

Martin Haluzík, Štěpán Svačina

METABOLICKÝ SYNDROM A NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

PPAR



Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude **trestně stíháno**.

Používání elektronické verze knihy je umožněno jen osobě, která ji legálně nabyla a jen pro její osobní a vnitřní potřeby v rozsahu stanoveném autorským zákonem. Elektronická kniha je datový soubor, který lze užívat pouze v takové formě, v jaké jej lze stáhnout s portálu. Jakékoliv neoprávněné užití elektronické knihy nebo její části, spočívající např. v kopírování, úpravách, prodeji, pronajímání, půjčování, sdělování veřejnosti nebo jakémkoliv druhu obchodování nebo neobchodního šíření je zakázáno! Zejména je zakázána jakákoliv konverze datového souboru nebo extrakce části nebo celého textu, umístování textu na servery, ze kterých je možno tento soubor dále stahovat, přitom není rozhodující, kdo takovéto sdílení umožnil. Je zakázáno sdělování údajů o uživatelském účtu jiným osobám, zasahování do technických prostředků, které chrání elektronickou knihu, případně omezují rozsah jejího užití. Uživatel také není oprávněn jakkoliv testovat, zkoušet či obcházet technické zabezpečení elektronické knihy.





Copyright © Grada Publishing, a.s.

Doc. MUDr. Martin Haluzík, CSc.

Prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA

METABOLICKÝ SYNDROM A NUKLEÁRNÍ RECEPTORY – PPAR

Recenze:

Prof. MUDr. Jaroslav Rybka, DrSc.

Doc. MUDr. Zdeněk Rušavý

© Grada Publishing, a.s., 2005

Cover Photo © profimedia.cz/CORBIS, 2005

Vydala Grada Publishing, a.s.

U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 2214. publikaci

Odpovědná redaktorka PhDr. Anna Monika Pokorná

Fotografie na obálce profimedia.cz/CORBIS

Sazba a zlom Jan Šístek

Počet stran 128 + 8 stran bar. přílohy

První vydání, Praha 2005

Vytiskly Tiskárny Havlíčkův Brod, a.s.

Husova ulice 1881, Havlíčkův Brod

Originální práce autorů v knize citované byly podporovány grantem 7429-3 od IGA MZ ČR.

Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplývají pro autory ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.

Všechna práva vyhrazena. Tato kniha ani její část nesmějí být žádným způsobem reprodukovány, ukládány či rozšiřovány bez písemného souhlasu nakladatelství.

ISBN 80-247-0824-8 (tištěná verze)

ISBN 978-80-247-6246-3 (elektronická verze ve formátu PDF)

© Grada Publishing, a.s. 2011

Obsah

Seznam zkratk	9
1 Úvod – metabolický syndrom a PPAR	11
2 Objev a historie PPAR (identifikace PPAR)	13
3 Struktura PPAR a mechanismus aktivace	15
3.1 Ligandy pro PPAR	16
3.1.1 Endogenní ligandy pro PPAR	16
3.1.2 Syntetické ligandy pro PPAR	17
3.2 PPAR- α	18
3.2.1 Gen pro PPAR- α	18
3.2.2 Tkáňová distribuce PPAR- α a regulace exprese PPAR- α při hladovění ...	18
3.2.3 Ligandy pro PPAR- α	19
3.2.4 Účinky aktivace PPAR- α , cílové geny, úloha PPAR- α při reakci organizmu na hladovění	20
3.2.5 Metabolické důsledky chybění PPAR- α <i>in vivo</i> : fenotyp PPAR- α knockout myši	24
3.3 PPAR- β/δ	25
3.3.1 Vývojový a diferenciační význam PPAR- β/δ	25
3.3.2 PPAR- β/δ a kůže	26
3.3.3 Vztah PPAR- β/δ k ateroskleróze	26
3.3.4 PPAR- β/δ a lipidy	27
3.3.5 PPAR- β/δ a nádory	27
3.3.6 PPAR- β/δ a obezita	28
3.3.7 PPAR- β/δ , steatóza a jaterní fibróza	28
3.3.8 Polymorfizmy PPAR- β/δ	29
3.3.9 Závěr	29
3.4 PPAR- γ	29
3.4.1 Gen pro PPAR- γ	29
3.4.2 Tkáňová distribuce a regulace exprese PPAR- γ	29
3.4.3 Ligandy pro PPAR- γ	30
3.5 Atypické a smíšené ligandy pro PPAR	32
4 PPAR a inzulinová senzitivita	35
4.1 PPAR- α a inzulinová senzitivita	35
4.1.1 Ektopické ukládání lipidů a inzulinová senzitivita: vliv aktivace PPAR- α	35

4.1.2	Mechanismus účinku PPAR- α na inzulinovou senzitivitu: experimentální studie s PPAR- α agonisty	36
4.1.3	PPAR- α a inzulinová senzitivita: výsledky klinických studií	38
4.2	PPAR- γ a inzulinová senzitivita	42
4.2.1	Mechanismus účinku PPAR- γ na inzulinovou senzitivitu	42
4.2.2	Vliv molekulárně-genetických manipulací PPAR- γ na inzulinovou senzitivitu: výsledky experimentálních studií	53
4.2.3	Je přítomnost tukové tkáně nutná pro inzulin-senzitizující účinky PPAR- γ ?	55
4.2.4	Význam PPAR- γ ve svalové tkáni	57
4.2.5	Význam PPAR- γ v jaterní tkáni	59
4.2.6	Význam PPAR- γ v β -buňkách pankreatu	60
4.2.7	Klinické využití PPAR- γ agonistů thiazolidindionů v léčbě diabetes mellitus 2. typu	61
5	PPAR a ateroskleróza	73
5.1	Etiopatogeneze aterosklerózy	73
5.1.1	Endotelová dysfunkce a ateroskleróza	73
5.1.2	Vznik aterosklerózy: jednotná hypotéza	74
5.1.3	Ateroskleróza, inzulinová rezistence a diabetes	75
5.1.4	Komplexní vlivy PPAR na aterogenezi	76
5.2	PPAR- α a ateroskleróza	76
5.2.1	PPAR- α a endotelová dysfunkce	77
5.2.2	Účinky PPAR- α na metabolismus lipidů	78
5.2.3	Klinické studie s fibráty	80
5.2.4	Indikace pro léčbu fibráty	83
5.3	PPAR- γ a ateroskleróza	84
5.3.1	Potenciální proaterogenní vlivy PPAR- γ	85
5.3.2	Potenciální antiaterogenní účinky PPAR- γ	86
5.2.3	PPAR- γ a ateroskleróza: experimentální a klinické poznatky	89
5.2.4	PPAR- γ a ateroskleróza: shrnutí poznatků a jejich využití v klinické praxi	92
6	PPAR a nádory	93
6.1	PPAR a urologické nádory	93
6.2	PPAR a karcinom prsu	94
6.3	PPAR a neuroblastom	94
6.4	PPAR a kolořektální karcinom	94
6.5	PPAR- γ a další nádory	96
7	Další účinky PPAR	97
7.1	PPAR- γ a arteriální hypertenze	97
7.1.1	Leptin jako možný mediátor arteriální hypertenze u obezity a inzulinové rezistence	97

7.1.2	PPAR- γ , endotelová dysfunkce a arteriální hypertenze	98
7.2	PPAR- γ a střevní záněty	99
7.2.1	Nespecifické střevní záněty, etiopatogeneze a základní terapeutické možnosti	99
7.2.2	Exprese PPAR- γ v trávicím ústrojí	100
7.3	PPAR a játra	102
7.4	PPAR a mozek	103
7.5	PPAR a srdce	104
7.6	PPAR a sval	105
7.7	PPAR a obezita	106
7.8	PPAR a kůže	106
7.9	Jiné PPAR efekty	108
7.9.1	Stárnutí	108
7.9.2	Hibernace u zvířat	108
7.9.3	Prevence diabetu	108
7.9.4	Koagulace	108
7.9.5	Akutní pankreatitida	109
8	Závěr a perspektivy	111
	Literatura	113
	Rejstřík	125

Seznam zkratek

ABCA-1	– ATP-binding cassette A-1
ADD-1	– adipocyte determination and differentiation factor-1
ADRP	– adipose differentiation related protein
ATP	– adenzin trifosfát
BCL-6	– B-cell lymphoma gene-6
C/EBP	– CCAAT/enhancer binding protein
CoA	– koenzym A
COX-2	– cyclooxygenase-2
CYP	– cytochrom P450
FABP	– fatty acid binding protein
FATP	– fatty acid transport protein
HB-EGF	– heparin binding epidermal growth factor
HMG	– hydroxymethylglutaryl
HODE	– kyselina hydroxyoctadecadienová
ICAM-1	– intercellular adhesion molecule-1
LC	– long chain (mastné kyseliny s dlouhým řetězcem)
LDL	– low density lipoproteins (lipoproteiny o nízké hustotě)
LXR	– jaterní nukleární receptor X
MAPK	– mitogen activated protein kinase
MCP-1	– monocyte chemoattractant factor-1
MCP-2	– monocyte chemoattractant factor-2
MMP-9	– matrix metalloproteinase-9
NcoR	– nuclear receptor corepressor
NF-κB	– nuclear factor kappa B
NO	– nitric oxide (oxid dusnatý)
PAI-1	– plasminogen activator inhibitor-1
PCAF	– CREB-binding protein associated factor
PDGF	– platelet-derived growth factor
PGC-1	– peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1
PGC-2	– peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-2
PPAR	– nukleární receptory aktivované peroxizomovými proliferátory
PPRE	– peroxisome proliferator responzivní elementy
PRIP	– PPAR-interacting protein
RXR	– retinoidní nukleární receptor X
SC	– short chain (mastné kyseliny s krátkým řetězcem)
SMRT	– silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors
SPPARM	– selective PPAR modulator
SRC-1	– steroid receptor coactivator-1
SREBP-1c	– sterol regulatory element binding protein-1c
TGL	– triacylglyceroly

TIF-2	– transcriptional intermediary factor-2
TNBS	– kyselina trinitrobenzen sulfonová
TNF- α	– tumor necrosis factor- α
UCP-1	– uncoupling protein-1
VCAM-1	– vascular cell adhesion molecule-1
VLC	– very long chain (mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem)
VMK	– volné mastné kyseliny

1 Úvod – metabolický syndrom a PPAR

Dříve než se začneme podrobněji zabývat poznatky o nukleárních receptorech aktivovaných peroxizomovými proliferátory (PPAR), považujeme za nutné již v této části knihy stručně vysvětlit, v čem spočívá souvislost mezi metabolickým syndromem a PPAR receptory a proč je toto téma důležité nejen z hlediska vědeckého, ale i klinického.

Metabolický syndrom (též Reavenův syndrom či syndrom X) v sobě zahrnuje řadu fenotypických rysů stále častěji provázejících životní styl ve vyspělých zemích současného světa (Reaven, 2002; Reaven, 1988; Svačina, 2001). Kombinace inzulínové rezistence, diabetu, arteriální hypertenze, dyslipidemie, obezity a dalších složek zcela jednoznačně zvyšuje riziko následných zdravotních komplikací. Dříve se na metabolický syndrom spíše pohlíželo optikou jeho jednotlivých složek a byla snaha nalézt primární odchylku, která vyvolává sekundárně odchylky ostatní. Dnešní pohled na toto onemocnění je komplexnější a stále více se ukazuje, že kombinace dědičných faktorů se spolupůsobením faktorů prostředí vyvolává jednotlivé složky metabolického syndromu spíše současně, často v různých kombinacích. Předpokládá se rovněž, že etiopatogenetický mechanismus řady složek metabolického syndromu je společný. Velké úsilí tak bylo věnováno snaze o odhalení tohoto mechanismu, které by umožnilo nejen cílenou léčbu více složek metabolického syndromu současně, ale i případnou prevenci jejich vzniku.

Zásadním přelomem v chápání etiologie metabolického syndromu byly dva objevy devadesátých let minulého století. Prvním objevem byly identifikace leptinu jako hormonu produkovaného prakticky výlučně adipocyty. Tento objev vedl k poznání, že tuková tkáň je velmi aktivním endokrinním orgánem, který se prostřednictvím svých hormonů zásadním způsobem podílí na metabolických regulacích. Dalším zásadním poznatkem byl objev nukleárních PPAR receptorů (dále jen PPAR). Současné poznatky ukazují, že PPAR působí jako transkripční faktory ovlivňující expresi genů kódujících celou řadu působků (enzymů, regulačních proteinů apod.) zapojených nejen v metabolismu lipidů a sacharidů, ale také v regulaci zánětu, nádorového bujení, imunitních dějů, diferenciace buněk apod. Komplexnost funkce PPAR a jejich výskyt prakticky ve všech tkáních a orgánech lidského těla otevírá možnost vysvětlit propojenost různých složek metabolického syndromu a umožnit jeho prevenci a léčbu. PPAR- γ se hojně vyskytují v tukové tkáni a jsou nejvýznamnějším regulátorem její diferenciace, kapacity k ukládání triacylglycerolů a nepřímo i její endokrinní funkce. PPAR- γ v jiných orgánech (např. v trávicím ústrojí) mohou ovlivňovat sklon tkání k nádorovému bujení a k rozvoji autoimunitně podmíněných zánětlivých onemocnění. PPAR- α jsou naopak hojně nalézány v jaterní a svalové tkáni, kde regulují oxidaci volných mastných kyselin a ovlivňují tak mimo jiné i citlivost těchto tkání na inzulín. PPAR- β/δ se vyskytují prakticky ve všech tkáních a zásadním způsobem ovlivňují myelinizaci centrálního nervového systému a podílejí se na regulaci implantace embrya v průběhu nitroděložního vývoje.

Není náhodou, že v současnosti jsou v klinické praxi hojně používány dvě skupiny léků, které působí prostřednictvím PPAR: hypolipidemické léky – *fibráty* a inzulín-senzitizující léky – *thiazolidindiony*. V obou případech byly paradoxně tyto léky zavedeny do praxe dříve, než byl objeven molekulární mechanismus jejich účinku.

V současné době není pochyb o tom, že další výzkumy PPAR přinesou zásadní poznatky o etiopatogenezi, prevenci a léčbě nejen metabolického syndromu, ale i řady dalších onemocnění. Klinická účinnost řady léků působících jako aktivátory PPAR již byla jednoznačně prokázána, přestože výsledky některých větších zásadních studií (především u thiazolidindionů) zatím nejsou k dispozici. Vývoj dalších kombinovaných agonistů různých subtypů PPAR představuje jeden z nejnadějnějších směrů v léčbě metabolického syndromu. Ve fázi výzkumu je pak použití PPAR agonistů v prevenci či terapii některých nádorových či zánětlivých onemocnění.

Kromě agonistů PPAR- γ ze skupiny thiazolidindionů mohou jako PPAR- γ agonisté působit i látky z jiných chemických skupin. Jde především o tyrozinové deriváty, izoxazolidindiony a deriváty kyseliny fenyloctové nebo fenoxyoctové. Některé z nethiazolidindionových preparátů mají silnější hypoglykemizující účinky než v současné době používané thiazolidindiony, navíc bez výraznějšího nárůstu množství tukové tkáně, který je pro současné PPAR- γ agonisty typický. Metabolismus glukózy je ovlivňován i aktivací RXR (retinoidního nukleárního receptoru X), který je za normálních okolností součástí receptorového komplexu vznikajícího po aktivaci PPAR- γ . Jiné nukleární receptory – LXR (jaterní nukleární receptor X) hrají důležitou úlohu při řízení metabolismu cholesterolu a jeho transportu z tkání do jater.

2 Objev a historie PPAR (identifikace PPAR)

PPARs (peroxisome proliferator activated receptors = receptory aktivované peroxizomovými proliferátory) patří do rodiny nukleárních receptorů, kam jsou mimo jiné řazeny i receptory pro steroidní a thyroideální hormony (Kersten et al., 2000).

Název této skupiny látek má historický původ. První práce, které vedly k identifikaci PPAR, byly totiž primárně zaměřeny na hledání cílových genů látek aktivujících proliferaci peroxizomů u hlodavců. Neúčinnější aktivátory PPAR – fibráty – u člověka nevedou k proliferaci peroxizomů, mají však významné účinky metabolické. Název receptory aktivované peroxizomovými proliferátory tak odráží, podobně jako u řady jiných dříve objevených látek, okruh znalostí v době objevu. Ze současného pohledu však tento název z hlediska účinků u člověka fakticky není zcela správný.

Peroxisomy jsou organely vyskytující se prakticky ve všech buňkách vyšších organismů. Skládají se z peroxizomální membrány a vnitřní matrix. V buňkách mají zásadní význam při β -oxidaci delších a rozvětvených mastných kyselin (mastné kyseliny s kratším řetězcem jsou oxidovány v mitochondriích), syntéze cholesterolu, žlučových kyselin, strukturálních lipidů a v řadě dalších procesů. Do současné doby bylo identifikováno více než 60 proteinů vyskytujících se v peroxizomech, z nichž více než polovina se podílí na regulaci lipidového metabolismu.

V současné době jsou známy tři izoformy PPAR, které jsou kódovány třemi různými geny: PPAR- α , PPAR- γ a PPAR- δ (někdy též nazývaný PPAR- β). Prvním identifikovaným PPAR byl PPAR- α , který byl objeven nejprve u myši v roce 1990 (přehled viz Kliewer et al., 2001), poté u člověka i dalších živočišných druhů. Hlavními místy exprese PPAR- α jsou játra, ledviny, srdce, příčně pruhované svalstvo a hnědá tuková tkáň. U lidí je gen kódující PPAR- α umístěn na 22. chromozomu.

PPAR- γ byl objeven v roce 1992 nejprve klonováním DNA u žáby *Xenopus* a v témže roce i u člověka (přehled viz Rosen and Spiegelman, 2001). Transkripční PPAR- γ genu vznikají 3 izoformy PPAR- γ : $\gamma 1$, $\gamma 2$ a $\gamma 3$ které se navzájem liší pouze nepatrně. Poněkud odlišná je však tkáňová distribuce jednotlivých izoform. PPAR- $\gamma 1$ se vyskytuje v celé řadě tkání včetně srdce, příčně pruhovaného svalu, bílé tukové tkáně, tlustého a tenkého střeva, ledvin, pankreatu a slinivky břišní. PPAR- $\gamma 2$ je exprimován převážně v bílé tukové tkáni (v minimálních množstvích snad i v kosterních svalech a játrech). PPAR- $\gamma 3$ je exprimován pouze v tlustém střevě a tukové tkáni.

PPAR- β/δ byl, podobně jako PPAR- γ , identifikován v roce 1992. Lidský gen pro PPAR- β/δ je umístěn na 6. chromozomu, zatímco u myši je tento gen na 17. chromozomu. PPAR- β/δ je exprimován ve většině tkání lidského organismu, relativně nejvyšší exprese se nalézá v mozku, tukové tkáni a kůži.

3 Struktura PPAR a mechanismus aktivace

Strukturálně jsou PPAR – podobně jako jiné nukleární receptory – tvořeny třemi oblastmi neboli tzv. doménami (přehled viz Picard and Auwerx, 2002, viz též obr. 1 na bar. příl.). V C-terminální části PPAR se nachází *ligand-dependentní AF-2 aktivační doména*, jejíž konformace a funkce jsou přímo ovlivňovány navázáním PPAR aktivátorů, resp. inhibitorů. V NH-terminální části PPAR je *AF-2 ligand-independentní aktivační doména*. Třetí *DNA-vázací doména* se skládá z dvojice specifických struktur zvaných zinkové prsty. Úkolem této části PPAR je vazba na úseky DNA nazývané PPRE (peroxizome proliferator responzivní elementy) nacházející se na tzv. PPAR responzivních genech. Ligand-dependentní doména nacházející se v C-terminální části receptoru má tvar „kapsy“, která je ve srovnání s ligand-dependentními doménami dalších nukleárních receptorů relativně velká, rovněž její tvar je značně variabilní. Tyto vlastnosti vysvětlují, proč jsou PPAR schopny na rozdíl od jiných nukleárních receptorů vázat tak pestrou škálu ligandů nejrůznější struktury a velikosti.

K aktivaci PPAR dochází navázáním látky s aktivačním účinkem – PPAR agonisty. Takto aktivovaný PPAR nejprve vytvoří heterodimer s tzv. retinoidním nukleárním receptorem X a poté se váže na zmíněné peroxizome proliferator responzivní elementy (obr. 2 na bar. příl.). Tato vazba pak vede k aktivaci transkripce specifických genů s následnou syntézou příslušných bílkovin vedoucích k vlastnímu biologickému účinku PPAR.

Kromě *agonistů* či *antagonistů* PPAR je funkce těchto receptorů ovlivňována ještě tzv. *koaktivátory* a *korepresory*. Jde o proteiny, které po navázání na PPAR (nejčastěji v místě ligand-vázací či AF-2 domény) modifikují působení PPAR na PPAR-responzivní cílové geny. Konkrétně tyto proteiny nejčastěji ovlivňují remodelaci chromatinu příslušných genů, acetylaci a metylaci histonů a v některých případech i transkripční pochody. Experimentálně se prokázalo, že jako kofaktory mohou působit látky z rodiny p160 (např. SRC-1, TIF-2, PRIP, PGC-1, PGC-2 a další (přehled viz Picard and Auwerx, 2002)). Korepresorová aktivita byla naopak popsána u transkripčních faktorů NcoR a SMRT. Je nutno zdůraznit, že žádný z výše uvedených kofaktorů či korepresorů není specifický pouze pro PPAR, ale působí na řadu dalších transkripčních faktorů. Skutečný kvantitativní význam kofaktorů či korepresorů v modifikaci účinků PPAR zatím není znám, jednoznačnou odpověď patrně přinesou až studie se selektivním knockoutem (vyřazením) uvedených látek.

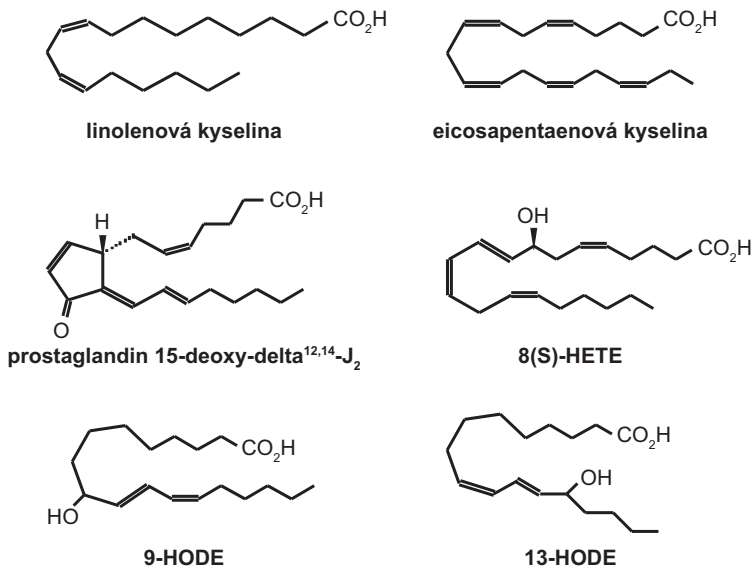
Aktivace PPAR je velmi komplexní proces, který může být modifikován na řadě různých úrovní. Zjednodušeně řečeno stimulace PPAR nastartuje syntézu enzymů zapojených v metabolismu lipidů, sacharidů i řady dalších látek, a tím vede k ovlivnění nejrůznějších metabolických dějů v organismu včetně regulace inzulínové senzitivity a oxidace lipidů.

3.1 Ligandy pro PPAR

3.1.1 Endogenní ligandy pro PPAR

Brzy byla identifikována celá řada endogenních ligandů pro PPAR – především *volné mastné kyseliny a jejich deriváty*: eicosanoidy a prostaglandiny (obr. 2 na bar. příl., přehled viz Vamecq and Latruffe, 1999b). Většina uvedených ligandů však byla zkoumána *in vitro* (na buněčných kulturách) v řádově mikromolárních koncentracích. PPAR- γ -stimulační aktivita byla popsána u řady polynenasycených mastných kyselin včetně kyseliny linolenové, arachidonové a eicosapentaenové. Uvedené kyseliny se v lidském organismu sice vyskytují v mikromolárních koncentracích v plazmě, jejich intracelulární hladiny, které by pro aktivační působení na PPAR byly rozhodující, však nejsou známy. Kromě vlastních mastných kyselin byla PPAR- γ stimulační aktivita popsána i u některých jejich metabolitů, např. u 13-, resp. 9-hydroxyoctadecadienové kyseliny (metabolity linolenové kyseliny) a u prostaglandinu 15-deoxy-delta^{12,14}-J₂ (obr. 3).

PPAR- α jsou aktivovány řadou nasycených a nenasycených mastných kyselin (kyselinou palmitovou, linolenovou a arachidonovou). Rovněž PPAR- β/δ je aktivován nasycenými a polynenasycenými mastnými kyselinami – především kyselinou dihommo- γ -linolenovou, eicosapentaenovou a arachidonovou. Kromě uvedených kyselin



Obr. 3 *Struktura vybraných endogenních ligandů pro PPAR: kyselina linolenová, kyselina eicosapentaenová, prostaglandin 15-deoxy-delta^{12,14}-J₂, kyselina 8(S)-hydroxyeicosatetraenová (8(S)-HETE), kyselina 9-hydroxyoctadecadienová (9-HODE) a kyselina 13-hydroxyoctadecadienová (13-HODE)*

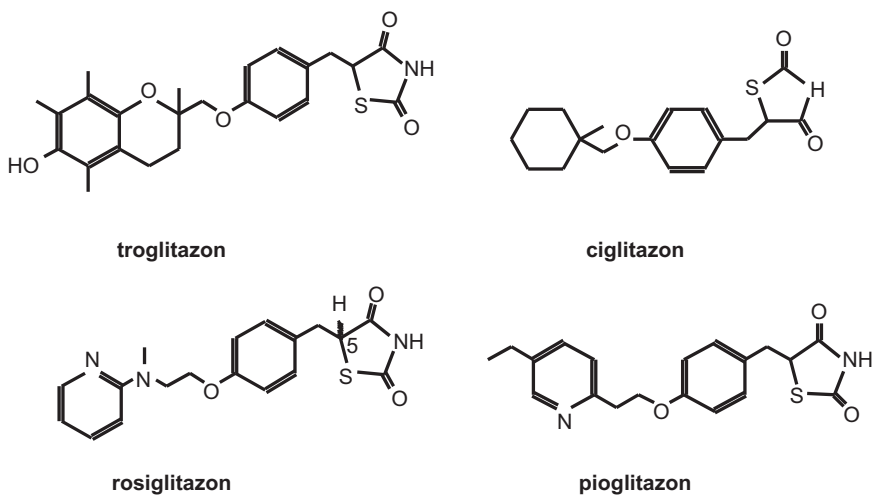
jsou PPAR- β/δ stimulovány také eicosanoidy PGA-1 a PGD-2 a některými semisyntetickými prostaglandiny (např. karbaprostacyklinem).

3.1.2 Syntetické ligandy pro PPAR

Jedním z paradoxů spojených s PPAR je, že jejich význam v metabolických regulacích nebyl prokázán zkoumáním účinků jejich endogenních ligandů, ale naopak výzkumem účinků ligandů syntetických.

Fibráty, jejichž hypolipidemický účinek byl objeven počátkem 60. let, byly vytvořeny při experimentálních výzkumech zaměřených empiricky na hledání látek snižujících sérové koncentrace lipidů. Jejich stimulační účinek na proliferaci peroxizomů u hlodavců byl popsán ještě o několik let později. Prvním významným zástupcem této skupiny látek, u něhož se prokázal efekt na sérové hladiny triacylglycerolů, byl **klofibrát**. Pokračující výzkumy vedly k vytvoření řady dalších zástupců této lékové skupiny. Teprve identifikace PPAR počátkem 90. let umožnila přesné vysvětlení mechanismu účinků fibrátů a jejich další rozčlenění podle afinity k jednotlivým podtypům PPAR. Zmíněný klofibrát a novější zástupce uvedené skupiny **fenofibrát** jsou smíšenými PPAR- α a PPAR- γ agonisty, jejich afinita k PPAR- α je však desetnásobně vyšší. Oproti tomu **bezafibrát** je agonistou všech tří podtypů PPAR a afinita k jednotlivým skupinám se významným způsobem neliší. Další fibrát, **WY-14643**, často používaný především v experimentálních studiích, je také relativně selektivním PPAR- α agonistou se zanedbatelnou PPAR- γ stimulační aktivitou.

Podobně jako u PPAR- α agonistů, také **PPAR- γ stimulanty (thiazolidindiony)** byly nasynthetizovány jako látky s inzulín-senzitizujícím účinkem, aniž by bylo známo, že jejich působení je zprostředkováno pomocí PPAR- γ (obr. 4). První zprávy o účinn-



Obr. 4 *Struktura thiazolidindionů (syntetických agonistů pro PPAR- γ)*

cích thiazolidindionů na diferenciaci adipocytů a expresi řady adipocytárních genů byly popsány v roce 1992. Teprve o dva roky později skupina B. Spiegelmana zjistila, že regulační úsek genu *aP2*, který je zásadní pro řízení diferenciacie nových adipocytů, je kontrolován receptory PPAR- γ . Další výzkumy odhalily, že PPAR- γ mohou být kromě thiazolidindionů aktivovány i látkami se značně odlišnou chemickou strukturou (např. některými tyrozinovými deriváty, deriváty kyseliny fenylloctové nebo fenoxyoctové atd.).

3.2 PPAR- α

3.2.1 Gen pro PPAR- α

Gen pro PPAR- α byl prvním identifikovaným z trojice izoform PPAR (přehled viz Berger and Moller, 2002). Nejprve byl objeven u myši v roce 1990, poté u člověka i dalších živočišných druhů. Hlavními místy exprese PPAR- α jsou *hnědá tuková tkáň, játra, ledviny, srdce, příčně pruhované svalstvo* a také *trávicí ústrojí*. U lidí je gen kódující PPAR- α umístěn na 22. chromozomu. V souvislosti s experimentálními studiemi s PPAR- α ligandy, které zde budou diskutovány, je nutno zdůraznit kvantitativní rozdíly v expresi PPAR- α u člověka a klasicky používaných laboratorních hlodavců. Zatímco u myši a potkanů je především v játrech exprese mRNA pro PPAR- α velmi vysoká, u lidí je tato exprese kvantitativně podstatně nižší.

Tento fakt je považován za hlavní důvod, proč u lidí – na rozdíl od hlodavců – nedochází k aktivaci tohoto receptoru po podání peroxizomových proliferátorů. Druhým potenciálním vysvětlením této skutečnosti je možnost, že cílové geny ovlivňované PPAR- α u lidí jsou poněkud odlišné od cílových genů u hlodavců. Je také možné, že výběr genů, které jsou aktivovány při stimulaci PPAR- α , závisí na intenzitě této stimulace. Toto by prakticky mohlo znamenat, že méně intenzivní (parciální) stimulace aktivuje jednu skupinu genů, zatímco při plné stimulaci by spektrum aktivovaných genů bylo poněkud odlišné. Jednoznačné důkazy pro tuto hypotézu však zatím chybí.

3.2.2 Tkáňová distribuce PPAR- α a regulace exprese PPAR- α při hladovění

Tkáňová distribuce PPAR- α byla podrobně zkoumána u potkanů, distribuce u lidí je podobná s výjimkou podstatně nižší exprese mRNA pro PPAR- α v jaterní tkáni. Obecně lze říci, že PPAR- α je exprimován *ve tkáních, které používají jako energetický substrát volné mastné kyseliny*. Nejvyšší exprese PPAR- α se u hlodavců nachází v hnědé tukové tkáni. Druhá nejvyšší exprese je pak v játrech (4krát nižší než v hnědé tukové tkáni). Asi o 20–40 % nižší než v játrech je pak exprese v ledvinách, srdci, bránici a jícnu. Exprese PPAR- α v tenkém střevě, močovém měchýři a ve svalové tkáni je oproti tkáni jaterní zhruba trojnásobně nižší. V trávicím ústrojí je exprese PPAR- α nejvyšší v jícnu a aborálním směrem postupně klesá. V ostatních tkáních je exprese PPAR- α rovněž detekovatelná, kvantitativně však velmi nízká.

Hladovění vede k výrazným změnám v expresi mRNA pro PPAR- α . K nejvyššímu, téměř dvojnásobnému vzestupu exprese mRNA pro tento receptor dochází v játrech, statisticky významná zvýšení jsou detekovatelná i v duodenu, jejunu, ileu, kolon a thymu. Hladovění naopak významně neovlivňuje expresi mRNA pro PPAR- α v srdečním a příčně pruhovaném svalu ani v ledvinách.

3.2.3 Ligandy pro PPAR- α

3.2.3.1 Endogenní ligandy pro PPAR- α

Podobně jako u PPAR- γ , i u PPAR- α byly dříve známy ligandy exogenní než endogenní. Fibráty, léky používané již řadu let jako hypolipidemika, byly v experimentálních studiích identifikovány jako látky efektivně snižující sérové lipidy, aniž by bylo známo, že mechanismem jejich účinku je aktivace PPAR- α .

Z endogenních ligandů je PPAR- α stimulován řadou nasycených i nenasycených mastných kyselin včetně kyseliny palmitové, olejové, linolenové a arachidonové. Většina z uvedených látek se na PPAR- α váže *in vitro* v mikromolárních koncentracích; není přitom jasné (podobně jako u endogenních ligandů pro PPAR- γ), zda jsou podobné koncentrace dosažitelné za fyziologických okolností *in vivo*. Ligandem, který aktivuje PPAR- α již v submikromolárních koncentracích, je jeden z metabolitů lipooxygenázy 8(S)-HETE (hydroxyeicosatetraenová kyselina). I přes takto relativně vysokou afinitu není ani u této látky zcela jisté, zda je fyziologickým endogenním ligandem pro PPAR- α . Obecně se však předpokládá, že fyziologickými ligandy pro PPAR- α patrně jsou *různé typy volných mastných kyselin*, které se ve tkáních schopných jejich metabolizace vyskytují pravděpodobně v dostatečně vysokých koncentracích. PPAR- α tak slouží jako endogenní senzory volných mastných kyselin, což má zásadní význam u stavů spojených se vzestupem těchto látek, jako je např. hladovění.

3.2.3.2 Syntetické ligandy pro PPAR- α

Syntetickými ligandy pro PPAR- α jsou fibráty, látky používané již řadu desetiletí jako účinná hypolipidemika. Tyto léky byly vyvinuty empiricky bez znalosti molekulárního mechanismu účinku a fakt, že jsou vysokoafinitními ligandy pro PPAR- α , byl odhalen až v první polovině 90. let. Klasickým a prvním používaným fibrátem byl *klofibrát*. Později byly na bázi tohoto léku vytvořeny další fibráty, především *fenofibrát*, *ciprofibrát*, *bezafibrát* a řada dalších. Zatímco klofibrát a fenofibrát jsou relativně selektivními ligandy pro PPAR- α (mají 10krát vyšší afinitu k PPAR- α než k PPAR- γ), bezafibrát je ligandem aktivujícím ve stejné míře všechny tři izoformy PPAR. Dalším fibrátem, který zde zmíníme, je *WY-14643*. Jde o analog klofibrátu na bázi kyseliny 2-arylthioctové, který je podobně jako klofibrát relativně selektivním PPAR- α agonistou s přibližně 10krát nižší afinitou k PPAR- γ . Jde o velmi účinný fibrát, který se často využívá především v experimentálních studiích, nikoliv však v klinické praxi.

Další podrobnosti o klinických účincích fibrátů a jejich indikacích v léčbě hyperlipidemií budou podrobně probrány v kapitole 5.2.4 – Indikace pro léčbu fibráty.

3.2.4 Účinky aktivace PPAR- α , cílové geny, úloha PPAR- α při reakci organismu na hladovění

Hlavním mechanismem účinku PPAR- α jako transkripčního faktoru je regulace transkripce relevantních genů. Hlavní cílovou tkání PPAR- α jsou *játra*. Experimentálními studiemi se zjistilo, že PPAR- α je jedním z hlavních transkripčních regulátorů lipidového metabolismu. Aktivace PPAR- α vede k transkripci genů zapojených do transportu mastných kyselin přes mitochondriální membránu a do α -, β - i ω -oxidace mastných kyselin. Jak prokázaly experimentální studie na transgenních myších s knockoutem genu pro PPAR- α , je přítomnost tohoto receptoru zcela zásadní pro regulaci metabolické adaptace na hladovění. Chybění PPAR- α prakticky znemožňuje využití mastných kyselin jako energetického substrátu při hladovění, což má zcela zásadní metabolické důsledky.

3.2.4.1 Adaptace organismu na hladovění: účinky a význam PPAR v tomto procesu

K pochopení úlohy PPAR- α v metabolických dějích je nutné se podrobněji zmínit o adaptační reakci organismu na hladovění a úloze volných mastných kyselin v tomto procesu. Zde nejprve krátce shrneme hormonální a metabolické děje, ke kterým při hladovění dochází, a poté budeme podrobně diskutovat přesnou úlohu PPAR- α v tomto procesu.

3.2.4.2 Metabolické změny při hladovění

Hladovění může vést k několika typům reakce organismu s různými metabolickými i klinickými projevy a také různými důsledky. Změny závisí na řadě faktorů. Mezi nejdůležitější faktory patří celkový stav organismu před začátkem hladovění či sníženého příjmu potravy, typ a množství přijímané potravy a také případné onemocnění primárně hladovění či malnutrici vyvolávající nebo modulující její důsledky.

Možností, kterou zde podrobně probereme, je tzv. *nekomplikované (nestresové) hladovění*. Při tomto typu hladovění dochází v důsledku sníženého příjmu potravy k poklesu hladin inzulínu s následnou stimulací glykogenolýzy a glukoneogeneze především v jaterní tkáni a lipolýzy ve tkáni tukové. Tato stimulace je kromě vlastního poklesu hladin inzulínu vyvolána vzestupem kontraregulačních hormonů působících antagonisticky vůči inzulínu – tedy glukokortikoidů, glukagonu a dalších. Zásoby glykogenu v lidském organismu jsou vyčerpány za méně než 24 hodin, hlavním zdrojem energie se tak stávají volné mastné kyseliny uvolněné lipolýzou z tukové tkáně a z nich tvořené ketolátky. Kromě lipolýzy v tukové tkáni dochází částečně i ke katabolickým procesům ve tkáni svalové. Štěpením svalových bílkovin se přímo získává část energie, uvolněné aminokyseliny jsou pak použity v játrech v procesu glukoneogeneze.

3.2.4.3 Úloha jater při hladovění

Glukoneogeneze se stává jediným zdrojem glukózy při delším hladovění. Takto vzniklá glukóza se pak využívá těmi tkáněmi a orgány, které nejsou schopny své metabo-

lické potřeby plně pokrýt metabolizací mastných kyselin, resp. ketoláttek. Jde především o erythrocyty a částečně také mozek.

Glukoneogeneze probíhá převážně v játrech, v menší míře v ledvinách a snad i tenkém střevě. Jako substrátu pro novotvorbu glukózy se při ní využívá glycerolu (uvolněného při štěpení triacylglycerolů), aminokyselin (získaných při štěpení svalových bílkovin) a laktátu (uvolněného při anaerobní glykolýze ve svalech). Energie k provádění glukoneogeneze se získává jaterní oxidací volných mastných kyselin. Právě oxidace mastných kyselin je zásadním způsobem regulována aktivací PPAR- α .

Cirkulující mastné kyseliny uvolněné lipolýzou v tukové tkáni jsou vychytávány játry, ledvinami, srdečním svalem a příčně pruhovanými svaly. V játrech jsou v malé míře reesterifikovány na triacylglyceroly a ty jsou uvolňovány zpět do cirkulace jako VLDL-částice. Hlavní část mastných kyselin je však oxidována v mitochondriích převážně tzv. β -oxidací, v malé míře také α - nebo ω -oxidací.

3.2.4.4 Oxidace mastných kyselin v dalších tkáních

Kromě jater mohou být volné mastné kyseliny přímo metabolizovány (oxidovány) také v srdečním a příčně pruhovaném svalu a v ledvinách. Vlastní oxidace volných mastných kyselin probíhá převážně v mitochondriích, z menší části také v peroxizomech (rozvětvené mastné kyseliny, popř. mastné kyseliny s delším řetězcem). Z kvantitativního hlediska je jednoznačně nejdůležitější β -oxidace. α - i ω -oxidace jsou z kvantitativního hlediska za normálních okolností zanedbatelné. α -oxidací jsou metabolizovány některé rozvětvené mastné kyseliny, u kterých je β -oxidace blokována přítomností alkylové skupiny na β -uhlíku mastné kyseliny. α -oxidace vede k uvolnění β -uhlíku a výsledný produkt může být již dále metabolizován β -oxidací. Příkladem mastné kyseliny metabolizované α -oxidací je kyselina fytanová. ω -oxidací jsou metabolizovány kyseliny o středním a dlouhém řetězci (oxidován je vždy poslední uhlíkový atom).

Při jednom cyklu β -oxidace dochází vždy k odnětí 2 atomů uhlíků. Ještě před vlastní β -oxidací musí být mastné kyseliny aktivovány neboli přeměněny na příslušný *acyl-CoA*. Tato reakce je katalyzována *acyl-CoA*-syntetázami a dochází k ní v cytosolu obvykle v těsné blízkosti mitochondriální membrány.

3.2.4.5 Transport mastných kyselin do mitochondrií

Poté musí být aktivované mastné kyseliny přeneseny z cytosolu do nitra mitochondrie. K tomuto procesu slouží systém *karnitin-palmitoyltransferáza I a II*, jehož aktivita je mimo jiné rovněž regulována PPAR- α . Acylová skupina aktivované mastné kyseliny je přenesena na karnitin za současného uvolnění CoA do cytosolu. Acylkarnitin je přenesen do mitochondriální matrix, acylová skupina je napojena na molekulu mitochondriálního CoA a uvolněný karnitin je vrácen zpět do cyklu.

Vlastní β -oxidace mastných kyselin probíhá rovněž v několika krocích, které zde nebudeme detailně popisovat. Tyto kroky jsou katalyzovány enzymy: *acyl-CoA*-dehydrogenázou, *enoyl-CoA*-hydratázou, *3-L-hydroxyacyl-CoA*-dehydrogenázou a β -oxoacyl-CoA-thiolázou označovanou někdy jen jako thioláza. Poslední stadium β -oxidace mastných kyselin vede ke vzniku acetyl-CoA a k novému *acyl-CoA*, který

je o dva atomy uhlíku kratší než acyl-CoA, jenž původně do cyklu vstupoval. Takto vzniklý acetyl-CoA může být oxidován v citrátovém cyklu. K tomu je ovšem nezbytný oxalacetát, jehož zásoby při hladovění postupně klesají. Po několika dnech hladovění je tak převážná část acetyl-CoA využita v procesu zvaném ketogeneze. Zde se acetyl-CoA postupně převádí na acetoacetát nebo na D-3-hydroxybutyrát (neboli β -hydroxybutyrát). Tyto děje probíhají převážně v mitochondriích hepatocytů a účastní se jich enzymy acetyl-CoA-acetyltransferáza, hydroxymethylglutaryl-CoA-syntáza a 3-hydroxybutyrátdehydrogenáza. Výsledkem je vznik tzv. **ketolátek**, tedy *acetoacetátu a β -hydroxybutyrátu*. Ketolátky mohou být přímo využity jako energetický substrát např. srdečním svalem nebo příčně pruhovanými svaly. Rovněž mozek se může při hladovění trvajícím déle než 24 hodin adaptovat na krytí větší části energetických potřeb metabolizací ketolátek, i při této adaptaci je však pro normální činnost mozku nutné určité množství glukózy tvořené glukoneogenezí.

3.2.4.6 *Souhrn metabolických změn při hladovění*

Shrneme-li stručně uvedené metabolické děje, adaptace na hladovění probíhá následujícím způsobem: po vyčerpání jaterních glykogenových rezerv dojde ve většině orgánů k metabolickému přesmyku z oxidace glukózy na oxidaci mastných kyselin získaných lipolýzou z tukové tkáně. V játrech dochází k neúplné oxidaci mastných kyselin, vzniklé ketolátky jsou uvolňovány do cirkulace a využívány jako energetický substrát ve svalu a částečně i mozku. Veškerá glukóza, která je nutná pro některé orgány v organismu, se tvoří glukoneogenezí z metabolických produktů štěpení triacylglycerolů, bílkovin a z laktátu. Z uvedeného přehledu je tedy zjevné, že normálně fungující β -oxidace mastných kyselin je nezbytným předpokladem metabolické adaptace na hladovění. K normální stimulaci oxidace mastných kyselin je nezbytná aktivace PPAR- α .

3.2.4.7 *Cílové geny pro PPAR- α*

Zásadní pro přesné zjištění cílových genů pro PPAR- α byly dva objevy. Prvním bylo zjištění, že fibráty jsou exogenními ligandy pro PPAR- α . Tento objev umožnil celou řadu studií specificky zaměřených na molekulární mechanismus změn vyvolaný podáváním fibrátů a identifikaci genů zapojených v tomto procesu. Druhým zásadním přelomem bylo vytvoření transgenní myši s knockoutem genu pro PPAR- α . Poněkud překvapivě se zjistilo, že tyto myši mají za normálních okolností relativně nevýrazný fenotyp neodlišující se příliš od kontrolních zvířat. Výraznější odchylky od normálu se projeví teprve při dlouhodobějším hladovění.

Z cílových genů pro PPAR- α byly nejpodrobněji zkoumány geny se vztahem k metabolismu mastných kyselin. Výzkumy byly prováděny jak na úrovni exprese mRNA pro daný gen, tak i na úrovni měření příslušného proteinu, popř. enzymatické aktivity. Hlavním modelem používaným pro tyto výzkumy byly zmíněné transgenní myši s knockoutem PPAR- α . Největší rozdíly byly vždy detekovány při srovnávání normálních a transgenních myši po podávání PPAR- α agonistů. Toto podání vedlo k mohutné indukci PPAR- α -dependentních enzymů u normálních myši, neovlivnilo však PPAR- α -dependentní enzymy u PPAR- α knockout myši.