

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2018

MUDr. Jiří Orság

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

3. interní klinika

– nefrologická, revmatologická a endokrinologická

Fakultní nemocnice Olomouc

MUDr. Jiří Orság

doktorský studijní program Vnitřní nemoci P5171

**ASOCIACE VYBRANÝCH ADIPOKINŮ
S MARKERY INZULÍNOVÉ REZISTENCE,
ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE A SUBKLINICKÉ
ATEROSKLERÓZY**

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. David Karásek, Ph.D.

Olomouc 2018

Abstrakt

Úvod. Současný životní styl v industriálně vyspělých zemích přispívá ke zvýšenému výskytu obezity, sarkopenie, metabolického syndromu, diabetu mellitu 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění. I přes pokroky v terapii zmíněných stavů stále existuje naléhavá potřeba prozkoumání nových možností farmakologických intervencí zaměřených na nadměrnou akumulaci tuků a rozvoj aterosklerotických změn. Nadějnými kandidáty se ukázaly být látky hormonální povahy secernované tukovou a některými dalšími tkáněmi – organokiny/adipokiny.

Cíl. Analýza asociace vybraných adipokinů/organokinů (adiponektin, adipocytární protein vázající mastné kyseliny /A-FABP/ a fibroblastový růstový faktor 21 /FGF 21/) s biomarkery inzulinové rezistence a endoteliální dysfunkce a také zhodnocení jejich vztahu k subklinické ateroskleróze (prezentované intimomediální tloušťkou společné karotidy) u asymptomatických jedinců s dyslipidemií.

Metody. Tato disertační práce vychází ze souboru observačních průřezových studií na asymptomatických dyslipidemických pacientech a zdravých kontrolách. U všech jedinců byly vyšetřeny antropometrické a laboratorní parametry (lipidový profil, markery inzulinové rezistence, hemostatické markery) a dle profilu studie A-FABP, FGF 21 a adiponektin. Dále bylo realizováno sonografické měření intimomediální tloušťky společné karotidy (C-IMT) jako znaku subklinické aterosklerózy. Výsledky byly zpracovány standardními statistickými testy vhodnými pro jednotlivé soubory probandů.

Výsledky. Verifikovali jsme rizikový metabolický profil dyslipidemických pacientů, i když zatím asymptomatických. Prokázali jsme také zvýšené hladiny A-FABP i FGF 21 u těchto jedinců oproti zdravým kontrolám s dominancí dyslipidemických jedinců s přítomností metabolického syndromu. Byla nalezena nezávislá asociace hladin A-FABP s markery inzulinové rezistence a zejména s hemostatickým parametrem von Willebrandovým faktorem (vWF), u FGF 21 pak byla prokázána nezávislá asociace s hemostatickými markery vWF a tkáňovým aktivátorem plazminogenu (tPA). FGF 21 také koreloval s C-IMT u dyslipidemických pacientů bez metabolického syndromu. Nalezli jsme také pozitivní asociaci adiponektinu s A-FABP a pozitivní reciproční asociaci mezi A-FABP a FGF 21 u dyslipidemických jedinců.

Závěr. Nalezené korelace A-FABP i FGF 21 potvrzují jejich úlohu v rozvoji metabolických komplikací, zvláště metabolického syndromu a aterosklerózy. Přínosem této práce je podrobnější verifikace vztahů A-FABP, FGF 21 a adiponektinu u skupiny dosud asymptomatických dyslipidemických jedinců ukazující na jejich vysokou rizikovost stran rozvoje kardiometabolických nemocí. Novým nálezem je zejména asociace těchto organokinů s hemostatickými markery (vWF, tPA), což může přispět k lepšímu porozumění jejich role v procesu endoteliálního poškození a rozvoji aterosklerózy.

Klíčová slova

dyslipidemie – metabolický syndrom – organokiny – adipokiny – adiponektin – fibroblastový růstový faktor 21 – adipocytární protein vázající mastné kyseliny – ateroskleróza

Abstract

Background. The current lifestyle in high-developed countries has contributed to the increased prevalence of obesity, sarcopenia, metabolic syndrome, type 2 diabetes and cardiovascular diseases. Despite advances in the treatment of the above-mentioned conditions, there is still an urgent need for exploring new possibilities for pharmacological interventions that can target excessive fat accumulation and the development of atherosclerotic changes. The hormone-active substances from adipose tissue and some other tissues - organokines / adipokines have been shown to be perspective candidates. The relationship of these substances to parameters of metabolic syndrome, the development of atherosclerosis and obesity have been investigated.

Aim. Analysis of association of selected adipokines / organokines (adiponectin, adipocyte fatty-acid binding protein (A-FABP) and fibroblast growth factor 21 (FGF 21) with biomarkers of insulin resistance and endothelial dysfunction as well as evaluation of their relationship to subclinical atherosclerosis (presented by carotid intima-media thickness) in asymptomatic dyslipidemic individuals.

Methods. The thesis is based on a set of observational cross-sectional studies on asymptomatic dyslipidemic patients and healthy controls. All anthropometric and laboratory parameters (lipid profile, insulin resistance markers, hemostatic markers) and A-FABP, FGF 21 and adiponectin levels were examined. In addition, the ultrasound measurement of carotid intima-media thickness (C-IMT) as a sign of subclinical atherosclerosis was performed. The results were processed by standard statistical tests appropriate to individual sample probands.

Results. We verified the high-risk metabolic profile of dyslipidemic patients, although asymptomatic. We also observed elevated levels of A-FABP and FGF 21 in these individuals compared to healthy controls with dominance of individuals with metabolic syndrome. An independent association of A-FABP levels with markers of insulin resistance and in particular a hemostasis parameter (von Willebrand factor – vWF) was found; in FGF 21 independent association with hemostasis markers - vWF and tissue plasminogen activator tPA - was demonstrated. FGF 21 also correlated with C-IMT in dyslipidemic patients without metabolic syndrome. We also found a positive association of adiponectin with A-FABP and a positive reciprocal association between A-FABP and FGF 21 in dyslipidemic individuals.

Conclusions. The correlations between A-FABP and FGF21 confirm the fact, they play a role in the development of metabolic complications, particularly metabolic syndrome and atherosclerosis. The benefit of this work is a more detailed verification of the relationships between A-FABP, FGF 21 and adiponectin in a group of asymptomatic dyslipidemic individuals, indicating their high-risk profile for development of cardiometabolic diseases. A new finding is the association of these organokines with hemostatic markers (vWF, tPA), which may contribute to a better understanding of their role in the endothelial damage and the development of atherosclerosis.

Key words

dyslipidemia – metabolic syndrome – organokines – adipokines – adiponectin – fibroblast growth factor 21 - adipocyte fatty acid-binding protein – atherosclerosis

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně s uvedením všech literárních pramenů a publikací, ze kterých jsem čerpal.

Práce byla podpořena granty IGA MZCR NS/10284 a LF_2012_016 a LF 2014_11.

Olomouc 9. 7. 2018

MUDr. Jiří Orság

Poděkování

Především děkuji svému školiteli, doc. MUDr. Davidu Karáskovi, Ph.D., za odborné vedení, dohled a cenné rady a připomínky v průběhu studia i při zpracování této disertace.

Velký dík náleží rovněž všem spolupracovníkům, kteří se podíleli na vyšetřování a sledování pacientů, jako i na statistickém zpracování získaných údajů.

Samotné studium i vypracování všech nutných výstupů, jakož i můj odborný vývoj a růst, by nebyly představitelné bez všestranné podpory vedoucích pracovníků i kolegů z domovského pracoviště – III. interní kliniky – nefrologické, revmatologické a endokrinologické, z jejichž zkušeností a znalostí jsem měl možnost čerpat. Za všechny bych chtěl jmenovitě poděkovat přednostovi kliniky, prof. MUDr. Josefu Zadražilovi, CSc., a dále emeritnímu přednostovi, prof. MUDr. Vlastimilovi Ščudlovi, CSc.

Vděčnost a poděkování chci vyjádřit také všem kolegům, přátelům a rodinným příslušníkům za trpělivost, pomoc a podporu během studia i při vypracování této práce.

OBSAH

ÚVOD.....	9
CÍLE PRÁCE	11
TEORETICKÁ ČÁST	
1. Organokiny.....	12
2. Adipokiny.....	13
2.1. Adiponektin.....	15
2.2. Adipocytární protein vázající mastné kyseliny.....	20
3. Hepatokiny.....	25
3.1. Fibroblastový růstový faktor 21.....	26
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
1. Adiponektin, adipocytární protein vázající mastné kyselin a fibroblastový růstový faktor 21 u dyslipidemických jedinců.....	34
1.1. Pacienti a metody.....	34
1.2. Výsledky.....	35
1.3. Diskuse a závěr.....	40
2. Adipocytární protein vázající mastné kyseliny a vybrané biomarkery hemostázy a endoteliální dysfunkce u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.....	43
2.1. Pacienti a metody.....	43
2.2. Výsledky.....	44
2.3. Diskuse a závěr.....	48
3. Fibroblastový růstový faktor 21 a vybrané biomarkery hemostázy a endoteliální dysfunkce u asymptomatických pacientů s dyslipidemií....	51
3.1. Pacienti a metody.....	51
3.2. Výsledky.....	52
3.3. Diskuse a závěr.....	56
4. Adipocytární protein vázající mastné kyseliny a intimomediální tloušťka společné karotidy u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.....	58
4.1. Pacienti a metody.....	58
4.2. Výsledky.....	60
4.3. Diskuse a závěr.....	64

5. Fibroblastový růstový faktor 21 a intimomediální tloušťka	
společné karotidy u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.....	66
5.1. Pacienti a metody.....	66
5.2. Výsledky.....	68
5.3. Diskuse a závěr.....	73
SOUHRN VÝSTUPŮ DISERTAČNÍ PRÁCE.....	75
LITERATURA.....	76
SEZNAM ZKRATEK.....	94
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	97
SEZNAM TABULEK.....	98
SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	100
PŘÍLOHY.....	112

ÚVOD

Současný životní styl ve vyspělých zemích charakterizovaný nadbytkem energetického příjmu, sedavým způsobem života a také zvýšením dožití s procesem stárnutí přispívají ke zvýšenému výskytu obezity, sarkopenie, metabolického syndromu, diabetu mellitu 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění.

I přes nesporné pokroky v terapii výše zmíněných stavů stále existuje naléhavá potřeba prozkoumání nových možností farmakologických intervencí zaměřených na nadměrnou akumulaci tuků a rozvoj aterosklerotických změn.

V rámci tohoto snažení vychází najevo, že funkce určitých tělesných tkání, orgánů ev. orgánových soustav zahrnuje mnohem širší spektrum činností, než bylo doposud předpokládáno. Nadějným nálezem se ukázala být především schopnost některých primárně neendokrinních tkání fungovat i jako hormonálně aktivní činitelé.

Pozornost se v posledních cca. 20 letech obrátila k tukové tkáni, která byla dlouho považována pouze za pasivní zásobárnu energie zajišťující navíc mechanickou a tepelnou ochranu organismu. Tento pohled byl narušen až koncem 20. století objevem proteinových substancí prokazatelně produkovaných a vylučovaných buňkami tukové tkáně (adipsin, faktor nekrotizující nádory- α – TNF- α) ovlivňující metabolické pochody v organismu (1) (2). Ukázalo se tak, že adipocyty se účastní metabolických a hormonálních pochodů v organismu a byl vysloven předpoklad o možné endokrinní funkci tukové tkáně. Potvrzení uvedené teorie přinesla identifikace leptinu v roce 1993 (3). Leptin se stal prvním potvrzeným adipokinem a prototypem pro celou tuto třídu látek.

Později byla sekrece takových substancí objevena i ve svalové a jaterní tkáni. Všechny zmíněné látky byly proto zahrnuty pod společný pojem organokiny – látky, které jsou převážně produkovány a vylučovány příslušnými tkáněmi a ovlivňují systémový metabolismus prostřednictvím autokrinních, parakrinních a endokrinních aktivit (4). V současné době rozlišujeme zejména adipokiny, produkované tukovou tkání, hepatokiny, produkované a secernované játry a myokiny, uvolňované z kosterních svalů.

Po objevení zmíněných molekul se rozběhl výzkum zaměřený na charakterizaci úlohy těchto látek v patofyziologii výše pospaných procesů v organismu zejména se

zaměřením na možné farmakologické využití. Zkoumány jsou vztahy organokinů k parametrům metabolického syndromu, k rozvoji aterosklerózy a k obezitě.

CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce byla analýza asociace vybraných adipokinů/organokinů s biomarkery inzulinové rezistence a endoteliální dysfunkce a také zhodnocení jejich vztahu k subklinické ateroskleróze u asymptomatických jedinců s dyslipidemií.

Specifikace cílů:

- Srovnání sérových hladin a určení vzájemných vztahů adiponektinu, adipocytárního proteinu vázajícího mastné kyseliny (A-FABP) a fibroblastového růstového faktoru 21 (FGF 21) u asymptomatických dyslipidemických jedinců s přítomností nebo bez přítomnosti metabolického syndromu (MetS).
- Zhodnocení vztahu mezi sérovými hladinami A-FABP a vybranými biomarkery hemostázy a endoteliální dysfunkce u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.
- Zhodnocení vztahu mezi sérovými hladinami FGF 21 a vybranými biomarkery hemostázy a endoteliální dysfunkce u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.
- Zhodnocení vztahu mezi sérovými hladinami A-FABP a intimomediální tloušťkou společné karotidy (C-IMT) jako markeru subklinické aterosklerózy u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.
- Zhodnocení vztahu mezi sérovými hladinami FGF 21 a intimomediální tloušťkou společné karotidy (C-IMT) jako markeru subklinické aterosklerózy u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.

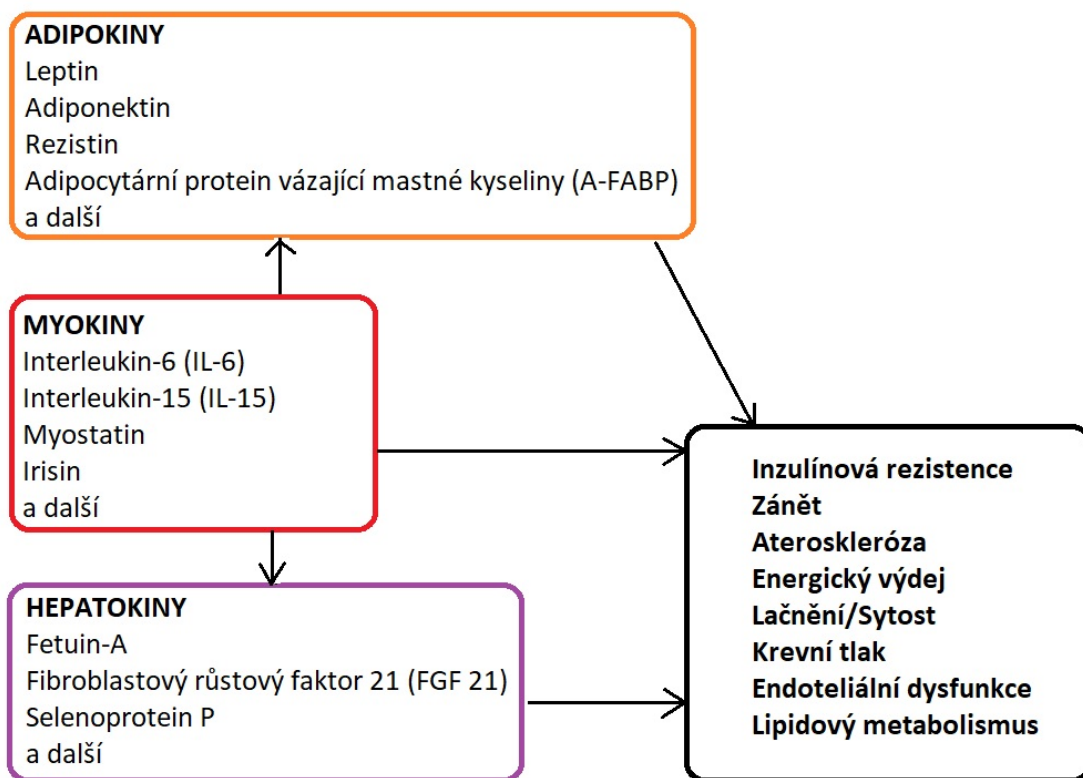
TEORETICKÁ ČÁST

1. Organokiny

Současný životní styl v industriálně rozvinutých zemích mimo jiné vede k exponenciálnímu rozšiřování obezity, která významně zvyšuje riziko kardiometabolických onemocnění, jako jsou diabetes mellitus 2. typu, dyslipidemie, arteriální hypertenze, koronární srdeční choroby a iktus. Navíc nedávné výzkumy prokázaly, že obezita je rizikovým faktorem i pro nealkoholickou steatózu jaterní, obstrukční spánkovou apnoí, demenci a několik typů rakoviny (5). I přes nesporné pokroky v terapii výše zmíněných stavů probíhá stále pátrání po nových diagnostických ukazatelích, terapeutických cílech a možných farmakologických intervencích. V rámci tohoto snažení vychází najevo, že funkce určitých tělesných tkání, orgánů ev. orgánových soustav zahrnuje mnohem širší spektrum činností, než bylo doposud předpokládáno. Nadějným nálezem se ukázala být především schopnost některých primárně neendokrinních tkání fungovat i jako hormonálně aktivní činitelé.

První nálezy se soustředily především na tukovou tkáň, u které bylo prokázáno vylučování hormonálně aktivních látek – adipokinů, které se podílejí na řízení systémového metabolismu a energetické homeostázy (6). Následně byla sekrece takových substancí objevena i ve svalové a jaterní tkáni. Všechny zmíněné látky byly proto zahrnuty pod společný pojem organokiny. Organokiny jsou definovány jako látky, které jsou převážně produkovány a vylučovány příslušnými tkáněmi a ovlivňují systémový metabolismus prostřednictvím autokrinních, parakrinních a endokrinních aktivit (4). V současné době rozlišujeme zejména adipokiny, produkované tukovou tkání (např. leptin, adiponektin), dále hepatokiny, produkované a secernované játry (fibroblastové růstové faktory – FGF) a myokiny, uvolňované z kosterních svalů (např. irisin). Schématický souhrn rozdělení a účinků organokinů podává Obrázek 1.

Následující kapitoly budou zaměřeny na některé z uvedených látek, které byly zkoumány v rámci experimentální části této disertační práce.

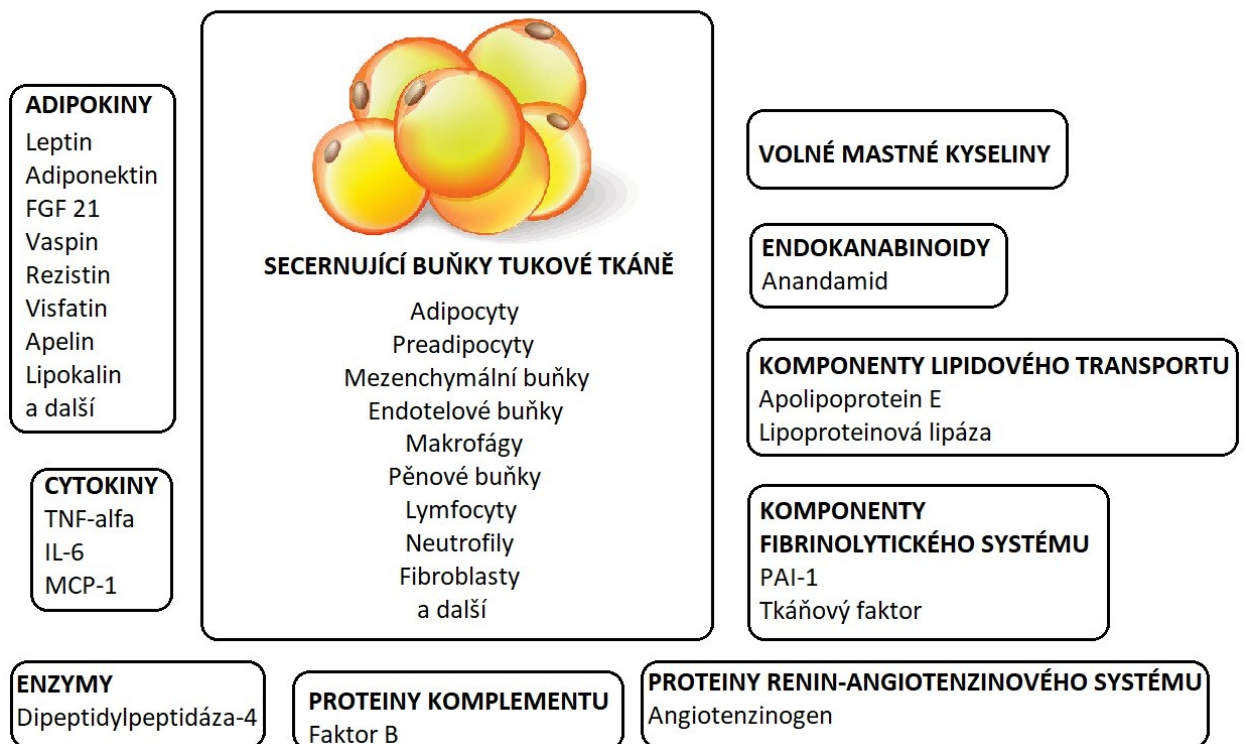


Obrázek 1. Úloha organokinů v rozvoji kardiometabolických onemocnění
(Převzato a upraveno z Choi, KM, 2016) (4).

2. Adipokiny

Tuková tkáň byla dlouho považována pouze za pasivní zásobárnu energie ve formě triglyceridů (TG), regulovanou hormonálními vlivy a vegetativním nervovým systémem, zajišťující navíc mechanickou a tepelnou ochranu organismu. Tento pohled byl narušen až koncem 20. století objevem proteinových substancí prokazatelně produkovaných a vylučovaných buňkami tukové tkáně (adipsin, TNF- α) ovlivňující metabolické pochody v organismu (1) (2). Ukázalo se tak, že adipocyty se účastní metabolických a hormonálních pochodů v organismu a byl vysloven předpoklad o možné endokrinní funkci tukové tkáně. Potvrzení uvedené teorie přinesla identifikace leptinu v roce 1993 (3). Leptin se stal prvním potvrzeným adipokinem a prototypem pro celou tuto třídu látek. Názvem adipokin jsou dnes označovány hormonálně aktivní látky proteinové povahy produkované tukovou tkání, tj. především adipocyty, ale i preadipocyty, fibroblasty,

endotelovými či imunitními buňkami. Některé adipokiny mají efekt parakrinní, tj. působí na adipocyty a další buňky přítomné v tukové tkáni (fibroblasty, makrofágy, endotelie), většina je ale uvolňována do krevního řečiště a ovlivňuje vzdálené cílové orgány (sval, endotel, játra, mozek). V současné době jsou již identifikovány stovky těchto substancí. Svými účinky představují heterogenní skupinu regulující intermediární metabolismus, inzulínovou senzitivitu, aterogenezi, imunitní odpověď, hemokoagulaci, angiogenezi a další pochody (7). Jejich objevení a výzkum vedl k zásadnímu posunu v chápání významu tukové tkáně, která je nyní považována za plnohodnotný endokrinní orgán komunikující s ostatními orgánovými soustavami (Obrázek 2).



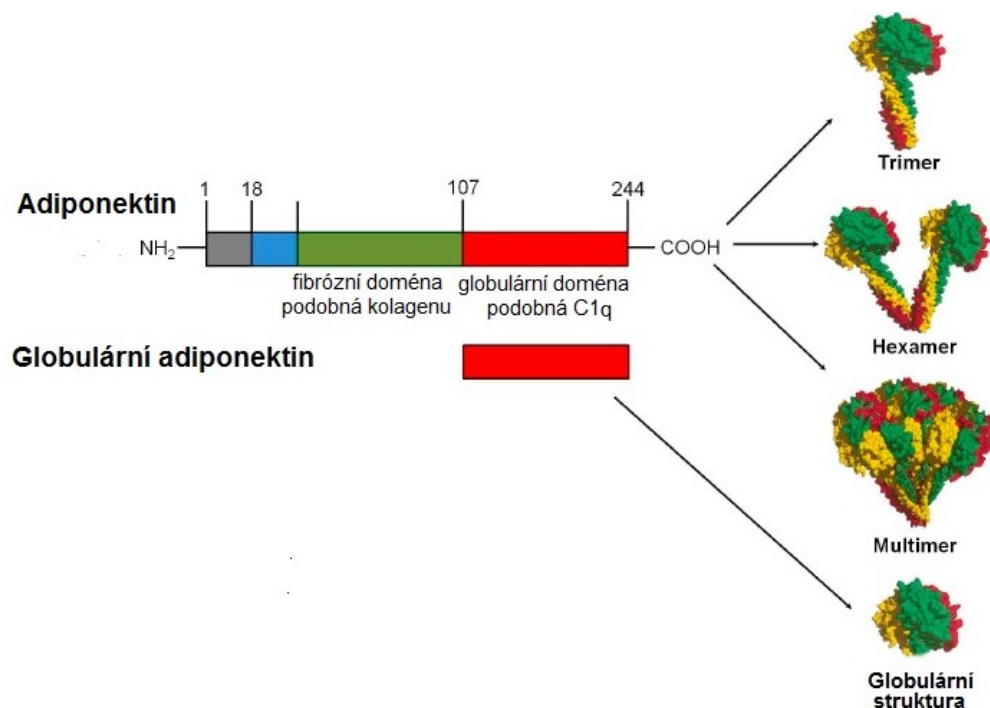
Obrázek 2. Přehled bioaktivních látek produkovaných tukovou tkání (*Převzato a upraveno z Fasshauer et al., 2015*) (5).

2.1. Adiponektin

Adiponektin – v literatuře uváděný i jako Acrp30 (8), AdipoQ (9), apM1 (10), GBP-28 (11) - (UniProt code: Q15848), je endokrinní faktor syntetizovaný a uvolňovaný především tukovou tkání (12). Strukturně se jedná o protein velikosti 30 kDa tvořený 244 aminokyselinami. Objeven a popsán byl v roce 1995 nezávisle na sobě několika skupinami, mj. na základě rozdílné exprese mRNA v buněčné linii 3T3-L1 diferencovaných adipocytů oproti nediferencovaným preadipocytům (8) (13). Jeho exprese byla ale detekována i v jiných tkáních a orgánech, zahrnující lidské i myší osteoblasty (14), hepatocyty (15), myocyty (16), epiteliální buňky (17) i placentární tkáň (18). Zajímavým zjištěním je podobnost struktury adiponektinu se strukturou TNF- α , což ukazuje na společný evoluční původ. In vitro i in vivo studii bylo prokázáno, že adiponektin působí jako protektivní faktor při iniciaci a progresi aterosklerózy vlivem jeho protizánětlivých a antiaterogenních vlastností. Řadí se tak do skupiny tzv. „dobrých“ adipokinů. Jeho sérové hladiny jsou sníženy u obézních jedinců, pacientů s diabetem 2. typu, u pacientů s onemocněním koronárních arterií apod. (19). Představuje zároveň adipokin nejhojněji zastoupený v systémové cirkulaci, tvořící asi 0,01 % všech proteinů lidské plazmy (20).

Gen pro lidský adiponektin (AdipoQ gen) se nachází na dlouhém raménku 3. chromozomu v pozici 27. 3. (21) (22). Jeho produktem je 30 kDa polypeptid složený z 244 aminokyselin, tvořený dvěma odlišnými doménami homologními s kolagenem VIII a faktorem komplementu C1q (8). Adiponektin je vylučován do cirkulace ve formě třech izoform. Základní monomerická stavební jednotka se sdružuje do nízkomolekulárního trimeru (67 kDa) a hexameru (140 kDa) a dále do vysokomolekulárního multimeru, obsahujícího nejméně 18 monomerů (23). Monomerická forma není za fyziologických okolností v krvi detekovatelná. Interakce mezi kolagenními doménami monomerních forem vede k vytvoření vysoce uspořádaného trimeru. Disulfidová vazba mezi dvěma trimery zprostředkovaná volným Cys39 pak rezultuje v tvorbu hexameru, jako základního stavebního kamene pro multimerickou formu, která představuje hlavní bioaktivní izoformu adiponektinu odpovědnou za pozitivní metabolické účinky (kardioprotektivní, inzulin-senzitizující, antiapoptotický) (24) (25). Na myším modelu byla potvrzena i další bioaktivní forma – globulární adiponektin, tvořený

globulární C1q doménou – zbytkem po proteolýze kompletního polypeptidu (26) (Obrázek 3).

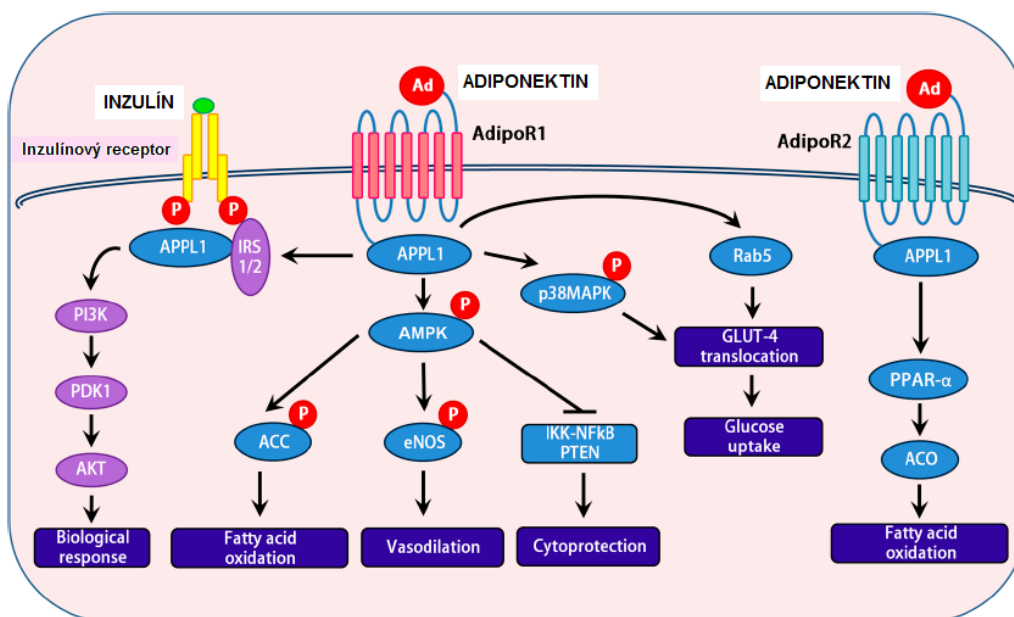


Obrázek 3. Domény a struktura adiponektinu (Upraveno dle Achari AE et al., 2017) (27).

Biosyntéza a sekrece adiponektinu je důsledně kontrolována několika chaperonovými proteiny v endoplazmatickém retikulu: ERp44 („Endoplasmic Reticulum resident protein 44“), Ero1-La („ER oxidoreductase 1-La“) a DsbA-L („disulfide-bond A oxidoreductase-like protein“). Adiponektin podléhá rozsáhlým potranslačním modifikacím, které zajišťují jeho účinné zrání, oligomeraci a stabilitu v krevním oběhu (28) (29) (30).

Účinek adiponektinu v cílových tkáních zajišťuje vazba na specifické membránové receptory. Byly identifikovány dvě dominantní izoformy adiponektinových receptorů spřažené s G-proteiny: AdipoR1 a AdipoR2 (31). AdipoR1 je exprimován především v kosterním svalstvu a má vysokou afinitu ke globulárnímu adiponektinu, zatímco AdipoR2 se vyskytuje hlavně v játrech a váže přednostně multimerickou formu adiponektinu. Mimo svá hlavní místa exprese se zmíněné

receptory nacházejí i v dalších tělesných buňkách a orgánech. AdipoR1 v endoteliálních buňkách (32), kardiomyocytech (33) a β -buňkách pankreatu (34), AdipoR2 pak v endoteliálních buňkách (35). Oba typy receptorů jsou přítomny také v hypothalamu (36). Geny pro uvedené receptory se nacházejí v chromozomálních oblastech 1p36.13, resp. 12p13.31. (31). Interakce adipokinu s receptory vede k navázání a aktivaci intracelulárního adaptorového proteinu APPL1, který slouží jako klíčový intracelulární první posel vícečetných signálních drah zahrnující aktivaci kináz IRS1/2 („Insulin receptor substrate 1“), AMPK, p38 MAPK, Rab5 a PPAR- α („Peroxisome proliferator-activated receptor alpha“). Aktivace IRS1/2 je přitom hlavním mechanismem spojující adiponektinovou signální kaskádu s účinkem inzulínu na cílové tkáně ve smyslu zvýšení citlivosti těchto tkání k inzulínu. (37) (38) (39) (Obrázek 4).



Obrázek 4. Schématické znázornění intracelulárních signálních kaskád aktivovaných vazbou adiponektinu na specifické receptory AdipoR1 a AdipoR2 (Převzato z Achari AE et al., 2017) (27).

Kromě AdipoR1 a AdipoR2 ale adiponektin interaguje i s T-cadherinem, který slouží jako receptor pro hexamerické a multimerické formy tohoto adipokinu (40). Vysokou expresi T-cadherinu nacházíme v cévách (endotelie, hladká svalovina,

pericyty) (41) (42). Realizované výzkumy prokázaly, že tento protein, zakotvený na membránovém povrchu glykosylfosfatidylinositolovou částí, je klíčovým receptorem pro uplatnění kardioprotektivního účinku adiponektinu (43). Tuto skutečnost dokládá např. eliminace adiponektinem zprostředkované prevence hypertrofie myokardu a ischemického reperfuze poškození myokardu při potlačení exprese T-cadherinu u myši (44).

Adiponektin náleží ke skupině adipokinů, které podporují působení inzulínu, a vykazuje také protizánětlivé a antiaterogenní účinky (19). Prokázána byla také jeho ústřední role v udržení energetické homeostázy organismu prostřednictvím své činnosti v hypotalamu (45) (46). Následující odstavce popisují působení a vliv adiponektinu v různých tkáních.

Tuková tkáň představuje největšího přirozeného producenta adiponektinu, zejména skrze adipocyty. Adiponektin zde vykazuje autokrinní aktivitu podněcující diferenciaci adipocytů. Přes signální kinázy a proteiny C/EBP α , PPAR γ a SREBP-1c vede k podpoře tvorby tukové tkáně zvyšováním obsahu lipidů a glukózového transportu podmíněného působením inzulínu (47). Na myších modelech bylo prokázáno, že vysoká exprese adiponektinu chrání před akutními i chronickými účinky diety s vysokým obsahem tuků a zvyšuje metabolickou pružnost tukové tkáně (48). Dále se ukazuje, že hladiny adiponektinu v krevní plazmě a počet exprimovaných adiponektinových receptorů v tukové tkáni reflektují jeho metabolické působení na adipocyty. Nízké hladiny adiponektinových receptorů byly nalezeny u lidí i zvířat s vyšší inzulínovou rezistencí. Tato zjištění naznačují postižení fyziologické funkce adiponektinu u jedinců s porušenou inzulínovou senzitivitou v důsledku nízké aktivity adipokinových receptorů (49). Ve studiích na obézních diabetických myších bylo poukázáno i na možnost zvýšení účinku adiponektinu stimulací jeho vlastní tvorby, včetně receptorů v tukové tkáni, podáním jeho agonistů, což vedlo k ochraně pokusných zvířat před rozvojem inzulínové rezistence (50).

Vaskuloprotektivní a angiogenní účinek adiponektinu byl verifikován vícečetnými studiemi, např. u myši s deficiencí adiponektinu, kde jeho arteficiální podání zlepšilo revaskularizaci ischemických končetin (51) a snížilo devastující efekt cerebrální ischemie (52). Hypoadiponektinémie je naopak spojena

s přítomností a závažností ischemické choroby srdeční, arteriální hypertenzí (53), hypertrofií levé komory srdeční (54) a zvýšeným rizikem infarktu myokardu (55). Adiponektin působí preventivně proti rozvoji aterosklerózy zabráněním transformace makrofágů v pěníte buňky a snižuje expresi povrchových adhezních molekul na povrchu makrofágů i endoteliálních buněk, čímž ovlivňuje časná stadia vzniku aterosklerotického plátu (56) (57). Mechanismus tohoto účinku spočívá mimo jiné v redukci tvorby interleukinu 8 a “ TNF- α mediated vascular cell adhesion molecule-1“ skrze supresi nukleárního faktoru kappa-B (NF κ B) v endoteliálních buňkách (58). Adiponektin zabraňuje ztluštění intimy u mechanicky poraněné arteriální stěny potlačením proliferace a migrace myocytů v médii (59). Velkou část vaskuloprotektivních účinků adiponektinu zprostředkovává také jeho schopnost zvýšit produkci oxidu dusnatého aktivací endoteliální syntázy oxidu dusnatého cestou kinázy AMPK (25).

Kosterní svalstvo představuje důležitou periferní cílovou tkáň pro příznivé metabolické působení adiponektinu. Pokusy s buňkami kosterní svaloviny krys ukázaly schopnost globulární izoformy adiponektinu zvýšit přesun glukózového transportéru 4 na povrch a akcelarovat tak absorpci glukózy z krve (60). Podobných výsledků bylo dosaženo na C2C12 myších myocytech. Navázání adiponektinu na své membránové receptory (především AdipoR1) vedlo k aktivaci dvou hlavních cest nitrobuněčného přenosu signálu, a to skrze kinázy AMPK a MAPK, jejichž výsledkem byla indukce absorpce glukózy a oxidace mastných kyselin (31).

Adiponektin prokázal ve studiích na myším modelu také schopnost zmírnit postižení **jater** (alkoholové i obezitou podmíněné), zahrnující hepatomegalii, steatózu a elevaci sérové alaninaminotransferázy. Tento terapeutický efekt byl podmíněn jednak indukovaným zvýšením aktivity karnitinpalmitoyltransferázy I, jednak zlepšením oxidace mastných kyselin v důsledku snížení aktivity klíčových enzymů syntézy mastných kyselin (acetyl-koenzym A karboxyláza a syntáza mastných kyselin) (61). Jiným mechanismem zodpovědným za příznivé účinky adiponektinu je také zlepšení mitochondriální dysfunkce, které vede ke snížení koncentrace produktů peroxidace lipidů. Právě mitochondriální dysfunkce přitom představuje ústřední mechanismus spojující obezitu s přidruženými metabolickými komplikacemi (62). Demonstrována byla dále inverzní korelace hladiny adiponektinu v systémové cirkulaci s obsahem tuku v játrech u lidí (63).

Z výsledků klíčových publikovaných prací lze konstatovat, že adiponektin má zřejmě ústřední úlohu v prevenci rozvoje inzulinové rezistence/diabetu a aterosklerózy. Jeho snížené hladiny v systémové cirkulaci představují rizikový faktor pro rozvoj diabetu 2. typu, obezity a kardiovaskulárních onemocnění. Výzkum na hlodavcích i lidech prokazuje roli adiponektinu jako důležitého regulátoru inzulinové senzitivity, metabolismu glukózy i lipidů a kardiovaskulární rovnováhy (27).

2.2. Adipocytární protein vázající mastné kyseliny

Adipocytární protein vázající mastné kyseliny (A-FABP, synonyma ALBP, FABP4, aP2), (UniProt code: P15090) je protein o velikosti 14,7 kDa tvořený 132 aminokyselinami mající význam pro transport mastných kyselin a jejich účinek v buňkách. A-FABP je produkován zejména adipocyty, ve kterých představuje až 6 % celkového obsahu proteinů (64) (65). Dalším důležitým místem produkce jsou makrofágy a dendritické buňky (66) (67). Za určitých okolností byla exprese A-FABP prokázána i v endoteliálních buňkách cév různých tkání a orgánů (68).

A-FABP patří do multigenní rodiny intracelulárních proteinů vázající mastné kyseliny a eikosanoidy (FABPs).

FABPs představují skupinu bílkovin o molekulových hmotnostech 14-15 kDa s funkcí intracelulárních lipidových chaperonů regulujících přenos tukových částic v buňkách (69) (70). Tyto proteiny reverzibilně váží hydrofobní ligandy, jako jsou satureované i nenasatureované mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, eikosanoidy i další lipidy (71). FABP nacházíme u všech živočišných druhů, což ukazuje na silnou evoluční konzervaci. Tento fakt potvrzuje také až 70 % sekvenční identita jednotlivých izoform FABP (72). Od identifikace prvního zástupce skupiny v roce 1972 (73) bylo postupně popsáno nejméně devět různých izoform FABP účastnících se lipidového metabolismu v rozličných tkáních. FABP rodina zahrnuje následující členy: jaterní (FABP1), střevní (FABP2), srdeční (FABP3), adipocytární (FABP4), epidermální (FABP5), ileální (FABP6), mozkový (FABP7), myelinový (FABP8) a testikulární (FABP9). FABPs zajišťují a usnadňují transport mastných kyselin do specifických buněčných organel k oxidaci v mitochondriích či peroxisomu, k regulaci transkripce

v jádře, k signalizaci a dopravě a v neposlední řadě i k syntéze buněčných membrán v endoplazmatickém retikulu (69). Regulují také enzymovou aktivitu v cytoplazmě a podílejí se na konverzi mastných kyselin na eikosanoidy a na stabilizaci leukotrienů (74) (75). Obecně přitom platí, že množství FABP v buňkách je přímo úměrné rychlosti metabolismu mastných kyselin (76).

Gen pro lidský A-FABP (FABP4 gen) se nachází na dlouhém raménku 8. chromozomu v oblasti q21.13. Identifikován byl v roce 1984 z diferencovaných 3T3-L1 adipocytů (77).

A-FABP v adipocytech

Jak bylo uvedeno v úvodu, adipocyty představují hlavní místo exprese A-FABP a také místo jeho nejvyšší akumulace. Tvorba se stupňuje v průběhu diferenciaci adipocytů při působení agonistů PPAR- γ (78), mastných kyselin (79), dexametazonu (80) a inzulínu (81). A-FABP reguluje lipolýzu v adipocytech aktivací hormon-senzitivní lipázy. Důkazy poskytly in vivo i in vitro pokusy na A-FABP deficientních myších, jejichž adipocyty vykazovaly redukci lipolýzy (82). A-FABP jako malý intracelulární protein může vstupovat do buněčného jádra k transkripčním faktorům, jako jsou členové rodiny PPAR a regulovat tak svou vlastní expresi (83). Zjistilo se také, že A-FABP má schopnost snižovat přenos signálu přes Janus kinázu 2, což indikuje jeho možnou roli jako senzoru obsahu mastných kyselin v adipocytu ovlivňujícího buněčný metabolismus (84).

A-FABP v makrofázích

Makrofágy představují druhé nejdůležitější místo produkce a účinku A-FABP. Exprese probíhá v průběhu diferenciaci monocytů v makrofágy a je indukována léčbou lipopolysacharidy, agonisty PPAR γ , oxidovanými LDL a produkty pokročilé glykace (66) (85) (86) (87). Naopak atorvastatin tvorbu A-FABP v makrofázích inhibuje (88). A-FABP podporuje hromadění esterů cholesterolu s tvorbou pěnových buněk a indukuje zánětlivou odpověď (89). Zvýšená tvorba A-FABP byla rovněž pozorována v makrofázích přítomných v nestabilních aterosklerotických plátech ze endarterktomických vzorků karotid u lidí (90). Infiltrace tukové tkáně makrofágy se dále zdá být jedním z důležitých faktorů zánětu („metanflammation“) tukové tkáně při obezitě (91) (92). Na myším modelu (apolipoprotein E deficientní myši) byla

demonstrována ochrana proti ateroskleróze při ablaci A-FABP (66) (93). Studie při transplantacích kostní dřeně ukázaly, že protektivní efekt deficience A-FABP v makrofázích na rozvoj aterosklerózy je významnější než stejný efekt v adipocytech (66).

A-FABP v ostatních buňkách a tkáních

Kromě adipocytů a makrofágů byla exprese A-FABP prokázána i v dalších typech buněk, ať už za fyziologických či patologických podmínek. Produkce A-FABP byla zjištěna mj. v endoteliích kapilár a malých žil v srdci a ledvinách (68). Předpokládá se, že se zde podílí na transendoteliálním transportu mastných kyselin do cílových orgánů (94). Za fyziologických okolností je A-FABP exprimován v endotelových buňkách peritubulárních kapilár v kůře i dřeni ledvin ovšem nikoliv v glomerulech. Ektopická tvorba A-FABP v glomerulech byla naopak asociována s progresí proteinurie a ledvinné dysfunkce (95).

Tvorba A-FABP byla indukována rovněž v endoteliálních buňkách aorty jako odpověď na jejich poškození intermitentní hypoxií (96). Exprese A-FABP za těchto patologických okolností pravděpodobně přispívá k rozvoji aterosklerózy a vaskulárního poškození. Dále byla exprese A-FABP potvrzena i endoteliích peribronchiálních cév a části makrofágů u pacientů s obstrukční chorobou bronchopulmonální, zvažuje se také jeho podíl na patogenezi sarkoidózy (97) (98). A-FABP byl detekován i lidském placentálním trofoblastu, kde slouží jako klíčový regulátor lipidového transportu a akumulace v průběhu vývoje placenty (99) (100). Studie ukazují i na roli A-FABP v modifikaci růstu a apoptózy maligních buněk určitých nádorů, např. ovariální tumoru, liposarkomu, uroteliálního karcinomu (101) (102).

A-FABP jako adipokin

Ačkoliv je A-FABP z titulu své funkce především intracelulárním cytoplazmatickým proteinem, data získaná ze studií na zvířatech i lidech prokázala jeho sekreci především adipocyty do systémové cirkulace s ovlivněním vzdálených tkání a orgánů. A-FABP, podobně jako ostatní zástupci rodiny FABPs, neobsahuje N-terminální sekreční signální sekvenci nutnou při klasické sekreci přes endoplazmatické retikulum

a Golgiho komplex (69). Jeho extracelulární sekrece je dle současných poznatků zajišťována dvěma na sobě nezávislými mechanismy.

A-FABP je vylučován jednak přímo ve spojení s lipolýzou skrze aktivaci AC-proteinkinázy A a GC-proteinkinázy G, jednak cestou mikrovesikul (103) (104). Pokusy na A-FABP deficientních myších prokázaly dominanci extracelulární sekrece A-FABP adipocyty. Jistá část A-FABP pochází sice z makrofágů, ale jeho úloha v metabolických procesech zůstává zatím nejasná. Předpokládá se lokální působení v rámci indukce zánětlivé odpovědi (105).

U žen nalézáme signifikantně vyšší sérové hladiny A-FABP, pravděpodobně kvůli vyššímu obsahu tukové tkáně v ženském těle (106). Dále byla verifikována vyšší hladina A-FABP u osob s renální dysfunkcí a byla potvrzena negativní korelace sérových hladin A-FABP s glomerulární filtrací, potvrzující tak domněnku eliminace sérového A-FABP zejména ledvinnou cestou (106) (107).

Cirkulující A-FABP přímo ovlivňuje četné typy buněk a zároveň se ukázal být důležitým biomarkerem. A-FABP podporuje tvorbu glukózy v játrech (105), tlumí kontraktilitu kardiomyocytů, inhibuje aktivaci endoteliální syntázy oxidu dusnatého (108), podporuje proliferaci a migraci myocytů cévní stěny (109) a zvyšuje sekreci inzulínu β -buňkami pankreatu stimulovaných glukózou (110).

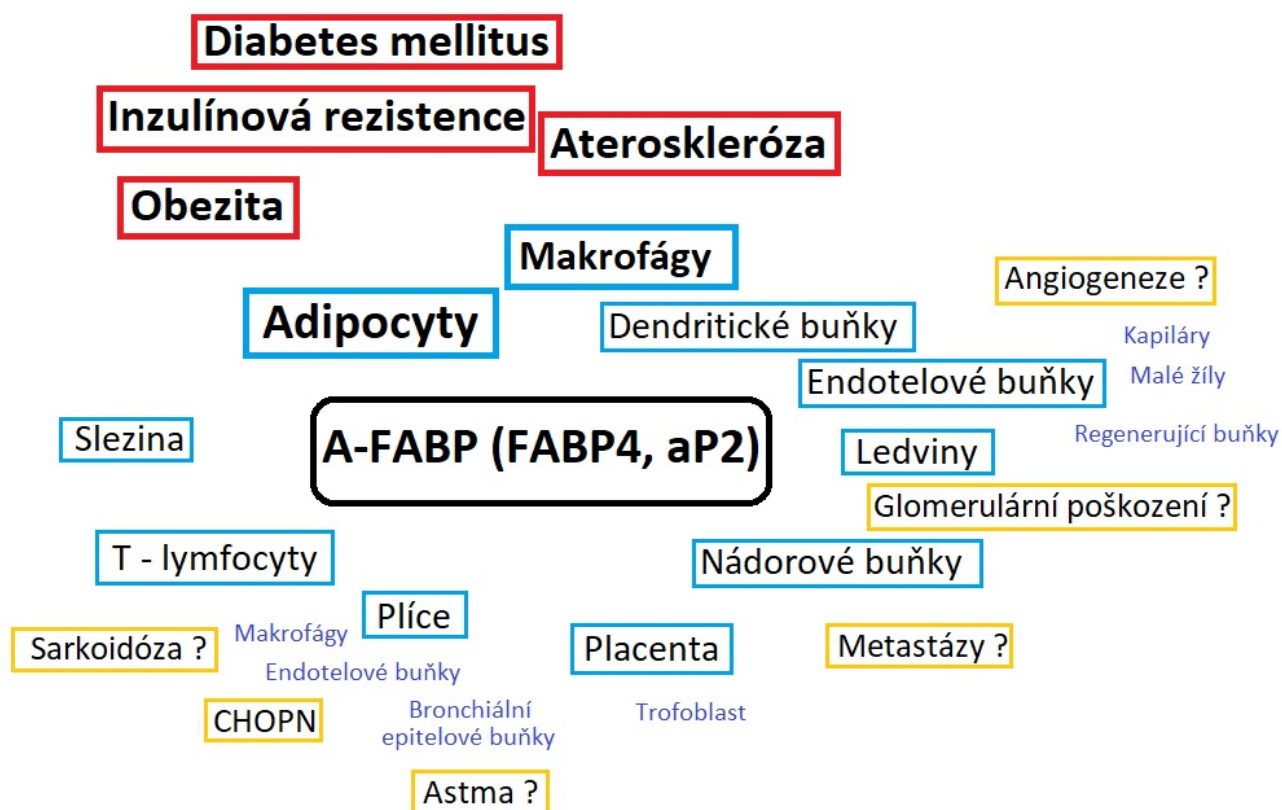
Zvýšené sérové hladiny A-FABP byly prokázány u jedinců s četnými nepříznivými metabolickými stavy - obezitou, inzulínovou rezistencí, diabetem mellitem 2. typu, art. hypertenzí, srdeční dysfunkcí a aterosklerózou (111) (112) (113) (114) (115) (116). Vyšší vstupní koncentrace A-FABP se ukázaly být nezávislým prediktorem rozvoje metabolického syndromu v průběhu následujících 5 let ve studii na čínských dobrovolnících (112). V desetileté prospektivní studii Tso et al. identifikoval vyšší vstupní hladiny A-FABP také jako nezávislý prediktor rozvoje diabetu mellitu 2. typu (113). Elevace cirkulujícího A-FABP byla prokázána také v rodinách s výskytem arteriální hypertenze, což naznačuje i možnou úlohu tohoto adiokinu v genetické predispozici arteriální hypertenze (114). Rovněž byla prokázána asociace A-FABP s intimomediální tloušťkou a. carotis jako markerem subklinické aterosklerózy (116). Všechna tato pozorování podporují domněnku, že A-FABP není jen důležitý biomarker, ale že sám hraje významnou úlohu v rozvoji metabolického syndromu a kardiovaskulárních onemocnění. Tento názor podporuje i průkaz snížení koncentrace

sérového A-FABP při léčbě atorvastatinem a blokátory receptoru pro angiotenzin II (117) (118).

Kromě úlohy v rozvoji kardiovaskulárních chorob se A-FABP ukazuje i jako nový prognostický faktor u pacientů s karcinomem prsu (119).

Celkově lze shrnout, že A-FABP hraje dle současných poznatků důležitou úlohu při rozvoji metabolických a kardiovaskulárních onemocnění, zejména metabolického syndromu, inzulínové rezistence a aterosklerózy. Elevace hladin cirkulujícího A-FABP je asociována s obezitou, inzulínovou rezistencí, diabetem a kardiální dysfunkcí. Lze jej tak zařadit k tzv. „nepříznivým“ adipokinům.

Souhrn klinických souvislostí A-FABP předkládá v grafické podobě Obrázek 5.



Obrázek 5. Klinické souvislosti tvorby a účinku A-FABP (Převzato a upraveno dle Furuhashi et. al., 2014). (120)

3. Hepatokiny

Játra představují hlavní regulátor systémového metabolismu a energetické homeostázy. V posledním desetiletí byly identifikovány nové proteiny s hormonálním účinkem – hepatokiny, které podobně jako adipokiny zasahují do lipidového a energetického metabolismu. Dosud prokázané účinky těchto látek jsou ambivalentní, na jedné straně progrese inzulínové rezistence, na druhé straně zlepšení metabolických parametrů u metabolického syndromu (121). Prvním známým hepatokinem je fetuin-A, který slouží jako mediátor mezi játry a cílovými orgány. Působí jako přirozený inhibitor tyrozinkinázy sdružené s inzulínovým receptorem, jak bylo ukázáno v pokusu na hlodavcích (122). Fetuin-A byl také identifikován jako endogenní ligand pro Toll-like receptor 4, kterým nasycené mastné kyseliny indukují prozánětlivou signalizaci a rezistenci na inzulín (123). Zvýšené sérové hladiny fetuinu-A byly nalezeny u lidí s obezitou, metabolickým syndromem a diabetem mellitem 2. typu a jeho koncentrace koreluje i s jaterní steatózou (124). Prospektivní studie navíc prokázaly, že hladiny fetuinu-A predikují zvýšené riziko diabetu 2. typu, stejně jako infarktu myokardu a iktu (125) (126).

Dalším hepatokinem je selenoprotein P, který pozitivně koreluje s parametry inzulínové rezistence a jeho syntéza je zvýšena u pacientů s diabetem 2. typu (127). Yang et al. (128) našel zvýšené hladiny selenoproteinu P u pacientů s poruchou metabolismu glukózy, které vykazovaly signifikantní asociaci s inzulínovou rezistencí, zánětem a intimomediální tloušťkou společné karotidy (C-IMT). Cirkulující hladiny selenoproteinu P navíc negativně korelovaly s hladinami adiponektinu u pacientů s diabetem 2. typu, což naznačuje existenci vztahu mezi hepatokiny a adipokiny (129).

V současnosti nejvíce studovaným a nadějným hepatokinem je fibroblastový růstový faktor 21 (FGF21), který se jeví jako centrální metabolický regulátor, který má příznivý vliv na metabolismus glukózy a lipidů. Podrobně je o něm pojednáno následující kapitole.

3.1. Fibroblastový růstový faktor 21

Fibroblastový růstový faktor (FGF 21) (UniProt code: Q9NSA1) je proteinový endokrinní faktor produkovaný především v játrech s funkcí metabolického regulátoru. Kromě jater jej nalézáme také v tukové tkáni a pankreatu (130). Identifikován byl u myši i lidí v roce 2000 (131).

Gen pro lidský FGF 21 se nachází na 19. chromozomu a sestává ze tří kódujících exonů, které dávají vzniknout dvěma transkriptům použitím dvou alternativních promotorů. Oba transkripty kódují tentýž preprotein skládající se z 209 aminokyselin zahrnující i 28aminokyselinový signální peptid. Secernovaná forma proteinu má pak molekulovou hmotnost cca. 23 kDa (181 aminokyselin) (131).

FGF 21 patří do rodiny fibroblastových růstových faktorů (FGF). U myši i lidí bylo dosud identifikováno 22 genů (FGF 1 až FGF 23), které se fylogeneticky seskupují do osmi podskupin (132). Z funkčního hlediska se ale FGF dělí do tří skupin: intracelulární FGF (FGF 11- FGF 14), jejichž molekula neobsahuje signální peptid, dále FGF s možností sekrece do cirkulace a tím se systémovým působením (FGF 19 a FGF 21) a zbývající FGF, které mají autokrinní či parakrinní účinek (133).

Působení FGF 21 je zprostředkováno vazbou na specifické membránové receptory – FGR receptory (FGFR). Jedná se o skupinu receptorů spojených s tyrosinkinázami. U savců bylo identifikováno sedm primárních izoform FGFR, a to 1b, 1c, 2b, 2c, 3b,3c, 4 (134). Aktivace FGFR vazbou FGF 21 je závislá na β -Klotho, který zde vystupuje jako koreceptor (135) (136). Aktivace tohoto komplexu FGF 21 vede k širokému spektru přenosů signálů. Nejlépe popsanou cestou je fosforylace FGFR substrátu $\alpha 2$ s následnou aktivací kaskády s účastí mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) (135).

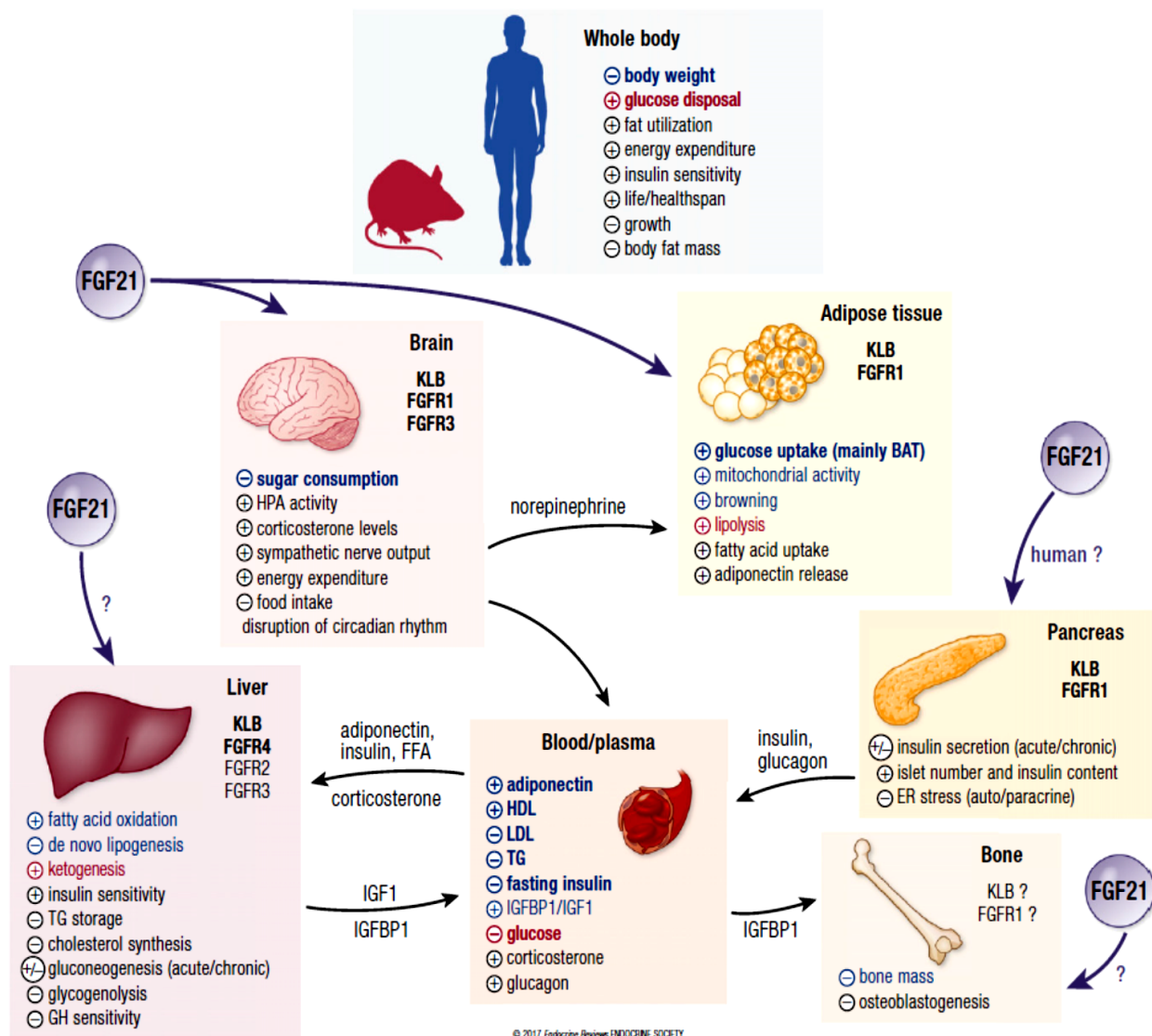
U myši je gen pro FGF 21 exprimován zejména v játrech a thymu (131). V menším měřítku je FGF 21 mRNA detekovatelná také v pankreatu, varlately, gastrointestinálním traktu, mozku, kosterním svalstvu, hnědé tukové tkáni („brown adipose tissue“ BAT) a v bílé tukové tkáni („white adipose tissue“ WAT) (137) (138). Naproti tomu u člověka je gen pro FGF 21 exprimován za bazálních podmínek téměř výhradně v játrech. Slabší exprese byla prokázána ještě v mozku a pankreatu (139). Nicméně určité patologické stimuly a okolnosti mohou provokovat

extrahepatickou expresi, např. v pankreatu, mozku, WAT, která může významněji ovlivňovat cirkulující koncentrace FGF 21 (140).

Bylo prokázáno, že hladovění, příjem lipidů kojením nebo ketogenní dieta (tj. dieta s vysokým obsahem tuků a nízkým podílem sacharidů) vede k několikanásobnému nárůstu sérové hladiny FGF 21 u myši, zřejmě jako výsledek zvýšené koncentrace volných mastných kyselin v krvi vedoucí k indukci exprese genu pro FGF 21 v játrech prostřednictvím receptoru PPAR α (141). Naproti tomu u lidí podobný efekt výše zmíněných faktorů na hladinu FGF 21 nebyl jednoznačně prokázán, mj. pro velkou interindividuální variabilitu hladin FGF 21 i její změnu po lačnění (142). Podání sacharidů, zejména fruktózy, vede u lidí ke zvýšení koncentrací sérového FGF 21 (143). Kim et al. pozoroval rovněž elevaci hladin FGF 21 u myši i lidí v návaznosti na cvičení (144). Hansen et al. pak demonstroval akceleraci jaterní produkce FGF 21 v důsledku zvýšeného uvolňování glukagonu do krevního oběhu v průběhu cvičení u lidí, což svědčí o úloze svalovo-pankreaticko-jaterní osy při cvičení (145). Bylo také zjištěno, že vystavení chladu vede ke zvýšené expresi genu pro FGF 21 v BAT a WAT u myši i lidí (146) (147). V neposlední řadě byl také pozorován cirkadiální rytmus v koncentracích FGF 21 s nejvyššími hladinami při lačnění (148).

Vzestup sérových hladin FGF 21 je asociován s vícečetnými metabolickými stavy a onemocněními, stejně tak, jako aplikace FGF 21 ovlivňuje vícečetné procesy látkové výměny. Následující část bude zaměřena právě na tyto nemoci a tkáňové působení FGF 21 se zdůrazněním situace u lidí.

Dosavadní poznatky o úloze FGF 21 u lidí a myši shrnuje Obrázek 6.



Obrázek 6. Úloha FGF 21 v metabolismu u myši a lidí (Převzato ze Staiger H. et al., 2017) (149).

Stimulační účinky jsou značeny (+), inhibiční (-). Efekty, které jsou podobné u myši i lidí, jsou značeny modře, účinky, které jsou rozdílné, nebo jsou literární data kontroverzní, jsou značeny červeně a konečně černě jsou označeny ty účinky, u kterých jsou známy údaje pouze na myším modelu.

Zkratky: KLB - β -Klotho protein, FGFR1-3 – receptor 1-3 pro fibroblastový růstový faktor 21, BAT – bílá tuková tkáň, TG – triacylglyceroly, FFA – volné mastné kyseliny, IGF1 – růstový faktor podobný inzulinu 1 („Insulin-like Growth Factor 1“), IGFBP1 – protein vázající IGF1 („Insulin-like growth factor-binding protein 1“).

FGF 21, obezita a tuková tkáň

Dle dosud provedených výzkumů jsou sérové koncentrace FGF 21 u lidí pozitivně asociovány s body mass indexem (BMI), obezitou a adipozitou (celkovou, viscerální, perikardiální i epikardiální) (150) (151) (152) (153). Zvýšení hmotnosti a obsahu tuku v důsledku nadměrné výživy vedou k elevaci hladin FGF 21 (154). Naproti tomu ale váhový úbytek po úspěšné bariatrické operaci nebyl spojen s očekávaným poklesem sérové koncentrace FGF 21, což ukazuje na fakt, že adipocyty zřejmě nejsou u člověka významným zdrojem cirkulujícího FGF 21 (155). Tuková tkáň je ovšem považována za jedno z důležitých cílových míst pro působení FGF 21. FGF 21 hraje roli v lipolýze ve WAT, ovšem není jasné, zda ji podporuje nebo tlumí. In vivo studie ukazují, že existuje rozdíl mezi chronickým a akutním působením FGF 21. Zatímco jednorázové podání rekombinantního lidského FGF 21 snížilo koncentraci volných mastných kyselin (FFA) u obézních myší zvýšením exprese hormon-senzitivní lipázy ve WAT, u myší s chronicky alterovanými hladinami FGF 21 není tento efekt zaznamenán. Podání FGF 21 také vede k produkci adiponektinu s jeho protizánětlivým, ateroprotektivním a inzulín-senzitizujícím účinkem. FGF 21 navíc stimuluje i absorpci glukózy v adipocytech jak u myší, tak u lidí (156).

FGF 21 a játra a pankreas

Játra jsou hlavním místem produkce cirkulujícího FGF 21 u myší i lidí. Nejsilnějším stimulem pro jeho produkci nezávislou na BMI je přitom obsah tuku v játrech (157). Nepřekvapuje proto, že zvýšené koncentrace FGF 21 jsou pravidelně nalézány u pacientů s nealkoholickou jaterní steatózou a steatohepatitidou (158). Účinky FGF 21 v játrech zahrnují stimulaci oxidace mastných kyselin a ketogeneze při lačnění nebo metabolicky podobných stavech (ketogenní dieta). Dále je FGF 21 zodpovědný za potlačení de novo jaterní lipogeneze (159). Efekt FGF 21 na glukózový metabolismus v játrech je závislý na časových okolnostech. Berglund et al. (160) a Xu et al. (161) prokázali, že chronické podávání FGF 21 vede k potlačení výdeje glukózy a jejímu použití pro tvorbu glykogenu. Naproti tomu jednorázové akutní podání FGF 21 indukuje tvorbu klíčových glukoneogenetických enzymů se zvýšením tvorby a výdeje glukózy. Podobný účinek byl pozorován na myších v průběhu lačnění (162).

Vzhledem k významné úloze jaterní steatózy v rozvoji inzulínové rezistence nepřekvapuje ani nález elevace koncentrací FGF 21 u prediabetu, diabetu mellitu 2. typu (163), gestačním diabetu (164) a diabetické retinopatii (165). Nicméně FGF 21 indukuje inzulínovou sekreci a využití glukózy tkáněmi (jaterní, tuková, svalová). Chronická aplikace FGF 21 vedla v pokusech na diabetických myších ke zvýšení počtu Langerhansových ostrůvků a zvýšení obsahu inzulínu v nich. Navíc měly tyto myši signifikantně sníženou sérovou hladinu inzulínu při lačnění a také nižší postprandiální glykemie. Působení FGF 21 vykazuje výraznou závislost na aktuálním nutričním stavu. Při lačnění vykazuje hyperglykemizující efekt stimulací lipolýzy, ketogeneze, glukoneogeneze a zvýšením inzulínové senzitivity (159). V případě dostatku potravy má FGF 21 naopak hypoglykemizující vliv podporou lipogeneze a diferenciacie adipocytů (166). Většina těchto poznatků byla ale získána na myších modelech, včetně hypoglykemizujícího účinku terapeuticky podaného FGF 21. U lidí ale aplikace analogů FGF 21 sérovou glykemií neovlivnila (167).

FGF 21, dyslipidemie a vaskulární komplikace

U jedinců s aterogenní dyslipidemií nalzáme zvýšené sérové koncentrace FGF 21 (150) (157) (168). Nejtěsnější korelace je přitom pozorována u TG, což zřejmě reflektuje jejich asociaci s hepatosteatózou. Elevované hladiny FGF 21 jsou asociovány rovněž s metabolickým syndromem, zvýšenou tepennou intimomediální tloušťkou (IMT), tepennou tuhostí a formací aterosklerotických plátů, včetně koronární nemoci (169) (170) (171) (172) (173). Tato pozorování svědčí pro vztah FGF 21 s vaskulárními komplikacemi. Zůstává ovšem otázkou, zda zvýšení jeho hladiny odráží kompenzační odpověď organismu na stav s vysokým cévním rizikem nebo je projevem rezistence na účinek FGF 21 (viz níže, odd. Rezistence na FGF 21).

FGF 21 a mozek

Expres FGF 21 byla nalezena i v různých částech myšího mozku, zejména v substantia nigra a ve striatu (174). Potvrzen byl i průnik FGF 21 přes hematoencefalickou bariéru (175). Přítomnost FGF 21 je předpokládána i v mozkové tkáni člověka, nicméně tato skutečnost musí být potvrzena dalším výzkumem. Dosud známé účinky FGF 21 v myším mozku zahrnují vzestup hladiny kortikosteronu, pokles hladin inzulínu, inhibice růstu (176) (177) a také změny cirkadiálního rytmu. Zdá se, že centrální působení FGF 21 je nutné pro jeho metabolický vliv, zejména

zvýšení energetického výdeje, váhový úbytek a snížení hladin cholesterolu (178). Zmíněná pozorování otevírají možnost fungování nově definované multifunkční osy játra-mozek s hepatokinem FGF 21 jako rozhodujícím mediátorem. Některé z kontroverzních nálezů mezi myšmi modely a lidmi by mohly být vysvětleny právě v rozdílu centrálních účinků FGF 21. U syntetických analogů FGF 21 terapeuticky použitých u pacientů ve studiích nebyl dostatečně zkoumán jejich průnik přes hematoencefalickou bariéru.

FGF 21 a kost

V souladu s pozorovanou inhibicí kostní formace působením FGF 21 u myši (179), Hanks et al. prokázal inverzní vztah mezi sérovou koncentrací FGF 21 a kostní densitou i u lidských jedinců (180). Patofyziologický podklad ozřejmil Wei et al., který verifikoval inhibici osteoblastogeneze a stimulaci adipogeneze u mezenchymálních kmenových buněk v kostní dřeni působením FGF 21 (179). Zdá se tak, že FGF 21 podporuje úbytek kostí přímo inhibicí kostní formace a nepřímo zvýšením jejich resorpce. Tento negativní vliv na kost je hlavním nežádoucím účinkem FGF 21 ohrožujícím jeho budoucí hypotetické terapeutické užití.

Teorie rezistence na FGF 21

Vzhledem k příznivým účinkům FGF 21 prokázaným na myších modelech byly elevované koncentrace FGF 21 nalezené u jedinců s poruchou glukózového a lipidového metabolismu nepříjemným překvapením. To vedlo k formulaci hypotézy o rezistenci k účinku FGF 21 u zmíněných subjektů, podobně jako je tomu u inzulinové či leptinové rezistence. Podporou tohoto tvrzení jsou například výsledky pokusů na obézních myších léčených aplikací FGF 21, kde došlo pouze k mírnému poklesu FFA společně s potlačenou indukcí FGF 21 genů (181). Existují ovšem i kontraverzní výsledky (182). Zatím navíc prakticky zcela chybějí údaje u lidí. Bude tak potřeba doplnit další výzkumy k potvrzení nebo vyvrácení uvedené hypotézy.

Na podkladě dosud zjištěných skutečností lze prohlásit, že FGF 21 představuje velmi důležitý adipokin/hepatokin s komplexním působením na homeostázu a metabolické pochody organismu, zejména lipidový a glukózový metabolismus jak u myší, tak u člověka. Shromážděné údaje setrvale dokumentují jeho příznivý vliv na výše uvedené metabolické děje, s výjimkou negativního působení na kostní denzitu. Nicméně existují důležité diskrepance mezi jeho působením u myší a lidí, které omezují předpokládané terapeutické použití analogů FGF 21 u lidí a vyžadují pokračování výzkumu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Adiponektin, A-FABP a FGF 21 u asymptomatických dyslipidemických jedinců.

Adiponektin, A-FABP a FGF 21 představují dle recentních poznatků důležité adipokiny/organokiny se vztahem k lipidovému metabolismu, transportu glukózy, rozvoji metabolického syndromu a diabetu mellitu 2. typu. I přes intenzivní výzkum na tomto poli jsou k dispozici pouze limitované údaje vzájemném vztahu těchto adipokinů u dyslipidemických pacientů, zejména s přítomností metabolického syndromu. Cílem následujícího výzkumu bylo proto porovnání hladin adiponektinu, A-FABP a FGF 21 u asymptomatických dyslipidemických jedinců s vyjádřeným metabolickým syndromem (MetS) i bez něj a objasnění vzájemných vztahů jednotlivých adipokinů k lipidovým parametrům, markerům inzulinové rezistence a endoteliálním hemostatickým markerům.

1.1. Pacienti a metody.

Soubor studovaných jedinců tvořilo celkem 209 asymptomatických dyslipidemických pacientů vyšetřených v lipidové poradně III. interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, u kterých byly vyloučeny možné příčiny sekundární hyperlipidemie: diabetes mellitus, hypotyreóza, ledvinná onemocnění, hepatopatie a nefrotický syndrom. Další vylučovací kritéria zahrnovala následující stavy: klinicky manifestní ateroskleróza prezentovaná koronární chorobou, cerebrovaskulárními nemocemi (ischemická cévní mozková příhoda apod.) a postižením periferních tepen, dále hypolipidemická léčba v předchozích 8 týdnech, hormonální terapie a přítomnost akutní infekce v době vyšetření. U všech zkoumaných osob byla odebrána anamnéza se zaměřením na kardiovaskulární problematiku, užívané léky a kouření. Byla realizována základní antropometrická vyšetření s výpočtem body mass indexu (BMI) a změřen systolický a diastolický krevní tlak (SBP, DBP). Studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Pacienti splňující zařazovací kritéria (n = 209) byli rozděleni do dvou skupin na podkladě přítomnosti metabolického syndromu (MetS): jedinci s metabolickým syndromem (MetS+, n=73, 31 mužů a 42 žen) a jedinci bez metabolického syndromu (MetS-, n=136, 74 mužů a 62 žen). K průkazu metabolického syndromu byla použita kritéria dle NCEP-ATPIII panel 2001: obvod pasu (muži >102 cm, ženy >88 cm), hladina triglyceridů (TG) $\geq 1,7$ mmol/l, hladina HDL cholesterolu (HDLc) (muži <1,04 mmol/l, ženy <1,30 mmol/l), krevní tlak $\geq 130/\geq 85$ mm Hg a lačná glykemie $\geq 6,1$ mmol/l. Přítomnost nejméně tří z výše uvedených faktorů diagnostikovala metabolický syndrom.

Laboratorní vyšetření

Vzorky krve použité k vyšetřením byly odebírány při vstupní kontrole v lipidové poradně, a to ráno po minimálně 12hodinovém lačnění. K vlastnímu vyšetření bylo použito sérum získané ze vzorků po centrifugaci.

Rutinní biochemické parametry byly analyzovány přístrojem Modular SWA (Roche, Basel Switzerland) v den odběru vzorků. Koncentrace adipokinů a dalších speciálních analytů byly změřeny z alikvotních vzorků uchovávaných při -80 (-20) °C nejpozději do 6 měsíců od odběru vzorků. Celkový cholesterol (TC), TG a HDLc byly stanoveny enzymaticky na přístroji Modular SWA systém (Basel, Roche, Switzerland). Stanovení HDLc bylo realizováno přímou metodou bez precipitace lipoproteinů obsahujících apolipoprotein B (ApoB). Hladiny LDL cholesterolu (LDLc) byly vypočteny pomocí Friedewaldovy rovnice (pro TG méně než 4,5 mmol/l). Výpočet byl použit také u následujících jednotek: non-HDL cholesterol, aterogenní index plazmy (AI) (logTG/HDLc). Koncentrace ApoB a apolipoproteinu A1 (ApoA1) byly stanoveny imunoturbidimetricky pomocí Tina-Quant Lipoprotein(a) TQ kitu (Roche, Basel, Switzerland). C-reaktivní protein (CRP) byl určen imunoturbidimetricky (kit Tina-Quant, Roche, Basel, Switzerland). Glykémii jsme stanovili pomocí GOD-PAP metody (Roche, Basel, Switzerland). N-terminální prohormon mozkového natriuretického peptidu (NT-proBNP) byl stanoven ECLIA metodou (Elecsys pro BNP reagent kit, Roche, Basel, Switzerland). Všechna měření provedena z čerstvého séra v den odběru krve. Inzulin určen pomocí specifických protilátek IRMA metodou (Immunotech, Marseille, France), rovněž C-peptid a proinzulín zjištěny pomocí komerčních kitů

(IRMA, Immunotech, France, resp. RIA, DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). Krevní vzorky uchovávány při -20 °C a stanovení proběhlo nejpozději do 6 měsíců po odběru.

Dále byly stanoveny hladiny následujících trombotických biomarkerů: von Willebrandův faktor (vWF) (Instrumentation Laboratory Spa, Milan, Italy), PAI-1 a tPA (oba ELISA, Technoclone, Vienna, Austria).

Hladiny adiponektinu, A-FABP a FGF 21 v séru byly změřeny pomocí ELISA (vše Biovendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic) z alikvotních vzorků uchovávaných při -80 °C. Sérové hladiny solubilních adhezivních molekul s-ICAM-1 a sVCAM-1 byly stanoveny komerčně dostupnými sety (Immunotech, Marseille, France) ze separátních alikvotních vzorků zamražených na -20°C.

Statistické zpracování dat

Číselné hodnoty výsledků byly vyjádřeny jako průměr \pm standardní odchylka (SD), parametry s nerovnoměrnou distribucí také jako mediány. Pro ověření normální distribuce byl užit Kolmogorovův-Smirnovův test. Proměnné s nerovnoměrnou distribucí (CRP, TG, lipoprotein(a), fibrinogen, vWF, tPA, PAI-1, inzulin, C-peptid, proinzulin, ADP, FGF 21, A-FABP, NT-proBNP) byly logaritmičsky transformovány před vlastní statistickou analýzou. Rozdíly mezi změřenými veličinami byly analyzovány pomocí ANCOVA po adjustaci na věk a pohlaví. Ke statistickému zhodnocení korelace mezi jednotlivými parametry byly použity Pearsonova korelační analýza pro veličiny s normálním rozložením a univariátní Spearmanova korelační analýza pro veličiny s nerovnoměrnou distribucí. Pro otestování nezávislé asociace mezi závisle proměnnými a nezávisle proměnnými byla zvolena vícenásobná regresní analýza. Ke statistickému zpracování dat byl použit statistický software SPSS Statistics, verze 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), všechny testy byly realizovány na úrovni signifikance 0,05.

1.2. Výsledky

Základní klinické a laboratorní charakteristiky zkoumaných subjektů shrnuje Tabulka 1. Jedinci s metabolickým syndromem měli dle očekávání nepříznivé lipidové a lipoproteinové profily (elevace TC, TG, nonHDL cholesterol, AI, ApoB, a naopak nízké hladiny HDLc a ApoA1) společně se známkami inzulinové

rezistence (zvýšené hladiny glykemie, inzulínu, proinzulínu a C-peptidu). Kromě výše zmíněného byly prokázány také vyšší koncentrace hemostatických markerů (tPA, PAI-1) a adhezivních faktorů (sVCAM-1, sICAM-1). U adipokinů byly nalezeny signifikantně nižší hladiny adiponektinu ve skupině pacientů s MetS ($p < 0,001$), zatímco koncentrace A-FABP a FGF 21 byly naopak zvýšené ($p < 0,001$).

V tabulce 2 jsou shrnuty zjištěné pozitivní korelace adipokinů s ostatními parametry ve skupinách dyslipidemických jedinců s MetS nebo bez MetS. Adiponektin koreloval ve skupině MetS+ pozitivně s věkem, HDLc, ApoA1, A-FABP a NT-proBNP, negativně pak s pohlavím a obvodem pasu. U A-FABP byla nalezena pozitivní korelace s vWF, adiponektinem, FGF 21 a NT-proBNP, zatímco FGF 21 koreloval pozitivně s TG, AI, vWF, PAI-1, A-FABP a obvodem pasu.

Ke zhodnocení, zda jsou zjištěné asociace adipokinů s ostatními parametry nezávislé, byla provedena vícenásobná regresní analýza s adipokiny jako závislými proměnnými a korelovanými parametry jako nezávislými prediktory (Tabulka 3).

Ve skupině MetS+ byla nalezena nezávislá pozitivní asociace adiponektinu s A-FABP ($\beta=0,4502$, $p < 0,05$), A-FABP byl nezávisle asociován s FGF 21 ($\beta=0,3811$, $p < 0,01$) a vWF ($\beta=0,4502$, $p < 0,01$). FGF 21 byl naproti tomu nezávisle sdružen jen s A-FABP ($\beta=0,4422$, $p < 0,001$). Ve skupině MetS- byla prokázána pozitivní asociace adiponektinu s vWF a negativní asociace s pohlavím, A-FABP asocioval pozitivně s FGF 21, vWF a BMI a FGF 21 byl pozitivně sdružen s A-FABP, TG a negativně s AI.

Tabulka 1. Základní charakteristiky všech studovaných jedinců a subjektů s MetS a bez MetS.

	All individuals n = 209	MetS- n = 136	Met S+ n = 73
<i>Age (years)</i>	46.7 ± 14.5	44.7 ± 15.9	50.1 ± 11.0
<i>CRP (mg/l)</i>	3.8 ± 10.1 (1.6)	2.9 ± 4.2 (1.4)	3.8 ± 4.5 (2.3) *
<i>TC (mmol/l)</i>	6.69 ± 1.84	6.42 ± 1.48	7.12 ± 2.25 **
<i>TG (mmol/l)</i>	3.01 ± 4.21 (1.77)	1.76 ± 1.74 (1.38)	4.34 ± 6.18 (3.31) ***
<i>AI</i>	0.1931 ± 0.4373	-0.0223 ± 0.3207	0.5827 ± 0.3563 ***
<i>nonHDL (mmol/l)</i>	5.33 ± 1.92	4.87 ± 1.51	6.10 ± 2.27 ***
<i>HDLc (mmol/l)</i>	1.37 ± 0.46	1.55 ± 0.45	1.03 ± 0.23 ***
<i>LDLc (mmol/l)</i>	4.06 ± 1.57	4.06 ± 1.33	3.97 ± 1.91
<i>Apo A1 (g/l)</i>	1.54 ± 0.37	1.65 ± 0.38	1.34 ± 0.25 ***
<i>Apo B (g/l)</i>	1.21 ± 0.38	1.13 ± 0.34	1.33 ± 0.43 ***
<i>Lp(a) (g/l)</i>	0.399 ± 0.465 (0.201)	0.409 ± 0.455 (0.221)	0.381 ± 0.489 (0.189)
<i>Fibrinogen (g/l)</i>	2.98 ± 0.76 (2.80)	2.90 ± 0.70 (2.73)	3.04 ± 0.64 (2.91)
<i>vWF (%)</i>	130 ± 55 (118)	128 ± 50 (118)	132 ± 60 (118)
<i>tPA (ng/ml)</i>	3.35 ± 2.43 (3.0)	2.79 ± 0.88 (2.8)	4.11 ± 2.82 (3.0) ***
<i>PAI-1 (ng/ml)</i>	65 ± 42 (58)	56 ± 36 (44)	83 ± 48 (78) **
<i>sICAM-1 (ng/ml)</i>	358 ± 148	335 ± 128	389 ± 173 *
<i>sVCAM-1 (ng/ml)</i>	743 ± 360	709 ± 327	819 ± 411 *
<i>Glucose (mmol/l)</i>	5.38 ± 1.04	5.10 ± 0.56	5.92 ± 1.46 ***
<i>Insulin (mIU/l)</i>	10.3 ± 6.6 (8.5)	8.4 ± 4.5 (7.5)	13.7 ± 8.2 (11.7) ***
<i>C-peptide (mg/l)</i>	2.7 ± 1.4 (2.5)	2.3 ± 1.0 (2.2)	3.6 ± 1.7 (3.4) ***
<i>BMI (kg/m²)</i>	26.99 ± 4.75	25.19 ± 4.17	30.36 ± 4.05 ***
<i>Waist (cm)</i>	91.1 ± 14.2	85.9 ± 11.9	101.0 ± 12.7 ***
<i>PINS (mIU/l)</i>	14.8 ± 10.5 (11.4)	12.0 ± 8.3 (9.6)	20.3 ± 12.2 (16.6) ***
<i>ADP (mg/l)</i>	8.6 ± 5.2 (7.4)	9.4 ± 5.0 (8.0)	7.0 ± 5.3 (5.4) ***
<i>FGF 21 (ng/l)</i>	317.7 ± 440.4 (197.6)	222.3 ± 299.9 (156.5)	471.4 ± 531.7 (305.6) ***
<i>A-FABP (μg/l)</i>	26.2 ± 17.9 (21.9)	22.2 ± 12.7 (19.9)	33.8 ± 23.5 (29.1) ***
<i>NT-proBNP (ng/l)</i>	65.7 ± 82.1 (40.7)	65.4 ± 84.2 (44.5)	67.7 ± 81.0 (41.4)
<i>SBP (mm Hg)</i>	128.7 ± 15.2	125.1 ± 13.6	136.1 ± 15.6 ***
<i>DBP (mm Hg)</i>	77.8 ± 8.7	75.9 ± 8.3	81.7 ± 8.0 ***

Data are expressed as means ± standard deviations, in parameters with skewed distribution also as medians (in parentheses). Differences in variables between groups were analyzed with ANCOVA after adjustment for age and sex. Variables with skewed distribution (CRP, TG, Lp(a), fibrinogen, vWF, tPA, PAI-1, insulin, C-peptide, PINS, ADP, FGF 21, A-FABP, NT-proBNP) were log transformed to normalize their distribution before statistical analyses. Significant differences between MetS- and MetS+ groups: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. CRP, C-reactive protein; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDLc, high density lipoprotein cholesterol; LDLc, low density lipoprotein cholesterol; nonHDL=TC-HDLc; AI, atherogenic index of plasma (logTG/HDLc); Apo, apolipoprotein; Lp(a), lipoprotein (a); vWF, von Willebrand factor; tPA, tissue plasminogen activator; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1; BMI, body mass index; PINS, proinsulin; ADP, adiponectin; FGF 21, fibroblast growth factor 21; A-FABP, adipocyte fatty acid binding protein; NT-proBNP, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

Tabulka 2. Signifikantní korelace hladin adipokinů s ostatními parametry ve skupinách MetS+ a MetS- (r a p hodnoty).

a) ADP

	Age	Sex	Waist	HDLc	Apo A1	vWF	A-FABP	NT-proBNP
<i>ADP MetS+</i>	0.386 <i>0.001</i>	-0.520 <i>0.000</i>	-0.414 <i>0.001</i>	0.499 <i>0.000</i>	0.355 <i>0.002</i>	0.139 <i>0.254</i>	0.267 <i>0.022</i>	0.411 <i>0.000</i>
<i>ADP MetS-</i>	0.261 <i>0.002</i>	-0.399 <i>0.000</i>	-0.253 <i>0.008</i>	0.476 <i>0.000</i>	0.507 <i>0.000</i>	0.310 <i>0.000</i>	0.124 <i>0.151</i>	0.442 <i>0.000</i>

b) A-FABP

	Age	BMI	Waist	vWF	ADP	FGF 21	NT-proBNP
<i>A-FABP MetS+</i>	0.117 <i>0.326</i>	0.050 <i>0.678</i>	0.046 <i>0.729</i>	0.404 <i>0.001</i>	0.267 <i>0.022</i>	0.521 <i>0.000</i>	0.399 <i>0.001</i>
<i>A-FABP MetS-</i>	0.327 <i>0.001</i>	0.379 <i>0.000</i>	0.288 <i>0.002</i>	0.266 <i>0.002</i>	0.124 <i>0.151</i>	0.282 <i>0.001</i>	0.198 <i>0.023</i>

c) FGF 21

	TG	AI	vWF	PAI-1	A-FABP	Waist
<i>FGF 21 MetS+</i>	0.374 <i>0.001</i>	0.340 <i>0.001</i>	0.362 <i>0.002</i>	0.223 <i>0.050</i>	0.521 <i>0.000</i>	0.256 <i>0.050</i>
<i>FGF 21 MetS-</i>	0.240 <i>0.005</i>	0.172 <i>0.046</i>	0.079 <i>0.371</i>	0.201 <i>0.022</i>	0.282 <i>0.001</i>	0.050 <i>0.606</i>

Pearson correlation analysis for parameters with normal distribution. Spearman correlation analysis for parameters with skewed distribution (TG, vWF, tPA, PAI-1, ADP, FGF 21, A-FABP, NT-proBNP). Bold values indicate significance at p<0.05.

Tabulka 3. Nezávislé asociace adiponektinu, A-FABP a FGF 21 zjištěné vícenásobnou regresní analýzou (tučně).

a) ADP			
	A-FABP	vWF	sex
<i>ADP MetS+</i>	beta = 0.4888 <i>p = 0.0382</i>	NS	NS
<i>ADP MetS-</i>	NS	beta = 0.4332 <i>p = 0.0245</i>	beta = -0.0609 <i>p = 0.0447</i>
b) A-FABP			
	FGF 21	vWF	BMI
<i>A-FABP MetS+</i>	beta = 0.3811 <i>p = 0.0002</i>	beta = 0.4502 <i>p = 0.0013</i>	NS
<i>A-FABP MetS-</i>	beta = 0.1491 <i>p = 0.0392</i>	beta = 0.3524 <i>p = 0.0352</i>	beta = 0.3785 <i>p = 0.0026</i>
c) FGF 21			
	A-FABP	TG	AI
<i>FGF 21 MetS+</i>	beta = 0.4422 <i>p = 0.0002</i>	NS	NS
<i>FGF 21 MetS-</i>	beta = 0.2984 <i>p = 0.0026</i>	beta = 0.1150 <i>p = 0.0358</i>	beta = -0.1105 <i>p = 0.0178</i>

Bold values indicate significance at $p < 0.05$. NS – no significance.

Tabulky 1, 2 a 3 převzaty z:

NOVOTNY, D. – VAVERKOVA, H. – KARASEK, D. – LUKES, J. – SLAVIK, L. – MALINA, P. – ORSAG, J. Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. *Physiological Research*, 2014, **63**, 219-228. ISSN: 0862-8408

1.3. Diskuse a závěr.

Ve studii jsme potvrdili očekávaný rizikový profil dyslipidemických pacientů s MetS, ač zatím asymptomatických. Vykazovali nepříznivý lipidový i lipoproteinový profil a zvýšené parametry inzulinové rezistence. Rovněž byly u těchto pacientů zjištěny vyšší koncentrace hemostatických markerů (tPA, PAI-1) a adhezivních molekul.

Snížené hladiny adiponektinu u těchto nemocných rovněž nepředstavovaly překvapení a byly ve shodě s publikovanými údaji (183) (184), stejně jako zvýšení A-FABP (185) a vyšší koncentrace FGF 21 (150).

Z výsledků korelací hladin adipokinů s ostatními parametry v uvedené studii stojí za pozornost zejména 3 zjištění:

1. pozitivní korelace hladin adiponektinu a A-FABP s NT-proBNP v obou sledovaných skupinách pacientů (MetS+ i MetS-).
2. nenalezení signifikantní korelace A-FABP s metabolickými a antropometrickými parametry inzulinové rezistence.
3. průkaz silné korelace A-FABP s FGF 21 u obou zkoumaných skupin pacientů.

Poznatky získané ve studiích na zvířatech podporují etiologickou roli A-FABP v rozvoji kardiovaskulárních chorob (69). A-FABP byl identifikován jako činitel, který zprostředkovává supresivní efekt adipocytů na srdeční kontraktilitu (186). Lze tak usuzovat, že zjištěná nezávislá asociace adiponektinu s A-FABP ve skupině MetS+ může být spojena se vztahem těchto adipokinů k srdeční funkci a odrážet elevaci adiponektinu jako kompenzační odpověď na vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění u těchto pacientů. Oba dva sledované parametry navíc pozitivně korelovaly s NT-proBNP, který je uznáván jako přesný a senzitivní diagnostický marker srdečního selhávání, i když signifikance této korelace nebyla v naší studii následnou vícenásobnou regresní analýzou potvrzena. Tyto poznatky jsou ve shodě s dosud publikovanými údaji, které rovněž prokázaly pozitivní asociaci adiponektinu se zánětlivými parametry, aterogenní dyslipidemií a NT-proBNP (187), jako i vztah A-FABP a koronární aterosklerózy (188) (189) s jeho předpokládaným vlivem na rozvoj kardiální dysfunkce včetně pozitivní korelace s NT-proBNP (190).

Dle vícečetných studií korelují sérové hladiny A-FABP s parametry inzulinové rezistence (glykémie, sérový inzulin, BMI, obvod pasu) u obézních jedinců, dále u

pacientů s diabetes mellitus 2. typu, s kombinovanou familiární hyperlipidemií a s metabolickým syndromem (191). V naší studii jsme v kontrastu k výše uvedenému našli jen slabou nebo vůbec žádnou korelaci A-FABP s výše uvedenými parametry ve skupině dyslipidemických pacientů s MetS, ačkoliv byly pozorovány signifikantní rozdíly v hladinách A-FABP mezi oběma skupinami (MetS+ a MetS-). Lze zvažovat vliv relativně malé velikosti souboru pacientů s MetS, nicméně toto zjištění je překvapivé a nemáme pro něj adekvátní vysvětlení. Pozitivní korelace A-FABP jsme naopak prokázali s vWF, adiponektinem, FGF 21 a NT-proBNP, ovšem nezávislá asociace byla ověřena vícenásobnou regresní analýzou pouze s vWF a FGF 21. Tento vztah s hemostatickým faktorem podporuje roli A-FABP v rozvoji endotelové dysfunkce a proaterogenní aktivity. V souladu s naším zjištěním jsou i patofyziologické literární poznatky o zprostředkování aterogenní aktivity A-FABP nikoliv vlivem na inzulinovou senzitivitu či lipidový metabolismus, ale přímým působením na makrofágy (192).

Nejdůležitějším výsledkem této studie je verifikace silné reciproční pozitivní asociace hladin FGF 21 s A-FABP u obou zkoumaných skupin pacientů s výraznějším vyjádřením v MetS+ ($p=0,0002$). Jedním z důvodů elevace FGF 21 u zmíněných nemocných může být kompenzační odpověď organismu na zvýšený metabolický stres vyjádřený vyššími hladinami A-FABP. Vyšší hladiny FGF 21 byly již dříve prokázány u kardiometabolických onemocnění jako obezita, metabolický syndrom, diabetes mellitus 2. typu a koronární nemoc (130). Cirkulující FGF 21 je produkován játry, zřejmě v důsledku indukce jeho tvorby zvýšenými hladinami lipidů a sacharidů v játrech (193). Ovšem zůstává otázkou, zda je cirkulující FGF 21 pouze marker těchto metabolických změn nebo, zda je jedním z jejich příčin. Druhým možným vysvětlením elevace FGF 21 u dyslipidemických pacientů s metabolickým syndromem může být naopak rezistence k účinkům FGF 21. Na počátku metabolických účinků FGF 21 je jeho vazba na FGF receptor: β -Klotho komplex (194). β -Klotho je zvýšeně exprimován v metabolicky aktivních tkáních včetně tukové tkáně, jater a pankreatu. Provedené studie naznačují vliv zánětlivých změn tukové tkáně u obezity na snížení exprese β -Klotho v důsledku působení TNF- α v adipocytech, což blokuje účinek FGF 21. Podobný mechanismus může vést k rezistenci na FGF 21 rovněž při stavech spojených se subklinickou zánětlivou odpovědí, jako například metabolický

syndrom, diabetes mellitus 2. typu a koronární nemoc (130). Svůj podíl na rezistenci tkání k působení FGF 21 může mít i A-FABP svým prozánětlivým působením.

Závěrem lze shrnout, že těžiště a význam této práce leží v ozřejmění vzájemných vztahů hladin adiponektinu, A-FABP a FGF 21 u dyslipidemických jedinců, zejména s přítomností MetS. Byly nalezeny pozitivní asociace adiponektinu s A-FABP a zejména pozitivní reciproční asociace mezi hladinami FGF 21 a A-FABP u obou skupin dyslipidemických pacientů s dominancí ve skupině s metabolickým syndromem. Dále jsme prokázali nezávislý vztah A-FABP a vWF.

2. A-FABP a vybrané biomarkery hemostázy a endoteliální dysfunkce u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.

V níže uvedené části výzkumu jsme se podrobněji zaměřili na vztah A-FABP k markerům hemostázy a endoteliální dysfunkce u asymptomatických pacientů s dyslipidemií bez ohledu na přítomnost či absenci metabolického syndromu s kontrolní skupinou zdravých jedinců. Podkladem pro výzkum byly již dříve verifikovaná spojitost mezi zvýšenými hladinami A-FABP a rozvojem aterosklerózy. Právě asociace A-FABP s markery hemostázy a endotelové dysfunkce představuje jeden z možných patofyziologických podkladů výše zmíněných účinků A-FABP.

2.1. Pacienti a metody.

Studovaný soubor tvořilo celkem 155 jedinců, a to jednak asymptomatických dyslipidemických pacientů, jednak zdravých kontrol. Pacienti byli rekrutováni ze souboru vyšetřených v lipidové poradně III. interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, u kterých byly vyloučeny možné příčiny sekundární hyperlipidemie. Vstupní a vylučovací kritéria se shodovala s předchozí studií (viz oddíl 1.1.).

Jedinci splňující zařazovací kritéria (n = 155) byli rozděleni do dvou skupin: asymptomatických pacientů s dyslipidemií (n = 105, 53 mužů a 52 žen) a zdravých normolipidemičtí jedinci (n = 50, 21 mužů a 29 žen) sloužící jako kontrolní skupina. Hyperlipidemie byla pro účely výzkumu definována jako přítomnost koncentrace sérových TG $\geq 1,5$ mmol/l a/nebo koncentrace ApoB $\geq 1,2$ g/l. Hodnota TG byla zvolena vzhledem k vyššímu zastoupení malých denzních LDL částic od zmíněné hladiny (195), hladina ApoB pak v důsledku prokázaného rapidně se zvyšujícího kardiovaskulárního rizika od udané koncentrace (196).

Laboratorní vyšetření

Vzorky krve použité k vyšetřením byly odebírány při vstupní kontrole v lipidové poradně, a to ráno po minimálně 12hodinovém lačnění. Biochemické parametry, včetně adipokinu A-FABP a hemostatických markerů (vWF, PAI-1, t-PA) a adhezivních molekul (sICAM-1, sVCAM-1) byly vyšetřeny stejným způsobem a metodami jako u předchozí studie (viz odd. 1.1. sekce *Laboratorní vyšetření*).

Výpočtem dle Matthewse et al. (197) byl zjištěn parametr inzulinové rezistence HOMA („homeostasis model assessment index“).

Statistické zpracování dat

Číselné hodnoty výsledků byly vyjádřeny jako průměr \pm standardní odchylka (SD), parametry s nenormální distribucí pak jako 25. a 75. percentil. Pro ověření normální distribuce byl užit Kolmogorovův-Smirnovův test. Proměnné s nenormální distribucí (TG, inzulin, HOMA, hs-CRP, tPA, PAI-1, sVCAM-1, sICAM-1, A-FABP) byly logaritmičsky transformovány k normalizaci jejich distribuce před vlastní statistickou analýzou. Rozdíly mezi měřenými veličinami byly analyzovány pomocí ANOVA po adjustaci na věk a pohlaví. Ke statistickému zhodnocení korelace mezi jednotlivými parametry byly použity univariální korelační analýza. Pro otestování nezávislé asociace mezi závisle proměnnými a nezávisle proměnnými byla zvolena vícenásobná regresní analýza. Ke statistickému zpracování dat byl použit statistický software SPSS Statistics, verze 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), všechny testy byly realizovány na úrovni signifikance 0,05.

2.2. Výsledky.

Základní klinické a laboratorní charakteristiky zkoumaných subjektů shrnuje Tabulka 4. Ve srovnání s kontrolami měli dyslipidemičtí pacienti signifikantně vyšší hladiny inzulinu, lačné glykémie, PAI-1, hs-CRP a také vyšší HOMA, BMI a obvod pasu. Naopak rozdíly nebyly zjištěny v hladinách vWF, tPA, sICAM-1, sVCAM-1 a A-FABP. Koncentrace A-FABP ve skupině dyslipidemických pacientů korelovaly pozitivně s věkem ($r = 0,252$, $p < 0,05$), TG ($r = 0,368$, $p < 0,001$), inzulinem ($r = 0,229$, $p < 0,05$), HOMA ($r = 0,238$, $p < 0,05$), BMI ($r = 0,481$, $p < 0,001$), obvodem pasu ($r = 0,233$, $p < 0,05$), hs-CRP ($r = 0,279$, $p < 0,01$) a vWF ($r = 0,214$, $p < 0,05$), negativní korelace byla naopak prokázána s mužským pohlavím ($r = 0,252$, $p < 0,05$). U zdravých jedinců v kontrolní skupině korelovaly koncentrace A-FABP pozitivně s TG ($r = 0,311$, $p < 0,05$), inzulinem ($r = 0,561$, $p < 0,001$), HOMA ($r = 0,571$, $p < 0,001$), BMI ($r = 0,437$, $p < 0,01$) a negativně s HDLc ($r = -0,324$, $p < 0,05$). Koncentrace A-FABP u dyslipidemických pacientů prokázaly při vícenásobné regresní analýze nezávislou asociaci s pohlavím, BMI a vWF (Tabulka 5) dyslipidemických pacientů, zatímco u zdravých kontrol byl

asociován s BMI (beta = 0,43, t = 3,62, p <0,001) a inzulínem (beta = 0,62, t = 2,99, p <0,001).

Tabulka 4. Základní charakteristiky souborů.

	NL (n=50)	DL (n=105)
Age (years)	45.2±17.0	45.0±13.5
TC (mmol/l)	5.61±0.88	7.28±1.73***
TG [‡] (mmol/l)	1.05 [0.83-1.21]	2.58 [1.73-4.16]***
HDL-C (mmol/l)	1.68±0.5	1.26±0.38***
LDL-C (mmol/l)	3.47±0.78	4.27±1.53***
non-HDL-C (mmol/l)	3.94±0.81	5.99±1.76***
apoB (g/l)	0.91±0.18	1.30±0.32***
fasting glycemia (mmol)	5.08±0.58	5.48±1.1*
insulin [‡] (mIU/l)	6.9 [4.7-11.3]	9.0 [7.1-12.5]*
HOMA [‡] (mIU*mmol/l ²)	1.57 [0.97-2.6]	2.18 [1.57-3.16]*
SBP (mm Hg)	129.7±14.6	129.6±15.3
DBP (mm Hg)	79.2±9.3	78.9±8.9
BMI (kg/m ²)	25.5±4.7	27.4±4.6*
waist circumference (cm)	85.2±14.7	93.8±13.9*
hs-CRP [‡] (mg/l)	1.0 [0.5-2.2]	1.9 [0.8-3.7]*
vWF (%)	123.5±52.1	134.7±52.3
t-PA [‡] (μg/l)	3.0 [2.0-3.5]	3.0 [2.1-4.2]
PAI-1 [‡] (μg/l)	40.0 [29.5-74.5]	63.5 [34.3-94.1]*
s-ICAM-1 [‡] (μg/l)	327 [240-473]	346 [280-475]
s-VCAM-1 [‡] (μg/l)	697 [488-867]	651 [418-871]
A-FABP [‡] (μg/l)	21.7 [15.0-31.3]	23.3 [16.1-34.3]

NL= normolipidemic controls, DL = dyslipidemic subjects (apoB ≥1.2 g/l and/or TG ≥1.5 mmol/l), TC = total cholesterol, TG = triglycerides, HDL-C = HDL cholesterol, LDL-C = LDL cholesterol, non-HDL-C = non-HDL cholesterol (TC – HDL-C), apoB = apolipoprotein B, HOMA = homeostasis model assessment, SBP = systolic blood pressure, DBP = diastolic blood pressure, BMI = body mass index, hs-CRP = high sensitivity C reactive protein, vWF = von Willebrand factor, t-PA = tissue-plasminogen activator, PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1, s-ICAM-1 = soluble intercellular cell adhesion molecule-1, s-VCAM-1 = soluble vascular cell adhesion molecule-1, A-FABP = serum adipocyte fatty acid-binding protein
 Values are expressed as mean ± standard deviation, for[‡] (parameters with skewed distribution) as median [25 and 75 percentiles]. Differences in variables between groups were analyzed with ANOVA after adjustment for age and sex. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 ... statistical significance level

Tabulka 5. Vícenásobná regresní analýza vztahů mezi A-FABP jako závisle proměnnou a korelujícími parametry jako nezávislými prediktory ve skupině dyslipidemických pacientů.

	Beta	t	p-value
age	0.07353	1.32655	n.s.
gender	-0.09485	-2.89502	0.006
TG (log)	0.00637	0.16525	n.s.
CRP (log)	0.00398	0.19876	n.s.
insulin (log)	0.30240	1.87779	n.s.
HOMA (log)	-0.08941	-1.24498	n.s.
BMI	0.52517	3.36664	0.002
waist circumference	0.10472	0.46511	n.s.
vWF	0.14483	3.27170	0.002

TG = triglycerides, hs-CRP = high sensitivity C reactive protein, HOMA = homeostasis model assessment, BMI = body mass index, vWF = von Willebrand factor

Parameters with skewed distribution (TG, hs-CRP, insulin, HOMA, A-FABP) were log transformed to normalize their distribution before statistical analysis

Tabulky 4 a 5 převzaty z:

KARASEK, D. – VAVERKOVA, H. – FRYSAK, Z. – ORSAG, J. – NOVOTNY, D. – HALENKA, M. – SLAVIK, L. Relationship between serum adipocyte fatty acid-binding protein and endothelial/hemostatic markers in dyslipidemic subjects. *Neuroendocrinology Letters*, 2012, **33**, Suppl. 2, 26-31. ISSN: 0172-780X

2.3. Diskuse a závěr.

V realizovaném výzkumu nebyly potvrzeny signifikantně zvýšené hladiny A-FABP u asymptomatických pacientů s dyslipidemií oproti zdravým kontrolám. A-FABP zde nekoreloval s TC, LDLc, HDLc, nonHDLc ani s ApoB. Naproti tomu ale A-FABP koreloval s TG, markery inzulínové rezistence, viscerální obezity a zánětu.

Tato zjištění ukazují na klíčový podíl obezity a inzulínové rezistence na vzestup sérové koncentrace A-FABP. Někteří autoři považují A-FABP přímo za marker tělesné adipozity (112) (198). V naší studii ale nebyla asociace A-FABP s hladinami TG nezávislá, což může být způsobeno adipozitou a inzulínovou rezistencí vedoucí samostatně k elevaci TG.

Hladiny A-FABP vykazovaly dále pozitivní korelaci s hs-CRP, což se shoduje s údaji v dostupné literatuře (185) (198) (112), a poukazuje na význam A-FABP jako prozánětlivého faktoru, který zprostředkovává spojení inzulínové rezistence se systémovou zánětlivou odpovědí. Přesný mechanismus tohoto působení není do detailu objasněn, nicméně jsou známy dílčí patofyziologické pochody. Hui et al. ukázal na schopnost akcelerace cévního zánětu prostřednictvím tvorby pozitivní zpětné vazby A-FABP s C-Jun N-terminálními kinázami (JNK) a „activator protein-1“ v makrofázích vedoucí k zánětlivé odpovědi indukované lipopolysacharidy (89). Aktivovaná JNK zvyšuje expresi A-FABP akcelerací genové transkripce a elevace A-FABP potencuje aktivaci JNK vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů (89) (199).

Z pohledu vztahu k hemostatickým markerům a markerům endotelové dysfunkce koreloval A-FABP pouze s vWF, ovšem tento vztah se ukázal nezávislým na ostatních metabolických faktorech, věku, pohlaví i BMI. Tento poznatek byl v době realizace studie nový (společně s výše zmíněným výzkumem – viz odd. 1) a nebyl předtím publikován v dostupné literatuře. V roce 2018 byla uvedena asociace potvrzena i u pacientů s diabetem mellitem 2. typu (200). Přesný mechanismus tohoto vztahu není dosud detailně objasněn, nicméně podporuje hypotézu o působení A-FABP jako důležitého faktoru v rozvoji endoteliální dysfunkce. vWF je produkován téměř výhradně buňkami cévního endotelu jako reakce na působení prozánětlivých cytokinů. Zvýšení plazmatické hladiny vWF nalzáme u různorodých stavů spojených s endoteliálním poškozením, což naznačuje jeho význam jako užitečného markeru endoteliální dysfunkce (201). Byl také nalezen společný výskyt A-FABP a vWF v endotelu apoE^{-/-} myši (202). A-FABP se

vyskytuje v aterosklerotických plátech karotid, jak prokázal Agardh *et al.* (203). Obsah A-FABP byl navíc vyšší v nestabilních plátech společně s populací makrofágů, což rovněž podporuje teorii o úloze A-FABP jako klíčového faktoru spojujícího vaskulární zánět s buněčnou akumulací lipidů. A-FABP aktivuje signální kaskády zprostředkované jak JNK, tak i nukleárním faktorem kappab (NFκB), které regulují transkripční aktivitu prozánětlivých genů (204). Účast A-FABP v procesu zánětlivé reakce aktivací NFκB může vést ke zvýšenému oxidačnímu stresu se snížením biologické dostupnosti oxidu dusného, a tím k endoteliální dysfunkci (205). Aktivace NFκB kaskády může být také příčinou zvýšené produkce vWF, jak bylo prokázáno při endoteliálním poškození indukovaného sepsí (206).

Otázkou zůstává absence průkazu korelace A-FABP s ostatními parametry hemostázy a endotelové dysfunkce. Pro tuto skutečnost existuje několik vysvětlení. PAI-1 představuje pravděpodobně méně specifický ukazatel endoteliálního poškození než vWF vzhledem ke skutečnosti, že je produkován více tkáněmi – endotelie, játra, tuková tkáň (207). Vyšší hladiny PAI-1 u dyslipidemických pacientů tedy nemusí odrážet jen endoteliální dysfunkci, ale mohou být způsobeny akcelerací produkce v játrech nebo tukové tkáni nezávisle na A-FABP. Tvorba PAI-1 je také spojena s hladinami tPA, protože většina tPA antigenu detekovatelného v krevním oběhu představuje část inaktivního cirkulujícího komplexu s PAI-1 (208). Zatímco VCAM-1 je lokálně produkován v endotelu, který překrývá místa aterosklerotických lézí, exprese ICAM-1 není omezena pouze na endotel. ICAM-1 je produkován i makrofágy, buňkami hladké svaloviny fibroblasty a kmenovými buňkami kostní dřeně (209). Navíc solubilní formy těchto adhezivních molekul většinou u asymptomatických dyslipidemických pacientů neodrážejí jejich vstupní akcelerovanou endoteliální expresi. Zejména hladiny s-VCAM-1 jsou zvýšeny jen u pacientů s manifestní aterosklerózou (210) (211). Různé hemostatické a endoteliální markery jsou pravděpodobně regulovány odlišnými cestami a reprezentují různorodé typy nebo závažnosti endoteliální dysfunkce. Lze spekulovat i o nedostatečné velikosti zkoumaného souboru pacientů a také jejich heterogenitě (přítomnost diabetu, metabolického syndromu apod.).

Význam popsané studie spočívá především v novém průkazu nezávislé asociace A-FABP s hemostatickým markerem vWF u klinicky asymptomatických pacientů s dyslipidemií, která může přispět k vysvětlení postavení A-FABP v procesu vzniku endoteliální dysfunkce.

3. FGF 21 a vybrané biomarkery hemostázy a endoteliální dysfunkce u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.

FGF 21 je zvažován jako nezávislý faktor v ochraně buněk kardiovaskulárního systému. V následující studii jsme se zaměřili na zhodnocení vztahu FGF 21 k hemostatickým a endotelovým markerům u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.

3.1. Pacienti a metody.

Studovaný soubor tvořilo 214 asymptomatických dyslipidemických pacientů. Pacienti byli rekrutováni ze souboru vyšetřených v lipidové poradně III. interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, u kterých byly vyloučeny možné příčiny sekundární hyperlipidemie. Vstupní a vylučovací kritéria se shodovala s předchozími studii (viz oddíl 1.1. a 2.1.).

Jedinci splňující zařazovací kritéria (n = 214) byli rozděleni do dvou skupin: asymptomatických pacientů s dyslipidemií (n = 148, 70 mužů a 78 žen) a kontrolní skupina (n = 66, 38 mužů a 28 žen). Dyslipidemie byla pro účely výzkumu definována jako přítomnost koncentrace sérových TG \geq 1,5 mmol/l a/nebo koncentrace ApoB \geq 1,2 g/l. Hodnota TG byla zvolena vzhledem k vyššímu zastoupení malých denzních LDL částic od zmíněné hladiny (195), hladina ApoB pak v důsledku prokázaného rapidně se zvyšujícího kardiovaskulárního rizika od udané koncentrace (196).

Laboratorní vyšetření

Vzorky krve použité k vyšetřením byly odebírány při vstupní kontrole v lipidové poradně, a to ráno po minimálně 12hodinovém lačnění. Biochemické parametry, včetně adipokinů FGF 21 a hemostatických markerů (fibrinogen, vWF, PAI-1, t-PA) a adhezivních molekul (sICAM-1, sVCAM-1) byly vyšetřeny stejným způsobem a metodami jako u předchozí studie (viz odd. 1.1. sekce *Laboratorní vyšetření*). Navíc byl vyšetřen i solubilní trombomodulin (sTBM) metodou ELISA (Thrombomodulin, Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, France).

Statistické zpracování dat

Číselné hodnoty výsledků byly vyjádřeny jako průměr \pm standardní odchylka (SD), parametry s nerovnoměrnou distribucí také jako mediány. Pro ověření normální distribuce byl užit Kolmogorovův-Smirnovův test. Proměnné s nerovnoměrnou distribucí (TG, ApoB, fibrinogen, vWF, tPA, PAI-1, sTBM, inzulin, C-peptid, proinzulin) byly logaritmicky transformovány před vlastní statistickou analýzou. Rozdíly mezi změřenými veličinami byly analyzovány pomocí ANOVA po adjustaci na věk, pohlaví a BMI. Ke statistickému zhodnocení korelace mezi jednotlivými parametry byly použity Pearsonova korelační analýza pro veličiny s normálním rozložením a univariální Spearmanova korelační analýza pro veličiny s nerovnoměrnou distribucí. Pro otestování nezávislé asociace mezi závisle proměnnými a nezávisle proměnnými byla zvolena vícenásobná regresní analýza. Ke statistickému zpracování dat byl použit statistický software SPSS Statistics, verze 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), všechny testy byly realizovány na úrovni signifikance 0,05.

3.2. Výsledky.

Základní klinické a laboratorní charakteristiky studovaných skupin pacientů jsou shrnuty v Tabulce 6. Ve srovnání s kontrolami byly u dyslipidemických jedinců prokázány signifikantně vyšší plazmatické hladiny TC, LDLc ($p < 0,001$), fibrinogenu a FGF 21 ($p < 0,001$ a $p < 0,01$) a naopak snížené koncentrace HDLc a ApoA1 ($p < 0,001$ a $p < 0,01$), vše po adjustaci na věk, pohlaví a BMI.

Koncentrace FGF 21 korelovaly pozitivně s C-peptidem ve skupině kontrol, zatímco ve skupině dyslipidemických pacientů byla nalezena signifikantní pozitivní korelace s vWF, tPA, PAI-1, s-ICAM-1, sVCAM-1, glykemií, C-peptidem a proinzulinem (Tabulka 7).

Při vícečetné regresní analýze byla prokázána nezávislá pozitivní asociace FGF 21 s vWF (beta = 0,4214, $p < 0,01$), tPA (beta = 0,1103, $p < 0,01$) a glykemií (beta = 0,2655, $p < 0,05$) pouze u dyslipidemických pacientů (Tabulka 8).

Tabulka 6. Základní charakteristiky dyslipidemických subjektů rozdělených dle hladin ApoB a TG.

	All subjects	CG	DLP
	n = 214	n = 66	n = 148
Male/Female	108/106	38/28	70/78
Smoking	54 (25%)	11 (17%)	43 (29%)
Age, years	46.7 ± 14.5 (35.0-57.0)	46.1 ± 15.9 (33.7-57.2)	47.0 ± 13.7 (35.3-57.0)
BMI, kg/m ²	26.99 ± 4.75 (23.25-29.51)	25.00 ± 4.06 (22.03-26.90)	27.85 ± 4.78** (24.62-30.74)
Waist, cm	91.1 ± 14.2 (80.0-100.3)	83.1 ± 11.4 (75.0-91.0)	94.2 ± 13.9 (85.0-104.0)
SBP, mm Hg	128.7 ± 15.2 (120-140)	127.6 ± 12.6 (120-140)	129.3 ± 16.2 (120-140)
DBP, mm Hg	77.8 ± 8.7 (70-80)	77.5 ± 8.0 (70-80)	77.9 ± 9.0 (70-80)
TC, mmol/l	6.69 ± 1.84 (5.48-7.58)	5.62 ± 0.93 (5.00-6.31)	7.17 ± 1.94*** (5.90-8.20)
TG, mmol/l	3.01 ± 4.21 [1.77] (1.12-3.08)	1.01 ± 0.28 [1.01] (0.83-1.23)	3.90 ± 4.80 [2.51]*** (1.71-3.88)
HDLc, mmol/l	1.37 ± 0.46 (1.02-1.63)	1.68 ± 0.49 (1.28-2.00)	1.23 ± 0.37*** (0.95-1.43)
LDLc, mmol/l	4.06 ± 1.57 (3.09-4.69)	3.48 ± 0.85 (2.96-4.08)	4.33 ± 1.74*** (3.28-5.25)
Apo A1, g/l	1.54 ± 0.37 (1.26-1.78)	1.67 ± 0.41 (1.37-2.01)	1.48 ± 0.34** (1.22-1.71)
Apo B, g/l	1.21 ± 0.38 [1.13] (0.97-1.40)	0.93 ± 0.19 [0.95] (0.79-1.07)	1.33 ± 0.38 [1.26]*** (1.05-1.53)
Fibrinogen, g/l	2.98 ± 0.76 [2.80] (2.50-3.30)	2.74 ± 0.55 [2.60] (2.40-3.02)	3.08 ± 0.82 [2.98]** (2.62-3.30)
vWF, %	130 ± 55 [118] (90-162)	123 ± 54 [112] (86-158)	133 ± 55 [120] (97-163)
tPA, ng/ml	3.35 ± 2.43 [3.0] (2.0-3.2)	2.88 ± 0.91 [3.0] (2.0-3.0)	3.40 ± 2.17 [3.0] (2.0-3.5)
PAI-1, ng/ml	65 ± 42 [58] (33-90)	56 ± 38 [42] (30-76)	69 ± 44 [63] (36-93)
sTBM, ng/ml	23.3 ± 12.4 [19.0] (15.0-28.0)	24.0 ± 13.4 [20.5] (16.8-28.0)	23.0 ± 11.9 [19.0] (14.0-29.0)
sICAM-1, ng/ml	358 ± 148 (255-451)	334 ± 129 (239-428)	369 ± 156 (270-459)
sVCAM-1, ng/ml	743 ± 360 (505-916)	762 ± 333 (518-958)	735 ± 372 (496-994)
Glucose, mmol/l	5.38 ± 1.04 (4.80-5.73)	5.12 ± 0.59 (4.70-5.50)	5.50 ± 1.17 (4.90-5.90)
Insulin, mIU/l	10.3 ± 6.6 [8.5] (6.3-12.3)	8.1 ± 4.8 [6.9] (4.8-10.4)	11.3 ± 7.1 [9.1] (7.1-14.1)
C-peptide, mg/l	2.7 ± 1.4 [2.5] (1.7-3.4)	2.3 ± 1.2 [2.2] (1.3-3.1)	2.9 ± 1.5 [2.7] (1.9-3.7)
PINS, mIU/l	14.8 ± 10.5 [11.4] (8.2-17.4)	12.8 ± 8.9 [9.9] (7.1-15.9)	15.7 ± 11.1 [12.0] (8.8-18.4)
FGF 21, ng/l	317.7 ± 440.4 [197.6] (103.3-357.6)	221.7 ± 388.3 [128.4] (63.7-225.5)	359.9 ± 456.3 [234.6]*** (134.6-419.3)

Data are expressed as means ± standard deviations, in parameters with skewed distribution also as medians [in brackets]. Values of 25 and 75 percentiles are expressed in parentheses. Differences in variables between groups were analyzed with ANOVA after adjustment for age, sex and BMI. Variables with skewed distribution (TG, Apo B, fibrinogen, vWF, tPA, PAI-1, sTBM, insulin, C-peptide, PINS, FGF 21) were log transformed to normalize their distribution before statistical analyses.

CG: Apo B < 1.2 g/l and /or TG < 1.5 mmol/l

DLP: Apo B ≥ 1.2 g/l and /or TG ≥ 1.5 mmol/l

Significant differences between CG and DLP groups: *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

Abbreviations: CG: Control Group; DLP: Dyslipidemic Phenotype; BMI: Body Mass Index; SBP: Systolic Blood Pressure; DBP: Diastolic Blood Pressure; TC: Total Cholesterol; TG: Triglycerides; HDLc: High-density Lipoprotein cholesterol; LDLc: Low-density Lipoprotein cholesterol; Apo A1: Apolipoprotein A1; Apo B: Apolipoprotein B; vWF: von Willebrand Factor; tPA: Tissue Plasminogen Activator; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; sTBM: Soluble Thrombomodulin; sICAM-1: Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1; sVCAM-1: Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1; PINS: Proinsulin; FGF 21: Fibroblast Growth Factor 21; ANOVA: Analysis of Variance

Tabulka 7. Korelace FGF 21 s endoteliálními a hemostatickými markery a parametry inzulínové rezistence ve skupině kontrol a dyslipidemických jedinců.

	FGF 21 (CG, n = 66)	FGF 21 (DLP, n = 148)
Fibrinogen	n.s.	n.s.
vWF	n.s.	0.182 p <0.05
tPA	n.s.	0.338 p <0.01
PAI-1	n.s.	0.214 p <0.05
sTBM	n.s.	n.s.
sICAM-1	n.s.	0.199 p <0.05
sVCAM-1	n.s.	0.163 p <0.05
Glucose	n.s.	0.279 p <0.01
Insulin	n.s.	n.s.
C-peptide	0.310 p <0.05	0.214 p <0.05
PINS	n.s.	0.232 p <0.01

CG: Apo B < 1.2 g/l and /or TG < 1.5 mmol/l

DLP: Apo B ≥ 1.2 g/l and /or TG ≥ 1.5 mmol/l

n.s., non-significant difference

r and p values are expressed in Table 2. Probability values of p<0.05 were considered as statistically significant.

Abbreviations: CG: Control Group; DLP: Dyslipidemic Phenotype; vWF: von Willebrand Factor; tPA: Tissue Plasminogen Activator; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; sTBM: Soluble Thrombomodulin; sICAM-1: Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1; sVCAM-1: Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1; PINS: Proinsulin; FGF 21: Fibroblast Growth Factor 21; DLP: Dyslipidemic Phenotype; Apo B: Apolipoprotein B; TG: Triglycerides

Tabulka 8. Asociace FGF 21 s korelovanými parametry u kontrolní a dyslipidemické skupiny.

	FGF 21 (CG, n = 66)	FGF 21 (DLP, n = 148)
fibrinogen	0.1172 p = 0.4477	-0.0196 p = 0.7718
vWF	-0.1201 p = 0.6757	0.4214 p = 0.0031
tPA	-0.0206 p = 0.8599	0.1103 p = 0.0099
PAI-1	0.3180 p = 0.0540	0.1801 p = 0.0912
sTBM	0.1922 p = 0.3241	-0.0550 p = 0.5828
sICAM-1	-0.0265 p = 0.7592	0.0533 p = 0.1357
sVCAM-1	-0.0932 p = 0.1827	0.0566 p = 0.0559
glucose	0.5691 p = 0.0684	0.2655 p = 0.0313
insulin	0.0418 p = 0.6697	-0.0076 p = 0.8904

CG: Apo B < 1.2 g/l and /or TG < 1.5 mmol/l

DLP: Apo B ≥ 1.2 g/l and /or TG ≥ 1.5mmol/l

Multiple regression analysis with FGF 21 as dependent variable and other parameters as independent predictors is presented. Results with endothelial/hemostatic markers and some of IR parameters only are shown.

Beta and p values are expressed in Table 3. Probability values of p<0.05 were considered as statistically significant (**bold values**).

Abbreviations: CG: Control group; DLP: Dyslipidemic Phenotype; vWF: von Willebrand Factor; tPA: Tissue Plasminogen Activator; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; sTBM: Soluble Thrombomodulin; sICAM-1: Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1; sVCAM-1: Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1; PINS: Proinsulin; FGF 21: Fibroblast Growth Factor 21; IR: Insulin Resistance

Tabulky 6, 7 a 8 převzaty z:

NOVOTNY, D. – KARASEK, D. – VAVERKOVA, H. – ORSAG, J. – KUBICKOVA, V. Fibroblast growth factor 21 and endothelial/hemostatic markers in dyslipidemic subjects. *Austin Journal of Cardiovascular Disease and Atherosclerosis* [online], 2014, 1(2), id.1008.

3.3. Diskuse a závěr.

Provedený výzkum verifikoval signifikantní rozdíly v hladinách FGF 21 mezi zkoumanými skupinami s rozdílnými hodnotami TG a ApoB. Tento nálezn je ve shodě jednak s naší předchozí studií (viz odd. 1.3.), jednak podporuje dosavadní literární zjištění. Vyšší hladiny FGF 21 byly prokázány u pacientů s kardiometabolickými onemocněními zahrnující obezitu, MetS, dyslipidemií a stavy se zvýšenou inzulínovou rezistencí (212) (168) (170). Nicméně přesný důvod elevace FGF 21 ve zmíněných případech není dosud objasněn. Předpokládá se možnost rezistence na působení FGF 21, podobně jako u hyperinzulinemie při stavech s inzulínovou rezistencí či hyperleptinémie u stavů se sníženou citlivostí na leptin. V souladu se zmíněnou hypotézou jsou výsledky pokusů na myších, kdy léčba rekombinantním lidským FGF 21 vedla jen k malému poklesu hladiny volných mastných kyselin a žádnému poklesu glykémie u obézních myší. Byly zaznamenány jen oslabení signální dráhy ERK kinázy a potlačená indukce FGF 21 cílových genů v játrech a tukové tkáni (181) (213). Naproti tomu existují i protichůdné výsledky. Hale et al. testoval myši s obezitou (jednak dietou navozenou, jednak genetickou ob/ob), kde nepotvrdil domněnku o FGF 21 rezistentním stavu (182). Zdá se tak, že cirkulující FGF 21 je spíše produkován játry a jeho hladiny jsou vyšší v důsledku indukce tvorby FGF 21 elevací koncentrací jaterních lipidů a sacharidů (214). Domníváme se, že zvýšené koncentrace TG, ApoB by mohly být příčinou elevace FGF 21 u dyslipidemických jedinců v naší studii.

Korelační analýza u dyslipidemických pacientů potvrdila známý vztah FGF 21 s parametry inzulínové rezistence. Novým nálezem byla korelace s hemostatickými markery a ukazateli endoteliální dysfunkce (kromě sTBM). Toto zjištění podporuje předpoklad úzké vazby FGF 21 k uvedeným parametrům výlučně u pacientů s nepříznivým lipidovým profilem. Nicméně většina z těchto korelací ztratila svou signifikanci po provedení vícenásobné regresní analýzy. Nejdůležitějším závěrem této studie tak zůstává nezávislá asociace FGF 21 s vWF a tPA u dyslipidemických pacientů. Plazmatické hladiny vWF se již dříve ukázaly být užitečným markerem endoteliální dysfunkce (215). Koncentrace vWF byla také identifikována jako nezávislý prediktor intimomediální tloušťky arteria carotis u asymptomatických dyslipidemických pacientů (216). Podobně i tPA se jeví průkazným parametrem

endoteliální dysfunkce, když byl mj. prokázán jeho prediktivní potenciál pro kardiální příhody (217).

Výsledky této práce představují jednak potvrzení signifikantní elevace hladin FGF 21 i u asymptomatických dyslipidemických pacientů se zvýšenými TG a ApoB, jednak průkaz vWF a tPA jako nezávislých prediktorů pro hladiny FGF 21 u stejné kohorty pacientů. Tato korelace může být znamením protrombogenního stavu u nositelů rizikového lipidového profilu a také možnosti endotelového poškození.

4. A-FABP a intimomediální tloušťka společné karotidy u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.

Adipocytární protein vázající mastné kyseliny (A-FABP) je řazen mezi „nepříznivé“ adipokiny a pravděpodobně představuje marker a/nebo prediktor metabolického syndromu, byl prokázán i jeho vztah k diabetu mellitu a kardiální dysfunkci. V následujícím výzkumu jsme se proto zaměřili na zhodnocení vztahu A-FABP k intimomediální tloušťce společné karotidy jako markeru subklinické aterosklerózy u asymptomatických pacientů s dyslipidemií s přítomností, resp. nepřítomností MetS.

4.1. Pacienti a metody.

Soubor studovaných jedinců tvořili zdraví dobrovolníci a asymptomatictí dyslipidemičtí pacienti vyšetření v lipidové poradně III. interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, u kterých byly vyloučeny možné příčiny sekundární hyperlipidemie: diabetes mellitus, hypotyreóza, ledvinná onemocnění, hepatopatie a nefrotický syndrom. Další vylučovací kritéria zahrnovala následující stavy: klinicky manifestní ateroskleróza prezentovaná koronární chorobou, cerebrovaskulárními nemocemi (ischemická cévní mozková příhoda apod.) a postižením periferních arterií, dále hypolipidemická léčba v předchozích 6 týdnech, hormonální terapie a přítomnost akutní infekce či traumatu v době vyšetření. U všech zkoumaných osob byla odebrána anamnéza se zaměřením na kardiovaskulární problematiku, užívané léky a kouření. Byla realizována základní antropometrická vyšetření s výpočtem BMI a změřen systolický a diastolický krevní tlak (SBP, DBP). Studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Jedinci splňující zařazovací kritéria (n = 72) byli rozděleni do tří skupin: dyslipidemičtí jedinci s metabolickým syndromem (MetS+, n=17, 8 mužů a 9 žen), dyslipidemičtí jedinci bez metabolického syndromu (MetS-, n=34, 16 mužů a 18 žen) a kontrolní skupina zdravých dobrovolníků (n=21, 7 mužů a 14 žen). K průkazu metabolického syndromu byla použita kritéria dle NCEP-ATPIII panel 2001: obvod pasu (muži >102 cm, ženy >88 cm), hladina triglyceridů (TG) \geq 1,7

mmol/l, hladina HDL cholesterolu (HDLc) (muži <1,04 mmol/l, ženy <1,30 mmol/l), krevní tlak $\geq 130/\geq 85$ mm Hg a lačná glykemie $\geq 6,1$ mmol/l. Přítomnost nejméně tří z výše uvedených faktorů diagnostikovala metabolický syndrom.

Laboratorní analýza

Vzorky krve použité k vyšetřením byly odebírány při vstupní kontrole v lipidové poradně, a to ráno po minimálně 12hodinovém lačnění. Biochemické parametry, včetně A-FABP byly vyšetřeny stejným způsobem a metodami jako u předchozí studie (viz odd. 1.1. sekce *Laboratorní vyšetření*).

Měření intimomediální tloušťky a. carotis communis

U všech studovaných jedinců bylo realizováno měření intimomediální tloušťky obou společných karotických tepen (arteria carotis communis, CCA) ultrazvukovým vyšetřením v B-módu s vysokým rozlišením (Philips Sonos 5500, 2004) s použitím lineární sondy s frekvencí 10 MHz anterolaterálním přístupem. Zobrazovaná oblast zahrnovala část těsně před rozšířením bulbu. Po získání optimálního obrazu vzdálené stěny CCA v oblasti 1 cm proximálně od bulbu byl tento zachycen v okamžiku kmitu R na paralelně prováděném EKG. Na obou CCA byly pořízeny 3 měření s videozáznamem. Vlastní měření intimomediální tloušťky společné karotidy (C-IMT) byla zpracována off-line pomocí softwaru Image-Pro plus (verze 4.0, Media-Cybernetics, Silver Spring, USA). Oblast, která byla předmětem hodnocení, byla stěna CCA vzdálená 1-2 cm v blízkosti uvedené hranice. Jako výsledek byl považován průměr z průměrů tří změřených C-IMT na každé straně. Plak byl definován jako fokální výčnělek do lumen o tloušťce alespoň o 50 % větší než sousední komplex intima-media. Subjekty s takovým nálezem v hodnocené oblasti nebyly zahrnuty do studie. Měření C-IMT bylo realizováno bez znalosti laboratorních výsledků.

Statistické zpracování dat

Statistická analýza byla provedena statistickým softwarem R ver. 3.4.2. (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Číselné hodnoty výsledků byly vyjádřeny jako průměr \pm standardní odchylka (SD). Distribuce pozorovaných proměnných byly porovnány pomocí ANOVA analýzy a Studentovým t-testem resp. Kruskal-Wallisových a

Wilcoxonovým testem. V případech více než dvou skupin byly provedena vícečetná srovnání pomocí Tukey resp. Nemenyihovo testu. Kategoriaální data byla prezentována pomocí kontingenčních tabulek a analyzována Pearsonovým chí-kvadrát testem, resp. Fisherovým testem. Pro údaje všech jednotlivců a také pro skupinu zdravých kontrol a skupinu MetS- byly vytvořeny vícenásobné lineární modely hodnot C-IMT. Výběr funkcí byl založen na výsledcích regrese LASSO (“Least Absolute Shrinkage and Selection Operator”) pro parameter lambda získaný jako minimální hodnota v 5násobné křížové validaci pro každou analyzovanou sadu dat (R package glmnet) (218). U skupiny MetS+ nebylo lineární modelování realizováno vzhledem k prázdné množině nenulových koeficientů ve výsledcích Lasso regrese. V příhodných případech (existence nesignifikantních regresorů) byl proveden také krokový selekční process.

4.2. Výsledky.

Základní demografické, klinické a laboratorní charakteristiky studovaných skupin jsou shrnuty v Tabulce 9 a na Obrázku 7. Dyslipidemičtí pacienti s MetS měli nejvyšší BMI a obvod pasu a předpokládaný nepříznivý lipidový a lipoproteinový profil (elevovaný TC, TG, nonHDLc, ApoB, poměr ApoB/ApoA1 a snížený HDLc a ApoA1) a také známky inzulínové rezistence (zvýšení inzulinémie a C-peptidu), a to i po adjustaci na věk a pohlaví.

Koncentrace A-FABP ve skupině MetS+ byly rovněž signifikantně vyšší v porovnání s MetS- i zdravými kontrolami, přičemž nebyl rozdíl v hladinách A-FABP mezi MetS- a kontrolami. Podobné výsledky ukázalo i měření C-IMT (signifikantně širší C-IMT ve skupině MetS+ oproti oběma ostatním skupinám s absencí vzájemné diference mezi MetS- a kontrolami). Ačkoliv byla pozorována korelace A-FABP s C-IMT ve spojené skupině dyslipidemických pacientů (MetS+ a MetS-) ($r= 0,03$, $p < 0,05$), došlo ke ztrátě signifikance tohoto vztahu při vícenásobné lineární regresní analýze. Koncentrace A-FABP nebyly prokázány jako nezávislý prediktor C-IMT u dyslipidemických pacientů i u zdravých kontrol. Naopak nezávislémi prediktory C-IMT byly verifikovány věk, pohlaví, obvod pasu, nonHDLc a poměr ApoB/ApoA1, viz Tabulka 10 až 12.

Tabulka 9. Klinické a biochemické charakteristiky studovaných subjektů.

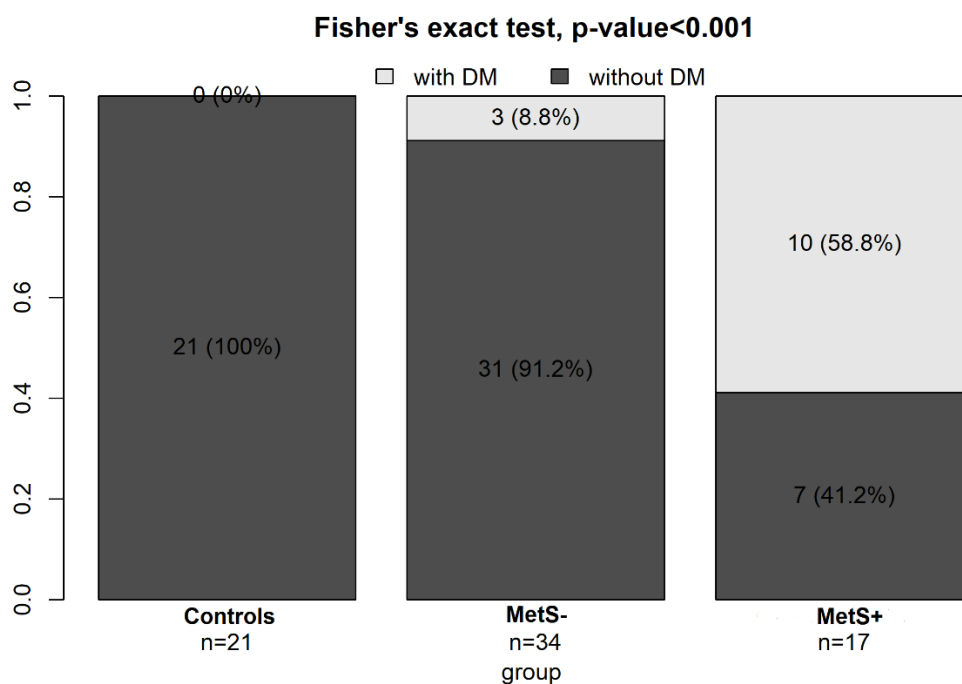
Parameters	Controls n=21	MetS- n=34	MetS+ n=17
Age (years)	47.0 ± 17.3	40.8 ± 15.5	47.9 ± 14.5
A-FABP (µg/l)	21.6 ± 11.0 ^c	21.5 ± 9.5 ^c	38.4 ± 30.1 ^{a,b}
C-IMT (mm)	0.60 ± 0.12 ^c	0.60 ± 0.14 ^c	0.80 ± 0.13 ^{a,b}
SBP (mm Hg)	129.4 ± 14.3	122.0 ± 14.3 ^c	139.3 ± 16.1 ^b
DBP (mm Hg)	77.8 ± 7.8	75.6 ± 9.5	81.6 ± 8.7
BMI (kg/m ²)	24.2 ± 3.0 ^c	24.8 ± 3.6 ^c	29.7 ± 4.0 ^{a,b}
Waist circumference (cm)	78.5 ± 8.7 ^c	86.0 ± 11.4 ^c	100.5 ± 9.9 ^{a,b}
hs-CRP (mg/l)	1.8 ± 2.4 ^c	2.9 ± 3.5	3.4 ± 3.8 ^a
Total cholesterol (mmol/l)	5.9 ± 0.8 ^{b,c}	7.4 ± 1.4 ^a	7.2 ± 1.9 ^a
Triglycerides (mmol/l)	1.0 ± 0.25 ^{b,c}	2.3 ± 1.75 ^{a,c}	4.2 ± 2.18 ^{a,b}
LDL- cholesterol (mmol/l)	3.6 ± 0.76 ^b	4.9 ± 1.32 ^a	4.3 ± 1.6
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.9 ± 0.42 ^{b,c}	1.5 ± 0.44 ^{a,c}	1.1 ± 0.26 ^{a,b}
nonHDL-cholesterol (mmol/l)	4.0 ± 0.75 ^{b,c}	5.9 ± 1.41 ^a	6.2 ± 1.83 ^a
ApoA1 (g/l)	1.9 ± 0.32 ^c	1.7 ± 0.43	1.4 ± 0.26 ^a
ApoB (g/l)	0.9 ± 0.18 ^{b,c}	1.4 ± 0.29 ^a	1.4 ± 0.38 ^a
ApoB/ApoA1	0.5 ± 0.17 ^{b,c}	0.9 ± 0.30 ^a	1.0 ± 0.26 ^a
Fasting glycaemia (mmol/l)	4.9 ± 0.37	5.0 ± 0.55	5.5 ± 0.91
Insulin (mIU/l)	7.4 ± 4.86 ^c	8.4 ± 3.74 ^c	12.5 ± 4.64 ^{a,b}
C-peptide (mg/l)	510.9 ± 376.21 ^c	741.9 ± 235.76 ^c	1026.4 ± 345.66 ^{a,b}

MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; A-FABP, adipocyte fatty acid-binding protein; IMT, carotid intima-media thickness; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; hs-CRP, high sensitivity C reactive protein; ApoA1, Apo lipoprotein A1; ApoB, Apo lipoprotein B

Data are presented as mean ± standard deviation.

Differences in variables between subgroups were analyzed with ANOVA after adjustment for age and sex. Significant difference $p < 0.05$ at least - ^a vs. Controls; ^b vs. MetS-; ^c vs. MetS+

Obrázek 7. Výskyt diabetu mellitu ve studovaných skupinách.



MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; DM, diabetes mellitus.

Obrázek 7 a Tabulky 9,10,11 a 12 převzaty z:

ORSAG, J. – KARASEK, D. – HALENKA, M. – VAVERKOVA, H. – SPURNA, J. – KUBICKOVA, V. – LUKES, J. – ZADRAZIL, J. Association of serum adipocyte fatty acid-binding protein and apolipoprotein B /apolipoprotein A1 ratio with intima media thickness of common carotid artery in dyslipidemic patients.

Tabulka 10. Lineární modelování C-IMT pro všechny studované subjekty (MetS+, MetS-, kontroly) po postupném selekčním procesu pro vstupní model s regresory: skupina, pohlaví, art. Hypertenze, věk, obvod pasu. nonHDLc a ApoB/ApoA1 (Multiple R²=0.71, Adjusted R²=0.69).

Coefficient	Estimate	Std. Error	P value	Significance
(Intercept)	0.1148	0.0809	0.161	NS
male gender	0.0513	0.0254	0.048	< 0.05
hypertesion	0.0514	0.0275	0.0666	NS
age	0.0050	0.0007	0.000	< 0.001
waist circumference	0.0019	0.0011	0.0851	NS
nonHDL-cholesterol	0.0258	0.0710	0.000	< 0.001
Residuals:				
Min	1st quartile	Median	3rd quartile	Max
-0.2480	-0.0477	0.0014	0.0268	0.2459

Tabulka 11. Lineární modelování C-IMT pro skupinu kontrol po vyloučení pozorování z iničiálního modelu se stejnými vstupními regresory. (Multiple R²=0.89, Adjusted R²=0.87).

Coefficient	Estimate	Std. Error	P value	Significance
(Intercept)	0.1434	0,0809	0.1610	NS
waist circumference	0.0031	0,0011	0.0122	< 0.05
Residuals:				
Min	1st quartile	Median	3rd quartile	Max
-0.0256	-0.0255	0.0062	0.0162	0.0505

Tabulka 12. Lineární modelování C-IMT pro skupinu MetS- (Multiple R²=0.72, Adjusted R²=0.7).

Coefficient	Estimate	Std. Error	P value	Significance
(Intercept)	0.2452	0.0511	0.0000	< 0.001
age	0.0069	0.0009	0.0000	< 0.001
ApoB/apoA1	0.1384	0.0456	0.0048	< 0.01
Residuals:				
Min	1st quartile	Median	3rd quartile	Max
-0.1986	-0.0359	0.0085	0.0384	0.1299

4.3. Diskuse a závěr.

I v této části výzkumu byl potvrzen rizikový metabolický profil dyslipidemických pacientů s MetS. Rovněž koncentrace A-FABP v této skupině byly signifikantně vyšší ve srovnání s oběma ostatními zkoumanými skupinami (MetS-, kontroly), což ve shodě s výsledky dříve realizovaného výzkumu (viz oddíl 2). Nález rovněž doplňuje mozaiku spojení A-FABP s rizikovými faktory aterosklerózy. Asociace hladin cirkulujícího A-FABP byla prokázána s obezitou, inzulínovou rezistencí, diabetem mellitem 2. typu, arteriální hypertenzí a kardiální dysfunkcí (111) (114) (115). Vyšší vstupní koncentrace A-FABP byly také identifikovány jako nezávislý prediktor rozvoje metabolického syndromu v průběhu pětiletého sledování u kohorty čínských pacientů (112). Tso et al. ve své desetileté prospektivní studii na čínských pacientech prokázal nezávislou asociaci vyšších hladin A-FABP s rozvojem diabetu mellitu 2. typu (113).

Vztah A-FABP a C-IMT byl v době výzkumu již znám z některých předchozích studií. Hao et al. našel pozitivní korelaci mezi sérovými koncentracemi A-FABP a subklinickou aterosklerózou v kohortě čínských premenopauzálních i postmenopauzálních žen s normální glukózovou tolerancí (219). V práci Yeunga et al. byly hladiny A-FABP silně asociovány s C-IMT u žen s normální glukózovou tolerancí i hyperglykemií (116). Zmíněné nálezy podporují domněnku, že A-FABP není pouze slibný biomarker rozvoje aterosklerózy, ale že hraje důležitou roli přímo v patofyziologii jejího rozvoje. Z tohoto pohledu je překvapivé, že v naší studii jsme neprokázali A-FABP jako důležitý prediktor C-IMT na rozdíl od klasických faktorů zahrnujících věk, pohlaví, obvod pasu, dokonce ani při spojení všech skupin studovaných jedinců. Vysvětlení se nabízí několik. Prvním je malá velikost souboru (např. Yeung et al. 479 pacientů), která neumožnila dosáhnout statistické signifikance. Druhým faktorem je absence odděleného testování mužů a žen, vzhledem k průkazu vztahu A-FABP a C-IMT zejména u žen. Možný je i vliv rozdílné rasy testovaných subjektů (kavkazská x asijská). Patofyziologickým vysvětlením je úvaha o převaze proaterogenního efektu silnějších klasických rizikových faktorů u našich pacientů.

Zajímavým zjištěním – novým, i když vedlejším – je průkaz poměru ApoB/ApoA1 jako důležitého nezávislého prediktoru C-IMT u skupiny dyslipidemických pacientů bez metabolického syndromu (MetsS-). Z literatury je dosud známa asociace poměru ApoB/ApoA1 s metabolickým syndromem s předpokladem jeho

použití právě jako citlivého prediktoru rozvoje tohoto metabolického stavu (220) (221). Panayiotou et al. demonstroval na zdravých dobrovolnících asociaci poměru ApoB/ApoA1 s časnou aterosklerózou. Při lineární regresní analýze byl poměr ApoB/ApoA1 signifikantně asociován s ultrazvukovými měřeními časné aterosklerózy (mj. i C-IMT) (222). Poznatek z naší studie podporuje použití poměru ApoB/ApoA1 jako užitečného parametru pro určení rizika aterosklerózy i u asymptomatických pacientů bez MetS.

Ve výše popsané studii jsme prokázali zvýšené sérové hladiny A-FABP a zvýšenou C-IMT u dyslipidemických pacientů s MetS oproti dyslipidemickým jedincům bez MetS i oproti zdravým kontrolám. Překvapivě ale nebyla dokázána nezávislá asociace A-FABP s C-IMT. Zajímavým vedlejším nálezem je průkaz nezávislé asociace poměru ApoB/ApoA1 s C-IMT u dyslipidemických pacientů bez metabolického syndromu, což doplňuje dosud známé údaje podporující užití tohoto poměru jako užitečného parametru pro určení rizika aterosklerózy a kardiovaskulárního rizika.

5. FGF 21 a intimomediální tloušťka společné karotidy u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.

FGF 21 jako člen rodiny fibroblastových růstových faktorů se účastní vícečetných metabolických pochodů, zvláště těch, které souvisejí s nutričním stavem. Provedené výzkumy prokázaly příznivé působení na metabolismus lipidů a glukózy na zvířecích modelech, na druhé straně ale byly vyšší hladiny FGF 21 nalezeny u lidí s metabolickými onemocněními, jako diabetes mellitus 2. typu, obezita, nealkoholická steatóza jater a koronární chorobou (130). Tento fakt je vysvětlován stavem se zvýšenou rezistencí na působení FGF 21, eventuálně jako kompenzační odpověď organismu na zvýšené kardiovaskulární riziko. V následující studii jsme se proto zaměřili na zhodnocení vztahu FGF 21 k intimomediální tloušťce společné karotidy jako markeru subklinické aterosklerózy u asymptomatických pacientů s dyslipidemií.

5.1. Pacienti a metody.

Soubor studovaných jedinců tvořilo celkem 103 asymptomatických dyslipidemických pacientů vyšetřených v lipidové poradně III. interní kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, u kterých byly vyloučeny možné příčiny sekundární hyperlipidemie: diabetes mellitus, hypotyreóza, ledvinná onemocnění, hepatopatie a nefrotický syndrom. Další vylučovací kritéria zahrnovala následující stavy: klinicky manifestní ateroskleróza prezentovaná koronární chorobou, cerebrovaskulárními nemocemi (ischemická cévní mozková příhoda apod.) a postižením periferních arterií, dále hypolipidemická léčba v předchozích 6 týdnech, hormonální terapie a přítomnost akutní infekce či traumatu v době vyšetření. Kontrolní skupinu tvořilo 50 zdravých dobrovolníků. U všech zkoumaných osob byla odebrána anamnéza se zaměřením na kardiovaskulární problematiku, užívané léky a kouření. Byla realizována základní antropometrická vyšetření s výpočtem body mass indexu (BMI) a změřen systolický a diastolický krevní tlak (SBP, DBP). Studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Pacienti splňující zařazovací kritéria (n = 103) byli rozděleni do dvou skupin na podkladě přítomnosti metabolického syndromu (MetS): jedinci s metabolickým syndromem (MetS+, n=50, 28 mužů a 22 žen) a jedinci bez metabolického syndromu (MetS-, n=53, 25 mužů a 28 žen). Kontrolní skupina zahrnovala 50 zdravých jedinců. K průkazu metabolického syndromu byla použita kritéria dle NCEP-ATPIII panel 2001: obvod pasu (muži >102 cm, ženy >88 cm), hladina triglyceridů (TG) $\geq 1,7$ mmol/l, hladina HDL cholesterolu (HDLc) (muži <1,04 mmol/l, ženy <1,30 mmol/l), krevní tlak $\geq 130/\geq 85$ mm Hg a lačná glykemie $\geq 6,1$ mmol/l. Přítomnost nejméně tří z výše uvedených faktorů diagnostikovala metabolický syndrom. Hyperlipidemie byla pro účely výzkumu definována jako přítomnost koncentrace sérových TG $\geq 1,5$ mmol/l a/nebo koncentrace ApoB $\geq 1,2$ g/l. Hodnota TG byla zvolena vzhledem k vyššímu zastoupení malých denzních LDL částic od zmíněné hladiny (195), hladina ApoB pak v důsledku prokázaného rapidně se zvyšujícího kardiovaskulárního rizika od udané koncentrace (196).

Laboratorní analýza

Vzorky krve použité k vyšetřením byly odebírány při vstupní kontrole v lipidové poradně, a to ráno po minimálně 12hodinovém lačnění. Biochemické parametry, včetně FGF 21 byly vyšetřeny stejným způsobem a metodami jako u předchozí studie (viz odd. 1.1. sekce *Laboratorní vyšetření*).

Měření intimomediální tloušťky a. carotis communis

U všech studovaných jedinců bylo realizováno měření intimomediální tloušťky obou společných karotických tepen stejným způsobem jako v předchozí studii (viz odd. 4.1., sekce *Měření intimomediální tloušťky a. carotis communis*).

Statistické zpracování dat

Číselné hodnoty výsledků byly vyjádřeny jako průměr \pm standardní odchylka (SD), parametry s nerovnoměrnou distribucí také jako mediány s interkvartilovým rozpětím. Pro ověření normální distribuce byl užit Kolmogorovův-Smirnovův test. Proměnné s nerovnoměrnou distribucí (FGF 21, hs-CRP, TG, inzulin, C-peptid) byly logaritmicky transformovány k normalizaci jejich distribuce před vlastní statistickou analýzou. Rozdíly mezi změřenými veličinami byly analyzovány pomocí ANOVA po adjustaci na věk a pohlaví. Ke statistickému zhodnocení

korelace mezi jednotlivými parametry byly použity Pearsonova korelační analýza pro veličiny s normálním rozložením a univariální Spearmanova korelační analýza pro veličiny s nerovnoměrnou distribucí. Pro otestování nezávislé asociace mezi závisle proměnnými a nezávisle proměnnými byla zvolena vícenásobná regresní analýza. Ke statistickému zpracování dat byl použit statistický software SPSS Statistics, verze 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), všechny testy byly realizovány na úrovni signifikance 0,05.

5.2. Výsledky.

Základní klinické a laboratorní charakteristiky studovaných jedinců jsou shrnuty v Tabulce 13. Stejně jako v předchozích studiích měli dyslipidemičtí pacienti s MetS nepříznivý lipidový a lipoproteinový profil (elevace TC, TG, nonHDLc, ApoB a snížení HDLc a ApoA1) a známky inzulínové rezistence (zvýšené hladiny glukózy, inzulínu a C-peptidu). Také koncentrace FGF 21 byly u této skupiny signifikantně vyšší, a to jak proti MetS-, tak kontrolní skupině, zatímco mezi MetS- a kontrolami nebyl tento rozdíl zaznamenán. Podobné výsledky byly nalezeny také u C-IMT: signifikantně širší C-IMT u MetS+ oproti MetS- a kontrolám. Mezi MetS- a kontrolami tento rozdíl nebyl prokázán.

Hladiny FGF 21 korelovaly u MetS+ pozitivně s kouřením a TG, u MetS- s C-IMT (Obrázek 7), věkem, C-peptidem a kouřením. Při spojení obou dyslipidemických skupin (MetS+ a MetS-) byla vyjádřena korelace s více parametry – pozitivní s IMT, věkem, obvodem pasu, BMI, TG, nonHDLc, C-peptidem a kouřením, negativní s HDLc. Souhrnně jsou vztahy vyjádřeny v Tabulce 14.

K posouzení existence nezávislé asociace korelovaných parametrů s C-IMT byla provedena vícenásobná regresní analýza s C-IMT jako závisle proměnnou a korelovanými parametry jako nezávislými prediktory (Tabulka 15).

Ve skupině MetS- si zachovala IMT nezávislou asociaci s FGF 21 a nonHDLc (beta = 0,3449, p = 0,01 resp. beta = 0,1775, p <0,05), na rozdíl od ostatních skupin, kde nebyla nezávislá asociace prokázána.

Tabulka 13. Klinické a biochemické charakteristiky studovaných jedinců.

Parameters	Controls n=50	MetS- n=53	MetS+ n=50
Age (years)	45.2 ± 17.0	41.8 ± 14.6	48.4 ± 11.4
FGF 21 (ng/l)	141.0 (68.5-210.1) ^c	169.2 (106.1-255.7) ^c	290.6 (200.3-537.6) ^{a,b}
IMT (mm)	0.65 ± 0.12 ^c	0.65 ± 0.14 ^c	0.76 ± 0.13 ^{a,b}
SBP (mm Hg)	129.7 ± 14.6	123.6 ± 14.8 ^c	135.2 ± 13.7 ^b
DBP (mm Hg)	79.2 ± 9.3 ^b	76.0 ± 17.0 ^{a,c}	81.6 ± 7.4 ^b
BMI (kg/m ²)	25.5 ± 4.7 ^c	25.0 ± 3.9 ^c	30.0 ± 3.8 ^{a,b}
Waist circumference (cm)	84.8 ± 14.8 ^c	87.2 ± 11.4 ^c	100.5 ± 13.1 ^{a,b}
hs-CRP (mg/l)	1.00 (0.50-2.20) ^c	1.75 (0.73-2.98) ^c	2.70 (1.10-4.30) ^{a,b}
Total cholesterol (mmol/l)	5.62 ± 0.88 ^{b,c}	7.19 ± 1.31 ^a	7.42 ± 1.70 ^a
Triglycerides (mmol/l)	1.05 (0.83-1.21) ^c	1.78 (1.54-2.72) ^c	3.81 (2.34-7.12) ^{a,b}
LDL- cholesterol (mmol/l)	3.47 ± 0.78 ^b	4.76 ± 1.24 ^a	3.79 ± 1.65 ^b
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.68 ± 0.50 ^{b,c}	1.42 ± 0.38 ^{a,c}	1.08 ± 0.29 ^{a,b}
nonHDL-cholesterol (mmol/l)	3.94 ± 0.81 ^{b,c}	5.77 ± 1.29 ^a	6.27 ± 2.11 ^a
ApoA1 (g/l)	1.70±0.40 ^c	1.64±0.37 ^c	1.40±0.24 ^{a,b}
ApoB (g/l)	0.91 ± 0.18 ^{b,c}	1.33 ± 0.27 ^a	1.29 ± 0.36 ^a
Fasting glycaemia (mmol/l)	5.09 ± 0.58 ^c	5.06 ± 0.52 ^c	5.94 ± 1.35 ^{a,b}
Insulin (mIU/l)	6.85 (4.68-11.30) ^c	8.00 (6.30-10.05) ^c	11.85 (8.46-15.85) ^{a,b}
C-peptide (mg/l)	653.5 (411.7-1019.0) ^c	714.0 (532.5-923.5) ^c	1079.0 (771.3-1486.5) ^{a,b}

MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; FGF 21, fibroblast growth factor 21; IMT, carotid intima-media thickness; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; hs-CRP, high sensitivity C reactive protein; ApoA1, Apo lipoprotein A1; ApoB, Apo lipoprotein B

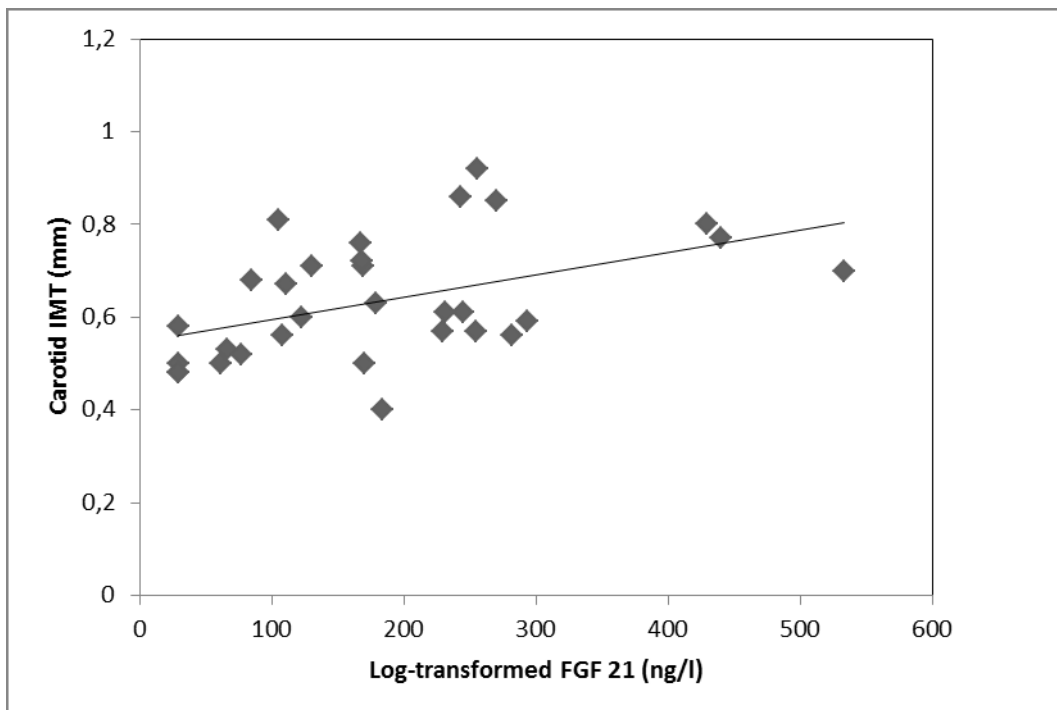
Data are presented as mean± standard deviation for parameters with normal distribution or median (interquartile range) for parameters with skew distribution.

Parameters with skewed distribution (FGF 21, CRP, TG, insulin, C-peptide) were log transformed to normalize their distribution before statistical analysis.

Differences in variables between subgroups were analyzed with ANOVA after adjustment for age and sex.

Significant difference $p < 0.05$ at least - ^a vs. Controls; ^b vs. MetS-; ^c vs. MetS+

Obrázek 8. Korelace mezi hladinami FGF 21 a C-IMT u dyslipidemických pacientů bez metabolického syndromu (MetS-). $r = 0,486$, $p < 0,01$.



Tabulka 14. Korelace FGF 21 s různými biochemickými a klinickými parametry.

	FGF21 Controls	FGF21 MetS-	FGF21 MetS+	FGF21 MetS+ and MetS-
IMT	-0.043 <i>0.856</i>	0.486 0.006	0.264 <i>0.324</i>	0.573 0.000
Age	-0.037 <i>0.809</i>	0.468 0.001	0.081 <i>0.584</i>	0.310 0.002
Sex	-0.283 <i>0.056</i>	-0.115 <i>0.443</i>	0.018 <i>0.902</i>	0.008 <i>0.938</i>
Waist circumference	-0.044 <i>0.803</i>	0.223 <i>0.192</i>	0.194 <i>0.251</i>	0.459 0.000
BMI	0.115 <i>0.459</i>	0.216 <i>0.145</i>	0.127 <i>0.391</i>	0.374 0.000
SBP	-0.038 <i>0.801</i>	-0.051 <i>0.745</i>	0.059 <i>0.697</i>	0.163 <i>0.127</i>
DBP	-0.033 <i>0.829</i>	-0.050 <i>0.751</i>	0.225 <i>0.133</i>	0.200 <i>0.060</i>
Total cholesterol	-0.130 <i>0.390</i>	0.086 <i>0.561</i>	0.241 <i>0.099</i>	0.169 <i>0.099</i>
Triglycerides	0.143 <i>0.343</i>	0.164 <i>0.265</i>	0.349 0.015	0.444 0.000
LDL-cholesterol	-0.194 <i>0.195</i>	0.133 <i>0.366</i>	-0.070 <i>0.642</i>	-0.071 <i>0.499</i>
HDL-cholesterol	0.028 <i>0.851</i>	-0.159 <i>0.279</i>	-0.064 <i>0.667</i>	-0.278 0.006
nonHDL-cholesterol	-0.188 <i>0.210</i>	0.134 <i>0.365</i>	0.246 <i>0.093</i>	0.202 0.048
ApoA1	0.119 <i>0.435</i>	-0.064 <i>0.664</i>	-0.041 <i>0.781</i>	-0.183 <i>0.074</i>
ApoB	-0.098 <i>0.517</i>	0.162 <i>0.273</i>	0.142 <i>0.335</i>	0.093 <i>0.367</i>
hs-CRP	0.000 <i>1.000</i>	0.009 <i>0.953</i>	0.127 <i>0.400</i>	0.136 <i>0.196</i>
Fasting glycaemia	0.042 <i>0.782</i>	0.155 <i>0.294</i>	-0.048 <i>0.745</i>	0.125 <i>0.226</i>
C-peptide	0.408 0.005	0.333 0.021	-0.045 <i>0.765</i>	0.273 0.007
Smoking	0.385 0.008	0.375 0.009	0.496 0.000	0.452 0.000

MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; FGF 21, fibroblast growth factor 21; IMT, carotid intima media thickness; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; hs-CRP, high sensitivity C reactive protein; ApoA1, Apo lipoprotein A1; ApoB, Apo lipoprotein B

Spearman correlation analysis for parameters with skewed distribution (FGF 21, CRP, TG, insulin, C-peptide). **Bold** values indicate significance at $p < 0.05$.

Tabulka 15. Vícenásobná lineární regresní analýza ukazující parametry se signifikantní nezávislou asociací s C-IMT u různých studovaných skupin.

			FGF 21*	TG*	Waist	nonHDL-C	SBP
MetS-	Full RM	beta	0.3449	-0.0091	0.2432	0.1775	-
		<i>p-value</i>	0.0110	<i>0.8564</i>	<i>0.2376</i>	0.0453	-
	Stepwise RM	beta	0.3401	-	0.2351	0.1738	0.2489
		<i>p-value</i>	0.0110	-	<i>0.2456</i>	0.0468	<i>0.1449</i>
MetS+	Full RM	beta	-0.0124	-0.1057	0.5756	0.1896	0.2458
		<i>p-value</i>	<i>0.9158</i>	0.0255	<0.001	0.0059	0.0363
	Stepwise RM	beta	-	-0.1057	0.5706	0.1878	0.2439
		<i>p-value</i>	-	0.0240	<0.001	0.0044	0.0336
MetS- and MetS+	Full RM	beta	0.1787	-0.0759	0.4354	0.1582	0.2030
		<i>p-value</i>	<i>0.0604</i>	0.0044	<0.001	0.0021	0.0395
	Stepwise RM	beta	0.1787	-0.0759	0.4354	0.1582	0.2030
		<i>p-value</i>	<i>0.0604</i>	0.0043	<0.001	0.0044	0.0400

MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; FGF 21, fibroblast growth factor 21; IMT, carotid intima media thickness; SBP, systolic blood pressure; TG, triglycerides; nonHDL-C, nonHDL-cholesterol; Waist, waist circumference; RM, regression model.

*Log transformed before analyses. Bold values indicate significance at $p < 0.05$

Obrázek 8 a Tabulky 13, 14 a 15 převzaty z:

ORSAG, J. – KARASEK, D. – KRŠKOVÁ, M. – HALENKA, M. – VAVERKOVÁ, H. – GAJDOVÁ, J. – NOVOTNÝ, D. – LUKES, J. The relationship of serum fibroblast growth factor 21 levels to intima-media thickness in dyslipidemic patients. *Journal of Disease Markers* [online], 2014,1(3), id. 1012 . Dostupné z < <http://austinpublishinggroup.com/disease-markers/all-issues.php> > . ISSN: 2380-0682.

5.3. Diskuse a závěr.

I v této práci byly potvrzeny zvýšené hladiny FGF 21 u dyslipidemických pacientů s MetS, což odpovídalo i nečetným literárním údajům v době realizace studie (150). FGF 21 jako člen rodiny fibroblastových růstových faktorů se účastní vícečetných metabolických pochodů, zvláště těch, které souvisejí s nutričním stavem. Provedené výzkumy prokázaly příznivé působení na metabolismus lipidů a glukózy na zvířecích modelech, na druhé straně ale byly vyšší hladiny FGF 21 nalezeny u lidí s kardiometabolickými onemocněními, jako diabetes mellitus 2. typu, obezita, nealkoholická steatóza jater a koronární chorobou (130). Tento fakt je vysvětlován stavem se zvýšenou rezistencí na působení FGF 21, viz odd. 3.3., eventuálně jako kompenzatorní odpověď organismu na zvýšené kardiovaskulární riziko (181).

Hlavním cílem naší studie však bylo objasnění vztahu FGF 21 a C-IMT u dyslipidemických jedinců, o kterém byla v době realizace výzkumu k dispozici jen velmi omezená literární data. U asymptomatických pacientů s dyslipidemií jsme potvrdili pozitivní korelaci hladin FGF 21 s C-IMT, ovšem jako nezávislá se ukázala být pouze u dyslipidemických jedinců bez přítomnosti metabolického syndromu (MetS-). Z literárních údajů pouze Chow et al. demonstroval nezávislou pozitivní asociaci FGF 21 a C-IMT ve skupině zdravých Číňanů, ale pouze u žen, nikoliv u mužů (170). Autoři tento rozdíl vysvětlují převažujícím vlivem silnějších rizikových faktorů pro kardiovaskulární onemocnění u mužů ve zkoumané skupině zahrnující jednak zvýšené procento kuřáků a průměrným vyšším věkem. Podobně lze spekulovat o výsledcích i v naší studii, tj. absence zjištění nezávislé pozitivní korelace u dyslipidemických pacientů s metabolickým syndromem (MetS+). U těchto pacientů jsme našli signifikantně vyšší hodnoty zavedených klinických a laboratorních kardiovaskulárních rizikových faktorů: BMI, obvod pasu, lačná glykemie). Dále mohlo sehrát svou roli vyšší zastoupení mužů s ve skupině MetS+, kteří byli rovněž častěji kuřáky. Přitom byla nalezena signifikantní korelace FGF 21 s kouřením ve všech sledovaných skupinách (viz Tabulka 10). Pozdější studie se zaměřily na studium vztahu FGF 21 a aterosklerózy zejména u nemocných s diabetem 2. typu. Xiao et al. prokázal výzkumem na 212 nově diagnostikovaných diabetických 2. typu vyšší hladiny FGF 21 při přítomnosti subklinické aterosklerózy, které korelovaly pozitivně s C-IMT a iliakální IMT, paradoxně zejména u žen (173). V podobné studii porovnávající 213 subjektů s normální glukozovou tolerancí a diabetem 2. typu byla identifikována korelace FGF 21 s diabetem 2.

typu. Pacienti v této studii také měli častěji aterosklerotické karotické pláty (169). Nečetné další výzkumy také ukázaly vztah mezi hladinami FGF 21 a diabetem mellitem 2. typu se silnější korelací u subjektů se subklinickou aterosklerózou (200) (223).

V naší studii jsme prokázali zvýšené sérové hladiny FGF 21 a zvýšenou C-IMT u dyslipidemických pacientů s MetS oproti dyslipidemickým jedincům bez MetS i oproti zdravým kontrolám. Ve skupině MetS- pak byla pak nalezena nezávislá pozitivní asociace IMT s FGF 21.

SOUHRN VÝSTUPŮ DISERTAČNÍ PRÁCE

Z výsledků provedených studií vyplývají následující hlavní zjištění:

1. Prokázali jsme pozitivní asociaci adiponektinu s A-FABP a zejména pozitivní reciproční asociace mezi hladinami FGF 21 a A-FABP u asymptomatických dyslipidemických pacientů s dominancí ve skupině s metabolickým syndromem.
2. U A-FABP jsme potvrdili jeho asociaci s markery inzulinové rezistence a nově prokázali jeho nezávislou asociaci s hemostatickým markerem vWF u asymptomatických dyslipidemických pacientů přispívající k vysvětlení patofyziologického postavení A-FABP v procesu vzniku endoteliální dysfunkce a ateroskleróze.
3. U FGF 21 jsme prokázali jeho zvýšené hladiny u asymptomatických dyslipidemických pacientů a zejména také nově nezávislou asociaci s hemostatickými markery vWF a tPA. Tato korelace může být znamením protrombogenního stavu u nositelů rizikového lipidového profilu a také možnosti endotelového poškození. Dále byla verifikována nezávislá asociace FGF 21 s C-IMT u dyslipidemických pacientů bez přítomnosti metabolického syndromu.
4. Zajímavým vedlejším nálezem je průkaz nezávislé asociace poměru ApoB/ApoA1 s C-IMT u dyslipidemických pacientů bez metabolického syndromu, což doplňuje dosud známé údaje podporující užití tohoto poměru jako užitečného parametru pro určení rizika aterosklerózy a kardiovaskulárního rizika.

LITERATURA

1. **Hotamisligil, GS, Shargill, NS a Spiegelman, BM.** Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993, 259 (5091), stránky 87-91.
2. **Cook, KS, a další.** Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science*. 1987, 237(4813), stránky 402-405.
3. **Zhang, Y, a další.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994, 372(6505), stránky 425-432.
4. **Choi, KM.** The Impact of Organokines on Insulin Resistance, Inflammation, and Atherosclerosis. *Endocrinology and Metabolism*. 2016, Sv. 1, 31, stránky 1-6.
5. **Fasshauer, M a Blüher, M.** Adipokines in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015, Sv. 7, 36, stránky 461-470.
6. **Blüher, M.** Clinical relevance of adipokines. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2012, 36, stránky 317-327.
7. **Lehr, S, Hartwig, S a Sell, H.** Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *PROTEOMICS – Clinical Applications*. 2012, 6(1-2), stránky 91-101.
8. **Scherer, PE, a další.** A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270(45), stránky 26746-26749.
9. **Hu, E., Liang, P. a Spiegelman, BM.** Adipoq is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271, stránky 10697–10703.
10. **Maeda, K., a další.** cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apm1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996, 221, stránky 286–289.
11. **Díez, JJ. a Iglesias, P.** The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. 2003, 148, stránky 293–300.
12. **Yamauchi, T., a další.** The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Medicine*. 2001, 7, stránky 941–946.
13. **Nakano, Y., a další.** Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. 1996, 120(4), stránky 803-812.
14. **Berner, HS., a další.** Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone*. 2004, 35, stránky 842–849.

15. **Yoda-Murakami, M., a další.** Change in expression of gbp28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001, 285(2), stránky 32-377.
16. **Delaigle, ALM., a další.** Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: In vivo and in vitro studies. *Endocrinology*. 2004, 145, stránky 5589–5597.
17. **Patel, JV., a další.** Circulating serum adiponectin levels in patients with coronary artery disease: Relationship to atherosclerotic burden and cardiac function. *Journal of internal medicine*. 2008, 264, stránky 593–598.
18. **Caminos, JE., a další.** Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *Endocrinology and Metabolism*. 2005, 90, stránky 4276–4286.
19. **Shimada, K., Miyazaki, T. a Hiroyuki, D.** Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clinica Chimica Acta*. 2004, 344, stránky 1-12.
20. **Arita, Y., a další.** Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999, 257(1), stránky 79-83.
21. **Saito, K., a další.** Organization of the gene for gelatin-binding protein (gbp28). *Gene*. 1999, 229, stránky 67–73.
22. **Takahashi, M., a další.** Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *International Journal of Obesity*. 2000, 24.
23. **Magkos, F. a Sidossis, LS.** Recent advances in the measurement of adiponectin isoform distribution. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2007, 10, stránky 571–575.
24. **Pajvani, UB., a další.** Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279, stránky 12152–12162.
25. **Kobayashi, H., a další.** Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circulation Research*. 2004, 94(4), stránky e27-e31.
26. **Fruebis, J., a další.** Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001, 98, stránky 2005–2010.
27. **Achari, AE. a Jain, SK.** Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, Sv. 1321, 18.

28. **Wang, ZV., a další.** Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. 2007, 27, stránky 3716–3731.
29. **Qiang, L., Wang, H. a Farmer, SR.** Adiponectin secretion is regulated by sirt1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase ero1-l. 2007, 27, stránky 4698–4707.
30. **Liu, M., a další.** A disulfide-bond a oxidoreductase-like protein (dsba-l) regulates adiponectin multimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, 105, stránky 18302–18307.
31. **Yamauchi, T., a další.** Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003, 423, stránky 762–769.
32. **Motoshima, H., a další.** Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 2004, 315(2), stránky 264-271.
33. **Piñeiro, R., a další.** Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Letters*. 2005, 579(23), stránky 5163-5169.
34. **Kharroubi, I., a další.** Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, 312(4), stránky 1118-1122.
35. **Tan, KC., a další.** Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004, 89(2), stránky 765-769.
36. **Coope, A., a další.** AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *FEBS Letters*. 2008, 582(10), stránky 1471-1476.
37. **Miaczynska, M., a další.** Appl proteins link rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*. 2004, 116, stránky 445-456.
38. **Mao, X., a další.** Appl1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nature Cell Biology*. 2006, 8, stránky 516-523.
39. **Nachamen, CA., Thomas, RM. a Dias, JA.** Appl1, appl2, akt2 and foxo1a interact with fshr in a potential signaling complex. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007, 260, stránky 93-99.
40. **Hug, C., a další.** T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, 101, stránky 10308–10313.

41. **Wyder, L., a další.** Increased expression of h/t-cadherin in tumor-penetrating blood vessels. *Cancer Research*. 2000, 60, stránky 4682–4688.
42. **Ivanov, D., a další.** Expression of cell adhesion molecule t-cadherin in the human vasculature. *Histochemistry and Cell Biology*. 2001, 115, stránky 231–242.
43. **Hebbard, LW., a další.** T-cadherin supports angiogenesis and adiponectin association with the vasculature in a mouse mammary tumor model. *Cancer Research*. 2008, 68, stránky 1407-1416.
44. **Denzel, MS., a další.** T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2010, 120, stránky 4342–4352.
45. **Suyama, S., a další.** Adiponectin at physiological level glucose-independently enhances inhibitory postsynaptic current onto NPY neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuropeptides*. 2017, 65, stránky 1-9.
46. **Loewen, SP., a další.** Sex-specific differences in cardiovascular and metabolic hormones with integrated signalling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Experimental physiology*. 2017, 102(11), stránky 1373-1379.
47. **Fu, Y., a další.** Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of Lipid Research*. 2005, 46, stránky 1369–1379.
48. **Combs, TP., a další.** A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology*. 2004, 145, stránky 367–383.
49. **Bauer, S., a další.** Low-abundant adiponectin receptors in visceral adipose tissue of humans and rats are further reduced in diabetic animals. *Archives of Medical Research*. 2010, 41, stránky 75-82.
50. **Ye, JM., a další.** Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats. *Diabetes*. 2001, 50, stránky 411-417.
51. **Shibata, R., a další.** Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279, stránky 28670–28674.
52. **Nishimura, M., a další.** Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Circulation*. 2008, 117, stránky 216-223.
53. **Sattar, N., a další.** Adiponectin and coronary heart disease. *Circulation*. 2006, 114, stránky 623-629.

54. **Iwashima, Y., a další.** Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension*. 2004, 43, stránky 1318-1323.
55. **Lam, KSL. a Xu, A.** Adiponectin: Protection of the endothelium. *Current Diabetes Reports*. 2005, 5, stránky 254-259.
56. **Okamoto, Y., a další.** An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Hormone and metabolic research*. 2000, 32(2), stránky 47-50.
57. **Kobashi, C., a další.** Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. *Circulation Research*. 2005, 97, stránky 1245-1252.
58. **Ouchi, N., a další.** Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a camp-dependent pathway. *Circulation*. 2000, 102, stránky 1296–1301.
59. **Matsuda, M., a další.** Role of adiponectin in preventing vascular stenosis the missing link of adipo-vascular axis. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277, stránky 37487–37491.
60. **Ceddia, RB., a další.** Globular adiponectin increases glut4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia*. 2005, 48, stránky 132-139.
61. **Xu, A., a další.** The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2003, 112, stránky 91-100.
62. **Yamauchi, T., a další.** Targeted disruption of adipor1 and adipor2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine*. 2007, 13, stránky 332-339.
63. **Maeda, K., a další.** Inverse correlation between serum adiponectin concentration and hepatic lipid content in japanese with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2005, 54, stránky 775-780.
64. **Makowski, L. a Hotamisligil, GS.** Fatty acid binding proteins—the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *Journal of Nutrition*. 2004, 134, stránky 2464S-2468S.
65. **Pelton, PD., a další.** PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999, 261, stránky 456-458.
66. **Makowski, L. a další.** Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nature Medicine*. 2001, Sv. 6, 7, stránky 699-705.

67. **Rolph, MS, a další.** Regulation of dendritic cell function and T cell priming by the fatty acid-binding protein AP2. *Journal of immunology*. 2006, Sv. 11, 177, stránky 7794-7801.
68. **Elmasri, H, a další.** Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB Journal*. 2009, Sv. 11, 23, stránky 3865-3873.
69. **Furuhashi, M. a Hotamisligil, GS.** Fatty acid-binding proteins: role in metametabolic diseases and potential as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008, 7(6), stránky 489-503.
70. **Furuhashi, M., a další.** Lipid chaperones and metabolic inflammation. *International Journal of Inflammation*. 2011, 2011:642612.
71. **Coe, NR. a Bernlohr, DA.** Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998, 1391(3), stránky 287-306.
72. **Chmurzynska, A.** The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of Applied Genetics*. 2006, 47(1), stránky 39-48.
73. **Ockner, RK., a další.** A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*. 1972, 177(4043), stránky 56-58.
74. **Ek, BA., a další.** Fatty acid binding proteins reduce 15-lipoxygenase-induced oxygenation of linoleic acid and arachidonic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997, 1346(1), stránky 75-85.
75. **Zimmer, JS., a další.** Fatty acid binding proteins stabilize leukotriene A4: competition with arachidonic acid but not other lipoxygenase products. *Journal of Lipid Research*. 2004, 45(11), stránky 2138-2144.
76. **Veerkamp, JH. a van Moerkerk, HT.** Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1993, 123(1-2), stránky 101-106.
77. **Bernlohr, DA, a další.** Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 81, stránky 5468-5472.
78. **Amri, EZ., a další.** Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *Journal of Lipid Research*. 1991, 32(9), stránky 1449-1456.

79. **Distel, RJ., Robinson, GS. a Spiegelman, BM.** Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 1992, 267(9), stránky 5937-5941.
80. **Cook, JS., a další.** Expression of the differentiation-induced gene for fatty acid-binding protein is activated by glucocorticoid and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988, 85(9), stránky 2949-2953.
81. **Kletzen, RF., a další.** Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. *Molecular Pharmacology*. 1992, 42(4), stránky 558-562.
82. **Shen, WJ, a další.** Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 1999, Sv. 10, 96, stránky 5528-5532.
83. **Tan, NS, a další.** Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Molecular and cellular biology*. 2002, Sv. 17, 22, str. 6318.
84. **Thompson, BR, a další.** Interaction of adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP) and JAK2: AFABP/aP2 as a regulator of JAK2 signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, Sv. 20, 284, stránky 13473-13480.
85. **Fu, Y, a další.** The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. 2002, Sv. 2, 165, stránky 259-269.
86. **Pelton, PD, a další.** PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999, Sv. 2, 261, stránky 456-458.
87. **Wang, XQ, a další.** Receptor mediated elevation in FABP4 levels by advanced glycation end products induces cholesterol and triacylglycerol accumulation in THP-1 macrophages. *Lipids*. 2011, Sv. 6, 46, stránky 479-486.
88. **Llaverias, G, a další.** Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004, Sv. 1, 318, stránky 265-274.
89. **Hui, X, a další.** Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH2-terminal kinases and activator protein-1. *The Journal of biological chemistry*. 14, 2010, 285, stránky 10273-10280.
90. **Agardh, HE, a další.** Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. *Journal of internal medicine*. 2011, Sv. 2, 269, stránky 200-210.

91. **Weisberg, SP, a další.** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 2003, Sv. 12, 112, stránky 1796-1808.
92. **Xu, H, a další.** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of clinical investigation*. 2003, Sv. 12, 112, stránky 1821-1830.
93. **Boord, JB, a další.** Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002, Sv. 10, 22, stránky 1686-1691.
94. **Iso, T, a další.** Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid uptake in heart and skeletal muscle. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 11, 2013, Sv. 33, stránky 2549-2557.
95. **Tanaka, M, a další.** Ectopic expression of fatty acid-binding protein 4 in the glomerulus is associated with proteinuria and renal dysfunction. *Nephron. Clinical practice*. 2014, Sv. 3-4, 128, stránky 345-351.
96. **Han, Q, a další.** Effects of intermittent hypoxia on A-/E-FABP expression in human aortic endothelial cells. *International Journal of Cardiology*. 2010, Sv. 2, 145, stránky 396-398.
97. **Ghelfi, E, a další.** Fatty acid-binding proteins and peribronchial angiogenesis in bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2011, Sv. 3, 45, stránky 550-556.
98. **Maver, A, Medica, I a Peterlin, B.** Search for sarcoidosis candidate genes by integration of data from genomic, transcriptomic and proteomic studies. *Medical Science Monitor*. 2009, Sv. 12, 15, stránky SR22-28.
99. **Biron-Shental, T, a další.** Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007, Sv. 5, 197, stránky e511-516.
100. **Scifres, CM, a další.** Fatty acid binding protein 4 regulates intracellular lipid accumulation in human trophoblasts. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011, Sv. 7, 96, stránky E1083-E1091.
101. **Nieman, KM, a další.** Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine*. 2011, Sv. 11, 17, stránky 1498-1503.
102. **Ohlsson, G, a další.** Loss of expression of the adipocyte-type fatty acid-binding protein (A-FABP) is associated with progression of human urothelial carcinomas. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005, Sv. 4, 4, stránky 570-581.

103. **Nickel, W a Rabouille, C.** Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, Sv. 2, 10, stránky 148-155.
104. **Mita, T, a další.** FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. 2015, Sv. 2, 23, stránky 359-367.
105. **Cao, H, a další.** Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell metabolism*. 2013, Sv. 5, 17, stránky 768-778.
106. **Ishimura, S, a další.** Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS One*. 2013, Sv. 11, 8, str. e81318.
107. **Yeung, DC., a další.** Circulating levels of adipocyte and epidermal fatty acid-binding proteins in relation to nephropathy staging and macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2009, Sv. 32, 1, stránky 132-134.
108. **Aragones, G, a další.** Fatty acid-binding protein 4 impairs the insulin-dependent nitric oxide pathway in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Diabetology*. 2012, Sv. 1, 11, str. 72.
109. **Girona, J, a další.** FABP4 induces vascular smooth muscle cell proliferation and migration through a MAPK-dependent pathway. *PLoS One*. 2013, Sv. 11, 8, str. e81914.
110. **Wu, LE, a další.** Identification of fatty acid binding protein 4 as an adipokine that regulates insulin secretion during obesity. *Molecular metabolism*. 2014, Sv. 4, 3, stránky 465-473.
111. **Xu, A, a další.** Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clinical Chemistry*. 2006, 52, stránky 405-413.
112. **Xu, A, a další.** Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation*. 2007, Sv. 12, 115, stránky 1537-1543.
113. **Tso, AW, a další.** Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care*. 2007, 30, stránky 2667-2672.
114. **Ota, H, a další.** Elevation of fatty acid-binding protein 4 is predisposed by family history of hypertension and contributes to blood pressure elevation. *American Journal of Hypertension*. 2012, 25, stránky 1124-1130.

115. **Fuseya, T, a další.** Elevation of circulating fatty acid-binding protein 4 is independently associated with left ventricular diastolic dysfunction in a general population. *Cardiovascular Diabetology*. 2014, 13, str. 126.
116. **Yeung, DC, a další.** Serum Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Levels Were Independently Associated With Carotid atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, 27, stránky 1796-1802.
117. **Karpisek, M, a další.** Treatment with atorvastatin reduces serum adipocyte-fatty acid binding protein value in patients with hyperlipidaemia. *European journal of clinical investigation*. 2007, Sv. 8, 37, stránky 637-642.
118. **Furuhashi, M, a další.** Angiotensin II receptor blockers decrease serum concentration of fatty acid-binding protein 4 in patients with hypertension. *Hypertension research*. 2015, Sv. 4, 38, stránky 252-259.
119. **Hancke, K, a další.** Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010, Sv. 2, 119, stránky 367-370.
120. **Furuhashi, M, a další.** Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*. 2014, Sv. S3, 8, stránky 23-33.
121. **Stefan, N a Haring, HU.** The role of hepatokines in metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*. 2013, 9, stránky 144-152.
122. **Mathews, ST, a další.** Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes*. 2002, Sv. 8, 51, stránky 2450-2458.
123. **Pal, D, a další.** Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nature Medicine*. 2012, Sv. 8, 18, stránky 1279-1285.
124. **Iroz, A, Couty, JP a Postic, C.** Hepatokines: unlocking the multi-organ network in metabolic diseases. *Diabetologia*. 2015, 58, stránky 1699-1703.
125. **Weikert, C, a další.** Plasma fetuin-a levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *Circulation*. 2008, Sv. 24, 118, stránky 2555-2562.
126. **Ix, JH, a další.** Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons. *JAMA*. 2008, Sv. 2, 300, stránky 182-188.
127. **Misu, H, a další.** A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2010, Sv. 5, 12, stránky 483-495.
128. **Yang, SJ, a další.** Serum selenoprotein P levels in patients with type 2 diabetes and prediabetes: implications for insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis.

The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2011, Sv. 8, 96, stránky E1325-1329.

129. **Misu, H, a další.** Inverse correlation between serum levels of selenoprotein P and adiponectin in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012, Sv. 4, 7, str. e34952.

130. **Woo, YC., a další.** Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clinical Endocrinology*. 2012, 78(4), stránky 489-496.

131. **Nishimura, T, a další.** Identification of novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, Sv. 1, 1492, stránky 203-206.

132. **Oulion, S, Bertrand, S a Escriva, H.** Evolution of the FGF gene family. *International Journal of Evolutionary Biology*. 2012, 2012, stránky 1-12.

133. **Goetz, R, a další.** Molecular insights into the Klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Molecular and Cellular Biology*. 2007, Sv. 9, 27, stránky 3417-3428.

134. **Kurosu, H, a další.** Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptors isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF 21. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007, Sv. 37, 282, stránky 26687-26695.

135. **Ogawa, Y, a další.** BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, Sv. 18, 104, stránky 7432-7437.

136. **Adams, AC, a další.** FGF21 requires betaklotho to act in vivo. *PLoS One*. 2012, Sv. 11, 7, str. e49977.

137. **Fon Tacer, K, a další.** Research resource: comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Molecular Endocrinology*. 2010, Sv. 10, 24, stránky 2050-2064.

138. **Petryszak, R, a další.** Expression atlas update-an intergrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Research*. 2016, Sv. D1, 44, stránky D746-D752.

139. **Kharitononkov, A a Adams, AC.** Inventing new medicines: the FGF21 story. *Molecular Metabolism*. 2013, Sv. 3, 3.

140. **Itoh, N.** FGF21 as a hepatokine, adipokine, and myokine in metabolism and diseases. *Frontiers in Endocrinology*. 2014, Sv. 107, 5.

141. **Inagaki, T, a další.** Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metabolism*. 2007, Sv. 6, 5, stránky 415-425.

142. **Matikainen, N, a další.** Decrease in circulating fibroblast growth factor 21 after an oral fat load is related to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and liver fat. *European Journal of Endocrinology*. 2012, Sv. 3, 166, stránky 487-492.
143. **Dushay, JR, a další.** Fructose ingestion acutely stimulates circulating FGF21 levels in humans. *Molecular Metabolism*. 2014, Sv. 1, 4, stránky 51-57.
144. **Kim, KH, a další.** Acute exercise induces FGF21 expression in mice and in healthy humans. *PLoS One*. 2013, Sv. 5, 8, str. e63517.
145. **Hansen, JS, a další.** Glucagon-to-insulin ratio is pivotal for splanchnic regulation of FGF-21 in humans. *Molecular Metabolism*. 2015, Sv. 8, 4, stránky 551-560.
146. **Cartoumpakis, DV, a další.** Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Molecular Medicine*. 2011, Sv. 7-8, 17, stránky 736-740.
147. **Lee, P, a další.** Mild cold exposure modulates fibroblast growth factor 21 (FGF21) diurnal rhythm in humans: relationship between FGF21 levels, lipolysis, and cold-induced thermogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013, Sv. 1, 98, stránky E98-E102.
148. **Tong, X, a další.** Transcriptional repressor E4-binding protein 4 (E4BP4) regulates metabolic hormone fibroblast growth factor 21 (FGF21) during circadian cycles and feeding. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010, Sv. 47, 285, stránky 36401-36409.
149. **Staiger, H, a další.** Fibroblast Growth Factor 21 - Metabolic Role in Mice and Men. *Endocrine Reviews*. 2017, Sv. 5, 38, stránky 468-488.
150. **Zhang, X, a další.** Serum FGF 21 levels are increased in obesity and are independently associated with metabolic syndrome in humans. *Diabetes*. 2008, 57, stránky 1246-1253.
151. **Mraz, M, a další.** Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clinical Endocrinology*. 2009, Sv. 3, 71, stránky 369-375.
152. **Akyildiz, ZI, a další.** Epicardial fat, body mass index, and triglyceride are independent contributors of serum fibroblast growth factor 21 level in obese premenopausal women. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2015, Sv. 3, 38, stránky 361-366.
153. **Taniguchi, H, a další.** Cardiorespiratory fitness and visceral fat are key determinants of serum fibroblast growth factor 21 concentration in Japanese men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014, Sv. 10, 99, stránky E1877-E1884.

154. **Heilbronn, LK, a další.** Metabolically protective cytokines adiponectin and fibroblast growth factor-21 are increased by acute overfeeding in healthy humans. *PLoS One*. 2013, Sv. 10, 8, str. e78864.
155. **Jansen, PLM, a další.** Alterations of hormonally active fibroblast growth factors after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Digestive Diseases* . 2011, Sv. 1, 29, stránky 48-51.
156. **Kharitonov, A, a další.** FGF-21 as a novel metabolic regulator. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, Sv. 6, 115, stránky 1627-1635.
157. **Li, H, a další.** Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *Journal of Hepatology*. 2010, Sv. 5, 53, stránky 934-940.
158. **Dushay, J, a další.** Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2010, Sv. 2, 139, stránky 456-463.
159. **Badman, MK, a další.** Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metabolism* . 2007, Sv. 6, 5, stránky 426-437.
160. **Berglund, ED, a další.** Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. *Endocrinology*. 2009, Sv. 9, 150, stránky 4084-4093.
161. **Xu, J, a další.** Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models-association with liver and adipose tissue effects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2009, Sv. 5, 297, stránky E1105-E1114.
162. **Fisher, FM, a další.** Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo. *Endocrinology*. 2011, Sv. 8, 152, stránky 2996-3004.
163. **Chavez, AO, a další.** Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes Care*. 2009, Sv. 8, 32, stránky 1542-1546.
164. **Li, SM, a další.** Fibroblast growth factor 21 expressions in white blood cells and sera of patients with gestational diabetes mellitus during gestation and postpartum. *Endocrine*. 2015, Sv. 2, 48, stránky 519-527.
165. **Esteghamati, A, a další.** Serum fibroblast growth factor 21 concentrations in type 2 diabetic retinopathy patients. *Annales d'Endocrinologie*. 2016, Sv. 5, 77, stránky 586-592.

166. **Dutchak, PA, a další.** Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell*. 2012, Sv. 3, 148, stránky 556-567.
167. **Gaich, G, a další.** The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metabolism*. 2013, Sv. 3, 18, stránky 333-340.
168. **Lee, Y, a další.** Serum FGF21 concentration is associated with hypertriglyceridaemia, hyperinsulinaemia and pericardial fat accumulation, independently of obesity, but not with current coronary artery status. *Clinical endocrinology*. 2014, 80, stránky 57-64.
169. **An, SY, a další.** Serum fibroblast growth factor 21 was elevated in subjects with type 2 diabetes mellitus and was associated with the presence of carotid artery plaques. *Diabetes research and clinical practise*. 2012, Sv. 2, 96, stránky 196-203.
170. **Chow, WS, a další.** Serum fibroblast growth factor-21 levels are associated with carotid atherosclerosis independent of established cardiovascular risk factors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013, Sv. 10, 33, stránky 2454-2459.
171. **Ulu, SM, a další.** Associations between serum hepcidin level, FGF-21 level and oxidative stress with arterial stiffness in CAPD patients. *International Urology and Nephrology*. 2014, Sv. 12, 46, stránky 2409-2414.
172. **Zhang, X, a další.** Serum fibroblast growth factor 21 levels is associated with lower extremity atherosclerotic disease in Chinese female diabetic patients. *Cardiovascular Diabetology*. 2015, Sv. 32, 14.
173. **Xiao, Y, a další.** Serum fibroblast growth factor 21 levels are related to subclinical atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Cardiovascular diabetology*. 2015, Sv. 72, 14.
174. **Mäkelä, J, a další.** Fibroblast growth factor-21 enhances mitochondrial functions and increases the activity of PGC-1 α in human dopaminergic neurons via Sirtuin-1. *Springerplus*. 2014, 3, str. 2.
175. **Hsuchou, H, Pan, W a Kastin, AJ.** The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides*. 2007, Sv. 12, 28, stránky 2382-2386.
176. **Bookout, AL, a další.** FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nature Medicine*. 2013, Sv. 9, 19, stránky 1147-1152.
177. **Liang, Q, a další.** FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting. *Diabetes*. 2014, Sv. 12, 63, stránky 4064-4075.

178. **Owen, BM, a další.** FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metabolism*. 2014, Sv. 4, 20, stránky 670-677.
179. **Wei, W, a další.** Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012, Sv. 8, 109, stránky 3143-3148.
180. **Hanks, LJ, a další.** Fibroblast growth factor-21, body composition, and insulin resistance in pre-pubertal and early pubertal males and females. *Clinical Endocrinology*. 2015, Sv. 4, 82, stránky 550-556.
181. **Fisher, FM, a další.** Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF 21)-resistant state. *Diabetes*. 2010, Sv. 11, 59, stránky 2781-2789.
182. **Hale, C, a další.** Lack of overt FGF 21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology*. 2012, Sv. 1, 153, stránky 69-80.
183. **Ryo, M, a další.** Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circulation Journal*. 2004, 68, stránky 975-981.
184. **Saely, CH H, a další.** Low serum adiponectin is independently associated with both the metabolic syndrome and angiographically determined coronary atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*. 2007, 383, stránky 97-102.
185. **Horakova, D, a další.** Adipocyte fatty acid binding protein and C-reactive protein levels as indicators of insulin resistance development. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc*. 2011, 155, stránky 355-359.
186. **Lamounier-Zepter, V, a další.** Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circulation Research*. 2009, 105, stránky 326-334.
187. **Von Eynatten, M, a další.** Relationship of adiponektin with markers of systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, and heart failure in patients with coronary heart disease. *Clinical Chemistry*. 2006, 52, stránky 853-859.
188. **Miyoshi, T, a další.** Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis*. 2010, 211, stránky 164-169.
189. **Rhee, EJ, a další.** The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009, 160, stránky 165-172.

190. **Zhou, M, a další.** Serum A-FABP is increased and closely associated with elevated NT-proBNP levels in type 2 diabetic patients treated with rosiglitazone. *PLoS One*. 2011, 6, str. e27032.
191. **Kralisch, S a Fasshauer, M.** Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia*. 2013, 56, stránky 10-21.
192. **Hoo, RC, a další.** Inflammatory biomarkers associated with obesity and insulin resistance: a focus on lipocalin-2 and adipocyte fatty acid-binding protein. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* . 2008, 3, stránky 29-41.
193. **Huating, L, Jing, Z a Weiping, J.** Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology. *Frontiers in Medicine*. 2013, 7, stránky 25-30.
194. **Kharitonov, A, a další.** FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *Journal of Cellular Physiology*. 2008, 215, stránky 1-7.
195. **Campos, H, a další.** LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1992, 12, stránky 1410-1419.
196. **Demacker, PN, a další.** Comparison of the measurement of lipids and lipoproteins versus assay of apolipoprotein B for estimation of coronary heart disease risk: a study in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2000, 153, stránky 483-490.
197. **Matthews, DR, a další.** Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985, 28, stránky 412-419.
198. **Park, SE, a další.** The role of serum adipocyte fatty acid-binding protein on the development of metabolic syndrome is independent of pro-inflammatory cytokines. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*. 2012, 22, stránky 525-532.
199. **Xu, A a Vanhoutte, PM.** Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2012, 302, stránky H1231-H1240.
200. **Spurná, J, a další.** Relationship of Selected Adipokines with Markers of Vascular Damage in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2018, Sv. 5, 16, stránky 246-253.
201. **Makin, AJ, a další.** Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *European Heart Journal*. 2004, Sv. 5, 25, stránky 371-376.

202. **Lee, MY, a další.** Chronic administration of BMS309403 improves endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice and in cultured human endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*. 2011, 162, stránky 1564-1576.
203. **Agardh, HE, a další.** Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. *Journal of internal medicine*. 2011, Sv. 2, 269, stránky 200-210.
204. **Makowski, L, a další.** The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. *The Journal of biological chemistry*. 2005, Sv. 13, 280, stránky 12888-12895.
205. **Pierce, GL, a další.** Nuclear factor- κ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation*. 2009, 119, stránky 1284-1292.
206. **Liang, YJ, Ma, XC a Li, X.** The role of p38 mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-KB transduction pathway on coagulation disorders due to endothelial injury induced by sepsis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2010, 22, stránky 528-532.
207. **Kohler, HP a Grant, PJ.** Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*. 2000, 342, stránky 1792-1801.
208. **Karasek, D, a další.** Prothrombotic markers in asymptomatic dyslipidemic subjects. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2011, 31, stránky 27-36.
209. **Galkina, E a Ley, K.** Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, 27, stránky 2292-2301.
210. **Blankenberg, S, Barbaux, S a Tiret, L.** Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 170, stránky 191-203.
211. **Karasek, D, a další.** Soluble intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in asymptomatic dyslipidemic subjects. *International angiology*. 2011, 30, stránky 441-450.
212. **Iglesias, P, a další.** Biological role, clinical significance, and therapeutic possibilities of the recently discovered metabolic hormone fibroblastic growth factor 21. *European journal of endocrinology*. 2012, 167, stránky 301-309.
213. **Ge, X, a další.** Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ers-like protein-1 in adipocytes. 2011, Sv. 40, 286, stránky 34533-34541.

214. **Li, H, Zhang, J a Jia, W.** Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology. *Frontiers in Medicine*. 2013, 7, stránky 25-30.
215. **Spiel, AO, Gilbert, JC a Jilma, B.** von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation*. 2008, 117, stránky 1449-1459.
216. **Karásek, D, a další.** Endothelial hemostatic markers in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Thrombosis Research*. 2009, 123, stránky 466-475.
217. **Grant, PJ.** Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *Journal of Internal Medicine*. 2007, 262, stránky 157-172.
218. **Tibshirani, R, a další.** Strong Rules for Discarding Predictors in Lasso-type Problems. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*. 2012, Sv. 2, 74, stránky 245-266.
219. **Hao, Y, a další.** Serum Adipocyte Fatty Acid Binding Protein Levels Are Positively Associated With Subclinical Atherosclerosis in Chinese Pre- and Postmenopausal Women With Normal Glucose Tolerance. 2014, 299, stránky 4321-4327.
220. **Zhong, L, a další.** The ApoB/ApoA1 ratio is associated with metabolic syndrome and its components in a Chinese population. *Inflammation*. 2010, 33, stránky 353-358.
221. **Jing, F, a další.** The value of Apolipoprotein B/Apolipoprotein A1 ratio for metabolic syndrome diagnosis in a Chinese population: a cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease*. 2014, 13, stránky 81-87.
222. **Panayiotou, A, a další.** ApoB/ApoA1 ratio and subclinical atherosclerosis. *International Angiology*. 2008, Sv. 1, 27, stránky 74-80.
223. **Kim, WJ, a další.** Association between Serum Fibroblast Growth Factor 21 and Coronary Artery Disease in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Korean medical science*. 2015, Sv. 5, 30, stránky 586-590.

SEZNAM ZKRATEK

AdipoR1	membránový receptor pro adiponektin 1
AdipoR2	membránový receptor pro adiponektin 2
A-FABP	adipocytární protein vázající mastné kyseliny („Adipocyte Fatty Acid – binding Protein“)
AI	aterogenní index plazmy
AMPK	adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkináza
ANOVA	analýza variance
ANCOVA	analýza kovariance
ApoA1	apolipoprotein A1
ApoB	apolipoprotein B
BAT	hnědá tuková tkáň („Brown Adipose Tissue“)
BMI	index tělesné hmotnosti („Body Mass Index“)
CCA	společná karotická arterie (a. carotis communis) („Common Carotid Artery“)
C-IMT	intimomediální tloušťka společné karotidy
CRP	C-reaktivní protein („C-reactive protein“)
DBP	diastolický krevní tlak („diastolic blood pressure“)
ELISA	imunoenzymatická metoda „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“
FABPs	proteiny vázající mastné kyseliny („Fatty Acid-binding Proteins“)
FFA	volné mastné kyseliny („Free Fatty Acids“)
FGF	fibroblastový růstový faktor („Fibroblast Growth Factor“)
FGFR	receptor pro fibroblastové růstové faktory
FGF 21	fibroblastový růstový faktor 21 („Fibroblast Growth Factor 21“)
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě („High Density Lipoprotein“)
HDLc	HDL cholesterol
HOMA	„Homeostasis Model Assessment Index“

hs-CRP	vysoce senzitivní C-reaktivní protein („high sensitivity C-reactive protein“)
IRMA	imunoradiometrická analýza
JNK	C-Jun N-terminální kináza
LASSO	“Least Absolute Shrinkage and Selection Operator”
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
LDLc	LDL cholesterol
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza („Mitogen-Activated Protein Kinase“)
MetS	metabolický syndrom
MetS-	skupina studovaných dyslipidemických jedinců bez metabolického syndromu
MetS+	skupina studovaných dyslipidemických jedinců s metabolickým syndromem
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina („messenger ribonucleic acid“)
NFκB	nukleární faktor kappa B
nonHDLc	non – HDL cholesterol
NT-proBNP	N-terminální prohormon mozkového natriuretického peptidu
PAI-1	inhibitor plazminového aktivátoru 4G/5G
PPAR-α	„Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α“
PPAR-γ	„Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ“
SBP	systolický krevní tlak („systolic blood pressure“)
s-ICAM-1	solubilní intercelulární adhezivní molekula 1 („soluble Intercellular Adhesion Molecule-1“)
sTBM	solubilní trombomodulin
s-VCAM-1	solubilní vaskulární adhezivní molekula 1 („soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1“)

TC	celkový cholesterol
TG	triacylglyceroly
TNF-α	faktor nekrotizující nádory- α („Tumor Necrosis Factor- α “)
t-PA	aktivátor tkáňového plazminogenu
vWF	von Willebrandův faktor
WAT	bílá tuková tkáň („White Adipose Tissue“)

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1.** Úloha organokinů v rozvoji kardiometabolických onemocnění.
- Obrázek 2.** Přehled bioaktivních látek produkovaných tukovou tkání.
- Obrázek 3.** Domény a struktura adiponektinu.
- Obrázek 4.** Schématické znázornění intracelulárních signálních kaskád aktivovaných vazbou adiponektinu na specifické receptory AdipoR1 a AdipoR2.
- Obrázek 5.** Klinické souvislosti tvorby a účinku A-FABP.
- Obrázek 6.** Úloha FGF 21 v metabolismu u myší a lidí.
- Obrázek 7.** Výskyt diabetu mellitu ve studovaných skupinách.
- Obrázek 8.** Korelace mezi hladinami FGF 21 a C-IMT u dyslipidemických pacientů bez metabolického syndromu (MetS-). $r = 0,486$, $p < 0,01$.

SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1.** Základní charakteristiky všech studovaných jedinců a subjektů s MetS a bez MetS.
- Tabulka 2.** Signifikantní korelace hladin adipokinů s ostatními parametry ve skupinách MetS+ a MetS-.
- Tabulka 3.** Nezávislé asociace adiponektinu, A-FABP a FGF 21 zjištěné vícenásobnou regresní analýzou (tučně).
- Tabulka 4.** Základní charakteristiky souborů.
- Tabulka 5.** Vícenásobná regresní analýza vztahů mezi A-FABP jako závisle proměnnou a korelujícími parametry jako nezávislými prediktory ve skupině dyslipidemických pacientů.
- Tabulka 6.** Základní charakteristiky dyslipidemických subjektů rozdělených dle hladin ApoB a TG.
- Tabulka 7.** Korelace FGF 21 s endoteliálními a hemostatickými markery a parametry inzulinové rezistence ve skupině kontrol a dyslipidemických jedinců.
- Tabulka 8.** Asociace FGF 21 s korelovanými parametry u kontrolní a dyslipidemické skupiny.
- Tabulka 13.** Klinické a biochemické charakteristiky studovaných jedinců.
- Tabulka 14.** Korelace FGF 21 s různými biochemickými a klinickými parametry.
- Tabulka 15.** Vícenásobná lineární regresní analýza ukazující parametry se signifikantní nezávislou asociací s C-IMT u různých studovaných skupin.

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

PUBLIKACE SOUVISEJÍCÍ S DISERTAČNÍ PRACÍ:

a) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

- KARASEK, D. – VAVERKOVA, H. – FRYSAK, Z. – **ORSAG, J.** – NOVOTNY, D. – HALENKA, M. – SLAVIK, L. Relationship between serum adipocyte fatty acid-binding protein and endothelial/hemostatic markers in dyslipidemic subjects. *Neuroendocrinology Letters*, 2012, **33**, Suppl. 2, 26-31. ISSN: 0172-780X. IF (2012) 0.932
- NOVOTNY, D. – VAVERKOVA, H. – KARASEK, D. – LUKES, J. – SLAVIK, L. – MALINA, P. – **ORSAG, J.** Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. *Physiological Research*, 2014, **63**, 219-228. ISSN: 0862-8408. IF (2013/2014) 1.487
- **ORSAG, J.** – KARASEK, D. – HALENKA, M. – VAVERKOVA, H. – SPURNA, J. – KUBICKOVA, V. – LUKES, J. – ZADRAZIL, J. Association of serum adipocyte fatty acid-binding protein and apolipoprotein B /apolipoprotein A1 ratio with intima media thickness of common carotid artery in dyslipidemic patients. – v recenzním řízení v *Biomedical Papers (Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech repub*

b) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

- **ORSAG, J.** – KARASEK, D. – KRŠKOVÁ, M. – HALENKA, M. – VAVERKOVA, H. – GAJDOVA, J. – NOVOTNY, D. – LUKES, J. The relationship of serum fibroblast growth factor 21 levels to intima-media thickness in dyslipidemic patients. *Journal of Disease Markers* [online], 2014,1(3), id. 1012 . Dostupné z <

<http://austinpublishinggroup.com/disease-markers/all-issues.php> > .
ISSN: 2380-0682.

- NOVOTNY, D. – KARASEK, D. – VAVERKOVA, H. – **ORSAG**, J. – KUBICKOVA, V. Fibroblast growth factor 21 and endothelial/hemostatic markers in dyslipidemic subjects. *Austin Journal of Cardiovascular Disease and Atherosclerosis* [online], 2014, 1(2), id.1008. Dostupné z <
<http://austinpublishinggroup.com/cardiovascular-diseases/fulltext/ajcd-v1-id1008.php>>.

c) Publikovaná abstrakta

- **ORSÁG**, Jiří – KARÁSEK, David – HALENKA, Milan – VAVERKOVÁ, Helena – NOVOTNÝ, Dalibor. Pozitivní asociace adipokinů FGF 21 a A-FABP s intimomediální tloušťkou společné karotidy u dyslipidemických jedinců. In *XXXI. dni mladých internistů s mezinárodní účastí, Martin, Slovenská republika, 24.-25.5. 2012 (Zborník abstrakt)* [online]. Martin: JLF UK a UNM Martin, 2012 [cit. 2012-08-28].
Dostupné z <http://www.vnitrnilekarstvi.cz/online/E2012_7>.
- **ORSÁG**, Jiří – KARÁSEK, David – HALENKA, Milan – VAVERKOVÁ, Helena – NOVOTNÝ, Dalibor. Hladiny adipokinů FGF 21 a A-FABP a intimomediální tloušťka společné karotidy u dyslipidemických jedinců. In *XIX. kongres České internistické společnosti ČLS J.E.Purkyně Brno, 24.-27.10.2012 (Sborník abstrakt – Postery)* [online]. Praha, 2012 [cit. 2013-06-28]. Dostupné z <http://www.vnitrnilekarstvi.cz/online/E2012_10>.
- **ORSÁG**, Jiří – KARÁSEK, David – HALENKA, Milan – VAVERKOVÁ, Helena – SPURNÁ, Jaromíra – KUBÍČKOVÁ, Veronika – LUKEŠ, Jiří. Asociace hladin adipocytárního proteinu vázajícího mastné kyseliny a poměru hladin apolipoproteinu B/apolipoproteinu A1 s intimomediální tloušťkou arteria carotis communis u asymptomatických pacientů s dyslipidemií. In *XXXVII.*

Dni mladých internistů s mezinárodní účastí, Martin, Slovenská republika, 7.- 8.6. 2018. Interná medicína, 2018, vol. S5, no. 18, s 13. ISSN: 1335-8359.

d) Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech:

- **ORSÁG**, Jiří. Vztah adipokinů FGF 21 a A-FABP k intimomediální tloušťce společné karotidy u dyslipidemických jedinců (přednáškové sdělení). Pracovní den „Laboratorní vyšetření u srdečně-cévních onemocnění“ 22. květen 2013, Teoretické ústavy LF UP Olomouc.
- **ORSÁG**, Jiří – **KARÁSEK**, David – **HALENKA**, Milan – **VAVERKOVÁ**, Helena – **NOVOTNÝ**, Dalibor. Adipokiny FGF 21 a A-FABP a intimomediální tloušťka společné karotidy u dyslipidemických jedinců (přednáškové sdělení). Konference vědeckých prací studentů DSP, 2013, Olomouc, Lékařská fakulta UP v Olomouci.

OSTATNÍ PUBLIKACE:

e) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v časopisech s IF

- **ORSAG**, J. – **FLODR**, P. – **MELTER**, O. – **TKADLEC**, J. – **STERNBERSKY**, J. – **HRUBY**, M. – **KLICOVA**, A. – **ZAMBOCH**, K. – **KREJCI**, K. – **ZADRAZIL**, J. Cutaneous bacillary angiomatosis due to Bartonella quintana in a renal transplant recipient. *Transplant International* [online], 2015, **28**(5), 626-631. Dostupné z < <https://doi.org/10.1111/tri.12539> >. IF (2015) 2.835
Oceněno Cenou děkana LF UP v Olomouci za nejlepší studentskou vědeckou práci v roce 2015.

- KARASEK, D. – VAVERKOVA, H. – HALENKA, M. – JACKULIAKOVA, D. – FRYSAK, Z.- **ORSAG**, J. – NOVOTNY, D. Prehypertension in dyslipidemic individuals; relationship to metabolic parameters and intima-media thickness. *Biomedical Papers (Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech repub.)*, March 2013, **157**(1), 41-49. ISSN 1213-8118. IF (2013) 1.661
- CIBIČKOVÁ, L'. – KARÁSEK, D. – LANGOVÁ, K. – VAVERKOVÁ, H. – **ORSÁG**, J. – LUKEŠ, J. – NOVOTNÝ, D. Correlation of lipid parameters and markers of insulin resistance: does smoking make a difference? *Physiological Research*, 2014, **63** (suppl. 3), S387-S393. ISSN 0862-8408. IF (2013/2014) 1.487
- VAVERKOVÁ, H. – KARÁSEK, D. – NOVOTNÝ, D. – HALENKA, M. – **ORSÁG**, J. – SLAVÍK, L. Hypertriglyceridemic waist – a simple clinical tool to detect cardiometabolic risk: comparison with harmonized definition of metabolic syndrome. *Physiological Research*, 2015, **64**(suppl. 3), S385-S394. ISSN 0862-8408. IF (2015) 1.646
- KREJČÍ, K. – ČERNÁ, M. – ŽAMBOCH, K. – **ORSÁG**, J. – KLÍČOVÁ, A. – ZADRAŽIL, J. Late rupture of lumbar artery as an unusual complication after renal biopsy – case report. *Urologia Internationalis*, 2017, **98**(1), 112-114. ISSN 0042-1138. IF (2017) 1.611

f) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

- **ORSÁG**, J. – PIKA, T. – KOSATÍKOVÁ, Z. – LOCHMAN, P. – ŽAMBOCH, K. – MINAŘÍK, J. – HRUBÝ, M. – ŠČUDLA, V. – ZADRAŽIL, J. Hemodialýza s použitím „high cut-off“ membrán při selhání ledvin u mnohočetného myelomu – první zkušenosti. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2013, **21**(2), No. 2, s. 88-92. ISSN: 1080-2711.
- **ORSÁG**, J. Hemoragická horečka s renálním syndromem (HFRS) imitující hemolyticko-uremický syndrom (TTP/HUS) – diferenciálně

diagnostický oříšek. *Postgraduální nefrologie*, 2014, vol.12, no.1, s.15-16. ISSN: 1214-178X.

- KLOS, D.- **ORSÁG**, J. – LOVEČEK, M. – SKALICKÝ, P. – HAVLÍK, R. – ZADRAŽIL, J. – NEORAL, Č. Emergency surgical treatment of complicated acute pancreatitis after kidney transplantation with acute rejection: Case report and literature review. *Annals of Medicine and Surgery*. [online], June 2016, vol. 8, s. 14-17. Dostupné z <[http://www.annalsjournal.com/article/S2049-0801\(16\)30040-1/fulltext](http://www.annalsjournal.com/article/S2049-0801(16)30040-1/fulltext)>. ISSN:2049-0801.
- KREJČÍ, K. – TICHÝ, T. – HRUBÝ, M. – ŽAMBOCH, K. – **ORSÁG**, J. – BACHLEDA, P. – ZADRAŽIL, J. Komplikace protokolárních biopsií transplantovaných ledvin: 10 let zkušeností transplantačního centra Olomouc. *Aktuality v nefrologii*, 2012, **18**, No.1, s. 21. ISSN: 1210-955X.
- KAJABOVÁ, M. – ZADRAŽIL, J. – HORÁK, P. – KREJČÍ, K. – KOSATÍKOVÁ, Z. – HRUBÝ, M. – ŽAMBOCH, K. – **ORSÁG**, J. Prospektivní sledování vybraných parametrů oxidačního stresu po transplantaci ledviny. *Aktuality v nefrologii*, 2012, **18**, No.1, s. 31-32. ISSN: 1210-955X.
- KREJČÍ, K. – TICHÝ, T. – BEDNAŘÍKOVÁ, J. – ŽAMBOCH, K. – **ORSÁG**, J. – HRUBÝ, M. Vliv nefrotoxicity kalcineurinových inhibitorů na BK virovou reaktivaci v časném potransplantačním období – pilotní studie. *Aktuality v nefrologii*, 2013, **24**, No.1, s. 6-12. ISSN: 1210-955X.
- KREJČÍ, K. – ŽAMBOCH, K. – **ORSÁG**, J. – HRUBÝ, M. . – KLÍČOVÁ, A. – KOSATÍKOVÁ, Z. – ČERNÁ, M. – ZADRAŽIL, J. Pozdní ruptura lumbální artérie jako vzácná komplikace renální biopsie. *Aktuality v nefrologii*, 2014, **20**, No.1, s. 33. ISSN: 1210-955X.

g) Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

- **ORSÁG, J.** – MINAŘÍK, J. – KOSATÍKOVÁ, Z. – HRUBÝ, M – LOCHMAN, P – ŠČUDLA, V. – ZADRAŽIL, J. „High cut-off“ hemodialýza – nová možnost v terapii ledvinného selhání u mnohočetného myelomu. *Interní medicína pro praxi*, 2014, vol. 16, iss. 5, s. 192-195. ISSN: 1212-7299.
- PŘEČEK, J. – HUTYRA, M. – KOVÁČIK, F. – **ORSÁG, J.** – TÁBORSKÝ, M. Biomarkers of renal function in prognostic stratification of patients with acute coronary syndrome. *Cor et Vasa* [online]. Available online 29 June 2017, Dostupné z <<https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2017.05.018>>.

h) Kapitoly v monografiích:

- **ORSÁG, J.** Membranoproliferativní glomerulonefritida. In *Moderní farmakoterapie autoimunitních chorob*. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2015. Kapitola I Nefrologie, část 8, s. 68–75.

i) Publikovaná abstrakta

- **ORSÁG, Jiří** – VAVERKOVÁ, Helena – MINAŘÍK, Jiří – PIKA, Tomáš – BAČOVSKÝ, Jaroslav – ZAPLETALOVÁ, Jana – ŠČUDLA, Vlastimil. Hladiny lipidů u pacientů s monoklonální gamapatií nejistého významu. In *XVIII. kongres České internistické společnosti ČLS J.E. Purkyně – Praha, 25.-28. 9. 2011 (Sborník abstrakt)* [online]. Praha, 2011 [cit. 2012-08-28]. Sekce postery. Dostupné z <http://www.vnitrnilekarstvi.cz/online/E2011_11?confirm_rules=1>.
- **ORSÁG, Jiří** – PIKA, Tomáš – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – LOCHMAN, Pavel – ŽAMBOCH, Kamil – MINAŘÍK, Jiří – KLÍČOVÁ, Anna – ŠČUDLA, Vlastimil – ZADRAŽIL, Josef. „High cut-off“ hemodialýza – nová možnost v terapii ledvinného selhání u mnohočetného myelomu. In *XXXII. dny mladých internistů Olomouc*,

30.-31.5. 2013 (sborník abstrakt). *Vnitřní lékařství*, 2013; vol. 59, iss.5, 1P1-1P36. Olomouc, 2013.

- **ORSÁG**, Jiří. Cévní onemocnění ledvin. In *IX. interní medicína pro praxi, V. Olomouc kazuistická, konference ambulantních internistů a praktických lékařů 27.-28. března 2014. Abstrakta*. Interní medicína pro praxi, Solen, s.r.o., 2014, vol. 16, ISSN 1212-7299.
- **ORSÁG**, Jiří – ŠAFRÁNEK, Petr – METELKA, Rudolf – TURCSÁNYI, Peter – MAZÁNEK, Libor – ZELENÁ, Hana – PRUCEK, Lukáš – ZAHÁLKOVÁ, Jana – KREJČÍ, Karel – ŽAMBOCH, Kamil – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – ZADRAŽIL, Josef. Co skrývá vaše zahrádka? Aneb hantavirové infekce na Moravě (přednáškové sdělení). In *XXXIII.dni mladých internistov s medzinárodnou účasťou, 29.-30.5. 2014, Martin, Slovenská republika. Zborník abstrakt. Vnitřní lékařství 2014, vol. 60, iss. 5-6, Suppl 1, S3-S31. ISSN: 0042-773X*.
- **ORSÁG**, Jiří – PIKA, Tomáš – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – LOCHMAN, Pavel – ŽAMBOCH, Kamil – MINAŘÍK, Jiří – KLÍČOVÁ, Anna - ŠČUDLA, Vlastimil - ZADRAŽIL, Josef. „High cut-off“ hemodialýza v terapii ledvinného selhání u mnohočetného myelomu – první zkušenosti. In *35.kongres České nefrologické společnosti 25.-27. června 2014, Praha. Abstrakta. Aktuality v nefrologii, 2014, vol. 20, suppl. 1, s. 28. ISSN: 1210-955X*.
- **ORSÁG**, Jiří – FLODR, Patrik – MELTER, Oto – TKADLEC, Jan – NOVÁKOVÁ, Martina – ŠTERNBERSKÝ, Jan – HRUBÝ, Miroslav – KLÍČOVÁ, Anna – ŽAMBOCH, Kamil – KREJČÍ, Karel – ZADRAŽIL, Josef. „Trench wars – episode 2: Bartonella strikes back“ (přednáškové sdělení). In *XXXIV. dny mladých internistů, Olomouc, 4.-5.6.2015, Sborník abstrakt. Vnitřní lékařství, 2015, vol. 61, no. 6, suppl. 2, s.2S57. ISSN: 0042-773X*.
- **ORSÁG**, Jiří – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – HRUBÝ, Miroslav – PIKA, Tomáš – MINAŘÍK, Jiří – BAČOVSKÝ, Jaroslav – KRHOVSKÁ, Petra – LOCHMAN, Pavel – KREJČÍ, Karel – KLÍČOVÁ, Anna – ŽAMBOCH, Kamil – SCHUBERTOVÁ, Markéta – ŠČUDLA,

Vlastimil – ZADRAŽIL, Josef. Hemodialýza s použitím high cut-off membrán u renálního selhání při mnohočetném myelomu – tříleté zkušenosti jednoho centra. (posterové sdělení). In *36. kongres České nefrologické společnosti 6.-8. června 2016, Praha. Aktuality nefrologii, 2016, vol. 22, suppl. 1, s. 43-44. ISSN: 1210-955X.*

- **ORSÁG**, Jiří – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – HRUBÝ, Miroslav – PIKA, Tomáš – MINAŘÍK, Jiří – BAČOVSKÝ, Jaroslav – KRHOVSKÁ, Petra – LOCHMAN, Pavel – KREJČÍ, Karel – KLÍČOVÁ, Anna – ŽAMBOCH, Kamil – SCHUBERTOVÁ, Markéta – ŠČUDLA, Vlastimil – PAPAJÍK, Tomáš - ZADRAŽIL, Josef. Hemodialýza s použitím“ high cut-off“ membrán u renálního selhání při mnohočetném myelomu – tříleté zkušenosti. (přednáškové sdělení). In *XXXV. dny mladých internistů s mezinárodní účastí, 2.-3. Jún 2016, Martin, Slovenská republika. Interná medicína, 2016, vol. Z1, no. 16, s 16. ISSN: 1335-8359.*
- **ORSÁG**, Jiří – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – HRUBÝ, Miroslav – PIKA, Tomáš – MINAŘÍK, Jiří – BAČOVSKÝ, Jaroslav – KRHOVSKÁ, Petra – LOCHMAN, Pavel – KREJČÍ, Karel – ŽAMBOCH, Kamil – SCHUBERTOVÁ, Markéta – ŠČUDLA, Vlastimil – PAPAJÍK, Tomáš – ZADRAŽIL, Josef. Vliv „high cut-off“ hemodialýzy na reparaci renálního selhání při mnohočetném myelomu – zkušenosti 1 centra. In *XXXVI. dny mladých internistů, Olomouc, 1.-2.6. 2017. Sborník abstrakt. Vnitřní lékařství 2017, vol. 63, no. 5, suppl. 1, s. 1S26. ISSN 0042-773X.*
- **ORSÁG**, Jiří. Proteinurie a hematurie v ordinaci praktického lékaře. In *XV. kongres praktických lékařů, 27. – 28. 4. 2017, Olomouc, Clarion Congress Hotel, Olomouc. Medicína pro praxi, 2017, vol. 14, suppl. B, s. 24-25. ISBN 978-80-7471-190-9.*

j) Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech:

- **ORSÁG**, Jiří – VYMĚTAL, Jiří – FALTÝNEK, Ladislav – HRBEK, Jan – GEIEROVÁ, Marie. Myxom srdce – záludný tumor mnoha tváří. In *Sborník přednášek z III. ročníku Olomouc kazuistická, 8. listopadu 2012, Olomouc, NH Olomouc Congress*. Olomouc: Solen,s.r.o, 2012. ISBN 978-80-7471-011-7
- **ORSÁG**, Jiří – MELTER, Oto – FLODR, Patrik – ŠTERNBERSKÝ, Jan – KREJČÍ, Karel – HRUBÝ, Miroslav – KLÍČOVÁ, Anna – ZADRAŽIL, Josef. Bacilární angiomatóza způsobená Bartonella quintana u pacientky po transplantaci ledvin. In *26.Kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí, Brno, 24.-26. června 2013 (Program, abstrakta)*. Brno, 2013. s. 93.
- **ORSÁG**, Jiří – PIKA, Tomáš – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – ŽAMBOCH, Kamil – LOCHMAN, Pavel – HRUBÝ, Miroslav - ŠČUDLA, Vlastimil - ZADRAŽIL, Josef. Dialýza s použitím HCO membrán při selhání ledvin u mnohočetného myelomu – první zkušenosti. Přednáškové sdělení na XI. Pracovní konferenci na téma monoklonálních gamapatií, 16.10. 2012, Hradec Králové.
- **ORSÁG**, Jiří. Pacient s akutní poststreptokokovou glomerulonefritidou (přednáškové sdělení). 11. pracovní konference lékařů a sester III. interní kliniky-NRE, 2. listopadu 2012, Olomouc. Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP Olomouc.
- **ORSÁG**, Jiří. Dialyzační léčba s použitím HCO membrán u akutního selhání ledvin u mnohočetného myelomu (přednáškové sdělení). Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť Moravy a Slezska, 9.-10.11. 2012, Hotel Tennis Club Prostějov.
- **ORSÁG**, Jiří. Současné aspekty imunosupresivní terapie po transplantaci ledviny (přednáškové sdělení). Pracovní seminář regionálních ARO a HDS Transplantačního centra FN Olomouc, 19.4. 2013, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP Olomouc.

- **ORSÁG**, Jiří – ŠAFRÁNEK, Petr – METELKA, Rudolf – TURCSÁNYI, Peter – MAZÁNEK, Libor – ZELENÁ, Hana – PRUCEK, Lukáš – ZAHÁLKOVÁ, Jana – KREJČÍ, Karel – ŽAMBOCH, Kamil – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – ZADRAŽIL, Josef. Srdečné pozdravy z Koreje aneb hantavirové infekce na Moravě (přednáškové sdělení). XX. kongres České internistické společnosti ČLS JEP, 2.-5. října 2013, Kongresové centrum, Praha.
- **ORSÁG**, Jiří – FLODR, Patrik – MELTER, Oto – TKADLEC, Jan – NOVÁKOVÁ, Martina – ŠTERNBERSKÝ, Jan – HRUBÝ, Miroslav – KLÍČOVÁ, Anna – ŽAMBOCH, Kamil – KREJČÍ, Karel – ZADRAŽIL, Josef. Bacilární angiomatóza u pacientky po transplantaci ledviny (přednáškové sdělení). In *V. česko-slovenský transplantační kongres, 2.-4. října 2014, Olomouc*.
- **ORSÁG**, Jiří – FLODR, Patrik – MELTER, Oto – TKADLEC, Jan – NOVÁKOVÁ, Martina – ŠTERNBERSKÝ, Jan – HRUBÝ, Miroslav – KLÍČOVÁ, Anna – ŽAMBOCH, Kamil – KREJČÍ, Karel – ZADRAŽIL, Josef. Bacilární angiomatóza – nemoc imunosuprimovaných pacientů (posterové sdělení). In *XXI. kongres České internistické společnosti ČLS J.E.Purkyně, Brno, 15.-18.10.2014*.
- **ORSÁG**, Jiří – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – HRUBÝ, Miroslav – PIKA, Tomáš – MINAŘÍK, Jiří – LOCHMAN, Pavel – ŠČUDLA, Vlastimil – PAPAJÍK, Tomáš – ZADRAŽIL, Josef. Hemodialýza s použitím high cut-off membrán u renálního selhání při mnohočetném myelomu – zkušenosti 1 centra. In *XIV. pracovní konference na téma monoklonálních gamapatií, 13. října 2015, Hradec Králové. Výchovné centrum LF UK v areálu FN Hradec Králové*.
- **ORSÁG**, Jiří. Zkušenosti s léčbou myelomové ledviny (přednáškové sdělení). In *XV. Ostravský nefrologický den, 10. listopadu 2015, Ostrava. Domov sester FN Ostrava*.
- **ORSÁG**, Jiří. Tipy, triky a doporučení pro interpretaci laboratorních vyšetření (přednáškové sdělení). In *XXII. kongres České internistické společnosti ČLS J.E. Purkyně, 22.-25. listopadu 2015, blok pracovní skupiny Mladých internistů. Praha. Kongresové centrum Praha*.

- **ORSÁG, Jiří.** Kontrastová nefropatie-nemoc moderní doby (přednáškové sdělení). In *XIV. konference lékařů a sester III. interní kliniky, aktuality v nefrologii, revmatologii a diabetologii, 11.12.2015, blok I – nefrologie. Olomouc. NH Collection Olomouc Congress.*
- **ORSÁG, Jiří.** Novinky v hemoeliminační léčbě mnohočetného myelomu (přednáškové sdělení). In *Přednáškový večer spolku lékařů v Olomouci, 16.3. 2016, Teoretické ústavy LF UP v Olomouci.*
- **ORSÁG, Jiří.** Doporučení pro interpretaci laboratorních vyšetření. In *Kongres praktických lékařů SVL ČLS JEP, 10.-11. března 2016, Olomouc, Clarion Congress Hotel, Olomouc.*
- **ORSÁG, Jiří.** Léčebné přístupy k renální nedostatečnosti u nemocných s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem (přednáškové sdělení). In *12. moravské lymfomové symposium, 22.1. 2016, Clarion congress Hotel, Olomouc.*
- **ORSÁG, Jiří.** Monitorace hladin VLR v průběhu hemodialyzační léčby s použitím „high cut-off“ membrán u pacientů s renálním selháním při mnohočetném myelomu. In *Pracovní konference: Freelite & Hevylite 2016 Diagnostika z různých úhlů pohledu, Hotel Eroplán, Rožnov pod Radhoštěm, 2016.*
- **ORSÁG, Jiří.** Význam nálezů v moči v klinické nefrologii (přednáškové sdělení). In *XV. konference lékařů a sester III. interní kliniky, aktuality v nefrologii, revmatologii a diabetologii, 7.10.2016, Olomouc, Clarion Congress Hotel Olomouc.*
- **ORSÁG, Jiří.** Novel anticoagulans in CKD patients – where we are? (přednáškové sdělení). In *17th Prague postgraduate training course in nephrology. Pitfalls of pharmacotherapy in chronic kidney disease. 20.-21.1. 2017, Praha. Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM), Praha.*
- **ORSÁG, Jiří – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – HRUBÝ, Miroslav – PIKA, Tomáš – MINAŘÍK, Jiří – BAČOVSKÝ, Jaroslav – KRHOVSKÁ, Petra – LOCHMAN, Pavel – KREJČÍ, Karel – KLÍČOVÁ, Anna – ŽAMBOCH, Kamil – SCHUBERTOVÁ, Markéta – ŠČUDLA, Vlastimil – PAPAŽÍK, Tomáš – ZADRAŽIL, Josef.** „High cut-off“

hemodialýza u renálního selhání při mnohočetném myelomu – 3leté zkušenosti. In *XXIII. kongres České internistické společnosti ČLS J.E.Purkyně, 21.-24.9.2016, Brno, Brněnské výstaviště, Pavilon E.*

- **ORSÁG, Jiří – KREJČÍ, Karel – HRUBÝ, Miroslav – KOSATÍKOVÁ, Zdenka – ŽAMBOCH, Kamil – KLÍČOVÁ, Anna – SCHUBERTOVÁ, Markéta – ZADRAŽIL, Josef – BACHLEDA, Petr.** Když dva dělají totéž aneb individualita transplantovaných pacientů (přednáškové sdělení). In *VI. český transplantační kongres, 31. října – 1. listopadu 2016, Brno, Hotel Continental.*
- **ORSÁG, Jiří – KREJČÍ, Karel – ZADRAŽIL, Josef – BACHLEDA, Petr – KLOS, Dušan – LOVEČEK, Martin – SKALICKÝ, Pavel – HAVLÍK, Roman – DOBEŠ, Oldřich – UVÍZL, Radovan.** Akutní pankreatitida po transplantaci ledviny (přednáškové sdělení). In *VI. český transplantační kongres, 31. října – 1. listopadu 2016, Brno, Hotel Continental.*
- **ORSÁG, Jiří.** NOACs z pohledu nefrologa (přednáškové sdělení). In *I vaši pacienti si NOACs zaslouží – odborný seminář, 16.5.2017, INNEF a.s., Tř. kpt. Jaroše 25, Brno.*
- **ORSÁG, Jiří.** Hantavírózy aneb co skrývá vaše zahrádka (přednáškové sdělení). In *Vliv zoonóz na zdraví člověka – odborný seminář, 7.11. 2017, Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČSL JEP, Praha, Lékařský dům I.P.Pavlova, Praha.*
- **ORSÁG, Jiří.** Tipy a triky v hodnocení laboratorních vyšetření 3 (přednáškové sdělení). In *XXIV. kongres České internistické společnosti ČLS J.E. Purkyně, 29.10. – 1.11. 2017, Praha. Kongresové centrum Praha.*
- **ORSÁG, Jiří.** Mozaika nefrologie pro atestaci i praxi (přednáškové sdělení). In *Seminář k atestačním otázkám pro mladé internisty, 14.12.2017, Praha, Autoklub ČR.*
- **ORSÁG, Jiří.** Antikoagulovaný pacient z pohledu nefrologa. In *XIII. interní medicína pro praxi, IX. Olomouc kazuistická – konference ambulantních internistů, 15.- 16. března 2018, Olomouc. Clarion Congress Hotel Olomouc.*

- **ORSÁG**, Jiří. Tipy a triky v hodnocení laboratorních vyšetření. In *XII. Kongres internej medicíny, 14. 6. – 16.6. 2018, Horný Smokovec, Vysoké Tatry, Slovenská republika, Grand Hotel Bellevue.*

PŘÍLOHY

Kopie publikovaných článků se vztahem k disertační práci

1. KARASEK, D. – VAVERKOVA, H. – FRYSÁK, Z. – **ORSAG, J.** – NOVOTNY, D. – HALENKA, M. – SLAVIK, L. Relationship between serum adipocyte fatty acid-binding protein and endothelial/hemostatic markers in dyslipidemic subjects. *Neuroendocrinology Letters*, 2012, **33**, Suppl. 2, 26-31. ISSN: 0172-780X. IF (2012) 0.932
2. NOVOTNY, D. – VAVERKOVA, H. – KARASEK, D. – LUKES, J. – SLAVIK, L. – MALINA, P. – **ORSAG, J.** Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. *Physiological Research*, 2014, **63**, 219-228. ISSN: 0862-8408. IF (2013/2014) 1.487
3. **ORSAG, J.** – KARASEK, D. – HALENKA, M. – VAVERKOVA, H. – SPURNA, J. – KUBICKOVA, V. – LUKES, J. – ZADRAZIL, J. Association of serum adipocyte fatty acid-binding protein and apolipoprotein B /apolipoprotein A1 ratio with intima media thickness of common carotid artery in dyslipidemic patients. – v recenzním řízení v *Biomedical Papers (Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech repub)*.
4. **ORSAG, J.** – KARASEK, D. – KRŠKOVÁ, M. – HALENKA, M. – VAVERKOVA, H. – GAJDOVA, J. – NOVOTNY, D. – LUKES, J. The relationship of serum fibroblast growth factor 21 levels to intima-media thickness in dyslipidemic patients. *Journal of Disease Markers* [online], 2014, **1**(3), id. 1012 . Dostupné z < <http://austinpublishinggroup.com/disease-markers/all-issues.php> > . ISSN: 2380-0682.
5. NOVOTNY, D. – KARASEK, D. – VAVERKOVA, H. – **ORSAG, J.** – KUBICKOVA, V. Fibroblast growth factor 21 and endothelial/hemostatic markers in dyslipidemic subjects. *Austin Journal of Cardiovascular Disease and Atherosclerosis* [online], 2014, **1**(2), id.1008. Dostupné z < <http://austinpublishinggroup.com/cardiovascular-diseases/fulltext/ajcd-v1-id1008.php>>.

Relationship between serum adipocyte fatty acid-binding protein and endothelial/hemostatic markers in dyslipidemic subjects

David KARASEK¹, Helena VAVERKOVA¹, Zdenek FRYSAK¹, Jiri ORSAG¹, Dalibor NOVOTNY², Milan HALENKA¹, Ludek SLAVIK³

¹ 3rd Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry UP Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

² Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc, Czech Republic

³ Department of Hematooncology, University Hospital Olomouc, Czech Republic

Correspondence to: Assoc. Prof. David Karasek, MD., PhD.
3rd Department of Internal Medicine,
Faculty of Medicine and Dentistry UP Olomouc and University Hospital Olomouc,
I.P.Pavlova 6, Olomouc 77520, Czech Republic.
TEL: +420585853381; FAX: +420585852526; E-MAIL: david.karasek@fnol.cz

Submitted: 2012-10-15 *Accepted:* 2012-11-12 *Published online:* 2012-11-25

Key words: **adipocyte fatty acid-binding protein; von Willebrand factor; plasminogen activator inhibitor-1; tissue-plasminogen activator; adhesion molecules; dyslipidemia**

Neuroendocrinol Lett 2012; 33(Suppl.2):26-31 PMID: 23183506 NEL330812A06 © 2012 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

Abstract

OBJECTIVES: Some findings support the role of serum adipocyte fatty acid-binding protein (A-FABP) as a key pro-inflammatory mediator that links obesity with cardiovascular diseases. The aim of the study was to evaluate the association of A-FABP with endothelial/hemostatic markers [von Willebrand factor (vWF), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), tissue-plasminogen activator (t-PA), soluble intercellular cell adhesion molecule-1 (s-ICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (s-VCAM-1)] in asymptomatic dyslipidemic subjects.

DESIGN: We examined 105 dyslipidemic patients (with apolipoprotein B concentration ≥ 1.2 g/l and/or triglyceride (TG) concentration ≥ 1.5 mmol/l) without clinical manifestation of atherosclerosis and 50 normolipidemic healthy subjects, who served as a control group. Except of endothelial/hemostatic markers, anthropometric and lipid parameters, markers of insulin resistance and inflammation were assessed.

RESULTS: In dyslipidemic patients, A-FABP positively correlated with age ($p < 0.05$), TG ($p < 0.05$), insulin ($p < 0.05$), homeostatic model assessment (HOMA) index ($p < 0.05$), body mass index ($p < 0.001$), waist circumference ($p < 0.05$), high sensitivity C reactive protein ($p < 0.01$), and vWF ($p < 0.05$) and negatively with male gender ($p < 0.05$). There were no correlations between A-FABP and PAI-1, t-PA, s-VCAM-1 or s-ICAM-1. By using linear multivariate regression analysis the positive association between A-FABP and vWF was independent of age, gender, insulin resistance, and visceral obesity.

CONCLUSION: Study displayed an independent positive association of A-FABP with vWF in clinically asymptomatic dyslipidemic subjects. Contribution of A-FABP in the process of endothelial dysfunction could help to explain the role of obesity in cardiovascular damage.

Abbreviations:

Apo	- apolipoprotein
A-FABP	- adipocyte fatty acid-binding protein
BMI	- body mass index
DBP	- diastolic blood pressure
ELISA	- enzyme-linked immunosorbent assay
HDL-C	- high density lipoprotein cholesterol
HOMA	- homeostasis model assessment
hs-CRP	- high sensitivity C-reactive protein
JNK	- C-Jun N-terminal kinases
LDL-C	- low density lipoprotein cholesterol
MCP-1	- monocyte chemo attractant protein-1
NFκB	- nuclear factor kappa B
PAI-1	- plasminogen activator inhibitor-1
SBP	- systolic blood pressure
s-ICAM-1	- soluble intercellular adhesion molecule
s-VCAM-1	- soluble vascular cell adhesion molecule
TC	- total cholesterol
TG	- triglycerides
TNF-α	- tumor necrosis factor-α
t-PA	- tissue-plasminogen activator
vWF	- von Willebrand factor

INTRODUCTION

Adipocyte fatty acid-binding protein (A-FABP) is expressed in adipocytes, macrophages and lymphocytes (Xu & Vanhoute 2012). In adipocytes, A-FABP regulates fatty acid storage and lipolysis. Its putative function is to serve as a lipid-binding chaperone for fatty acids (Hoo *et al.* 2008). In macrophages, A-FABP probably regulates central molecular pathways to coordinate macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity (Makowski *et al.* 2005). It integrates metabolic and immune responses and links the inflammatory and lipid-mediated pathways that are critical in the metabolic syndrome, for which some authors suggest A-FABP as a central mediator of obesity-related cardiovascular diseases (Xu & Vanhoute 2012).

Clinical investigations and animal models identify A-FABP as a factor associated with insulin resistance, adverse lipid profiles – including increased serum triglyceride (TG), LDL-cholesterol (LDL-C) and decreased HDL-cholesterol (HDL-C), hyperglycemia, obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, hypertension, and also with the development of atherosclerosis (Horakova *et al.* 2011; Hsu *et al.* 2010; Tso *et al.* 2007; Xu *et al.* 2006; Xu *et al.* 2007; Xu & Vanhoute 2012). A-FABP positively correlates with coronary artery disease (Bao *et al.* 2011; Doi *et al.* 2011; Hsu *et al.* 2010; Miyoshi *et al.* 2010; Rhee *et al.* 2009) and ischemic stroke (Tso *et al.* 2011). Serum levels of A-FABP are associated with carotid (Yeung *et al.* 2007) and femoral (Xiao *et al.* 2010) intima-media thickness and with impaired endothelium-dependent vasodilatation (Xiao *et al.* 2010). The pro-atherogenic effect of A-FABP is probably mediated by vascular inflammation. The plasma concentration of A-FABP correlates positively with several pro-inflammatory markers, such as high sensitivity C reactive protein (hs-CRP), tumor necrosis factor-α (TNF-α), monocyte chemo attractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-6 (Horakova *et al.* 2011; Park *et al.* 2012; Xu *et al.* 2007; Xu

& Vanhoute 2012). These findings also support the role of A-FABP as a key pro-inflammatory mediator that links obesity with cardiovascular damage.

Endothelial dysfunction and atherothrombosis play important roles in atherogenesis. Some serum markers of endothelial dysfunction and/or hemostasis have been shown to predict the development of cardiovascular events in addition to conventional risk factors (Smith *et al.* 2005). There is increasing evidence that endothelial dysfunction is closely associated with insulin resistance accompanying obesity and some types of dyslipidemias (Garanty-Bogacka *et al.* 2005; Karasek *et al.* 2011a and 2011b). Thus, we could suggest that pro-inflammatory effect of A-FABP on artery wall leads to vascular damage detected by serum elevation of the corresponding markers.

The aim of this study was to evaluate the relationship between A-FABP and markers of hemostasis and endothelial dysfunction: von Willebrand factor (vWF), tissue-plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), soluble vascular cell adhesion molecule-1 (s-VCAM-1), and soluble intercellular adhesion molecule-1 (s-ICAM-1) in a high risk population of dyslipidemic subjects without clinical manifestation of atherosclerosis.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out as a cross-sectional study with "lipid-modifying drug naive" asymptomatic patients, their affected relatives, spouses and healthy volunteers. All subjects filled in a questionnaire about their previous medical history, especially the cardiovascular status, medication, and smoking habits. Body mass index (BMI), waist circumference, systolic and diastolic blood pressure (SBP, DBP) were determined. Exclusion criteria were: diabetes mellitus, hypothyroidism, hepatic or renal impairment and nephrotic syndrome (causes of secondary hyperlipidemia); history of clinically manifesting atherosclerosis (coronary artery disease, cerebrovascular ischemic disease and peripheral arterial disease); hypolipidemic therapy in the previous 8 weeks; hormone therapy with estrogens; and clinical presence of acute infectious disease or trauma. The study was reviewed and approved by the institutional Ethics Committee of Medical Faculty and University Hospital Olomouc and informed consent was obtained from all participants.

Individuals who met the above-mentioned criteria (155 subjects, 74 men and 81 women) were divided into two groups: 105 hyperlipidemic patients (males/females: 53/52, mean age: 45.0±13.4 years) and 50 normolipidemic healthy subjects (males/females: 21/29, mean age: 45.2±16.9 years) who served as a control group. Hyperlipidemic subjects were defined as those with serum triglycerides (TG) concentration ≥1.5 mmol/l and/or apolipoprotein B (apoB) concentration ≥1.2 g/l. The value for TG was chosen because small dense LDL

particles become common above this level (Campos *et al.* 1992), the value for apoB was chosen because it is a level from which cardiovascular risk rapidly increases (Demacker *et al.* 2000).

Biochemical analyses

Venous blood samples were drawn in the morning after a 12-h fasting period. Total cholesterol, TG and HDL-C were determined enzymatically on Modular SWA analyzer (Roche, Basel, Switzerland) using commercially available kits (Roche, Basel, Switzerland).

Tab. 1. Basic characteristics.

	NL (n=50)	DL (n=105)
Age (years)	45.2±17.0	45.0±13.5
TC (mmol/l)	5.61±0.88	7.28±1.73***
TG [†] (mmol/l)	1.05 [0.83-1.21]	2.58 [1.73-4.16]***
HDL-C (mmol/l)	1.68±0.5	1.26±0.38***
LDL-C (mmol/l)	3.47±0.78	4.27±1.53***
non-HDL-C (mmol/l)	3.94±0.81	5.99±1.76***
apoB (g/l)	0.91±0.18	1.30±0.32***
fasting glycemia (mmol)	5.08±0.58	5.48±1.1*
Insulin [†] (mIU/l)	6.9 [4.7-11.3]	9.0 [7.1-12.5]*
HOMA [†] (mIU*mmol/l ²)	1.57 [0.97-2.6]	2.18 [1.57-3.16]*
SBP (mm Hg)	129.7±14.6	129.6±15.3
DBP (mm Hg)	79.2±9.3	78.9±8.9
BMI (kg/m ²)	25.5±4.7	27.4±4.6*
waist circumference (cm)	85.2±14.7	93.8±13.9*
hs-CRP [†] (mg/l)	1.0 [0.5-2.2]	1.9 [0.8-3.7]*
vWF (%)	123.5±52.1	134.7±52.3
t-PA [†] (µg/l)	3.0 [2.0-3.5]	3.0 [2.1-4.2]
PAI-1 [†] (µg/l)	40.0 [29.5-74.5]	63.5 [34.3-94.1]*
s-ICAM-1 [†] (µg/l)	327 [240-473]	346 [280-475]
s-VCAM-1 [†] (µg/l)	697 [488-867]	651 [418-871]
A-FABP [†] (µg/l)	21.7 [15.0-31.3]	23.3 [16.1-34.3]

NL = normolipidemic controls, DL = dyslipidemic subjects (apoB ≥ 1.2 g/l and/or TG ≥ 1.5 mmol/l), TC = total cholesterol, TG = triglycerides, HDL-C = HDL cholesterol, LDL-C = LDL cholesterol, non-HDL-C = non-HDL cholesterol (TC - HDL-C), apoB = apolipoprotein B, HOMA = homeostasis model assessment, SBP = systolic blood pressure, DBP = diastolic blood pressure, BMI = body mass index, hs-CRP = high sensitivity C reactive protein, vWF = von Willebrand factor, t-PA = tissue-plasminogen activator, PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1, s-ICAM-1 = soluble intercellular cell adhesion molecule-1, s-VCAM-1 = soluble vascular cell adhesion molecule-1, A-FABP = serum adipocyte fatty acid-binding protein. Values are expressed as mean ± standard deviation, for [†] (parameters with skewed distribution) as median [25 and 75 percentiles]. Differences in variables between groups were analyzed with ANOVA after adjustment for age and sex. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 ... statistical significance level

Determination of HDL-C was made by a direct method without precipitation of apoB containing lipoproteins. LDL-C levels were calculated according to the Friedewald formula (for TG < 4.5 mmol/l). We also calculated non-HDL-cholesterol (non-HDL-C = TC - HDL-C). Concentration of apoB was determined immunoturbidimetrically (TinaQuant Apo B kit, Roche, Basel, Switzerland). A-FABP was determined in serum by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) according to the manufacturer's instructions (BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Brno, Czech Republic). Hs-CRP was assessed by means of an ultra sensitive latex immunoturbidimetric method (CRP latex TinaQuant kit, Roche, Basel, Switzerland). Glycemia was determined by enzymatic-colorimetric method (Glucose GOD-PAP kit, Roche, Basel, Switzerland). Insulin was determined using commercially available kit (Immunotech, Marseille, France) using specific antibodies by immunoradiometric assay method. The result obtained was then used for the calculation of the parameter of insulin resistance HOMA [homeostasis model assessment index (Matthews *et al.* 1985): fasting glycemia (mmol/l), fasting insulin (mIU/l)/22.5]. Serum levels of the soluble adhesion molecules s-ICAM-1 and s-VCAM-1 were measured by immunoenzymatic assay using standard kits (both Immunotech, Marseille, France). The following endothelial/hemostatic markers were examined: von Willebrand factor by immunoturbidimetric assay (Instrumentation Laboratory Spa, Milan, Italy), plasminogen activator inhibitor-1 and tissue plasminogen activator by ELISA (both Technoclone, Vienna, Austria).

Statistical analysis

All values are expressed as means ± standard deviation or as median with 25 and 75 percentiles for variables with non-normal distribution. The Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normal distribution. Variables with skewed distribution (TG, insulin, HOMA, hs-CRP, t-PA, PAI-1, sICAM-1, sVCAM-1, A-FABP) were log transformed to normalize their distribution before statistical testing. Differences in variables between individual groups were analyzed with ANOVA after the adjustment for age and sex. The correlation between individual parameters was tested by a univariate correlation analysis. Multivariate regression analysis was used for testing of an independent association between dependent and independent variables. Statistical analyses were performed by using SPSS for Windows version 12.0 (Chicago, IL, USA). Probability values of p<0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Basic characteristics of the investigated groups are summarized in Table 1. Compared to normolipidemic controls, dyslipidemic patients had significantly higher insulin levels, fasting glycaemia, HOMA, BMI, waist

circumference, levels of PAI-1 and of hs-CRP. There were no significant differences in vWF, t-PA, s-ICAM-1, s-VCAM-1 and A-FABP levels. Levels of A-FABP correlated positively with age ($r=0.252, p<0.05$), TG ($r=0.368, p<0.001$), insulin ($r=0.229, p<0.05$), HOMA ($r=0.238, p<0.05$), BMI ($r=0.481, p<0.001$), waist circumference ($r=0.233, p<0.05$), hs-CRP ($r=0.279, p<0.01$) and vWF ($r=0.214, p<0.05$), and negatively with male gender ($r=-0.252, p<0.05$) in dyslipidemic subjects. In normolipidemic controls, A-FABP positively correlated with TG ($r=0.311, p<0.05$), insulin ($r=0.561, p<0.001$), HOMA ($r=0.571, p<0.001$), BMI ($r=0.437, p<0.01$) and negatively with HDL-C ($r=-0.324, p<0.05$). By using linear multivariate regression analysis A-FABP was independently associated with gender, BMI, and vWF in dyslipidemic subjects – see table 2, and with BMI (beta=0.43, $t=3.62, p<0.001$) and insulin (beta=0.62, $t=2.99, p<0.001$) in normolipidemic controls.

DISCUSSION

The presented study did not reveal significantly increased levels of A-FABP in asymptomatic dyslipidemic patients compared to normolipidemic controls. A-FABP did not correlate with total cholesterol, LDL-C, HDL-C, non-HDL-C or apoB. But, except of age and gender, A-FABP correlated with TG, markers of insulin resistance, visceral obesity and inflammation.

These findings confirm the key contribution of obesity and insulin resistance in serum increase of A-FABP and some authors suggest A-FABP as a marker for adiposity (Park *et al.* 2012; Xu *et al.* 2006). The positive association of A-FABP with TG levels was not independent in the present study. It might have been caused by adiposity and insulin resistance leading to elevation of TG levels. Nevertheless, some authors suppose the direct role of A-FABP in the increase of TG concentration. A-FABP could serve as a regulator of the liver X receptor ATP-binding cassette transporter A1, which might stimulate the transfer of TG to HDL and catabolism of TG (Park *et al.* 2012).

We found a positive correlation between A-FABP and hs-CRP levels. Recent studies have also reported similar results (Bao *et al.* 2011; Horakova *et al.* 2011; Miyoshi *et al.* 2010; Park *et al.* 2012; Xu *et al.* 2007). Furthermore, A-FABP was also positively associated with other inflammatory cytokines such as MCP-1 and TNF- α , even after adjusting for adiposity (Park *et al.* 2012). This pointed to A-FABP as a pro-inflammatory mediator, connecting insulin resistant states with systemic inflammation. The precise mechanism, whereby A-FABP modulates inflammation, remains unclear. Recently, A-FABP was reported to potentiate vascular inflammation by forming a positive feedback loop with C-Jun N-terminal kinases (JNK) and activator protein-1 to exacerbate lipopolysaccharide induced inflammatory responses in macrophages (Hui *et al.* 2010). Activated JNK increases A-FABP expression by enhancing gene

transcription and conversely, elevated A-FABP potentiates JNK activation leading to augmented production of pro-inflammatory cytokines (Hui *et al.* 2010; Xu & Vanhoute 2012).

From the endothelial/hemostatic markers, only vWF positively correlated with A-FABP in dyslipidemic patients and this relation was independent of other metabolic factors, age, gender, and BMI. As we know, the positive independent association between serum levels of A-FABP and vWF has not been reported yet and the plausible explanation of this finding remains unclear. This factor is produced almost exclusively by vascular endothelial cells activated by pro-inflammatory cytokines. Plasma levels of vWF are elevated in different states of endothelial damage and they have been proposed as a useful marker of endothelial dysfunction (Makin *et al.* 2004). In patients with acute coronary syndrome, vWF correlated significantly with circulating endothelial cells – a marker of endothelial damage (Lee *et al.* 2005). The role of A-FABP as a factor causing endothelial dysfunction was verified by impaired endothelium-dependent vasodilatation in animal and human studies (Lee *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2010). A specific inhibitor of A-FABP improved endothelium dependent relaxations by endothelial nitric oxide synthase phosphorylation leading to increased nitric oxide production. Lee *et al.* found the co-localization of A-FABP and vWF in the endothelial layer of apoE^{-/-} mice (Lee *et al.* 2011). In a human study, Agardh *et al.* (2011) identified A-FABP in carotid plaques. Moreover, this expression of A-FABP was increased in unstable plaques and there was a co-localization of A-FABP and macrophage population indicating A-FABP as a key factor connecting vascular inflammation and cellular

Tab. 2. Multivariate regression analysis of the relations between A-FABP as dependent variable and correlated parameters as independent predictors in dyslipidemic group.

	Beta	t	p-value
age	0.07353	1.32655	n.s.
gender	-0.09485	-2.89502	0.006
TG (log)	0.00637	0.16525	n.s.
CRP (log)	0.00398	0.19876	n.s.
Insulin (log)	0.30240	1.87779	n.s.
HOMA (log)	-0.08941	-1.24498	n.s.
BMI	0.52517	3.36664	0.002
waist circumference	0.10472	0.46511	n.s.
vWF	0.14483	3.27170	0.002

TG = triglycerides, hs-CRP = high sensitivity C reactive protein, HOMA = homeostasis model assessment, BMI = body mass index, vWF = von Willebrand factor
Parameters with skewed distribution (TG, hs-CRP, insulin, HOMA, A-FABP) were log transformed to normalize their distribution before statistical analysis

lipid accumulation. A-FABP can activate both JNK and nuclear factor kappa B (NF κ B) pathways, which regulate the transcriptional activity of inflammatory genes (Makowski *et al.* 2005). This involvement of A-FABP in inflammatory reactions by the activation of the NF κ B pathway may result in increased oxidative stress and decreased nitric oxide bioavailability, leading to endothelial dysfunction (Pierce *et al.* 2009). The activation of NF κ B pathway could also be a cause of the overexpression of vWF, as was shown in endothelial injury induced by sepsis (Liang *et al.* 2010).

It remains unclear – why A-FABP did not correlate with other endothelial/hemostatic markers investigated in the presented study. PAI-1 is probably less specific for endothelial damage than vWF. PAI-1 originates from several sites, including the endothelium, liver and adipose tissue (Kohler & Grant 2000). Thus, higher levels of PAI-1 detected in dyslipidemic subjects may not reflect only endothelial dysfunction, but they could also be caused by increased production of PAI-1 in the liver or in adipose tissue by a mechanism independent of A-FABP. The production of PAI-1 is connected with t-PA levels, because most of the assessed t-PA antigen in blood is a part of an inactive circulating complex with PAI-1 (Karasek *et al.* 2011a). While VCAM-1 is expressed locally in the endothelium overlying sites of atherosclerotic lesion formation, the expression of ICAM-1 is not restricted only to the endothelium, since it can also be found on macrophages, smooth muscle cells, fibroblasts and hematopoietic cells (Galkina & Ley 2007). In addition, we could expect NF κ B pathway activation by A-FABP leading to VCAM- and ICAM-1 expression (Kawakami *et al.* 2006). However, soluble forms of these adhesion molecules may not reflect their initial endothelial overexpression in clinically asymptomatic dyslipidemic patients. Especially the levels of s-VCAM-1 are increased (and predicting a risk for future coronary events) only in patients with manifest atherosclerosis. In contrast, s-ICAM-1 appears to be a marker of a more general inflammatory condition and it may be predictive also in healthy people (Blankenberg *et al.* 2003; Karasek *et al.* 2011b). Moreover, various hemostatic/endothelial markers are probably regulated differently and may represent a different type or severity of endothelial dysfunction. The other reasons and the concurrent limitation of the study may be the small number of patients (105 dyslipidemic patients and 50 normolipidemic controls) and the heterogeneity of dyslipidemic group, a significant increase of A-FABP was detected mostly in subjects with metabolic syndrome (Horakova *et al.* 2011; Hsu *et al.* 2010; Tso *et al.* 2007; Xu *et al.* 2006; Xu *et al.* 2007). Another examinations especially testing microcirculation endothelial function are needed to clarify the importance of A-FABP in an initial step of endothelial dysfunction and during the whole process of atherogenesis.

The presented study found independent positive association of A-FABP with vWF in clinically asymp-

tomatic dyslipidemic subjects. This association could participate in explaining of the role of A-FABP in the process of endothelial dysfunction. Further studies are necessary to elucidate the contribution of A-FABP in atherogenesis.

ACKNOWLEDGEMENT

Supported by grant IGA MZCR NS/10284 and LF_2012_016.

REFERENCES

- 1 Agardh HE, Folkersen L, Ekstrand J, Marcus D, Swedenborg J, Hedin U, *et al.* (2011). Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. *J Intern Med.* **269**: 200–210.
- 2 Bao Y, Lu Z, Zhou M, Li H, Wang Y, Gao M, *et al.* (2011). Serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein are associated with the severity of coronary artery disease in Chinese women. *PLoS One.* **6**: e19115.
- 3 Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* **170**: 191–203.
- 4 Campos H, Blijlevens E, McNamara JR, Ordovas JM, Posner BM, Wilson PW, *et al.* (1992). LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb.* **12**: 1410–1419.
- 5 Demacker PN, Veerkamp MJ, Bredie SJ, Marcovina SM, de Graaf J, Stalenhoef AF (2000). Comparison of the measurement of lipids and lipoproteins versus assay of apolipoprotein B for estimation of coronary heart disease risk: a study in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* **153**: 483–490.
- 6 Doi M, Miyoshi T, Hirohata S, Nakamura K, Usui S, Takeda K, *et al.* (2011). Association of increased plasma adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in non-elderly men. *Cardiovasc Diabetol.* **10**: 44.
- 7 Galkina E, Ley K (2007). Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **27**: 2292–2301.
- 8 Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Syrenicz A, Gebala A, Walczak M (2005). Relation of acute-phase reaction and endothelial activation to insulin resistance and adiposity in obese children and adolescents. *Neuro Endocrinol Lett.* **26**: 473–479.
- 9 Hoo RC, Yeung CY, Lam KS, Xu A (2008). Inflammatory biomarkers associated with obesity and insulin resistance: a focus on lipocalin-2 and adipocyte fatty acid-binding protein. *Expert Rev Endocrinol Metab.* **3**: 29–41.
- 10 Horakova D, Pastucha D, Stejskal D, Kollarova H, Azeem K, Janout V (2011). Adipocyte Fatty Acid binding protein and C-reactive protein levels as indicators of insulin resistance development. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **155**: 355–359.
- 11 Hsu BG, Chen YC, Lee RP, Lee CC, Lee CJ, Wang JH (2010). Fasting serum level of fatty-acid-binding protein 4 positively correlates with metabolic syndrome in patients with coronary artery disease. *Circ J.* **74**: 327–331.
- 12 Hui X, Li H, Zhou Z, Lam KS, Xiao Y, Wu D, *et al.* (2010). Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH2-terminal kinases and activator protein-1. *J Biol Chem.* **285**: 10273–10280.
- 13 Karasek D, Vaverkova H, Halenka M, Jackullakova D, Frysak Z, Slavik L, *et al.* (2011a). Prothrombotic markers in asymptomatic dyslipidemic subjects. *J Thromb Thrombolysis.* **31**: 27–36.
- 14 Karasek D, Vaverkova H, Frysak Z, Halenka M, Jackullakova D, Novotny D, *et al.* (2011b). Soluble intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in asymptomatic dyslipidemic subjects. *Int Angiol.* **30**: 441–450.

- 15 Kawakami A, Aikawa M, Alcaide P, Luschniska FW, Libby P, Sacks FM (2006). Apolipoprotein CIII induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells and increases adhesion of monocytic cells. *Circulation*. **114**: 681–687.
- 16 Kohler HP, Grant PJ (2000). Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med*. **342**: 1792–1801.
- 17 Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD (2005). Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood*. **105**: 526–532.
- 18 Lee MY, Li H, Xiao Y, Zhou Z, Xu A, Vanhoutte PM (2011). Chronic administration of BMS309403 improves endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice and in cultured human endothelial cells. *Br J Pharmacol*. **162**: 1564–1576.
- 19 Liang YJ, Ma XC, Li X (2010). The role of p38 mitogen-activated protein kinase/nuclear factor- κ B transduction pathway on coagulation disorders due to endothelial injury induced by sepsis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. **22**: 528–532.
- 20 Makin AJ, Blann AD, Chung NA, Silverman SH, Lip GY (2004). Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J*. **25**: 371–376.
- 21 Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS (2005). The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and κ B kinase activities. *J Biol Chem*. **280**: 12888–12895.
- 22 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. **28**: 412–419.
- 23 Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, Hirohata S, Usui S, Hina K, et al (2010). Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis*. **211**: 164–169.
- 24 Park SE, Rhee EJ, Lee WY, Kim WJ, Yoo SH, Bae JC, et al (2012). The role of serum adipocyte fatty acid-binding protein on the development of metabolic syndrome is independent of pro-inflammatory cytokines. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. **22**: 525–532.
- 25 Pierce GL, Lesniewski LA, Lawson BR, Beske SD, Seals DR (2009). Nuclear factor- κ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation*. **119**: 1284–1292.
- 26 Rhee EJ, Lee WY, Park CY, Oh KW, Kim BJ, Sung KC, et al (2009). The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *Eur J Endocrinol*. **160**: 165–172.
- 27 Smith A, Patterson C, Yarnell J, Rumley A, Ben-Shlomo Y, Lowe G (2005). Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study. *Circulation*. **112**: 3080–3087.
- 28 Tso AW, Lam TK, Xu A, Yiu KH, Tse HF, Li LS, et al (2011). Serum adipocyte fatty acid-binding protein associated with ischemic stroke and early death. *Neurology*. **76**: 1968–1975.
- 29 Tso AW, Xu A, Sham PC, Wat NM, Wang Y, Fong CH, et al (2007). Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care*. **30**: 2667–2672.
- 30 Xiao Y, Yao L, Li X, Zhong H, Chen XY, Tang WL, et al (2010). Relationship of adipocyte fatty acid-binding protein to adiponectin ratio with femoral intima-media thickness and endothelium-dependent vasodilation in patients with newly-diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. **90**: 231–235.
- 31 Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, et al (2007). Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation*. **115**: 1537–1543.
- 32 Xu A, Vanhoutte PM (2012). Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **302**: H1231–H1240.
- 33 Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, et al (2006). Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem*. **52**: 405–413.
- 34 Yeung DC, Xu A, Cheung CW, Wat NM, Yau MH, Fong CH, et al (2007). Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **27**: 1796–1802.

Evaluation of Total Adiponectin, Adipocyte Fatty Acid Binding Protein and Fibroblast Growth Factor 21 Levels in Individuals With Metabolic Syndrome

D. NOVOTNÝ¹, H. VAVERKOVA², D. KARASEK², J. LUKES¹, L. SLAVIK³, P. MALINA⁴, J. ORSAG²

¹Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic, ²Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic, ³Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic, ⁴Department of Clinical Biochemistry, Hospital Pisek, Pisek, Czech Republic

Received June 27, 2013

Accepted November 21, 2013

On-line January 8, 2014

Summary

Although many studies have investigated the relationships of several adipokines to metabolic syndrome (MetS), the interrelationships of adiponectin (ADP), adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) and fibroblast growth factor 21 (FGF 21) have not been described in detail. We examined 209 asymptomatic dyslipidemic patients divided into MetS+ (n=73) and MetS- (n=136) groups. The aim of study was to evaluate the relationships between observed adipokines, to compare the levels of total ADP, A-FABP and FGF 21 in individuals with and without MetS, and to elucidate the relationships of individual adipokines to lipid parameters, markers of insulin resistance and endothelial hemostatic markers in these groups. In MetS+ group, we found the independent positive association ADP with A-FABP (beta=0.4888, p=0.0382), A-FABP with FGF 21 (beta=0.3811, p=0.0002) and von Willebrand factor (beta=0.4502, p=0.0013), and FGF 21 with A-FABP (beta=0.4422, p=0.0002). Our study has confirmed the well-established risk profile of subjects with MetS, although clinically asymptomatic. MetS+ patients had also lower levels of ADP and higher levels of A-FABP and FGF 21. Our study evaluated the interrelationships of ADP, A-FABP and FGF 21 in asymptomatic dyslipidemic subjects with diagnosis of MetS. Especially strong association between A-FABP and FGF 21 needs to be clarified in further studies.

Key words

Metabolic syndrome • Adiponectin • Adipocyte fatty acid binding protein • Fibroblast growth factor 21 • Dyslipidemia

Corresponding author

D. Novotný, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic. E-mail: dalibor.novotny@fnol.cz

Introduction

The metabolic syndrome is a common metabolic disorder associated with increased risk of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases (Eckel *et al.* 2005). Although the mechanisms underlying MetS have not been well understood, recent research studies support the idea that visceral obesity plays an important role (Han *et al.* 2002).

Adipose tissue serves both as reservoir of the energy storage and the active endocrine tissue producing many proactive substances including adipokines. These molecules have many important metabolic effects (Funahashi *et al.* 1999). Inflammation of adipose tissue is characterized by infiltration of the macrophages and other types of inflammatory cells. Proinflammatory adipokines exert adverse effects on the vasculature by promoting of

insulin resistance and monocyte infiltration into the vessel wall (Libby *et al.* 2011).

Adiponectin is an adipose tissue-derived adipokine with a protective role in initiation and progression of atherosclerosis through its antiinflammatory and antiatherogenic effects. Serum adiponectin levels are decreased in obesity, type 2 diabetes and patients with coronary artery disease, etc. (Haluzik *et al.* 2004, Shimada *et al.* 2004). Low adiponectin concentrations were found to independently associate with both MetS and coronary atherosclerosis (Saely *et al.* 2007).

Adipocyte fatty acid binding protein is an „unfavourable“ adipokine, probably a new marker and/or predictor of metabolic syndrome. A-FABP is a dominant cytoplasmic protein of mature adipocytes and a regulator of lipid and glucose metabolism, present also in macrophages of fat tissue. Oxidized LDL induces its expression. Higher levels of A-FABP were associated with increased fasting glucose, triglycerides, insulin, body mass index (BMI) and waist circumference, and decreased HDL cholesterol (HDLc) in patients with metabolic syndrome in the study of Xu *et al.* (2006). A-FABP is also considered a valuable marker of metabolic disturbances in patients with type 2 diabetes mellitus (Haluzik *et al.* 2009).

Fibroblast growth factor 21 is a “favourable” cytokine considered as a new metabolic regulator of non-insulin dependent glucose transport in cells. Systematic administration of FGF 21 decreases plasma levels both of glucose and triglycerides and leads to improving of lipoprotein profiles in genetic compromised FGF transgenic mice and primates (Kharitonov *et al.* 2007). Nevertheless, increased levels of FGF 21 and a negative correlation with HDL and adiponectin were found in patients with MetS (Zhang *et al.* 2008). In general, high levels of FGF 21 are found in cardiometabolic disorders such as obesity, MetS, type 2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease in human studies (Woo *et al.* 2013). These findings may indicate a compensatory response to metabolic stress or resistance to FGF 21. Serum FGF 21 has been implicated as a potential biomarker for early detection of these syndromes (Woo *et al.* 2013).

Although many studies investigated the relationships of adipokines to MetS, there is only limited information about all three parameters and their interrelationships in asymptomatic subjects with signs of MetS.

Therefore, the aim of our study was to compare the levels of ADP, A-FABP and FGF 21 in individuals with and without MetS, and to elucidate the relationships of individual adipokines to lipid parameters, markers of insulin resistance and endothelial hemostatic markers in these groups.

Materials and Methods

Study design and subjects

The study was performed with asymptomatic dyslipidemic subjects (i.e. individuals without history of clinically manifest atherosclerosis- coronary artery disease, heart failure, cerebrovascular ischemic disease and peripheral vascular disease, with altered plasma lipids), their relatives and spouses, without lipid-modifying therapy. They had been examined for the first time in the Lipid Centre of the 3rd Department of Internal Medicine, University Hospital Olomouc, Czech Republic, during the period from January 2009 to March 2012. All subjects were tested for the signs of secondary hyperlipidemia: diabetes mellitus, hypothyroidism, renal or hepatic diseases and nephrotic syndrome. Other exclusion criteria were as follows: history of clinically manifested atherosclerosis presented by coronary artery disease, cerebrovascular disease and peripheral arterial disease, hypolipidemic therapy in previous 8 weeks, hormone therapy and clinical presence of acute infections. All individuals filled out a questionnaire on their previous medical history, especially cardiovascular status, medication and smoking habits. Body mass index and systolic and diastolic blood pressure (SBP, DBP) were also determined. The study was reviewed and approved by Ethics Committee of Medical Faculty and University Hospital Olomouc and informed consent was obtained from all participants.

Individuals who met criteria mentioned above (n=209) were divided into two groups: patients with presence of metabolic syndrome (MetS+, n=73, 31 males, 42 females), and individuals with absence of metabolic syndrome (MetS-, n=136, 74 males, 62 females). Following criteria were used for identification of MetS according to NCEP- ATP III Panel 2001: waist circumference (men >102 cm, women >88 cm), triglycerides (TG) ≥ 1.7 mmol/l, HDL cholesterol (men <1.04 mmol/l, women <1.30 mmol/l), blood pressure $\geq 130/\geq 85$ mm Hg and fasting glucose ≥ 6.1 mmol/l. The presence of minimally three of following factors was sufficient for diagnosis of MetS.

Laboratory analysis

Venous blood samples were drawn in the morning after a 12-h fast. After centrifugation, the serum was used for other analyses. For assessment of thrombotic markers, venous blood was collected in 3.8 % sodium citrate tubes and plasma was obtained after centrifugation.

Routine serum biochemical parameters were analyzed on Modular SWA (Roche, Basel, Switzerland) in the day of blood collection. Concentrations of adipokines and other special analytes were measured in the sample aliquotes stored at -80 (-20) °C, no longer than 6 months – see below in text.

Total cholesterol (TC), TG and HDLc were determined enzymatically on a Modular SWA system (Roche, Basel, Switzerland). Determination of HDLc was realized by a direct method without precipitation of apoB containing lipoproteins. Low density lipoprotein cholesterol (LDLc) levels were calculated using Friedewald formula (for TG less than 4.5 mmol/l). Another calculated parameters were as follows: non-HDL-cholesterol (nonHDLc = TC-HDLc) and atherogenic index of plasma (AI) (\log TG/HDLc). Concentration of Apo B and Apo A1 were determined immunoturbidimetrically using Tina-Quant ApoB and ApoA-1 kits (Roche, Basel, Switzerland). Lipoprotein(a) [Lp(a)] was determined immunoturbidimetrically using Tina-Quant Lipoprotein(a) TQ kit (Roche, Basel, Switzerland). C-reactive protein (CRP) was assessed by an ultrasensitive immunoturbidimetric method using the kit Tina-Quant (Roche, Basel, Switzerland). Glucose was determined using GOD-PAP method (Roche, Basel, Switzerland). N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide (NT-proBNP) was determined by ECLIA method (Elecsys pro BNP reagent kit, Roche, Basel, Switzerland). All tests were measured from fresh sera in the day of blood collection.

Insulin was determined by the commercially available kit (Immunotech, Marseille, France) using specific antibodies by the IRMA method. C-peptide and proinsulin (PINS) were determined using the commercially available kits: C-peptide (Immunotech, Marseille, France), and Proinsulin (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany), by the IRMA method, and RIA method, respectively. The sample aliquotes were stored at -20 °C, no longer than 6 months.

The following thrombotic markers were examined from human plasma stored at -20 °C: von Willebrand factor (immunoturbidimetric assay,

Instrumentation Laboratory Spa, Milan, Italy), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and tissue plasminogen activator (tPA) (ELISA, Technoclone, Vienna, Austria).

Total adiponectin, A-FABP and FGF 21 were measured in serum (one separate aliquot stored at -80 °C until the day of analysis) by following immunochemical kits: Human Adiponectin ELISA, Human A-FABP ELISA and Human FGF 21 ELISA (all Biovendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic), according to the manufacturer's instructions and after verification of all three methods. Both the intra- and inter-assay coefficients of variation were below 10 % for all parameters.

Serum levels of the soluble adhesion molecules s-ICAM-1 and sVCAM-1 were determined by immunoenzymatic assay using commercially available kits s-ICAM-1 and sVCAM-1 (both Immunotech, Marseille, France) from one separate aliquot stored at -20 °C.

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm standard deviation (SD) and parameters with skewed distribution also as medians. The Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normal distribution. Variables with skewed distribution (CRP, TG, Lp(a), fibrinogen, vWF, tPA, PAI-1, insulin, C-peptide, PINS, ADP, FGF 21, AFABP, NT-proBNP) were log transformed in order to normalize their distribution before statistical analysis. Differences in variables between individual groups were analyzed with ANCOVA after adjustment for age and sex. For statistical evaluation of a correlation between individual parameters we used a Pearson correlation analysis for analytes with normal distribution, and a univariate Spearman correlation analysis for variables with skewed distribution. Multiple regression analysis was performed for testing of an independent association between dependent and independent variables. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows version 12.0 (Chicago, IL, USA). Probability values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

The basic clinical and laboratory characteristics of all subjects and divided into two groups according to absence/presence of MetS are summarized in Table 1. Besides of expected unfavourable lipid and lipoprotein

Table 1. Basic characteristics of all individuals and subjects without MetS and with MetS.

	All individuals n = 209	MetS- n = 136	Met S+ n = 73
Age (years)	46.7 ± 14.5	44.7 ± 15.9	50.1 ± 11.0
CRP (mg/l)	3.8 ± 10.1 (1.6)	2.9 ± 4.2 (1.4)	3.8 ± 4.5 (2.3) *
TC (mmol/l)	6.69 ± 1.84	6.42 ± 1.48	7.12 ± 2.25 **
TG (mmol/l)	3.01 ± 4.21 (1.77)	1.76 ± 1.74 (1.38)	4.34 ± 6.18 (3.31) ***
AI	0.1931 ± 0.4373	-0.0223 ± 0.3207	0.5827 ± 0.3563 ***
nonHDL (mmol/l)	5.33 ± 1.92	4.87 ± 1.51	6.10 ± 2.27 ***
HDLc (mmol/l)	1.37 ± 0.46	1.55 ± 0.45	1.03 ± 0.23 ***
LDLc (mmol/l)	4.06 ± 1.57	4.06 ± 1.33	3.97 ± 1.91
Apo A1 (g/l)	1.54 ± 0.37	1.65 ± 0.38	1.34 ± 0.25 ***
Apo B (g/l)	1.21 ± 0.38	1.13 ± 0.34	1.33 ± 0.43 ***
Lp(a) (g/l)	0.399 ± 0.465 (0.201)	0.409 ± 0.455 (0.221)	0.381 ± 0.489 (0.189)
Fibrinogen (g/l)	2.98 ± 0.76 (2.80)	2.90 ± 0.70 (2.73)	3.04 ± 0.64 (2.91)
vWF (%)	130 ± 55 (118)	128 ± 50 (118)	132 ± 60 (118)
tPA (ng/ml)	3.35 ± 2.43 (3.0)	2.79 ± 0.88 (2.8)	4.11 ± 2.82 (3.0) ***
PAI-1 (ng/ml)	65 ± 42 (58)	56 ± 36 (44)	83 ± 48 (78) **
sICAM-1 (ng/ml)	358 ± 148	335 ± 128	389 ± 173 *
sVCAM-1 (ng/ml)	743 ± 360	709 ± 327	819 ± 411 *
Glucose (mmol/l)	5.38 ± 1.04	5.10 ± 0.56	5.92 ± 1.46 ***
Insulin (mIU/l)	10.3 ± 6.6 (8.5)	8.4 ± 4.5 (7.5)	13.7 ± 8.2 (11.7) ***
C-peptide (mg/l)	2.7 ± 1.4 (2.5)	2.3 ± 1.0 (2.2)	3.6 ± 1.7 (3.4) ***
BMI (kg/m ²)	26.99 ± 4.75	25.19 ± 4.17	30.36 ± 4.05 ***
Waist (cm)	91.1 ± 14.2	85.9 ± 11.9	101.0 ± 12.7 ***
PINS (mIU/l)	14.8 ± 10.5 (11.4)	12.0 ± 8.3 (9.6)	20.3 ± 12.2 (16.6) ***
ADP (mg/l)	8.6 ± 5.2 (7.4)	9.4 ± 5.0 (8.0)	7.0 ± 5.3 (5.4) ***
FGF 21 (ng/l)	317.7 ± 440.4 (197.6)	222.3 ± 299.9 (156.5)	471.4 ± 531.7 (305.6) ***
A-FABP (μg/l)	26.2 ± 17.9 (21.9)	22.2 ± 12.7 (19.9)	33.8 ± 23.5 (29.1) ***
NT-proBNP (ng/l)	65.7 ± 82.1 (40.7)	65.4 ± 84.2 (44.5)	67.7 ± 81.0 (41.4)
SBP (mm Hg)	128.7 ± 15.2	125.1 ± 13.6	136.1 ± 15.6 ***
DBP (mm Hg)	77.8 ± 8.7	75.9 ± 8.3	81.7 ± 8.0 ***

Data are expressed as means ± standard deviations, in parameters with skewed distribution also as medians (in parentheses). Differences in variables between groups were analyzed with ANCOVA after adjustment for age and sex. Variables with skewed distribution (CRP, TG, Lp(a), fibrinogen, vWF, tPA, PAI-1, insulin, C-peptide, PINS, ADP, FGF 21, A-FABP, NT-proBNP) were log transformed to normalize their distribution before statistical analyses. Significant differences between MetS- and MetS+ groups: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. CRP, C-reactive protein; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDLc, high density lipoprotein cholesterol; LDLc, low density lipoprotein cholesterol; nonHDL=TC-HDLc; AI, atherogenic index of plasma (logTG/HDLc); Apo, apolipoprotein; Lp(a), lipoprotein (a); vWF, von Willebrand factor; tPA, tissue plasminogen activator; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1; BMI, body mass index; PINS, proinsulin; ADP, adiponectin; FGF 21, fibroblast growth factor 21; A-FABP, adipocyte fatty acid binding protein; NT-proBNP, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

profiles (elevated TC, TG, nonHDLc, AI, Apo B, and decreased levels of HDLc and Apo A1) and pronounced insulin resistance (increased levels of glucose, insulin, proinsulin and C-peptide), individuals with MetS had significantly elevated concentrations of endothelial and hemostatic markers tPA, PAI-1 and adhesive molecules

sVCAM-1 and sICAM-1. Adiponectin was significantly lower in MetS+ (p<0.001), whilst A-FABP and FGF 21 concentrations were elevated in comparison with MetS- group (p<0.001).

In Table 2, significant correlations of adipokines with other parameters in MetS+ and MetS- groups are

introduced. In MetS+ group, ADP positively correlated with age, HDLc, Apo A1, A-FABP and NT-proBNP, and negatively with sex and waist circumference. A-FABP

positively correlated with vWF, ADP, FGF 21 and NT-proBNP, whereas FGF 21 positively correlated with TG, AI, vWF, PAI-1, A-FABP and waist circumference.

Table 2. Significant correlations of adipokines with other parameters in MetS+ and MetS- groups (*r* and *p* values).

a) ADP

	Age	Sex	Waist	HDLc	Apo A1	vWF	A-FABP	NT-proBNP
<i>ADP MetS+</i>	0.386 <i>0.001</i>	-0.520 <i>0.000</i>	-0.414 <i>0.001</i>	0.499 <i>0.000</i>	0.355 <i>0.002</i>	0.139 <i>0.254</i>	0.267 <i>0.022</i>	0.411 <i>0.000</i>
<i>ADP MetS-</i>	0.261 <i>0.002</i>	-0.399 <i>0.000</i>	-0.253 <i>0.008</i>	0.476 <i>0.000</i>	0.507 <i>0.000</i>	0.310 <i>0.000</i>	0.124 <i>0.151</i>	0.442 <i>0.000</i>

b) A-FABP

	Age	BMI	Waist	vWF	ADP	FGF 21	NT-proBNP
<i>A-FABP MetS+</i>	0.117 <i>0.326</i>	0.050 <i>0.678</i>	0.046 <i>0.729</i>	0.404 <i>0.001</i>	0.267 <i>0.022</i>	0.521 <i>0.000</i>	0.399 <i>0.001</i>
<i>A-FABP MetS-</i>	0.327 <i>0.001</i>	0.379 <i>0.000</i>	0.288 <i>0.002</i>	0.266 <i>0.002</i>	0.124 <i>0.151</i>	0.282 <i>0.001</i>	0.198 <i>0.023</i>

c) FGF 21

	TG	AI	vWF	PAI-1	A-FABP	Waist
<i>FGF 21 MetS+</i>	0.374 <i>0.001</i>	0.340 <i>0.001</i>	0.362 <i>0.002</i>	0.223 <i>0.050</i>	0.521 <i>0.000</i>	0.256 <i>0.050</i>
<i>FGF 21 MetS-</i>	0.240 <i>0.005</i>	0.172 <i>0.046</i>	0.079 <i>0.371</i>	0.201 <i>0.022</i>	0.282 <i>0.001</i>	0.050 <i>0.606</i>

Pearson correlation analysis for parameters with normal distribution. Spearman correlation analysis for parameters with skewed distribution (TG, vWF, tPA, PAI-1, ADP, FGF 21, A-FABP, NT-proBNP). Bold values indicate significance at $p < 0.05$.

In order to evaluate the independent association of followed up parameters with ADP, A-FABP and FGF 21, the multiple regression analysis with adipokines as dependent variables and correlated parameters as independent predictors was performed (see Table 3). In MetS+ group, ADP was independently positively associated with A-FABP ($\beta=0.4888$, $p < 0.05$), A-FABP was positively associated with FGF 21 ($\beta=0.3811$, $p < 0.001$) and vWF ($\beta=0.4502$, $p < 0.01$), whilst FGF 21 was positively associated only with A-FABP ($\beta=0.4422$, $p < 0.001$). In MetS- group, ADP was positively associated with vWF and negatively with sex, A-FABP was positively associated with FGF 21, vWF and BMI, and FGF 21 was positively associated with A-FABP, TG, and negatively with AI.

Discussion

Our study confirms the well-established risk profile of subjects with MetS, although clinically asymptomatic. They had unfavourable lipid and lipoprotein profiles, increased parameters of insulin resistance, and significantly elevated concentrations of endothelial hemostatic markers represented by tPA, PAI-1 and adhesive molecules, in comparison with MetS- individuals. Decreased levels of ADP in MetS+ individuals are not surprising and they are consistent with recent literature (Ryo *et al.* 2004, Saely *et al.* 2007), as well as the increase of A-FABP levels (Horakova *et al.* 2011, Park *et al.* 2012), and FGF 21 concentrations (Zhang *et al.* 2008, Chen *et al.* 2011, Reinehr *et al.* 2012).

Table 3. Independent associations of ADP, A-FABP and FGF 21 as result of the multiple regression analysis (bold values).

a) ADP			
	A-FABP	vWF	sex
<i>ADP MetS+</i>	beta = 0.4888 <i>p = 0.0382</i>	NS	NS
<i>ADP MetS-</i>	NS	beta = 0.4332 <i>p = 0.0245</i>	beta = -0.0609 <i>p = 0.0447</i>
b) A-FABP			
	FGF 21	vWF	BMI
<i>A-FABP MetS+</i>	beta = 0.3811 <i>p = 0.0002</i>	beta = 0.4502 <i>p = 0.0013</i>	NS
<i>A-FABP MetS-</i>	beta = 0.1491 <i>p = 0.0392</i>	beta = 0.3524 <i>p = 0.0352</i>	beta = 0.3785 <i>p = 0.0026</i>
c) FGF 21			
	A-FABP	TG	AI
<i>FGF 21 MetS+</i>	beta = 0.4422 <i>p = 0.0002</i>	NS	NS
<i>FGF 21 MetS-</i>	beta = 0.2984 <i>p = 0.0026</i>	beta = 0.1150 <i>p = 0.0358</i>	beta = -0.1105 <i>p = 0.0178</i>

Bold values indicate significance at $p < 0.05$. NS – no significance.

Significant correlations of adipokines with other selected parameters in MetS+ and MetS- groups as a result of univariate correlation analysis are described in Table 2. There are minimally three interesting points in this summary: 1. positive correlation of ADP and A-FABP with NT-proBNP in both groups, which was amplified especially in MetS+ group (although no differences were seen in NT-proBNP levels), 2. only weak or no correlation of A-FABP with metabolic and anthropometric parameters of insulin resistance, and 3. strong correlation of A-FABP and FGF 21 in both observed groups.

Adiponectin is one of the few adipokines that has multiple favourable effects on the prevention of cardiovascular disease through its pleiotropic actions on the blood vessels and the heart. In our study, we have verified correlations with many clinical, anthropometrical and laboratory parameters (age, sex, waist circumference, HDLc, Apo A1), mostly well described in previous studies. But positive relationship of ADP to A-FABP as an independent predictor was seen only in MetS+ individuals and was confirmed by multiple regression

analysis (however, A-FABP as dependent variable did not correlate with ADP in this group). We can speculate about the reason of this relationship. One of the main beneficial functions of adiponectin is cardioprotective action (Xu *et al.* 2012). The antiapoptotic activity represents a key mechanism, whereby ADP protects against cardiac injury (Tao *et al.* 2007). In cardiomyocytes, adiponectin promotes decrease of oxidative/nitrosative stress, apoptosis, fibrosis and inflammation and increase of fatty acid and glucose uptake. On the other side, despite its atheroprotective properties, ADP has been associated with both decreased (Pischon *et al.* 2004, Frystyk *et al.* 2007) and increased (Lindsay *et al.* 2005) risk of cardiovascular disease and/or mortality. In our recent study, the positive association of ADP was found with thrombomodulin, vWF and sVCAM-1 in dyslipidemic subjects, which might contribute to increased risk of cardiovascular disease associated with higher plasma ADP levels (Vaverkova *et al.* 2013).

Data from animal studies support an etiological role of A-FABP in cardiovascular disease (Furuhashi *et*

et al. 2008). A-FABP has been identified as a major cardiodepressant factor that confers the suppressive effect of adipocytes on cardiac contractile functions (Lamounier-Zepter *et al.* 2009). Thus, independent association of ADP with A-FABP in MetS+ group may be connected with the relationship of these adipokines to cardiac and/or vascular functions, and may reflect compensatory response of ADP to higher risk of cardiovascular disease. In addition, both parameters have correlated positively with NT-proBNP (see Table 2), which has been shown to be an accurate and sensitive diagnostic marker in patients with heart failure, although, after multiple regression analysis, the association has lost significance in our study. Von Eynatten *et al.* (2006) have investigated the relationship of adiponectin to markers of inflammation, atherogenic dyslipidemia and heart disease in patients with coronary artery disease. After adjusting for age and sex, adiponectin was associated positively with HDL cholesterol and NT-proBNP. Moreover, several studies found the relationship between A-FABP and coronary atherosclerosis (Miyoshi *et al.* 2010, Rhee *et al.* 2009) and its possible role in the development of cardiac dysfunction have been suggested, including positive correlation with NT-proBNP (Zhou *et al.* 2011).

In recent cross-sectional studies, serum A-FABP correlated with parameters of IR (glucose, insulin, waist circumference, BMI) in obese individuals, patients with type 2 diabetes mellitus, patients with familial combined hyperlipidemia and patients with metabolic syndrome (Kralisch *et al.* 2013). But we have found only weak or no correlation of A-FABP with these parameters in MetS+ group, although significant differences were observed between MetS+ and MetS- groups, as shown in Table 1. We speculate about relatively small number of individuals in MetS+ group. In any case, this phenomenon is surprising and we have no other relevant explanation for it.

A-FABP is a key proinflammatory mediator that links obesity with cardiovascular disease in humans (Xu *et al.* 2012). The proatherogenic activity is mediated by its direct action on macrophages, independently of lipid metabolism and insulin sensitivity (Hoo *et al.* 2008). In MetS+ group, the positive correlation between A-FABP with vWF, ADP, FGF21 and NT-proBNP was observed, but independent relationship with only vWF and FGF 21 was revealed by the multiple regression analysis (see Table 3). Positive association with vWF is in accordance with our previous study (Karasek *et al.* 2012) and supports the role of A-FABP in development of

endothelial dysfunction. The independent association with FGF 21 is discussed below.

Fibroblast growth factor 21 is a member of the FGF superfamily, with relevant metabolic actions (Iglesias *et al.* 2012). FGF 21 has been recently considered as a metabolic hormone regulated by nutritional status, with multiple beneficial effects on glucose homeostasis and lipid metabolism in animal models. Indeed, FGF 21 improves insulin sensitivity, glucose, and lipid homeostasis and preserves beta-cell functions in diabetic animal models (Kharitonov *et al.* 2007, Coskun *et al.* 2008, Kralisch *et al.* 2011). However, increased levels of FGF 21 and negative correlation with HDLc and adiponectin were found in patients with MetS (Zhang *et al.* 2008). In general, high levels of FGF 21 are found in cardiometabolic disorders such as obesity, MetS, type 2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease in human studies (Woo *et al.* 2013).

As shown in Table 2, FGF 21 has positively correlated with waist, TG, AI, vWF, PAI-1 and A-FABP in MetS+ group. Some of these relationships have been described in previous studies: higher levels of FGF 21 and positive correlation with TG in patients with coronary artery disease and dyslipidemia (Lin *et al.* 2010), independent association with TG and LDLc in patients with impaired glucose tolerance and/or type 2 diabetes (Chen *et al.* 2011) or above-mentioned study of Zhang *et al.* (2008) revealing positive correlation with adiposity and TG in obese individuals with metabolic syndrome.

There are only limited information about the relationships of FGF 21 and endothelial hemostatic markers in recent literature. PAI-1 is probably less specific marker of endothelial damage (Karasek *et al.* 2012). It originates from several sites, including endothelium, liver and adipose tissue, and higher levels may not reflect endothelial dysfunction. In our recent study, positive associations of ADP and vWF were found in dyslipidemic patients (Vaverkova *et al.* 2013). Correlation of FGF 21 with vWF is surprising and may reflect higher risk of atherothrombosis in MetS+ group in general. However, both relationships have lost significance after the multiple regression analysis.

The favourable effects in animal studies would support the potential role of FGF 21 as a therapeutic agent for diabetes and obesity (Dostalova *et al.* 2009, Woo *et al.* 2013). However, high serum FGF 21 levels were observed in obese individuals, and patients with

obesity-related disorders and insulin resistance (Zhang *et al.* 2008, Chen *et al.* 2011). The causes of this phenomenon need to be clarified. FGF 21 resistance has been proposed as one of the causes in animal study (Fisher *et al.* 2010).

The most important finding of our study was the strong reciprocal positive association of FGF 21 with A-FABP levels in both investigated groups, with pronounced relationship in MetS+ group ($p=0.0002$). One of the reasons of elevated FGF 21 could be the presence of compensatory response to higher metabolic stress presented by high levels of A-FABP. As mentioned above, high levels of FGF 21 were found in cardiometabolic disorders such as obesity, MetS, type 2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease in human studies (Woo *et al.* 2013). It seems likely that this circulating FGF 21 is derived from the liver, perhaps due to the induction of FGF 21 by elevated hepatic lipid and carbohydrate levels (Huating *et al.* 2013). But it is not clear if circulating A-FABP is only a strong marker of metabolic disturbances or one of its primary causes (Haluzik *et al.* 2009).

FGF 21 resistance has been proposed as one of the causes for the raised circulating levels in obese mice (Fischer *et al.* 2010). For activation of FGF receptor mediated signaling, FGF 21 has to bind a FGF receptor: beta-Klotho complex (Kharitonov *et al.* 2008). Beta-Klotho is highly expressed in metabolically active tissues including adipose tissue, liver and pancreas. A recent study suggests that adipose tissue inflammation in obesity can lead to the repression of beta-Klotho expression by TNF alpha and impaired FGF 21 in adipocytes (Diaz-Delfin *et al.* 2012). Similar actions may also lead to

FGF 21 resistance in subclinical inflammation such as metabolic syndrome, type 2 diabetes and coronary artery disease (Woo *et al.* 2013). Therefore, it is possible that A-FABP (as a key proinflammatory mediator that links obesity with cardiovascular disease) may participate in the process of FGF 21 resistance, for example by its proinflammatory effect. Further studies are needed to address the mechanisms underlying the observed relationship.

Conclusion

Although many studies investigated the relationships of several adipokines to metabolic syndrome, we have first evaluated the interrelationships of ADP, A-FABP and FGF 21 in dyslipidemic subjects with signs of MetS. We have found independent positive association of ADP with A-FABP, and, to the best of our knowledge, we have first documented strong positive reciprocal association between FGF 21 and A-FABP in dyslipidemic subjects highlighted in MetS+ group. In addition, we have confirmed previously described independent relationship of A-FABP and vWF.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

Supported by the Institutional Support of Ministry of Health, Czech Republic, Nr.1 RVO-FNOL2013. Supported by the Internal Grant Agency of Palacky University, Czech Republic, Nr. LF_2013_010.

References

- CHEN C, CHEUNG BM, TSO AW, WANG Y, LAW LS, ONG KL, WAT NM, XU A, LAM KS: High plasma level of fibroblast growth factor 21 is an independent predictor of type 2 diabetes: a 5.4-year population based prospective study in Chinese subjects. *Diabetes Care* 34: 2113-2115, 2011.
- COSKUN T, BINA HA, SCHNEIDER MA, DUNBAR JD, HU CC, CHEN Y, MOLLER DE, KHARITONENKOV A: Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149: 6018-6027, 2008.
- DIAZ-DELFIN J, HONDARES E, IGLESIAS R, GIRALT M, CAELLES C, VILLARROYA F: TNF-alpha represses beta-Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells; involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology* 153: 4238-4245, 2012.
- DOSTALOVA I, HALUZIKOVA D, HALUZIK M: Fibroblast Growth Factor 21: A novel metabolic regulator with potential therapeutic properties in obesity/type 2 diabetes mellitus. *Physiol Res* 58: 1-7, 2009.
- ECKEL RH, GRUNDY SM, ZIMMENT PZ: The metabolic syndrome. *Lancet* 365: 1415-1428, 2005.
- FISHER FM, CHUI PC, ANTONELLIS PJ, BINA HA, KHARITONENKOV A, FLIER JS, MARATOS-FLIER E: Obesity is a fibroblast growth factor (FGF 21)-resistant state. *Diabetes* 59: 2781-2789, 2010.

Association of serum adipocyte fatty acid-binding protein and apolipoprotein B /apolipoprotein A1 ratio with intima media thickness of common carotid artery in dyslipidemic patients

Jiri Orsag^a, David Karasek^a, Milan Halenka^a, Helena Vaverkova^a, Jaromira Spurna^a,
Veronika Kubickova^b, Jiri Lukes^b, Josef Zadrazil^a

^a Department of Internal Medicine III – Nephrology, Rheumatology and Endocrinology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc.

^b Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc.

Corresponding author:

Jiri Orsag, M.D.

*Department of Internal Medicine III – Nephrology, Rheumatology and Endocrinology,
Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University
Hospital Olomouc*

I. P. Pavlova 6

779 00 Olomouc

Czech Republic

Tel.: +420588444747

E-mail: jiri.orsag@fnol.cz

Short title:

A-FABP and IMT of CCA in dyslipidemic patients

Summary:

Background: Diseases caused by atherosclerosis play the most important role in mortality and morbidity worldwide. Serum adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) seems to be a new promising marker to determine the risk of atherosclerosis.

Objective: The aim of this study was to evaluate relationships between serum A-FABP levels in studied individuals and to assess the possibility of modeling intima media thickness of common carotid artery (C-IMT) by A-FABP levels and other observed characteristics.

Methods: Seventy two Caucasian individuals were enrolled and divided into 3 groups: dyslipidemic patients with or without metabolic syndrome (MetS+, n=17; MetS-, n=34) and controls (n=21).

Results: There was confirmed the well-established risk profile of individuals with MetS (unfavorable lipid and lipoprotein profile, as well as increased parameters of insulin resistance and C-IMT). A-FABP concentrations in this group were significantly higher in comparison with both MetS- and controls. By using multiple linear regression models of C-IMT values for all individuals data and also for subset of healthy controls and dyslipidemic patients without metabolic syndrome (MetS-) A-FABP levels was not reveal as an important predictor of C-IMT in our model. In contrast, age, gender, waist circumference, nonHDL cholesterol levels and ApoB/ApoA1 ratio were important repressors of C-IMT in study individuals. This finding may be attributed to the overwhelming effect of other more robust risk factors for atherosclerosis in these individuals.

Key words: Adipocyte fatty acid binding protein, Intima media thickness, Dyslipidemia

Introduction

Diseases caused by atherosclerosis as stroke or myocardial infarction play the most important role in mortality and morbidity worldwide, especially in highly developed countries. New markers for onset of atherosclerosis are searching. Serum adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) seems to be a new promising marker to determine the risk of atherosclerosis.

Adipocyte fatty acid-binding protein (A-FABP) is a member of the fatty acid binding protein super family, accounting for approximately 6% of total cellular proteins in mature adipocytes¹. It is also present in macrophages, which possess similar functions as adipocytes, and modulated by proliferator-activated receptor- α agonists and oxidized low density lipoproteins². Recently, ectopic expression and function of A-FABP in several other types of cells and tissues (for example endothelial cells of capillaries and small veins in the heart and kidney) have been demonstrated³. A-FABP-deficient mice are protected from insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis^{4,5}. It has been demonstrated that A-FABP is released into the human blood stream⁶.

Human serum A-FABP levels are significantly higher in men than in women, possibly because of the larger amount of body fat in women^{6,7}. Its circulating levels are elevated in patients with obesity and other components of the metabolic syndrome, including adverse lipid profiles, hyperglycemia and hypertension, independently of sex, age and adiposity^{6,8-10}. Serum A-FABP levels correlate also positively with markers of endothelial dysfunction, and coronary atherosclerotic burden¹¹⁻¹⁵.

High concentration of A-FABP at baseline was an independent predictor for the development of metabolic syndrome during a five-year follow-up period in a Chinese population¹⁶. A 10-year prospective study also showed that high level of A-FABP at baseline independently predicted the development of type 2 diabetes¹⁷. Associations of A-FABP levels with the development of left ventricular (LV) hypertrophy and with systolic and diastolic cardiac dysfunction have also been reported¹⁸⁻²¹. These findings support the role of A-FABP as a key pro-inflammatory mediator that links obesity with cardiovascular damage and atherosclerosis.

The aim of this cross sectional study was to evaluate relationships between serum A-FABP levels in studied individuals and to assess the possibility of modeling intima media thickness of common carotid artery (C-IMT) by A-FABP levels and other observed characteristics.

Methods

Study design and subjects

The study cohort included Czech asymptomatic dyslipidemic subjects and healthy volunteers who underwent C-IMT measurement in the Lipid Centre of the Department of Internal Medicine III, University Hospital Olomouc, Czech Republic. Medical history was obtained and physical examination was performed, including measurement of waist circumference, body mass index (BMI), and systolic and diastolic pressure (SBP, DBP). Patients with following conditions were excluded from the study: secondary hyperlipidemia (hypothyroidism, renal or hepatic diseases, nephrotic syndrome), hypolipidemic therapy in previous 6 weeks, hormone therapy, acute infection or trauma and history of clinically manifested atherosclerosis (coronary artery disease, cerebrovascular disease or peripheral arterial

disease). Individuals who met criteria mentioned above (72 subjects, 31 men and 41 women) were divided into three groups: 17 hyperlipidemic patients with presence of metabolic syndrome (MetS+, men/women: 8/9, mean age: 47.9 ± 14.5 years), 34 hyperlipidemic patients with absence of metabolic syndrome (MetS-, men/women: 16/18, mean age: 40.8 ± 15.5 years) and 21 normolipidemic healthy subjects (men/women: 7/14, mean age: 47.0 ± 17.3 years) who served as a control group. Diagnosis of metabolic syndrome was based on a modified version of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (NCEP ATP III) and defined as the presence of at least three of the following at baseline: waist circumference (men > 102 cm, women > 88 cm), triglycerides (TG) ≥ 1.7 mmol/l, HDL cholesterol (men < 1.04 mmol/l, women < 1.30 mmol/l), blood pressure $\geq 130/\geq 85$ mm Hg and fasting glucose ≥ 6.1 mmol/l. Presence of metabolic syndrome was evaluated at the time of first patient examination in the lipid center. The study was reviewed and approved by Ethics Committee of Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc and informed consent was obtained from all participants.

Laboratory analysis

All subjects were assessed after overnight fasting for at least 12 hours. Venous blood samples were obtained and after centrifugation, the serum was used for analysis. Routine serum biochemical parameters were analyzed in the day of blood collection, concentrations of adipokines were measured in the sample aliquots stored at -80 °C, no longer than 6 months. Total cholesterol (TC), TG and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were determined enzymatically on Modular SWA system (Roche, Basel, Switzerland). HDL-C was measured by direct method without precipitation of apoB containing lipoproteins. Low density lipoprotein cholesterol

(LDL-C) levels were calculated using Friedewald formula. Non-HDL-cholesterol (nonHDL-C) was calculated as TC – HDL-C. Concentration of apoB and apolipoprotein A1 (apoA1) were determined immunoturbidimetrically using Tina-Quant ApoB and ApoA-1 kits (Roche, Basel, Switzerland). Glucose was measured using GOD-PAP method (Roche, Basel, Switzerland). A-FABP was determined using Human A-FABP ELISA kit (Biovendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic).

Measurement of carotid IMT

High-resolution B-mode ultrasound (Philips Sonos 5500, 2004) was used to measure the IMT of the common carotid arteries (CCA). Linear array transducers with frequency of 10 MHz were used. Anterolateral approach was used to longitudinally image the right and left CCA. This image was displayed just before the widening of the bulb. When an optimal longitudinal image of the far wall of the CCA in the region of 1 cm proximally from the bulb was obtained, it was frozen on the R wave according to a simultaneous ECG and video tapered. Three video records were made on both CCA. C-IMT measurements were processed off-line using the software Image-Pro plus (Version 4.0, Media –Cybernetics, Silver Spring, USA). The region under evaluation was the CCA wall 1-2 cm distant proximally from the mentioned border. The average of all mean C-IMT of three frozen images of both sides was chosen as outcome variable. Plaque was defined as a focal protrusion into the lumen with a thickness of at least 50% more than adjacent intima-media complex. Subjects with this atherosclerotic plaque in the evaluated region were not included in the study. The measurement of C-IMT was made without knowledge of laboratory results.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with software R, ver. 3.4.2. (ref.²²). Data in tables were summarized as mean and standard deviation. Distributions of observed variables were compared with ANOVA and Student's t-test, resp. Kruskal-Wallis and Wilcoxon test. In case of more than two groups, multiple comparisons were done with Tukey test, resp. Nemenyi test. Distribution of categorical variables were presented as contingency tables and analyzed with Pearson's chi-square test, resp. Fisher's exact test. Multiple linear models of IMT values were built for all individuals' data and also for subset of healthy controls and dyslipidemic patients without metabolic syndrome (MetS-). Feature selection was based on LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) regression results for lambda parameter obtained as minimal value in 5-fold cross-validation process for each analyzed set of data (R package glmnet) (ref.²³). Linear model for dyslipidemic patients with metabolic syndrome was not performed due to empty non-zero coefficient set of Lasso regression results for these subset of patients. In suitable cases (existence of non-significant regressors), a stepwise selection process was also performed. In case of healthy subset, based on fit diagnostic plot (Cook's distance), one leverage observation was excluded in final model.

Results

The demographic, clinical and biochemical characteristic of the investigated groups are summarized in Table 1 and Figure 1, 2. Individuals with MetS (MetS+) had highest BMI and waist circumference and expected unfavorable lipid and lipoprotein profiles (elevated TC, TG, and nonHDL-C, ApoB, ApoB/ApoA1 ratio and decreased HDL-C and ApoA1) and signs of insulin resistance (increased levels of insulin and C-peptide). A-FABP concentrations in this group were significantly higher in

comparison with both MetS- and controls. Differences in A-FABP levels between MetS- and controls were not significant. Similar results were found in C-IMT (significantly thicker C-IMT in MetS+ than in MetS- and in controls, but no difference between MetS- and controls).

By using multiple linear regression models of C-IMT values for all individuals data and also for subset of healthy controls and dyslipidemic patients without metabolic syndrome (MetS-) A-FABP level was not reveal as an important predictor of C-IMT. Only age, gender, waist circumference, nonHDL cholesterol levels and ApoB/ApoA1 ratio were important regressors of C-IMT – see Tab. 2, 3, 4.

Discussion

In the current study we confirmed the well-established risk profile of individuals with MetS. They had unfavorable lipid and lipoprotein profiles, as well as increased parameters of insulin resistance. A-FABP concentrations in this group were significantly higher in comparison with both MetS- and controls. This finding is consistent with the results of previous studies and our previous reports¹². It has been reported that increased circulating A-FABP levels are associated with obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, hypertension, cardiac dysfunction, and atherosclerosis^{6,14,16,17,24,25}. High concentration of A-FABP at baseline was an independent predictor for the development of metabolic syndrome during a five-year follow-up period in a Chinese population¹⁶. A 10-year prospective study also showed that high level of A-FABP independently predicted the development of type 2 diabetes¹⁷.

Relationship between serum A-FABP and C-IMT was observed in some previous studies. Hao Y. et al. revealed a positive correlation between serum A-FABP and

subclinical atherosclerosis in a cohort of Chinese pre- and postmenopausal women with normal glucose tolerance²⁶. A study from Yeung et al. reported that serum A-FABP levels were strongly associated with C-IMT in women including both hyperglycemia and normal glucose tolerance¹⁴. These findings support the notion that circulating A-FABP is not only a potent biomarker but also plays an important role, as an adipokine, in the development of atherosclerosis.

From this point of view is surprising, that A-FABP was not found as a predictor of C-IMT in our multiple linear regression models in contrast with classical factors as age, gender or waist circumference, even when all subjects were included in the analysis.

This is in contrast with study from Yeng et al. 2007 (ref.¹⁴), where multiple regression analysis had identified serum A-FABP together with age and hypertension to be independent risk factors related to C-IMT in female subjects. Study cohort consisted of much more subject than ours (479 vs. 72 individuals), this could be one of the explanation of the difference. The other factor is separate testing men and women. There is the difference in race of participants, too (Chinese vs. Caucasian). Other limitation of our study are as follows. First, there was used a cross-sectional study design and therefore could not establish a cause-and-effect relationship between A-FABP and C-IMT. Second, participants of our study were Caucasians, so our findings cannot be generalized to other ethnicities.

Other possible explanation for our findings is that the proatherosclerotic effects of conventional risk factors were stronger than A-FABP and probably outweighed its effect on carotid atherosclerosis. Therefore, future studies should be prospective and include a large number of cases to clarify relationship between A-FABP and C-IMT.

The confounding factor in this study is impossibility to perform linear model for dyslipidemic patients with metabolic syndrome due to empty non-zero coefficient set of Lasso regression results for this subset of patients. We only can speculate about small number of individuals in MetS+ group or about wide heterogeneity of these patients (different proportion of presence of the factors of metabolic syndrome). In any case, this phenomenon is surprising and we have no other relevant explanation for it.

An interesting fact is the presence of ApoB/ApoA1 ratio as an important predictor of C-IMT in dyslipidemic patients without metabolic syndrome.

The apoB/apoA1 ratio has been reported to be associated with the metabolic syndrome (MetS), and it may be a more convenient biomarker in MetS predicting, especially in Chinese population^{27,28}. In single study on older healthy volunteers, [Panayiotou](#) et al. demonstrated that high ApoB/ApoA1 ratio is associated with early atherosclerosis²⁹. In linear regression analysis, the ApoB/ApoA1 ratio was significantly associated with all the ultrasonic measurements of early atherosclerosis (among others C-IMT). In our study it is the first observation of influence of ApoB/ApoA1 on C-IMT in dyslipidemic individuals.

Our data, in agreement with previous animal and clinical studies, revealed higher A-FABP levels and C-IMT in Czech dyslipidemic individuals with metabolic syndrome. This supports the role of A-FABP in the development of the metabolic syndrome and probably atherosclerosis. Contrasting to these findings A-FABP did not prove its importance as predictor of C-IMT in dyslipidemic patients. This finding may be attributed to the overwhelming effect of other risk factors of atherosclerosis in dyslipidemic individuals. Interesting finding is revealing of ApoB/ApoA1 ratio as an

important predictor of common C-IMT in dyslipidemic patients without metabolic syndrome.

In our knowledge, it is the first observation. Further investigations are needed to identify model regressors especially for very heterogenic group of dyslipidemic patients with metabolic syndrome.

Authors contributions:

JO, DK, MH, HV, JS took care of patients, reviewed the literature, drafted the manuscript, and contributed to its revision. VK, JL performed laboratory tests.

JZ approved the manuscript.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgments

This work was supported by the IGA_LF_2017_015 and MZ CR-RVO (FNOI, 00098892).

References

1. Makowski L, Hotamisligil GS. Fatty acid binding proteins—the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr* 2004; 134: 2464–2468.
2. Boord JB, Fazio S, Linton MF. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 141–147.
3. Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, Ghelfi E, Weng M, Ince TA, Kozakewich H, Bischoff J, Cataltepe S: Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB J* 2009; 23: 3865–3873.
4. Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev V, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS: Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004; 110: 1492–1498.
5. Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, Parker RA, Suttles J, Fazio S, Hotamisligil GS, and Linton MF: Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001; 7: 699–705.
6. Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NMS, Wong WK, Lam KSL: Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006; 52: 405–413.
7. Ishimura S, Furuhashi M, Watanabe Y, Hoshina K, Fuseya T, Mita T, Okazaki Y, Koyama M, Tanaka M, Akasaka H, Ohnishi H, Yoshida H, and Saitoh S, Miura T:

Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS One* 2013; 8: e81318.

8. Stejskal D, Karpisek M. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 621-625.

9. Engl J, Ciardi C, Tatarczyk T, Kasr S, Laimer M, Laimer E, Weiss H, Aigner F, Molnar C, Tilg H, Patsch JR, Ebenbichler CF: A-FABP -a biomarker associated with the metabolic syndrome and/or an indicator of weight change? *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16:1838-1842.

10. Hsu BG, Chen YC, Lee RP, Lee CC, Lee CJ, Wang JH. Fasting serum level of fatty acid-binding protein 4 positively correlates with metabolic syndrome in patients with coronary artery disease. *Circ J* 2010; 74: 327-331.

11. Aragonés G, Ferré R, Lázaro I, Cabré A, Plana N, Merino J, Heras M, and Girona J, Masana L: Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2010; 213: 329-331.

12. Karasek D, Vaverkova H, Frysak Z, Orsag J, Novotny D, Halenka M, Slavik L: Relationship between serum adipocyte fatty acid-binding protein and endothelial/hemostatic markers in dyslipidemic subjects. *Neuro Endocrinol Lett* 2012; 33(Suppl 2):26-31.

13. Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, Hirohata S, Usui S, Hina K, Kawamura H, Doi M, Kusano KF, Kusachi S, and Ninomiya Y: Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis* 2010; 11: 164-169.

14. Yeung DC, Xu A, Cheung CW, Wat NM, Yau MH, Fong CHY, Chau MT, Lam KSL: Serum Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Levels Were Independently

Associated With Carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1796-1802.

15. Xiao Y, Yao L, and Li X, Zhong H, Chen XY, Tang WL, Liu SP, Xu AM, Zhou ZG: Relationship of adipocyte fatty acid-binding protein to adiponectin ratios with femoral intima-media thickness and endothelium-dependent vasodilation in patients with newly-diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Zhonghua Yi ue Za Zhi* 2010; 90: 231-235.

16. Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, Yeung DC, Janus ED, Sham PC, and Lam KS: Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 2007; 115: 1537-1543.

17. Tso AW, Xu A, Sham PC, Wat NM, Wang Y, Fong CH, Cheung BM, Janus ED, Lam KS: Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care* 2007; 30: 2667–2672.

18. Engeli S, Utz W, Haufe S, Lamounier-Zepter V, Pofahl M, Taber J, Janke J, Luft FC, Boschmann M, Schulz-Menger J, Jordan J: Fatty acid binding protein 4 predicts left ventricular mass and longitudinal function in overweight and obese women. *Heart* 2013; 99: 944–948.

19. Huang CL, Wu YW, Wu CC, Lin L, Wu YC, Hsu PY, Jong YS, Yang WS: Association between serum adipocyte fatty-acid binding protein concentrations, left ventricular function and myocardial perfusion abnormalities in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 12:105.

20. Liu M, Zhou M, Bo Y, Xu Z, Li H, Zhang H, Zhu W, Zhang J, Xu A, Wei M, Jia W: Circulating adipocyte fatty acid-binding protein levels are independently associated with heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2013; 124: 115-122.
21. Baessler A, Lamounier-Zepter V, Fenk S, Strack C, Lahmann C, Loew T, Schmitz G, Bluher M, Bornstein SR, Fischer M: Adipocyte fatty acid-binding protein levels are associated with left ventricular diastolic dysfunction in morbidly obese subjects. *Nutr Diabetes* 2014; 4: e106.
22. R Development Core Team : R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2008.
23. Tibshirani R, Bien J, Friedman J, Hastie T, Simon N, Taylor J, Tibshirani RJ: Strong Rules for Discarding Predictors in Lasso-type Problems. *JRSSB* 2012; 74 (2): 245-266.
24. Ota H, Furuhashi M, Ishimura S, Koyama M, Okazaki Y, Mita T, Fuseya T, Yamashita T, Tanaka M, Yoshida H, Shimamoto K, Miura T: Elevation of fatty acid-binding protein 4 is predisposed by family history of hypertension and contributes to blood pressure elevation. *Am J Hypertens* 2012; 25:1124–1130.
25. Fuseya T, Furuhashi M, Yuda S, Muranaka A, Kawamukai M, Mita T, Ishimura S, Watanabe Y, Hoshina K, Tanaka M, Ohno K, Akasaka H, Ohnishi H, Yoshida H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T: Elevation of circulating fatty acid-binding protein 4 is independently associated with left ventricular diastolic dysfunction in a general population. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13:126.
26. Hao Y, Ma X, Luo Y, Shen Y, Dou J, Pan X, Bao Y, Jia W: Serum Adipocyte Fatty Acid Binding Protein Levels Are Positively Associated With Subclinical

Atherosclerosis in Chinese Pre- and Postmenopausal Women With Normal Glucose Tolerance. *Clin Endocrinol Metab* 2014; 299: 4321–4327.

27. Zhong L, Li Q, Jiang Y, Cheng D, Liu Z, Wang B, Luo R, Cheng Q, Quing H: : The ApoB/ApoA1 ratio is associated with metabolic syndrome and its components in a Chinese population. *Inflammation* 2010; 33:353–358.

28. Jing F, Mao Y, Guo J, Zhang Z, Li Y, Ye Z, Ding Y, Wang J, Jin M, Chen K: The value of Apolipoprotein B/Apolipoprotein A1 ratio for metabolic syndrome diagnosis in a Chinese population: a cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease* 2014;13:81-87.

29. Panayiotou A, Griffin M, Georgiou N, Bond D, Tyllis T, Tziakouri-Shiakalli C, Fessas C, Nicolaides A: ApoB/ApoA1 ratio and subclinical atherosclerosis. *Int Angiol* 2008;27(1):74-80.

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of study subjects

Parameters	Controls n=21	MetS- n=34	MetS+ n=17
Age (years)	47.0 ± 17.3	40.8 ± 15.5	47.9 ± 14.5
A-FABP (µg/L)	21.6 ± 11.0 ^c	21.5 ± 9.5 ^c	38.4 ± 30.1 ^{a,b}
C-IMT (mm)	0.60 ± 0.12 ^c	0.60 ± 0.14 ^c	0.80 ± 0.13 ^{a,b}
SBP (mm Hg)	129.4 ± 14.3	122.0 ± 14.3 ^c	139.3 ± 16.1 ^b
DBP (mm Hg)	77.8 ± 7.8	75.6 ± 9.5	81.6 ± 8.7
BMI (kg/m ²)	24.2 ± 3.0 ^c	24.8 ± 3.6 ^c	29.7 ± 4.0 ^{a,b}
Waist circumference (cm)	78.5 ± 8.7 ^c	86.0 ± 11.4 ^c	100.5 ± 9.9 ^{a,b}
hs-CRP (mg/L)	1.8 ± 2.4 ^c	2.9 ± 3.5	3.4 ± 3.8 ^a
Total cholesterol (mmol/L)	5.9 ± 0.8 ^{b,c}	7.4 ± 1.4 ^a	7.2 ± 1.9 ^a
Triglycerides (mmol/L)	1.0 ± 0.25 ^{b,c}	2.3 ± 1.75 ^{a,c}	4.2 ± 2.18 ^{a,b}
LDL- cholesterol (mmol/L)	3.6 ± 0.76 ^b	4.9 ± 1.32 ^a	4.3 ± 1.6
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.9 ± 0.42 ^{b,c}	1.5 ± 0.44 ^{a,c}	1.1 ± 0.26 ^{a,b}

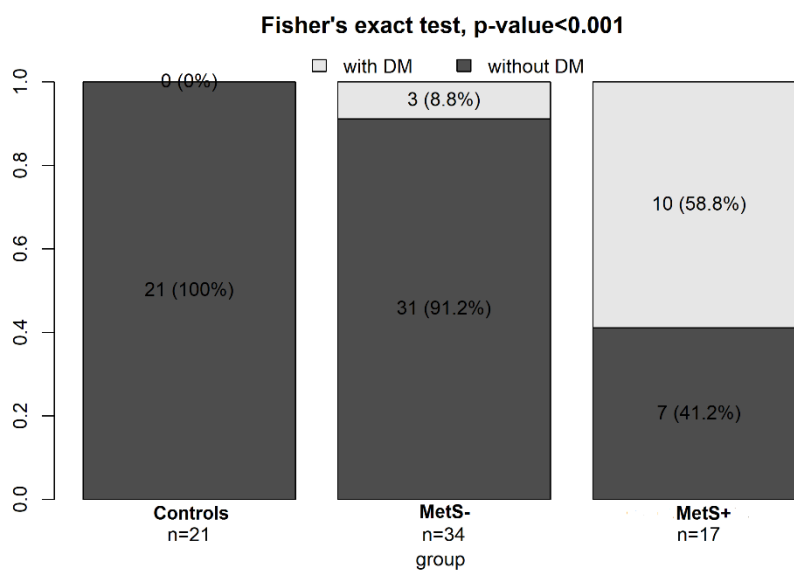
nonHDL-cholesterol (mmol/L)	4.0 ± 0.75 ^{b,c}	5.9 ± 1.41 ^a	6.2 ± 1.83 ^a
ApoA1 (g/L)	1.9 ± 0.32 ^c	1.7 ± 0.43	1.4 ± 0.26 ^a
ApoB (g/L)	0.9 ± 0.18 ^{b,c}	1.4 ± 0.29 ^a	1.4 ± 0.38 ^a
ApoB/ApoA1	0.5 ± 0.17 ^{b,c}	0.9 ± 0.30 ^a	1.0 ± 0.26 ^a
Fasting glycaemia (mmol/L)	4.9 ± 0.37	5.0 ± 0.55	5.5 ± 0.91
Insulin (mIU/L)	7.4 ± 4.86 ^c	8.4 ± 3.74 ^c	12.5 ± 4.64 ^{a,b}
C-peptide (mg/L)	510.9 ± 376.21 ^c	741.9 ± 235.76 ^c	1026.4 ± 345.66 ^{a,b}

MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; A-FABP, adipocyte fatty acid-binding protein; IMT, carotid intima-media thickness; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; hs-CRP, high sensitivity C reactive protein; ApoA1, Apo lipoprotein A1; ApoB, Apo lipoprotein B

Data are presented as mean ± standard deviation.

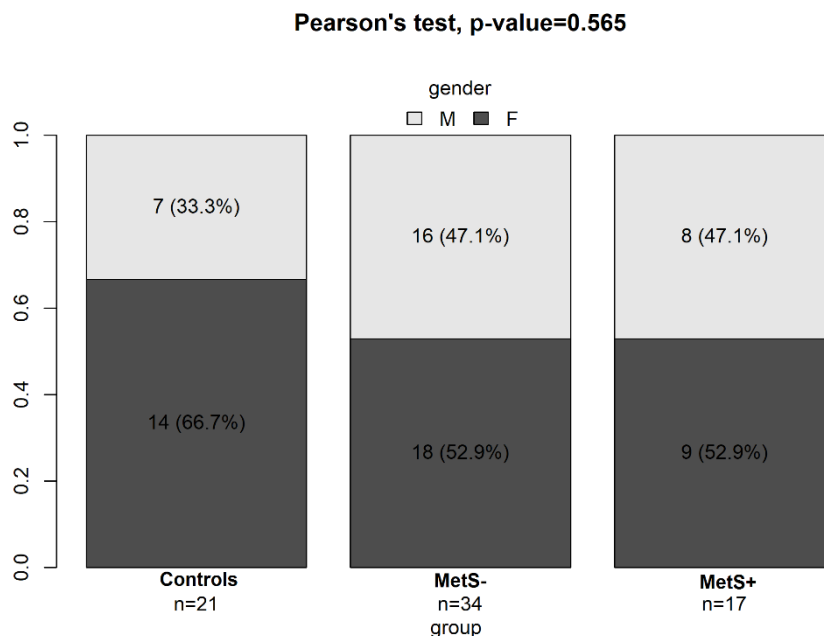
Differences in variables between subgroups were analyzed with ANOVA after adjustment for age and sex. Significant difference p<0.05 at least - ^a vs. Controls; ^b vs. MetS-; ^c vs. MetS+

Figure 1. Presence of diabetes mellitus in study groups



MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; DM, diabetes mellitus.

Figure 2. Gender distribution of the studied groups



MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; M, male gender; F, female gender

Table 2. Linear model of C-IMT mean for all study individuals (n=65) after stepwise selection process for initial model with regressors: group, gender, hypertension, age, waist circumference, nonHDL-cholesterol and ApoB/apoA1 (Multiple R²=0.71, Adjusted R²=0.69).

Coefficient	Estimate	Std. Error	P value	Significance
(Intercept)	0.1148	0.0809	0.161	NS
male gender	0.0513	0.0254	0.048	< 0.05
hypertension	0.0514	0.0275	0.0666	NS
age	0.0050	0.0007	0.000	< 0.001
waist circumference	0.0019	0.0011	0.0851	NS
nonHDL-cholesterol	0.0258	0.0710	0.000	< 0.001
Residuals:				
Min	1st quartile	Median	3rd quartile	Max
-0.2480	-0.0477	0.0014	0.0268	0.2459

Table 3. Linear model of C-IMT mean for subset of controls (n=18) after one leverage observation exclusion from initial model with the same regressors (Multiple R²=0.89,

Adjusted R²=0.87).

Coefficient	Estimate	Std. Error	P value	Significance
(Intercept)	0.1434	0,0809	0.1610	NS
waist circumference	<i>0.0031</i>	<i>0,0011</i>	<i>0.0122</i>	<i>< 0.05</i>
Residuals:				
Min	1st quartile	Median	3rd quartile	Max
-0.0256	-0.0255	0.0062	0.0162	0.0505

Table 4. Linear model of C-IMT mean for subset of dislipidemic patients without metabolic syndrome MetS- (n=34, Multiple R²=0.72, Adjusted R²=0.7).

Coefficient	Estimate	Std. Error	P value	Significance
(Intercept)	<i>0.2452</i>	<i>0.0511</i>	<i>0.0000</i>	<i>< 0.001</i>
age	<i>0.0069</i>	<i>0.0009</i>	<i>0.0000</i>	<i>< 0.001</i>
ApoB/apoA1	<i>0.1384</i>	<i>0.0456</i>	<i>0.0048</i>	<i>< 0.01</i>
Residuals:				
Min	1st quartile	Median	3rd quartile	Max
-0.1986	-0.0359	0.0085	0.0384	0.1299

Research Article

The Relationship of Serum Fibroblast Growth Factor 21 Levels to Intima-Media Thickness in Dyslipidemic Patients

Orsag J^{*}, Karasek D¹, Krskova M², Halenka M¹, Vaverkova H¹, Gajdova J¹, Novotny D³, Lukes J³

¹Department of Internal Medicine III – Nephrology, Rheumatology and Endocrinology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

²Computer Centre, Palacky University Olomouc, Czech Republic

³Department of Medical Chemistry and Biochemistry, University Hospital Olomouc, Czech Republic

***Corresponding author:** Orsag J, Department of Internal Medicine III – Nephrology, Rheumatology and Endocrinology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic, Tel.: +420 588-444-747; Fax: +420 588-442-526; Email: jiri.orsag@fnol.cz

Received: August 15, 2014; **Accepted:** September 23, 2014; **Published:** September 29, 2014

Abstract

Dyslipidemias are very important risk factors for onset of atherosclerosis. Serum fibroblast growth factor 21 (FGF 21) could be a new promising marker to determine the risk of atherosclerosis. However, there is limited information about the relationships of FGF 21 and atherosclerosis in recent literature the aim of this study was to evaluate relationships of serum FGF 21 levels to intima-media thickness (IMT), as a surrogate marker of subclinical atherosclerosis manifestation, in dyslipidemic patients. We examined 155 individuals divided into 3 groups: dyslipidemic patients with or without metabolic syndrome (MetS+, MetS-) and controls. We found significantly higher serum FGF 21 levels and IMT in MetS+ group than in MetS- group ($p < 0.05$) as well as in controls ($p < 0.05$). In MetS- group and in all dyslipidemic patients (MetS- and MetS+), IMT correlated positively with serum FGF 21 ($r = 0.486$, $r = 0.573$; $p < 0.01$ both). In MetS- group, IMT was independently associated with FGF 21 ($p < 0.01$). We verified independent positive association between IMT and FGF 21 in Caucasian dyslipidemic patients without presence of metabolic syndrome.

Keywords: Fibroblast growth factor 21; Intima-media thickness; Dyslipidemia; Metabolic syndrome

Abbreviations

ANOVA: Analysis of variance; ApoA1: Apo lipoprotein A1; ApoB: Apo lipoprotein B; BMI: Body mass index; CCA: Common carotid artery; DBP: Diastolic blood pressure; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; FGF 21: Fibroblast growth factor 21; GOD-PAP method: Glucose oxidase- peroxidase method; HDL: High density lipoprotein; HDL-C: HDL-cholesterol; Hs-CRP: High sensitivity C reactive protein; IMT: Intima-media thickness; IRMA: Immunoradiometric assay; LDL: Low density lipoprotein; LDL-C: LDL-cholesterol; MetS+: Dyslipidemic patients with metabolic syndrome; MetS-: Dyslipidemic patients without metabolic syndrome; NonHDL-C: NonHDL-cholesterol; SBP: Systolic blood pressure; SPSS: Statistical package for the social sciences; TNF alpha: Tumor necrosis factor alpha; TC: Total cholesterol; TG: Triglycerides

Introduction

Diseases associated with atherosclerosis as stroke or myocardial infarction play the most important role in mortality and morbidity worldwide, especially in highly developed countries. Beside the classical risk factors, new markers for onset of atherosclerosis are searching. Serum fibroblast growth factor 21 (FGF 21) could be this new promising marker to determine the risk of atherosclerosis.

FGF 21 is a protein predominantly produced by the liver; but it is also expressed in adipocytes and the pancreas [1, 2]. It is widely involved in glucose and lipid metabolism through pleiotropic actions in these tissues and the brain. In mice, fasting leads to increased expression of FGF 21 in the liver where stimulates gluconeogenesis, fatty acid oxidation and ketogenesis, as an adaptive response to fasting

and starvation [3]. Administration of recombinant FGF 21 has been shown to confer multiple metabolic benefits on insulin sensitivity, blood glucose, lipid profile and body weight in obese mice and diabetic monkeys [4, 5]. FGF 21 seems to be a promising therapeutic agent for obesity related medical conditions [6]. In contrast with this findings, in human studies, high circulating FGF 21 levels are found in obesity and its related cardiometabolic diseases including the metabolic syndrome, diabetes type 2, non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease [7,8]. This paradoxical increase of FGF 21 level might be a defensive response of the human body to counteract the metabolic stress, or it maybe caused by resistance to FGF 21 actions, leading to its compensatory up regulation [2, 9]. Serum FGF 21 could be used as potential biomarker for the early detection of these cardiometabolic disorders [10].

The aim of the cross sectional study was to evaluate relationships of serum FGF 21 levels to intima-media thickness of the arteria carotis communis, as a surrogate marker of subclinical atherosclerosis manifestation, in dyslipidemic patients.

Materials and Methods

Study design and subjects

The study cohort included Czech asymptomatic dyslipidemic subjects without lipid modifying therapy and healthy volunteers who underwent carotid IMT measurement in the Lipid Centre of the Department of Internal Medicine III, University Hospital Olomouc, Czech Republic. Medical history was obtained and physical examination performed. All subjects were tested for secondary hyperlipidemia: hypothyroidism, renal or hepatic diseases

Table 1: Clinical and biochemical characteristics of study subjects.

Parameters	Controls n=50	MetS- n=54	MetS+ n=51
Age (years)	45.2 ± 17.0	41.8 ± 14.6	48.4 ± 11.4
FGF 21 (ng/l)	141.0 (68.5-210.1) ^a	169.2 (106.1-255.7) ^a	290.6 (200.3-537.6) ^{a,b}
IMT (mm)	0.65 ± 0.12 ^a	0.65 ± 0.14 ^a	0.76 ± 0.13 ^{a,b}
SBP (mm Hg)	129.7 ± 14.6	123.6 ± 14.8 ^a	135.2 ± 13.7 ^a
DBP (mm Hg)	79.2 ± 9.3 ^a	76.0 ± 17.0 ^{a,b}	81.6 ± 7.4 ^a
BMI (kg/m ²)	25.5 ± 4.7 ^a	25.0 ± 3.9 ^a	30.0 ± 3.8 ^{a,b}
Waist circumference (cm)	84.8 ± 14.8 ^a	87.2 ± 11.4 ^a	100.5 ± 13.1 ^{a,b}
hs-CRP (mg/l)	1.00 (0.50-2.20) ^a	1.75 (0.73-2.98) ^a	2.70 (1.10-4.30) ^{a,b}
Total cholesterol (mmol/l)	5.62 ± 0.88 ^{a,b}	7.19 ± 1.31 ^a	7.42 ± 1.70 ^a
Triglycerides (mmol/l)	1.05 (0.83-1.21) ^a	1.78 (1.54-2.72) ^a	3.81 (2.34-7.12) ^{a,b}
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.47 ± 0.78 ^a	4.76 ± 1.24 ^a	3.79 ± 1.65 ^a
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.68 ± 0.50 ^{a,b}	1.42 ± 0.38 ^{a,b}	1.08 ± 0.29 ^{a,b}
nonHDL-cholesterol (mmol/l)	3.94 ± 0.81 ^{a,b}	5.77 ± 1.29 ^a	6.27 ± 2.11 ^a
ApoA1 (g/l)	1.70±0.40 ^a	1.64±0.37 ^a	1.40±0.24 ^{a,b}
ApoB (g/l)	0.91 ± 0.18 ^{a,b}	1.33 ± 0.27 ^a	1.29 ± 0.36 ^a
Fasting glycaemia (mmol/l)	5.09 ± 0.58 ^a	5.06 ± 0.52 ^a	5.94 ± 1.35 ^{a,b}
Insulin (mIU/l)	6.85 (4.68-11.30) ^a	8.00 (6.30-10.05) ^a	11.85 (8.46-15.85) ^{a,b}
C-peptide (mg/l)	653.5 (411.7-1019.0) ^a	714.0 (532.5-923.5) ^a	1079.0 (771.3-1486.5) ^{a,b}

MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; FGF 21, fibroblast growth factor 21; IMT, carotid intima-media thickness; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; hs-CRP, high sensitivity C reactive protein; ApoA1, Apo lipoprotein A1; ApoB, Apo lipoprotein B

Data are presented as means ± standard deviation for parameters with normal distribution or median (interquartile range) for parameters with skew distribution.

Parameters with skewed distribution (FGF 21, CRP, TG, insulin, C-peptide) were log transformed to normalize their distribution before statistical analysis.

Differences in variables between subgroups were analyzed with ANOVA after adjustment for age and sex. Significant difference p<0.05 at least - * vs. Controls; ^a vs. MetS-; ^b vs. MetS+

and nephrotic syndrome. From the study were excluded patients with hypolipidemic therapy in previous 6 weeks, with hormone therapy, with secondary hyperlipidemias, with acute infection or trauma or with acute cardiovascular event in previous 3 month (without personal history of acute coronary syndrome or myocardial infarction, without elevation of troponin T or ischemic changes on electrocardiogram). Hypertension was defined as a sitting blood pressure of $\geq 120/80$ mm Hg, taken as a mean of 3 readings or on regular antihypertensive medications. Dyslipidemia was defined as having one or more of the following criteria: triglycerides (TG) ≥ 1.5 mmol/l, Apo lipoprotein B (apoB) ≥ 1.2 g/l [11]. The value for TG was chosen because small dense LDL particles become common above this level [12], the value for apoB was chosen because it is a level from which cardiovascular risk rapidly increases [13]. Dyslipidemic individuals were divided into two groups: 50 hyperlipidemic patients with presence of metabolic syndrome (MetS+, males/females: 28/22, mean age: 48.3±11.3 years) and 53 hyperlipidemic patients with absence of metabolic syndrome (MetS-, males/females: 25/28, mean age: 41.8±14.5 years). Criteria for identification of MetS were used according to 2001 National Cholesterol Education Program/ATP III. 50 normolipidemic healthy subjects (males/females: 30/20, mean age: 45.2±16.8 years) served as a control group. The study was reviewed and approved by Ethics Committee of Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc and informed consent was obtained from all participants.

Laboratory analysis

All subjects were assessed after overnight fasting for at least 12 hours. Venous blood samples were obtained and after centrifugation, the serum was used for analysis. Routine serum biochemical parameters were analyzed in the day of blood collection, concentrations of adipokines were measured in the sample aliquots stored at -80 °C, no longer than 6 months. Total cholesterol (TC), TG and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were determined enzymatically on Modular SWA system (Roche, Basel, Switzerland). HDL-C was measured by direct method without precipitation of apoB containing lipoproteins. Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were calculated using Friedewald formula. NonHDL-cholesterol (nonHDL-C) was calculated as TC - HDL-C. Concentration of apoB and Apo lipoprotein A1 (apoA1) were determined immunoturbidimetrically using Tina-Quant ApoB and ApoA-1 kits (Roche, Basel, Switzerland). Glucose was measured using GOD-PAP method (Roche, Basel, Switzerland). Insulin and C-peptide were determined by the commercially available kits (Immunotech, Marseille, France) using specific antibodies by the IRMA method. FGF 21 levels were determined using Human FGF 21 ELISA kits (Biovendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic).

Measurement of carotid IMT

High-resolution B-mode ultrasound (Philips Sonos 5500, 2004)

was used to measure the IMT of the common carotid arteries (CCA). Linear array transducers with frequency of 10 MHz was used. The longitudinal image of the CCA was displayed just before the widening of the bulb. When an optimal longitudinal image of the far wall of the CCA in the region of 1 cm proximally from the bulb was obtained, it was frozen on the R wave according to a simultaneous ECG and video tapered. Three video records were made on both CCA. IMT measurements were processed off-line using the software Image-Pro plus (Version 4.0, Media-Cybernetics, Silver Spring, USA). The region under evaluation was the CCA wall 1-2 cm distant proximally from the mentioned border. The average of all mean IMT of three

frozen images of both sides was chosen as outcome variable.

Statistical analysis

All analysis was performed with Statistical Package for Social Sciences Version 12.0 (SPSS) (Chicago, IL, USA). Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD) or median with interquartile range as appropriate. Differences in means between groups were analyzed using ANOVA after adjustment for age and sex. Data that were not normally distributed (FGF 21, hs-CRP, TG, insulin, C-peptide) as determined using Kolmogorov-Smirnov test, were log transformed before analysis. For statistical evaluation of a correlation

Table 2: Correlations of FGF 21 levels with various clinical and biochemical parameters.

	FGF21 Controls	FGF21 MetS-	FGF21 MetS+	FGF21 MetS+ and MetS-
IMT	-0.043	0.488	0.264	0.673
	0.868	0.006	0.324	0.000
Age	-0.037	0.468	0.081	0.310
	0.809	0.001	0.654	0.002
Sex	-0.283	-0.115	0.018	0.008
	0.068	0.443	0.902	0.930
Waist circumference	-0.044	0.223	0.194	0.468
	0.803	0.192	0.261	0.000
BMI	0.115	0.216	0.127	0.374
	0.459	0.145	0.391	0.000
SBP	-0.038	-0.051	0.059	0.163
	0.801	0.746	0.697	0.127
DBP	-0.033	-0.050	0.225	0.200
	0.829	0.761	0.133	0.060
Total cholesterol	-0.130	0.086	0.241	0.169
	0.390	0.661	0.099	0.099
Triglycerides	0.143	0.154	0.348	0.444
	0.343	0.266	0.015	0.000
LDL-cholesterol	-0.194	0.133	-0.070	-0.071
	0.195	0.366	0.642	0.499
HDL-cholesterol	0.028	-0.159	-0.064	-0.278
	0.651	0.279	0.667	0.006
nonHDL-cholesterol	-0.188	0.134	0.246	0.202
	0.210	0.366	0.093	0.048
ApoA1	0.119	-0.064	-0.041	-0.183
	0.436	0.664	0.781	0.074
ApoB	-0.098	0.162	0.142	0.093
	0.617	0.273	0.336	0.367
hs-CRP	0.000	0.009	0.127	0.136
	1.000	0.963	0.400	0.198
Fasting glycaemia	0.042	0.155	-0.048	0.125
	0.782	0.294	0.745	0.228
C-peptide	0.408	0.333	-0.045	0.273
	0.005	0.021	0.765	0.007
Smoking	0.385	0.375	0.488	0.462
	0.008	0.009	0.000	0.000

MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; FGF 21, fibroblast growth factor 21; IMT, carotid intima media thickness; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; hs-CRP, high sensitivity C reactive protein; ApoA1, Apo lipoprotein A1; ApoB, Apo lipoprotein B

Spearman correlation analysis for parameters with skewed distribution (FGF 21, CRP, TG, insulin, C-peptide). Bold values indicate significance at $p < 0.05$.

between individual parameters Pearson correlation analysis was used for variables with normal distribution and an univariate Spearman correlation analysis for variables with skewed distribution. Multiple regression analysis was done for testing of an independent association between dependent and independent variables. Probability values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

The demographic, clinical and biochemical characteristic of the subjects divided into three groups (healthy controls, dyslipidemic patients with or without presence of metabolic syndrome) are summarized in Table 1. Individuals with MetS (MetS+) had expected unfavorable lipid and lipoprotein profiles (elevated TC, TG, and nonHDL-C, ApoB, and decreased HDL-C and ApoA1) and marked signs of insulin resistance (increased levels of glucose, insulin and C-peptide). FGF 21 concentrations were in this group significantly higher in comparison with both MetS- and controls, whilst differences in FGF 21 levels between MetS- and controls were not significant. Similar results were found in IMT (significantly thicker IMT in MetS+ than in MetS- and in controls, but no difference between MetS- and controls).

In Table 2, correlations of adipokine FGF 21 with other parameters in various study groups are presented. In MetS- group, FGF 21 positively correlated with IMT (see Figure-1), age, C-peptide and smoking, but in MetS+ group, FGF 21 positively correlated only with TG and smoking. In all dyslipidemic patients (MetS- and MetS+ group) FGF 21 correlated with more parameters - positively with IMT, age, waist circumference, BMI, TG, nonHDL-C, C-peptide and smoking, negatively with HDL-C.

In order to evaluate the independent association followed up parameters with IMT, the multiple regression analysis with IMT as dependent variables and correlated parameters as independent predictor was performed (see Table 3). In MetS- group, IMT was independently positively associated with FGF 21 and nonHDL-C in both the full regression model ($\beta = 0.3449$, $p = 0.01$; $\beta = 0.1775$, $p < 0.05$) and the stepwise regression model ($\beta = 0.3401$, $p = 0.01$; $\beta = 0.1738$, $p < 0.05$). However, in MetS+ group, IMT was independently positively associated with waist circumference, non

HDL-C and SBP and negatively with TG in both regression models.

Nevertheless, the association IMT with FGF 21 lost its significance, when multivariate regression analysis was performed in all patients (MetS- and MetS+).

Discussion

In our study, we confirm the well-established risk profile of individuals with MetS. They had unfavorable lipid and lipoprotein profiles, as well as increased parameters of insulin resistance. Increased levels of FGF 21 in MetS+ subjects are consistent with recent literature [2]. Fibroblast growth factor 21, as a member of the FGF superfamily, involves many metabolic pathways, especially these regulated by nutritional status. It has multiple beneficial effects on glucose and lipid metabolism in animal models, on the other hand, high levels of FGF 21 are found in cardio metabolic diseases such as obesity, type 2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease in human [10]. This could be explained by the FGF 21 resistant state [9], analogous to insulin resistance in these clinical conditions. For activation of FGF 21 mediating signaling is crucial binding a FGF receptor: beta-Klotho complex [14]. A recent study suggests that adipose tissue inflammation in obesity can lead to the repression of beta-Klotho expression by TNF alpha and impaired FGF 21 in adipocytes [15]. Similar pathways could also lead to FGF 21 resistance in subclinical inflammation such as metabolic syndrome, type2 diabetes and coronary artery disease [10]. However, the finding that elevated serum FGF 21 levels are significantly associated with carotid IMT suggest that the elevation of serum FGF 21 levels in individuals with atherosclerosis could be a compensatory protective response to atherosclerotic process [16]. Consistent with this theory, elevated serum FGF 21 levels were observed in mice after administration of variety of stimulants that induce an acute phase response [17]. Mraz et al. [18] showed significantly higher serum FGF 21 levels with a visceral fat FGF 21 mRNA expression in obese subject compared with that of lean subjects. Consequently, Ikonomidis et al. [19] supplied other evidence for the theory of presence of elevated serum adipokines levels as a compensatory response to inflammation and atherosclerosis. They revealed, that increased mRNA and protein expression of adiponectin receptors is related with increased aortic stiffness, coronary and peripheral atherosclerosis in patients with coronary artery disease. In recent study, there was found that administration of FGF 21 protects H9c2 cardiomyoblasts against hydrogen peroxide-induced oxidative stress injury [20].

In present study, FGF 21 positively correlated with IMT (independent association was verified only in MetS- group), age, waist circumference, BMI, TG, nonHDL-C, C-peptide and smoking, negatively with HDL-C in dyslipidemic individuals. These relationships have been demonstrated in previous studies: higher levels of FGF 21 and positive correlation with TG in patients with coronary artery disease and dyslipidemia [21], independent association with TG and LDL-C in patients with impaired glucose tolerance and/or type 2 diabetes [22] or positive correlation with adiposity and TG in individuals with metabolic syndrome [2,23]. However, there are limited data about the relationships of FGF 21 and carotid IMT in recent literature. Only Chow et al. demonstrated independent positive association between FGF 21 and carotid IMT in women, but

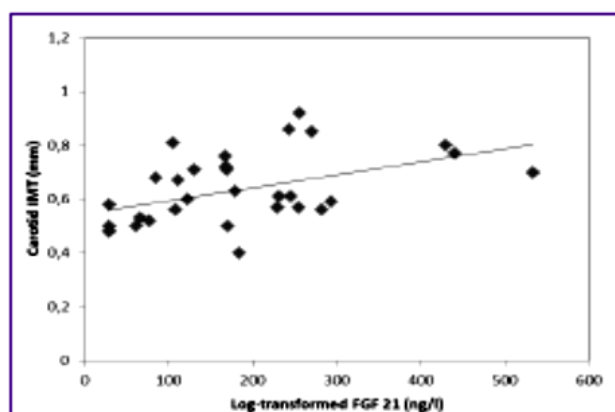


Figure 1: Correlation between serum fibroblast growth factor 21 (FGF 21) levels and carotid intima-media thickness (IMT) in dyslipidemic patients without metabolic syndrome (MetS-). $r = 0.486$; $p < 0.01$.

Table 3: Multiple linear regression analysis showing the parameters with significant independent associations with carotid intima-media thickness in different study groups.

			FGF 21*	TG*	Waist	nonHDL-C	SBP
MetS-	Full RM	beta	0.3448	-0.0091	0.2432	0.1776	-
		p-value	0.0110	0.8564	0.2376	0.0453	-
	Stepwise RM	beta	0.3401	-	0.2351	0.1738	0.2489
		p-value	0.0110	-	0.2450	0.0468	0.1440
MetS+	Full RM	beta	-0.0124	-0.1067	0.6768	0.1898	0.2468
		p-value	0.9168	0.0255	<0.001	0.0059	0.0363
	Stepwise RM	beta	-	-0.1067	0.6768	0.1878	0.2438
		p-value	-	0.0240	<0.001	0.0044	0.0336
MetS- and MetS+	Full RM	beta	0.1787	-0.0768	0.4364	0.1682	0.2030
		p-value	0.0604	0.0044	<0.001	0.0021	0.0395
MetS+	Stepwise RM	beta	0.1787	-0.0768	0.4364	0.1682	0.2030
		p-value	0.0604	0.0043	<0.001	0.0044	0.0400

MetS-, dyslipidemic patients without metabolic syndrome; MetS+, dyslipidemic patients with metabolic syndrome; FGF 21, fibroblast growth factor 21; IMT, carotid intima media thickness; SBP, systolic blood pressure; TG, triglycerides; nonHDL-C, nonHDL-cholesterol; Waist, waist circumference; RM, regression model.

*Log transformed before analyses. Bold values indicate significance at p<0.05

not in men from a large cohort of Southern Chinese subjects [16]. Authors explain this difference by overwhelming presence of other cardiovascular risk factors in male subjects of their cohort, including a higher prevalence of smoking history and an older mean age. In our study, we described independent association of FGF 21 with carotid IMT in dyslipidemic patients without metabolic syndrome (MetS-), but not in dyslipidemic patients with metabolic syndrome (MetS+). This may be caused by presence of other stronger cardiovascular risk factors in our MetS+ individuals. There were significantly higher values of established laboratory and clinical cardiovascular risk factors in MetS+ group (BMI, waist circumference, IMT, fasting glycaemia). Higher number of men in comparison with women in MetS+ group could play a role, because the independent association between FGF 21 and IMT was demonstrated only in women, not in men, as showed Chow et al. [16]. There was a higher prevalence of smoking in MetS+ group and this may contribute to overwhelming presence of atherogenic risk factors in these patients. There was significant correlation of FGF 21 levels with smoking in all groups (see Table 2). In addition, our study had some limitations. The main limitation was its cross-sectional design. Our findings could not rule out the possibility of a reverse causal relationship between FGF 21 and carotid IMT. Study participants were mostly asymptomatic dyslipidemic patients without clinical manifestation of cardiovascular diseases. Our findings remain to be confirmed in other larger studies in the future.

Conclusion

In our study, we have found significantly higher serum FGF 21 concentrations and intima-media thickness (IMT) in dyslipidemic patients with metabolic syndrome (MetS+) in comparison with dyslipidemic patients without metabolic syndrome (MetS-) and controls. In MetS- group and in all dyslipidemic patients (MetS- and MetS+), IMT correlated positively with serum FGF 21. We also described independent association of FGF 21 with carotid IMT in dyslipidemic patients without metabolic syndrome (MetS-), but not in dyslipidemic patients with metabolic syndrome (MetS+). This may be caused by presence of stronger established cardiovascular risk

factors in our MetS+ individuals.

Acknowledgment

This work was supported by the Internal Grant Agency of Palacky University, Czech Republic, Nr. LF_2014_011.

References

- Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1492: 203-206.
- Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*. 2008; 57: 1246-1253.
- Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukous G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab*. 2007; 5: 426-437.
- Kharitonov A, Wroblewski VJ, Koester A, Chen YF, Clutinger CK, Tigno XT, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*. 2007; 148: 774-781.
- Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*. 2008; 149: 6018-6027.
- Dostálová I, Haluzíková D, Haluzík M. Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator with potential therapeutic properties in obesity/type 2 diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2009; 58: 1-7.
- Yilmaz Y, Eren F, Yonal O, Kurt R, Aktas B, Celikel CA, Ozdogan O. Increased serum FGF21 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Clin Invest*. 2010; 40: 887-892.
- Shen Y, Ma X, Zhou J, Pan X, Hao Y, Zhou M, et al. Additive relationship between serum fibroblast growth factor 21 level and coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2013; 12: 124.
- Fisher FM, Chul PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonov A, Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes*. 2010; 59: 2781-2789.
- Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam KS. Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013; 78: 489-496.
- Sniderman AD. Applying apoB to the diagnosis and therapy of the

- atherogenic dyslipoproteinemias: a clinical diagnostic algorithm. *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15: 433-438.
12. Campos H, Biljevens E, McNamara JR, Ordovas JM, Posner BM, Wilson PW, et al . LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb.* 1992; 12: 1410-1419.
 13. Demacker PN, Veerkamp MJ, Bredie SJ, Marcovina SM, de Graaf J, Stalenhoef AF . Comparison of the measurement of lipids and lipoproteins versus assay of apolipoprotein B for estimation of coronary heart disease risk: a study in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2000; 153: 483-490.
 14. Khartonenkov A, Dunbar JD, Bina HA, Bright S, Moyers JS, Zhang C, et al . FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J Cell Physiol.* 2008; 215: 1-7.
 15. Diaz-Deilfin J, Hondares E, Iglesias R, Giralt M, Caelles C, Villarroya F . TNF- α represses β -Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology.* 2012; 153: 4238-4245.
 16. Chow WS, Xu A, Woo YC, Tso AW, Cheung SC, Fong CH, et al . Serum fibroblast growth factor-21 levels are associated with carotid atherosclerosis independent of established cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 2454-2459.
 17. Feingold KR, Grunfeld C, Heuer JG, Gupta A, Cramer M, Zhang T, et al . FGF21 is increased by inflammatory stimuli and protects leptin-deficient ob/ob mice from the toxicity of sepsis. *Endocrinology.* 2012; 153: 2689-2700.
 18. Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z, Michalsky D, Kasalicky M, Haluzkova D, et al . Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009; 71: 369-375.
 19. Ikonomidis I, Kadoglou N, Tsiotra PC, Kollas A, Palios I, Fountoulaki K, et al . Arterial stiffness is associated with increased monocyte expression of adiponectin receptor mRNA and protein in patients with coronary artery disease. *Am J Hypertens.* 2012; 25: 746-755.
 20. Han MM, Wang WF, Liu MY, Li DS, Zhou B, Yu YH, et al . [FGF-21 protects H9c2 cardiomyoblasts against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in vitro]. *Yao Xue Xue Bao.* 2014; 49: 470-475.
 21. Lin Z, Wu Z, Yin X, Liu Y, Yan X, Lin S, et al . Serum levels of FGF-21 are increased in coronary heart disease patients and are independently associated with adverse lipid profile. *PLoS One.* 2010; 5: e15534.
 22. Chen C, Cheung BM, Tso AW, Wang Y, Law LS, Ong KL, et al . High plasma level of fibroblast growth factor 21 is an independent predictor of type 2 diabetes: a 5.4-year population-based prospective study in Chinese subjects. *Diabetes Care.* 2011; 34: 2113-2115.
 23. Novotny D, Vaverkova H, Karasek D, Lukes J, Slavik L, Malina P, et al . Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. *Physiol Res.* 2014; 63: 219-228.

Research Article

Fibroblast Growth Factor 21 and Endothelial/Hemostatic Markers in Dyslipidemic Subjects

Novotny D^a, Karasek D^a, Vaverkova H^a, Orsag J^a and Kubickova V^b

^aDepartment of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc, Czech Republic

^bDepartment of Internal Medicine, Palacky University Olomouc, Czech Republic

*Corresponding author: Novotny D, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic

Received: October 16, 2014; Accepted: December 29, 2014; Published: December 31, 2014

Abstract

Aim: Fibroblast growth factor 21 (FGF 21) has been suggested as an independent factor for the protection of cardiovascular system cells. We performed an analysis to evaluate a possible association of FGF 21 levels with endothelial/hemostatic markers in asymptomatic dyslipidemic individuals. We hypothesized that a potential protective action could be reflected in plasma elevation of FGF 21 in patients with adverse dyslipidemic phenotype.

Methods: The study was conducted with asymptomatic patients (n = 214), subsequently divided into two groups (control group [CG], n = 66, 38 males, 28 females; dyslipidemic group [DLP], n = 148, 70 males, 78 females), according to apolipoprotein B (Apo B) and triglyceride (TG) levels. The plasma FGF 21 levels were measured by Elisa, while biochemical and endothelial/hemostatic markers were analysed by routine kit methods.

Results: In DLP group (i.e. in individuals with TG \geq 1.5 mmol and/or Apo B \geq 1.2 g/l), plasma fibrinogen and FGF 21 levels were significantly higher (p<0.01 and p<0.001, respectively), compared to CG. We observed no significant differences in parameters of insulin resistance between groups after adjustment for sex, age and body mass index (BMI). The multiple regression analysis revealed that FGF 21 was associated positively with von Willebrand factor (vWF, p = 0.0031), tissue plasminogen activator (tPA, p = 0.0099), and glucose (p = 0.0313) only in DLP individuals.

Conclusion: The significant positive association of FGF 21 with vWF and tPA in subjects with no clinical symptoms of atherosclerosis could be related to emerging endothelial damage in dyslipidemic patients, although clinically asymptomatic.

Keywords: Fibroblast growth factor 21; Dyslipidemia; Endothelial dysfunction; von Willebrand factor; Tissue plasminogen activator

Abbreviations

ANOVA: Analysis of Variance; Apo A1: Apolipoprotein A1; Apo B: Apolipoprotein B; BMI: Body Mass Index; CG: Control Group; DBP: Diastolic Blood Pressure; DLP: Dyslipidemic Phenotype; ED: Endothelial Dysfunction; ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay; FGF 21: Fibroblast Growth Factor 21; GOD-PAP: Glucose Oxidase- peroxidase Method; HDL: High-density Lipoproteins; IR: Insulin Resistance; IRMA: Immunoradiometric Assay; LDLc: Low-density Lipoprotein cholesterol; MetS: Metabolic Syndrome; mRNA: Messenger Ribonucleic Acid; oxLDL: Oxidized Low-density Lipoproteins; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; PINS: Proinsulin; RIA: Radioimmuno Assay; SBP: Systolic Blood Pressure; SD: Standard Deviation; sICAM-1: Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1; SPSS: Statistical Package for the Social Sciences; sTBM: Soluble Thrombomodulin; sVCAM-1: Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1; TC: Total Cholesterol; TG: Triglycerides; tPA: Tissue Plasminogen Activator; vWF: von Willebrand Factor

Introduction

Adipokines have been recognized as adipocyte proteins which link obesity with metabolic and vascular diseases. Endothelial

dysfunction (ED) and atherothrombosis play significant roles in atherogenesis, and some serum markers of insulin resistance (IR), ED and/or hemostasis have been shown to predict the development of cardiovascular events, in addition to conventional risk factors [1]. Adipokines have been suggested to play an important role in these processes. Proinflammatory adipokines exert adverse effects on the vasculature by promoting of IR and monocyte infiltration into the vessel wall [2]. They also participate in low-grade proinflammatory processes leading to development of IR and cardiovascular diseases.

Fibroblast growth factor 21 (FGF 21) is considered as a new metabolic regulator of non-insulin dependent glucose transport in cells. FGF 21 improves insulin sensitivity, glucose and lipid homeostasis, and preserves beta-cell functions in diabetic animal models [3-5]. However, increased levels of FGF 21 and a negative correlation with high-density lipoproteins (HDL) and adiponectin were observed in patients with metabolic syndrome (MetS) [6]. In general, higher levels of FGF 21 are found in cardiometabolic disorders, such as obesity, MetS, type 2 diabetes mellitus, non-alcoholic fatty liver disease, and coronary artery disease in human studies [7]. These findings may indicate a compensatory response to metabolic stress or a resistance to FGF 21. The evidence from the

animal model explains FGF 21 resistance in the receptor and the post-receptor pathway, but the mechanism in humans is still unclear [8]. Recent studies have been focused on the role of FGF 21 especially in metabolic disorders [9]. Nevertheless, FGF 21 has been also suggested as an independent factor for protection of cardiovascular system cells.

We hypothesized that the above-mentioned action could be reflected in plasma elevation of FGF 21 in patients with adverse dyslipidemic phenotype. In the presented study, we also performed an analysis to explain a possible association of FGF 21 with ED markers and some parameters of IR in two cohorts of patients.

Materials and Methods

Study design and subjects

The study was carried out with the patients and their relatives who had been firstly examined in the Lipid Center of the 3rd Department of Internal Medicine, University Hospital Olomouc, Czech Republic, during the period from October 2009 to May 2012. This cohort represented a group of asymptomatic subjects (i.e. individuals without history of clinically manifest atherosclerosis-coronary artery disease, heart failure, cerebrovascular ischemic disease and peripheral vascular disease, with altered plasma lipids). All subjects were tested for an underlying cause of secondary hyperlipidemia: diabetes mellitus, hypothyroidism, renal or hepatic diseases and nephrotic syndrome. Other exclusion criteria were as follows: history of clinically manifested atherosclerosis presented by coronary artery disease, cerebrovascular disease and peripheral arterial disease, any hypolipidemic therapy in previous 8 weeks, hormone therapy and clinical presence of acute infections. All individuals filled out a questionnaire on their previous medical history, especially cardiovascular status, medication and smoking habits. Body mass index and systolic and diastolic blood pressures (SBP, DBP) were also determined. The study was reviewed and approved by Ethics Committee of Medical Faculty and University Hospital Olomouc, and written informed consent was obtained from all participants.

Dyslipidemia was defined as having one or more of the following parameters: triglycerides (TG) ≥ 1.5 mmol/l, apolipoprotein B (Apo) ≥ 1.2 g/l [10]. Individuals, who met the above-mentioned criteria, were divided into two groups (CG: Apo B <1.2 g/l and /or TG <1.5 mmol/l, n = 66, 38 males, 28 females; DLP: Apo B ≥ 1.2 g/l and /or TG ≥ 1.5 mmol/l, n = 148, 70 males, 78 females). A value 1.2 g/l for Apo B was chosen because it is level from which the cardiovascular risk increases rapidly [10]. The use of TG value in this algorithm is justified as well. It had been proved that the amount of small dense low density lipoproteins rises with TG concentration from the level of 1.5 mmol/l [10].

Laboratory analyses

Venous blood samples were drawn in the morning after a 12-h fast. After centrifugation, serum was used for other analyses. For the assessment of hemostatic markers, venous blood was collected in 3.8% sodium citrate tubes and plasma was obtained after centrifugation.

Routine serum biochemical parameters were analyzed on Modular SWA (Roche, Basel, Switzerland) in the day of the blood collection. Concentrations of FGF 21 and other special analytes were measured in the serum sample aliquotes stored at -80 (-20) °C, no longer than 6 months.

Total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and HDLc were determined enzymatically using commercial kits (Roche, Basel, Switzerland). Measurement of HDLc levels was performed by a direct method without precipitation of Apo B containing lipoproteins. Low density lipoprotein cholesterol (LDLc) levels were calculated using Friedewald formula. Apo B and Apo A1 were determined immunoturbidimetrically using Tina-Quant ApoB and ApoA-1 kits (Roche, Basel, Switzerland). Glucose was determined using enzymatic GOD-PAP method (Roche, Basel, Switzerland). Insulin was measured by the commercially available kit (Immunotech, Marseille, France) using the specific antibodies by the IRMA method. C-peptide and proinsulin (PINS) were determined using the commercially available kits: C-peptide (Immunotech, Marseille, France), and Proinsulin (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany), by IRMA and RIA methods, respectively. Serum levels of the soluble adhesion molecules s-ICAM-1 and sVCAM-1 were assessed by immunoenzymatic assay using commercially available kits s-ICAM-1 and sVCAM-1 (both Immunotech, Marseille, France).

The following hemostatic markers were examined from human plasma: fibrinogen (function coagulation method by Clauss, Technoclone, Vienna, Austria), von Willebrand factor (vWF, immunoturbidimetric assay, Instrumentation Laboratory Spa, Milan, Italy), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), tissue plasminogen activator (tPA, both ELISA, Technoclone, Vienna, Austria), and soluble thrombomodulin (sTBM, ELISA Thrombomodulin, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France).

FGF 21 was determined from the separate serum aliquot by Elisa immunochemical kit: Human FGF 21 ELISA (Biovendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic), according to the manufacturer's instructions, and after a verification of the methods. The intra- and inter-assay coefficients of variation were below 10%.

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm standard deviation (SD), and parameters with skewed distribution also as medians. The Kolmogorov-Smirnov test was used to check for normal distribution. Variables with skewed distribution (TG, Apo B, fibrinogen, vWF, tPA, PAI-1, sTBM, insulin, C-peptide, PINS, FGF 21) were log transformed in order to normalize their distribution before statistical analysis. Differences in variables between individual groups were analyzed with ANOVA, after adjustment for age, sex and BMI. For statistical evaluation of a correlation between individual parameters we used a Pearson correlation analysis for analytes with normal distribution, and a univariate Spearman correlation analysis for variables with skewed distribution. The multiple regression analysis was performed for testing of an independent association between dependent and independent variables. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows version 12.0 (Chicago, IL, USA). Probability values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results and Discussion

The basic clinical and laboratory characteristics of investigated groups are summarized in Table 1. Compared to CG subjects, DLP patients had significantly higher plasma TC, LDLc ($p < 0.001$), fibrinogen and FGF 21 ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively), and decreased HDLc and Apo A1 levels ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively),

Table 1: Basic characteristics of dyslipidemic subjects divided into CG and DLP groups.

	All subjects n = 214	CG n = 88	DLP n = 148
Male/Female	108/106	38/28	70/78
Smoking	54 (25%)	11 (17%)	43 (29%)
Age, years	46.7 ± 14.5 (35.0-57.0)	46.1 ± 15.9 (33.7-57.2)	47.0 ± 13.7 (35.3-57.0)
BMI, kg/m ²	26.99 ± 4.75 (23.25-29.51)	25.00 ± 4.06 (22.03-26.90)	27.85 ± 4.78** (24.62-30.74)
Waist, cm	91.1 ± 14.2 (80.0-100.3)	83.1 ± 11.4 (75.0-91.0)	94.2 ± 13.9 (85.0-104.0)
SBP, mm Hg	128.7 ± 15.2 (120-140)	127.6 ± 12.6 (120-140)	129.3 ± 16.2 (120-140)
DBP, mm Hg	77.8 ± 8.7 (70-80)	77.5 ± 8.0 (70-80)	77.9 ± 9.0 (70-80)
TC, mmol/l	6.69 ± 1.84 (5.48-7.58)	5.62 ± 0.93 (5.00-6.31)	7.17 ± 1.94*** (5.90-8.20)
TG, mmol/l	3.01 ± 4.21 [1.77] (1.12-3.08)	1.01 ± 0.28 [1.01] (0.83-1.23)	3.90 ± 4.80 [2.51]*** (1.71-3.88)
HDLc, mmol/l	1.37 ± 0.46 (1.02-1.63)	1.68 ± 0.49 (1.28-2.00)	1.23 ± 0.37*** (0.95-1.43)
LDLc, mmol/l	4.06 ± 1.57 (3.09-4.69)	3.48 ± 0.85 (2.96-4.08)	4.33 ± 1.74*** (3.28-5.25)
Apo A1, g/l	1.54 ± 0.37 (1.26-1.78)	1.67 ± 0.41 (1.37-2.01)	1.48 ± 0.34** (1.22-1.71)
Apo B, g/l	1.21 ± 0.38 [1.13] (0.97-1.40)	0.93 ± 0.19 [0.95] (0.79-1.07)	1.33 ± 0.38 [1.26]*** (1.05-1.53)
Fibrinogen, g/l	2.98 ± 0.76 [2.80] (2.50-3.30)	2.74 ± 0.55 [2.60] (2.40-3.02)	3.08 ± 0.82 [2.98]** (2.62-3.30)
vWF, %	130 ± 55 [118] (90-162)	123 ± 54 [112] (86-158)	133 ± 55 [120] (97-163)
tPA, ng/ml	3.35 ± 2.43 [3.0] (2.0-3.2)	2.88 ± 0.91 [3.0] (2.0-3.0)	3.40 ± 2.17 [3.0] (2.0-3.5)
PAI-1, ng/ml	65 ± 42 [58] (33-90)	56 ± 38 [42] (30-76)	69 ± 44 [63] (36-93)
sTBM, ng/ml	23.3 ± 12.4 [19.0] (15.0-28.0)	24.0 ± 13.4 [20.5] (16.8-28.0)	23.0 ± 11.9 [19.0] (14.0-29.0)
sICAM-1, ng/ml	358 ± 148 (255-451)	334 ± 129 (239-428)	369 ± 156 (270-459)
sVCAM-1, ng/ml	743 ± 360 (505-916)	762 ± 333 (518-958)	735 ± 372 (496-994)
Glucose, mmol/l	5.38 ± 1.04 (4.80-5.73)	5.12 ± 0.59 (4.70-5.50)	5.50 ± 1.17 (4.90-5.90)
Insulin, mIU/l	10.3 ± 6.6 [8.5] (6.3-12.3)	8.1 ± 4.8 [6.9] (4.8-10.4)	11.3 ± 7.1 [9.1] (7.1-14.1)
C-peptide, mg/l	2.7 ± 1.4 [2.5] (1.7-3.4)	2.3 ± 1.2 [2.2] (1.3-3.1)	2.9 ± 1.5 [2.7] (1.9-3.7)
PINS, mIU/l	14.8 ± 10.5 [11.4] (8.2-17.4)	12.8 ± 8.9 [9.9] (7.1-15.9)	15.7 ± 11.1 [12.0] (8.8-18.4)
FGF 21, ng/l	317.7 ± 440.4 [197.6] (103.3-357.6)	221.7 ± 388.3 [128.4] (63.7-225.5)	359.9 ± 456.3 [234.6]*** (134.6-419.3)

Data are expressed as means ± standard deviations, in parameters with skewed distribution also as medians [in brackets]. Values of 25 and 75 percentiles are expressed in parentheses. Differences in variables between groups were analyzed with ANOVA after adjustment for age, sex and BMI. Variables with skewed distribution (TG, Apo B, fibrinogen, vWF, tPA, PAI-1, sTBM, Insulin, C-peptide, PINS, FGF 21) were log transformed to normalize their distribution before statistical analyses.

CG: Apo B < 1.2 g/l and/or TG < 1.5 mmol/l

DLP: Apo B ≥ 1.2 g/l and/or TG ≥ 1.5 mmol/l

Significant differences between CG and DLP groups: *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

Abbreviations: CG: Control Group; DLP: Dyslipidemic Phenotype; BMI: Body Mass Index; SBP: Systolic Blood Pressure; DBP: Diastolic Blood Pressure; TC: Total Cholesterol; TG: Triglycerides; HDLc: High-density Lipoprotein cholesterol; LDLc: Low-density Lipoprotein cholesterol; Apo A1: Apolipoprotein A1; Apo B: Apolipoprotein B; vWF: von Willebrand Factor; tPA: Tissue Plasminogen Activator; PAI-1: Plasminogen Activator inhibitor-1; sTBM: Soluble Thrombomodulin; sICAM-1: Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1; sVCAM-1: Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1; PINS: Proinsulin; FGF 21: Fibroblast Growth Factor 21; ANOVA: Analysis of Variance

Table 2: Correlation of FGF 21 with endothelial/hemostatic markers and parameters of insulin resistance in CG and DLP groups.

	FGF 21 (CG, n = 66)	FGF 21 (DLP, n = 148)
Fibrinogen	n.s.	n.s.
vWF	n.s.	0.182
tPA	n.s.	p < 0.05 0.338
PAI-1	n.s.	p < 0.01 0.214
sTBM	n.s.	p < 0.05
sICAM-1	n.s.	n.s. 0.199
sVCAM-1	n.s.	p < 0.05 0.163
Glucose	n.s.	p < 0.05 0.279
Insulin	n.s.	p < 0.01
C-peptide	0.310 p < 0.05	0.214 p < 0.05
PINS	n.s.	0.232 p < 0.01

CG: Apo B < 1.2 g/l and/or TG < 1.5 mmol/l

DLP: Apo B ≥ 1.2 g/l and/or TG ≥ 1.5 mmol/l

n.s., non-significant difference

r and p values are expressed in Table 2. Probability values of p < 0.05 were considered as statistically significant.

Abbreviations: CG: Control Group; DLP: Dyslipidemic Phenotype; vWF: von Willebrand Factor; tPA: Tissue Plasminogen Activator; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; sTBM: Soluble Thrombomodulin; sICAM-1: Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1; sVCAM-1: Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1; PINS: Proinsulin; FGF 21: Fibroblast Growth Factor 21; DLP: Dyslipidemic Phenotype; Apo B: Apolipoprotein B; TG: Triglycerides

after adjustment for sex, age and BMI. Also classification parameters (TG and Apo B) were naturally significantly elevated in DLP subjects (both p < 0.001).

FGF 21 levels correlated positively with C-peptide in CG subjects, whilst in DLP group we observed a significant positive correlation of FGF 21 with vWF, tPA, PAI-1, adhesive molecules sICAM-1 and sVCAM-1, glucose, C-peptide and PINS – see Table 2.

To evaluate the association of the observed parameters with FGF 21, the multiple regression analysis with FGF 21 as dependent variable and correlated parameters as independent predictors was performed (Table 3). In contrast to CG, FGF 21 was positively associated with vWF (beta = 0.4214, p = 0.0031), tPA (beta = 0.1103, p = 0.0099), and glucose (beta = 0.2655, p = 0.0313) in DLP subjects.

Elevated levels of FGF 21 in DLP group

The presented study revealed the strong significant difference in the levels of FGF 21 between two groups with different levels of TG and Apo B, which is in accordance with our previous work [11]. As mentioned above, higher levels of FGF 21 are found in cardiometabolic disorders, including obesity, MetS, dyslipidemia, and insulin resistant states in human studies [12-14]. These conditions

are more pronounced in DLP subjects. However, the precise reason of the FGF 21 elevation remains still unclear. The FGF 21 resistance has been suggested to be one of the causes of elevated FGF 21 levels in obese mice [15]. Nevertheless, a study of Hale et al. [16] reported that FGF 21 resistance was not evident at the whole-organism level in *ob/ob* and diet-induced obese mice models of genetic or acquired obesity and insulin resistance. Increased hepatic FGF 21 expression and elevated FGF 21 levels are probably due to the metabolic changes. It seems likely that circulating FGF 21 is derived from the liver, and its levels are probably higher due to the FGF 21 induction caused by elevated hepatic lipid and carbohydrate levels [9]. Thus, we believe that increased TG, Apo B, and Apo B-containing lipoproteins might be an essential cause of the FGF 21 elevation in DLP group in our study.

Nevertheless, one of the main objectives of the presented work was to evaluate, if FGF 21 levels elevation could be explained as a response to emerging endothelial damage. FGF 21 has been previously suggested as an independent factor for protection of cardiovascular system cells. In experimental models the recent studies showed, that FGF 21 induced cardiac protection and restoration of cardiac function involving autocrine/ paracrine pathways [17], and FGF 21 action on cardiomyocytes prevents cardiac hypertrophy [18]. The study of Lu et al. [19] aimed to elucidate the changes of FGF 21 levels induced by oxidized-low density lipoprotein (oxLDL), and the changes of apoptosis affected by regulating of FGF 21. The expression of FGF 21 on both the mRNA, and the protein levels in cultured cardiac microvascular endothelial cells confirmed that cardiovascular endothelial cells had the ability to produce FGF 21. The authors concluded that FGF 21 can be secreted by endothelial cells in response to stress, and it may be a signal in damaged tissues [19]. The protein may play physiological roles as an endogenous protective factor in improving the endothelial function at an early stage of atherosclerosis. However, these observations have not been subsequently confirmed in any clinical study. Therefore, it is only a speculation, if the increased levels of FGF 21 in DLP could be partially explained as a response to endothelial damage. In addition, from the endothelial/hemostatic markers and the markers of IR, only fibrinogen, a determinant of blood viscosity and platelet aggregation, was significantly higher in patients with adverse dyslipidemic phenotype.

Endothelial/hemostatic parameters as predictors of FGF 21 levels in DLP group

Correlation analysis confirmed the well-known relationship of FGF 21 to the parameters of insulin resistance in DLP group. Newly we performed an analysis with endothelial/hemostatic markers. FGF 21 correlated with all parameters, except of sTBM. These observations might indicate proposed closer link of FGF 21 to markers of endothelial dysfunction only in patients with adverse dyslipidemic profile. Nevertheless, the most of these relationships have lost significance after the multiple regression analysis performance. The observed association of FGF 21 with vWF and tPA in DLP group was probably the most important finding of the study. To the best of our knowledge, the presented work is the first to found both ED

Table 3: Association of FGF 21 with correlated parameters in CG and DLP groups.

	FGF 21 (CG, n = 88)	FGF 21 (DLP, n = 148)
fibrinogen	0.1172 p = 0.4477	-0.0196 p = 0.7718
vWF	-0.1201 p = 0.6757	0.4214 p = 0.0031
tPA	-0.0206 p = 0.8599	0.1103 p = 0.0090
PAI-1	0.3180 p = 0.0540	0.1801 p = 0.0912
sTBM	0.1922 p = 0.3241	-0.0550 p = 0.5828
sICAM-1	-0.0265 p = 0.7592	0.0533 p = 0.1357
sVCAM-1	-0.0932 p = 0.1827	0.0566 p = 0.0559
glucose	0.5691 p = 0.0684	0.2666 p = 0.0313
insulin	0.0418 p = 0.6697	-0.0076 p = 0.8904

CG: Apo B < 1.2 g/l and/or TG < 1.5 mmol/l

DLP: Apo B ≥ 1.2 g/l and/or TG ≥ 1.5 mmol/l

Multiple regression analysis with FGF 21 as dependent variable and other parameters as independent predictors is presented. Results with endothelial/hemostatic markers and some of IR parameters only are shown.

Beta and p values are expressed in Table 3. Probability values of p < 0.05 were considered as statistically significant (bold values).

Abbreviations: CG: Control group; DLP: Dyslipidemic Phenotype; vWF: von Willebrand Factor; tPA: Tissue Plasminogen Activator; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; sTBM: Soluble Thrombomodulin; sICAM-1: Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1; sVCAM-1: Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1; PiNS: Proinsulin; FGF 21: Fibroblast Growth Factor 21; IR: Insulin Resistance

parameters as independent predictors of FGF 21 levels in the patients with dyslipidemia. vWF plasma levels have previously been proposed as a useful marker of endothelial dysfunction [20,21]. In our former study, vWF levels independently predicted intima-media thickness, a marker of subclinical atherosclerosis, in asymptomatic dyslipidemic subjects [22]. Similarly, clinical studies have identified tPA as a strong predictor of future cardiac events [23]. tPA is released from the vascular endothelium, and circulating levels of tPA antigen may be a useful marker of endothelial dysfunction. As discussed above, FGF 21 could play a physiological role as an endogenous protective factor improving the endothelial function at an early stage of atherosclerosis. Therefore, it can be assumed that the positive association of FGF 21 with vWF and tPA could be related to emerging endothelial damage in dyslipidemic patients, although clinically asymptomatic. The question remains, why no elevation of vWF and tPA plasma levels in subjects with adverse lipid phenotype was found in our study. Similarly, no association of FGF 21 with the other endothelial/hemostatic parameters requires further explanation.

Limitation of the study

The results of the study could be influenced by relatively a small number of control subjects and the different number within two analyzed groups, which could reduce the power of significance of the observed relationships. The presented work was conducted with

individuals divided according to TG and Apo B levels. Considering this fact, the control group could not be regarded as a cohort of "normal" healthy subjects. Another markers influencing ED, such as the parameters of inflammation and oxidative stress, could be taken into account.

Conclusion

The presented study revealed the strong significant elevation of the FGF 21 levels in asymptomatic dyslipidemic patients with elevated TG and/or Apo B. Probably the most important finding was the positive association of FGF 21 with vWF and tPA levels in DLP group. To the best of our knowledge, the study is the first to found both parameters as independent predictors of FGF 21 in patients with the high-risk dyslipidemic phenotype. Correlation with endothelial/hemostatic markers and the positive association of FGF 21 with vWF and tPA might be a sign of emerging prothrombotic conditions in the high-risk lipid profile carriers. These observations should be evaluated in further studies with different populations.

References

- Smith A, Patterson C, Yamell J, Rumley A, Ben-Shlomo Y, Lowe G. Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study. *Circulation*. 2005; 112: 3080-3087.
- Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J*. 2010; 74: 213-220.
- Khartonenkov A, Wroblewski VJ, Koester A, Chen YF, Clutinger CK, Tigno XT, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*. 2007; 148: 774-781.
- Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*. 2008; 149: 6018-6027.
- Kralisch S, Fasshauer M. Fibroblast growth factor 21: effects on carbohydrate and lipid metabolism in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011; 14: 354-359.
- Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*. 2008; 57: 1246-1253.
- Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam KS. Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013; 78: 489-496.
- Choi SH, Hong ES, Lim S. Clinical implications of adipocytokines and newly emerging metabolic factors with relation to insulin resistance and cardiovascular health. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4: 97.
- Li H, Zhang J, Jia W. Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology. *Front Med*. 2013; 7: 25-30.
- Sniderman AD. Applying apoB to the diagnosis and therapy of the atherogenic dyslipoproteinemias: a clinical diagnostic algorithm. *Curr Opin Lipidol*. 2004; 15: 433-438.
- Novotny D, Vaverkova H, Karasek D, Lukes J, Slavik L, Malina P, et al. Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. *Physiol Res*. 2014; 63: 219-228.
- Lee Y, Lim S, Hong ES, Kim JH, Moon MK, Chun EJ, et al. Serum FGF21 concentration is associated with hypertriglyceridaemia, hyperinsulinaemia and pericardial fat accumulation, independently of obesity, but not with current coronary artery status. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014; 80: 57-64.
- Iglesias P, Selgas R, Romero S, Diez JJ. Biological role, clinical significance, and therapeutic possibilities of the recently discovered metabolic hormone fibroblastic growth factor 21. *Eur J Endocrinol*. 2012; 167: 301-309.

14. Chow WS, Xu A, Woo YC, Tso AWK, Cheung SCW, Fong CHY, et al. Serum fibroblast growth factor-21 levels are associated with carotid atherosclerosis independent of established cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 2454-2459.
15. Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonov A, Flier JS, et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes.* 2010; 59: 2781-2789.
16. Hale C, Chen MM, Stanislaus S, Chinookoswong N, Hager T, Wang M, et al. Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology.* 2012; 153: 69-80.
17. Patel V, Adya R, Chen J, Ramanjaneya M, Bari MF, Bhudra SK, et al. Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts. *PLoS One.* 2014; 9: e87102.
18. Planavila A, Redondo I, Hondares E, Vinciguerra M, Muntis C, Iglesias R, et al. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun.* 2013; 4: 2019.
19. Lü Y, Liu JH, Zhang LK, DU J, Zeng XJ, Hao G, et al. Fibroblast growth factor 21 as a possible endogenous factor inhibits apoptosis in cardiac endothelial cells. *Chin Med J (Engl).* 2010; 123: 3417-3421.
20. Spiel AO, Gilbert JC, Jilka B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation.* 2008; 117: 1449-1459.
21. Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood.* 2005; 105: 526-532.
22. Karásek D, Vavřková H, Halenka M, Slavík L, Novotný D. Endothelial haemostatic markers in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Thromb Res.* 2009; 123: 466-475.
23. Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med.* 2007; 262: 157-172.