u T2DM a zároveň kontrola metabolismu tyrosinu u takto postižených pacientů může významně snížit riziko diabetické retinopatie. U syntézy sfingolipidů software vyhodnotil jako problematický komponent sfinganin, který se nám zároveň podařilo statisticky vyhodnotit jako významný. Podle posledních poznatků se zdá, že sfinganin hraje důležitou roli v ochraně buněk před účinky ceramidů a zánětlivých cytokinů. Narušená dráha biosyntézy CoA může potlačovat stimulaci PKB a Palmitoyl-CoA, který je prekuzorem pro tvorbu ceramidů. Ačkoliv se to na první pohled nemusí zdát, chondroitin sulfát může hrát důležitou roli v diabetickém stavu. Chondroitin sulfát patří do skupiny sulfatovaných polymerů, které hrají zásadní roli v různých biologických procesech. V ledvinách jsou přítomny v malých, ale významných množstvích. Obsah chondroitin sulfátu významně poklesl (14 %) u diabetických potkanů. Změny v chondroitin sulfátu měly za následek změnu vazebné vlastnosti ligandu k hlavním složkám extracelulární matrice, jako je kolagen typu IV, laminin a fibronectin. Tyto změny by mohly zhoršit stavy, jako je diabetická nefropatie (Joladarashi et al. 2011).

Ze statistického vyhodnocení 51 látek vybraných z pseudocílené analýzy vyšlo 7 rozdílových látek mezi skupinami W a HHTg, což odpovídalo 13,7 %. Hladiny všech rozdílových lipidů byly vyšší u skupiny HHTg, což odpovídá jak našim tezím, tak i literatuře.

Hladiny ceramidu 38-1 byly u skupin HHTg 1,8krát vyšší oproti kontrolní skupině. Nejspíše se jedná o ceramid (C18:1, C20:0). Ceramidy s postranním řetězcem C18:1 byly již dříve spojeny s inzulínovou rezistencí a zároveň hrají roli v aktivaci PKC.

Diacylglycerol 40:5 byl u skupiny HHTg zastoupen v 2,1krát vyšší míře. Diacylglyceroly aktivují dráhu PKC a zdá se, že hrají svou roli i v inzulínové rezistenci.

Triacylglyceroly (TG53:1, TG55:2, TG56:2) byly u skupin HHTg zvýšeny průměrně 1,6krát. Triacylglyceroly jsou spojeny s atherogenními faktory a podílí se na dyslipidémii, která je stěžejní pro rozvoj metabolického syndromu.

Velká škála jednotlivých izomerů a konformací mastných kyselin znemožnila automatickou intergraci pík u některých látek. Látky byly identifikovány podle hmotnosti matečného iontu, jednotlivé izomery vytvořili řadu pík s téměř identickým fragmentovým otiskem, ale rozdílným retenčním časem. Retenční časy lišily na základě vazebného místa na molekule glycerolu a konfigurací dvojných vazeb na mastné kyselině, přičemž vyšší retenční

čas jsme předpokládali u konfigurace cis. Z daných důvodů bylo nutné provést integraci některých píků manuálně na základě retenčního času.

## 6.2 Vliv metabolického syndromu na hladiny biomarkerů

Při hodnocení vlivu metabolického syndromu na zvýšení oxidačního stresu a zánětlivé odpovědi jsme dospěli k závěru, že metabolický syndrom je zodpovědný za kaskádu zánětlivých reakcí a také se podílí na zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku. Veškeré stanovené biomarkery ve svalové tkáni dokonale reflektovali prooxidační a prozánětlivý stav způsobený metabolickým syndromem.

Jako biomarker oxidačního stresu byl vybrán malondialdehyd, 8-isoprostan a 4-hydroxynonenal. Všechny tyto látky poukazují na zvýšenou peroxidaci tuků. Malondialdehyd je asi nejvíce studovaným produktem peroxidace polynenasycených mastných kyselin. Tento aldehyd je vysoce toxická molekula a můžeme ho považovat za více než jen marker peroxidace lipidů. Jeho interakce s DNA a proteiny je často označována jako potenciálně mutagenní a aterogenní. Isoprostány reflektují peroxidaci mastných kyselin, především kyseliny arachidonové. 4-Hydroxynonenal se vyskytuje v důsledku peroxidace lipidů indukované oxidačním stresem.

Využitými biomarkery zánětlivé reakce byly interleukiny 6, 10 a leukotrieny B4. Vztah interleukinu jako biomarkeru byl popsán již v teoretické části. Naše výsledky se shodovaly s dohledanými studiemi, kdy prozánětlivý IL-6 byl zvýšen u metabolického syndromu a hladiny protizánětlivého IL-10 korelovaly s MetS opačně. Leukotrien B4 je produkován v reakci na zánětlivé mediátory a je schopen také indukovat oxidační stres.

Významné korelace patogenních markerů byly nalezeny ve spojení s metabolickým syndromem. I přesto, že vyšly významné rozdíly mezi mladou a starou populací potkanů, tak koncentrační rozdíly byly malé a poukazovali na s věkem klesající antioxidační kapacitu. Proto lze vyvodit metabolický syndrom jako hlavní příčinu oxidačního stresu a systémového zánětu.

## 7 Závěr

Cílem této práce bylo prokázat zvýšené koncentrace lipoperoxidačních produktů pozorovaných při zhoršené glukózové toleranci u geneticky modifikovaných hereditárně hypertriglyceridemických potkanů. V teoretické části byly popsány faktory a mechanismy vedoucí ke vzniku Diabetu mellitus 2. typu. Dále byla popsána úloha jednotlivých lipidů v etiopatogenezi T2DM a s ní i vhodný panel biomarkerů, jako možnost predikce nastupujícího onemocnění.

- V experimentu byly prokázány zvýšené koncentrace lipidů podílejících se na lipoperoxidaci a zároveň potkani se zhoršenou glukózovou tolerancí byly vystaveny většímu množství oxidačního stresu.
- Jako produkt zvýšené lipoperoxidace byl naměřen malondialdehyd, 8-isoprostan a 4-hydroxynonenal. Všechny jmenované látky byly signifikantně zvýšeny u potkanů s metabolickým syndromem.

### **1. T2DM patogeneze koresponduje s koncentračními hladinami signálních molekul-biomarkerů.**

- Zvýšená hladina ceramidu u HHTg potkanů zhoršuje inzulínovou aktivitu a aktivuje dráhu PKC. Ceramidy hrají taky důležitou roli v dysfunkci pankreatických buněk.
- Zvýšené hladiny diacylglycerolů hrají důležitou roli v inzulínové rezistenci, tím že aktivují dráhu proteinkinázy C. Zvýšené hladiny diacylglycerolů se podílejí na zvýšených hladinách reaktivních forem kyslíku.
- Biomarkery oxidačního stresu a zánětu reflektovali rozvoj metabolického syndromu směrem k prediabetu.
- Také data z necílené metabolické analýzy poukazovali na narušené metabolické dráhy vedoucí k T2DM

### **2. Biomarkery reflektující patogenezi metabolického syndromu a T2DM jsou obsaženy v různých koncentracích v řadě různých biomatrik (tuková tkáň, kosterní sval, plazma, moč atd.).**

- Námi naměřené signifikantní lipidy byly již dříve spojeny s inzulínovou rezistencí, dyslipidemií a rizikem pro vznik kardiovaskulárních onemocnění. Triacylglyceroly se podílejí na aterogenezi a dyslipidémii.
- Biomarkery oxidačního stresu a zánětu reflektovali patogenezi metabolického syndromu a zároveň prooxidační i prozánětlivé markery byly obsaženy ve vyšších koncentracích u potkanů s indukovaným metabolickým syndromem.

**3. V průběhu patogeneze T2DM dochází ke změně v koncentrací zánětlivých biomarkerů a biomarkerů oxidačního stresu, které jsou indukovány stravou a stravovacími návyky.**

- Koncentrace biomarkerů oxidačního stresu jako je malondialdehyd, 8-isoprostan a 4-hydroxynonenal přímo reflektovaly prooxidační stres indukovaný jednotlivými komponenty metabolického syndromu. Oxidační stres u potkanů se jevil více indukovaný metabolickým syndromem než stářím hlodavce.
- Hladiny biomarkerů reflektujících prozánětlivý stav se vyskytovali ve větší míře u HHTg potkanů, přičemž do prozánětlivých faktorů jsme zařadili leukotrien B4 a interleukin 6. Zároveň hladiny protizánětlivého interleukinu 10 byly vyšší u kontrolní skupiny a mladých potkanů.
- V našem experimentu jsme nezahrnuli dietní vliv na vznik oxidačního stresu, ale z literární rešerše vyplývá přímá korelace se vyšším příjmem mastných kyselin a Fruktózy majoritně v podobě.
- Veškerá získaná data při měření oxidačního stresu a zánětlivých biomarkerů potvrdily nejnovější poznatky získané z literatury i naši hypotézu. Potkani inklinující k T2DM trpěly oxidačním stresem a záněty více než zdravá kontrolní skupina.

## 8 Literatura

- Abbasi F, Brown BW, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. 2002. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *Journal of the American College of Cardiology* **40**:937-943. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073510970202051X>.
- Aguilar M, Bhuket T, Torres S, Liu B, Wong RJ. 2015. Prevalence of the Metabolic Syndrome in the United States, 2003-2012. *JAMA* **313**. Available at <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2015.4260> (accessed April 12, 2022).
- Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. 2014. Oxidative stress and triglycerides as predictors of subclinical atherosclerosis in prediabetes. *Redox Report* **19**:87-91. Available at <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/1351000213Y.0000000080>.
- Alessi M-C, Juhan-Vague I. 2006. PAI-1 and the Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**:2200-2207. Available at <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000242905.41404.68>.
- Alexopoulos A-S, Qamar A, Hutchins K, Crowley MJ, Batch BC, Guyton JR. 2019. Triglycerides: Emerging Targets in Diabetes Care? Review of Moderate Hypertriglyceridemia in Diabetes. *Current Diabetes Reports* **19**. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s11892-019-1136-3>.
- Amati F et al. 2011. Skeletal Muscle Triglycerides, Diacylglycerols, and Ceramides in Insulin Resistance. *Diabetes* **60**:2588-2597. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/60/10/2588/33443/Skeletal-Muscle-Triglycerides-Diacylglycerols-and>.
- American Diabetes Association. 2014. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **37**:S81-S90. Available at [https://diabetesjournals.org/care/article/37/Supplement\\_1/S81/37753/Diagnosis-and-Classification-of-Diabetes-Mellitus](https://diabetesjournals.org/care/article/37/Supplement_1/S81/37753/Diagnosis-and-Classification-of-Diabetes-Mellitus).
- Aroor AR, McKarns S, DeMarco VG, Jia G, Sowers JR. 2013. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism* **62**:1543-1552. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049513002096>.
- Azzawi M. 1999. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease. *Cardiovascular Research* **43**:850-859. Available at [https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363\(99\)00138-8](https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363(99)00138-8).
- Bao P, Liu G, Wei Y. 2015. Association between IL-6 and related risk factors of metabolic syndrome and cardiovascular disease in young rats. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(8): 13491. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4612971/>

- Barrows BR, Parks EJ. 2006. Contributions of Different Fatty Acid Sources to Very Low-Density Lipoprotein-Triacylglycerol in the Fasted and Fed States. **91**:1446-1452. Available at <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2005-1709>.
- Bartke N, Hannun YA. 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research* **50**:S91-S96. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520305939>.
- Benn M. 2009. Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review. *Atherosclerosis* **206**:17-30. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915009000136>.
- Bergman RN, Kim SP, Catalano KJ, Hsu IR, Chiu JD, Kabir M, Huckling K, Ader M. 2006. Why Visceral Fat is Bad: Mechanisms of the Metabolic Syndrome. *Obesity* **14**:16S-19S. Available at <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2006.277>.
- Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD, Kabir M, Richey JM, Ader M. 2007. Abdominal Obesity: Role in the Pathophysiology of Metabolic Disease and Cardiovascular Risk. *The American Journal of Medicine* **120**:S3-S8. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934306013611>.
- Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD, Kabir M, Richey JM, Ader M. Abdominal Obesity: Role in the Pathophysiology of Metabolic Disease and Cardiovascular Risk. *S3-S8*. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934306013611>.
- Billiet L, Doaty S, Katz JD, Velasquez MT. 2014. Review of Hyperuricemia as New Marker for Metabolic Syndrome. *ISRN Rheumatology* **2014**:1-7. Available at <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/852954/>.
- Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW. 2002. Plasminogen Activator Inhibitor 1: Physiological and Pathophysiological Roles. *Physiology* **17**:56-61. Available at <https://www.physiology.org/doi/10.1152/nips.01369.2001>.
- Borodzicz S, Czarzasta K, Kuch M, Cudnoch-Jedrzejewska A. 2015. Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Lipids in Health and Disease* **14**. Available at <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-015-0053-y>.
- Boyer F, Vidot JB, Dubourg AG, Rondeau P, Essop MF, Bourdon E. 2015. Oxidative Stress and Adipocyte Biology: Focus on the Role of AGEs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**:1-9. Available at <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/534873/>.
- Brinkmann C, Schwinger RHG, Brixius K. 2011. Körperliche Aktivität und endotheliale Dysfunktion bei Typ-2-Diabetikern: über die Rolle von Stickstoffmonoxid und oxidativem Stress. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **161**:305-314. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s10354-011-0868-8>.



- Cong W-na, Golden E, Pantaleo N, M. White C, Maudsley S, Martin B. 2010. Ghrelin Receptor Signaling: A Promising Therapeutic Target for Metabolic Syndrome and Cognitive Dysfunction. **9**:557-563.
- Côté M, Mauriège P, Bergeron J, Alméras N, Tremblay A, Lemieux I, Després J-P. 2005. Adiponectinemia in Visceral Obesity: Impact on Glucose Tolerance and Plasma Lipoprotein and Lipid Levels in Men. **90**:1434-1439. Available at <https://academic.oup.com/jcem/article/90/3/1434/2836737>.
- The DECODE Study Group 2008. Does the constellation of risk factors with and without abdominal adiposity associate with different cardiovascular mortality risk?. *International Journal of Obesity* 32:757-762. Available at <http://www.nature.com/articles/0803797>.
- Dentin R, Liu Y, Koo S-H, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, Yates J, Montminy M. 2007. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature* **449**:366-369. Available at <http://www.nature.com/articles/nature06128>.
- Després J-P. 2009. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome?. *Annals of Medicine* **38**:52-63. Available at <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07853890500383895>.
- Dong H et al. 2007. The phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene V175M single nucleotide polymorphism confers the susceptibility to NASH in Japanese population. *Journal of Hepatology* **46**:915-920. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827807000359>.
- Dong M, Ren J. 2014. What Fans the Fire: Insights into Mechanisms of Leptin in Metabolic Syndrome- Associated Heart Diseases. *Current Pharmaceutical Design* **20**:652-658.
- Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. 2011. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **10**:453-471. Available at <http://www.nature.com/articles/nrd3403>.
- Dunn S, Vohra R S, Murphy J E, Homer-Vanniasinkam S, Walker J H, Ponnambalam S. 2008. The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease. *Biochemical Journal* **409**:349-355. Available at <https://portlandpress.com/biochemj/article/409/2/349/43480/The-lectin-like-oxidized-low-density-lipoprotein>.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. 2005. The metabolic syndrome. *The Lancet* **365**:1415-1428. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605663787>.
- Erion DM, Shulman GI. 2010. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nature Medicine* **16**:400-402. Available at <http://www.nature.com/articles/nm0410-400>.
- Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. 2002. Insulin-Dependent Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Impaired by O-Linked Glycosylation Modification of Signaling Proteins

- in Human Coronary Endothelial Cells. *Circulation* **106**:466-472. Available at <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000023043.02648.51>.
- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. 2011. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences* **12**:3117-3132. Available at <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/5/3117>.
- Figuroa-Romero C, Sadidi M, Feldman EL. 2008. Mechanisms of disease: The oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **9**:301-314. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s11154-008-9104-2>.
- Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. 2008. Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. *Diabetes* **57**:1446-1454. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/57/6/1446/40774/Oxidative-Stress-as-a-Major-Culprit-in-Kidney>.
- Fuentes JAG, Ríos MS. 2005. *The Metabolic Syndrome at the Beginning of the XXI Century: A Genetic and Molecular Approach*. Elsevier España
- Fujita S, Rasmussen BB, Cadenas JG, Grady JJ, Volpi E. 2006. Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **291**:E745-E754. Available at <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00271.2005>.
- Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. 2000. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *Journal of Clinical Investigation* **105**:1631-1639. Available at <http://www.jci.org/articles/view/9551>.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* **114**:1752-1761. Available at <http://www.jci.org/articles/view/21625>.
- Fuster V, Gotto AM. 2005. Risk Reduction. *The Metabolic Syndrome at the Beginning of the XXI Century* **102**:iii-v. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9788481748925500309>.
- Gannagé-Yared M-H, Khalife S, Semaan M, Fares F, Jambart S, Halaby G. 2006. Serum adiponectin and leptin levels in relation to the metabolic syndrome, androgenic profile and somatotrophic axis in healthy non-diabetic elderly men. *European Journal of Endocrinology* **155**:167-176. Available at <https://eje.bioscientifica.com/view/journals/eje/155/1/1550167.xml>.
- Ghantous CM, Azrak Z, Hanache S, Abou-Kheir W, Zeidan A. 2015. Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. *International Journal of Endocrinology* **2015**:1-13. Available at <http://www.hindawi.com/journals/ije/2015/534320/>.

- Goldberg IJ, Ginsberg HN. 2006. Ins and Outs Modulating Hepatic Triglyceride and Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **130**:1343-1346. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508506004744>.
- Guzik TJ, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M. 2014. Functional Implications of Reactive Oxygen Species (ROS) in Human Blood Vessels. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*:1155-1176. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. Available at [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30018-9\\_178](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30018-9_178).
- Halse R, Bonavaud SM, Armstrong JL, McCormack JG, Yeaman SJ. 2001. Control of Glycogen Synthesis by Glucose, Glycogen, and Insulin in Cultured Human Muscle Cells. *Diabetes* **50**:720-726. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/50/4/720/10951/Control-of-Glycogen-Synthesis-by-Glucose-Glycogen>.
- Hanamatsu H, Ohnishi S, Sakai S, Yuyama K, Mitsutake S, Takeda H, Hashino S, Igarashi Y. 2014. Altered levels of serum sphingomyelin and ceramide containing distinct acyl chains in young obese adults. **4**:e141-e141. Available at <http://www.nature.com/articles/nutd201438>.
- He Q, Bo J, Shen R, Li Y, Zhang Y, Zhang J, Yang J, Liu Y, Chiefari E. 2021. S1P Signaling Pathways in Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Research* **2021**:1-12. Available at <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2021/1341750/>.
- He Q, Bo J, Shen R, Li Y, Zhang Y, Zhang J, Yang J, Liu Y, Chiefari E. 2021. S1P Signaling Pathways in Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Research* **2021**:1-12. Available at <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2021/1341750/>.
- Hla T, Kolesnick R. 2014. C16: 0-Ceramide Signals Insulin Resistance. *Cell Metabolism* **20**:703-705. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413114004641>.
- Hu B, Li D, Sawamura T, Mehta JL. 2003. Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**:1008-1012. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X03012956>.
- Hüttl M, Markova I, Miklankova D, Zapletalova I, Poruba M, Haluzik M, Vaněčkova I, Malinska H. 2021. In a Prediabetic Model, Empagliflozin Improves Hepatic Lipid Metabolism Independently of Obesity and before Onset of Hyperglycemia. *International Journal of Molecular Sciences* **22**. Available at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11513>.
- Chedraui P, Escobar GS, Pérez-López FR, Palla G, Montt-Guevara M, Cecchi E, Genazzani AR, Simoncini T. 2014. Angiogenesis, inflammation and endothelial function in postmenopausal women screened for the metabolic syndrome. *Maturitas* **77**:370-374. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378512214000498>.
- Chen L-ying, Zhu W-hua, Chen Z-wen, Dai H-lei, Ren J-jing, Chen J-hua, Chen L-qian, Fang L-zheng. 2007. Relationship between hyperuricemia and metabolic syndrome.

- Journal of Zhejiang University SCIENCE B **8**:593-598. Available at <http://link.springer.com/10.1631/jzus.2007.B0593>.
- Chen Y, Liu Y, Sullards MC, Merrill AH. 2010. An Introduction to Sphingolipid Metabolism and Analysis by New Technologies. *NeuroMolecular Medicine* **12**:306-319. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s12017-010-8132-8>.
- Choi SM, Tucker DF, Gross DN, Easton RM, DiPilato LM, Dean AS, Monks BR, Birnbaum MJ. 2010. Insulin Regulates Adipocyte Lipolysis via an Akt-Independent Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **30**:5009-5020. Available at <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.00797-10>.
- Chong C-R, Clarke K, Levelt E. 2017. Metabolic remodelling in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* **113**:422-430. Available at <https://academic.oup.com/cvres/article/2977343/Metabolic>.
- Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E-I, Nagai R, Yamakado M. 2005. Association Between Serum Uric Acid, Metabolic Syndrome, and Carotid Atherosclerosis in Japanese Individuals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25**:1038-1044. Available at <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000161274.87407.26>.
- Jansen F, Yang X, Franklin BS, Hoelscher M, Schmitz T, Bedorf J, Nickenig G, Werner N. 2013. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovascular Research* **98**:94-106. Available at <https://academic.oup.com/cvres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvt013>.
- Jensen MD, Caruso M, Heiling V, Miles JM. 1989. Insulin Regulation of Lipolysis in Nondiabetic and IDDM Subjects. *Diabetes* **38**:1595-1601. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/38/12/1595/8976/Insulin-Regulation-of-Lipolysis-in-Nondiabetic-and>.
- Jeong E-M, Chung J, Liu H, Go Y, Gladstein S, Farzaneh-Far A, Lewandowski ED, Dudley SC. 2016. Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Glucose Tolerance, Insulin Resistance, and Cardiac Diastolic Dysfunction. *Journal of the American Heart Association* **5**. Available at <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.115.003046>.
- Joladarashi D, Salimath PV, Chilkunda ND. 2011. Diabetes results in structural alteration of chondroitin sulfate/dermatan sulfate in the rat kidney: effects on the binding to extracellular matrix components. *Glycobiology* **21**:960-972. Available at <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwr029>.
- Kelly AS, Jacobs DR, Sinaiko AR, Moran A, Steffen LM, Steinberger J. 2010. Relation of circulating oxidized LDL to obesity and insulin resistance in children. *Pediatric Diabetes* **11**:552-555. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-5448.2009.00640.x>.
- Kharroubi AT. 2015. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes* **6**. Available at <http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v6/i6/850.htm>.

- Khitan Z, Kim DH. 2013. Fructose: A Key Factor in the Development of Metabolic Syndrome and Hypertension. *Journal of Nutrition and Metabolism* **2013**:1-12. Available at <http://www.hindawi.com/journals/jnme/2013/682673/>.
- Kim H-J et al. 2004. Differential Effects of Interleukin-6 and -10 on Skeletal Muscle and Liver Insulin Action In Vivo. *Diabetes* **53**:1060-1067. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/53/4/1060/24279/Differential-Effects-of-Interleukin-6-and-10-on>.
- Kim J-a, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. 2006. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction. *Circulation* **113**:1888-1904. Available at <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563213>.
- Klop B, Elte J, Cabezas M. 2013. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* **5**:1218-1240. Available at <http://www.mdpi.com/2072-6643/5/4/1218>.
- Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. 2014. NADPH Oxidases in Vascular Pathology. **20**:2794-2814. Available at <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2013.5607>.
- Kraja AT, Province MA, Arnett D, Wagenknecht L, Tang W, Hopkins PN, Djoussé L, Borecki IB. 2007. Do inflammation and procoagulation biomarkers contribute to the metabolic syndrome cluster?. **4**. Available at <http://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-7075-4-28>.
- Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Hotowy K, Czapińska E, Majda J, Kustrzeba-Wójcicka I, Noczyńska A, Gamian A. 2013. Paraoxonase-1 activity in overweight and obese children and adolescents: Association with obesity-related inflammation and oxidative stress. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 22(2): 229-236. Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23709379/>
- Landar A, Zmijewski JW, Dickinson DA, Le Goffe C, Johnson MS, Milne GL, Zanoni G, Vidari G, Morrow JD, Darley-Usmar VM. 2006. Interaction of electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and formation of reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **290**:H1777-H1787. Available at <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.01087.2005>.
- Land M, Rubin CS. 2017. A Calcium- and Diacylglycerol-Stimulated Protein Kinase C (PKC), *Caenorhabditis elegans* PKC-2, Links Thermal Signals to Learned Behavior by Acting in Sensory Neurons and Intestinal Cells. *Molecular and Cellular Biology* **37**:e00192-17. Available at <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.00192-17>.
- Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. 2005. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **288**:H2031-H2041. Available at <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.01058.2004>.

- Laychock SG, Sessanna SM, Lin M-H, Mastrandrea LD. 2006. Sphingosine 1-Phosphate Affects Cytokine-Induced Apoptosis in Rat Pancreatic Islet  $\beta$ -Cells. *Endocrinology* **147**:4705-4712. Available at <https://academic.oup.com/endo/article/147/10/4705/2500319>.
- Lemieux I, Pascot A, Prud'homme D, Alméras N, Bogaty P, Nadeau A, Bergeron J, Després J-P. 2001. Elevated C-Reactive Protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **21**:961-967. Available at <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.21.6.961>.
- Lizcano JM, Alessi DR. 2002. The insulin signalling pathway. *Current Biology* **12**:R236-R238. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982202007777>.
- Luo H-H, Li J, Feng X-F, Sun X-Y, Li J, Yang X, Fang Z-Z. 2020. Plasma phenylalanine and tyrosine and their interactions with diabetic nephropathy for risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **8**. Available at <https://drc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjdr-2019-000877>.
- Magaye RR, Savira F, Hua Y, Kelly DJ, Reid C, Flynn B, Liew D, Wang BH. 2019. The role of dihydrosphingolipids in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**:1107-1134. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s00018-018-2984-8>.
- Mandal N, Grambergs R, Mondal K, Basu SK, Tahia F, Dagogo-Jack S. 2021. Role of ceramides in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Journal of Diabetes and its Complications* **35**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056872720305122>.
- Maschirow L, Khalaf K, Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. 2015. Inflammation, coagulation, endothelial dysfunction and oxidative stress in prediabetes — Biomarkers as a possible tool for early disease detection for rural screening. *Clinical Biochemistry* **48**:581-585. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912015000715>.
- Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. 2004. Adiponectin and Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**:29-33. Available at <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000099786.99623.EF>.
- McCormick DL. 2017. Preclinical Evaluation of Carcinogenicity Using Standard-Bred and Genetically Engineered Rodent Models. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*:273-292. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128036204000128>.
- McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. 2018. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology* **36**:14-20. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X1730158X>.
- McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, Rothblat GH, Reilly MP. 2009. Inflammation Impairs Reverse Cholesterol Transport In Vivo. *Circulation* **119**:1135-1145. Available at <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.810721>.

- McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. 2004. Plasma Ghrelin Concentrations Are Decreased in Insulin-Resistant Obese Adults Relative to Equally Obese Insulin-Sensitive Controls. **89**:1630-1635. Available at <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2003-031572>.
- Meigs JB, Larson MG, Fox CS, Keaney JF, Vasan RS, Benjamin EJ. 2007. Association of Oxidative Stress, Insulin Resistance, and Diabetes Risk Phenotypes. *Diabetes Care* **30**:2529-2535. Available at <https://diabetesjournals.org/care/article/30/10/2529/30227/Association-of-Oxidative-Stress-Insulin-Resistance>.
- Meikle PJ et al. 2015. Statin action favors normalization of the plasma lipidome in the atherogenic mixed dyslipidemia of MetS: potential relevance to statin-associated dysglycemia. *Journal of Lipid Research* **56**:2381-2392. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002227520309561>.
- Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman EL, Bergman RN. 2002. Extreme Insulin Resistance of the Central Adipose Depot In Vivo. *Diabetes* **51**:755-761. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/51/3/755/34459/Extreme-Insulin-Resistance-of-the-Central-Adipose>.
- Morino K, Petersen KF, Shulman GI. 2006. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Their Potential Links With Mitochondrial Dysfunction. *Diabetes* **55**:S9-S15. Available at [https://diabetesjournals.org/diabetes/article/55/Supplement\\_2/S9/12062/Molecular-Mechanisms-of-Insulin-Resistance-in](https://diabetesjournals.org/diabetes/article/55/Supplement_2/S9/12062/Molecular-Mechanisms-of-Insulin-Resistance-in).
- Mucinski JM, Manrique-Acevedo C, Kasumov T, Garrett TJ, Gaballah A, Parks EJ. 2020. Relationships between Very Low-Density Lipoproteins–Ceramide, –Diacylglycerols, and –Triacylglycerols in Insulin-Resistant Men. *Lipids* **55**:387-393. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lipd.12244>.
- Newgard CB et al. 2009. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metabolism* **9**:311-326. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413109000400>.
- Owen JB, Butterfield DA. 2010. Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. *Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging*:269-277. Humana Press, Totowa, NJ. Available at [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-756-3\\_18](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-756-3_18).
- Paganelli F, Alessi MC, Morange P, Maixent JM, Lévy S, Vague IJ. 1999. Relationship of plasminogen activator inhibitor-1 levels following thrombolytic therapy with rt-PA as compared to streptokinase and patency of infarct related coronary artery. *Thrombosis and haemostasis*, **82**(07): 104-108. Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10456462/>
- Pohjantähti-Maaroos H, Palomäki A, Kankkunen P, Laitinen R, Husgafvel S, Oksanen K. 2010. Circulating oxidized low-density lipoproteins and arterial elasticity: comparison between men with metabolic syndrome and physically active

- counterparts. *Cardiovascular Diabetology* **9**. Available at <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2840-9-41>.
- Prattichizzo F et al. 2018. Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages. *Redox Biology* **15**:170-181. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231717306985>.
- Prentki M, Madiraju SRM. 2008. Glycerolipid Metabolism and Signaling in Health and Disease. *Endocrine Reviews* **29**:647-676. Available at <https://academic.oup.com/edrv/article/29/6/647/2354984>.
- Pulkkinen L, Ukkola O, Kolehmainen M, Uusitupa M. 2010. Ghrelin in Diabetes and Metabolic Syndrome. *International Journal of Peptides* **2010**:1-11. Available at <https://www.hindawi.com/journals/ijpep/2010/248948/>.
- Raghavan S, Subramaniam G, Shanmugam N. 2012. Proinflammatory effects of malondialdehyde in lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **92**:1055-1067. Available at <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.1211617>.
- Reali F, Morine MJ, Kahramanoğulları O, Raichur S, Schneider H-C, Crowther D, Priami C. 2017. Mechanistic interplay between ceramide and insulin resistance. *Scientific Reports* **7**. Available at <http://www.nature.com/articles/srep41231>.
- Reaven GM. 1988. Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes* **37**:1595-1607. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/37/12/1595/8592/Role-of-Insulin-Resistance-in-Human-Disease>.
- Reichlin S. 1983. Somatostatin. *New England Journal of Medicine* **309**:1556-1563. Available at <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198312223092506>.
- Ronald Kahn C. 1978. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: A necessary distinction. *Metabolism* **27**:1893-1902. Springer Netherlands, Dordrecht. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049578800079>.
- Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Khamaisi M, Bashan N. 1999. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* **42**:949-957. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s001250051253>.
- Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N. 1998. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **47**:1562-1569. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/47/10/1562/10797/Prolonged-oxidative-stress-impairs-insulin-induced>.
- Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T. 2004. Adiponectin as a Biomarker of the Metabolic Syndrome. *Circulation Journal* **68**:975-981. Available at [http://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/68/11/68\\_11\\_975/article](http://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/68/11/68_11_975/article).



- Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806. Available at <http://www.nature.com/articles/414799a>.
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806. Available at <http://www.nature.com/articles/414799a>.
- Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. 2007. Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Physiological Reviews* 87:507-520. Available at <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00024.2006>.
- Seino Y et al. 2010. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Investigation* 1:212-228. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2040-1124.2010.00074.x>
- Schramm A, Matusik P, Osmenda G, Guzik TJ. 2012. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascular Pharmacology* 56:216-231. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537189112000456>.
- Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG. 2001. Glucose Sensing in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes* 50:1-11. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/50/1/1/10884/Glucose-Sensing-in-Pancreatic-CellsA-Model-for-the>.
- Sonksen PH. 2001. Insulin, growth hormone and sport. *Journal of Endocrinology* 170:13-25. Available at <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/170/1/13.xml>.
- Soran H, Schofield JD, Adam S, Durrington PN. 2016. Diabetic dyslipidaemia. *Current Opinion in Lipidology* 27:313-322. Available at <http://journals.lww.com/00041433-201608000-00002>.
- Soukup M, Biesiada I, Henderson A, Idowu B, Rodeback D, Ridpath L, Bridges EG, Nazar AM, Bridges KG. 2012. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome. *4*. Available at <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-5996-4-14>.
- Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro JI, Sodhi K. 2016. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *International Journal of Medical Sciences* 13:25-38. Available at <http://www.medsci.org/v13p0025.htm>.
- Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. 2005. Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options. *Endocrine Reviews* 26:380-392. Available at <https://academic.oup.com/edrv/article/26/3/380/2355244>.
- Stewart AF, Hussain MA, García-Ocaña A, Vasavada RC, Bhushan A, Bernal-Mizrachi E, Kulkarni RN. 2015. Human  $\beta$ -Cell Proliferation and Intracellular Signaling: Part 3. *Diabetes* 64:1872-1885. Available at

- <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/64/6/1872/34897/Human-Cell-Proliferation-and-Intracellular>.
- Symons JD, Abel ED. 2013. Lipotoxicity contributes to endothelial dysfunction: A focus on the contribution from ceramide. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 14:59-68. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s11154-012-9235-3>.
- Taskinen M-R. 2003. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice\*. *Diabetologia* 46:733-749. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s00125-003-1111-y>.
- Tesauro M, Schinzari F, Rovella V, Di Daniele N, Lauro D, Mores N, Veneziani A, Cardillo C. 2009. Ghrelin Restores the Endothelin 1/Nitric Oxide Balance in Patients With Obesity-Related Metabolic Syndrome. *Hypertension* 54:995-1000. Available at <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.137729>.
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. 1999. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochemical Journal*, 344(1): 109-116. Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10548540/>
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. 39:44-84. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272506002196>.
- van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJM, Frölich M, Bootsma-van der Wiel A, Westendorp RGJ. 2002. Low Production Capacity of Interleukin-10 Associates With the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51:1088-1092. Available at <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/51/4/1088/34607/Low-Production-Capacity-of-Interleukin-10>.
- Wan A, Rodrigues B. 2016. Endothelial cell–cardiomyocyte crosstalk in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 111:172-183. Available at <https://academic.oup.com/cvres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvw159> (accessed April 13, 2022).
- Wang Y, Viscarra J, Kim S-J, Sul HS. 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16:678-689. Available at <http://www.nature.com/articles/nrm4074>.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 112:1796-1808. Available at <http://www.jci.org/articles/view/19246>.
- Weiss TW, Arnesen H, Seljeflot I. 2013. Components of the Interleukin-6 transsignalling system are associated with the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Metabolism* 62:1008-1013. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049513000231>.
- Xuan Q, Hu C, Yu D, Wang L, Zhou Y, Zhao X, Li Q, Hou X, Xu G. 2018. Development of a High Coverage Pseudotargeted Lipidomics Method Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*

90:7608-7616. Available at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.8b01331> (accessed April 10, 2022).

Xuan Q, Hu C, Yu D, Wang L, Zhou Y, Zhao X, Li Q, Hou X, Xu G. 2018. Development of a High Coverage Pseudotargeted Lipidomics Method Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 90:7608-7616. Available at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.8b01331>.

Yang Q, Vijayakumar A, Kahn BB. 2018. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19:654-672. Available at <http://www.nature.com/articles/s41580-018-0044-8>.

Yang Q, Vijayakumar A, Kahn BB. 2018. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19:654-672. Available at <http://www.nature.com/articles/s41580-018-0044-8>.

Ye Y, Ding Y, Jiang Q, Wang F, Sun J, Zhu C. 2017. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Reports* 36:235-242. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s00299-016-2084-x>.

Yilmaz H, Sayar N, Yilmaz M, Gurkan U, Sesal C, Tosu R, Cakmak N, Erer B, Oz D, Ciloglu F, Bolca, O. 2010. Serum paraoxonase 1 activity in women with metabolic syndrome. *Kardiologia Polska (Polish Heart Journal)*, 68(11): 1219-1224. Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21108196/>

Zicha J, Pecháňová O, Čáčányiová S, Cebova M, Kristek F, Török J, Simko F, Dobesová Z, Kuneš, J. 2006. Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of cardiovascular disease and metabolic syndrome?. *Physiological research*, 55. Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17177626/>

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

8-OHdG – 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin

AGE – produkty pokročilé glykosylace

AMP – adenosinmonofosfát

AMPK – aktivovaná proteinkináza

apoB – apolipoprotein B

ATP – adenositrifosfát

BHT– butylhydroxytoluen

BMI – body mass index

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CER– ceramid

CRP -C – reaktivní protein

DAG– diacylglycerol

dhCer– dihydroceramidy

DM– diabetes mellitus

eNOs – endoteliární syntáza oxidu dusnatého

F2-IsoPs – F-2 isoprostan

FA– mastné kyseliny

FFA – volné mastné kyseliny

GADPH– glykolytický enzym

GFAT– glutamin-fruktosová-6- fosfátová transaminace

GHSR-1a – receptor sekretagogu růstového hormonu

GSH – redukovaný glutathion

GSSH – oxidovaný glutathion

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peroxid vodíku

HBP – hexozaminová biosyntetická dráha

HDL – lipoprotein s vysokou hustotou

Hex– hexadecenal  
HHTg– hereditárně hyperglyceridemický potkan  
HOCl – kyselina chlorná  
IChS – ischemická choroba srdeční  
IL – 6 – Interleukin 6  
IL-10 – Interleukin- 10  
IPA- Isopropylalkohol  
KVO – kardiovaskulární onemocnění  
LDL – lipoprotein s nízkou hustotou  
LOX-1– Lectin-like oxLDL receptor  
MDA – malondialdehyd  
MetS– metabolický syndrom  
mTOR – mammalian target of rapamycin  
NADPH – nikotinamid adenindinukleotid fosfát  
NEFA – neesterifikované mastné kyseliny  
NO – oxid dusný  
NO<sub>2</sub> – oxid dusičitý  
OH<sup>·</sup> – hydroxylový radikál  
ONOO<sup>-</sup>neradikální peroxyinitrit  
OxLDL – oxidovaný lipoprotein s nízkou hustotou  
PAI-1 – inhibitor plazminogenového aktivátoru- 1  
PCA– analýza hlavních komponent  
PE– fosfoethanolamin  
PKA – Proteinkináza A  
PKB – proteinkináza B  
PKC – proteinkináza C  
PON-1 – Paraoxonáza- 1

RAGE – receptor AGE  
RNS – reaktivní formy dusíku  
ROS – reaktivní formy kyslíku  
RT– retenční čas  
S1P– sfingosin-1-fosfát  
SDH– sorbitol dehydrogenáza  
SM– sfingomyelin  
SOD – superoxiddismutáza  
T1DM– diabetes mellitus 1.typu  
T2DM – diabetes mellitus 2. typu  
TAG– triacylglycerol  
TGF- $\beta$  – růstový faktor angiotensinu I  
TNF –  $\alpha$  – tumor nektotizující faktor –  $\alpha$   
tPA– tkáňový aktivátor plazminogenu  
uPA – aktivátor plazminogenu urokinázonázového typu  
VLDL – lipoprotein s velmi nízkou hustotou  
W – potkan kmene Wistar

## 10 Samostatné přílohy



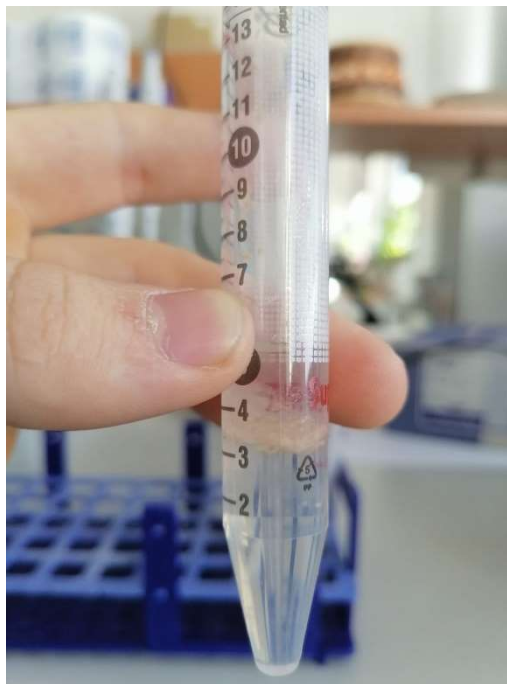
**Příloha 1:** Navážka svalu



**Příloha 2:** Homogenizace svalu za pomoci tloučku



**Příloha 3:** Kvantitativní převedení jemného prášku do centrifugační zkumavky



**Příloha 4:** Separace vrstev po centrifugaci