

# Hyperglykémie a KV onemocnění – patogenetické mechanismy cévního poškození

## (EXPERIMENTÁLNÍ DŮKAZY)

T. Pelikánová

### ÚVOD

Kardiovaskulární (KV) komplikace jsou nejčastější příčinou úmrtí nemocných s diabetem 2. typu (DM2). DM2 je v současné době považován za jeden z projevů metabolického syndromu (MeTS), který je souborem biochemických, klinických a humorálních odchylek zvyšujících riziko aterosklerózy. Protože absolutní většina nemocných s DM2 má zároveň známky metabolického syndromu, je možné vyšší výskyt aterosklerózy při diabetu částečně vysvětlit přítomností hypertenze, dyslipidémie, centrální obezity, endoteliální dysfunkce, produkci prozánětlivých a proagregačních mediátorů. V epidemiologických hodnoceních je však hyperglykémie jasným samostatným rizikovým faktorem KV mortality a morbidity. Několikanásobně zvyšuje výskyt KV komplikací, nezávisle na přítomnosti ostatních rizikových faktorů, přestože význam léčby hyperglykémie z hlediska redukce kardiovaskulárního (KV) rizika je stále předmětem diskusí. Intervenční studie u diabetiků nevyzývají zcela jednoznačně; efekt léčby na redukcii KV mortality není významný nebo se pohybuje na hranici významnosti (UKPDS, PROACTIVE, DIGAMI 2). V roce 2008 byly zveřejněny výsledky velkých randomizovaných, multicentrických intervenčních studií UKPDS, VADT, ACCORD, ADVANCE, k nimž v letošním roce přibyla studie RECORD. Důvodem je dlouhá časová prodleva, nutná k tomu, aby se intervence projevila (desetiletí) a negativní vliv hypoglykémii, které jsou rovněž rizikovým faktorem KV příhod. Metaanalýza pěti výše uvedených studií uveřejněná v letošním roce, která zahrnovala 33 040 nemocných s DM2 ukázala, že rozdíl HbA1c v intervenované a konvenční větvi o 0,9 % vede k významné redukci rizika KV mortality o 15 % a rizika infarktu myokardu o 17 %, zatímco celková mortalita a mrtvice zůstávají bez rozdílu.

Následující text shrnuje in vitro a experimentální důkazy, které hodnotí roli hyperglykémie v patogenetice aterosklerózy a řeší postavení hyperglykémie

jako samostatného rizikového faktoru versus postavení dyslipidémie.

## JAKÉ JSOU MECHANISMY TOXICKÉHO PROATEROGENNÍHO ÚČINKU GLUKÓZY A POŠKOZENÍ CÉVNÍ STĚNY

Typické je, že buňky, které se účastní na procesu aterogeneze (endotelové buňky, imunokompetentní buňky – makrofágy, trombocyty, fibroblasty), nemají enzymatickou výbavu, která by umožnila využít jako zdroj energie mastné kyseliny a jejich energetický metabolismus je vázáný na oxidaci glukózy. Obecně se glukóza do buněk dostává dvěma různými mechanismy: a) na inzulínu závislým transportem glukózy, který je zprostředkovan glukózovými transportéry 4 (GLUT4) a b) na inzulínu nezávislým transportem. Ten je zajištěn také glukózovými transportéry (GLUT1-3,5-8), které však jsou jinak geneticky kódovány, mají pozmeněné složení aminokyselin. Důležité je, že nejsou aktivovány inzulínem, ale zejména hyperglykémii a hypoxií. Endotelové i imunokompetentní nejsou vybaveny GLUT4. Obsahují pouze GLUT1 a 2 a transport glukózy do těchto buněk je zajištěn na inzulínu nezávislými mechanismy. Závisí především na koncentračním spádu. Buňky tak mají omezenou schopnost regulovat vstup glukózy a bránit se jejímu „toxickému vlivu“ při hyperglykémii.

Hyperglykémie pak indukuje řadu funkčních a morfologických změn cílových buněk, změny v sekreci řady mediátorů, buněčnou proliferaci ev. apoptózu (trofické změny) a fibroprodukcii.

Mechanismy poškození vázané na hyperglykémii. Intracelulární metabolismus glukózy znázorňuje obrázek 1. Po vstupu glukózy do buněk, je glukóza fosforylována na glukózo-6-fosfát. Její metabolické cesty za fyziologických podmínek znázorňuje levá část obrázku: probíhá glykolýza, která je provázána tvorbou glycerol-3-fosfátu a diacyl-glycerolu (DAG), oxidace glukózy a je syntetizován zásobní glykogén. V případě nadbytku glukózy intracelulárně, k němuž dochází při hyperglykémii zejména v non-inzulín-dependentních tkáních, jsou patologicky zvýšené náhradní metabolické cesty, které se za fyziologických podmínek uplatňují pouze minimálně. V současné době je za základní spojující mechanismus považován zvýšený oxidační stres a tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS), zejména superoxidu v mitochondriích. Zdrojem ROS je zvýšená „fyziologická“ oxidace glukózy. Sama glukóza podléhá autooxidaci (glykooxidace) a je zdrojem reaktivních forem kyslíku, které mohou indukovat

řetězovou reakci vzniku dalších kyslíkových radikálů (oxidační stres) provázenou poškozením řady struktur. ROS inhibují klíčový enzym glykolýzy (glyceraldehydfosfátdehydrogenáza), je omezena normální glykolýza a zvyšuje se a) neenzymatická glykace a tvorba pokročilých produktů glykace (AGE), b) tvorba hexosaminu, c) polyolová cesta zvyšující osmoticky aktivní sorbitol a d) dále se prohlubuje oxidační stresu. Dalším samostatným mechanismem je zvýšená aktivace klasických izoforem proteinkinázy C (cPKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), které jsou při hyperglykémii aktivované v nadbytku se tvořícím DAG.

Mediátory funkčních a morfologických změn. Aktivace rezidentních i infiltrujiících buněk stěny cévní hyperglykémii vede k produkci řady mediátorů, které můžeme rozdělit na skupinu působků s vazokaktivními vlastnostmi, ať již vazokonstrikčními či vasodilatačními, skupinu růstových faktorů, a látek, které se uplatňují jako mediátory zánětu či mají prokoagulační a protrombotické vlastnosti (obrázek 2). Jednotlivé mediátory jsou z důvodů přehlednosti zařazeny do uvedených kategorií, ačkoli téměř pravidelně mají více různých funkcí. Například angiotenzin II (Ang II) má nejenom vlastnosti vazokonstrikční, ale má i účinky trofické a prozánětlivé. Mediátory se navíc vzájemně ovlivňují. Některé z nich působí synergicky nebo se mohou naopak uplatňovat jako antagonisté. Protože jednotlivé mediátory často působí prostřednictvím vazby na své receptory, je jejich biologický účinek navíc negativně ovlivněn cirkulujícími solubilními receptory či receptorovými antagonisty a protilátkami. Konečně posledním faktorem, který je třeba zmínit, je koncentrace mediátoru, která podmiňuje způsob jeho účinku. Například NO, který má při nižších koncentracích řadu „příznivých“ účinků, může mít při vyšších hladinách efekty opačné, indukuje apoptózu buněk a řadu toxických reakcí na podkladě tvorby peroxinitratu.

## HYPERGLYKÉMIE A ATEROSKLERÓZA IN VITRO

Existuje řada přímých důkazů in vitro na buněčných a tkáňových kulturách, které ukazují přímý efekt hyperglykémie na vybrané funkce cílových buněk, které se prokazatelně účastní v arterogenezi. Například zvýšení glukózy v mediu stimuluje adhezi monocytů k buňkám endotelu a jejich migraci do subendoteliálního prostoru. V buňkách endotelu je tento efekt provázen zvýšením exprese genů zodpovědných za produkci adhezních molekul, MCP a prozánětlivých cytokinů. In monocytech zvyšuje přidání glukózy expresi prozánětlivých cytokinů, IL-

1, IL-6 a indukuje zvýšení PKC, NF $\kappa$ B, superoxidu. Dalším mechanismem jsou glukózou indukované změny LDL částic (low-density lipoproteins) a funkce HDL (high-density-lipoproteins). Hyperglykémie vede ke glykaci a oxidativní modifikace LDL částic. Změněné částice jsou pak vychytávány „scavenger“ receptory makrofágů a jsou zodpovědné za zvýšené vychytávání a ukládání lipidů ve stěně cévní. Glykované AGE proteiny interferují s reverzním transportem cholesterolu zprostředkovaným HDL částicemi a inhibují odsunu cholesterolu z tkání.

## HYPERGLYKÉMIE A ATEROSKLERÓZA IN VIVO

Některé z výše uvedených toxických účinků glukózy se podařilo potvrdit i in vivo v experimentálních podmínkách. Například bylo potvrzeno, že glukóza přímo stimuluje adhezi leukocytů k cévní stěně a vede k akumulaci hladkých svalových buněk (SMC) v cévní stěně.

Použity mohou být různé metodické přístupy

- Infuze glukózy in vivo. In vivo infuze glukózy u potkanů stimulovala adhezi leukocytů k endotelu a tento efekt mizel po podání inzulinu a normalizaci glykémie.
- Transgenní modely. Jinou metodou je využití transgenních modelů, které mají zvýšenou expresi GLUT-1 v hladkých svalových buňkách arterií (SMC). Zmnožení a translokace SMC hraje nepříznivou roli v aterogenezi. Tyto modely vykazují vyšší vychytávání a lokální koncentrace glukózy v SMC, která je provázena sníženou apoptózou SMC po poškození.
- Zvířecí modely diabetu 1. a 2. typu (DM1 a DM2). Problémem modelů diabetu je komplexnost diabetem indukovaných změn, které zahrnují nejen hyperglykémii, ale také další metabolické poruchy jako je dyslipidémie, endoteliální dysfunkce, protrombotické a prozánětlivé změny. U modelů aterosklerózy asociované s diabetem je obtížné odlišit, zda jde o izolovaný vliv hyperglykémie nezávislý na dalších výše uvedených odchylkách. Klasické studie z 50. let s králíky s aloxanem indukovaným diabetem, u nichž byl sledován rozvoj aterosklerózy, ukazují, že ateroskleróza je spojena zároveň s rozvojem hypertriglyceridémie. Hypertriglyceridémie a vyšší poměr LDL a HDL cholesterolu se ukazují jako významný interferující faktor, při posuzování aterogenicity hyperglykémie také u prasečích modelů. Prasečí modely diabetu nemají aterosklerózu, pokud není zároveň přítomna hyperlipidémie. Pokud je hyperlipidémie přítomna, pak diabetes stupeň aterosklerózy významně zhoršuje. V posledních

letech jsou užívaným modelem diabetické aterosklerózy „diabetické apoE deficientní myši“. I u tohoto modelu je však zvýšená ateroskleróza spojená s proporcionálním zvýšením cholesterolu.

Prakticky jediným modelem, který v současné době umožňuje posoudit izolovaný vliv hyperglykémie, je model LDL receptor deficientních myši (LDLR<sup>-/-</sup>, LDLR<sup>+/-</sup>) s diabetem. LDL receptor deficientních myši jsou modelem pro aterosklerózu. Deficit LDL receptoru je za předpokladu, že jsou zvířata krmena stravou s obsahem cholesterolu, provázen dyslipidemií. Pokud však jsou krmena stravou bez cholesterolu (0% chol), mají normální hladiny lipidů a je tudíž možné zkoumat izolovaný vliv hyperglykémie. Diabetes je indukován tak, že se použijí transgenní zvířata, která exprimují glykoprotein (GP) na beta buňkách, ten funguje jako antigen pro viry, kterými pak infikují zvířata. Viry zničí antigen i s beta buňkou a vznikne diabetes, který je velmi podobný diabetu 1. typu u lidí.

U těžce hyperlipidemických, LDL receptor deficientních zvířat s výraznou hyperlipidemií už přítomnost diabetu progresi aterosklerózy významně neovlivní. Avšak u zvířat, která mají normální nebo lehce zvýšené hladiny lipidů hyperglykémie zvyšuje plochu ČASNÝCH aterosklerotických lézí (lipidové proužky) a akumulaci makrofágů v lézích (Obr. 3). Při dietě s cholesterolem, kterou provází zvýšené hladiny lipidů, zvyšuje hyperglykémie riziko pokročilých aterosklerotických lézí a krvácení do plátu.

Vliv hyperglykémie na již formované pokročilé aterosklerotické léze v myokardu, zkoumali autoři na obdobném modelu LDLR<sup>-/-</sup> myši, s tím, že diabetes byl vyvolán až po 16 týdenní vysokocholesterolové dietě. Diabetes zvyšoval riziko krvácení do plátu a rupturu plátu. Tento efekt však zcela vymizel, pokud byly agresivně sníženy hladiny lipidů (dosaženo další transgenní modifikací zvířat, která zvýšeně exprimovala VLDL receptor v játrech).

Hyperglykémie zvyšuje riziko ruptury aterosklerotických plátů a krvácení do plátů mechanismem, který je podmíněn zvýšenou hladinou TG (nad 2 mmol/l). Efekt hyperglykémie je závislý na zvýšení hladin sérových TG.

## CO JE „METABOLICKÁ PAMĚŤ“?

Problémem intervenčních studií, které testují vliv hyperglykémie na riziko aterosklerózy je dlouhá časová perioda, za kterou se efekt glykémie projeví. Zdá se, že buňky jsou schopné si „pamatovat“ metabolické prostředí a hladinu glykémie, a efekt se projeví až po letech. Na existenci metabolické

paměti poprvé upozornila studie Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study (EDIC/DCCT) u nemocných s DM1. V prodloužené studii DCCT, jejíž intervenční perioda byla ukončena v roce 1994 a nemocní byli sledováni dalších 10 let, se ukázalo, že ačkoli obě skupiny měly na konci sledování stejnou hodnotu HbA<sub>1c</sub>, významně se lišily v riziku nejen mikrovaskulárních komplikací, a původně lépe kompenzovaná skupina měla také o 42 % nižší riziko KV úmrtí a o 57 % nižší riziko KV příhod (infarkt myokardu, centrální příhoda mozková, revaskularizační intervence).

Obdobné výsledky přineslo i prodloužení studie United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 80) u DM2, kdy stejným způsobem, tj. dalších 10 let po ukončení intervenční části studie, byli nemocní dále sledováni. Průměrná celková doba sledování byla asi 17 let (16-30 let). Nemocní, kteří byli původně léčeni intenzivně, měli po dalších deseti letech, kdy již byly srovnatelné hladiny HbA<sub>1</sub> (Obrázek 5), nižší riziko mikrovaskulárních komplikací (o 25 %), ale i riziko infarktu myokardu (o 15 %) a celkové mortality (o 13 %).

Dokladu pro „metabolickou paměť“ v in vitro studiích je řada. Například v kulturách endoteliálních buněk (HUVEC) bylo prokázáno, že pokud byly buňky vystaveny 2 týdny hyperglykémii, přetrvává hyperprodukce fibronektinu a kolagenu přestože jsou buňky několik dní kultivovány při normálních hladinách glukózy. Přetrvává také zvýšení markerů oxidačního stresu a PKCb. In vivo studie u experimentálních zvířat přinášejí podobné výsledky. Zvýšení markerů oxidačního stresu a lipoperoxidace u myši, které bylo navozeno 2 a 6 měsíců trvající hyperglykémii, přetrvává i po 7 měsících dobré kompenzace.

Jaký je molekulární mechanismus odpovědný za metabolickou paměť není známo. Jednou z teorií, která má řadu zastánců, je glykémii indukovaná dysfunkce mitochondrií, která je pak dlouhodobě odpovědná za zvýšenou produkci ROS. Jejím podkladem by mohla být glykace proteinů respiračního řetězce.

## SOUHRN

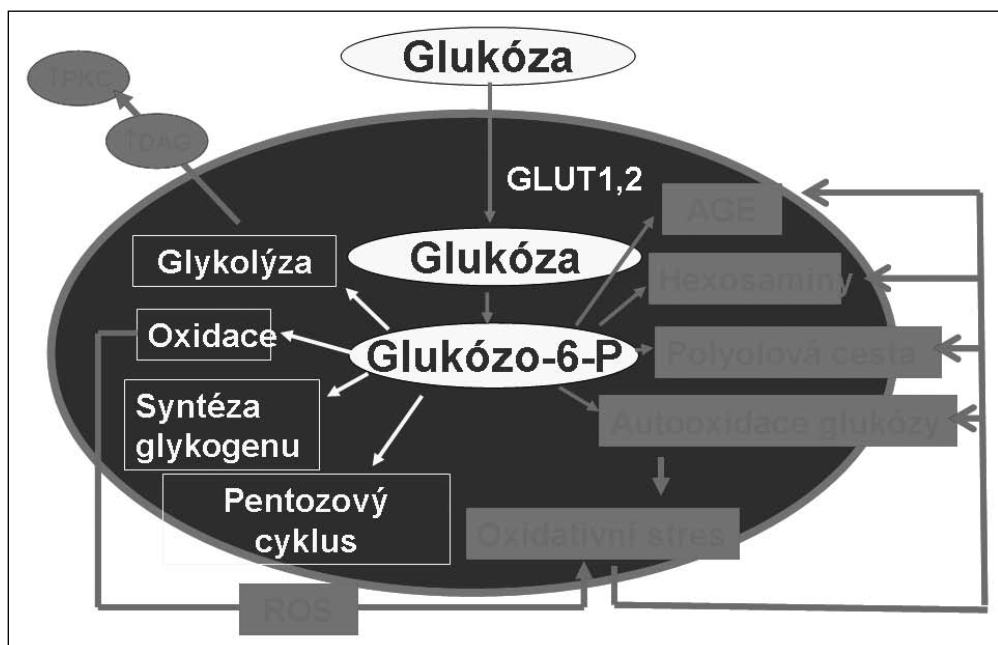
Výsledky in vitro studií a studií na experimentálních modelech, které hodnotí roli hyperglykémie v patogenezi aterosklerózy a řeší její postavení jako samostatného rizikového faktoru přinesly následující závěry:

- a) Hyperglykémie přímo a nezávisle na hladinách sérových lipidů potencuje rozvoj časných aterosklerotických lézí (adheze leukocytů, lipidové proužky, akumulace pěnových buněk v lézích)

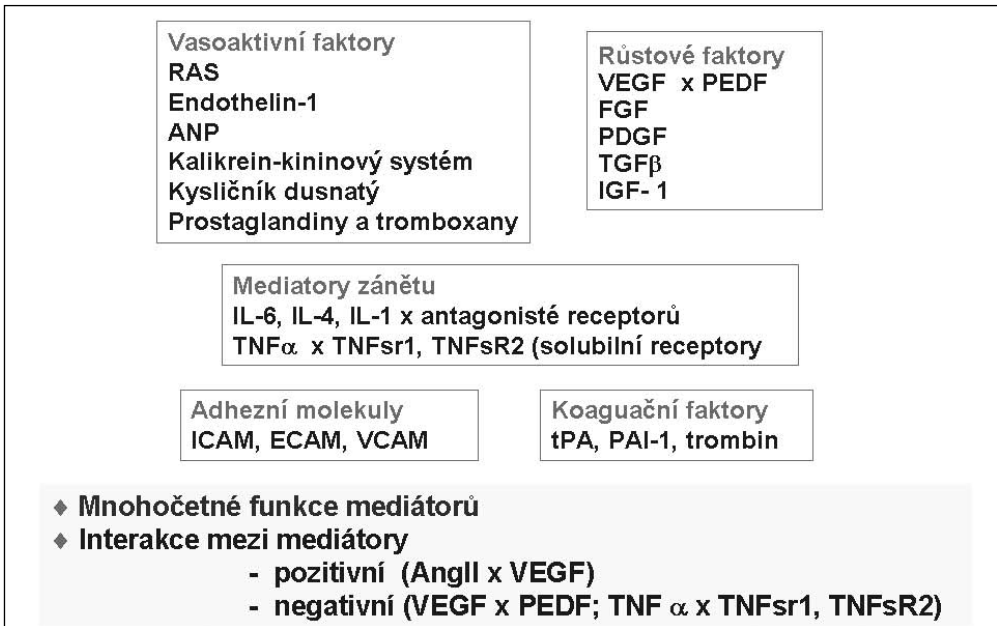
- b) Toxický vliv hyperglykémie se uplatňuje s časovým odstupem i po normalizaci hladin glukózy (metabolická paměť)
- c) Hyperglykémie bez současné lipidové abnormality neakceleruje rozvoj pokročilých aterosklerotických lézí
- d) Hyperglykémie zvyšuje riziko ruptury AS plátů a krvácení do plátů mechanismem, který je podmíněn zvýšenou hladinou triglyceridů (nad 2 mmol/l)

Uvedené závěry, podporují koncept časné intervence a snahy o co nejtěsnější kompenzaci diabetu v počátečních stádiích onemocnění, tj. ihned po stanovení diagnózy diabetu u nemocných ještě bez klinických projevů kardiovaskulárního onemocnění.

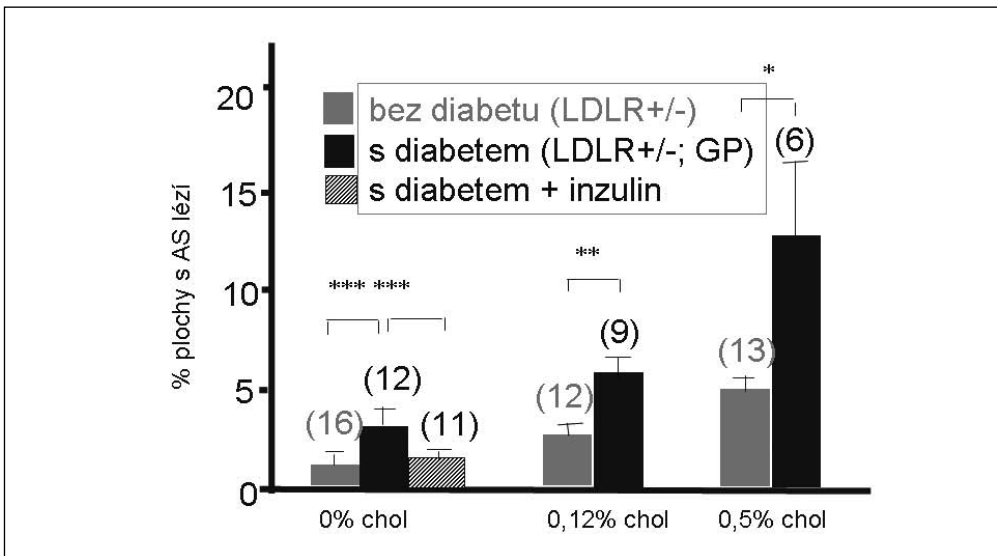
## LITERATURA U AUTORA



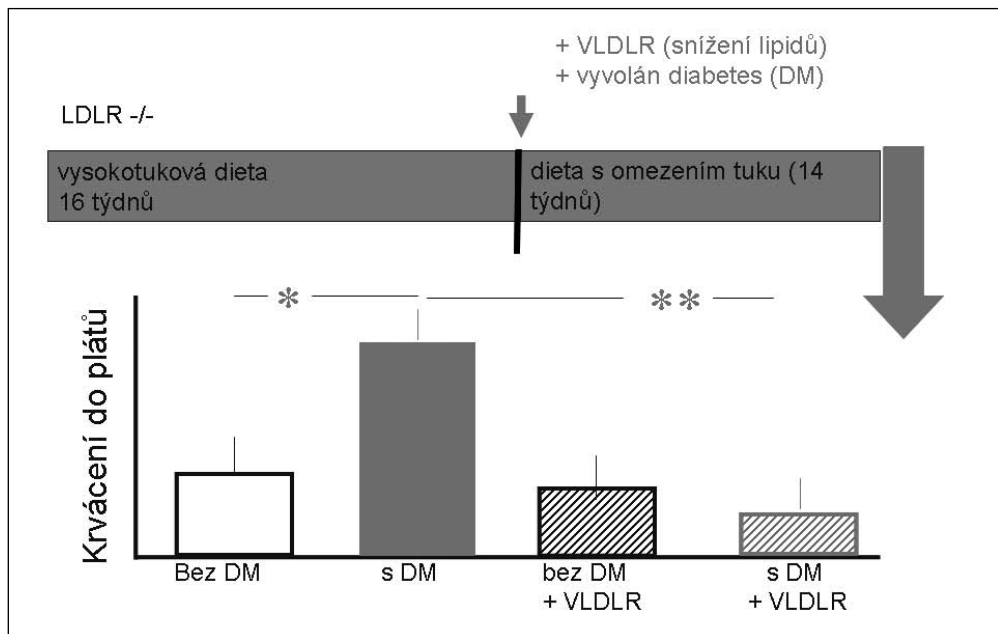
Obrázek 1. Intracelulární metabolismus glukózy a mechanismy poškození cílových buněk (endothelie, imunokompetentní buňky, fibroblasty) hyperglykemií



Obrázek 2. Mediatory funkčních a morfologických změn

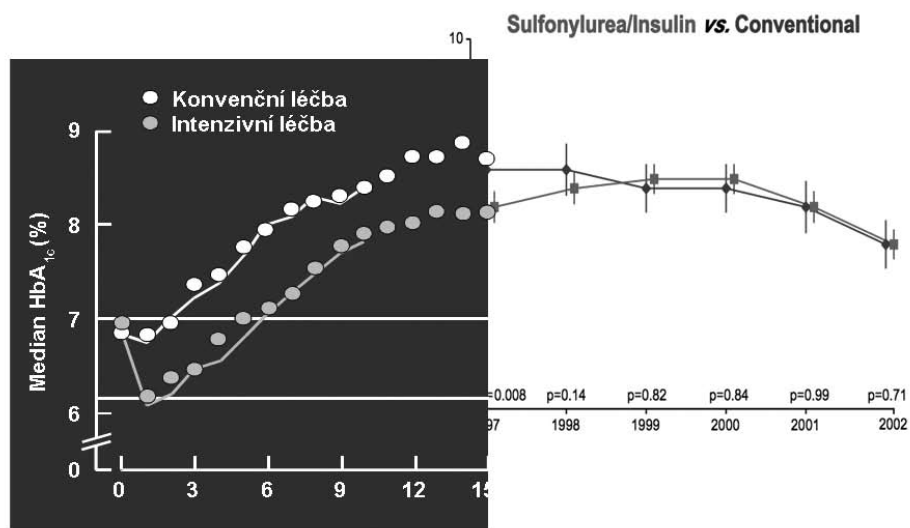


Obrázek 3. Hyperglykémie zvyšuje plochu počínajících aterosklerotických lézí a) nezávisle na dietě - a míře dyslipidémie; b) i při norm. hladinách sérových lipidů (upraveno podle Renard et al. J. Clin. Invest. 2004) LDLR+/-: LDL receptor deficientní myši (model aterosklerózy), blíže viz text., krmené dietou bez cholesterolu (0% chol) či s obsahem cholesterolu (0,12% chol; 0,5% chol)



**Obrázek 4.** Hyperglykémie zvyšuje riziko ruptury aterosklerotických plátů a krvácení do plátů. Efekt hyperglykémie je závislý na zvýšení hladin sérových triglyceridů. Během 16 týdnů se u LDLR-/- (model aterosklerózy) rozvinuly pokročilé léze. Po dalších 14 týdnech diety s omezením tuku bylo provedeno hodnocení krvácení do plátů u skupiny bez diabetu (DM), s DM, a u obou skupin po agresivním snížení hladin lipidů genovou manipulací (+VLDLR) (upraveno podle Johansson et al. 2008)

# UKPDS (1998, 2008) – Vliv léčby na HbA<sub>1c</sub> v průběhu let



Obrázek 5. UKPDS. Hladiny HbA<sub>1c</sub> u konvenčně a intenzivně (Sulfonylurea/insulin) léčené skupiny nemocných s diabetem 2. typu v UKPDS a) v intervenční části studie (od 1977 do 1997) a b) v 10letém následném sledování (od 1997 do 2007) (Upraveno podle UKPDS)