

Šobrův den, XXIII. konference o hyperlipoproteinemiích Praha, 7. června 2006

Abstrakta

Mutácie v géne apo B-100 u pacientov s fenotypom familiárnej hypercholesterolémie

Z. Bašistová, J. Gašparovič, Ľ. Fábryová, J. Sirotiaková, K. Rašlová

Katedra antropologie Přírodovědecké fakulty UK, Bratislava, Slovenská republika

Apolipoprotein B-100, štruktúrny komponent LDL-častice slúži ako ligand pre LDL receptorom sprostredkovanú endocytózu. Mutačným poškodením väzbovej domény apo B-100 dochádza k redukcii väzbovej schopnosti apolipoproteínu B-100, čím sa LDL častice akumuluju v krvi.

Cieľom nášho výskumu bolo zistiť frekvencie mutácií R3500Q, R3531C a H3543Y vo väzbovej doméne génu apo B-100, u ktorých sa udáva vzťah ku hypercholesterolémii.

Súbor pozostával z 377 probandov (105 mužov, 272 žien) vo veku $46,5 \pm 15,9$ rokov s klinickou diagnózou FH. Priemerné hladiny lipidov boli ($x \pm SD$): TC $8,9 \pm 2,1$ mmol/l, LDL-C $6,5 \pm 3,0$ mmol/l, TG $1,9 \pm 1,3$ mmol/l a HDL-C $1,41 \pm 0,41$ mmol/l.

Výsledky: Mutáciu R3500Q sme zistili u 9,3 % probandov, kým R3531C nebola dokázaná ani v jednom prípade. Mutácia H3543Y sa zistila u jednej probandky (0,27 %), ktorá mala hypercholesterolémiu, šlachové xantómy a pozitívnu rodinnú anamnézu IM. Vyšetrením rodiny probandky sme túto mutáciu našli u probandkinej sestry s hypercholesterolémiou (LDL-C 5,73 mmol/l) a u dcéry s normolipémiou (LDL-C 3,32 mmol/l), avšak mutácia nebola zistená u ďalšej sestry s fenotypom FH (LDL-C 5,08 mmol/l). Nízka frekvencia mutácie H3543Y v súbore pacientov s fenotypom FH, absencia mutácie u probandkinej sestry so závažnou hypercholesterolémiou a jej prítomnosť u dcéry s normolipémiou indikujú, že ide o polymorfizmus, ktorý nemá kauzálny vplyv na rozvoj dyslipidemií.

Praktický význam plazmatických nechoslesterolových sterolů při monitorování léčby dětských a adolescentních familiárních hypercholesterolemíí

J. Hyánek, F. Pehal, V. Martiníková, J. Dvořáková, L. Dubská, H. Pejznochová

metabolická ambulance oddělení klinické biochemie Nemocnice na Homolce, Praha

Cíl: Určit praktický význam stanovení cholesterolových prekurzorů a fytosterolů během monitorování dietní nebo medikamentózní léčby familiárních hypercholesterolemíí (FH) u dětí a adolescentů.

Metody: Lathosterol, desmosterol, lanosterol, kampesterol a sitosterol byly stanovovány pomocí GC/MS v plazmě zdravých i nemocných dětí během jejich návštěvy v metabolické ambulanci v letech 2003–2005.

Výsledky: U 160 dětí ve věku 6–18 let (50 % zdravých a 50 % trpících FH) byly stanovovány hlavní markery endogenní syntézy cholesterolu (lathostereol, desmosterol, lanosterol) a fytosterolů (kampesterol a sitosterol) během nízkocholesterolové dietní léčby stejně jako během léčby iontoměníči, statiny a statiny kombinované ezetimibem. Byly určeny referenční hodnoty těchto metabolitů u zdravých různých věkových skupin dětí, které nejsou závislé na pohlaví ani věku. U dětí na přísné dietní léčbě byly hladiny lathosterolu a desmosterolu zvýšeny i po dosažení léčebné hladiny celkového cholesterolu. Stejný trend byl patrný také u dětí léčených statiny. Léčba iontoměníči a statiny kombinovanými s ezetimibem snižovaly hladiny prekurzorů. Fytosteroly v plazmě nebyly závislé na hladinách cholesterolu ani na věku a pohlaví dětí. Jejich výrazné zvýšení jsme pozorovali po podávání iontoměníčů a ezetimibu. Pacienti s vysokými hladinami lathosterolu jsou vhodní pro léčbu statiny, pacienti s vysokým kampesterolem pro léčbu ezetimibem nebo stanoly. Extrémně vysoké hladiny lathosterolu nebo kampesterolu nám dovoluji určit „hyperrespondéry“ na dietní či medikamentózní léčbu.

Závěry: Monitorování dietní či medikamentózní léčby FH pomocí nesterolových sterolů je užitečné a efektivní. Dovoluje snáze diferencovat jednotlivé pacienty s FH a snáze volit medikamentózní dávky či snadněji udržovat léčebnou hladinu celkového cholesterolu v plazmě.

Podpořeno grantem IGA MZČR NA 7452-3.

Polymorfismus FABP-2: vztahy ke koncentraci triglyceridů v plazmě a ve VLDL

M. Jáchymová¹, M. Vecka², E. Tvrzická^{1,2}, L. Janíková², B. Staňková², A. Žák^{1,2}

¹ Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha

² IV. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

Východisko: Střevní izoforma proteinu vázajícího mastné kyseliny (FABP-2) hraje důležitou úlohu v transportu mastných kyselin. Polymorfismus (Ala54Thr) tohoto proteinu byl v několika studiích spojen se změnami v oxidaci lipidů, hladině plazmatických lipidů a inzulinové senzitivitě; méně už je známo o jiném polymorfismu tohoto proteinu, FABP-2p-ID.

Cíl studie: Naším cílem bylo prozkoumat vztahy mezi dvěma polymorfismy FABP-2 (Ala54Thr, FABP-2p-ID) a hladinami plazmatických lipidů u dyslipidemie.

Soubor nemocných a metody: Studie zahrnovala 140 pacientů, kteří byli postupně získáni z lipidové ambulance IV. interní kliniky 1. LF UK a VFN. Tito jedinci byli rozděleni na horní a dolní kvintily podle koncentrace plazmatických triglyceridů (TG), VLDL-TG a poměru TG/apo-B v částicích VLDL. Tyto skupiny se nelišily v zastoupení mužů a žen, ani frekvencí alel apo-E. Podíly plazmy odpovídající částicím VLDL a LDL byly odděleny sekvenční ultracentrifugací; apo-B byl měřen pomocí EIA a koncentrace lipidů plazmy byly stanoveny enzymaticko-kolorimetrickými metodami. Statistická analýza byla provedena s použitím software (STATISTICA® for Windows, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, U.S.A. 1999). U párových analýz bylo po provedení testů na normalitu souborů provedeno hodnocení pomocí Studentova 2výběrového párového t-testu, pro analýzu genetických polymorfismů byl použit χ^2 test s případnou Yatesovou korekcí na nižší počty.

Výsledky: U skupiny s vyšší hladinou plazmatických TG byly v obou zkoumaných polymorfismech FABP-2 [frekvence alely A (-54Thr) a alely I (FABP-2p-I)] shledáno vyšší zastoupení těchto alel (A: 0,33, $P < 0,01$; I: 0,50, $P < 0,01$) vůči skupině s nižšími hladinami TG. Zvýšená frekvence alely A (0,37, $P = 0,02$) byla také nalezena u skupiny s vyšší koncentrací TG v částicích VLDL. U pacientů s vyšším poměrem TG/apo B v částicích VLDL byly zaznamenány zvýšené frekvence jak alely I (0,54, $P < 0,01$), tak A (0,42, $P = 0,02$).

Závěr: Výsledky studie ukazují na vztah častých polymorfismů FABP-2 a zvýšených koncentrací TG v částicích VLDL a poměru TG/apo B v VLDL. Tyto polymorfismy tak mohou mít vztah k částicím VLDL-1, hlavnímu prediktoru malých hustých LDL a prekursorů remnantních lipoproteinových částic.

Studie byla podpořena grantem IGA MZČR číslo. NR/8149-3.

Metabolický syndrom: vztahy k některým genovým polymorfismům, složení mastných kyselin a oxidačnímu stresu

L. Janíková¹, B. Staňková¹, M. Vecka¹, M. Jáchymová², E. Tvrzická^{1,2}, A. Žák^{1,2}

¹ IV. interní klinika 1. LF UK a VFN Praha

² Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha

Východisko: Metabolický syndrom (MS) je nejčastější rizikový faktor předčasné ICHS. Pro MS je charakteristické z hlediska složení mastných kyselin (FA) zvýšený obsah nasycených mastných kyselin (SFA), snížený obsah kyseliny linolové (LA), zvýšené aktivity $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - a snížené aktivity $\Delta 5$ -desaturázy ($\Delta 5D$). Etiologie MS je multifaktoriální a zahrnuje vliv genů, zevního prostředí, složení potravy a metabolické faktory. Z hlediska genetických faktorů jsou nejvíce studovány geny řídící syntézu IRS-1 (resp. -2), PPAR- α , (resp. - γ), geny řídící enzymy lipoproteinové kaskády – jaterní lipázu (HL), střevní izoformu proteinu vázajícího FA (FABP-2), transferového proteinu pro estery cholesterolu (CETP) i lipoproteinové lipázy (LPL). Předpokládá se, že interakce faktorů zevního prostředí spolu s polymorfismy genů řídících glukoregulaci a metabolismus lipoproteinů nejen významně ovlivňují patogenezi MS i odpověď jednotlivých komponent MS na terapeutickou intervenci.

Cíl studie: Bylo zjištěno vztahy mezi MS, složením FA hlavních lipidových tříd, některými polymorfismy (SNP) kandidátních genů LP metabolismu a parametry oxidačního stresu.

Soubor nemocných a metody: Soubor sestává z 39 osob s MS diagnostikovaným na základě doporučení IDF (2005) a 94 kontrolních osob. Celkový cholesterol (TC), triglyceridy (TG), glukóza a kyselina močová byly vyšetřeny enzymaticko-kolorimetricky, CRP turbidimetricky, apo B a apo A-I pomocí EIA. Inzulin a C-peptid byly vyšetřeny RIA metodou. Složení FA bylo analyzováno CGLC a hladiny t-Hcy byly zjištěny pomocí HPLC. Koncentrace konjugovaných dienu (KD) v LDL byly vyšetřeny spektroskopicky ($A_{234\text{ nm}}$). Analýza SNP genů apo-E, FABP-2 (Ala54Thr), FABP-2p-ID, MTP (-493G/T) a PPAR- γ 2 (Pro12Ala) zahrnovala izolaci DNA a vyšetření SNP metodou RFLP s pomocí specifických endonukleáz.

Výsledky: Jedinci s MS vykazovali ve srovnání s kontrolní skupinou, kromě typických změn BMI (+20 %), obvod pasu (+4 %), podíl tuku (+ 25 %, vše $P < 0,001$), TC (+12 %, $P < 0,01$), TG (+104 %, $P < 0,001$), B (+36 %, $P < 0,001$), apo A-I (-6 %, $P < 0,05$), také vyšší koncentrace CRP (+ 87 %, $P < 0,001$), KD v LDL (+32 %, $P < 0,001$) a t-Hcy (+15 %, $P < 0,05$). Z vyšetřených polymorfizmů kandidátních genů byla u MS zjištěna pouze zvýšená frekvence alely -54/Thr (0,43) FABP-2 ve srovnání s kontrolní skupinou (0,27; $P < 0,05$). U pacientů s MS byla ve srovnání s kontrolní skupinou zjištěna zvýšená koncentrace kyseliny palmitolejové (+21 %, $P < 0,001$), stearové (+6 %, $P < 0,05$), dihomog- γ -linolenové (+8 %, $P < 0,05$) a snížená koncentrace LA (-15 %, $P < 0,001$).

Závěry: Z hlediska složení FA u MS je charakteristické zvýšení koncentrace kyseliny palmitolejové, dihomog- γ -linolenové a nasycených mastných kyselin, stejně jako snížená koncentrace linolové a n-6 vícenenasycených mastných kyselin. Jedinci s MS mají zvýšenou koncentraci konjugovaných dienu v LDL, což svědčí o zvýšené oxidaci částic LDL. Vyšší koncentrace CRP a vzestup celkového homocysteinu, vedle typických změn lipidů a lipoproteinů, doplňují biochemický obraz MS. Pokles koncentrace kyseliny linolové, jako aktivátoru PPAR- γ , může dále akcentovat nepříznivé biologické změny tukové tkáně i inzulinovou rezistenci.

Podporováno grantem IGA MZ ČR NR/8149-3.

Umírněná konzumace alkoholu ovlivňuje inzulinorezistenci u HHTG potkana

E. Jindřichová^{1,2}, M. Burešová¹, L. Kazdová¹, J. Kovář^{1,2}

¹ *Institut klinické a experimentální medicíny Praha*

² *Centrum výzkumu chorob srdce a cév, Praha*

Úvod: Umírněná konzumace alkoholu má protektivní účinky na kardiovaskulární systém a má rovněž příznivý vliv na inzulinovou rezistenci u lidí. Detailní mechanismus působení alkoholu na insulinorezistenci však není zatím objasněn. Zkoumali jsme proto vliv konzumace alkoholu na experimentálním modelu metabolického syndromu – hereditárně hypertriglyceridemického (HHTG) potkana.

Metody: Samci HHTG potkanů byli napájeni 5% etanolem nebo vodou po dobu 4 týdnů. Jako kontrolní zvířata byli použiti samci normotriglyceridemického Wistar potkana. Zvířata byla krmena standardní laboratorní dietou ad libitum. Po 4 týdnech byla stanovena koncentrace sérového inzulinu, glukózy nalačno a plazmatických lipidů – triglyceridů (TG), neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) a celkového cholesterolu (TC). Ultracentrifugací byly analyzovány lipoproteiny. Koncentrace TG byla rovněž stanovena v kosterním svalu (m. gastrocnemius) a v játrech.

Výsledky: Konzumace alkoholu neměla vliv na koncentraci sérového inzulinu a triglyceridů ani na koncentraci triglyceridů ve svalu a v játrech u normotriglyceridemických potkanů Wistar. U HHTG potkana konzumace alkoholu zvýšila koncentraci inzulinu v séru o 62 % ($p < 0,01$) a koncentraci TG ve svalu o 84 % ($p < 0,05$). Konzumace alkoholu neměla vliv na hmotnost zvířat ani u jedné experimentální skupiny.

Závěr: Umírněná konzumace alkoholu paradoxně vedla u HHTG potkana k další indukci inzulinové rezistence.

Práce byla podpořena grantem č. NR7847-3 IGA MZ ČR.

Apolipoprotein E Arg136→Cys a dysbetalipoproteinemie

J. Kovář^{1,2}, V. Adámková¹, Z. Škodová¹, J.A. Hubáček^{1,2}

¹ *Institut klinické a experimentální medicíny Praha*

² *Centrum výzkumu chorob srdce a cév Praha*

Některé ze vzácných variant genu pro apolipoprotein E jsou spojeny s rozvojem dysbetalipoproteinemie, která se dědí dominantně (nikoli recesivně, jako je tomu u apo E2). Vztah jedné z těchto vzácných variant – apo E136-Cys k dysbetalipoproteinemii nebyl dosud jednoznačně charakterizován. Pokusili jsme se proto odhadnout frekvenci výskytu této

varianty v české populaci a analyzovat její efekt na koncentraci lipoproteinů. Polymorfismus apo E byl analyzován ve vzorku české populace ($n = 2558$) a alela apo E136-Cys prokázána u 5 jedinců. To odpovídá frekvenci výskytu této alely 0,10 % (95% konfidenční interval: 0,01–0,19 %). Vliv apo E136-Cys na koncentraci ultracentrifugačně izolovaných lipoproteinů byl studován u probandů zachycených v rámci této populační studie a jejich pokrevních příbuzných – celkem u 9 osob heterozygotních pro tuto vzácnou alelu. Ačkoli žádný z nich nevykazoval klinicky významnou hyperlipoproteinemii, u 3 osob byla zjištěna řádově zvýšená koncentrace LDL-cholesterolu a u jedné osoby VLDL vykazující charakteristické rysy pre- β -VLDL. Naše nálezy naznačují, že apo E136-Cys může být asociován s dysbetalipoproteinemií jako dominantní alela s nízkou expresivitou (a penetrancí).

Práce byla podpořena grantem MŠMT 1M6798582302.

Regulace exprese genu pro cholesterol 7 α -hydroxylázu

Z. Lejsková^{1,2}, J. Kovář^{1,2}, M. Jirsa¹

¹ Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

² Centrum výzkumu chorob srdce a cév, Praha

Úvod: V klinických studiích bylo demonstrováno, že koncentrace cholesterolu souvisí s polymorfismem –203A/C v promotoru genu pro enzym cholesterol 7 α -hydroxylázu (CYP7A1). Tento polymorfismus je ve vazbě s polymorfismem –469C/T, není však jasné, který z těchto polymorfismů odpovídá za rozdíly v expresi genu CYP7A1.

Metody: Exprese genu byla sledována metodou duální luciferázové eseje. Buněčná linie HepG2 byla transfekována plazmidem pGL3 nesoucím jeden ze 4 možných haplotypů promotoru genu CYP7A1: [–203A;–469C], [–203C;–469T], [–203C;–469C], [–203A;–469T]. Jako kontrola byl použit plazmid pGL3 Basic (bez promotoru) a vektor pGL3 s anti-sense vloženým promotorem haplotypu [–203A;–469C] nebo [–203C;–469T].

Výsledky: Haplotypy nesoucí v pozici –203 cytosin (C) byly exprimovány přibližně 5násobně ve srovnání s haplotypy nesoucími v téže pozici –203 adenosin (A). Exprese námi studovaných variant byla dle očekávání inhibována kyselinou 50 μ M chenodeoxycholovou a nikoli 50 μ M kyselinou ursodeoxycholovou.

Závěr: Lze tedy uzavřít, že za rozdíly v expresi genu CYP7A1 odpovídá polymorfismus promotoru v poloze –203.

Podpořeno grantem NR-8987-3 z IGA MZ ČR.

Dynamika změn krevních lipidů při 24hodinovém běhu

J. Novák¹, A. Steinerová², O. Macharáček¹

¹ Ústav tělovýchovného lékařství LF UK a FN Plzeň

² Zdravotnické zařízení Medrin a.s., Plzeň

Sedm běžců-dobrovolníků absolvovalo závod v 24hodinovém běhu. Před startem se všichni podrobili tělovýchovně lékařskému vyšetření včetně zátěžového testu na běhátku. Charakteristika souboru ($n = 7$): věk 26,3–63,6 let, hmotnost 59,9–74,0 kg, výška 171,5–185,0 cm, BMI 20,0–23,6, % tuku 9,0–13,4, VO_{2max}/kg 41,9–70,2 ml/min. Běžcům bylo doporučeno tempo odpovídající 50–60 % jejich VO_{2max} . Závod probíhal na rovinatém 5kilometrovém okruhu v n.v. 342–356 m. Běžci dosáhli výkonů 142–228 km/24 h, jeden z probandů ukončil závod po 18 h a 124 uběhnutých km pro zdravotní potíže. Vzorky žilní krve byly odebrány před startem, po 3–4 h, po 8 h, po 12–13 h, po 18 h a po skončení závodu a dále po 4 dnech odpočinku. V průběhu závodu je patrný úvodní nevýznamný vzestup hladiny celkového cholesterolu (C-chol) z $5,07 \pm 0,27$ na $5,61 \pm 0,59$ mmol/l a významný vzestup hladiny triglyceridů (TG) z $1,58 \pm 0,56$ na $2,06 \pm 0,73$ mmol/l. Tyto změny však jsou u obou parametrů v dalším průběhu závodu vystřídány významným poklesem, u C-chol až na $4,76 \pm 0,46$ mmol/l, u TG na $0,59 \pm 0,20$ mmol/l po skončení závodu. Hodnoty HDL-cholesterolu se v průběhu výkonu významně zvýšily z výchozích $1,85 \pm 0,37$ mmol/l až na $2,65 \pm 0,50$ mmol/l. U apolipoproteinu B došlo v úvodní třetině závodu k nevýznamnému vzestupu z $1,02 \pm 0,29$ na $1,18 \pm 0,20$ mmol/l, vystřídánému významným poklesem na $0,79 \pm 0,26$ mmol/l. Po 4 dnech odpočinku se parametry C-Chol, TG a HDL-Chol upravily na předstartovní úroveň (C-Chol $5,23 \pm 0,41$, TG $1,58 \pm 0,62$, HDL-Chol $1,73 \pm 0,36$). Je pravděpodobné, že v souladu s poznatkem Blaira et al (1996) nevyvolá ani vysoce náročná vytrvalostní zátěž trvalejší posuny v lipidogramu v případě, že zjištěné hodnoty se pohybují v mezích fyziologické normy.

Lipidový profil u atletů – vytrvalců

J. Novák¹, V. Zeman¹, A. Steinerová²

¹ Ústav tělovýchovného lékařství LF UK a FN Plzeň

² Zdravotnické zařízení Medrin a.s., Plzeň

Hodnoty cholesterolemie u skupiny 15 maratonců – účastníků mistrovství republiky – jsou porovnány s průměrnými hodnotami cholesterolemie mužů středního věku v různých zemích. Průměrné hodnoty maratonců (věk 23–51 let, celkový cholesterol $5,44 \pm 0,98$ mmol/l, triglyceridy $1,20 \pm 0,39$ mmol/l, HDL-cholesterol $1,77 \pm 0,36$ mmol/l, rizikový index C-chol/HDL-chol $3,16 \pm 0,69$, α -lipoproteiny $34,27 \pm 6,55$ %, pre- β -lipoproteiny $16,2 \pm 9,51$ %, β -lipoproteiny $48,2 \pm 24,73$ %) odpovídají fyziologickému normativu pro tuto populaci. Ve srovnání s normativem cholesterolemie pro muže 35- až 55leté, uváděnému Nejedlým (1980) jsou výsledky maratonců spíše v oblasti příznivějších hodnot. I mezi nimi však lze najít jedince s hodnotami představujícími zvýšené riziko z hlediska ICHS, zasluhující dietní ev. farmakologickou intervenci. V souladu s Hartungem (1980) a dalšími autory lze potvrdit pozitivní vliv soustavné pohybové aktivity na lipidogram vytrvalců. Podle řady studií (např. Wood 1983, Dowling 2001, Máček 2004) lze žádoucího efektu dosáhnout při splnění určitých požadavků na formy a kvalitu pohybové aktivity. Optimální jsou vytrvalostní sportovní disciplíny (chůze, jogink, běh, plavání, jízda na kole, bruslení, chůze a běh na lyžích aj) 3- až 5krát týdně 20–60 min na úrovni 55–80 % TF_{max} . Energetický výdej by při tom měl dosáhnout alespoň 4 000–5 000 kJ/týden. Efekt je výraznější, dojde-li současně k redukci tělesné hmotnosti. Pozitivní vliv pohybové aktivity se uplatňuje i v sekundární prevenci – mezi hladinou HDL-cholesterolu a objemem naběhaných kilometrů týdně byla i u kardiaků po AIM zjištěna významná korelace (Kavanagh 1983). Individuální rozdíly v dosaženém výsledku závisí na řadě faktorů, mj. na iniciační úrovni jednotlivých parametrů (Eisenmann 2002) či distribuci svalových vláken. Při vyšším podílu pomalých vláken je efekt rychlejší a výraznější (Tikkanen 1999). Pohybová aktivita by u dyslipidemií měla být nedílnou součástí komplexní léčby.

Rekondiční pobyty zdravého životního stylu v primární prevenci kardiovaskulárních chorob

J. Slaviček¹, A. Dohnalová¹, J. Konečná², R. Žižka²

¹ Fyziologický ústav 1. LF UK Praha

² Občanské sdružení Prameny zdraví, Praha

Kardiovaskulární choroby zaujímají jedno z předních míst v nemocnosti a úmrtnosti rozvinutých zemí světa včetně ČR. Životním stylem lze tuto situaci ovlivnit až z 50 %. Cílem této práce bylo zjistit, zda týdenní rekondiční pobyt v prostředí bez stresu, s mírným aktivním odpočinkem (cvičení, procházky) a nízkokalorickou převážně laktoovo-vegetabilní stravou s dostatkem tekutin, ovoce, zeleniny, obilnin, luštěnin a vitaminů, je schopen změnit základní parametry rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění (tělesná hmotnost, krevní tlak, serový cholesterol, glykemie). Dvaceti týdenních rekondičních pobytů v letech 1999–2005 se účastnilo celkem 1 065 dobrovolníků průměrného věku $50,8 \pm 14$ let. Průměrný věk mužů (272 osob) byl $50,8 \pm 15$ let, průměrný věk žen (893 osoby) byl $50,8 \pm 14,5$ let. Osoby byly vyšetřovány před a po pobytu. U mužů i žen (1 046 osob) byla v souhrnu tělesná hmotnost snížena ze $71,0 \pm 14,2$ na $70,3$ kg, BMI (měřen u 878 osob) sníženo ze $24,9 \pm 4,54$ na $24,7 \pm 4,38$ kg/m², tlak krevní systolický (měřen u 1 037 osob) sníženo ze $130,0 \pm 23,3$ na $123,9 \pm 21,6$ mm Hg, tlak diastolický (1 029 osob) sníženo z $80,0 \pm 12,8$ na $77,6 \pm 11,2$ mm Hg ($p < 0,0001$). Pulz se významně neměnil. Serový cholesterol (834 osob) byl sníženo ze $4,87 \pm 0,97$ na $4,31 \pm 0,78$ mmol/l, glykemie (409 osob) byla snížena ze $4,26 \pm 1,62$ na $3,82 \pm 1,37$ mmol/l ($p < 0,0001$). Podobných výsledků bylo dosaženo při srovnání těchto parametrů u mužské a ženské populace zvlášť. U některých osob bylo měřeno celé lipidové spektrum. Naše výsledky ukázaly, že již týdenní přívod nízkokalorické a nízkenergetické stravy v prostředí bez stresu snižuje rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění.

Hyperinzulinemie – závažný rizikový faktor předčasné aterosklerózy

M. Szabó¹, M. Matouš², P. Pelíšková¹, M. Kvapil¹

¹ Diabetologické centrum Interní kliniky 2. LF UK a FN Motol, Praha

² Klinika tělovýchovného lékařství 2. LF UK a FN Motol, Praha

Vysoká inzulinová rezistence a její následek kompenzatorní hyperinzulinemie představují závažné rizikové faktory rozvoje předčasné aterosklerózy a riziko zvýšení četnosti klinických kardiovaskulárních příhod. V jejich prevenci je nutno inzulinovou rezistenci

a hyperinzulinemii snižovat. Množství obézních diabetiků 2. typu, jejichž kardiovaskulární profil je vysoce rizikový, je léčeno inzulinem, který inzulinemii zvyšuje. Jsme přesvědčeni, že nová perorální antidiabetika, která přišla v posledních letech na český trh, jsou u některých obézních diabetiků 2. typu schopna nahradit inzulinoterapii. Zvláště stále častěji používané různé kombinace perorálních antidiabetik a také ověřenější používání léků ve vyšších dávkách než dříve nasvědčují pro možnost úspěchu této terapie.

Představení výzkumného projektu: V roce 2006 byl ve Fakultní nemocnici Motol Praha zahájen výzkumný projekt. V něm je obézním diabetikům (BMI: 30–45) 2. typu s dostatečnou sekrecí vlastního inzulinu (stanovenou vyšetřením C-peptidu) vysazován inzulin a nahrazován perorálními antidiabetiky (PAD). Pacienti jsou randomizováni do 2 skupin – jedna mimo diety a PAD léčena pohybovou terapií (3krát týdně 1 hodinu kombinace veslařského a bicyklového ergometru), druhá pokračuje v dosud běžně vykonávaném pohybovém režimu. Po roce bude mezi oběma skupinami srovnávána úroveň kompenzace diabetu, nutnost znovunavrácení inzulinoterapie, hmotnost pacienta, obvod břicha v pase, lipidové spektrum, inzulinová senzitivita, hodnoty krevního tlaku, tepové frekvence, posouzení přítomnosti autonomní neuropatie, četnost kardiovaskulárních příhod a ekonomická náročnost zvolené léčby.

Práce je podpořena výzkumným záměrem IGA č. NR/8975-3.

Možnosti využití HPLC v konfiguraci systému přepínání kolon (2-D-chromatografie) pro přímou analýzu vybraných statinů v lidské plazmě

D. Šatínský¹, P. Sadílek¹, R. Sladkovský¹, P. Solich¹, V. Bláha², D. Solichová²

¹ Katedra analytické chemie Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové

² Klinika gerontologická a metabolická LF UK a FN, Hradec Králové

V analyticko-diagnostickém stanovení lékových hladin v tělních tekutinách je kladen důraz především na přesnost, správnost, citlivost metody a rychlost dosažení spolehlivých výsledků. Ve většině případů je však zpracování biologických vzorků provedeno off-line pomocí náročných postupů, např. extrakce. Tento způsob úpravy přináší kromě náročnosti i riziko vnesení chyb během několika kroků postupu. Jednou z možností, jak urychlit, zpřesnit a zjednodušit náročné procesy, je použití systému přepínání kolon se zapojením speciálních extrakčních materiálů umožňujících přímý nástřik biologické matrice do analytického chromatografického systému (HPLC). Tyto speciální materiály (RAM) – materiály s omezeným přístupem – jsou určeny pro přímé a opakované dávkování biologického materiálu (plazma). Na RAM sorbentu dochází k zakoncetrování analytu a jeho následnému vymytí na analytickou kolonu a separaci v druhém kroku pomocí přepínacího ventilu a analytické mobilní fáze. HPLC systém přepínání kolon je robustní a umožňuje analyzovat vzorky bez jejich předchozí úpravy. Cílem je nově použít tuto techniku pro stanovení dvou nejčastěji používaných statinů v ČR (atorvastatin a simvastatin) pro detekci jejich hladin u pacientů s hyperlipoproteinemií a ve spolupráci s klinickým pracovištěm vyhodnotit vliv genotypu a fenotypu pacienta na úspěšnost léčby statiny. *Práce byla finančně podpořena projektem IGA MZ č.1A/8689-4.*

Vliv Kardioprotektinu® (fixní kombinace folátu, vitamínu B₁₂ a pyridoxinu) na mírnou hyperhomocysteinemii

T. Vařeka, A. Žák, M. Zeman

IV. interní klinika 1. LF UK a VFN Praha

Úvod: Hyperhomocysteinemie (hHcy) je na základě výsledků řady prospektivních studií uznávána jako samostatný rizikový faktor aterosklerózy a jejích komplikací, zejména kardiovaskulárních onemocnění (KVO) a cévních onemocnění mozku, dále též tromboembolické nemoci, arteriální hypertenze i neuropsychiatrických poruch, jako jsou deprese, demence Alzheimerova typu, Parkinsonova choroba. Hhcy hraje roli v patogenezi komplikací gravidity, poruch neurální trubice a kongenitálních malformací. Ve srovnání s rizikovými faktory, jako je hyperlipidemie či hypertenze, lze zvýšené hladiny tHcy poměrně snadno a levně modifikovat suplementací vitaminy řady B. Kyselina listová (folát) a vitamin B₁₂ či B₆ (pyridoxin) působí jako kofaktory v metabolismu homocysteinu. Chybí přesvědčivé důkazy ve smyslu evidence-based medicine, že vitaminová substituce ovlivní vedle hladiny Hcy současně i mortalitu či incidenci KVO.

Metodika: V naší práci jsme se zaměřili na možnost ovlivnění mírné hHcy (definované jako Hcy 15–30 μmol/l) podáváním preparátu Kardioprotektin, obsahujícího fixní kombinaci kyseliny listové (1 mg folátu), vitamínu B₁₂ (20 μg) a pyridoxinu (5 mg) v jedné denní dávce. Sledovali jsme účinnost této léčby v závislosti na předléčebných koncentracích tHcy

a polymorfizmu MTHFR C677T a A1298C. Do studie bylo zařazeno celkem 23 pacientů (průměrný věk 56 roků, rozsah 42–71 let, BMI 27,6 kg/m², rozsah 24,1–33,4), s mírnou hHcy (12,1–21,6 μmol/l). Studii dokončilo 17 pacientů.

Výsledky a závěr: Při léčbě fixní kombinací vitaminy skupiny B došlo k poklesu koncentrace tHcy o 25 % [ze vstupní průměrné koncentrace Hcy 15,3 μmol/l (SEM 2,7) na výsledných 11,4 μmol/l (SEM 3,3), $p < 0,001$], došlo k poklesu jak u homozygotů MTHFR (C677T), tak u heterozygotů. Léčba nevedla k signifikantní změně lipidových rizikových parametrů (celkový cholesterol, TG, HDL-C, LDL-C, apo B).

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 0021620820 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Faktory ovlivňující metabolismus necholesterolových sterolů u primárních hyperlipidemií

M. Vecka¹, E. Tvrzická^{1,2}, M. Jáchymová², L. Janíková¹, B. Staňková¹, A. Žák^{1,2}

¹ IV. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

² Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha

Východisko: Dyslipidemie jako porucha metabolismu lipidů je úzce spojena se změnami metabolismu cholesterolu. Genetické vlivy na homeostázu cholesterolu zahrnují jak polymorfizmy genů zapojených do absorpce cholesterolu (ABCG5/G8, apo E), tak i do vlastního procesu biosyntézy cholesterolu (SREBP-1). Jako nepřímý marker biosyntézy cholesterolu (CS) se stanovuje hladina jednoho z biosyntetických prekursorů cholesterolu, lathosterolu (LAT), resp. poměru LAT/celkový cholesterol. Úroveň absorpce cholesterolu pozitivně koreluje s koncentrací fytosterolů v plazmě (β-sitosterol, kampesterol), popřípadě jejich poměrem vůči celkovému cholesterolu.

Cíl studie: Cílem studie bylo prozkoumat efekty klinických, metabolických i genetických prediktorů na koncentrace lathosterolu a β-sitosterolu u pacientů s dyslipidemií.

Účastníci studie: Do studie bylo zahrnuto 87 dyslipidemických pacientů a 49 zdravých dobrovolníků. Spojená skupina byla rozdělena podle poměru LAT/celkový cholesterol na horní (high CS) a dolní (low CS) tercil.

Metody: Pro vyšetření plazmatického celkového cholesterolu (TC), triglyceridů (TG), glukózy a kyseliny močové byly použity enzymaticko-kolorimetrické metody. Koncentrace HDL-C byla vyšetřena enzymaticko-kolorimetricky po precipitaci LP-B. Koncentrace apolipoproteinů apo B a apo A-I imunochemicky (EIA) s použitím specifických protilátek. Koncentrace inzulinu a C-peptidu byly vyšetřeny RIA metodou. Koncentrace konjugovaných dienu (KD) v LDL byly vyšetřeny spektrofotometricky (A234 nm) po precipitační izolaci LDL. Koncentrace necholesterolových sterolů byly stanoveny pomocí kapilární plynové chromatografie v nezmýditelném podílu plazmy jako acetylované deriváty. DNA byla amplifikována pomocí PCR a kandidátní geny lipoproteinového metabolismu byly vyšetřeny s pomocí štěpení DNA specifickými endonukleázami (RFLP). Statistická analýza byla provedena s použitím software (STATISTICA® for Windows, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, U.S.A. 1999).

Výsledky: Skupina s vysokou úrovní CS měla oproti skupině s nízkou CS vyšší hodnotu BMI (+12 %, $p < 0,001$) a obvod pasu (+13 %, $p < 0,001$). Zvýšená CS je charakterizována vyššími koncentracemi TC a apo B (+12 %, resp. 20 %, $p = 0,02$, resp. $p < 0,01$), VLDL-C a VLDL-TG (+80 %, +55 %, obě $p < 0,05$), i LDL-TG (+22 % a $p < 0,05$). U genetických polymorfizmů jsme nenašli žádný rozdíl pro frekvenci alel pro apo E, FABP-2p-ID, MTP (-493G/T) a PPARγ2 (Pro12Ala). Ve skupině high CS byl ovšem nalezen významný rozdíl pro frekvenci alely Ala54Thr proteinu FABP-2 (0,46) ve srovnání se skupinou low CS (0,24, $p = 0,0019$).

Závěr: Studie ukazuje na vztah zvýšené syntézy cholesterolu k BMI, intraabdominální akumulaci tuku, zvýšené koncentraci celkového cholesterolu a triglyceridů v plazmě, VLDL a LDL. Z analyzovaných kandidátních genů je zvýšenou syntézou cholesterolu spojena pouze alela Ala54Thr proteinu FABP-2.

Tato studie byla podpořena grantem IGA MZD ČR číslo 8149-3.

Ukazatelé oxidačního stresu a zánětu během léčby smíšené hyperlipidemie kombinací statin – fibrát

M. Zeman, M. Vecka, T. Vařeka, L. Janíková, A. Žák

IV. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

Východisko: Hyperlipidemie (HLP) patří k hlavním rizikovým faktorům vzniku kardiovaskulárních onemocnění (KVO) i diabetes mellitus 2. typu (DM2). Jak hypercholesterolemie, tak hypertriglyceridemie jsou spojeny se zvýšenou úrovní

oxidačního stresu i se zánětlivým stavem, které hrají roli v aterogenezi i v patogenezi rozvoje inzulinové rezistence (IR), poruch glukózové homeostázy a jejich progresu do DM2. Velmi závažný problém představuje zejména smíšená hyperlipidemie, u které je doporučovaných cílových hodnot plazmatických lipidů dosahováno jen zřídka užitím monoterapie statiny či fibráty.

Metody a výsledky: Po dobu 12 měsíců jsme podávali 22 nemocným se smíšenou HLP (LDL-C > 4,1 mmol/l a současně TG > 3,5 mmol/l) denně současně 20 mg atorvastatinu nebo 40 mg simvastatinu a 200 mg mikronizovaného fenofibrátu. Po roční terapii jsme zjistili vedle příznivého ovlivnění koncentrací plazmatických lipidů významné a statisticky významné kvalitativní změny ve složení VLDL a LDL izolovaných preparativní ultracentrifugací (pokles cholesterolu i triglyceridů v obou frakcích). Pozorovali jsme významný pokles koncentrace konjugovaných dienu (KD) v LDL (-16 %, $p < 0,05$); při vyšetření kinetiky KD v LDL pokles bazální absorbance v LDL (-10 %, $p < 0,05$) a hraniční prodloužení lag fáze. Významně klesla koncentrace CRP, zatímco hladiny fibrinogenu a zánětlivých cytokinů IL-6, TNF α , VCAM-1 se nezměnily.

Závěr: V této práci jsme u nemocných se smíšenou hyperlipidemií dosáhli podáváním kombinací léčby statin + fibrát významné příznivé úpravy složení izolovaných částic LDL a VLDL a snížení ukazatelů oxidačního stresu (koncentrace konjugovaných dienu a hodnota bazální absorbance v LDL).

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 0021620820 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Vliv polymorfizmu FABP-2 na homeostázu cholesterolu u metabolického syndromu

A. Žák¹, M. Vecka¹, M. Jáchymová², E. Tvrzická^{1,2}, M. Zeman¹, B. Staňková¹

¹ IV. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

² Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha

Východisko: Střevní izoforma proteinu vázajícího mastné kyseliny (FABP-2) (4q28-31q) je významným enzymem zapojeným do rezorpce mastných kyselin (FA). Je exprimována v proximálních partiích tenkého střeva. Byl popsán SNP na exonu 2, kodonu 54 se záměnou guaninu za adenin, který rezultuje v substituci alaninu za threonin. Alela -54Thr (A) je spojována se zvýšenou resorpcí FA, zvýšenou oxidací FA, inzulinorezistencí, zvýšeným rizikem nadváhy (resp. obezity), viscerální akumulací tukové tkáně a postprandiální hypertriglyceridemií (HTG). Vedle dyslipidemie typické pro metabolický syndrom (MS), zahrnující HTG, pokles HDL-C a převahu malých denzních LDL (fenotyp B velikosti LDL), je nověji u MS popisována zvýšená syntéza cholesterolu (C), žlučových kyselin (BA), zvýšená sekrece C i BA do žluče a snížená rezorpce C i ne-cholesterolových sterolů (NCS) ze zažívacího ústrojí. Koncentrace prekurzorů C (desmosterol, lathosterol), resp. jejich poměr ku celkovému C (TC) v plazmě je ukazatelem syntézy C de novo, koncentrace některých NCS (kampesterol, sitosterol), resp. jejich poměr ku TC jsou ukazatelem rezorpce exogenního cholesterolu.

Cíl studie: Cílem studie bylo zjistit frekvenci alely -54Thr (resp. genotypu AA) u osob s MS a jak se tento genotyp uplatňuje v homeostáze C.

Soubor nemocných a metody: Soubor sestává z 39 osob s MS diagnostikovaným dle doporučení IDF (2005) a 94 kontrolních osob. Lipidy v plasmě (TC, TG) a v LP třídách byly vyšetřeny enzymaticko-kolorimetricky, apo B a apo A-I pomocí EIA, inzulin a C-peptid RIA metodou. Koncentrace prekurzorů C i NCS byly analyzovány CGLC. Analýza SNP genů apo E, FABP-2 zahrnovala izolaci DNA a vyšetření SNP metodou RFLP s pomocí specifických endonukleáz.

Výsledky: U MS byla zjištěna zvýšená frekvence alely -54Thr (0,39) ve srovnání s kontrolní skupinou (0,14, $p < 0,05$). V souboru osob s MS byla zjištěna vyšší koncentrace lathosterolu (L) (+42 %, $p < 0,001$), desmosterolu (D) (+31 %, $p < 0,001$), poměru L/TC i D/TC (+21, resp. +14 %, obě $p < 0,001$) a nižší poměr kampesterolu (K) a sitosterolu (S) ku TC (-22, resp. -21 %, obě $p < 0,01$). Jedinci s genotypem AA (Thr54Thr) měli ve srovnání s GG (54Ala54) větší BMI (+12 %), obvod pasu (+6 %, obě $p < 0,05$), koncentrace C peptidu (+92 %, $p < 0,01$) a také vyšší poměr poměru L/TC i D/TC (+32, resp. +28 %, obě $p < 0,01$). Poměrem K/TC a S/TC se obě skupiny významně nelišily. Tyto změny nebyly závislé na frekvenci izoformy apo-E ani na složení a příjmu potravy.

Závěry: Ve skupině osob s MS jsme zjistili zvýšenou frekvenci alely -54Thr. Současně u MS je prokázána zvýšená syntéza C de novo, která je kompenzována poklesem jeho rezorpce. Alela -54Thr významně zvyšuje BMI, intraabdominální akumulaci tuku i syntézu C de novo, a to nezávisle na apo E, energetickém příjmu a složení potravy. Zdá se, že syntéza cholesterolu a jeho homeostáza je vedle negenetických činitelů (množství a složení přijímaných FA, množství exogenního cholesterolu, BMI, koncentrace inzulinu, glukózy) a genetických faktorů (apo E, Cyp 7A1, SREBP-1c, ABCG5/G8) také významně ovlivňována alelou -54Thr FABP-2.

Podporováno grantem IGA MZ ČR NR/8149-3.