

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Úloha tukové tkáně v rozvoji inzulinorezistence a dalších metabolických změn u nemocných
s feochromocytomem

The role adipose tissue in development of insulin resistance and other metabolic disorders in
patients with pheochromocytoma

MUDr. Judita Klímová

Praha, 2020

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

Školící pracoviště: III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a VFN

Školitel: doc. MUDr. Ondřej Petrák, Ph.D

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| 1. Úvod | 3 |
| 2. Hypotézy a cíle práce | 4 |
| 3. Materiál a metodika..... | 5 |
| 4. Výsledky - Tuková tkáň a její endokrinní funkce..... | 5 |
| 5. Diskuse – Tuková tkáň a její endokrinní funkce..... | 6 |
| 6. Výsledky – FGF21 | 10 |
| 7. Diskuse – FGF21..... | 11 |
| 8. Závěry | 13 |
| 9. Použitá literatura..... | 14 |
| 10. Publikace autora | 15 |

Abstrakt

Feochromocytoomy a funkční paragangliomy (PPGL) jsou vzácné neuroendokrinní tumory charakteristické nadprodukcí katecholaminů, která může vést mj. k poruchám glukózového, lipidového a energetického metabolismu. Role tukové tkáně v těchto procesech zůstává nejasná. Naším cílem bylo stanovit profil genové exprese v subkutánní a viscerální tukové tkáni pacientů s PPGL se zaměřením na endokrinní funkce tukové tkáně, výskyt hnědé (BAT) a béžové tukové tkáně (BeAT), vše v souvislosti s dalšími měřeními metabolickými a energetickými parametry a hladinami cirkulujících adipokinů.

Ve vzorcích retroperitoneální VAT pacientů s PPGL jsme prokázali známky UCP1-mediované noradrenalinem indukované termogeneze s vyšší expresí *DIO2* a klíčových transkripčních faktorů adipogeneze BAT/BeAT (*PPARGC1A*, *CEBPB* a *PRDM16*). VAT pacientů s PPGL neodpovídala na základě použitých markerů jednoznačně BAT ani BeAT. V subkutánní tukové tkáni (SAT) pacientů s PPGL jsme našli známky transformace v BeAT, ale bez známek současně probíhající UCP1-mediované termogeneze.

Dále jsme prokázali, že pacienti s PPGL mají vyšší cirkulující hladiny FGF21 ve srovnání s kontrolami a po adrenalectomii dochází k jejich poklesu. Zvýšené hladiny FGF21 byly zvláště evidentní u pacientů s DM a byly pozitivně spojené s hladinami glykémie na lačno a BMI u těchto pacientů. Důsledky elevace FGF21 u pacientů s PPGL jsou nejasné. Nemůžeme jasně určit, zdali jsou zvýšené hodnoty důsledkem kontroverzní "FGF21 rezistence" nebo zdali má FGF21 specifický metabolický efekt. Domníváme se, že hladiny FGF21 u pacientů s PPGL jsou biologicky významné a odrážejí metabolické abnormality asociované s diabetem mellitus a metabolickým syndromem. Spojení mezi sérovými hladinami FGF21 či expresí UCP1 s hypermetabolismem, stanoveným metodou nepřímé kalorimetrie, jsme nenašli. Současně rozšiřujeme možnosti endokrinní funkce termogenní tukové tkáně o působení adiponektinu a visfatinu.

Nenašli jsme změny v cirkulujících hladinách rezistinu, lipokalinu 2, PAI-1 a adiposinu u pacientů s PPGL.

Abstract

Pheochromocytoma and functional paraganglioma (PPGL) are rare neuroendocrine tumors characterized by catecholamines overproduction, which give a rise to disorders of glucose, lipid, and energy metabolism. The role of adipose tissue in these processes remains unclear. Our aim was to determine the gene expression profile in subcutaneous and visceral adipose tissue of patients with PPGL focusing on endocrine functions of adipose tissue, occurrence of brown (BAT) and beige adipose tissue (BeAT), all in connection with other measured metabolic and energy parameters and levels of circulating adipokines.

We demonstrate signs of UCP1-dependent norepinephrine induced thermogenesis connected with overexpression of *DIO2* in retroperitoneal VAT of PPGL and higher expression of key transcriptional factors of brown/beige adipogenesis, namely *PPARGC1 α* , *CEBPB* and *PRDM16*. However, classic murine BAT or BeAT gene signature in VAT of PPGL was not detected. In subcutaneous adipose tissue (SAT) of PPGL we found signs of possible BeAT transformation, however without simultaneously undergoing UCP1-dependent thermogenesis.

We also demonstrate that patients with PPGL have higher serum levels of FGF21 compared to healthy controls and these levels do not differ from obese patients. Furthermore, successful tumor removal decreased significantly FGF21 levels. Elevated FGF21 levels were more evident in patients with secondary diabetes mellitus and were related positively to fasting glucose levels and BMI in PPGL. The consequences of the elevation of FGF21 in PPGL are unclear. We cannot identify from our work whether the elevation of FGF21 is the result of a controversial FGF21 resistance or whether FGF21 has some biological effect. We assume, that elevated levels of FGF21 in patients with PPGL are biologically significant and reflect metabolic abnormalities associated with diabetes mellitus and obesity. We did not find a relationship between FGF21 or UCP1 expression and hypermetabolic state in PPGL.

We also extend possible endocrine functions of BAT/BeAT of hormone adiponectin and visfatin. We did not find difference in circulating levels of resistin, lipocalin 2, PAI-1 and adipsin in patients with PPGL.

1. Úvod

Feochromocytomy a funkční paragangliomy (PPGL) jsou vzácné neuroendokrinní nádory vycházející z chromafinních buněk dřeně nadledvin nebo sympatických ganglií hrudníku, břicha nebo pánve (Lenders, Eisenhofer et al. 2005). Tyto nádory jsou charakteristické svojí schopností syntetizovat, metabolizovat a většinou i uvolňovat jeden nebo více katecholaminů (adrenalin, noradrenalin, dopamin).

Nadprodukce katecholaminů vede u pacientů s PPGL k široké škále obtíží, hemodynamických a metabolických odchylek. Klinický obraz se vyvíjí závisle na typu uvolňovaného katecholaminu, jeho množství a způsobu sekrece. Tato práce se zabývá především metabolickými změnami způsobených nadprodukcí katecholaminů. PPGL nám tak umožňují studovat účinky dlouhodobé nadprodukce stresových hormonů na organismus.

Jako první z metabolických abnormalit u pacientů s PPGL můžeme uvést ztrátu tělesné hmotnosti nezávisle na příjmu potravy či pohybové aktivitě. Aktivace hnědé tukové tkáně jako jeden z mechanismů hypermetabolismu u pacientů s PPGL zůstává diskutabilní a je náplní této práce. K dalším z metabolických odchylek vyskytujících se u pacientů s PPGL patří poruchy metabolismu glukózy, změny lipidového spektra nebo změny v hladinách adipokinů.

Tuková tkáň patří mezi vazivové tkáně. Dle lokalizace rozlišujeme subkutánní (SAT), viscerální (VAT) a ektopickou tukovou tkáň. Dále rozlišujeme tukovou tkáň bílou (WAT), béžovou (BeAT) a hnědou (BAT). Hnědá tuková tkáň je metabolicky vysoce aktivní tkáň se schopností přeměnit chemickou energii získanou z lipolýzy na teplo v procesech nazývaných chladem a dietou indukovaná termogeneze. Pro BAT je charakteristická aktivace β 3-adrenoreceptorů noradrenalinem a spuštění kaskády ústící v situaci, kdy uncoupling protein 1 (UCP1) zabrání mitochondriím v produkci ATP a místo toho energii získanou oxidací volných mastných kyselin uvolní jako teplo (Cannon and Nedergaard 2004). Aktivace BAT patří k jedním z experimentálních terapií obezity. Do roku 2002 patřily PPGL k jednomu ze tří patologických stavů společně s hibernomem a nádorovou kachexií (Leiphart and Nudelman 1970) spojených s výskytem metabolicky signifikantního množství BAT u dospělých. Dodnes je však vyšší výskyt BAT u pacientů s PPGL kontroverzním tématem.

K odlišení bílé, hnědé a béžové tukové tkáně může pomoci genový profil. Ze studií především *in vitro* a méně pak *in vivo* pochází seznam genů spojených buď s jedním či druhým typem tukové tkáně. Tyto geny z větší části exprimují transkripční faktory či povrchové molekuly. V průběhu determinace a diferenciaci BeAT a BAT hraje roli několik proteinů, z nichž k nejzákladnějším patří C/EBP, PPAR- γ s koaktivátorem PGC-1 α a

PRDM16. Za klasické markery BAT je považovaný gen *FBXO31*, *LHX8* a *ZIC1*. Za klasické markery BeAT jsou považovány geny *TNFRSF9*, *TMEM26* a *SHOX2*.

Adipocyty produkují působky nazývané souhrnně adipokiny. Ty zasahují do regulace příjmu potravy, informují o zásobách energie v těle, ovlivňují imunitní reakce a inzulinovou senzitivitu, krevní tlak, proces angiogeneze a celkový lipidový a glukózový metabolismus. Adipokinů bylo popsáno již několik desítek, my jsme pro naši práci vybrali leptin, adiponektin, visfatin, rezistin, neutrofilní s gelatinózou asociovaný lipokalin 2 (NGAL), adiposin, inhibitor aktivátoru plasminogenu typu 1 (PAI-1) a fibroblastový růstový faktor 21 (FGF21).

2. Hypotézy a cíle práce

Hypotézy

1. Profil genové exprese tukové tkáně nemocných s PPGL bude odlišný od kontrolní skupiny bez feochromocytomu/paragangliomu a bude charakterizován zvýšeným zastoupením UCP1 a dalších genů typických pro netřesovou termogenezi.
2. Zároveň bude tento genový profil obsahovat zvýšenou expresi specifických markerů pro hnědou nebo béžovou tukovou tkáň, případně obojí.
3. Expresie genů pro adipokiny a jejich receptory bude změněná ve viscerální tukové tkáni.
4. Hladiny adipokinů zasahujících do glukoregulačních a energetických dějů budou odlišné u pacientů s feochromocytomem ve srovnání se zdravými dobrovolníky.

Cíle práce:

1. Porovnat mRNA expresi genů asociovaných s výskytem a aktivitou hnědé a béžové tukové tkáně v subkutánní a viscerální tukové tkáni pacientů s feochromocytomem ve srovnání s kontrolní skupinou.
2. Zjistit, zda v tukové tkáni pacientů s feochromocytomem probíhá netřesová termogeneze a zdali je za ní zodpovědná spíše hnědá, či béžová tuková tkáň.
3. Analyzovat mRNA expresi genů asociovaných s endokrinní funkcí tukové tkáně.
4. Porovnat hladiny adipokinů u pacientů s feochromocytomem před operací a rok po ní a dále s hladinami adipokinů u skupiny zdravých dobrovolníků, event. s jinou skupinou pacientů.
5. Srovnat hladiny vybraných adipokinů se základními biochemickými ukazateli.

6. Posoudit, zdali se ve zkoumaných parametrech liší pacienti s noradrenergním a adrenergním biochemickým fenotypem a dále pacienti s hypermetabolismem kvantifikovaným metodou nepřímé kalorimetrie.

3. Materiál a metodika

Do části studie s odběrem tukové tkáně bylo zahrnuto 25 pacientů s PPGL a 14 kontrol. Do části studie s FGF21 bylo zahrnuto 40 pacientů s PPGL, 26 zdravých dobrovolníků a 21 obézních. Všichni pacienti s PPGL byli vyšetřeni během krátké hospitalizace na našem pracovišti před operací a rok po ní. Odstranění primárního nádoru bylo provedeno na 1. chirurgické klinice VFN a 1. LF UK v Praze nebo na Urologické klinice VFN a 1. LF UK v Praze. Obézní pacienti byli vyšetřeni na naší klinice na začátku hospitalizace z důvodu redukce váhy. Cholecystektomii podstoupili pacienti na 1. chirurgické klinice VFN a 1. LF UK v Praze.

Základní laboratorní hodnoty byly měřeny standardními metodami naší laboratoře s mezinárodní akreditací. Vzorky SAT i VAT byly získány během otevřené či laparoskopické adrenalektomie u pacientů s PPGL a během laparoskopické cholecystektomie u kontrol. Vzorky VAT byly získány z oblasti retroperitonea u pacientů s PPGL a z omenta u kontrol. Vzorky SAT byly získány z přední břišní stěny. Diabetes mellitus, arteriální hypertenze, obezita a metabolický syndrom byly definovány dle doporučení příslušných společností. Energetický metabolismus byl kvantifikován metodou nepřímé kalorimetrie s užitím ventilované kanopy. Podskupina pacientů s hypermetabolismem byla identifikována. Podskupiny s adrenergním a noradrenergním fenotypem byly taktéž definovány. Současně s měřením nepřímé kalorimetrie probíhalo měření celkového množství tuku v těle.

Stanovení genové exprese bylo provedeno na 7500 Real-Time PCR Systému. Beta-2-mikroglobulin (B2M) byl použit jako validní house-keeping gen pro tuto studii. Vzorec 2^{-ddCt} byl použit ke kalkulaci relativní genové exprese. Byla stanovena exprese 23 genů.

4. Výsledky - Tuková tkáň a její endokrinní funkce

Jak jsme očekávali, skupina s PPGL vykazovala signifikantně vyšší hodnoty glykémie na lačno (FBG) ($p=0,005$), HbA1C ($p<0,001$) a hladiny volných metanefrinů v plazmě ($p<0,001$). Zároveň tato skupina vykazovala vyšší energetický výdej (REE/BEE) ($p=0,008$). Srovnání hladin HDL se nacházelo na hranici významnosti ($p=0,055$). Patnáct pacientů s PPGL (60 %) splňovalo kritéria pro hypermetabolismus a 8 pacientů s PPGL (32 %) splňovalo kritéria pro noradrenergní fenotyp.

Ve VAT pacientů s PPGL jsme našli zvýšenou mRNA expresi genů *CEBPB* ($p < 0,001$), *DIO2* ($p = 0,005$), *PPARGCIA* ($p < 0,001$) a *UCPI* ($p < 0,001$). Rozdíl v expresi genu *PRDMI6* se nacházel na hranici hladiny významnosti ($p = 0,069$). Naopak jsme našli snížené hladiny exprese genu *TMEM26* ($p = 0,007$). V SAT pacientů s PPGL jsme našli zvýšenou mRNA expresi genu pro adrenoceptor beta 3 (*ADRB3*) ($p = 0,046$), *CIDEA* ($p = 0,048$) a *PPARGCIA* ($p = 0,001$). Exprese genu *FBXO 31* byla vyšší v SAT kontrol ($p = 0,035$). mRNA exprese genů *ZICI* a *LHX8* se ve SAT i VAT nacházela pod detekční schopností metody u obou vyšetřovaných skupin. mRNA exprese genu *UCPI* se nacházela pod detekční schopností metody v SAT obou skupin.

Exprese genu *UCPI* korelovala pozitivně ve VAT pacientů s PPGL s expresí genů *ADRB3*, *CIDEA*, *DIO2*, *PPARGCIA*, *PPARG*, *PRDMI6* (vše $p < 0,001$) a *TMEM26* ($p = 0,033$), *CEBPB* ($0,003$), *PPARD* ($0,044$). Exprese termogenních genů ve VAT pacientů s PPGL klesala s věkem a BMI. Exprese genů *UCPI* a *DIO2* pozitivně korelovala s hladinami normetanefrinu v plazmě ($p < 0,001$ a $p = 0,019$). V SAT pacientů s PPGL se taktéž negativně projevil vliv věku a BMI.

Ve VAT pacientů s PPGL byla přítomna signifikantně vyšší mRNA exprese genů *ADIPOR1* ($p < 0,001$), *INSR* ($p = 0,040$) a *NAMPT* ($p < 0,001$). V SAT pacientů s PPGL byla taktéž přítomna vyšší mRNA exprese genů *ADIPOR1* ($p = 0,033$) a *NAMPT* ($p = 0,012$).

Ve VAT pacientů s PPGL korelovala negativně s BMI mRNA exprese genu pro inzulinový receptor a genu pro substrát inzulinového receptoru 1. Naopak s vyššími hodnotami BMI se zvyšovala i mRNA exprese genů pro adipokiny visfatin a leptin. V SAT pacientů s PPGL taktéž s BMI negativně korelovala mRNA exprese genů pro adiponektin, inzulin a substráty inzulinového receptoru 1 a 2. mRNA exprese těchto genů zároveň negativně korelovala i s FBG. Pozitivní korelace byla nalezena mezi BMI a mRNA expresí genu pro leptin. mRNA exprese genu pro leptin taktéž vykazovala negativní korelaci s volným normetanefrinem a metanferinem v plazmě.

5. Diskuse – Tuková tkáň a její endokrinní funkce

V naší studii jsme prokázali u pacientů s PPGL ve vzorcích retroperitoneální VAT vyšší expresi genu *UCPI*, funkčního markeru BAT i BeAT. Hodnota mediánu u pacientů s PPGL převýšila 35x hodnotu mediánu kontrol. Hodnoty mRNA exprese *UCPI* se obecně nacházely u pacientů s PPGL (na rozdíl od kontrol) v širokém rozmezí. Hodnoty mRNA exprese genu *UCPI* pozitivně korelovaly s hladinami normetanefrinu v plazmě a mRNA expresí genu

ADRB3, genů odpovědného za syntézu β 3-receptorů. mRNA exprese genu *UCP1* v naší skupině klesala s věkem a BMI, což je nález v souladu s obecným nálezem ve zdravé populaci (Pfannenber, Werner et al. 2010, Wang, Zhang et al. 2015). Vliv pohlaví na expresi *UCP1* jsme naopak v naší skupině nezaznamenali. Hodnoty mRNA exprese genu *UCP1* ve VAT pacientů s PPGL pozitivně korelovaly dále s mRNA expresí genů *CIDEA* a *DIO2*, které jsou považovány za markery obou tkání – BeAT i BAT. Dále hodnoty mRNA exprese genu *UCP1* pozitivně korelovaly s mRNA expresí genů pro klíčové transkripční faktory adipogeneze BAT i BeAT. Musíme zmínit celkově vyšší mRNA ve VAT genu *DIO2* ve VAT, kódujícím dejodinázu typu II, která je považována za známku zralé BAT. Z výsledků výše zmíněných usuzujeme na přítomnost probíhající noradrenalinem-indukované UCP1 dependentní termogeneze ve VAT pacientů s PPGL.

Nenašli jsem však signifikantní rozdíl v expresi klíčových genových markerů pro BAT či BeAT ve vzorcích VAT pacientů s PPGL. Prokázali jsme nízké nebo nezměněné hladiny klíčových markerů BeAT (*TMEM26*, *TNFSRF9* a *SHOX2*) i BAT (*ZIC1*, *FBXO31* a *LHX8*). Funkce těchto genů není známa nebo je nejednoznačná. Seznam těchto genů je založen především na in vitro a zvířecích modelech. Rozdílné výsledky byly publikovány i u pacientů s PPGL. Di Franco s kolegy našli v retroperitoneální BAT a z ní odvozených kmenových buněk osmi pacientů s PPGL jak klasické známky BAT, tak i BeAT. V této studii retroperitoneální BAT a nediferencované hnědé kmenové buňky exprimovali vyšší hladiny *ZIC1* a *TNFSRF9*, ale ne *LHX8* (Di Franco, Guasti et al. 2014). Nagano s kolegy prokázali na 11 pacientech s PPGL, že adipocyty retroperitoneální BAT exprimovaly molekulární charakteristiky klasické hnědé spíše než béžové tukové tkáně (Nagano, Ohno et al. 2015). Konkrétně stanovili v retroperitoneální oblasti pacientů s PPGL vyšší expresi genů *UCP1*, *CIDEA*, *ELOVL3*, *EBF3*, *FBXO31* a *LHX8*, ale ne *TNFSRF9*, *TBX1* nebo *TMEM26* ve srovnání se 7 pacienty s afunkčním tumorem nadledviny (Nagano, Ohno et al. 2015). Betz a kol. zkoumali 57 pacientů s tumorem nadledviny (včetně PPGL). Prokázali, že skupina, kde se nachází BAT vykazuje vyšší expresi *UCP1*, *PPARGC1A*, *DIO2*, *ADRB3* ale ne *PRDM16* (Betz, Slawik et al. 2013). V jiné studii prokázal Frontini v omentálním tuku v 12 pacientů s PPGL vyšší expresi *UCP1*, *ADRB3* a *PRDM16*, ale ne *PPARGC1A* a *DIO2*. Naše a výše zmíněné výsledky ukazují, že specificita a funkce těchto klasických genových markerů je stále nejasná (Giralt and Villarroya 2013, Di Franco, Guasti et al. 2014). Na otázku, zdali se ve VAT našich pacientů převažuje BAT či BeAT, proto nedokážeme jednoznačně odpovědět.

Na základě našich výsledků je pravděpodobné, že noradrenalin indukuje transformaci obou tukových tkání, tedy jak BAT, tak BeAT.

Ve VAT pacientů s PPGL jsme zaznamenali signifikantně vyšší expresi genů pro transkripční faktory *PPARGC1A* a *CEBPB*. Exprese genu pro další transkripční faktor a to *PRDM16*, se nacházela na hranici významnosti. Exprese genu *PPARGC1A* korelovala ve VAT pacientů s PPGL s expresí genů *UCPI* ($p < 0,001$), *TMEM26* ($p = 0,009$), *CIDEA*, *DIO2* (oba $p < 0,001$) a *ADRB3* ($p < 0,001$). PGC-1 α , kódovaný genem *PPARGC1A*, je považován za hlavní regulátor mitochondriální biogeneze a esenciální látku pro chladem a agonisty $\beta 3$ -receptorů indukovanou termogenezi (Uldry, Yang et al. 2006). *CEBPB* kóduje CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP- β), další transkripční faktor v adipogenezi. Ztráta C/EBP- β vede ke snížené termogenezi myši (Carmona, Hondares et al. 2005) a jeho zvýšená funkce vede ke zvýšení aktivity BAT (Karamanlidis, Karamitri et al. 2007). *PRDM16* je transkripční faktor, který indukuje vývoj hnědé tukové tkáně namísto myoblastů z MYf5-pozitivních prekurzorů u myši (Seale, Bjork et al. 2008) a zvyšuje transformaci WAT do BeAT za přítomnosti PPAR γ agonistů nebo agonistů $\beta 3$ -receptorů u myši (Ohno, Shinoda et al. 2012). Nenalezli jsme žádný rozdíl v expresi *PPARG* či *PPARD*, skupině genů pro jaderné receptory. Domníváme se však, že zvýšená aktivita transkripčních faktorů zmíněných výše odráží zvýšenou diferenciaci termogenní tkáně ve zkoumaných vzorcích, ať už se jedná o BAT či BeAT. Tyto transkripční faktory se nachází jednak na začátku diferenciaci a jednak odráží aktivitu i zralější tkáně.

V SAT pacientů s PPGL jsme prokázali vyšší mRNA expresi genů *PPARGC1A* a *ADRB3* společně s vyššími mRNA hladinami genu *CIDEA*. mRNA exprese genu *CIDEA* korelovala pozitivně s expresí genů pro transkripční faktory a to *PPARGC1A* a *PRDM16* (oba $p < 0,05$). mRNA expresi funkčního genu termogeneze *UCPI* jsme však v SAT pacientů s PPGL nezaznamenali (ani v SAT kontrol). O tom, že i v SAT dochází ke změně u pacientů s PPGL informoval např. T. Okamura s kolegy (Okamura, Nakajima et al. 2015). Jasný průkaz v hnědnutí SAT u pacientů s PPGL však zatím k dispozici není (Vergnes, Davies et al. 2016). Naproti tomu k hnědnutí SAT dochází jasně u myši. Naše výsledky nemůžeme považovat za jasný důkaz zvýšené diferenciaci tkáně, a tady naše hypotéza o transformaci SAT nebyla potvrzena. Na druhou stranu naše výsledky nevyvrací možnost existence UCPI-nezávislé termogeneze, která je v literatuře také hojně diskutována.

Dle hodnoty REE/BEE jsme rozdělili pacienty s PPGL na podskupinu s hypermetabolismem a podskupinu s normálním metabolismem. Dále jsme pacienty s PPGL

rozdělili na podskupinu s adrenergním a noradrenergním fenotypem. Nenalezli jsme rozdíl v genové expresi mezi pacienty s PPGL a normometabolismem ve srovnání s hypermetabolismem nebo pacienty s adrenergním fenotypem ve srovnání s noradrenergním fenotypem. Nicméně limitací naší práce v podrobnějších subanalýzách byl nízký počet pacientů s feochromocytomem, neboť se jedná o vzácné onemocnění. Dále musíme brát v úvahu různorodé rozpětí katecholaminů u pacientů s PPGL nebo vliv sezónních teplot.

Stran endokrinní funkce tukové tkáně jsme došli k následujícím výsledkům. Našli jsme pozitivní korelaci mezi mRNA expresí genu *UCPI* a expresí genu kódujícím hormon adiponektin (*ADIPOQ*) a receptor pro adiponektin 1 (*ADIPOR1*) (oba $p < 0,001$). Zároveň jsme prokázali vyšší mRNA expresi genu *ADIPOR1* ve VAT i SAT pacientů s PPGL. Adiponektin je znám širokou škálou pozitivních účinků na metabolismus, ale jeho vliv na BAT je nejasný. Q. Wei s kolegy ukázali, že kmen myši s ablací genu pro adiponektin (*Adipoq* $-/-$) po vystavení chladu nedokáže dobře udržet teplotu těla a exprese termogenních genů ve VAT i SAT je snižená. Také ukázal že počet mitochondrií v BAT je u těchto myši snižen, stejně tak jako exprese mitochondriálních genů. Dále ukázal že delece genu pro adiponektin vede ke snížené sympatické stimulaci a down-regulaci $\beta 3$ -receptorů v BAT u těchto myši (Wei, Lee et al. 2017).

Zcela opačné výsledky publikoval L. Qiao s kolegy, kteří označili efekt adiponektinu za výrazně anti-termogenní a jejich kmen myši *Adipoq* $-/-$ se choval v chladu zcela jinak než kmen myši ve studii Q. Weia (Qiao, Yoo et al. 2014). Pozoruhodné je, že efekt na termogenezi v této studii nebyl zprostředkovaný vazbou adiponektinu na receptory pro adiponektin 1 ani 2 (Qiao, Yoo et al. 2014). G. Iacobellis měřil mRNA expresi adiponektinu a jeho receptorů 1 a 2 v tkáni feochromocytomu u 49 pacientů (Iacobellis, Di Gioia et al. 2013). Zároveň měřil hladiny v plazmě celkového a HMW adiponektinu u 10 pacientů s feochromocytomem a u 33 zdravých dobrovolníků. Prokázal vyšší mRNA expresi hlavně pro *ADIPOR1* u pacientů s PPGL a adrenergním fenotypem. U pacientů s noradrenergním fenotypem prokázal vyšší hladiny celkového i HMW adiponektinu (Iacobellis, Di Gioia et al. 2013). V jedné z našich minulých studií jsme změny adiponektinu v jeho cirkulující frakci u 18 pacientů s PPGL před operací ve srovnání se stavem po operaci, nezaznamenali (Bošanská, Petrák et al. 2009). Naše současná práce s tukovou tkání hovoří spíše pro pozitivní vazbu mezi adiponektinem a termogenezí, který se může projevovat na parakrinní úrovni.

Adipocyty BAT obsahují velké množství inzulिनových receptorů a tkáň BAT je obecně považována za vysoce inzulín-senzitivní tkáň. Ve VAT pacientů s PPGL jsme našli vyšší

mRNA expresi genu pro inzulínový receptor (*INSR*), ale ne substrátů pro inzulínový receptor 1 a 2. mRNA exprese UCP1 avšak pozitivně korelovala s mRNA expresí jak inzulínového receptoru, tak IRS1 (oba $p < 0,05$). Nemůžeme vyloučit, že se jedná o up-regulaci receptorů při celkově snížených cirkulujících hladinách inzulínu.

V SAT i VAT pacientů s PPGL jsme prokázali vyšší mRNA expresi genu *NAMPT*, který kóduje hormon visfatin. Předpokládá se, že visfatin je produkován makrofágy infiltrujícími tukovou tkáň spíše než adipocyty samotnými a jeho hladiny korelují se stupněm zánětu (Saddi-Rosa, Oliveira et al. 2010). Visfatin mimikuje účinky inzulínu a snižuje hladinu glukózy v krvi (Adeghate 2008). Rozdíl v mRNA expresi genů pro leptin a rezistin jsme ve VAT či SAT u pacientů s PPGL nenašli.

6. Výsledky – FGF21

Laboratorně obézní skupina vykazovala vyšší BMI a procento tělesného tuku ve srovnání s PPGL i kontrolami ($p < 0,001$). Jejich lipidogram se taktéž lišil v hladině triglyceridů a HDL ($p < 0,001$). Vyšší energetický metabolismus byl přítomen jak u skupiny s PPGL, tak u obézních ($p = 0,007$). Definici hypermetabolismu splňovalo 49 % pacientů s PPGL. Jak obézní, tak pacienti s PPGL vykazovali vyšší hodnoty systolického krevního tlaku než kontroly ($p = 0,002$). Hladiny FBG a HbA1c byly u skupiny PPGL i obézních podobné, ale vyšší než u kontrol ($p < 0,001$). Hladiny inzulínu byly nižší u pacientů s PPGL než u kontrol a očekávaně vyšší u obézních ($p = 0,037$) společně s HOMA-IR ($p < 0,001$) ve srovnání s kontrolami. Adrenergní fenotyp byl přítomen u 61 % pacientů s PPGL a noradrenergní u 39 % pacientů s PPGL.

Podskupina 27 pacientů byla vyšetřena 1 rok po provedení unilaterální adrenalectomie. Pokles v hladině volných metanefrinů v plazmě a chromograninu A odráží úspěšnost operace ($p < 0,001$). Váhový přírůstek byl signifikantní ve všech sledovaných parametrech. Žádný pacient po operaci nesplnil kritéria pro hypermetabolismus. Arteriální hypertenze zůstala přítomna u 22 % pacientů, ale celkový počet užívaných antihypertenziv se snížil. Hladiny FBG a HbA1c významně poklesly ($p < 0,001$ a $p = 0,018$). Překvapivě nedošlo k normalizaci hladin inzulínu, ale normoglykémie byla pooperačně přítomna u většiny pacientů (93 %). Inzulín rok po operaci neužíval žádný pacient.

Hladiny FGF21 se nacházely u všech skupin v širokém rozpětí. Hladiny FGF21 byly signifikantně vyšší u PPGL než u kontrol ($p < 0,001$) a srovnatelné s obézními. Pacienti s PPGL a diabetem vykazovali vyšší hladiny FGF21 než ti s normální glukózovou tolerancí

(438,2 [337] pg/ml vs. 154,5 [97] pg/ml; $p=0,007$). Pacienti s PPGL a diabetem taktéž vykazovali vyšší hladiny FGF21 než ti s prediabetem (438,2 [337] pg/ml vs. 154,5 [97] pg/ml; $p=0,022$). Obézní diabetici taktéž vykazovali vyšší hladiny FGF21 než obézní s normální glukózovou tolerancí (314,1 [300] pg/ml vs. 140,5 [7] pg/ml; $p=0,049$). Obézní s diabetem vykazovali vyšší hladiny FGF21 než obézní s prediabetem (314,1 [300] pg/ml vs. 113,1 [54] pg/ml; $p=0,024$). Hladiny FGF21 u pacientů s PPGL a noradrenergním fenotypem se lišily od těch s adrenergním fenotypem lehce nad úrovní významnosti ($p=0,062$). Rozdíl mezi pacienty s PPGL a hypermetabolismem či normálním metabolismem nebyl zachycen.

Hladiny FGF21 korelovaly pozitivně u pacientů s PPGL s věkem ($p=0,005$), BMI ($p=0,028$), pulzním tlakem ($p=0,032$), glykemií na lačno ($p=0,002$) a HbA1c ($p=0,014$). Pacienti s PPGL a s metabolickým syndromem nebo dyslipidemií vykazovali vyšší hladiny FGF21 než jedinci bez těchto onemocnění ($p<0,001$).

Nenašli jsme signifikantní rozdíl v žádném z dalších stanovených adipokinů.

7. Diskuse – FGF21

Naše studie ukázala, že pacienti s PPGL mají vyšší hladiny FGF21 ve srovnání s kontrolami a tyto hladiny se neliší od hladin FGF21 obézních jedinců. Dále jsme zaznamenali signifikantní pokles v hladinách FGF21 po odstranění nádoru. Zvýšené hladiny FGF21 byly zvláště evidentní u pacientů s PPGL a DM a pozitivně korelovaly s hladinami glykémie na lačno a BMI. Nenašli jsme spojení mezi FGF21 a hypermetabolismem u pacientů s PPGL.

Nadprodukce katecholaminů u pacientů s PPGL vede ke zvýšenému energetickému výdeji (Petrák, Haluzíková et al. 2013). Ačkoliv jsme prokázali zvýšené hladiny FGF21, nenašli jsme spojení s hypermetabolismem. V biopsiích tuku u pacientů s PPGL byla prokázána vyšší exprese mRNA FGF21 ve srovnání s kontrolami podstupujícími elektivní cholecystektomii (Hondares, Gallego-Escuredo et al. 2014). Tato studie však neobsahovala hladiny FGF21 v periferní krvi. Můžeme se tedy domnívat, že sérové hladiny neodráží parakrinní aktivitu FGF21 v tukové tkáni.

Experimentální studie ukázaly, že to je noradrenalin, který stimuluje produkci FGF21 v hnědé tukové tkáni přes aktivaci β -receptorů (Hondares, Iglesias et al. 2011) a tento jev není ovlivněn současným podáváním alfa-blokátorů (Hondares, Iglesias et al. 2011). Překvapivě jsme nenašli spojení mezi sérovými hladinami FGF21 a volnými metanefriny v plazmě či jednotlivými fenotypy. V naší studii jsme využili volné metanefriny v plazmě, které jsou

zlatým standardem při diagnostice PPGL. Jsou kontinuálně produkovány nádorovými buňkami PPGL nezávisle na sekreci katecholaminů, a proto nereflektují biochemickou aktivitu nádorů. Domníváme se, že tento jev by mohl vysvětlit slabou spojitost mezi FGF21 a noradrenergickým fenotypem v této části studie.

Mráz se spolupracovníky ukázali, že exprese FGF21 v lidských játrech byla více než 100násobná ve srovnání s bílou tukovou tkání, což naznačuje, že játra jsou primárním zdrojem FGF21 u člověka (Mráz, Bártlová et al. 2009). Zvýšená produkce FGF21 játry byla spojena s obezitou, DM2T nebo metabolickým syndromem (Zhang, Yeung et al. 2008, Mráz, Bártlová et al. 2009, Semba, Sun et al. 2012). Naše studie ukazuje podobné spojitosti. Obézní pacienti s metabolickým syndromem měli vyšší sérové hladiny FGF21, které zároveň korelovaly s BMI a hladinou glykémie na lačno. U našich pacientů s PPGL byly výsledky podobné, ačkoliv jejich hodnoty BMI byly nižší. Otázkou zůstává, zdali je to hyperglykémie, kdo vyvolává nadprodukcí FGF21 u pacientů s PPGL. Podle dostupných studií je možné lidské sérové hladiny FGF21 zvýšit infúzí glukózy (Lin, Gong et al. 2012, Dushay, Toschi et al. 2015, Vienberg, Jacobsen et al. 2017) a 24hodinovou hyperglykémií udržovanou intravenózní infúzí glukózy (von Holstein-Rathlou, BonDurant et al. 2016). Na druhou stranu R.J. Samms se spolupracovníky ukázali, že inzulin více než glukóza zvyšuje celkový a bioaktivní FGF21 v postprandiálně období u dospělých s i bez DM během funkčních testů (Samms, Lewis et al. 2017). V naší skupině pacientů s PPGL byly naměřeny hodnoty inzulinu signifikantně nižší než u obézních a hubených kontrol. U pacientů s PPGL je inzulinová sekrece ovlivněna inhibičním efektem katecholaminové nadprodukce pomocí α -adrenergických receptorů v β -buňkách pankreatu (Colwell 1969, Isles and Johnson 1983, Cryer 1993). H. Komada s kolegy prokázali u pacientů s PPGL poruchu inzulinové sekrece především v časné fázi (Komada, Hirota et al. 2017). Naše práce ukazují, že metabolické změny u PPGL jsou částečně reverzibilní. Rok po odstranění tumoru jsme prokázali zlepšení v metabolismu glukózu a inzulinové rezistence doprovázející pokles v sérových hladinách FGF21 i přes signifikantní nárůst na váze u našich pacientů.

Naše studie s tukovou tkání má následující limitace. Zaprvé, obě vyšetřované skupiny obsahovaly jedince s obezitou i nadváhou, což jsou stavy, které jsou samy o sobě spojené s přestavbou tukové tkáně. Zadruhé, vzorky VAT nebyly odebrány ze stejných oblastí. Retroperitoneální tuková tkáň obsahuje fyziologicky více hnědé tukové tkáně, zatímco omentální ji obsahuje minimálně nebo vůbec, a to jak ve zdraví, tak nemoci. Jsme si tohoto

faktu vědomi a snažili jsme se vyhnout nepřesným srovnáním. Nemůžeme taktéž vyloučit vliv užívané medikace, procesu odběru tukové tkáně a odlišné teploty v daném období. Dále musíme brát také v úvahu, že genová exprese neodpovídá striktně výsledné proteosyntéze.

Rozsah koncentrace FGF21 v séru dospělých jedinců je široký, což dělá jeho interpretaci složitou. Taktéž nemůžeme v této části práce vyloučit vliv užívané medikace. V naší studii jsme měřili celkový FGF21, a ne jeho bioaktivní formu. Feochromocytom je onemocnění vzácné a počet pacientů limituje interpretaci statistických testů nebo jejich provedení. Tato obtíž nastává především při analýzách podskupin.

8. Závěry

Naše práce přináší nové poznatky ohledně tukové tkáně a cirkulujících adipokinů, především FGF21, u pacientů s feochromocytomem. Zároveň rozšiřujeme znalosti ohledně dlouhodobého působení katecholaminů na metabolismus.

Ve vzorcích retroperitoneální VAT pacientů s PPGL ve srovnání s omentální VAT kontrol jsme prokázali známky UCP1-mediované noradrenalinem indukované termogeneze s vyšší expresí genu *DIO2*. Zároveň jsme prokázali v této tkáni pacientů s PPGL vyšší mRNA expresi klíčových transkripčních faktorů adipogeneze BAT/BeAT a to *PPARGC1A*, *CEBPB* a *PRDM16*. Překvapivě jsme neprokázali klasický zvířecí model genové exprese BAT ani BeAT ve vzorcích VAT pacientů s PPGL. Na otázku, zdali u pacientů s PPGL převládá výskyt BAT nebo BeAT proto nedokážeme jednoznačně odpovědět. V SAT pacientů s PPGL jsme našli známky možné transformace v BeAT, ale bez známek současně probíhající UCP1-mediované termogeneze. Současně rozšiřujeme znalosti o možných endokrinních funkcích termogenní tukové tkáně o působení adiponektinu a visfatinu. Nenašli jsme jasnou korelaci mezi zmíněnou genovou expresí a hypermetabolismem či jedním ze sledovaných katecholaminových fenotypů.

Dále jsme prokázali, že pacienti s PPGL mají vyšší cirkulující hladiny FGF21 ve srovnání s kontrolami a po adrenalectomii dochází k jejich poklesu. Zvýšené hladiny FGF21 byly zvláště evidentní u pacientů s DM a byly pozitivně spojené s hladinami glykémie na lačno a BMI u těchto pacientů. Důsledky elevace FGF21 u pacientů s PPGL jsou nejasné. Nemůžeme z naší práce říct, zdali jsou zvýšené hodnoty důsledkem kontroverzní "FGF21 rezistence" nebo zdali má FGF21 specifický metabolický efekt. Domníváme se, že hladiny FGF21 u pacientů s PPGL jsou biologicky signifikantní a odráží metabolické abnormality

asociované s diabetem mellitus a metabolickým syndromem. Spojení mezi sérovými hladinami FGF21 s hypermetabolismem jsme nenašli.

Nenašli jsme u pacientů s PPGL rozdíl v cirkulujících hladinách rezistinu, NGAL, adiposinu nebo PAI-1. Možné změny tkáňových koncentrací s převládajícími parakrinními účinky vyloučit ale nemůžeme, což dokládá první část práce, která zahrnovala mj. adiponektin.

9. Použitá literatura

Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev **84**(1): 277-359.

Colwell, J. A. (1969). "Inhibition of insulin secretion by catecholamines in pheochromocytoma." Ann Intern Med **71**(2): 251-256.

Cryer, P. E. (1993). "Adrenaline: a physiological metabolic regulatory hormone in humans?" Int J Obes Relat Metab Disord **17 Suppl 3**: S43-46; discussion S68.

Dushay, J. R., E. Toschi, E. K. Mitten, F. M. Fisher, M. A. Herman and E. Maratos-Flier (2015). "Fructose ingestion acutely stimulates circulating FGF21 levels in humans." Mol Metab **4**(1): 51-57.

Hondares, E., J. M. Gallego-Escuredo, P. Flachs, A. Frontini, R. Cereijo, A. Goday, J. Perugini, P. Kopecky, M. Giralt, S. Cinti, J. Kopecky and F. Villarroya (2014). "Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue." Metabolism **63**(3): 312-317.

Hondares, E., R. Iglesias, A. Giralt, F. J. Gonzalez, M. Giralt, T. Mampel and F. Villarroya (2011). "Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue." J Biol Chem **286**(15): 12983-12990.

Isles, C. G. and J. K. Johnson (1983). "Pheochromocytoma and diabetes mellitus: further evidence that alpha 2 receptors inhibit insulin release in man." Clin Endocrinol (Oxf) **18**(1): 37-41.

Komada, H., Y. Hirota, A. So, T. Nakamura, Y. Okuno, H. Fukuoka, G. Iguchi, Y. Takahashi, K. Sakaguchi and W. Ogawa (2017). "Insulin Secretion and Insulin Sensitivity Before and After Surgical Treatment of Pheochromocytoma or Paraganglioma." J Clin Endocrinol Metab **102**(9): 3400-3405.

Leiphart, C. J. and E. J. Nudelman (1970). "Hibernoma masquerading as a pheochromocytoma. A case report." Radiology **95**(3): 659-660.

Lenders, J. W., G. Eisenhofer, M. Mannelli and K. Pacak (2005). "Pheochromocytoma." Lancet **366**(9486): 665-675.

Lin, Z., Q. Gong, C. Wu, J. Yu, T. Lu, X. Pan, S. Lin and X. Li (2012). "Dynamic change of serum FGF21 levels in response to glucose challenge in human." J Clin Endocrinol Metab **97**(7): E1224-1228.

Mráz, M., M. Bártlová, Z. Lacinová, D. Michalský, M. Kasalický, D. Haluzíková, M. Matoulek, I. Dostálová, V. Humeňanská and M. Haluzík (2009). "Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity." Clin Endocrinol (Oxf) **71**(3): 369-375.

Petrák, O., D. Haluzíková, P. Kaválková, B. Štrauch, J. Rosa, R. Holaj, A. Brabcová Vránková, D. Michalský, M. Haluzík, T. Zelinka and J. Widimský, Jr. (2013). "Changes in energy metabolism in pheochromocytoma." J Clin Endocrinol Metab **98**(4): 1651-1658.

- Samms, R. J., J. E. Lewis, L. Norton, F. B. Stephens, C. J. Gaffney, T. Butterfield, D. P. Smith, C. C. Cheng, J. W. Perfield, 2nd, A. C. Adams, F. J. P. Ebling and K. Tsintzas (2017). "FGF21 Is an Insulin-Dependent Postprandial Hormone in Adult Humans." J Clin Endocrinol Metab **102**(10): 3806-3813.
- Semba, R. D., K. Sun, J. M. Egan, C. Crasto, O. D. Carlson and L. Ferrucci (2012). "Relationship of serum fibroblast growth factor 21 with abnormal glucose metabolism and insulin resistance: the Baltimore Longitudinal Study of Aging." J Clin Endocrinol Metab **97**(4): 1375-1382.
- Vienberg, S. G., S. H. Jacobsen, D. Worm, L. E. Hvolris, L. Naver, T. Almdal, D. L. Hansen, B. S. Wulff, T. R. Clausen, S. Madsbad, J. J. Holst and B. Andersen (2017). "Increased glucose-stimulated FGF21 response to oral glucose in obese nondiabetic subjects after Roux-en-Y gastric bypass." Clin Endocrinol (Oxf) **86**(1): 156-159.
- von Holstein-Rathlou, S., L. D. BonDurant, L. Peltekian, M. C. Naber, T. C. Yin, K. E. Claflin, A. I. Urizar, A. N. Madsen, C. Ratner, B. Holst, K. Karstoft, A. Vandenbeuch, C. B. Anderson, M. D. Cassell, A. P. Thompson, T. P. Solomon, K. Rahmouni, S. C. Kinnamon, A. A. Pieper, M. P. Gillum and M. J. Potthoff (2016). "FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver." Cell Metab **23**(2): 335-343.
- Zhang, X., D. C. Yeung, M. Karpisek, D. Stejskal, Z. G. Zhou, F. Liu, R. L. Wong, W. S. Chow, A. W. Tso, K. S. Lam and A. Xu (2008). "Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans." Diabetes **57**(5): 1246-1253.

10. Publikace autora

Publikace autora, které jsou podkladem pro disertaci a k tématu disertace

- FGF21 Levels in Pheochromocytoma/Functional Paraganglioma; Klímová J., Zelinka T., Rosa J., Štrauch B., Haluzíková D., Haluzík M., Holaj R., Krátká Z., Kvasnička J., Ďurovcová V., Matoulek M., Novák K., Michalský D., Widimský J. Jr., Petrák O.; *Cancers* (Basel). 2019 Apr 5;11(4). pii: E485. doi: 10.3390/cancers11040485; IF = 6.126 (2019)
- V recenzentním řízení *Endocrine connections: Gene profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of patients with pheochromocytoma*; Klímová J., Mráz M.; Kratochvílová H.; Lacinová Z.; Novák K.; Michalský D.; Kvasnička J.; Holaj R.; Haluzíková D.; Petráková Doležalová R.; Haluzík M.; Zelinka T.; Petrák O.
- *Pheochromocytoma With Adrenergic Biochemical Phenotype Shows Decreased GLP-1 Secretion and Impaired Glucose Tolerance*; O. Petrák, J. Klímová, M. Mráz, D. Haluzíková, R. Petráková Doležalová, H. Kratochvílová, Z. Lacinová, K. Novák, D. Michalský, P. Waldauf, R. Holaj, J. Widimský, T. Zelinka, M. Haluzík; *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2020 Jun 1;105(6):dgaa154. doi: 10.1210/clinem/dgaa154; IF = 5.399 (2019)

- Blood Pressure Profile, Catecholamine Phenotype, and Target Organ Damage in Pheochromocytoma/Paraganglioma; Petrák O., Rosa J., Holaj R., Štrauch B., Krátká Z., Kvasnička J., Klímová J., Waldauf P., Hamplová B., Markvartová A., Novák K., Michalský D., Widimský J., Zelinka T.; J Clin Endocrinol Metab. 2019 Nov 1;104(11):5170-5180. doi: 10.1210/jc.2018-02644; IF = 5.399 (2019)

Publikace autora bez vztahu k tématu disertace

- Fixní kombinace v sekundární prevenci kardiovaskulárních onemocnění; Klímová J.; Farmakoterapie 2019;15(1):93–96.
- Predikce dlouhodobé účinnosti renální denervace; Kvasnička J., Lambert L., Waldauf P., Zelinka T., Petrák O., Štrauch B., Holaj R., Indra T., Krátká Z., Klímová J., Václavík J., Kociánová E., Nykl I., Jiravský O., Rappová G., Táborský M., Branny M., Widimsky J., Rosa J.; Cor Vasa 2019;61:e378–e384