

Sérová hladina retinol-binding proteinu 4 u obézných s inzulinovou rezistenciou a jedincov s diabetom 2. typu liečených metformínom

M. Tajtáková¹, Z. Semanová¹, G. Ivančová², J. Petrovičová³, V. Doničová², E. Žemberová⁴

¹ I. interná klinika Lekárskej fakulty UPJŠ a FN L. Pasteura Košice, Slovenská republika, prednostka prof. MUDr. Ivica Lazúrová, CSc.

² Interná a diabetologická ambulancia NZZ, Košice, Slovenská republika

³ Ústav lekárskej informatiky Lekárskej fakulty UPJŠ Košice, Slovenská republika, prednosta Ing. Jaroslav Majerník, Ph.D.

⁴ RIA laboratórium Košice, Slovenská republika, vedúca PharmDr. Eva Žemberová

Súhrn: Cieľ: Je rozdiel v sérovej hladine retinol-binding proteinu 4 (RBP4) medzi obéznymi s inzulinovou rezistenciou (IR) bez diabetu voči obéznym s diabetom 2. typu (DM2T) liečených metformínom a neobéznymi zdravými? Metodika: 28 obéznym s inzulinovou rezistenciou, 11 diabetikom 2. typu liečených metformínom a 17 kontrolám sa metódou RIA vyšetrila sérová hladina retinol-binding proteinu 4. Výsledky sa porovnali v rámci skupín a RBP4 sa v skupine s IR a v kontrolnej skupine koreloval s inzulinom. Výsledky: Najvyššiu hladinu RBP4 ($561,6 \pm 209$ ng/ml) mali obézni s IR (IR HOMA 3,9) a najnižšiu obézni diabetici typu 2 liečení metformínom ($391,1 \pm 133,5$ ng/ml; $p < 0,01$). Kontrolná skupina mala signifikantne nižšiu hladinu RBP4 voči obéznym s IR ($452,8 \pm 104,6$ ng/ml; $p < 0,05$), ale nesignifikantne vyššiu voči obéznym jedincom s DM2T liečených metformínom ($391,1 \pm 133,5$ ng/ml). RBP4 v sledovanej skupine koreloval s inzulinom $r = 0,46$ ($p < 0,03$). Záver: Zvýšenie RBP4 u obézných cestou spätnej regulácie GLUT4 v adipocytoch prispieva k rozvoju a k zhoršeniu systémovej IR metformín vplyvom na expresiu RBP4 v adipocytoch môže u obézných aj s MS zlepšovať celkovú inzulinovú senzitivitu a spomaliť nástup manifestného DM. RBP4 by mohol slúžiť aj ako marker zhoršujúcej sa tolerance glukózy u obézných.

Kľúčové slova: obezita – diabetes mellitus 2. typu – metformin – retinol-binding protein 4

Serum level of retinol-binding protein 4 in obese patients with insulin resistance and in patients with type 2 diabetes treated with metformin

Summary: Objective: Is there a difference between the retinol-binding protein 4 (RBP4) levels in obese patients with insulin resistance (IR) without diabetes, in obese patients with type 2 diabetes mellitus (DM2T) treated with metformin and in nonobese healthy individuals? Method: 28 obese individuals with insulin resistance, 11 type 2 diabetes patients treated with metformin and 17 control individuals were examined for serum level of retinol-binding protein 4 using the RIA method. The results were compared within the groups and RBP4 was correlated with insulin in the IR group and the control group. Outcome: The highest and the lowest RBP4 levels (561.6 ± 209 ng/ml) were recorded, respectively, for obese individuals with IR (IR HOMA 3.9) and for obese type 2 diabetics treated with metformin (391.1 ± 133.5 ng/ml) ($P < 0.01$). The RBP4 level of the control group was significantly lower as compared with the obese individuals with IR (452.8 ± 104.6 ng/ml) ($P < 0.05$), but insignificantly higher as compared with the obese individuals with DM2T treated with metformin (391.1 ± 133.5 ng/ml). RBP4 in the monitored group correlated with insulin $r = 0.46$ ($p < 0.03$). Conclusion: The increase in RBP4 in obese individuals by GLUT4 regulation in adipocytes contributes to the development and aggravation of systemic IR. Through its effect on RBP4 expression in adipocytes, metformin may improve total insulin sensitivity in obese individuals including those with MS and delay the onset of manifest DM. RBP4 could be used as a marker of deteriorating glucose tolerance in obese individuals.

Key words: obesity – type 2 diabetes mellitus – metformin – retinol-binding protein 4

Úvod

Obezita je najčastejšie sa vyskytujúca metabolická choroba často spojená s inzulinovou rezistenciou (IR) a zvýšeným rizikom rozvoja diabetu 2. typu (DM2T).

Tukové tkanivo je tkanivo aktívne. Secernuje biogenné peptidy (adipokíny), ktoré účinkujú lokálne i vzdialene ces-

tou autokrinného, parakrinného a endokrinného pôsobenia [3,21]. Produkcia adipokínov závisí od množstva a rozloženia tukového tkaniva. Zmnoženie hlavne viscerálneho tuku má za následok zvýšené uvoľnenie a následné ukladanie voľných mastných kyselín (VMK) a zníženie inzulinového vplyvu v inzulín-senzitívnych tkanivách a to hlavne

v pečeni, kostrovom svalstve a v B-bunkách pankreasu [10]. Tuková infiltrácia kostrového svalstva a pečene u obézných priamo súvisí s IR a rozvojom DM2T. Priamy efekt VMK na B-bunky pankreasu je lipotoxický. Lipotoxicita je zodpovedná za aktiváciu intracelulárnych signálov, ktoré vedú k apoptóze B-buniek pankreasu a v konečnom

Tab. 1. Jednotlivé parametre v rámci sledovaných skupín.

Sledované parametre	IR (n = 28) x ± SD	KON (n = 17) x ± SD	DM2T (n = 11) x ± SD
Vek v rokoch	49,3 ± 10,0	51,0 ± 8,7	51,1 ± 12,1
BMI kg/m ²	34,3 ± 4,6	24,3 ± 2,9**	35,9 ± 9
Inzulín µIU/ml	14,8 ± 7,5	4,7 ± 1,5**	–
Glykémia mmol/l	6,4 ± 2,7	5,1 ± 0,5*	–
IR HOMA	3,9 ± 1,9	1,0 ± 0,4**	–
TKs mm Hg	143,1 ± 13,6	120,3 ± 16,6**	137,7 ± 14,7
TKd mm Hg	73,2 ± 9,3	85,0 ± 10,2	92,3 ± 12,1**
TAG mmol/l	1,09 ± 0,6	1,06 ± 0,4	1,49 ± 0,8
RBP4 ng/ml	561,6 ± 209	452,8 ± 104*	391,9 ± 133**

IR HOMA – index inzulínovej rezistencie, RBP4 – retinol-binding protein 4, IR – jedinci s inzulínovou rezistenciou, KON – kontrolná skupina, DM2T – jedinci s diabetom 2. typu, TKs – systolický krvný tlak, TKd – diastolický krvný tlak, TAG – triacylglyceroly

*P < 0,05, **P < 0,01

dôsledku k ich redukcii. Oba procesy, IR a poškodenie B-buniek, sú v tesnom vzťahu k obezite a k DM2T u obéznych [6].

Zmnoženie hlavne viscerálneho tuku má za následok aj dysreguláciu v produkcii adipokínov [11]. Stúpa produkcia tých adipokínov, ktoré negatívne ovplyvňujú mnohé funkcie, a to hlavne chuť do jedla, energetickú bilanciu, imunitu, inzulínovú senzitivitu, angiogénu, krvný tlak, metabolizmus tukov a homeostázu [21]. Cestou adipokínov je sprostredkovaný vzdialený vplyv obezity na metabolizmus [1,6].

Dysregulácia v sekrécii adipokínov je spojená s inzulínovou rezistenciou. Inzulínová rezistencia navodzuje ťažké metabolické zmeny zahrňujúce hyperglykémiu, dyslipidémiu a hypertenziu a je spojená s metabolickými chorobami a kardiovaskulárnym rizikom [1,3,6,9]. Okrem leptínu, IL-6, TNFα, rezistínu a adiponektínu sa v poslednej dobe vo vzťahu k IR a DM2T venuje pozornosť aj retinol-binding proteinu 4 (RBP4), ako jednému z nových faktorov ovplyvňujúcich inzulínovú senzitivitu [4,8,11,12,25].

Cieľom predkladanej práce bolo:

- zistiť či je rozdiel v sérovej hladine RBP4 medzi obéznymi s IR bez dia-

betu a neobéznym zdravým a či RBP4 v tejto skupine koreluje s inzulínom

- porovnať sérovú hladinu RBP4 u obéznych s IR bez diabetu so sérovou hladinou RBP4 u obéznych diabetikov typu 2, liečených viac ako 1 rok metformínom.

Súbor vyšetrených a metodika

Súbor, ktorý tvorilo 56 približne rovnako starých jedincov (M 24 – vek 50,6 ± 10,2; Ž 32 – vek 50,9 ± 10,1) sa rozdelil na 39 obéznych (M 15; Ž 24) s BMI (váha v kg/výška v m²) > 30, WHR ženy 0,90 ± 0,09; muži 0,99 ± 0,04 a 17 neobéznych s BMI 24,3 ± 2,9 s WHR ženy 0,79 ± 0,07; muži 0,90 ± 0,03 (M 9; Ž 8), zatiaľ zdravých jedincov (IR HOMA 1,1) tvoriacich kontrolnú skupinu (KON). Skupina 39 obéznych sa rozdelila na 28 jedincov s IR (IR HOMA 3,9) zatiaľ bez diabetu a 11 obéznych s DM2T (BMI 35,9 ± 9,0, WHR ženy 0,85 ± 0,1; muži 0,96 ± 0,2), ktorí boli v evidencii diabetológa v priemere 5 rokov. Podmienkou pre zaradenie bola liečba iba metformínom (500–800 mg/deň), ktorá trvala viac ako 1 rok a kompenzácia diabetu s opakovanou hladinou HbA_{1c} pod 7 %.

Za účelom vypočítania indexu IR HOMA – G₀ × I₀/22 [20] sa skupine s IR a KON vyšetrila štandardne bio-

chemicky ráno na lačno medzi 7. až 9. hodinou glykémia a metódou RIA inzulín. Celej skupine sa ortuťovým tlakomerom zmeral krvný tlak, štandardne biochemicky sa vyšetrila aj sérová hladina triacylglycerolov a metódou RIA [RBP4 (Human) RIA] sérová hladina RBP4. V rámci jednotlivých skupín (IR, KON, DM2T) sa porovnal vek, BMI a RBP4, krvný tlak a triacylglyceroly. V skupine IR a KON aj glykémia a inzulín. RBP4 sa v tejto skupine koreloval s inzulínom.

Pri štatistickom spracovaní sa použili základné popisné štatistiky. Hypotéza rovnosti stredných hodnôt v jednotlivých skupinách sa testovala analýzou rozptylu jednoduchého triedenia. Na porovnanie medzi jednotlivými skupinami sa použila Tukey-Kramerová metóda. V prípade testovania hypotézy rovnosti dvoch stredných hodnôt sa použil T-test nepárový a v prípade štatisticky významného rozdielu medzi rozptylmi sa použil neparametrický Mann-Whitneov test. Štatistickú významnosť medzi rozptylmi automaticky testuje nami použitý program StatsDirect. Lineárna závislosť medzi RBP4 a inzulínom v skupine IR a KON sa overovala regresnou a korelačnou analýzou.

Výsledky

Vek v rokoch nevykazoval v rámci skupín štatisticky významný rozdiel (IR 49,3 ± 10, KON 51,0 ± 8,7, DM2T 55,1 ± 12,1). Medzi obéznymi jedincami s IR a kontrolnou skupinou bol štatisticky významný rozdiel v BMI, glykémii na lačno, inzulíne na lačno, v systolickom aj diastolickom krvnom tlaku, ale aj v sérovej hladine RBP4 (tab. 1). RBP4 v tejto skupine pozitívne koreloval s inzulínom (r = 0,46, p < 0,03). V rámci celej skupiny signifikantne najnižšie hodnoty tlaku krvi mali jedinci s KON skupiny. Priemerné sérové hladina triacylglycerolov vo všetkých troch skupinách boli v norme. V skupine s IR 2 (7,1 %) a v skupine s DM2T 4 (36,4 %) mali ale sérovu hladinu triacylglycerolov > 2,3 mmol/l, napriek

tomu, že všetci so skupiny DM2T boli liečení hypolipidemikami. V celej skupine najvyššiu sérovú hladinu RBP4 mali obézni s IR. Napriek tomu, že medzi jedincami s IR a DM2T liečených metformínom nebol štatisticky významný rozdiel v BMI ($34,3 \pm 4,6/35,9 \pm 6$), v sérových hladinách RBP4 bol signifikantný rozdiel ($561,6 \pm 209/391,9 \pm 133$; $P < 0,01$). Kontrolná skupina mala signifikantne nižšiu sérovú hladinu RBP4 voči obéznym i IR ($452,8 \pm 104,6/561,6 \pm 209$) ($P < 0,05$), ale nesignifikantne vyššiu ako jedinci s DM2T liečení metformínom ($452,8 \pm 104/391,9 \pm 133$), tab. 1.

Až 11/28 obéznych jedincov s IR (39,3 %) malo sérovú hladinu RBP > 600 ng/ml.

V KON skupine, ale ani v skupine diabetikov typu 2 liečených metformínom, sa takáto sérová hladina RBP4 nenamerala.

Diskusia

Adipocyty slúžia ako glukózový senzor v regulácii metabolizmu glukózy [12]. Glukóza je esenciálny substrát metabolizmu mnohých buniek. K transportu glukózy cez biologickú membránu je potrebný špecifický transportný proteín. V tukovom tkanive a v kostrovom svalstve je to GLUT4 transportér. U zdravých jedincov väzba inzulínu na receptor v membráne tukovej a svalovej bunky je signálom pre GLUT4 sprostredkovaný transport glukózy z plazmy intracelulárne. Súčasne je potlačená produkcia glukózy pečňou, čím sa udržiava normálna hladina krvného cukru [2,7,14,25]. Dostatočná expresia GLUT4 transportéra v tukovej a svalovej bunke zvyšuje inzulínovú senzitivitu. Pokles GLUT4 naopak inzulínovú senzitivitu znižuje a je spojený s IR [3,25].

Disrupcia GLUT4 transportéra pri IR oslabuje inzulínom stimulovaný transmembránový transport glukózy a jej metabolizmus v tukovom tkaniva i v kostrovom svalstve. Keď je potlačený vstup glukózy do tukovej a svalovej bunky, stúpa utilizácia a využívanie

tukov miesto cukrov [14]. U obéznych jedincov v dôsledku pomnoženia tukových buniek a zvýšeného skladovania tuku v tkanivách dochádza k zvýšenej produkcii proteinov produkovaných práve tukovými bunkami. Jedným z týchto proteinov je aj RBP4. Jeho produkcia sa u obéznych zvyšuje, a to ešte pred manifestáciou DM2T [8,25]. Vyššia produkcia RBP4 u obéznych spätnou negatívnou reguláciou GLUT4 v adipocytoch modifikuje expresiu GLUT4, čo vedie k zníženej citlivosti na inzulín v tuku, v svaloch i v pečeni. Výsledkom je systémová IR a zvýšená hladina krvného cukru [8,25]. Vyššia produkcia RBP4 spôsobuje aj zvýšenú produkciu glukoneogenetických enzýmov v pečeni, čo tiež zvyšuje hladinu krvného cukru [4,25]. Tieto dva účinky RBP4 (oslabenie inzulínového signálu a zvýšená produkcia glukózy pečňou) môžu predstavovať ďalší, od adipocytov odvodený signál dôležitý v patogenéze DM2T [8].

Podobne ako uvádza Graham et al [8], i my sme zistili, že u obéznych jedincov s IR zatiaľ bez diabetu bola nielen vyššia hladina glykémie a inzulínu na lačno, ale aj sérová hladina RBP4, čo ale nepotvrdili u ľudí Janke et al [12].

Mnohí autori zistili že obezita, IR a DM2T sa spájali so zníženou sérovou hladinou adiponektínu [4,9,24]. Zvýšenie sérovej hladiny adiponektínu pri liečbe tiazolidíndiónmi viedlo k zlepšeniu inzulínovej senzitivity [15,21]. Liečba metformínom neovplyvnila sérovú hladinu adiponektínu [23]. Dorosa et al [5] a Steals [22] udávajú výraznejší pozitívny vplyv na všetky rizikové faktory spojené s obezitou a DM2T v prípade ak sa použila v liečbe kombinácia metformín a tiazolidíndióny. Adiponectin a RBP4 sa v týchto prácach nesledoval. Yang et al [25] v experimente potvrdili po rosiglitazone aj dramatický pokles RBP4 a zlepšenie IR.

Vplyv metformínu na RBP nebol zatiaľ publikovaný. Metformín predstavuje zlatý štandard v liečbe DM2T

práve priaznivým vplyvom na inzulínovú senzitivitu [16,22].

V našom malom súbore obéznych diabetikov typu 2, ktorí boli liečení aspoň 1 rok iba metformínom, sme zistili signifikantne nižšiu sérovú hladinu RBP4 voči rovnako obéznym, zatiaľ neliečeným jedincom s IR.

Metformín, podobne ako tiazolidíndióny, patrí medzi inzulínové senzitizer, možno práve aj vplyvom na sérovú hladinu RBP4, čo sa ale bude musieť potvrdiť ďalšími pozorovaniami.

RBP4 bol doteraz považovaný iba za nosič pre vitamín A k tkanivám [13,17]. Podľa posledných literárnych údajov [8,19,25] nadbytok RBP4, s ktorým sa môžeme stretnúť u obéznych s IR a DM2T, môže mať aj inú funkciu nielen zásah do metabolizmu vitamínu A. Vplyvom na expresiu GLUT4 sa nadbytok RBP4 u obéznych môže uplatniť aj v patogenéze IR a DM2T ako nepriamy faktor ovplyvňujúci inzulínovú akciu predovšetkým v kostrovom svalstve, ktoré predstavuje najväčšie glukózu utilizujúce tkanivo [8,26].

Záver

Zvýšenie RBP4 u obéznych cestou spätnej regulácie GLUT4 v adipocytoch môže prispievať k rozvoju a k zhoršeniu systémovej IR. Metformín možno práve vplyvom na expresiu RBP4 v adipocytoch môže u obéznych aj s metabolickým syndrómom zlepšovať inzulínovú senzitivitu a spomaliť nástup manifestného DM. Retinol-binding protein 4 by preto mohol slúžiť ako marker zhoršujúcej sa tolerance glukózy u obéznych.

Práca vznikla vďaka podpore Vedeckej grantovej agentúry MŠ SR pri riešení projektu 1/9308/02.

Literatúra

1. Anderwald C, Roden M. Adipotoxicity and the insulin resistance syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev* 2004; 1: 310-319.
2. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 267-277.

3. Carvalho E, Kotani K, Peroni OD et al. Adipose – specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E551–E561.
4. Craig RL, Chu WS, Elbein SC. Retinol binding protein 4 as a candidate gene for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits. *Mol Genet Metab* 2006; PMID: 17174134.
5. Dorosa G, D'Angelo A, Ragonesi PD et al. Metformin–pioglitazone and metformin–rosiglitazone effects on non-conventional cardiovascular risk factors plasma level in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. *J Clin Pharm Ther* 2006; 31: 375–383.
6. Eldor R, Raz I. Lipotoxicity versus adipotoxicity – The deleterious effects of adipose tissue on beta cells in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; PMID: 16891032.
7. Gonzalez E, McGraw TE. Insulin signaling diverges into act dependent and independent signals to regulate the recruitment/docking and the fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 2006; PMID: 16914513.
8. Graham TE, Yang Q, Bluher M et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006; 354: 2552–2563.
9. Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 2004; 30: 13–19.
10. Heilbronn L, Smith ER, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: S4: 12–21.
11. Cho YM, Youn BS, Lee H et al. Plasma retinol-binding protein 4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 2457–2461.
12. Janke J, Engeli S, Boschmann M et al. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes* 2006; 55: 2805–2810.
13. Kanai M, Raz A, Goodman S. Retinol binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 1968; 47: 2025–2044.
14. Kotani K, Peroni OD, Minokoshi Y et al. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *J Clin Invest* 2004; 114: 1666–1675.
15. Kubota N, Terauchi Y, Kubota T et al. Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and – independent pathways. *J Biol Chem* 2006; 281: 8748–8755.
16. Moon RJ, Bascombe LA, Holt RI. The addition of metformin in type I diabetes improves insulin sensitivity, diabetic control, body composition and patient well-being. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 143–145.
17. Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 2000; 348: 481–495.
18. Osei K, Gaillard T, Schuster D. Thiazolidinediones increase hepatic insulin extraction in African Americans with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. A pilot study of rosiglitazone. *Metabolism* 2007; 56: 24–29.
19. Polonsky KS. Retinol-binding protein 4, insulin resistance and type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2006; 354: 2596–2598.
20. Radíková Z. Assessment of insulin sensitivity/resistance in epidemiological studies. *Endocrine Regulations* 2003; 37: 188–194.
21. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 355–365.
22. Steals B. Metformin and pioglitazone: Effectively treating insulin resistance. *Curr Med Res Opin* 2006; 22(Suppl 2): S27–S37.
23. Sharma PK, Bhansali A, Sialy R et al. Effects of pioglitazone and metformin on plasma adiponectin in newly detected type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 722–728.
24. Tajtáková M, Petrášova D, Petrovičová J et al. Adiponectin as a biomarker of clinical manifestation of metabolic syndrome. *Endocrine Regulations* 2006; 40: 1–6.
25. Yang Q, Graham TE, Mody N et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436: 356–362.
26. Zorzano A, Palaci M, Gumá A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiologica* 2005; 183: 43–58.

prof. MUDr. Mária Tajtáková, Ph.D.
www.medic.upjs.sk
e-mail: tajtakov@central.medic.upjs.sk

Doručeno do redakcie: 21. 9. 2006
Přijato po recenzii: 26. 3. 2007

www.praktickagyneekologie.cz