

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Autoreferát disertační práce

Nutriční faktory v rozvoji inzulínové rezistence
kosterního svalu

Nutritional Factors in Skeletal Muscle Insulin Resistance Development

MUDr. Jan Gojda

Školitel: Prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady: Fyziologie a patofyziologie člověka, Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Centrum pro výzkum diabetu, metabolismu a výživy a II. Interní klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

Autor: MUDr. Jan Gojda

Školitel: prof. MUDr. Michal Anděl, CSc., Centrum pro výzkum diabetu, metabolismu a výživy 3. lékařské fakulty a II. Interní klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Školitel konsultant: doc. MUDr. Pavel Těšínský

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM 0021620814, PRVOUK P3 a IGA NT 14416.

Obsah

SOUHRN	4
SUMMARY	5
LITERÁRNÍ ÚVOD	6
CÍLE ŘEŠENÍ	7
METODOLOGIE	8
VÝSLEDKY	12
DISKUZE	20
ZÁVĚR	24
IMPLIKACE PRO DIETOLOGII	24
REFERENCE	26
PUBLIKAČNÍ AKTIVITA	32
SEZNAM ZKRATEK	35

Souhrn

Úvod. Strava se řadí mezi významné environmentální faktory rozvoje inzulinové rezistence (IR) a diabetu. Lidé stravující se výlučně rostlinnou stravou (vegani) mají nižší incidenci chorob asociovaných s IR a představují tak vhodný model pro studium vlivu nutričních faktorů na rozvoj IR. Mezi tyto faktory lze zařadit také aminokyseliny s větveným řetězcem (BCAA).

Cíle a hypotézy. Cílem observační studie bylo potvrdit lepší glukózovou homeostázu veganů a validovat model „vegan vs. omnivor“. Následující intervenční studie měla za cíl prokázat na tomto modelu, že dietní intervence BCAA povede ke skupinově specifickým posunům v parametrech funkce inzulínu.

Metodologie. Do observační studie bylo zařazeno 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Byla provedena vyšetření: hyperinzulinemický euglykemický clamp (HEC) a svalová biopsie (množství intramyocelulárních lipidů (IMCL), množství mtDNA a aktivita citrát syntázy (CS)). Do druhé studie bylo zařazeno 8 veganů a 8 kontrol, kteří byli intervenováni 15, resp. 20 g BCAA denně po dobu 3 měsíců. Vyšetření bylo provedeno vstupně (baseline), následně po intervenci (intervence) a po 6 měsíční vymývací periodě (wash-out): antropometrie, HEC, argininový test, svalové (SM) biopsie (aktivita CS, aktivity komplexů dýchacího řetězce, genové exprese) a tukové (AT) biopsie (genová exprese).

Výsledky. V observační studii se nám podařilo prokázat, že vegani mají signifikantně vyšší odsun glukózy v HEC (M-hodnota, vegan 8.11 ± 1.51 vs. omnivor 6.31 ± 1.57 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p=0.014$). Obsah IMCL, mtDNA a CS v SM nebyl mezi skupinami signifikantně rozdílný. Intervence BCAA vedla ve skupině veganů ke zhoršení odsunu glukózy, který se normalizoval po wash-out periodě (M-hodnota: baseline 9.63 vs. intervence 7.99 vs. wash-out 9.64 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p < 0.05$). V omnivorní skupině tento efekt pozorován nebyl, naopak u nich po intervenci došlo ke zvýšení exprese lipogenních genů (DGAT-2, FASN) v AT.

Závěr. Vegani mají vyšší inzulinovou senzitivitu, která však nekoreluje se změnami na úrovni kosterního svalu. Dlouhodobá intervence BCAA indukuje IR u veganů, u omnivorů tento efekt patrný není, ale dochází ke zvýšení lipogenní aktivity tukové tkáně. Proto lze předpokládat, že navyšování BCAA nad úroveň běžnou pro omnivorní dietu již k negativním posunům v celotělovém odsunu glukózy nevede, a to pravděpodobně díky kompenzačním změnám metabolismu tukové tkáně.

Klíčová slova: *inzulín, inzulinová rezistence, větvené aminokyseliny, vegan*

Summary

Background. Diet composition ranks among etiological factors of insulin resistance (IR) and diabetes. Vegans, people consuming exclusively plant-based diet, have significantly lower prevalence of IR and thus represent a suitable model population for study of nutritional factors on IR development. Branched chain amino acids (BCAA) ranks among these factors.

Aims and hypothesis. Aim of the observational study was to prove that vegans have better glucoregulatory functions and thus to validate “vegan vs. omnivore” model. Aim of the consecutive interventional study was to prove in this model that dietary intervention with BCAA leads to a group specific changes in the insulin function measures.

Methods. 11 vegans and 10 omnivorous controls were recruited in the observational study. Hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC) and muscle (SM) biopsies (amount of intramyocellular lipids (IMCL), mtDNA and the activity of citrate synthase (CS)) were performed. 8 vegans and 8 omnivores were consequently subjected to the intervention with 15 or 20 g of BCAA respectively. The examination was performed at the baseline, after the intervention and after 6 months wash-out period: anthropometry, HEC, arginine test, SM biopsy (CS, activity of respiratory chain complexes, gene expression) and fat (AT) biopsy (gene expression) were performed.

Results. We proved in the observational study that vegans have higher glucose disposal in HEC (M-value vegan 8.11 ± 1.51 vs. omnivores 6.31 ± 1.57 mg.kg⁻¹.min⁻¹, $p = 0.014$). IMCL content as well as mtDNA and CS did not differ. In vegans the intervention resulted in a deterioration in the glucose disposal, that normalized after the wash-out period (M value: baseline 9.63 vs intervention 7.99 vs. washout 9.64 mg.kg⁻¹.min⁻¹, $p < 0.05$). In the omnivores this effect was not observed but we observed an increase in the expression of lipogenic genes (DGAT-2, FASN) in AT after the intervention.

Conclusion. Vegans have higher insulin sensitivity, which does not correlate with changes at the level of SM. Supplementation with BCAA leads to a deterioration in an insulin sensitivity in vegans. In omnivores the effect was not observed, but the intervention was associated with increased lipogenic activity of AT. Therefore it can be assumed that increasing the BCAA intake over the average omnivorous intake does not have a negative impact on whole-body glucose disposal, probably due to compensatory changes in the metabolism of AT.

Key words: *insulin, insulin resistance, branched chain amino acids, vegan*

Literární úvod

Choroby asociované s inzulínovou rezistencí (IR), obezita a diabetes 2. typu (T2DM) jsou rizikovými faktory rozvoje aterosklerózy a jejích komplikací a podílejí se tak významnou měrou na kardiovaskulární mortalitě ve vyspělých zemích. Prevalence diabetu je na vzestupu a dosahuje již pandemických rozměrů. V České republice očekáváme, že do roku 2035 bude diabetem trpět každý desátý obyvatel.

Existuje celá řada kandidátních environmentálních faktorů, které mohou mít vliv na rozvoj T2DM. Mezi ně se dá zařadit také skladba potravy. V minulosti bylo prokázáno, že prevalence T2DM je nižší v populaci vegetariánů než v populaci stravující se bez omezení (Aune et al. 2009; Tonstad et al. 2009), stejně jako mortalita na kardiovaskulární onemocnění (Key et al. 1998). Mezi vegany je více než dvojnásobně nižší zastoupení diabetiků 2. typu. (Tonstad et al. 2011). Naopak skupiny populace s vysokým příjmem masa mají větší prevalenci T2DM (Aune et al. 2009). V souladu s těmito pozorováními pak intervenční studie u pacientů s T2DM, ve kterých byla veganská, resp. lakto-ovo-vegetariánská strava porovnávána s konvenční diabetickou dietou (při srovnatelné fyzické aktivitě), prokázaly snížení hmotnosti, zlepšení kompenzace diabetu, zlepšení lipidového spektra (Kahleova et al. 2011; Huang et al. 2016) a dokonce snížení parametrů oxidačního stresu a zlepšení IR (Kahleova et al. 2011).

Jedním ze substrátů, který je v literatuře spojován s inzulín rezistentními stavy jsou aminokyseliny (AA) s větveným řetězcem (branched chain amino acids, BCAA), leucin, valin a izoleucin. BCAA jsou esenciální AA, které buňky lidského organismu nemohou syntetizovat a jsou tedy závislé na jejich exogenní dodávce. Kromě strukturální podobnosti uhlíkatého skeletu, BCAA také sdílejí zčásti stejný metabolický osud a jejich plazmatické hladiny jsou synchronizovaně elevovány v řadě klinických stavů, fyzické aktivitě, lačnění (Nair et al. 1987), ale právě také IR a diabetu (Cole 2015).

Asociace mezi vyšší hladinou BCAA a IR je popsána již přes třicet let (Felig et al. 1969) a dále byla potvrzena (Kamaura et al. 2010). Cirkulující hladiny BCAA predikují riziko rozvoje T2DM dokonce 12 let před jeho projevením (Wang et al. 2011). Kauzalita mezi příjmem BCAA a jejich vyššími hladinami však není jasná. Na jednu stranu jsou BCAA esenciálními AA a organismus je zřejmě závislý na jejich příjmu (Kohlmeier 2015). Složení dietního proteinu má u zdravé populace rozhodující dopad na koncentrace BCAA (Nilsson et al. 2004). Možná kauzální souvislost mezi dietním příjmem BCAA a rozvojem IR byla popsána v intervenční studii na krysách (Newgard et al. 2009), kdy vyšší obsah BCAA ve vysoko-tukové dietě

indukoval vyšší IR. Obdobně akutní intervence infúzním roztokem AA/BCAA moduluje u lidí odsun glukózy do kosterního svalu (Everman et al. 2015; Robinson et al. 2014). Na druhou stranu však observační data z longitudinálních studií nepodporují hypotézu, že by u IR subjektů byl vyšší příjem BCAA (Wang et al. 2011).

Za vyšší hladiny BCAA by tak mohl být zodpovědný jejich snížený odsun a degradace v tukové a svalové tkáni. Bylo prokázáno, že exprese genů prvních klíčových enzymů odpovědných za katabolismus BCAA (dehydrogenáza větvených ketokyselin, BCKDH), je v tukové tkáni (AT) IR subjektů down-regulována (Lu et al. 2013). Právě AT byla recentně ustavena jako významný hráč v celotělovém metabolismu BCAA. AT je jednou z hlavních tkání, která vychytává exces BCAA, který není využit v periferních tkáních. Uhlíkatý skelet derivovaný deaminací BCAA slouží v AT jako prekurzor pro de novo lipogenezu. Až 30 % lipogenního acetyl CoA v AT je původem z BCAA (Green et al. 2016). Nižší kapacita AT pro metabolismus BCAA byla navržena jako možný spojující mechanismus mezi IR a vyššími hladinami BCAA (Herman et al. 2010).

Data o chronické expozici BCAA u lidí jsou stále omezená, což znemožňuje ustanovit kauzalitu, tedy zda dietní přívod BCAA je sám o sobě dostačující k indukci IR, či zda jsou vyšší hladiny BCAA pouze odrazem vyšší endogenní produkce.

Cíle řešení a hypotézy

1/ Východiska observační studie. Populace veganů s extrémně odlišným způsobem příjmu nutrientů by mohla představovat unikátní model pro studium iniciálního zhoršování IS ve vztahu k dietním faktorům. Pokud by se nám podařilo verifikovat a zpřesnit nálezy dostupných studií a potvrdit, že vegani mají vyšší citlivost na inzulín, mohl by se model „vegan vs. omnivor“ zařadit mezi další standardní modelové populace v diabetologickém výzkumu.

Primární hypotéza. Populace veganů má vyšší inzulínovou senzitivitu (stanovenou pomocí HEC) a tomu odpovídající vyšší mitochondriální denzitu (jako ukazatel mitochondriální biogeneze) a nižší obsah IMCL v SM.

Sekundární hypotézy. Vegani mají nižší sérové koncentrace BCAA a mají příznivější profil sérových lipidů a spektra volných mastných kyselin. Vegani mají příznivější parametry glukózové a lipidové homeostázy. Dále mají vegani nižší tělesné zásoby železa.

2/ *Východiska intervenční studie.*

Předpokládáme, že významným nutričním faktorem, který odlišuje veganskou stravu, je nižší příjem BCAA. S ohledem na četné biologické funkce BCAA lze předpokládat, že právě nižší příjem BCAA může mít dopad na rozdílnou metabolickou kondici lidí na čisté rostlinné stravě. Navýšení podílu BCAA ve veganské stravě by mohlo modulovat parametry inzulínové citlivosti veganské populace ve směru populace stravující se bez omezení (omnivorů).

Primární hypotéza. Suplementace BCAA povede u veganů ke zhoršení odsunu glukózy v clam-povém vyšetření. V omnivorní skupině nepovede suplementace BCAA k žádným změnám.

Sekundární hypotézy. Suplementace BCAA povede u veganů ke zhoršení parametrů respirace v kosterním svalu, a tomu odpovídajícím změnám v genové expresi (zvýšení katabolismu BCAA, snížení inzulínové signalizace). V tukové tkáni veganů povede suplementace ke zvýšení genové exprese ve smyslu katabolismu BCAA, zhoršení inzulínové signalizace a zvýšení lipolýzy.

Metodologie

Do *observační studie* byl zařazen soubor 11 veganů (výlučně stravující se s úplným vyloučením živočišných produktů déle než 3 roky) a 10 omnivorních subjektů (stravující se běžnou stravou a denně konzumující masné a mléčné produkty). Kontrolní skupina byla postavena tak, aby studované skupině odpovídala v parametrech taktéž asociovaných s IS (věk, pohlaví, BMI, míra fyzické aktivity, kalkulovaný proteino-energetický příjem). Do studie nebyly zařazeny subjekty, jejichž věk je pod 18 let, které trpí chronickými chorobami (zejména diabetem, obezitou, tyreopatiemi, chorobami nadledvin apod.) či užívající chronickou medikaci se známým vlivem na energetický metabolismus. Vyloučeny byly také subjekty s rodinou zátěží T2DM (T2DM v příbuzenstvu první linie), kouřením a pravidelnou konzumací alkoholu. Zařazeny také nebyly subjekty, u kterých byl kontraindikován odběr svalové tkáně.

Do *intervenční studie* bylo rekrutováno 8 veganů (déle než 3 roky na exkluzivní veganské dietě) a 8 kontrolních omnivorních subjektů. Kritéria pro výběr omnivorních kontrol odpovídala kritériím užitým v observační studii. Intervence představovala suplementaci BCAA v dávce 15 gramů (ženy) či 20 gramů (muži). Použit byl komerčně dostupný preparát, který je vyroben bez živočišných produktů (BCAA 4:1:1 Fair Power[®], Survival Nutrition Supplements, Czech Rep.).

Každý subjekt splňující kritéria pro zařazení do projektu byl informován o povaze protokolu a podepsal informovaný souhlas. Design studie, jakož i informovaný souhlas byl schválen etickými komisemi 3. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Intervenční studie byla registrována na veřejném registru clinicaltrials.gov, identifikátor: NTC02684929.

Klinické vyšetření a antropometrie. Každý zařazený dobrovolník podstoupil úvodní lékařské vyšetření. U každého subjektu byla provedena základní antropometrická vyšetření. Složení tělesných kompartmentů bylo měřeno pomocí bioimpedanční analýzy za použití multifrekvenční BIA (Nutrigoard-M, Data Input GmbH, Frankfurt, Germany).

Hodnocení dietního příjmu. Od každého participanta byl získán vyplněný prospektivní dotazník 3- denního příjmu (2 všední dny, 1 víkendový den). K hodnocení nutričního příjmu bylo použito programu Nutridan. Zvláště byl vypočítán průměrný příjem energie, příjem sacharidů (mono a disacharidů, polysacharidů), množství proteinů a lipidů. Data z dotazníků byla dále využita k odhadu podílu BCAA (Souci et al. 2000).

Hodnocení fyzické aktivity. Fyzická aktivita byla hodnocena za pomoci Baeckeho dotazníku fyzické aktivity (Baecke et al. 1982). Maximální zátěžový test byl proveden u každého ze subjektů zařazených do intervenční studie. Bylo užito bicyklového ergometru (Ergoline 800, Bitz, Germany). Iničiální zátěž 50 W byla zvyšována o 25 W každou minutu do plného vyčerpání subjektu. Analýza plynů ve vydechované směsi byla měřena za pomoci Vmax, Sensor Medics (Yorba Linda, CA).

Analýzy ze séra. Ráno po 12-ti hodinovém lačnění byl vyšetřovaným subjektům proveden odběr venózní krve. Bylo provedeno základní biochemické a hematologické vyšetření. Ukazatele glukózové homeostázy: sérové hladiny glukózy, C-peptidu, HbA1c, inzulínu. Parametry metabolismu vápníku: sérové hladiny Ca, P, PTH. Parametry metabolismu železa: sérové hladiny Fe, ferritin, transferrin, V_kFe. Lipidové spektrum: sérové hodnoty celkového cholesterolu, triglyceridů, apo A1, apo B, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterol byl kalkulován Friedewaldovou rovnicí.

Sérové hladiny BCAA. V rámci řešení projektu byla vyvinuta a do experimentální praxe zavedena metoda stanovení BCAA pomocí bezkontaktní vodivostní kapilární elektroforózy (CE). Pro detailní popis vývoje a zavádění metody odkazujeme na příložený autorský článek (Tůma a Gojda 2015).

Pro stanovení *hladiny sérového hepcidinu a prohepcidinu* byly použity komerční ELISA kity EIA-4644 a EIA-5258 (DRG Instruments GmbH, Germany).

Inzulínová citlivost. Citlivost na inzulín byla stanovována pomocí 2-hodinového hyperinzulinemického euglykemického clampu (DeFronzo et al. 1979). Ke kalkulacím byla použita průměrná rychlost perfúze roztoku glukózy z pěti konsektivních měření po dobu 30 minut na vrcholu clampu. Výpočet inzulínové senzitivity na dané hladině inzulínu byl potom dán množstvím infundované glukózy za jednotku času vztažené na tělesnou hmotnost (M-hodnota, g/min/kg) po korekcích na změnu poolu glukózy v extracelulární tekutině (space correction).

Sekrece inzulínu. Sekrece inzulínu byla hodnocena pomocí intravenózního argininového testu za použití již popsaného protokolu (Palmer et al. 1976). Akutní inzulínová odpověď byla vyjádřena jako inkrementální plocha pod křivkou (iAUC), kalkulována za pomoci trapezoidálního modelu.

Biopsie kosterního svalu. Každý subjekt v observační studii a ve studii intervenční (před a po intervenci) podstoupil punkční svalovou biopsii m. vastus lateralis. Byla použita popsaná metoda odběru Bergströmovou jehlou (Gojda et al. 2015).

Biopsie podkožní tukové tkáně. Biopsie podkožní AT byla provedena u každého subjektu zařazeného do intervenční studie spolu s biopsií kosterního svalu. Bylo užito Bergströmovy metody (Alderete et al. 2015). Podkožní tuk se odebíral z periumbilikální oblasti.

Mitochondriální denzita kosterního svalu. Aktivita CS byla stanovena podle standardního protokolu s využitím komerčně dostupného kitu (Sigma, CS0720). Relativní množství mtDNA ve vzorku bylo stanoveno pomocí kvantitativní PCR (Gojda et al. 2013).

Aktivita komplexů dýchacího řetězce. Enzymatické aktivity jednotlivých komplexů dýchacího řetězce (I-IV) a citrát syntázy (CS) byly měřeny spektrofotometricky ve svalových homogenátech. Homogenáty byly připraveny podle publikovaného protokolu (Spinazzi et al. 2012). Aktivita komplexů I-IV a CS byla stanovena podle publikovaných protokolů (Spinazzi et al. 2012), které byly modifikovány pro měření v destičkovém spektrofotometru (Infinite M200 PRO, Tecan) v objemu 200 μ l.

Kvantitativní real time PCR (RT-qPCR). Celková RNA ze tkáně (SAAT, SM) byla izolována za použití komerčně dostupných kitů Lipid Tissue and Fibrous Tissue RNeasy Mini Kits (Qiagen, Germany). Koncentrace RNA byla měřena pomocí Nanodrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). K real time PCR reakci byly využity kity Fast Advanced master mix and Gene

expression assay (IRS1, GLUT4, BCKDHA, BCKDHB, ACOX, CPT1b, PLIN1, PLIN2, PLIN5, FASN, SCD1, DGAT2, PPAR- γ ; Applied Biosystems). V detailu zde (Gojda et al. 2017).

Lipidologické analýzy. *Mastné kyseliny v kosterním svalu* byly po extrakci a transesterifikaci analyzovány na plynovém chromatografu (GC) dle popsané metodiky (Gojda et al. 2013).

Plazmatické volné mastné kyseliny (FFA) byly extrahovány a esterifikovány. Analýzy byly prováděny na přístroji GC-17A verze 3 (Shimadzu, Japan) s FID detektorem. V detailech opět odkazujeme na autorské publikace (Gojda et al. 2013)

Statistické analýzy. Data jsou vyjádřena jako průměry \pm směrodatná odchylka (SD) a jako rozdíly průměrů s 95% konfidenčním intervalem pro rozdíl. Hladina významnosti $p < 0.05$ byla považována za signifikantní. *Observační* data byla testována na normalitu rozložení. Pro normálně distribuovaná data bylo pro testování signifikance mezi nezávislými skupinami užito Studentova t-testu, pro data, která nebyla distribuována normálně pak Wilcoxonova testu. Vztahy mezi proměnnými a změnami proměnných byly vyjádřeny za použití výpočtu Pearsonova korelačního koeficientu, resp. Spearmanova koeficientu pro nenormálně rozložená data. K analýzám byl použit software Statistica 9.0, StatSoft, Inc. USA. Longitudinální data *intervenční studie* byla analyzována pomocí mixed-effect (multilevel) regresního modelu. Fixní část modelu je vždy tvořena interakcí mezi skupinou a vizitou. Pro random part bylo pro každý parametr testováno několik modelů: lineární regrese (bez random part), random intercept, random slope bez a s covariance s random intercept a bez a s covariance mezi rezidui. Nejlepší model byl vybrán dle Bayesian information criterion (BIC) a dle likelihood ratio testu. Většina parametrů splňovala kritéria normálního rozložení dle Shapiro-Wilkova testu. Výstup z regresního modelu je u těchto parametrů prezentován jako rozdíl průměrů podskupin s 95% konfidenčním intervalem (CI). Některé parametry (zobrazeno v textu) jsou log-normálně rozložené. U těchto parametrů jsme provedli regresi na zlogaritmovaných hodnotách a rozdíl průměrů jsme zpětně exponenciovali. Tím jsme získali poměr geometrických průměrů, který je opět prezentován s 95% CI. Pro analýzy intervenční studie byl použit software Stata 14.2, StataCorp, LP, Texas, USA.

Výsledky

Observační studie

Základní charakteristiky souboru

Tabulka 1 Charakteristiky observačního souboru

	Vegan (n=11) průměr ± SD	Omnivor (n=10) průměr ± SD	P-hodnota
Věk (v letech)	30.30 ± 3.93	27.12 ± 1.10	0.023
Výška (m)	1.75 ± 0.09	1.77 ± 0.07	0.665
Váha (kg)	68.63 ± 14.02	73.15 ± 12.82	0.451
BMI (kg.m ⁻²)	22.15 ± 3.02	23.24 ± 2.89	0.412
WHR	0.86 ± 0.10	0.89 ± 0.14	0.583
Délka veganské diety (v letech)	8.05 ± 3.83		
Bioimpedance			
Tuková hmota (kg)	9.22 ± 6.03	11.98 ± 8.39	0.419
Netuková hmota (kg)	57.56 ± 13.38	62.01 ± 11.12	0.443
Viscerální tuk – US (cm)	4.11 ± 2.28	2.96 ± 1.1	0.181
Podkožní tuk – US (cm)	1.33 ± 0.63	2.09 ± 1.32	0.134
Fyzická aktivita			
Baecke score	9.89 ± 1.42	8.88 ± 1.12	0.090
Příjem makro nutrientů			
Celková energie (kcal)	2097.67 ± 531.2	2023.00 ± 563	0.771
Lipidy (%)	36.13 ± 7.65	42.31 ± 8.49	0.116
Sacharidy (%)	48.90 ± 10.57	40.39 ± 7.51	0.057
Proteiny (g)	74.78 ± 22.96	81.10 ± 19.63	0.526
Proteiny (%)	14.96 ± 5.08	17.31 ± 5.23	0.336

Porovnání rozdílů průměrných hodnot ± SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. * p<0.05, hranice statistické signifikance. BMI, body mass index; WHR, waist hip ratio, poměr obvodu pasu a boků; US, ultrazvuk.

Profil parametrů z periferní krve

Tabulka 2 Profil parametrů séra

	Vegan (n=11) průměr ± SD	Omnivor (n=10) průměr ± SD	P-hodnota
Lipidové spektrum			
Cholesterol (mmol.l ⁻¹)	3.48 ± 0.58	4.20 ± 0.88	0.038 *
HDL-cholesterol (mmol.l ⁻¹)	1.38 ± 0.37	1.66 ± 0.40	0.114
LDL-cholesterol (mmol.l ⁻¹)	1.81 ± 0.64	2.22 ± 0.68	0.167
Triglyceridy (mmol.l ⁻¹)	0.65 ± 0.26	0.72 ± 0.26	0.527
Volné mastné kyseliny (μg.ml⁻¹ plazmy)			
LA (C18:2n6cc)	40.57 ± 14.29	16.76 ± 8.08	0.001 *
ALA (C18:3n3)	2.18 ± 1.14	0.98 ± 0.64	0.009 *
EDA (C20:2n6)	1.67 ± 0.13	1.52 ± 0.10	0.009 *
DGLA (C20:3n6)	1.39 ± 0.13	1.24 ± 0.17	0.038 *
Celkové FFA	172.63 ± 78.43	119.58 ± 53.59	0.089
SFA	40.62 ± 18.97	39.18 ± 15.60	0.852
MUFA	85.08 ± 45.70	58.85 ± 30.81	0.144
PUFA	46.94 ± 15.67	21.85 ± 9.03	0.001 *
Metabolismus vitamínu B12			
Transkobalamin (ng.l ⁻¹)	186.6 ± 39.5	342.6 ± 172.9	0.012 *
Folát (μg.l ⁻¹)	10.23 ± 5.28	5.79 ± 2.28	0.02 *
Homocystein (μmol.l ⁻¹)	19.8 ± 7.87	13.7 ± 5.35	0.135
Kalcio-fosfátový metabolismus			
Vápník (mmol.l ⁻¹)	2.30 ± 0.16	2.27 ± 0.10	0.706
Fosfát (mmol.l ⁻¹)	0.99 ± 0.23	0.94 ± 0.20	0.724
Parathormon (pmol.l ⁻¹)	5.96 ± 2.31	6.47 ± 2.09	0.687
Metabolismus železa			
Železo (μmol.l ⁻¹)	21.8 ± 3.97	19.4 ± 8.62	0.546
VkFe (μmol.l ⁻¹)	59.3 ± 5.43	60.3 ± 7.99	0.809
Transferin (g.l ⁻¹)	2.58 ± 0.46	2.53 ± 0.32	0.849
Ferritin (μg.l ⁻¹)	68.42 ± 41.59	53.7 ± 82.25	0.605
Hepcidin (ng.ml ⁻¹)	104.4 ± 19.1	122.4 ± 9.5	0.014 *
Prohepcidin (ng.ml ⁻¹)	495.7 ± 261.4	858.2 ± 689.6	0.121
Aminokyseliny s větveným řetězcem			
Leucín (μg.ml ⁻¹)	5,8 ± 1,5	5,8 ± 1,1	0,98
Izoleucín (μg.ml ⁻¹)	2,8 ± 1,2	3,3 ± 0,5	0,21
Valin (μg.ml ⁻¹)	8,9 ± 3,9	11,1 ± 1,4	0,09

Porovnání rozdílů průměrných hodnot ± SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. * p<0.05, hranice statistické signifikance. FA, mastné kyseliny; LA, linolová FA; ALA, alfa-linolenová FA; EDA, eikosadienová FA; DGLA, dihomogama-linolenová FA; FFA, free fatty acids, volné mastné kyseliny; SFA, saturevané FA; PUFA, polynenasycené FA; MUFA, mononenasycené FA. VkFe, vazebná kapacita pro železo.

Parametry glukózové homeostázy

Výsledky parametrů glukózové homeostázy shrnuje tabulka 3. V obou skupinách bylo dosaženo srovnatelných inzulinémií na vrcholu clampu a tyto byly postačující k supresi endogenní produkce inzulínu (data nezobrazena).

Tabulka 3 Parametry glukózové homeostázy observačního souboru

	Vegan (n=11)	Omnivor (n=10)	P-hodnota
	průměr ± SD	průměr ± SD	
Lačná glykémie (mmol.l ⁻¹)	4.82 ± 0.65	5.46 ± 0.69	0.040 *
Lačná inzulinémie (mU.l ⁻¹)	2.39 ± 1.01	4.07 ± 2.29	0.039 *
HbA1c (%)	3.5 ± 0.31	3.45 ± 0.32	0.722
M-hodnota (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	8.18 ± 1.62	6.36 ± 1.74	0.023 *
M-hodnota _{korigovaná} (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	8.11 ± 1.51	6.31 ± 1.57	0.014 *
MSM (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	3.51 ± 0.65	2.44 ± 0.90	0.006 *
Rovnovážné inzulinémie (mU.l ⁻¹)	31.98 ± 7.86	34.45 ± 8.46	0.497

Porovnání rozdílů průměrných hodnot ± SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. * p<0.05, hranice statistické signifikance. Odsun glukózy je vyjádřen jako M-hodnota; MSM, M-hodnota adjustovaná na celkové množství svalové hmoty hodnocené bioimpedancí.

Mitochondriální denzita a množství intramyocelulárních lipidů

Tabulka 4 Mitochondriální denzita a intramyocelulární lipidy

	Vegan (n=11)	Omnivor (n=10)	P-hodnota
	průměr ± SD	průměr ± SD	
Mitochondriální denzita			
Aktivita CS (μmol.g ⁻¹ .min ⁻¹)	18.43 ± 5.05	18.16 ± 5.41	0.906
mtDNA	1.36 ± 0.31	1.13 ± 0.36	0.135
Svalové lipidy (mg FA.g svalu⁻¹)			
Celkové IMCL	19.33 ± 11.53	27.81 ± 22.46	0.283

Porovnání rozdílů průměrných hodnot ± SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. * p<0.05, hranice statistické signifikance. CS, citráty syntáza; mtDNA, relativní copy number mitochondriální DNA; IMCL, intramyocelulárně deponované lipidy; FA, mastné kyseliny.

Intervenční studie

Subjekty

Charakteristiky souboru a jejich změny během intervence jsou shrnuty v tabulce 6. Omnivoři měli vyšší vstupní dietní příjem BCAA (BCAA: vegan 10.33 ± 2.3 vs. omnivor 16.5 ± 3.2 g, $p=0.03$). Vegani byli na výlučně veganské dietě 7.7 ± 3.8 let. Vegani se od omnivorních kontrol nelišili v míře fyzické aktivity (Beackeho skóre: vegan 9.6 ± 0.4 , vs. omnivor 9.8 ± 0.3 , $p=0.8$) a v celotělové aerobní kapacitě (VO_{2max} vegan 40.6 ± 2.2 , vs. omnivor 37.8 ± 2.8 ml.min⁻¹, $p=0.5$). Nebyly také zachyceny rozdíly ve vstupní hodnotě hladiny holotranskobalaminu: vegan 38.7 ± 23.0 , vs. omnivor 49.8 ± 19.3 pmol/l, $p=0.17$.

Tabulka 5 Charakteristiky intervenčního souboru a jejich vývoj během intervence

Parametr	Rozdíly mezi skupinami s 95% CI				Změny v rámci skupiny s 95% CI		
	Vizita	Vegan	Omnivor	Rozdíl [95% CI]	Vizita	Vegan	Omnivor
Váha (kg)	0 m	72.3 ± 13.2	75.3 ± 16.4	-3.0 [-16.2;10.3]			
	3 m	71.9 ± 12.8	74.9 ± 16.0	-3.0 [-16.3;10.3]	3-0 m	-0.48 [-2.0;1.1]	-0.45 [-2.0;1.2]
	9 m	71.7 ± 12.7	75.7 ± 15.3	-4.0 [17.2;10.3]	9-3 m	-0.1 [-1.6;1.4]	0.8 [-0.7;2.3]
WHR	0 m	0.9 ± 0.09	0.87 ± 0.05	0.03 [-0.04;1.0]			
	3 m	0.89 ± 0.08	0.92 ± 0.08	0.03 [-0.1;0.04]	3-0 m	0.0 [-0.06;0.05]	0.06 [-0.01;0.1]
	9 m	0.87 ± 0.1	0.9 ± 0.05	0.02 [-0.1;0.05]	9-3 m	0.02 [-0.07;0.03]	0.03 [-0.08;0.03]
BMI (kg.m ²)	0 m	23.5 ± 2.2	24.5 ± 4.9	-1.0 [-4.4;2.3]			
	3 m	23.5 ± 2.0	24.4 ± 4.8	-1.0 [-4.3;2.4]	3-0 m	0.03 [-0.6;0.6]	-0.1 [-0.7;0.5]
	9 m	23.4 ± 2.0	24.8 ± 4.6	-1.4 [-4.8;2.0]	9-3 m	0.04 [-0.6;0.6]	0.4 [-0.2;1.0]
Tuková hmota (%)	0 m	17.3 ± 7.8	16.6 ± 12.2	-1.7 [-11.3;8.0]			
	3 m	16.7 ± 7.5	17.0 ± 12.3	-2.6 [-12.1;6.9]	3-0 m	-0.7 [-2.2;0.8]	0.2 [-1.2;1.6]
	9 m	15.1 ± 6.9	17.2 ± 12.0	-3.7 [-12.9;5.5]	9-3 m	0.9 [-2.5;0.6]	0.2 [-1.2;1.6]
Celkový příjem kalorií (kcal.den ⁻¹)	0 m	1 715 ± 162	1 882 ± 682	-167 [-568;234]			
	3 m	1 721 ± 177	1 881 ± 507	-160 [-561;241]	3-0 m	6 [-94;106]	-1 [-101;99]
	9 m	1 769 ± 136	1 910 ± 593	-141 [-542;260]	9-3 m	48 [-52;148]	29 [-70;129]
Příjem proteinů (g.den ⁻¹)	0 m	62 ± 6	74 ± 14	-13[-30;5]			
	3 m	64 ± 13	78 ± 19	-14 [-31;4]	3-0 m	2 [-2;6]	3 [-1;7]
	9 m	65 ± 18	79 ± 21	-14[-31;4]	9-3 m	1.5 [-2;5]	1.0 [-3;5]

Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. Signifikance rozdílů jsou vyjádřeny jako 95% konfidenční interval (CI). BMI, body mass index; WHR, poměr obvodu pasu a boků.

Sérové hladiny BCAA

Tabulka 6 Hladiny větvených aminokyselin v séru a jejich vývoj během intervence

Parametr	Rozdíly mezi skupinami s 95% CI				Změny v rámci skupiny s 95% CI		
	Vizita	Vegan	Omnivor	Rozdíl [95% CI]	Vizita	Vegan	Omnivor
Leucin ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0 m	108.1 ± 25.6	122.9 ± 13.8	-14.8 [-35.2;5.7]			
	3 m	125.5 ± 28.8	129.4 ± 31.3	-3.9 [-24.4;16.6]	3-0 m	17.4 [4.6;30.1] *	6.5 [-6.2;19.2]
	9 m	104.4 ± 16.0	113.0 ± 9.4	-8.6 [-29.1;11.9]	9-3 m	-21.1 [-33.9;-8.4] *	-16.4 [-29.1;-3.6] *
Izoleucin ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0 m	53.5 ± 14.7	57.6 ± 7.7	-4.1 [-14.7;6.4]			
	3 m	50.1 ± 14.2	52.3 ± 14.4	-2.1 [-12.7;8.4]	3-0 m	-3.4 [-9.4;2.7]	-5.4 [-11.4;0.7]
	9 m	52.1 ± 8.1	55.0 ± 6.91	-2.9 [-13.4;7.7]	9-3 m	2.0 [-4.0;8.0]	2.8 [-3.3;8.8]
Valin ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0 m	181.5 ± 39.3	216.8 ± 26.2	-35.3 [-65.0;5.5]			
	3 m	180.8 ± 26.9	197.3 ± 46	-16.5 [-46.2;13.2]	3-0 m	-0.8 [-18.1;16.6]	-19.5 [-36.9;-2.1] *
	9 m	179.9 ± 28.9	194.8 ± 20.3	-14.9 [-44.6;14.9]	9-3 m	-0.9 [-19.9;14.9]	-2.5 [-19.9;14.9]

Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. Signifikance rozdílů jsou vyjádřeny jako 95% konfidenční interval (CI).

Glukózová homeostáza

Výsledky jsou přehledně zobrazeny v tabulce 8. M-hodnota v celém vzorku nekorelovala s hladinami rovnovážných inzulinémií ($R=0.05$, $p=0.73$).

Tabulka 7 Parametry glukózové homeostázy a jejich vývoj během intervence

Parametr	Rozdíly mezi skupinami s 95% CI				Změny v rámci skupiny s 95% CI		
	Vizita	Vegan	Omnivor	Rozdíl [95% CI]	Vizita	Vegan	Omnivor
Glykémie ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0 m	4.29 ± 0.2	4.31 ± 0.3	-0.03 [-0.31;0.26]			
	3 m	4.48 ± 0.4	4.65 ± 0.3	-0.2 [-0.48;0.14]	3-0 m	0.19 [0.0;0.38] *	0.33 [0.15;0.52] *
	9 m	4.79 ± 0.3	4.62 ± 0.4	0.2[-0.18;0.51]	9-3 m	0.31 [0.12;0.5] *	-0.03 [-0.21;0.16]
Inzulinémie ($\text{mU}\cdot\text{l}^{-1}$)	0 m	5.05 ± 2.53	4.36 ± 1.01	0.15 [-0.35;0.64] †			
	3 m	4.24 ± 1.49	5.69 ± 4.01	-0.18 [-0.67;0.31] †	3-0 m	-0.14 [-0.48;0.2]†	0.19 [-0.15;0.53] †
	9 m	4.58 ± 2.79	6.16 ± 3.94	-0.25 [-0.74;0.24] †	9-3 m	0.01 [-0.33;0.36] †	0.09 [-0.26;0.43] †
C-peptid ($\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0 m	316.6 ± 67.6	289.1 ± 76.5	27.5[-71.4;126.4]			
	3 m	285.8 ± 70.3	337.8 ± 139.9	-52.0 [-150.9;46.9]	3-0 m	-30.9 [-99.0;37.2]	48.6 [-19.6;116.7]
	9 m	307.6 ± 99.4	348.4 ± 158	-40.8 [-139.6;58.1]	9-3 m	21.9 [-46.2;90.0]	10.6 [-57.5;78.7]
HbA1c	0 m	32.75 ± 2.49	32.37 ± 4.75	0.38 [-2.97;3.72]			

(mmol.mol ⁻¹)	3 m	34.0 ± 1.93	32.13 ± 4.39	1.88 [-1.47;5.2]	3-0 m	1.25 [-0.07;2.57]	-0.25 [-1.57;1.07]
	9 m	33.25 ± 1.83	32.13 ± 5.0	1.13 [-2.22;4.47]	9-3 m	-0.75 [-2.07;0.57]	0 [-2.07;0.57]
M-hodnota (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	0 m	9.6 ± 2.4	7.1 ± 2.4	2.5 [0.25; 5.0] *	3-0 m	-1.64 [-2.5; -0.75] *	0.77 [-0.12;1.66]
	3 m	8.0 ± 3.1	7.9 ± 2.6	0.1 [-2.4; 2.6]	9-3 m	1.65 [0.75; 2.54] *	0.2 [-0.68;1.1]
	9 m	9.6 ± 2.5	8.1 ± 3.1	1.5 [-0.9; 4.0]			
MCR (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	0 m	11.22 ± 3.07	8.04 ± 2.7	3.19 [0.55;5.82] *	3-0 m	-3.18 [-4.27;-2.1]*	1.19 [0.1;2.28] *
	3 m	8.04 ± 3.30	9.23 ± 2.63	-1.19 [-3.98;1.6]	9-3 m	2.58 [1.32;3.85] *	-0.56 [-1.82;0.71]
	9 m	10.62 ± 3.29	8.69 ± 4.00	1.95 [-1.38;5.28]			
MCR/I (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹ / mU.l ⁻¹)	0 m	0.151 ± 0.06	0.138 ± 0.06	0.13 [-0.06; 0.08]	3-0 m	-0.03 [-0.08;0.1]	0.01 [-0.06;0.03]
	3 m	0.117 ± 0.03	0.127 ± 0.05	0.01 [-0.08; 0.06]	9-3 m	0.1 [0.04;0.16] *	0.06 [0.01;0.12] *
	9 m	0.218 ± 0.11	0.190 ± 0.11	0.03 [-0.04; 0.1]			
Rovnovážné inzulinémie (mU l ⁻¹)	0 m	78.1 ± 19.6	64.5 ± 20.8	13.6 [-3.55;30.7]	3-0 m	-9.7 [-26.9;7.43]	13.1 [-4.0;30.3]
	3 m	68.4 ± 16.1	77.6 ± 19.1	-9.24 [-26.4;7.9]	9-3 m	-14.0 [-31.1;3.2]	-24.3 [-41.5;-7.2] *
	9 m	54.4 ± 16.8	53.3 ± 19.4	1.14 [-16.0;18.3]			
AIR (mIU.l ⁻¹ .min ⁻¹)	0 m	214.9 ± 73.6	171.0 ± 81.0	43.0 [-56.4;144.3]	3-0 m	25.9[-55.7;107.6]	110.3 [28.7;192.0]*
	3 m	240.9 ± 89.3	281.3 ± 201.9	-40.5 [-140.8;59.9]	9-3 m	-4.4 [-86.0;77.3]	-29.4 [-111.1;52.2]
	9 m	236.5 ± 34.4	251.9 ± 99.8	-15.4 [-115.7;84.9]			

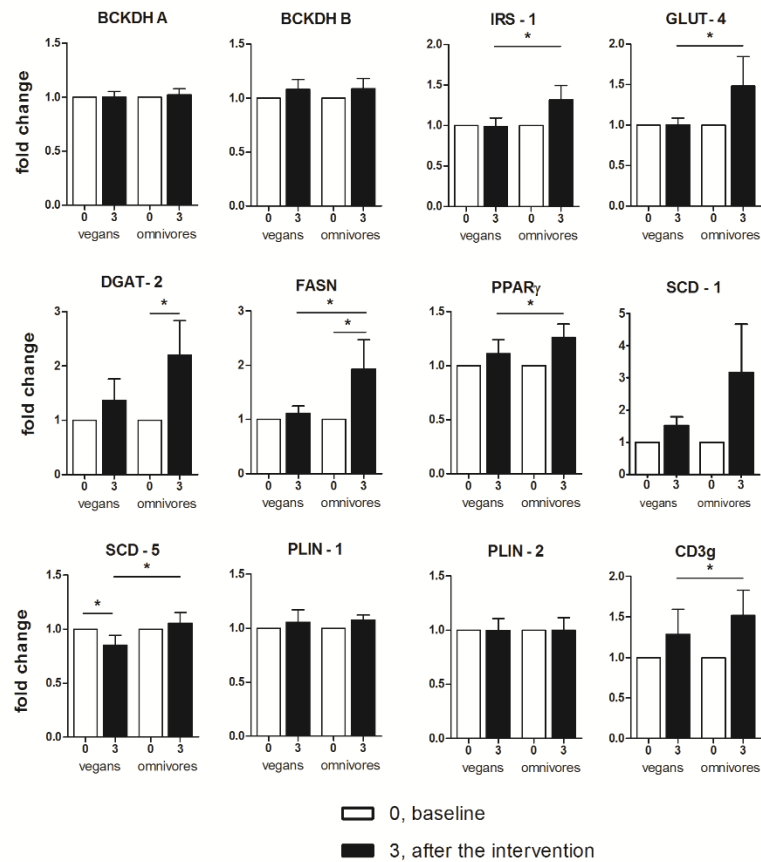
Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. Signifikance rozdílů jsou vyjádřeny jako 95% konfidenční interval (CI). Odsun glukózy je vyjádřen jako M-hodnota; MCR, metabolic clearance rate, M-hodnota adjustovaná na rovnovážné glykemie; MCR/I, MCR adjustovaná na rovnovážné inzulinémie; AIR, acute insulin response, AUC pro 30-min inzulinémie během argininového testu. † Log-normálně rozložená data, k analýzám byl použit geometrický průměr.

Charakteristika podkožní tukové tkáně

Efekty intervence na mRNA expresi jednotlivých genů v SAAT jsou shrnuty na obrázku 1. Signifikantní změny v expresi bylo dosaženo pouze u DGAT-2 a FASN genu, který byl po intervenci zvýšeně exprimován u omnivorů. Změna v expresi DGAT-2 genu pozitivně korelovala se změnami ve FASN (R 0.91, p=0.002), SCD-1 (R=0.85, p=0.008) a PPAR-γ (R 0.76, p=0.03).

Ve spektru plazmatických lipidů a celkových FFA nebyly mezi soubory zachyceny žádné rozdíly, ani intervence nevedla k signifikantním změnám: celkové FFA, vegan vstupní 162.6 ± 54 vs. intervence 170.5 ± 41.2 μg.ml⁻¹, p=0.7; omnivor vstupní 210 ± 62.4 vs. intervence 173.3 ± 54.5 μg.ml⁻¹, p=0.2. Žádných signifikancí nebylo také dosaženo v hladinách triglyceridů a celkového cholesterolu ani vstupně, ani během intervence (data nezobrazena).

Obrázek 1 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni v reakci na intervenci.



Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. * $p < 0.05$.

Charakteristiky kosterního svalu, genová exprese, aktivita komplexů respiračního řetězce

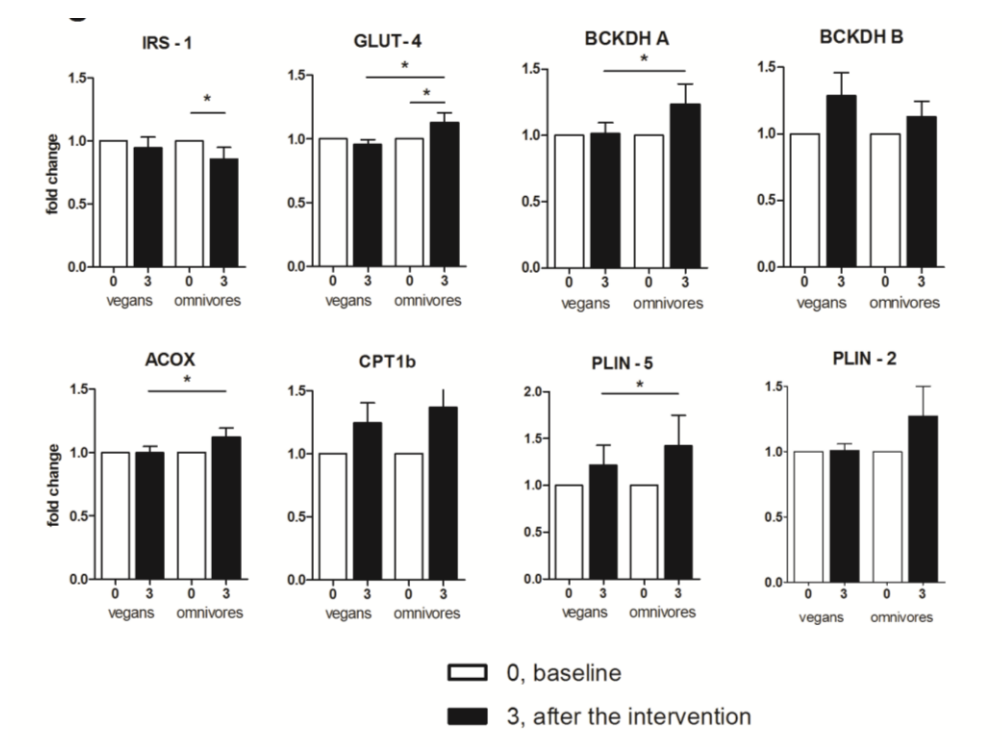
Mitochondriální funkce. Zvýšení aktivity komplexu II korelovalo v celém souboru se změnami v komplexu III ($R 0.75$, $p=0.0008$) a CS ($R 0.55$, $p=0.03$) (viz tabulka 8 a obrázek 2).

Tabulka 8 Parametry mitochondriální funkce kosterního svalu

Parametr	Rozdíly mezi skupinami s 95% CI				Změny v rámci skupiny s 95% CI		
	Vizita	Vegan	Omnivor	Rozdíl [95% CI]	Vizita	Vegan	Omnivor
CS ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	0 m	210.3 \pm 68.8	204.7 \pm 49.3	5.6 [-44.9;56.1]	-	-	-
	3 m	207.8 \pm 43.7	215.4 \pm 54.4	-7.6 [-58.2;42.9]	3-0 m	-2.5 [-41.3;36.2]	10.7 [-28.1;49.5]
Komplex I ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$)	0 m	29.6 \pm 18.9	37.6 \pm 7.4	-8.0 [-21.1;5.0]	-	-	-
	3 m	41.7 \pm 14.3	41.2 \pm 13.7	0.5 [-12.5;13.6]	3-0 m	12.2 [-0.8;25.2]	3.6 [-9.4;16.6]
Komplex II ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$)	0 m	6.9 \pm 1.4	7.1 \pm 0.7	-0.2 [-1.4;1.0]	-	-	-
	3 m	8.1 \pm 1.4	9.2 \pm 1.6	-1.1 [-2.3;0.1]	3-0 m	1.2 [0.3;2.4]*	2.1 [0.9;3.3] *
Komplex III ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$)	0 m	109.6 \pm 20.5	120.3 \pm 25.8	-10.1 [-36.7;15.1]	-	-	-
	3 m	113.7 \pm 20.6	130.7 \pm 41.1	-17.0 [-43.0;8.9]	3-0 m	4.1 [-21.8;30.0]	10.4 [-15.5;36.3]
Komplex IV ($\Delta\log$ (A550). $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$)	0 m	5.2 \pm 2.1	4.7 \pm 1.3	0.4 [-1.1;2.0]	-	-	-
	3 m	4.8 \pm 1.2	4.6 \pm 1.8	0.15 [-1.4;1.7]	3-0 m	-0.4 [-1.9;1.2]	-0.1 [-1.6;1.4]

Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. Signifikance rozdílů jsou vyjádřeny jako 95% konfidenční interval (CI). CS, aktivita citrát syntázy.

Obrázek 2 mRNA exprese v kosterním svaly v reakci na intervenci.



Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. * p < 0.05.

Diskuze

Observační studie

V observační studii jsme zkoumali vliv dlouhodobé veganské diety na celotělovou citlivost k inzulínu, na obsah IMCL a mitochondriální denzitu v kosterním svalu. Naše hypotéza byla, že vegani budou mít vyšší IS, čemuž bude na tkáňové úrovni SM odpovídat nižší obsah IMCL a vyšší mitochondriální denzita. Dále jsme předpokládali, že tato unikátní populace by mohla posloužit jako vhodný model ke studiu iniciálních stádií zhoršování IS, a že modifikací skladby stravy ve směru omnivorní diety by bylo možné studovat vliv vybraných nutrientů na parametry glukózové homeostázy.

Glukózová homeostáza. Ukázali jsme, že vegani mají nižší lačné glykemie a inzulínemie, a že mají vyšší inzulínem stimulovaný odsun glukózy v clampovém vyšetření. Toto je pravděpodobně podkladem nižší incidence IR-asociovaných onemocnění v této populaci. Obdobná data již byla publikována (Hua et al. 2001; Goff et al. 2005). Byli jsme však první, kdo použil k posouzení inzulínové senzitivity metodu HEC, která je zlatým standardem pro posouzení SM IR. **Profil cirkulujících lipidů a FFA.** V minulosti již bylo popsáno, že vegani mají příznivější lipidový profil, nižší koncentrace celkového a LDL-cholesterolu a triglyceridů (Yang et al. 2012; Kim et al. 2012). Naše nálezy jsou podobné, vegani měli signifikantně nižší hladinu celkového cholesterolu. V profilu FFA jsme ukázali, že vegani mají vyšší hladiny PUFA a vyšší množství omega 6 mastných kyselin LA, EDA a DGLA. Zachytili jsme také vyšší hladiny omega 3 mastných kyselin u veganů, což nebylo doposud popsáno. **Obsah intramyocelulárních lipidů.** Předchozí studie prokázaly, že obsah IMCL koreluje pozitivně s IR u zdravých nediabetických subjektů (Roden et al. 1996), a že vegani mají nižší obsah IMCL v porovnání s omnivory (Goff et al. 2005). Nižší obsah IMCL byl nicméně zachycen pouze ve svalu s převahou oxidativních vláken (m. soleus) a nikoli ve svalu s vlákny převážně glykolytickými (m. tibialis anterior). V naší studii jsme zkoumání podrobili bioptický vzorek m. vastus lateralis, tedy sval převážně glykolytický a v souladu s předchozí prací jsme nenalezli mezi skupinami statisticky signifikantní rozdíl, ač je patrný trend k nižšímu IMCL obsahu u veganů. **Mitochondriální denzita.** Mitochondriální aerobní kapacita kosterního svalu je hlavním kontributorem celotělové IS, kosterní sval je zodpovědný za prakticky 85 % inzulínem zprostředkovaného odsunu glukózy (Brehm & Roden, 2007). Je známo, že IR subjekty mají nižší mitochondriální oxidativní kapacitu a nižší mitochondriální obsah (Ritov et al. 2010). Doposud však u veganů nebyla žádná data o mitochondriální

funkci publikována. V předkládané práci jsme hodnotili mitochondriální denzitu pomocí měření aktivity CS (mitochondriální enzym kódovaný v jádru buňky) a relativního množství mitochondriální DNA v kosterním svalu. V našem souboru jsme nezachytili žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami. Nicméně byl patrný trend k vyššímu množství mtDNA u veganů.

Souhrnně jsme v observační studii prokázali, že vegani se odlišují od omnivorů v řadě parametrů glukózové homeostázy, a že je tedy možné použít model „vegan vs. omnivor“ v intervenční studii.

Intervenční studie

V minulosti již bylo prokázáno, že cirkulující hladiny BCAA korelují s IR a rizikem rozvoje T2DM (Wang et al. 2011). Avšak kauzalita mezi těmito jevy je stále předmětem debat. Cílem intervenční studie bylo prokázat možnou kauzální roli dietních BCAA na zhoršování citlivosti na inzulín. Vycházeli jsme z předpokladu, že vegani mají nižší příjem BCAA, a že toto je podkladem jejich lepší inzulínové citlivosti.

Hladiny BCAA, IR a sekrece inzulínu. BCAA patří mezi AA, které nejsou primárně metabolizovány v játrech, a proto postprandiálně jejich periferní hladiny odrážejí jejich podanou a vstřebanou dávku (van Loon et al. 2000). Naše hypotéza byla, že také během dlouhodobé intervence dojde ke zvýšení hladin BCAA, a že tato změna bude korelovat s poklesem IS a se zvýšením sekrece inzulínu. I přes významné navýšení (více než dvojnásobek bazálního dietního příjmu BCAA) podílu BCAA v dietě jsme prokázali pouze mírný, leč statisticky signifikantní vzestup v hladině leucinu. Toto naše pozorování je v rozporu se staršími daty (van Loon et al. 2000; Wahren et al. 1976), která však byla získána během akutních intervencí. Data z dlouhodobých intervencí jsou nemnohá. Jedna skupina dosáhla po dvanáctiměsíční intervenci BCAA obdobných výsledků jako my, tedy zvýšení sérového leucinu bez korespondujícího vzestupu valinu a izoleucinu (Takeshita et al. 2012). Naše data tedy neimplikují, že by dlouhodobý dietní přívod BCAA byl zodpovědný za jejich vyšší cirkulující hladiny, které provázejí T2DM. Zdá se tedy, že cirkulující BCAA jsou odrazem selhání inzulínem zprostředkované suprese proteolýzy či poruchy oxidace BCAA, jak již bylo navrženo (Lynch a Adams 2014).

I přes relativně malý vliv suplementace na cirkulující BCAA, intervence vedla k významnému poklesu inzulínové citlivosti u veganů. Zajímavé je, že pokles odsunu glukózy u veganů dosáhl vstupních hodnot omnivorní kontrolní skupiny, a že po wash-out periodě došlo ve

skupině k návratu zpět na vstupní hodnoty. Toto pozorování podporuje hypotézu, že BCAA mohou mít přímý negativní dopad na IS u zdravých lidí. Obdobě byl pokles IS pozorován v již publikovaných intervenčních studiích, kdy bylo použito IV infúze AA roztoku obsahujícího BCAA (Robinson et al. 2014). Žádné negativní změny IS jsme však nepozorovali v omnivorní skupině. Taková skupinově specifická odpověď na dlouhodobou intervenci BCAA u dvou kohort, které se liší ve svých nutričních zvyklostech, by mohla vysvětlovat předchozí konfliktní výsledky animálních studií (Newgard et al. 2009; Macotela et al. 2011). V rozporu s našimi výsledky, které byly získány na skupině metabolicky zdravých a mladých jedinců, jsou výsledky intervenčních studií, které byly naopak prováděny na IR dobrovolnících, a které prokázaly zlepšení odsunu glukózy po navýšení příjmu stravy s vysokým obsahem BCAA (Ouellet et al. 2007; Jakubowicz et al. 2014). Zdá se tedy, že jen IR subjekty mohou profitovat z BCAA suplementace. Tento efekt může být podmíněn inzulinotropními účinky BCAA (van Loon et al. 2003). BCAA stimulují sekreci inzulínu z β -buňky jak přímo, tak cestou inkretinů (Yang et al. 2010; Jakubowicz et al. 2014). V tomto smyslu také suplementace BCAA u pacientů s T2DM zvýšila AIR a vedla ke zlepšení kompenzace postprandiálních glykemií (Jakubowicz et al. 2014). U zdravých jedinců však nemusejí být tyto inzulinotropní efekty nutně pozitivní, protože hyperinzulinémie sama o sobě zhoršuje inzulinovou signalizaci v játrech a v SM (Ueno et al. 2005). V souladu s těmito úvahami jsme také my prokázali zvýšení AIR po intervenci pouze ve skupině omnivorů, kteří jsou méně senzitivní než vegani.

Mitochondriální kapacita a genová exprese v SM. Naše hypotéza byla, že změny v IS, které detekujeme na celotělové úrovni po intervenci, budou se odrážet ve změnách v mitochondriální respiraci kosterního svalu a/nebo v expresi klíčových genů pro inzulinovou signalizaci a metabolismus BCAA. Je známo, že změny v mitochondriální respiraci SM jsou asociovány s IR (Tumova et al. 2015). Navíc BCAA patří mezi hlavní substráty oxidované v SM. Po intervenci jsme neshledali žádné rozdíly mezi skupinami v mitochondriální denzitě (aktivitě CS) ani u jedné ze skupin. Zvýšení aktivity komplexů RC byly naopak zachyceny u obou skupin, ač více vyjádřeny byly ve skupině omnivorů. Statisticky signifikantní zvýšení bylo zachyceno v aktivitě komplexu II, u omnivorů tato změna navíc korelovala se změnami v komplexu III a CS. U omnivorů tedy zvýšení aktivity komplexů RC po intervenci koresponduje se vzestupem odsunu glukózy do SM. Navíc intervence vedla u omnivorů ke zvýšení exprese GLUT-4 v SM, což může ke zlepšení IS přispívat. Na druhou stranu naše výsledky nepoukazují na to, že by pokles IS u veganů byl asociován s odpovídajícími změnami v mitochondriální respiraci v SM.

Ve srovnání se skupinou omnivorů měli vegani méně vyjádřeny změny v BCKDH A, což může naznačovat, že po intervenci neindukují BCAA katabolizmus v SM.

Genová exprese v AT. V minulosti bylo prokázáno in vitro, že BCAA slouží jako významný prekurzor pro de novo lipogenezu v adipocytech (Green et al. 2016). Na druhou stranu stavy charakterizované poruchou glukózové homeostázy jsou charakterizovány down-regulací klíčových enzymů v katabolizmu BCAA v AT (Lackey et al. 2013). Naše hypotéza tedy byla, že intervence BCAA bude modulovat expresi genů pro metabolismus BCAA a lipogenezu v AT. V rozporu s naší hypotézou jsme nepozorovali žádné signifikantní změny v expresi genů pro metabolismus BCAA, které by odrážely pokles IS po intervenci u veganů. Nicméně nemůžeme vyloučit, že zvýšená nabídka BCAA v SM mohla mít dopad na translaci těchto genů či přímo ovlivnila aktivitu příslušného enzymu.

Na druhou stranu suplementace BCAA vedla ve skupině omnivorů ke zvýšení exprese genů pro lipogenezu: syntézu mastných kyselin (FASN) a syntézu triglyceridů (DGAT-2). Změny v expresi DGAT-2 navíc korelovaly se změnami v genech dalších lipolytických enzymů, PPAR- γ a SCD-1. Tato pozorování podporují hypotézu, že exces exogenních BCAA je využíván v AT a slouží jako substrát pro de novo lipogenezu. Vyšší lipogenní kapacita AT byla v minulosti prokázána také v souvislosti s vyšší IS (Obata et al. 2016). Zvýšení exprese lipogenních genů u omnivorů tedy může představovat adaptivní mechanismus na zvýšený přívod BCAA, které by jinak negativně ovlivnily IS v SM.

Naše data nám neposkytují vysvětlení pro rozdílnou metabolickou odpověď na suplementaci BCAA u veganů a omnivorů. Jedna z hypotéz může záležet v rozdílném vstupním přívodu AA a BCAA mezi skupinami. U BCAA nízko-příjmové skupiny (tedy u veganů) mohou být BCAA přijaté stravou směřovány primárně do SM, kde jsou použity jako substrát pro proteo-syntézu. Toto může vysvětlovat pokles IS po intervenci u veganů, protože bylo již v minulosti prokázáno, že leucin snižuje inzulínovou signalizaci cestou stimulace mTORC1-SK61 komplexu a zpětnovazebnou inhibicí IRS-1 a IRS-2 v SM (Krebs et al. 2007). V BCAA vysoko-příjmové skupině (omnivoři) je exces BCAA pufrován tukovou tkání, kde jsou BCAA deaminovány a uhlíkatý skelet je použit pro lipogenezu. Jelikož jsme však ve studii nestanovovali ani míru proteo-syntézy v SM, ani aktivitu mTORC1 nemůžeme dát v této hypotéze konkluzivní závěr.

Další hypotézou vysvětlující rozdílnou metabolickou odpověď na intervenci BCAA je rozdíl v příjmu a zásobách kobalaminu (vitamínu B12). Je známo, že veganská dieta je chudá na kobalamin, a zásoby kobalaminu jsou u veganů významně sníženy (Pawlak et al. 2014), což

jsme prokázali i my v observační studii (Gojda et al. 2013). Přitom právě de novo lipogeneza a diferenciacie adipocytů v AT je dependentní na dostupnosti právě kobalaminu-4 (Green et al. 2016). Nižší dostupnost kobalaminu u veganů tedy může být příčinou horší lipogenní kapacity AT, což vede k přetékání excessu BCAA do kosterního svalstva, kde BCAA interferují s odsunem glukózy. V intervenční studii jsme však zachytili ve vstupních hladinách kobalaminu pouze trend k nižším hodnotám u veganů.

Závěr

Diabetes 2. typu a jeho kardiovaskulární komplikace patří celosvětově v současnosti mezi nejvýznamnější příčiny mortality. Podstatnou měrou k tomu přispívá také skladba stravy. Existuje vztah mezi IR a vyšší hladinou plazmatických BCAA. Dosud však není zřejmé, zda jsou tyto dva jevy v kauzální souvislosti, a zda je zdroj cirkulujících BCAA exogenního či endogenního původu. Cílem naší práce bylo prokázat vztah mezi těmito jevy v intervenční studii.

Před samotnou intervencí, jsme vyvinuli unikátní model „vegan vs. omnivor“. Předpokládali jsme, že populace veganů má dlouhodobě nižší dietní přívod BCAA (vegani) a zároveň lepší parametry funkce inzulínu. Tento model byl validován v první observační studii. Následně byl model použit k intervenci perorálními preparáty BCAA po dobu tří měsíců. Zjistili jsme, že navýšení BCAA v dietě vedlo k poklesu IS pouze u veganů. U omnivorů suplementace BCAA vedla k indukci lipogenní aktivity AT a mitochondriální respirace SM. Prokázali jsme tedy negativní dopad suplementace BCAA pouze u subjektů s vysokou IS a nízkým bazálním příjmem AA/BCAA. Efekt suplementace BCAA na IS u veganů může být částečně vysvětlen jejich neschopností zvýšit katabolizmus BCAA v AT a SM. Zároveň suplementace BCAA neměla významný efekt na zvýšení cirkulujících BCAA, ani na jejich tkáňový metabolismus, což vylučuje kauzální vliv dietních BCAA v progresi IR u diabetu. Dietní BCAA by však mohly mít vliv v iniciálních fázích zhoršování IS.

Implikace pro dietologii

Skutečnost, že některé aminokyseliny mají také jiné než jen strukturální funkce na syntézu proteinů je známa již desítky let. Větvené aminokyseliny mají v tomto ohledu mezi ostatními esenciálními AA exkluzivní postavení, protože nejsou metabolizovány v játrech a slouží jako významné nutriční signály v řadě periferních tkání. Leucin působí přímo na

β -buňku, kde stimuluje sekreci inzulínu (Yang et al. 2010), v kosterním svalu aktivuje mTOR a proteosyntézu svalových vláken, a bylo navrženo, že může ovlivňovat příjem stravy cestou signalizace v anorexigenních centrech hypotalamu (Zampieri et al. 2013).

Prokázali jsme, že BCAA mohou protektivně působit hned na několika úrovních metabolismu. U obecné populace s normálním příjmem AA/BCAA, BCAA zlepšují postprandiální odsun glukózy a stimuluji lipogenní aktivitu v tukové tkáni. Za významné považujeme, že BCAA také vykazují při dlouhodobé suplementaci inzulinotropní účinky. Tato jejich vlastnost je známa z akutních pokusů již desítky let (Floyd JC et al. 1966). Selhání β -buněk v kompenzaci IR je přitom ústředním rozvojem manifestace a progresu diabetu. Proto dietní manipulace s cílem zvýšit sekreci inzulínu představují potenciálně lákavý mechanismus k překonání IR a kompenzaci glykemií u pacientů s diabetem. V minulosti již bylo prokázáno, že pokud je u pacientů s diabetem před jídly podána syrovátka, bohatý zdroj BCAA (Layman 2003), je dosaženo lepší postprandiální kompenzace glykemií (Frid et al. 2005). Obdobných výsledků bylo dosaženo také suplementací směsí AA (obsahující také BCAA) (Solerte et al. 2008).

Ač jsme v současné době ještě daleko od možnosti formulace jednoznačných dietních doporučení, je zřejmé, že naše výsledky podporují obecný trend v dietoterapii diabetu, který spočívá v redukci příjmu sacharidů na úkor proteinů a tuků (American Diabetes Association 2017). Suplementace BCAA či jejich zdroji se zdá být výhodná až u stavů, kdy dochází k poklesu v sekreci inzulínu a manifestaci diabetu. Naopak u skupin obyvatelstva s vysokou citlivostí na inzulín mohou BCAA a jejich inzulinotropní vlastnosti představovat potenciální riziko.

Naše výsledky také podporují protektivní efekt diet založených na rostlinných zdrojích. Vegetariánská dieta je dnes považována za vědecky podloženou alternativu diety diabetické, což se promítlo také v posledním doporučení české diabetologické společnosti pro diabetickou dietu (Kahleova a Pelikanova 2015).

Reference:

1. ALDERETE, T L, F R SATTler, X SHENG, J TUCCI, S D MITTELMAN, E G GRANT a M I GORAN, 2015. A novel biopsy method to increase yield of subcutaneous abdominal adipose tissue. *International journal of obesity (2005)* [online]. B.m.: Macmillan Publishers Limited, 1., **39**(1), 183–6 [vid. 2016-01-21]. ISSN 1476-5497. Dostupné z: doi:10.1038/ijo.2014.90
2. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017. 4. Lifestyle Management. *Diabetes Care* [online]. 15. 1., **40**(Supplement 1), S33–S43 [vid. 2017-03-16]. Dostupné z: doi:10.2337/dc17-S007
3. AUNE, D, G URSIN a M B VEIER?D, 2009. Meat consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia* [online]. **52**(11), 2277–2287. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-009-1481-x>
4. BAECKE, J A, J BUREMA a J E FRIJTERS, 1982. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr.* **36**(5), 936–942.
5. BREHM, Attila a Michael RODEN, 2007. Glucose Clamp Techniques. In: *Clinical Diabetes Research* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, s. 43–76 [vid. 2016-11-29]. ISBN 9780470513095. Dostupné z: doi:10.1002/9780470513095.ch4
6. COLE, Jeffrey T., 2015. Metabolism of BCAAs. In: *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 13–24 [vid. 2017-02-23]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-1923-9_2
7. DEFRONZO, R A, J D TOBIN a R ANDRES, 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 10., **237**(3), E214–E223.
8. EVERMAN, Sarah, Lawrence J MANDARINO, Chad C CARROLL a Christos S KATSANOS, 2015. Effects of acute exposure to increased plasma branched-chain amino acid concentrations on insulin-mediated plasma glucose turnover in healthy young subjects. *PloS one* [online]. 1., **10**(3), e0120049 [vid. 2016-01-22]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0120049
9. FELIG, P, E MARLISS a Jr CAHILL GF, 1969. Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *N Engl J Med* [online]. **281**(15), 811–816. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM196910092811503>
10. FLOYD JC, Jr, S S FAJANS, J W CONN, R F KNOFF a J RULL, 1966. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* [online]. 10., **45**(9), 1487–1502. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI105456>
11. FRID, Anders H, Mikael NILSSON, Jens Juul HOLST a Inger M E BJÖRCK, 2005. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* 7., **82**(1), 69–75.
12. GOFF, L M, J D BELL, P-W. SO, A DORNHORST a G S FROST, 2005. Veganism and its relationship with insulin resistance and intramyocellular lipid. *Eur J Clin Nutr* [online]. 2., **59**(2), 291–298. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602076>

13. GOJDA, J., L. ROSSMEISSLOVÁ, J. TŮMOVÁ, A. KRAJČOVÁ, M. ELKALAF, J. ŽIAK, M. JAČEK, K. BALUŠÍKOVÁ, F. DUŠKA, J. TRNKA a M. ANDĚL, 2015. Role of percutaneous biopsy of skeletal muscle in diabetes research. Methodological summary | Postavení perkutánní biopsie kosterního svalu v diabetologickém výzkumu. Metodologický přehled. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Vyziva*. **18**(4). ISSN 12126853 12119326.
14. GOJDA, J, J PATKOVÁ, M JAČEK, J POTOČKOVÁ, J TRNKA, P KRAML a M ANDĚL, 2013. Higher insulin sensitivity in vegans is not associated with higher mitochondrial density. *European journal of clinical nutrition* [online]. (September), 1–6. ISSN 1476-5640. Dostupné z: doi:10.1038/ejcn.2013.202
15. GOJDA, J, L ROSSMEISLOVÁ, R STRAKOVÁ, J TŮMOVÁ, M ELKALAF, M JAČEK, P TŮMA, J POTOČKOVÁ, E KRAUZOVÁ, P WALDAUF, J TRNKA, V ŠTICH a M ANDĚL, 2017. Chronic dietary exposure to branched chain amino acids impairs glucose disposal in vegans but not in omnivores. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 1. 2. [vid. 2017-03-21]. ISSN 0954-3007. Dostupné z: doi:10.1038/ejcn.2016.274
16. GREEN, Courtney R, Martina WALLACE, Ajit S DIVAKARUNI, Susan A PHILLIPS, Anne N MURPHY, Theodore P CIARALDI a Christian M METALLO, 2016. Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nature chemical biology* [online]. 1., **12**(1), 15–21 [vid. 2016-05-27]. ISSN 1552-4469. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.1961
17. HERMAN, Mark A, Pengxiang SHE, Odile D PERONI, Christopher J LYNCH a Barbara B KAHN, 2010. Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. *J Biol Chem* [online]. 4., **285**(15), 11348–11356. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.075184>
18. HUA, N W, R A STOOHS a F S FACCHINI, 2001. Low iron status and enhanced insulin sensitivity in lacto-ovo vegetarians. *Br J Nutr*. **86**(4), 515–519.
19. HUANG, Ru-Yi, Chuan-Chin HUANG, Frank B. HU a Jorge E. CHAVARRO, 2016. Vegetarian Diets and Weight Reduction: a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of General Internal Medicine* [online]. 3. 1., **31**(1), 109–116 [vid. 2017-03-15]. ISSN 0884-8734. Dostupné z: doi:10.1007/s11606-015-3390-7
20. JAKUBOWICZ, Daniela, Oren FROY, Bo AHRÉN, Mona BOAZ, Zohar LANDAU, Yosefa BAR-DAYAN, et al., 2014. Incretin, insulinotropic and glucose-lowering effects of whey protein pre-load in type 2 diabetes: a randomised clinical trial. *Diabetologia* [online]. 10., **57**(9), 1807–1811. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-014-3305-x>
21. KAHLEOVA, H, M MATOULEK, H MALINSKA, O OLIYARNIK, L KAZDOVA, T NESKUDLA, et al., 2011. Vegetarian diet improves insulin resistance and oxidative stress markers more than conventional diet in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med* [online]. 5., **28**(5), 549–559. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.03209.x>
22. KAHLEOVA, Hana a Terezie PELIKANNOVA, 2015. Vegetarian Diets in the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition* [online]. 3. 9., **34**(5), 448–458 [vid. 2017-03-16]. ISSN 0731-5724. Dostupné z: doi:10.1080/07315724.2014.976890

23. KAMAURA, Mitsumasa, Kiyoko NISHIJIMA, Mitsuo TAKAHASHI, Toshihiko ANDO, Shunsaku MIZUSHIMA a Osamu TOCHIKUBO, 2010. Lifestyle modification in metabolic syndrome and associated changes in plasma amino acid profiles. *Circ J.* **74**(11), 2434–2440.
24. KEY, T J, G E FRASER, M THOROGOOD, P N APPLEBY, V BERAL, G REEVES, et al., 1998. Mortality in vegetarians and non-vegetarians: a collaborative analysis of 8300 deaths among 76,000 men and women in five prospective studies. *Public Health Nutr.* **3**, **1**(1), 33–41.
25. KIM, Mi Kyung, Sang Woon CHO a Yoo Kyoung PARK, 2012. Long-term vegetarians have low oxidative stress, body fat, and cholesterol levels. *Nutr Res Pract* [online]. **4**, **6**(2), 155–161. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4162/nrp.2012.6.2.155>
26. KOHLMIEIER, Martin., 2015. *Nutrient Metabolism*. B.m.: Academic Press. ISBN 9780123877840.
27. KREBS, Michael, Barbara BRUNMAIR, Attila BREHM, Michaela ARTWOHL, Julia SZENDROEDI, Peter NOWOTNY, et al., 2007. The Mammalian target of rapamycin pathway regulates nutrient-sensitive glucose uptake in man. *Diabetes* [online]. **6**, **56**(6), 1600–1607. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1016>
28. LACKEY, Denise E, Christopher J LYNCH, Kristine C OLSON, Rouzbeh MOSTAEDI, Mohamed ALLI, William H SMITH, et al., 2013. Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* [online]. **1**. **6**, **304**(11), E1175-87 [vid. 2016-01-22]. ISSN 1522-1555. Dostupné z: [doi:10.1152/ajpendo.00630.2012](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00630.2012)
29. LAYMAN, Donald K, 2003. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr.* **1**, **133**(1), 261S–267S.
30. LU, Jingyi, Guoxiang XIE, Weiping JIA a Wei JIA, 2013. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids. *Front Med* [online]. **3**, **7**(1), 53–59. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s11684-013-0255-5>
31. LYNCH, Christopher J a Sean H ADAMS, 2014. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature reviews. Endocrinology* [online]. B.m.: NIH Public Access, **12**, **10**(12), 723–36 [vid. 2017-02-02]. ISSN 1759-5037. Dostupné z: [doi:10.1038/nrendo.2014.171](https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.171)
32. MACOTELO, Yazmin, Brice EMANUELLI, Anneli M BÃNG, Daniel O ESPINOZA, Jeremie BOUCHER, Kirk BEEBE, Walter GALL a C Ronald KAHN, 2011. Dietary leucine--an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PLoS One* [online]. **6**(6), e21187–e21187. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021187>
33. NAIR, K S, P D WOOLF, S L WELLE a D E MATTHEWS, 1987. Leucine, glucose, and energy metabolism after 3 days of fasting in healthy human subjects. *The American journal of clinical nutrition* [online]. B.m.: American Society for Nutrition, **10**, **46**(4), 557–62 [vid. 2017-02-28]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3661473>
34. NEWGARD, Christopher B, Jie AN, James R BAIN, Michael J MUEHLBAUER, Robert D STEVENS, Lillian F LIEN, Andrea M HAQQ, et al., 2009. A branched-chain amino acid-related metabolic

- signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* [online]. 4., **9**(4), 311–326. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002>
35. NILSSON, Mikael, Marianne STENBERG, Anders H FRID, Jens J HOLST a Inger M E BJÖRCK, 2004. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr.* **80**(5), 1246–1253.
 36. OBATA, Atsushi, Naoto KUBOTA, Tetsuya KUBOTA, Masahiko IWAMOTO, Hiroyuki SATO, Yoshitaka SAKURAI, et al., 2016. Tofogliflozin Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Accelerates Lipolysis in Adipose Tissue in Male Mice. *Endocrinology* [online]. 3., **157**(3), 1029–42 [vid. 2016-05-27]. ISSN 1945-7170. Dostupné z: [doi:10.1210/en.2015-1588](https://doi.org/10.1210/en.2015-1588)
 37. OUELLET, Véronique, Julie MAROIS, S John WEISNAGEL a Hélène JACQUES, 2007. Dietary cod protein improves insulin sensitivity in insulin-resistant men and women: a randomized controlled trial. *Diabetes care* [online]. 11., **30**(11), 2816–21 [vid. 2016-01-22]. ISSN 1935-5548. Dostupné z: [doi:10.2337/dc07-0273](https://doi.org/10.2337/dc07-0273)
 38. PALMER, J P, J W BENSON, R M WALTER a J W ENSINCK, 1976. Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagon secretion in diabetic subjects. *The Journal of clinical investigation* [online]. 9., **58**(3), 565–70 [vid. 2015-12-10]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: [doi:10.1172/JCI108502](https://doi.org/10.1172/JCI108502)
 39. PAWLAK, R, S E LESTER a T BABATUNDE, 2014. The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: a review of literature. *European journal of clinical nutrition* [online]. 5., **68**(5), 541–8 [vid. 2016-06-02]. ISSN 1476-5640. Dostupné z: [doi:10.1038/ejcn.2014.46](https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.46)
 40. RITOV, Vladimir B, Elizabeth V MENSHIKOVA, Koichiro AZUMA, Richard WOOD, Frederico G S TOLEDO, Bret H GOODPASTER, Neil B RUDERMAN a David E KELLEY, 2010. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 1., **298**(1), E49–E58. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00317.2009>
 41. ROBINSON, Matthew M, Mattias SOOP, Tae Seo SOHN, Dawn M MORSE, Jill M SCHIMKE, Katherine A KLAUS a K Sreekumaran NAIR, 2014. High insulin combined with essential amino acids stimulates skeletal muscle mitochondrial protein synthesis while decreasing insulin sensitivity in healthy humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [online]. 12., **99**(12), E2574–83 [vid. 2016-05-27]. ISSN 1945-7197. Dostupné z: [doi:10.1210/jc.2014-2736](https://doi.org/10.1210/jc.2014-2736)
 42. RODEN, M, T B PRICE, G PERSEGHIN, K F PETERSEN, D L ROTHMAN, G W CLINE a G I SHULMAN, 1996. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *The Journal of clinical investigation* [online]. B.m.: American Society for Clinical Investigation, 15. 6., **97**(12), 2859–65 [vid. 2016-11-29]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: [doi:10.1172/JCI118742](https://doi.org/10.1172/JCI118742)
 43. SOLERTE, Sebastiano B, Marisa FIORAVANTI, Eleonora LOCATELLI, Roberto BONACASA, Mauro ZAMBONI, Cristina BASSO, et al., 2008. Improvement of blood glucose control and insulin sensitivity during a long-term (60 weeks) randomized study with amino acid dietary

- supplements in elderly subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* [online]. 6., **101**(11A), 82E–88E. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.03.006>
44. SOUCI, S. W., W. FACHMANN a H. KRAUT, 2000. Food composition and nutrition tables. [online]. B.m.: Medpharm GmbH Scientific Publishers, (Ed.6) [vid. 2016-01-20]. Dostupné z: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20001418574.html;jsessionid=46277F47F16A2E0B8F137D24E5143C20>
 45. SPINAZZI, Marco, Alberto CASARIN, Vanessa PERTEGATO, Leonardo SALVIATI a Corrado ANGELINI, 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature protocols* [online]. 6., **7**(6), 1235–46 [vid. 2016-01-19]. ISSN 1750-2799. Dostupné z: [doi:10.1038/nprot.2012.058](https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058)
 46. TAKESHITA, Yumie, Toshinari TAKAMURA, Yuki KITA, Hitoshi ANDO, Teruyuki UEDA, Kenichiro KATO, Hirofumi MISU, et al., 2012. Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. *Metabolism: clinical and experimental* [online]. 10., **61**(10), 1388–94 [vid. 2016-01-22]. ISSN 1532-8600. Dostupné z: [doi:10.1016/j.metabol.2012.03.011](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.03.011)
 47. TONSTAD, S, K STEWART, K ODA, M BATECH, R P HERRING a G E FRASER, 2011. Vegetarian diets and incidence of diabetes in the Adventist Health Study-2. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [online]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2011.07.004>
 48. TONSTAD, Serena, Terry BUTLER, Ru YAN a Gary E FRASER, 2009. Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* [online]. 5., **32**(5), 791–796. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2337/dc08-1886>
 49. TŮMA, Petr a Jan GOJDA, 2015. Rapid determination of branched chain amino acids in human blood plasma by pressure-assisted capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* [online]. 8., **36**(16), 1969–1975. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201400585>
 50. TUMOVA, J, M ANDEL a J TRNKA, 2015. Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* [online]. 8. 10. [vid. 2016-05-27]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26447514>
 51. UENO, M, J B C CARVALHEIRA, R C TAMBASCIA, R M N BEZERRA, M E AMARAL, E M CARNEIRO, F FOLLI, K G FRANCHINI a M J A SAAD, 2005. Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia* [online]. 3., **48**(3), 506–518. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-004-1662-6>
 52. VAN LOON, L J, W H SARIS, H VERHAGEN a A J WAGENMAKERS, 2000. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr.* 7., **72**(1), 96–105.
 53. VAN LOON, Luc J C, Margriet KRUIJSHOOP, Paul P C A MENHEERE, Anton J M WAGENMAKERS, Wim H M SARIS a Hans A KEIZER, 2003. Amino acid ingestion strongly enhances insulin secretion in patients with long-term type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 3., **26**(3), 625–630.

54. WAHREN, J, P FELIG a L HAGENFELDT, 1976. Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and in patients with diabetes mellitus. *J Clin Invest* [online]. 4., **57**(4), 987–999. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI108375>
55. WANG, Thomas J, Martin G LARSON, Ramachandran S VASAN, Susan CHENG, Eugene P RHEE, Elizabeth MCCABE, Gregory D LEWIS, Caroline S FOX, Paul F JACQUES, Céline FERNANDEZ, Christopher J O'DONNELL, Stephen A CARR, Vamsi K MOOTHA, Jose C FLOREZ, Amanda SOUZA, Olle MELANDER, Clary B CLISH a Robert E GERSZTEN, 2011. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* [online]. 4., **17**(4), 448–453. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2307>
56. YANG, Jichun, Yujing CHI, Brant R BURKHARDT, Youfei GUAN a Bryan A WOLF, 2010. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev* [online]. 5., **68**(5), 270–279. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00282.x>
57. YANG, Shu-Yu, Xue-Jun LI, Wei ZHANG, Chang-Qin LIU, Hui-Jie ZHANG, Jin-Rong LIN, Bing YAN, Ya-Xin YU, Xiu-Lin SHI, Can-Dong LI a Wei-Hua LI, 2012. Chinese lacto-vegetarian diet exerts favorable effects on metabolic parameters, intima-media thickness, and cardiovascular risks in healthy men. *Nutr Clin Pract* [online]. 6., **27**(3), 392–398. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1177/0884533611436173>
58. ZAMPIERI, Thais T., João A. B. PEDROSO, Isadora C. FURIGO, Julio TIRAPEGUI, Jose DONATO, MG Myers JR., DP OLSON, et al., 2013. Oral Leucine Supplementation Is Sensed by the Brain but neither Reduces Food Intake nor Induces an Anorectic Pattern of Gene Expression in the Hypothalamus. *PLoS ONE* [online]. B.m.: Public Library of Science, 13. 12., **8**(12), e84094 [vid. 2017-01-15]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0084094](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084094)

Publikace, prezentace a vědecká ocenění výstupů řešení disertace

Originální články s faktorem impaktu

1. GOJDA, J, L ROSSMEISLOVÁ, R STRAKOVÁ, J TŮMOVÁ, M ELKALAF, M JAČEK, P TŮMA, J POTOČKOVÁ, E KRAUZOVÁ, P WALDAUF, J TRNKA, V ŠTICH a M ANDĚL, 2017. Chronic dietary exposure to branched chain amino acids impairs glucose disposal in vegans but not in omnivores. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 1. 2. [vid. 2017-03-21]. ISSN 0954-3007. Dostupné z: doi:10.1038/ejcn.2016.274. Impact Factor 2.935 = *Příloha 1*
2. GOJDA, J, J PATKOVÁ, M JAČEK, J POTOČKOVÁ, J TRNKA, P KRAML a M ANDĚL, 2013. Higher insulin sensitivity in vegans is not associated with higher mitochondrial density. *European journal of clinical nutrition* [online]. (September), 1–6. ISSN 1476-5640. Dostupné z: doi:10.1038/ejcn.2013.202. Impact Factor 2.935 = *Příloha 2*
3. TUMA, P. a J. GOJDA, 2015. Rapid determination of branched chain amino acids in human blood plasma by pressure-assisted capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* [online]. **36**(16). ISSN 15222683 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201400585. IF 3.028 = *Příloha 3*

Originální články v periodických bez faktoru impaktu

1. GOJDA, J., L. ROSSMEISSLOVÁ, J. TŮMOVÁ, A. KRAJČOVÁ, M. ELKALAF, J. ŽIAK, M. JAČEK, K. BALUŠÍKOVÁ, F. DUŠKA, J. TRNKA a M. ANDĚL, 2015. Role of percutaneous biopsy of skeletal muscle in diabetes research. Methodological summary | Postavení perkutánní biopsie kosterního svalu v diabetologickém výzkumu. Metodologický přehled. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Vyziva*. **18**(4). ISSN 12126853 12119326. = *Příloha 4*
2. GOJDA, J., J. TRNKA a M. ANDĚL, 2011. Cellular mechanisms of muscle atrophy | Buněčné mechanismy svalové atrofie. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Vyziva*. **14**(3). ISSN 12119326 12126853. = *Příloha 5*

Vědecká ocenění výsledků řešení

Travel Grant ESPEN, ústní sdělení na kongresu ESPEN 2015:

GOJDA, J., R. STRAKOVA, L. ROSSMEISLOVA, J. TUMOVA, M. ELKALAF, M. JACEK, P. TUMA, J. POTOCKOVA, J. TRNKA, V. STICH a M. ANDEL, 2015b. OR013: Chronic Dietary Exposure to Branched Chain AMINO ACIDS Causes Impaired Glucose Disposal and Higher Adipose Tissue Lipogenesis. *Clinical Nutrition* [online]. B.m.: Elsevier, 9., **34**, S5 [vid. 2017-03-24]. ISSN 02615614. Dostupné z: doi:10.1016/S0261-5614(15)30110-2

Publikační aktivita autora bez vztahu k tématu disertace

Originální články s faktorem impaktu

1. GOJDA, Jan a Jan BARTONÍČEK, 2012. The retinacula of Weitbrecht in the adult hip. *Surgical and radiologic anatomy : SRA* [online]. **34**(1), 31–8. ISSN 1279-8517. Dostupné z: doi:10.1007/s00276-011-0829-3. IF=1,195
2. JIROUTKOVÁ, K., A. KRAJČOVÁ, J. ZIAK, M. FRIC, P. WALDAUF, V. DŽUPA, J. GOJDA, V. NĚMCOVA-FÜRSTOVÁ, J. KOVÁŘ, M. ELKALAF, J. TRNKA a F. DUŠKA, 2015. Mitochondrial function in skeletal muscle of patients with protracted critical illness and ICU-acquired weakness. *Critical Care* [online]. **19**(1). ISSN 1466609X 13648535. Dostupné z: doi:10.1186/s13054-015-1160-x. IF=7,442
3. JIROUTKOVÁ, Kateřina, Adéla KRAJČOVÁ, Jakub ŽIAK, Michal FRIC, Jan GOJDA, Valér DŽUPA, Martin KALOUS, Jana TŮMOVÁ, Jan TRNKA a František DUŠKA, 2016. Mitochondrial Function in an In Vitro Model of Skeletal Muscle of Patients With Protracted Critical Illness and Intensive Care Unit–Acquired Weakness. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* [online]. B.m.: SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 29. 6., 14860711665764 [vid. 2017-03-24]. ISSN 0148-6071. Dostupné z: doi:10.1177/0148607116657649 IF= 3,151

Originální články v periodících bez faktoru impaktu

1. GOJDA, J.: Úbytek svalové hmoty - kachexie vs. sarkopenie: komentovaný překlad. DMEV, 2011, ann. 14 (2), p. 97-98.
2. GOJDA, J., J. ŠVANDA, P., TĚŠÍNSKÝ, M. ANDĚL: Hypoglykemie asociovaná s léčbou Olanzapinem u nediabetického pacienta. DMEV, 2014, ann. 17 (1): 22-23.
3. STRAKOVÁ, R.; L. VEČEŘOVÁ; J. GOJDA; P. KRAML; M. ANDĚL: Steatóza pankreatu a její vztah k diabetu. DMEV, 2016, ann. 18 (4): 178-186.

Seznam zkratek

AA: aminokyseliny

ACOX: acyl CoA oxidáza

AT: adipose tissue, tuková tkáň

BCAA: branched chain aminoacids, aminokyseliny s větveným řetězcem

BCKDHA, BCKDHB: branched chain keto acid dehydrogenáza A a B

CD3g: cluster of differentiation 3, povrchový antigen T lymfocytů

CPT1b: kreatin-palmitoyl tranferáza 1 beta

DGAT-2: diglycerol acyl transferáza

FASN: fatty acid syntáza

GLUT-4: glucose transporter 4

IS: inzulínová senzitivita

IR: inzulínová rezistence

IRS-1: inulin receptor substrate

PPAR- γ : peroxisom proliferator activated receptor gamma

PLIN-1, PLIN-2: perilipiny

SCD-1, SCD-5: stearoyl CoA desaturázy

SM: skeletal muscle, kosterní sval

T2DM: diabetes mellitus 2. typu