

# VYBRANÉ MECHANIZMY V PROCESU ATEROSKLERÓZY

## Antidiabetogenní a protizánětlivé účinky metforminu u potkanů s expresí lidského CRP

I. Marková<sup>1</sup>, H. Malínská<sup>1</sup>, O. Oliarynyk<sup>1</sup>, J. Trnovská<sup>1</sup>, V. Škop<sup>1</sup>, M. Hüttl<sup>1</sup>, L. Kazdová<sup>1</sup>, M. Pravenec<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centrum experimentální medicíny IKEM, Praha

<sup>2</sup>Fyziologický ústav AV ČR, Praha

**Úvod:** Mírný chronický zánět má významnou úlohu v patogenezi komplikací spojených s metabolickým syndromem (MS) a diabetem 2. typu (DM2T). Metformin je nejpoužívanějším lékem pro léčbu DM2T, protože efektivně potlačuje glukoneogenezi v játrech. Recentní nálezy naznačují, že může příznivě ovlivnit i poruchy provázející dyslipidemii a MS. Cílem studie bylo sledovat vliv metforminu na zánět, oxidační a dikarboxylový stres u experimentálního modelu pro výzkum zánětu a MS. **Metodika:** Pokusy byly provedeny na unikátním modelu transgenních spontánně hypertenzních potkanů s exprimovaným lidským CRP (SHR-CRP). Potkani byli krmeni standardní dietou bez nebo s metforminem (300 mg/kg/den) po dobu 4 týdnů. **Výsledky:** Podávání metforminu u SHR-CRP potkanů snížilo sérové koncentrace triacylglycerolů (-24 %,  $p < 0,05$ ), inzulínu a reaktivních dikarboxylů methylglyoxalu (-18 %,  $p < 0,05$ ) a 3-deoxyglukozonu (-25 %,  $p < 0,05$ ). Metformin v játrech u SHR-CRP potkanů snížil akumulaci triacylglycerolů (-28 %,  $p < 0,05$ ), zlepšil funkci glutathionového systému a snížil hladiny lipoperoxidačních produktů (konjugované dieny: -20 %,  $p < 0,05$ ; TBARS: -29 %,  $p < 0,001$ ), v myokardu významně redukoval oxidační stres. Nižší sérové koncentrace cytokinů IL6 (-50 %,  $p < 0,05$ ), TNF $\alpha$  a MCP1 zjištěné po podávání metforminu u SHR-CRP potkanů svědčily pro protizánětlivé účinky metforminu. **Závěr:** Výsledky ukazují, že metformin v přítomnosti vysokých hladin CRP má nejen protizánětlivé účinky, ale snižuje i oxidační a dikarboxylový stres ve tkáních. Tyto účinky se mohou uplatnit v mechanismu kardioprotektivních účinků metforminu.

Podpořeno MZ ČR-RVO (Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001) a grantem P305/13–04420S.

## Vliv rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění na fenotyp makrofágů v lidské tukové tkáni

I. Králová Lesná<sup>1</sup>, S. Čejková<sup>1</sup>, A. Králová<sup>1</sup>, J. Froněk<sup>2</sup>, F. Thieme<sup>2</sup>, L. Janoušek<sup>2</sup>, A. Sekerková<sup>3</sup>, R. Poledne<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, Centrum experimentální medicíny IKEM, Praha

<sup>2</sup>Klinika transplantační chirurgie, Transplantcentrum IKEM, Praha

<sup>3</sup>Pracoviště klinické a transplantační imunologie PLM IKEM, Praha

**Úvod:** Ačkoliv jsou běžně makrofágy děleny na proinflamační M1 a antiinflamační M2, definice těchto subpopulací vychází zejména z in vitro studií. Metoda průtokové cytometrie umožňuje detekci více buněčných znaků, a tím zpřesnění definice makrofágů izolovaných z tukové tkáně (ATM) zdravých jedinců. **Metoda:** Vzorky tukové tkáně byly získány při explantaci ledviny 52 živých dárců ledvin per operačně. Fenotyp makrofágů byl analyzován průtokovou cytometrií na základě exprese CD14, CD16, CD36 a CD163. Proporce M1 fenotypu ATM (CD14 + 16 + 36<sup>high</sup>) a M2 fenotypu ATM (CD14 + 16 – 163+) byly korelovány s rizikovými faktory aterosklerózy. **Výsledky:** Výrazně vyšší počet celkových makrofágů i podíl M1 makrofágů v subkutánní tukové tkáni je u jedinců s BMI > 30 a je provázen zrcadlovým snížením M2 makrofágů u těchto jedinců. Nárůst hladiny non-HDL-cholesterolu je spojen s obdobnými změnami ve viscerální tukové tkáni, vliv věku na proinflamační změny v této tkáni byl pozorován pouze u žen. **Závěr:** Proinflamační ATM a jejich propojení s kardiovaskulárními rizikovými faktory prokazuje přímé význam tukové tkáně pro patogenezi kardiovaskulárního onemocnění. Specifické intercelulární prostředí v této tkáni indukuje vznik specifického proinflamačního fenotypu makrofágů, tzv. metabolicky aktivovaných makrofágů.

Podpořeno projektem (MZCR) rozvoje výzkumné organizace 00023001 (IKEM – Institucionální podpora).

## Proinflamační stav viscerální tkáně může vysvětlit pleiotropní vliv statinů

R. Poledne<sup>1</sup>, I. Králová Lesná<sup>1</sup>, M. Petráš<sup>3</sup>, J. Froněk<sup>2</sup>, A. Králová<sup>1</sup>, F. Thieme<sup>2</sup>, S. Čejková<sup>1</sup>, J. Piřha<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoř pro výzkum aterosklerózy, Centrum experimentální medicíny IKEM, Praha

<sup>2</sup> Klinika transplantční chirurgie, Transplantcentrum IKEM Praha

<sup>3</sup> LF UK, Praha

V nedávné době jsme dokumentovali velmi úzkou korelaci koncentrací non-HDL-cholesterolu k proporci proinflamačních M1 makrofágů v lidské tukové tkáni. V této studii jsme k analyzovaným 47 živým dárčům ledvin přidali skupinu 23 pacientů s angiograficky prokázanou aterosklerózou. **Metody:** viscerální tkáň pacientů byla získána perioperativně v průběhu rekonstrukce periferního řečiště. Stroma vaskulární frakce byla separována a podíl proinflamačních M1 (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD36<sup>+++</sup>) makrofágů byl stanoven průtokovou cytometrií. Antropometrická, laboratorní a klinická data byla hodnocena Bayesovskou analýzou. **Výsledky:** Podobná korelace koncentrace non-HDL-cholesterolu k podílu M1-makrofágů ve skupině živých dárčů byla prokázána rovněž u skupiny pacientů ( $p < 0,005$ ). Bayesovská analýza rizik kardiovaskulárního onemocnění (pohlaví, věk, BMI, přítomnost aterosklerotických změn, hypercholesterolemie) prokázala zvýšený podíl M1-makrofágů ve viscerální tukové tkáni všech jedinců s hypercholesterolemií. Na druhou stranu byl signifikantně nižší podíl těchto makrofágů zjištěn u jedinců léčených statiny. **Závěr:** Hypolipemický vliv statinové terapie na proinflamační stav tukové tkáně může vysvětlit dlouhodobě předpokládaný pleiotropní vliv statinů.

Podpořeno projektem (MZ ČR) rozvoje výzkumné organizace 00023001 (IKEM) – institucionální podpora.

## Soluble endoglin participate on the development of endothelial dysfunction: or not?

P. Nachtigal, K. Jezkova, J. Rathouska, M. Varejckova, B. Vitverova, M. Vican, E. Dolezelova, I. Nemeckova

<sup>1</sup> Department of Biological and Medical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

A soluble form of tissue endoglin (sEng) circulating in plasma has been proposed to be at least partially responsible for the induction of endothelial dysfunction, however in blood vessels not related to atherosclerosis. We provided couple of experiments in order to reveal whether high levels of soluble endoglin might upregulate endothelial dysfunction markers and induce endothelial dysfunction both *in vitro* and *in vivo*. Transgenic mice overexpressing human sEng (high *Sol-Eng*<sup>+</sup>) and their age-matched transgenic littermates that do not develop high levels of human sEng (low *Sol-Eng*<sup>+</sup>) were fed high fat diet for 3 months and HUVEC and HEK were exposed to recombinant human endoglin at concentration 40–500 ng/mL at different times (16–48 hours). High soluble endoglin levels and the presence of mild hypercholesterolemia resulted in induction of inflammation in aorta of high *Sol-Eng*<sup>+</sup> mice. On the contrary, functional properties of aorta were not altered. Soluble endoglin treatment in endothelial cells resulted in upregulation of NFκB and IL6 expression but in increased expression of cell adhesion molecules. In conclusion, current results show that high levels of soluble endoglin induce signs of inflammation in vascular endothelium both *in vivo* and *in vitro*. On the other hand, not all typical markers of endothelial dysfunction in endothelial cells or functional properties in aorta were changed in the presence of high levels of soluble endoglin. In other words, more studies are necessary to answer the question whether soluble endoglin can induce endothelial dysfunction and promote atherogenesis.

*Grants:* This work was supported by grants from Czech Science foundation GACR number 15–24015S. The study was supported by grant from The Grant Agency of Charles University in Prague number 1284214/C and grant SVV/2014/260064. Transgenic mice were kindly provided by prof. Lopez-Novoa from University of Salamanca in Spain and Dr. Bernabeu from CSIC Madrid.

## Sledování dynamiky změn obsahu tuku v játrech po pokusné zátěži

J. Kovář, T. Bláhová, K. Zemánková, M. Drobny, P. Šedivý, X. Deligianni, M. Dezortová, M. Hájek

Praha

**Úvod:** Nealkoholická jaterní steatóza postihuje významnou část populace vyspělých zemí. Prakticky nic není známo o tom, jak se obsah tuku v játrech může měnit v průběhu dne. **Metodika:** U 6 zdravých mužů byla provedena 3 vyšetření trvající asi 8 hodin. Při jednom vyšetření dobrovolníci obdrželi pokusnou snídani (150 g tuku) a absolvovali 3 vyšetření obsahu tuku v játrech pomocí MR-zobrazování před a 3 a 6 hodin po konzumaci snídaně (A). V průběhu druhého vyšetření obdrželi navíc  $3 \times 50$  g glukózy v 2hodinových intervalech (B) a v průběhu třetího vyšetření lačnili (C). Odběry krve pro stanovení TG, NEMK, glukózy a inzulinu byly prováděny v definovaných časových intervalech v průběhu experimentu. **Výsledky:** Po podání 150 g tuku v pokusné snídani (A) vzrostl obsah tuku v játrech z  $3,1 \pm 0,7$  % na  $3,4 \pm 0,6$  %, po 3 hodinách ( $p < 0,05$ ) a dále se neměnila. Srovnatelné výsledky byly získány, pokud dobrovolníci celý den lačnili (C). V pokusu ve kterém bylo podání 150 g tuku spojeno s podáním glukózy (B) se obsah tuku v játrech neměnil. V průběhu vyšetření A C stoupala koncentrace NEMK v plazmě, zatímco v průběhu vyšetření B se neměnila. **Závěr:** Tyto předběžné výsledky jsou v souladu s představou, že NEMK jsou významným zdrojem pro syntézu TG v játrech.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 16–28427A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

## Úloha visfatinu v patogenezi metabolického syndromu a rakoviny – vliv jeho sekrece a intracelulární lokalizace

V. Škop<sup>1,2</sup>, P. Svoboda<sup>1</sup>, E. Křížová<sup>1</sup>, Š. Voráčková<sup>1</sup>, J. Zídková<sup>1</sup>, Z. Knejzlík<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

<sup>2</sup>Centrum experimentální medicíny IKEM, Praha

**Úvod:** Visfatin je protein s mnoha biologickými funkcemi, působí jako enzym při syntéze NAD, ale také jako adipokin a cytokin s vlivem na metabolismus lipidů a sacharidů a zánětlivé procesy. Jeho role jako secernovaného faktoru je však značně kontroverzní, protože prozatím není znám receptor na cílových buňkách ani způsob sekrece. Pro pochopení mechanismu jeho působení a sekrece je důležité znát detailní informace o jeho intracelulární lokalizaci a transportu. **Metodika:** Studovali jsme lokalizaci visfatinu značeného zeleným fluorescenčním proteinem in vitro (u buněk 3T3-L1 a HepG2) v průběhu buněčného cyklu a za specifických stresových podmínek. **Výsledky:** Visfatin se u žádné se studovaných buněčných linií nenacházel v sekrečních váčcích, ani nebyl asociován s cytoplazmatickou membránou. U dělících se buněk 3T3-L1-preadipocytů a HepG2-hepatocytů visfatin měnil svoji lokalizaci v průběhu buněčného cyklu z cytozolické (po rozdělení buněk) na převážně jadernou (před mitózou). Inhibice buněčného cyklu v různých fázích se vždy projevila zvýšenou akumulací visfatinu v jádře. Stejně tak genotoxický a oxidační stres zvýšil akumulaci visfatinu v jádře. V molekule visfatinu jsme identifikovali jaderný lokalizační signál a ukázali jsme, že mutace v tomto signálu výrazně zpomalí růst nádorových HepG2-buněk. **Závěr:** Visfatin pravděpodobně není aktivně secernován 3T3-L1-adipocyty ani HepG2-hepatocyty. Jaderná lokalizace visfatinu souvisí s potřebou NAD pro jaderné procesy, nezbytné pro dělení buňky. Inhibice jeho jaderného importu by tak mohla být novým nástrojem v léčbě rakoviny.

Podpořeno MZ ČR-RVO („IKEM, IČ 00023001“).