

## Metabolismus cholesterolu u obézních pacientů s diabetes mellitus 1. typu - vliv redukce hmotnosti

Lesná J.<sup>1,2,3,4</sup>, Tichá A.<sup>2</sup>, Hyšpler R.<sup>2,3</sup>, Svobodová I.<sup>2</sup>, Musil F.<sup>1</sup>, Bláha V.<sup>1,2</sup>, Sobotka L.<sup>1,4</sup>, Zadák Z.<sup>1,2</sup>, Šmahelová A.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>III. Interní klinika gerontometabolická, Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>2</sup>Centrum pro vývoj a výzkum, Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>3</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>4</sup>Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

### SOUHRN

*Cíl studie:* Diabetes mellitus 1. typu, onemocnění charakterizované absolutní inzulínovou deficiencí, je spojen se zvýšenou absorpcí cholesterolu. Obezita je stav provázený sníženou inzulínovou senzitivitou, pro níž je charakteristické naopak zvýšení endogenní cholesterolové syntézy a snížení absorpce. Cílem této studie bylo charakterizovat metabolismus cholesterolu u skupiny obézních diabetiků 1. typu a zachytit dynamiku změn v rámci řízené redukce hmotnosti.

*Typ studie:* intervenční, prospektivní.

*Materiál a metody:* Enzymatickou metodou byly stanoveny plazmatické hladiny celkového cholesterolu, HDL (high density lipoproteins)-cholesterolu, LDL (low-density lipoproteins)-cholesterolu, a triacylglycerolů u obézních diabetiků 1. typu ( $n = 14$ , BMI  $>30\text{kg/m}^2$ ) v I. fázi (před intervencí), II. fázi (po týdenním hladovění za hospitalizace + 3 týdnech s dietou o 150 g sacharidů/den) a v III. fázi (po 11 měsících s dietou o 225 g sach/den). Ve shodném algoritmu byl stanoven glykovaný hemoglobin metodou HPLC (high-performance liquid chromatography); dále hladiny skvalenu a ne-cholesterolových sterolů (lathosterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol) metodou plynové chromatografie s plamenionizační detekcí. Skupina štíhlých diabetiků 1. typu byla vyšetřena jednorázově ( $n = 14$ , BMI  $< 24$ ). Markery cholesterolového metabolismu byly porovnány s kontrolní skupinou štíhlých nediabetiků. Data jsou prezentována jako medián (percentil 25;75).

*Výsledky:* Ve fázi I. byly zaznamenány signifikantně ( $P \leq 0,05$ ) vyšší hladiny campesterolu podskupiny obézních diabetiků v porovnání se štíhlými. Ve srovnání s nediabetiky byly nalezeny signifikantně vyšší ( $P \leq 0,001$ ) hladiny sitosterolu u pacientů s diabetem. V průběhu redukčního programu (fáze III.) došlo u intervenované studijní podskupiny k signifikantnímu snížení hladin lathosterolu ( $P \leq 0,001$ ) i campesterolu ( $P \leq 0,05$ ).

*Závěr:* Mezi komparovanými studijními podskupinami byly nalezeny významné rozdíly v markerech absorpce cholesterolu. V průběhu redukčního programu došlo u obézních diabetiků 1. typu k signifikantnímu poklesu markerů absorpce i endogenní syntézy cholesterolu.

*Klíčová slova:* steroly, diabetes mellitus 1. typu, obezita.

### SUMMARY

**Lesná J., Tichá A., Hyšpler R., Svobodová I., Musil F., Bláha V., Sobotka L., Zadák Z., Šmahelová A.: Metabolism of cholesterol in obese patients with diabetes mellitus type 1 - impact of weight reduction**

*Objective:* Diabetes mellitus type 1 is characterized with an absolute insulin deficiency. Deterioration of cholesterol metabolism is well known in this disease – cholesterol absorption is typically elevated. Obesity, on the other hand, is typically accompanied with lower insulin sensitivity, that is known to increase cholesterol synthesis and decrease cholesterol absorption. The aim of this study was to characterize cholesterol metabolism in obese type 1 diabetics and to characterize its dynamics during weight reduction programme.

*Design:* interventional, prospective.

*Material and methods:* Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and triacylglycerols were estimated in obese type diabetic patients ( $n = 14$ , BMI  $> 30\text{ kg/m}^2$ ) enzymatically. Glycated hemoglobin was estimated by HPLC (high-performance liquid chromatography). Measurements were repeated in Phase I (before intervention), Phase II (after one week of fasting + three weeks on a diet with 150g saccharides per day) and in Phase III (after one year on a diet with 225g saccharides per day). Gas chromatography with the flame ionisation detector was used to estimate squalene and non-cholesterol sterols (lathosterol, campesterol and  $\beta$ -sitosterol). One-time, the control group of non-obese patients with type 1 diabetes ( $n=14$ , BMI $<24$ ) was investigated. Markers of cholesterol metabolism were compared with the control group of lean non-diabetics. Data are presented as median (percentile (25;75)).

*Results:* In Phase I, significant ( $P \leq 0.05$ ) elevation of campesterol in obese diabetics was found in comparison to lean subjects. In non-diabetic subjects, significantly ( $P \leq 0.001$ ) lower levels of sitosterol were found. During the weight reduction programme (Phase III) significant decrease in lathosterol ( $P \leq 0.001$ ) and campesterol ( $P \leq 0.05$ ) was found.

*Conclusion:* Compared study subgroups significantly differed in markers of cholesterol absorption. The significant decrease in markers of cholesterol absorption and endogenous cholesterol synthesis was found after the weight reduction programme.

*Keywords:* sterols, obesity, diabetes mellitus type 1, obesity.

## Úvod

Cholesterol představuje esenciální složku biomembrán. V plazmě jej, stejně jako ostatní steroly, nalzáme ve formě esterů mastných kyselin (hlavně linolové a olejové), dále ve formě volné, neesterifikované. Zdrojem cholesterolu je jednak dieta, jednak endogenní syntéza. Dietou se denně vstřebává cca 250–500 mg cholesterolu. Zásadní vliv na plazmatickou hladinu cholesterolu má endogenní syntéza (cca 1 g cholesterolu denně). Centrem syntézy cholesterolu jsou játra, byť mimojaterní produkce (kůra nadledvin, střevo, kůže) též není zanedbatelná.

K posouzení metabolismu cholesterolu v klinických studiích je frekventně využíváno stanovení prekurzorů cholesterolové syntézy a fytosterolů. Plazmaticky stanovené prekurzory syntézy cholesterolu s hydroxylovou skupinou na 3C steroidního jádra a steroly rostlinného původu (fytoosteroly) nazýváme necholesterolové steroly.

Markery syntézy (lathosterol, lanosterol, 7-dehydrocholesterol) jsou z buněk uvolňovány v neesterifikované formě (pouze neesterifikovaná forma methylsteroidů představuje marker [1]) rychlostí odpovídající biosyntéze.

Skvalen, prekurzor cholesterolové syntézy, představuje 30C uhlovodík bez steroidního jádra. V přírodě je nejvýznamněji zastoupen v tuku z jater žraloka (80%), dále potom v amarantovém (10%) i olivovém oleji (2%). V lidském organismu je majoritně syntetizován v játrech, obsahem se nachází především v tukové tkáni a v kůži. V plazmě, vázaný především na VLDL-cholesterolu, vykazuje cirkadiální změny [2]. Lathosterol je dalším důležitým prekurzorem syntézy cholesterolu, z buněk je uvolňován v neesterifikované podobě. V praxi se užívá především poměr lathosterol/cholesterol (stabilní v lipoproteinových částicích), který je považován za vůbec nejpřesnější marker endogenní syntézy. Plazmatická hladina lathosterolu odpovídá aktivitě HMG-CoA reduktázy [3].

Fytoosteroly, základní stavební kameny buněčné stěny rostlin, se od cholesterolu liší strukturou postranního řetězce. V lidském organismu se netvoří, jejich plazmatická hladina proto vypovídá o míře absorpce z diety [4]. Denní příjem činí asi 200–300 mg fytosterolů, absorbují se v neesterifikované formě maximálně z 5% [5]. Hydrolyzované formy fytosterolů jsou schopny vytěsněním z vazby snížit absorpci cholesterolu a snížit tak hladiny LDL-cholesterolu [6]. Nadbytek fytosterolů na druhou stranu akceleruje aterogenezi, mění vlastnosti žlučových kyselin a podporuje formování žlučových kamenů [7, 8].  $\beta$ -sitosterol je v naší dietě nejvíce zastoupen (v řepkovém, slunečnicovém i olivovém oleji). Campesterol se v nízkých koncentracích nachází v širokém dietním spektru (obiloviny, brambory, ovoce). Fytoosteroly jsou vstřebávány v neesterifikované podobě, stejně jako steroly uvolňované buňkami, v nichž byly syntetizované.

Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je chronické onemocnění, charakterizované absolutním inzulínovým deficitem způsobeným většinou autoimunitní destrukcí  $\beta$ -buněk pankreatu. Představuje necelých 8% paci-

entů diabetické populace. Každý rok v České republice nově onemocní téměř 20 pacientů na 100 tisíc obyvatel (s frekventní manifestací především mezi 13. a 15. rokem života), což představuje středně vysokou hodnotu incidence v rámci ostatních evropských států. Vzhledem k šíři metabolických efektů inzulínu zasahuje onemocnění nejen metabolismus sacharidů, ale i tuků a bílkovin [9,10].

Obezita, byť bývá typicky součástí charakteristiky diabetes mellitus 2. typu, se stále častěji vyskytuje i u diabetiků 1. typu. Obezita je provázána zvýšením počtu a velikosti adipocytů, stoupá množství tukových depozit, typická je infiltrace adipocytů mononukleárními buňkami. Dochází k relativnímu snížení zásobení tukové tkáně neurovaskulárními strukturami, zvyšuje se apoptotická destrukce buněk [11]. Metabolické změny tukové tkáně provází snížení citlivosti k inzulínu, na jejímž vzniku se podílí především steatóza jater s lokální inflamatorní reakcí, zvýšené množství volných mastných kyselin a intracelulární akumulace lipidů ve svalové a jaterní tkáni [12, 13]. Tuková tkáň mění svou sekreční charakteristiku ve smyslu nadprodukce proinflamatorních cytokinů, jež se zpětně podílí na vzestupu inzulínové rezistence a změnách cholesterolového metabolismu. Pro inzulín nezávislý diabetes je typické zvýšení cholesterolové absorpce, endogenní cholesterolová syntéza bývá spíše snížena [14]. Pacienty zatížené vzestupem inzulínové rezistence, tedy i obézní, naopak charakterizuje akcentace endogenní syntézy cholesterolu s nižší absorpcí cholesterolu [15, 16]. U obézních diabetiků 1. typu nebyl cholesterolový metabolismus dosud dostatečně charakterizován. Cílem této studie bylo charakterizovat cholesterolový metabolismus obézních diabetiků 1. typu a komparovat jej s podskupinou štíhlých diabetiků i kontrolní skupinou štíhlých nediabetiků. Dále je cílem hodnocení zachytit změny v cholesterolovém metabolismu obézních diabetiků 1. typu v průběhu definovaného redukčního programu.

## Metodika

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové. Probíhala v Diabetologickém centru III. Interní gerontometabolické kliniky FNHK, z jejíhož registru byli pacienti rekrutováni. Zahradila 28 studijních pacientů (14 pacientů k intervenci x 14 štíhlých pacientů s diabetes mellitus 1. typu), dále kontrolní skupinu 25 štíhlých nediabetiků:

- 1/ Obézní diabetici 1. typu (n=14, BMI>30kg/m<sup>2</sup>, věk 29–62 let, muži/ženy~ 9/5)
- 2/ Štíhlí diabetici 1. typu (n=14, BMI<24, věk 21–57 let, muži/ženy~8/6)
- 3/ Štíhlí nediabetici (n=25, BMI <24, věk 22–55 let, muži/ženy ~ 14/11)

Výše zmíněné podskupiny pacientů (obézní diabetici 1. typu, neobézní diabetici 1. typu a štíhlí nediabetici) byly vstupně komparovány. Obézní diabetici 1. typu byli intervenováni redukčním programem, měření a sledování dále ve II. a III. fázi redukce, v délce 12 měsíců.

## Klinické procedury

Po podpisu informovaného souhlasu byli pacienti plánovaně přijati ke k hospitalizaci.

**FÁZE I:** V den přijetí bylo zahájeno kompletní lačnění. Pacientům byly ponechány dávky bazálního inzulínu, za frekventních kontrol glykemie a ketonemie (4x denně). Následující den ráno bylo provedeno měření hmotnosti, výšky, obvod pasu (v polovině vzdálenosti mezi dolním žebrem a horním okrajem pánve), odběry krve.

**FÁZE II:** V průběhu následujících sedmi dní hospitalizace pacienti lačnili za aplikace bazálních dávek inzulínu. Současně probíhala dietní reedukace pacientů pro domácí režim diabetické diety se 150 g sacharidů/den (1200 kcal). Po dimisi bylo s odstupem 4 týdnů provedeno kontrolní měření v rámci ambulantní návštěvy: ve shodném algoritmu bylo provedeno antropometrické měření a krevní odběry po 10hodinovém lačnění. Pacienti byli reedukováni a převedeni na standardní diabetickou dietu s 225 g sacharidů/den (1650 kcal, 75 g bílkovin, 50 g tuku).

**FÁZE III:** V průběhu 11 měsíců od dimise, byli pacienti sledováni studijním lékařem ambulantně. Pravidelné kontroly probíhaly á 10 ± 1 týdnů. Pacienti byli nadále motivováni k dodržování dietních a racionálních režimových doporučení. Po 12 měsících od počátku redukčního programu bylo provedeno kontrolní antropometrické měření a laboratorní testy.

## Odběr a analýza biologického materiálu pro vyšetření glykovaného hemoglobinu

Krev byla odebrána do zkumavky s protisrážlivým činidlem EDTA (BD Vacutainer, Velká Británie) a analyzována metodou HPLC (Variant II Turbo, Bio-Rad, Laboratoires GmbH, California, USA).

## Odběr a analýza biologického materiálu pro vyšetření celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu a TAG

Vzorky byly odebrány do zkumavky bez protisrážlivého činidla a analyzovány na přístroji Modular Analytix (Roche, Basilej, Švýcarsko).

## Odběr biologického materiálu k analýze sterolů

Krev byla odebrána do zkumavky s protisrážlivým činidlem EDTA (BD Vacutainer, Velká Británie). Vzorky krve byly centrifugovány při 4°C, po dobu 10 minut a 2,5 rcf a pro stanovení sterolů byla použita krevní plazma.

## Použité chemikálie a přístroje:

Pro extrakce byl použit aceton, ethanol, hydroxid draselný, pyridin, hexan od firmy Merck (Německo), pro derivatizaci bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (Supelco, USA). Standardy -skvalen, lathosterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol a interní standard stigmastanol byly od Sigma (Německo). Zábrusové zkumavky 25 ml pro extrakce byly z firmy Kavalier (Česká republika) a autosamplerové vialy 2 ml ze Supelco (USA). Dále byly použity tyto přístroje: termoblok QBT2 (Velká Británie), termostat Thermo Scientific (Německo), horizontální třepačka

Kavalier LT3 (Česká republika), centrifuga Eppendorf 5810 R (Německo), vakuový koncentrátor Eppendorf 5301 (Německo), Plynový chromatograf GC 8000 series FISON Instruments - IPSWICH (Velká Británie) a kapilární kolona Rtx-5MS, délky 60 m x 0,25 mm ID, tloušťka filmu 0,25  $\mu$ m (Restek, USA).

## Příprava a extrakce vzorků k analýzám

Do zábrusové zkumavky bylo pipetováno 500  $\mu$ l krevní plazmy. Do každého vzorku a standardů bylo přidáno 5  $\mu$ l interního standardu (o koncentraci 20 mg/100 ml hexanu), 4,7 ml ethanolu a 0,3 ml vodného roztoku 33 % hydroxidu draselného a vše bylo intenzivně promíseno. Směs byla temperována na 45°C po dobu 60 minut v termostatu a poté ochlazena na laboratorní teplotu. Dále bylo přidáno 5 ml redestilované vody a byla provedena extrakce hexanem (5 ml), vzorky byly třepány po dobu 10 min, poté byly centrifugovány (4°C, 2,5 rcf, po dobu 10 minut). Hexanová vrstva byla stažena do zkumavky a byla provedena druhá extrakce s dalšími 5 ml hexanu. Spojené extrakty byly odpařeny v koncentrátoru do sucha (program pro těkavá rozpouštědla, 45°C). Odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml hexanu. Extrakt byl přenesen do autosamplerové vialy a odpařen do sucha v koncentrátoru. Poté bylo přidáno 100  $\mu$ l směsi bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu s pyridinem 1:1 (v/v), vialy uzavřeny a vzorky byly derivatizovány při teplotě 75°C po dobu 45 min v termobloku.

## Vlastní analýza na přístroji GC/FID, analytické znaky metody

Nástřík 1  $\mu$ l připraveného vzorku. Pro nástřík byl použit injektor typu split/splitless (liner 2 mm ID) o teplotě 300 °C. Perioda uzavřeného splitu (splitless) 1 min. Tlak na hlavu kolony 100 kPa, rychlost nosného plynu (helium) 37 cm/s. Termostat pece byl programován 50°C (po dobu 2 min), nárůst teploty o 15 °C/min na 315 °C (po dobu 14 min). Teplota detektoru FID – 330°C. Kvantifikace je prováděna metodou vnitřního standardu. Koncentrace jednotlivých analytů byla odečtena z kalibrační přímky.

## Statistické zpracování

Data byla zpracována softwarem Sigmastat (Systat, USA). Byly použity statistické testy – One way Anova measurement, Spearment test, Linear regression analysis.

## Výsledky

**FÁZE I:** Vstupní charakteristika podskupiny diabetiků 1. typu obézních (n=14, BMI>30kg/m<sup>2</sup>, věk 29 až 62 let, muži/ženy~ 9/5) a štíhlých (n=14, BMI<24, věk 21–57 let, muži/ženy~ 8/6) byla porovnána (Tabulka 1). Lipidové spektrum, glykovaný hemoglobin a vybrané markery cholesterolového metabolismu byly vstupně stanoveny u skupiny diabetiků 1. typu (Tabulka 2). Byly zaznamenány signifikantně vyšší (P<0.05) hladiny campesterolu a poměru campesterol/cholesterol u podskupiny obézních pacientů.

**Table 1.** Initial characteristics of obese and lean patients with diabetes mellitus type 1.

|                                | Lean patients     | Obese patients – Phase I | Sign. Lean vs. Obese |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------|----------------------|
| Age (years)                    | 36 (23; 47)       | 43 (36; 46)              | NS                   |
| Years since DM diagnosis       | 10 (7; 15)        | 19 (10; 26)              | NS                   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 22.5 (20.8; 23.8) | 33.2 (32.4; 33.6)        | * P ≤ 0.001          |
| Waist circumference (cm)       | 84 (78; 90)       | 108 (105; 110)           | * P ≤ 0.001          |
| HbA1c (%; IFCC)                | 7.5 (5.7; 8.1)    | 5.8 (5.4; 6.5)           | NS                   |
| Therapeutical insulin (IU/day) | 46 (40;58)        | 50 (39; 54)              | NS                   |

Legend: DM /diabetes mellitus/, BMI /body mass index/, HbA1c /glycated haemoglobin/, IU /international unit/, Phase I - before weight reduction programme; Sign. Lean vs. Obese - significance between lean and obese subjects; \* - significant (p-value), NS – non significant..

**Table 2.** Initial characteristics of cholesterol metabolism in obese and lean patients with diabetes mellitus type 1 and lean nediabetics.

|   | Lean subjects      | Obese patients      | Nondiabetics       | Sign. Lean vs. Obese | Sign. Lean vs. Nondiabetics |
|---|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------|
| Total cholesterol (mmol/l)                      | 5.20 (4.50; 5.50)  | 4.95 (4.39; 5.57)   |                    | NS                   |                             |
| High-density lipoprotein - cholesterol (mmol/l) | 1.60 (1.30; 1.77)  | 1.30 (0.97; 1.85)   | -                  | NS                   | -                           |
| Low-density lipoprotein - cholesterol (mmol/l)  | 2.90 (2.60; 3.50)  | 3.35 (2.30; 3.70)   | -                  | NS                   | -                           |
| Triacylglycerols (mmol/l)                       | 1.20 (1.00; 1.30)  | 1.28 (1.03; 1.59)   | -                  | NS                   | -                           |
| Squalen (μmol/l)                                | 2.10 (1.90; 2.50)  | 2.05 (1.23; 2.41)   | 2.05 (1.42; 2.49)  | NS                   | * P< 0.001                  |
| Lathosterol (μmol/l)                            | 6.60 (3.10; 8.90)  | 8.15 (6.46; 10.25)  | 6.61 (3.04; 9.68)  | NS                   | NS                          |
| Campesterol (μmol/l)                            | 9.50 (5.50; 11.30) | 13.53 (7.96; 16.46) | 9.80 (7.46; 12.51) | * P<0.05             | NS                          |
| Sitosterol (μmol/l)                             | 9.20 (7.60; 11.90) | 8.08 (6.87; 11.76)  | 5.03 (3.31; 6.17)  | NS                   | * P< 0.001                  |
| Lathosterol/cholesterol (μmol/mmol)             | 1.30 (0.60; 2.20)  | 1.45 (1.28; 2.25)   | 1.33 (1.03; 1.87)  | NS                   | NS                          |
| Campesterol/cholesterol (μmol/mmol)             | 1.80 (1.30; 2.40)  | 2.48 (1.56; 3.49)   | 2.09 (1.41; 2.67)  | * P= 0.032           | NS                          |
| β-sitosterol/ cholesterol (μmol/mmol)           | 1.90 (1.50; 2.20)  | 1.77 (1.01; 2.12)   | 0.97 (0.72; 1.28)  | NS                   | * P< 0.001                  |

Legend: Sign. Lean vs. Obese vs. Nondiabetics - significance between lean and obese type 1- diabetics and lean nediabetics; \* - significant (p-value), NS – non significant.

Při porovnání štíhlých diabetiků 1. typu a nediabetické kontrolní skupiny byly zaznamenány signifikantně vyšší ( $P < 0,001$ ) plazmatické hladiny sitosterolu, poměru sitosterol/chol a squalenu u podskupiny štíhlých diabetiků (Tabulka 3).

FÁZE II a III: Podskupina obézních diabetiků 1. typu byla charakterizována v průběhu 3 fází redukčního programu (Tabulka 3). Došlo k významnému snížení těles-

né hmotnosti i obvodu pasu, denní dávka inzulínu byla zredukována v průměru o 20%. V I.-II. fázi programu došlo ke snížení celkového cholesterolu a LDL-cholesterol, v I.-III. fázi stoupla signifikantně hladina HDL-cholesterol (Tabulka 4). U obézních diabetiků hladina celkového cholesterolu pozitivně korelovala s denní terapeutickou dávkou inzulínu (Obr. 1). V průběhu I.-III. fáze byly zaznamenány významné změny v plaz-

**Table 3.** Characteristics of obese patients with diabetes mellitus type 1 during the weight reduction programme.

|                                | Obese - Phase I   | Obese - Phase II  | Obese - Phase III | Sig. I vs II | Sig. I vs III |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|---------------|
| Age(years)                     | 43 (36; 46)       | -                 | -                 | -            | -             |
| Years since DM diagnosis       | 19 (10; 26)       | -                 | -                 | -            | -             |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 33.2 (32.4; 33.6) | 31.5 (30.4; 32.2) | 32.7 (31.6; 32.8) | *P<0.001     | *P<0.001      |
| Waist circumference (cm)       | 108 (105; 110)    | 103 (94; 106)     | 105 (92; 110)     | *P<0.001     | *P<0.05       |
| HbA1c (%; IFCC)                | 5.8 (5.4; 6.5)    | 5.7 (5.1; 6.2)    | 6.6 (6.1; 6.9)    | NS           | *P<0.05       |
| Therapeutical insulin (IU/day) | 50 (39; 54)       | 37 (32; 40)       | 42 (39; 51)       | *P<0.001     | *P<0.001      |

Legend: DM /diabetes mellitus/, BMI /body mass index/, HbA1c /glycated haemoglobin/, IU /international unit/, Phase I - before weight reduction programme, Phase II - after a month of weight reduction programme, Phase III - after 12 months of weight reduction programme; Sign I vs. II, III - significance among Phase I, II or III; \* - significant (p-value), NS – non significant.

**Table 4.** Characteristics of cholesterol metabolism in obese type 1 diabetics during the weight reduction programme.

|   | Obese - Phase I     | Obese - Phase II   | Obese- Phase III  | I vs II  | I vs III |
|---|---------------------|--------------------|-------------------|----------|----------|
| Total cholesterol (mmol/l)                    | 4.95 (4.39; 5.57)   | 4.10 (3.88; 5.03)  | 4.91 (4.28; 5.47) | *P≤0.05  | NS       |
| High-density lipoprotein-cholesterol (mmol/l) | 1.30 (0.97; 1.59)   | 1.14 (1.03; 1.39)  | 1.49 (1.15; 2.01) | NS       | *P≤0.05  |
| Low-density lipoprotein-cholesterol (mmol/l)  | 3.35 (2.3; 3.70)    | 2.45 (2.02; 3.23)  | 2.71 (2.24; 3.11) | *P≤0.05  | NS       |
| Triacylglycerols (mmol/l)                     | 1.28 (1.03; 1.59)   | 1.04 (0.91; 1.68)  | 0.83 (0.63; 1.41) | NS       | NS       |
| Squalene (μmol/l)                             | 2.05 (1.23; 2.41)   | 2.09 (1.80; 2.51)  | 1.49 (0.60; 2.84) | NS       | NS       |
| Lathosterol (μmol/l)                          | 8.15 (6.46; 10.25)  | 9.37 (7.55; 9.80)  | 5.44 (2.44; 6.09) | NS       | *P≤0.001 |
| Campesterol (μmol/l)                          | 13.53 (7.96; 16.46) | 8.46 (6.22; 11.76) | 5.68 (4.15; 7.53) | *P≤0.05  | *P≤0.05  |
| Sitosterol (μmol/l)                           | 8.08 (6.87; 11.76)  | 5.66 (4.61; 9.51)  | 7.42 (4.24; 8.70) | *P≤0.05  | NS       |
| Lathosterol/cholesterol (μmol/mmol)           | 1.45 (1.28; 2.25)   | 1.82 (1.41; 2.37)  | 0.99 (0.53; 1.36) | *P≤0.05  | *P≤0.05  |
| Campesterol/cholesterol (μmol/mmol)           | 2.48 (1.56; 3.49)   | 1.88 (1.75; 2.89)  | 1.10 (0.95; 1.37) | *P=0.032 | *P≤0.001 |
| β-sitosterol/ cholesterol (μmol/mmol)         | 1.77 (1.01; 2.12)   | 1.48 (0.98; 1.75)  | 1.46 (0.87; 1.97) | NS       | NS       |

Legend: Phase I - before weight reduction programme, Phase II - after a month of weight reduction programme, Phase III - after 12 months of weight reduction programme; Sign I vs. II, III - significance among Phase I, II or III; \* - significant (p- value), NS - non significant.

**Table 5.** Correlation of initial therapeutical insulin dose and markers of cholesterol metabolism in obese patients with diabetes mellitus type 1.

|                         | Spearman test |      |
|-------------------------|---------------|------|
|                         | r             | p    |
| Squalene                | 0.003         | 0.98 |
| Lathosterol             | 0.15          | 0.60 |
| Campesterol             | 0.59          | 0.84 |
| Sitosterol              | 0.088         | 0.76 |
| Lathosterol/Cholesterol | 0.025         | 0.92 |
| Campesterol/Cholesterol | -0.11         | 0.71 |
| Sitosterol/Cholesterol  | -0.003        | 0.98 |

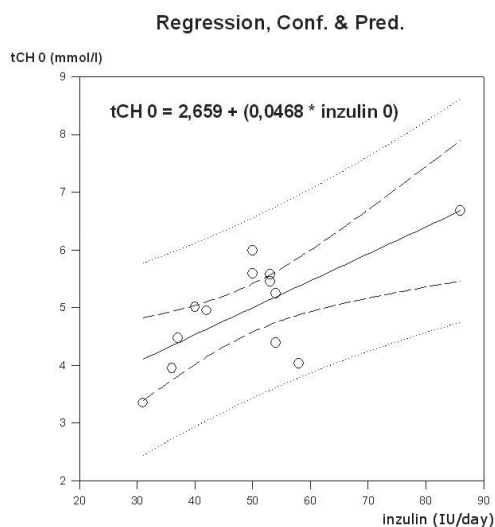
Legend: P- (p-value), r (correlation coefficient).

matických hladinách markerů cholesterolové syntézy a absorpce. Došlo k významnému snížení lathosterolu, poměru lathosterol/cholesterol, campesterolu a poměru campesterol/cholesterol.

Ve fázi I. u obézních diabetiků byl vztah terapeutické denní dávky inzulínu a celkového cholesterolu charakterizován lineární regresí (P=0,007, r<sup>2</sup>=0,50) (Obr. 1). Nebyla zaznamenána signifikantní korelace terapeutické dávky inzulínu (ve fázi I.) s markery cholesterolového metabolismu (Tabulka 5).

## Diskuse

U pacientů s diabetes mellitus 1. typu bývá charakteristicky zvýšená absorpce cholesterolu, endogenní syntéza je spíše nižší. U obézních pacientů se zvýšenou inzulínovou rezistencí bývá naopak akcentovaná endogenní syntéza cholesterolu [14]. Cílem tohoto hodnocení bylo charakterizovat cholesterolový metabolismus u obézních diabetiků 1. typu.



**Fig. 1.** Positive significant (P=0.007, r<sup>2</sup>=0.50) linear regression of initial therapeutical insulin dose and plasmatric total cholesterol in obese patients with diabetes mellitus type 1.

Legend: tCH - total cholesterol, IU - international unit.

Vstupně, v I. fázi protokolu, byli srovnáni štíhlí a obézní diabetici 1. typu, parametry cholesterolového metabolismu byly porovnány s kontrolní skupinou štíhlých nediabetiků. Studijní podskupiny se významně nelišily v základních vstupních charakteristikách (věk, zastoupení pohlaví, u diabetiků délka trvání diabetu a terapeutická dávka inzulínu). Nesignifikantní odlišnosti byly zaznamenány v kompenzaci diabetu (Tabulka 1), kdy podskupina štíhlých diabetiků inklinovala k horší kompenzaci. Jedním z možných vysvětlení je vyšší variabilita glykemických profilů štíhlých pacientů spojená s celkově aktivnějším životním stylem. Obézní pacienti bývají také vzhledem k vyšší inzulínové rezistenci méně náchylní ke vzniku hypoglykemie, což je důležitý faktor přispívající ke stabilizaci glykemického profilu.

Nebyly zaznamenány významné rozdíly v lipidovém spektru mezi podskupinou obézních a štíhlých diabetiků 1. typu. Ze vstupních dat charakterizujících cholesterolový metabolismus je zřejmá zvýšená absorpce cholesterolu štíhlých diabetiků (signifikantní elevace hladiny sitosterolu) v porovnání s kontrolní nediabetickou skupinou. To je v souladu s původním předpokladem o akcentované absorpci cholesterolu u diabetiků 1. typu [17, 18]. Naopak snížení markerů endogenní syntézy u diabetiků 1. typu nebylo při porovnání s kontrolní skupinou zaznamenáno. Vedlejším nálezem byla významně nižší hladina squalenu u nediabetiků. Vzhledem k tomu, že šlo o detekci za současně nesignifikantních rozdílů hladiny lathosterolu či poměru lathosterol/cholesterol, nehodnotíme výsledek jako rozdíl v endogenní syntéze.

Signifikantně vyšší hladiny campesterolu u obézních diabetiků vůči štíhlým pacientům s diabetes mellitus 1. typu pravděpodobně odpovídají celkově vyššímu dietnímu příjmu. Obezita, metabolický syndrom a nárůst inzulínové rezistence však bývají tradičně spjaty s akcentovanou endogenní syntézou a naopak poklesem absorpčních markerů [15,19]. V rámci našeho sledování nebyly nalezeny významné rozdíly v markerech endogenní syntézy cholesterolu u skupiny obézních a štíhlých diabetiků 1. typu.

V průběhu redukčního programu došlo k významnému poklesu BMI. Denní terapeutická dávka inzulínu byla významně snížena. Významným arteficiálním faktorem podílejícím se na redukci denního inzulínu byla obava pacientů z hypoglykemie. Při snaze dodržovat racionální režimová a dietní doporučení proto často aplikovali nižší dávky inzulínu, než bylo doporučeno. To považujeme za hlavní důvod nežádoucího a významného vzestupu glykovaného hemoglobinu ve fázi III. V průběhu programu nicméně nebyla zaznamenána zvýšená frekvence epizod hypoglykemií.

V průběhu II. fáze byl zaznamenán u podskupiny obézních diabetiků 1. typu významný pokles LDL-cholesterolu, celkového cholesterolu a markerů absorpce, což odpovídá doporučenému nízkokalorickému příjmu. Ve III. fázi programu došlo k významnému vzestupu HDL-cholesterolu, což souvisí pravděpodobně s režimovými změnami (ve smyslu navýšení pohybových aktivit), které anamnesticky uváděly především ženy. Ve III. fázi byl pozorován významný

pokles markeru absorpce – campesterolu a markeru endogenní syntézy - lathosterolu, spolu s poměrem lathosterol/cholesterol. Hallikainen a spol. [20] dokládá, v souladu s naším pozorováním, u skupiny obézních se spánkovou apnoí po redukci hmotnosti pokles endogenní syntézy cholesterolu. Vzestup markerů absorpce cholesterolu související s poklesem hmotnosti [20] v rámci našeho sledování nepotvrzujeme. Je pravděpodobné, že významné změny v endogenní cholesterolové syntéze souvisejí se změnami inzulínové senzitivity. Inzulínová rezistence je zásadně ovlivněna množstvím tuku v jaterní tkáni (nealkoholová steatóza jater), jehož kvantita se přímo úměrně odráží v endogenní cholesterolové syntéze [21]. Dlouhodobé dietní a režimové změny mohou vést k redukci intrahepatální tukové tkáně, zlepšení inzulínové senzitivity a předpokládanému poklesu endogenní syntézy cholesterolu. Vzestup inzulínové senzitivity je také provázen zvýšenou aktivitou 5'-AMP-aktivované protein kinázy (AMPK), jež je významným inhibítozem endogenní cholesterolové syntézy [22]. Jejím důležitým aktivátorem je, cestou cAMP a HMGCoA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductáza), inzulín. U podskupiny obézních diabetiků ve fázi I. byl vztah denní terapeutické dávky inzulínu a celkového cholesterolu charakterizován lineární regresí ( $P=0,007$ ). Nebyla prokázána významná korelace markerů absorpce a endogenní syntézy s denní terapeutickou dávkou inzulínu. Nejvýraznější redukce dávky inzulínu ve fázi I.-II. nebyla provázena významnými změnami v endogenní syntéze cholesterolu, které byly zatíženy ve fázi I.-III. Snížení dávky inzulínu v průběhu programu tedy nepovažujeme za majoritní mechanismus snížení endogenní syntézy cholesterolu. Za zásadní pokládáme vzestup inzulínové senzitivity spojený s dlouhodobými dietními a režimovými úpravami.

V dostupných zdrojích obdobná intervenční studie zabývající se změnami v cholesterolovém metabolismu u podskupiny obézních diabetiků 1. typu nebyla nalezena, ačkoliv srovnávací neintervenční data popisující cholesterolový metabolismus u štíhlých diabetiků jsou k dispozici [17,18]. Vzhledem k celkově velmi specifické cílové subpopulaci diabetiků (obézní DM 1. typu) není studijní soubor pacientů obsahlý a studijní výstupy je třeba dále ověřit na početnějším souboru pacientů. Vzhledem k tomu, že studie probíhala ambulantně po dobu 12 měsíců, mohla být do určité míry limitována compliance pacientů k dietním a režimovým doporučením, předpokládáme tedy zatížení výsledků interindividuální variabilitou compliance. Na druhou stranu v sobě takto získaná data nesou důležitou výpovědní hodnotu efektivitě reálné terapie aplikované a dosažitelné v podmínkách běžné klinické praxe.

## Závěr

Byly nalezeny významné rozdíly ve vstupní charakteristice cholesterolového metabolismu studijních podskupin. U pacientů s diabetes mellitus 1. typu byla zaznamenána elevace markerů absorpce v porovnání s nediabetickou skupinou. Absorpce cholesterolu byla

dále akcentována u podskupiny obézních diabetiků. Signifikantní rozdíly v endogenní syntéze cholesterolu nebyly vstupně nalezeny. Signifikantní pokles markerů absorpce u obézních diabetiků v průběhu redukčního programu přisuzujeme změně dietních zvyklostí. Lze předpokládat, že významný pokles v markerech endogenní syntézy v průběhu redukčního programu úzce souvisí se vzestupem inzulinové senzitivity spojené s redukcí hmotnosti pacientů a dlouhodobými dietními a režimovými změnami.

## Literatura

1. **Kuksis, A.** Plasma non-cholesterol sterols. *Journal of Chromatography*, 2001; 935, p. 203-236.
2. **Hashim, Y. Z., Eng, M., Gill, C. I., et al.** Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. *Nutr. Rev.*, 2005, 63(11), p. 374-386.
3. **Hyšpler, R., Crhova, S., Gasparič, J., et al.** Determination of isoprene in human expired breath using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 2000, 28, p. 183-90.
4. **Heinemann, T., Axtmann, G., von Bergmann, K.** Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1993, 40, p. 302-308.
5. **Silbernagel, G., Fauler, G., Renner, W., et al.** The relationships of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with the severity of coronary artery disease. *J. Lipid Res.*, 2009, 50(2), p. 334 – 341.
6. **Choudhary, S. P., Tran, L. S.** „Phytosterols: Perspectives in human nutrition and clinical therapy“. *Current medicinal chemistry*, 2011, 18(29), p. 4557–67.
7. **Koivusalo, A. I., Pakarinen, M. P., Sittiwet, C., et al.** Cholesterol, non-cholesterol sterols and bile acids in paediatric gallstones. *Dig. Liver Dis.*, 2010, 42(1), p. 61 – 66.
8. **Jones, P. J., Raeini-Sarjaz, M., Jenkins, D. J., et al.** Effects of a diet high in plant sterols, vegetable proteins, and viscous fibers (dietary portfolio) on circulating sterol levels and red cell fragility in hypercholesterolemic subjects. *Lipids*, 2005, 40(2), p.169 – 174.
9. **Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J. et al.** National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, 2011, 378 (9785), p. 31–40.
10. Online: [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz).
11. **Summers, L. K., Samra, J. S., Frayn, K. N.** Impaired postprandial tissue regulation of blood flow in insulin resistance: a determinant of cardiovascular risk? *Atherosclerosis*. 1999, 147(1), p. 11-15.
12. **Bjorkhem, I., Miettinen, T. A., Reihner, E. et al.** Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG- CoA reductase in human liver. *J. Lipid Res.*, 1987, 28, p.1137-1143.
13. **Samuel, V. T., Shulman, G. I.** Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.*, 2012, 148, p. 852-871.
14. **Miettinen, T. A., Gylling, H., Tuominen, J., Simonen, P., Koivisto, V.** Low synthesis and high absorption of cholesterol characterize type 1 diabetes. *Diabetes care.*, 2004, 27, p.53-58.
15. **Simonen, P., Gylling, H., Howard, A., Miettinen, T. A.** Introducing a new component of the metabolic syndrome: low cholesterol absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, 72, p. 82-88.
16. **Šmahelová, A., Zadák, Z., Hyšpler, R., Haas, T.** An importance of vegetable sterols in diabetics (in Czech). *Vnitřní lékařství*, 2004, 50, p.147-152.
17. **Jarvisalo, M., Raitakari, O., Gylling, H., Miettinen, T. A.** Cholesterol absorption and synthesis in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care.*, 2006, 29(10), p. 2300-4.
18. **Gylling, H., Laaksonen, D. E., Atalay, M., Hallikainen, M., Niskanen, L., Miettinen, T. A.** Markers of absorption and synthesis of cholesterol in men with type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2007, 23(5), p. 372-7.
19. **Paramsothy, P., Knopp, R. H., Kahn, S. E., Retzlaff, B. M., Fish, B., Ma, L., Ostlund, R. E. Jr.** Plasma sterol evidence for decreased absorption and increased synthesis of cholesterol in insulin resistance and obesity. *Am J. Clin. Nutr.*, 2011, 94(5), p. 1182-8.
20. **Hallikainen, M., Tuomilehto, H., Martikainen, T., Vanninen, E., Seppa, J., Kokkarinen, J., Randell, J., Gylling, H.** Cholesterol metabolism and weight reduction in subjects with mild obstructive sleep apnoea: a randomised, controlled study. *Cholesterol 2013*, 2013, 769457.
21. **Brindisi, M. C., Guiu, B., Duvillard, L., Athias, A., Rollot, F., Bouillet, B., Beacco, M., Hillon, P., Cercueil, J. P., Verges, B., Petit, J. M.** Liver fat content is associated with an increase in cholesterol synthesis independent of statin therapy use in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 2012, 224(2), p. 465-8.
22. **Bijland, S., Mancini, S. J., Salt, I. P.** Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin. Sci.*, 2013, 124 (8), p. 491-507.

Studie byla podpořena projektem MZ ČR-RVO(FNHNK 00179906) a grantem Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictvím České republiky (IGA MZ ČR NT/12287-5/2011).

Do redakce došlo 17. 2. 2015

Adresa pro korespondenci:  
MUDr. Jana Lesná  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky  
Fakultní nemocnice Hradec Králové  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
e-mail: [jana.lesna@fnhk.cz](mailto:jana.lesna@fnhk.cz)