

Ceramidy a kardiovaskulárne ochorenie

Ceramides and cardiovascular disease

Ján Murín

I. interná klinika LF UK a UNB, Nemocnica Staré Mesto, Bratislava

Súhrn

Obezita asociuje so zvýšeným kardiovaskulárnym (KV) rizikom, a preto vedomosti o potenciálnej úlohe dysregulácie v tukovom tkanive (TT) sú veľmi dôležité. Klinická štúdia sa zamerala na metabolity (ceramidy, sfingomyelíny, mastné kyseliny a iné) secernované intratorakálnym a subkutánnym TT u obéznych pacientov s pokročilou aterosklerózou – niektorí pacienti podstúpili liečbu aortokoronárnym by-passom. Autori študovali v endotelových bunkách mechanizmy podporujúce aterosklerózu a študovali aj klinickú hodnotu týchto mechanizmov pri ich asociácii s tvrdými klinickými príhodami u pacientov. Objem intratorakálneho TT asociuje s oxidatívnym arteriálnym stresom a existujú významné rozdiely v sekrécii sfingolipidov medzi intratorakálnym a subkutánnym TT. 16:0-ceramid a jeho deriváty sú najčastejším metabolitom uvoľňovaným z adipocytov prostredníctvom extracelulárnych vezikúl. Veľká sekrécia sfingolipidov z intratorakálneho TT významne asociuje s redukovanou endoteliálnou dostupnosťou NO a so zvýšenou tvorbou superoxidu v humánnych cievach. Výška koncentrácie C16:0-ceramidu v krvi koreluje pozitívne s uvoľňovaním ceramidov v intratorakálnom TT, ďalej s dysreguláciou vaskulárneho redox-potenciálu a so systémovým vaskulárnym zápalom u pacientov s aterosklerózou. Vysoká sérová hladina C16:0-ceramidu nezávisle asociuje so zvýšeným rizikom kardiálneho úmrtia. V randomizovanej klinickej štúdii ročná liečba obéznych pacientov pomocou GLP1-RA (liraglutidu) potlačila sérové hladiny C16:0-ceramidu a C16:0-glykosylceramidu. Tieto výsledky dokazujú prvý raz u ľudí, že ceramidy odvodené od TT by mohli byť modifikovateľnými regulátormi vaskulárneho redox-stavu u obezity s dosahom ovplyvniť aj kardiálnu mortalitu u chorých s pokročilou aterosklerózou.

Kľúčové slová: ateroskleróza – ceramidy – intratorakálne tukové tkanivo – kardiovaskulárne ochorenie – liraglutid – tukové tkanivo – vaskulárny zápal

Summary

Obesity is associated with an increased cardiovascular risk and therefore the knowledge of a potential role of dysregulations in the adipose tissues (AT) seems to be important. A study looking at metabolites (ceramides, sphingomyelins, free fatty acids, other) secreted by intrathoracic and subcutaneous AT in obese patients with atherosclerosis was conducted, and some of these patients were undergoing coronary bypass surgery. The underlying mechanisms were explored in human endothelial cells and their clinical value was tested against hard clinical endpoints. The intrathoracic AT volume is associated significantly with arterial oxidative stress and there are significant differences in sphingolipid secretion between intrathoracic AT and subcutaneous AT. C16:0-ceramide and its derivatives are the most abundant species released within adipocyte-derived extracellular vesicles. High intrathoracic AT sphingolipid secretion was significantly associated with reduced endothelial NO bioavailability and increased superoxide generated in human vessels. Circulating C16:0-ceramide correlated positively with intrathoracic AT production of ceramides, dysregulated vascular redox signaling and increased systemic inflammation in patients with atherosclerosis. High plasma C16:0-ceramide is independently related with increased risk for cardiac mortality. In a randomized controlled clinical trial, 1-year treatment of obese patients with the GLP-1 RA (liraglutid) suppressed plasma C16:0-ceramide and C16:0-glycosylceramide. These results demonstrate for the 1st time in humans that AT-derived ceramides are modifiable regulators of vascular redox state in obesity and with an impact on cardiac mortality in advanced atherosclerosis.

Key words: adipose tissues – atherosclerosis – ceramides – cardiovascular disease – intrathoracic adipose tissue – liraglutide – vascular inflammation

✉ prof. MUDr. Ján Murín, CSc. | jan.murin@gmail.com | www.fmed.uniba.sk

Doručené do redakcie | Received 10. 3. 2023

Prijaté po recenzii | Accepted 12. 4. 2023

Úvod

Kardiovaskulárne (KV) ochorenia dominujú vo svete i u nás v morbidite a mortalite a dnes ich výskyt i dôsledky podporuje aj globálna epidémia obezity. Je treba poznať patofyziologické mechanizmy, ktorými obezita podporuje vývoj KV-ochorení. Ak ich rozpoznáme, tak budeme vedieť, ako treba týmto KV-problémom predchádzať.

Akawi et al [1] sa sústredili na prešetrenie koronárnych artérií (získaných pri kardiochirurgickom zákroku), u ktorých zisťovali štrukturálne a biochemické metabolické zmeny u chorých s obezitou – pokúšali sa popísať mechanizmy vývoja vaskulopatie pri obezite, čo bol cieľ výskumu.

Isté iné štúdie preukázali, že tukové tkanivo (TT) secerňuje celý rad molekúl s endokrinnou a parakrinnou aktivitou, ktoré spolu vplyvajú na vaskulárny systém a vyvolávajú v ňom isté zmeny, včítane zmien v oxido-redukčnej oblasti, no a týmito aktivitami vyvolávajú a podporujú progresiu vaskulopatie [2,3]. Tieto práce ukázali, že ľudské TT produkuje mnohé a doteraz aj neznáme bioaktívne molekuly (užíva sa termín „sekretóm“), ktoré vyvolávajú vaskulopatiu, ale mohli by súčasne slúžiť aj ako biomarkery vývoja vaskulopatie, ale mohli by byť aj cieľovými liečebnými molekulami u chorých s KV-ochoreniami (KVO), ev. aj s cieľom ich prevencie.

Dizajn štúdie k zodpovedaniu cieľa výskumu

Akawi et al (2021) sa vo svojej práci sústredili na úlohu dysregulácie TT pri ovplyvňovaní vaskulárneho potenciálu redox (oxido-redukčného), ktorý podporuje vývoj vaskulopatie a následne i vývoj KVO [1].

Stručne k ich metodológii výskumu (paralelne prebiehajú tri štúdie):

- Prvá štúdia hľadala prepojenie medzi objemom TT a vaskulárnym redox-stavom, ale aj sérovými hladinami ceramidov. U 633 pacientov, ktorí podstupovali výkon aorto-koronárneho bypassu pre vážne kardiálne ochorenie, analyzovali hladiny ceramidov v sére, ale analyzovali aj biopsie vaskulárnych segmentov odobratých pri operácii, a analyzovali aj parametre získaného subkutánneho a intratorakálneho TT. Vykonali CT-vyšetrenie subkutánneho TT, ale aj intratorakálneho TT. Prospektívne boli pacienti sledovaní klinickými vyšetreniami po dobu 5 rokov čo do výskytu KV-príhod i celkovej mortality.

- Druhá štúdia hľadala prepojenie medzi bio-aktívnymi metabolitmi dysfunkčného TT a zmenami vaskulárnymi (analyzované u 48 pacientov s aorto-koronárnym by-passom), hodnotenými analýzami vzoriek tkanivovej biopsie koronárnych vaskulárnych segmentov, ale aj biopsie subkutánneho a intratorakálneho TT.
- Tretia štúdia prešetrovala vplyv redukcie hmotnosti (pomocou liečby liraglutidom ale i bez tejto liečby, t.j. len príslušnou diétou) na koncentráciu plazmatických sfingolipidov (včítane ceramidov, ktoré sú bazálnymi štrukturálnymi jednotkami sfingolipidov – a to po spojení sfingozínu s masnými kyselinami dlhých reťazcov) u obéznych osôb. Zaradených do sledovania bolo 32 obéznych osôb, ktoré najprv pristúpili na 8-týždňovú diétu liečbu s redukciami hmotnosti a následne boli randomizovaní k liečbe liraglutidom 1,2 mg denne vs ostali len na nízkokalorickej diéte 1 rok s kontrolou sérových sfingolipidov na konci štúdie.

Vzorky subkutánneho a intratorakálneho TT boli odobraté u 48 pacientov, ktorí podstúpili aorto-koronárny bypass. Autori potom analyzovali v sére jednak metabolity TT (chromatograficky, spektrometricky), ale tiež sfingolipidy (v TT ale i v sére, spektrometricky), a analyzovali fyziologické vlastnosti vaskulárnych segmentov koronárnych artérií vazomotorickými testami. Sústredili sa i na bunkové kultúry adipocytov izolovaných z intratorakálneho TT, v ktorých analyzovali aj produkciu superoxidu, NADPH, L-NAME, ale tiež celulózne proteinové extrakty (pomocou elektroforézy). Vykonali kvantifikáciu biopterínu v sére a ešte realizovali aj génové analýzy. Klinicky sledovali výskyt KV-príhod, včítane mortality u pacientov.

Výsledky predstavených štúdií

Metabolizmus sfingolipidov u obezity

Analyzovaný bol súbor 633 pacientov, ktorí podstúpili kardiochirurgický zákrok. V podskupine 87 pacientov boli kvantifikované objemy TT (jednak subkutánneho ale i viscerálneho v hrudníku, vlastne intratorakálneho) pomocou CT-vyšetrenia. Preukázala sa tu pozitívna korelácia medzi hodnotami bazálnej koncentrácie superoxidu v artérii mamma interna a objemom subkutánneho TT i viscerálneho intratorakálneho TT, ale pri adjustácii (zohľadnení) na prítomné rizikové tradičné faktory u daného pacienta bola významná korelácia len s objemom intratorakálneho TT.

Okrem toho autori realizovali kultiváciu bunkových kultúr TT. Išlo o 48 párov biopsií subkutánneho TT, ale aj viscerálneho intratorakálneho TT, pričom 31 osôb bolo obéznych a 17 osôb bolo neobéznych. Kultivácia tukových bunkových kultúr trvala 4 hodiny a preukázala 115 metabolitov z intratorakálneho TT a 116 metabolitov z subkutánneho TT. V prípade 82 metabolitov boli tieto rozdielne produkované z oboch spomínaných typov TT a išlo tu o aminokyseliny, puríny a pyrimidíny, o intermediárne produkty metabolizmu glukózy, ale tiež o mastné kyseliny a sfingolipidy. Sfungolipidy boli najviac produkované v intratorakálnom TT, no a ceramidy, glykosylceramidy a dihydroceramidy boli tiež významne viac produkované v intratorakálnom TT v porovnaní s tukovým tkanivom v lokalite subkutánnej. U obéznych (vs neobéznych) pacientov bol metabolizmus sfingolipidov vysoký, osobitne v intratorakálnom TT, ale bola tu aj vysoká sekrécia ceramidov.

Rozdielna produkcia a sekrécia ceramidov medzi intratorakálnym a subkutánnym TT

Dotýka sa to osobitne sfingolipidov z intratorakálneho TT, hlavne čo do ich úlohy byť endokrinným regulátorom vaskulárnej funkcie. Zistilo sa, že C16:0-ceramid a iné C16:0-sfungolipidy (glykosylceramid, laktosylceramid a dihydroceramid), nie však C16:0 sfingomyelín, boli výrazne secernované v oboch tukových tkanivách, ale 3-násobne viac boli secernované C16:0-ceramid a C16:0-glycosylceramid v intratorakálnom TT.

Sekrécia C16:0-glycosylceramidu bola 2-krát vyššia v intratorakálnom TT oproti subkutánnemu TT.

Adipocyty v intratorakálnom TT produkujú a uvoľňujú sfingolipidy prostredníctvom extracelulárnych vezikul

Autori štúdie izolovali preadipocyty a adipocyty z biopsií intratorakálneho TT (počas kardiochirurgického zákroku) a oba typy adipocytov tvorili sfingolipidy a C16:0-ceramid bol najviac tvorený a secernovaný.

Vysoké hladiny sfingolipidov (v sére, v tkanivách), produkované intratorakálnym tukovým tkanivom asociujú so zvýšenou produkciou superoxidu a s porušenou endotelovou funkciou ciev (v analyzovanej arteria mammaria a tiež vo vena saphena)

Sú to sfingolipidy s touto nepriaznivou prozápalovou aktivitou, ktoré produkuje hlavne intratorakálne TT, ale nie subkutánne TT, ktoré vyvolávajú následne endotelovú dysfunkciu so zníženou dostupnosťou NO, a preto i s podporou progresie aterosklerózy.

Zvýšené hladiny C16:0-ceramidu v plazme osobitne asociujú so zvýšeným arteriálnym oxidačným stresom, s endotelovou dysfunkciou a so systémovým vaskulárnym zápalom

Dotýka sa to osobitne produkcie C16:0-ceramidu v intratorakálnom TT, a nie v subkutánnom TT. Koncentrácia C16:0-ceramidu asociuje aj s hladinou hsCRP v sére (so zápalom), tiež so zvýšenou produkciou superoxidu a s poruchou (znížením) produkcie NO, no a to podporuje endotelovú dysfunkciu.

Priame účinky C16:0-ceramidu na oxido-redukčný stav

C16:0-ceramid v bunkovej kultúre významne zvyšoval produkciu superoxidu, a súčasne znemožňoval podporu produkcie NO (odpojením eNO-syntázy z tejto produkcie). Toto „odpojenie“ eNO-syntázy je v detailoch už tiež definované v biochemickej podrobnej postupnosti.

Plazmatické hladiny C16:0-ceramidu predikujú KV-mortalitu

Pacienti v „prvej“ štúdií boli sledovaní v priemere 5,5 rokov. Vyskytlo sa tu 44 úmrtí a z nich 17 bolo KV-podmienovaných. Významnými prediktormi KV-mortality boli sérové koncentrácie C16:0-ceramidu, C16:0-glycosylceramidu, C16:0/C22:0-ceramidov a C16:0/C24:0 ceramidov – aj po zohľadnení obvyklých KV-rizikových faktorov.

Sérové hladiny C16:0-ceramidu možno modifikovať liečbou liraglutidom (GLP1-RA)

Ide o liečbu, ktorá vedie k preprogramovaniu biológie TT, ale aj nízkokalorická diéta v dlhodobom režime to dokáže. U 32 obéznych osôb (priemerný BMI 33,5) merali v cirkulácii koncentrácie sfingolipidov, pričom pred liečbou (liraglutidom vs placebo) mali všetci pacienti zabezpečenú 8-týždňovú dobu nízko kalorickej diéty (800 kcal/deň) a stratili pritom 12,8 kg. Následná farmakologická liečba trvala 52 týždňov. Výsledky liečby boli nasledovné: C16:0-ceramid a C16:0-glycosylceramid koncentrácie v sére stúpili významne v placebovej podskupine pacientov, ale nezmenili sa v liraglutidovom ramene liečby. Prepokladá sa, že je to v dôsledku metabolického preprogramovania pomocou GLP1-RA.

Posolstvo štúdie

Ceramidy sa javia byť kľúčovými signálnymi molekulami viacerých typov buniek, v ktorých (zdá sa) regulujú vitálne celulárne procesy. Nie je celkom jasné, kde v organizme sa tvoria, ale zdá sa, že u ľudí je to v pečeni a v tukovom tkanive [4,5].

Autori štúdie preukázali, že sfingolipidy sa tvoria u obéznych osôb hlavne v intratorakálnom TT a nie v subkutánnom TT. Spomedzi sfingolipidov je to hlavne C16:0-ceramid, ktorého sa v intratorakálnom TT vytvára najviac a následne sa secernuje prostredníctvom extracelulárnych vezikúl, uvoľňovaných z adipocytov v TT. Kvantita sekrécie C16:0-ceramidu z tukového intratorakálneho tkaniva korelovala s plazmatickou hladinou C16:0-ceramidu.

Ceramidy a ich metabolity sú asociované s KVO [6,7]. Osobitne plazmatická koncentrácia C16:0-ceramidu je asociovaná so zvýšeným rizikom výskytu veľkých KV-príhod, včítane srdcového zlyhávania [8,9], ale aj infarktu myokardu [6,10]. Čo zatiaľ celkom jasné nie je, je tá skutočnosť, či ceramidy (secernované z TT) hrajú aj dôležitú úlohu pri vaskulárnych komplikáciách obezity. V práci [1] autori ukázali, že volum intratorakálneho TT asociuje so zvýšeným arteriálnym oxidatívnym stresom a toto tukové tkanivo secernuje omnoho viacej ceramidov ako subkutánne TT, pričom obvykle ide o C16:0-ceramid. C16:0-ceramidové sérové hladiny asociujú aj s vaskulárnym oxido-redukčným stavom.

Zvýšený vaskulárny oxidatívny stres a redukovaná dostupnosť endotelového NO sú potom kľúčové faktory aterogenézy [16]. NO býva produkovaný pomocou eNO-syntázy a potrebuje k tomu kofaktor tetrahydrobiopterin. Ak nemá spomenutý kofaktor (lebo bol oxidovaný), tak eNO-syntáza potom produkuje superoxid (kyslíkový radikál) [12]. Autori [1] preukázali na ľudských odobratých cievach a následne na in vitro kultivovaných bunkách, že zvýšená sérová hladina C16:0-ceramidu (uvoľňovaného z transtorakálneho TT) zapríčiňuje vzostup oxidatívneho stresu v artériách. Tento efekt je prítomný u ceramidov s dlhým reťazcom, ale nie je u ceramidov so stredne dlhým reťazcom (napr. C12:0 ceramid). Teda C16:0-ceramid je bohato produkovaný v transtorakálnom TT, a ten má priamy vplyv na vývoj aterosklerózy (podporuje ju).

Hoci nálezy autorov [1] našepkávajú, že medzi ceramidmi a vaskulárnou dysfunkciou je kauzálne prepojenie, je treba pridať aj informáciu, že jestvujú práce [6,7], ktoré toto prepojenie podporujú, ale sú aj iné práce [13], ktoré to popierajú. Laaksonen et al [7] v roku 2016 preukázali, že sérová hladina C16:0-ceramidu predikuje výskyt KV-mortality u veľkej skupiny pacientov, u ktorých bola vykonaná koronárna angiografia a relatívne riziko spomenutej predikcie (RR) tu bolo vysoké (až 2-násobné) s RR 1,98 (95% CI 1,49–2,62; $p < 0,001$). V ďalšej štúdii [1] zahrňajúcou 633 pacientov s pokročilou koronárnou aterosklerózou, nakoľko podstupovali výkon aorto-koronárneho bypassu, sa preukázalo, že plazmatická hladina C16:0-ceramidu nezávisle predikovala KV-mortalitu s RR 1,39 (95% CI 1,03–1,89; $p =$

0,031), pričom trvanie sledovania pacientov bolo pozoruhodných 5,5 rokov v priemere.

Jestvujú i práce s liečebným „zásahom“ voči biosyntéze ceramidov [14,15], nie je však ešte jasné, či by zásah vedel reprogramovať vlastnosti tukového tkaniva, a tak by mohol redukovať i KV-riziko, ako to dokázali GLP1-RA [16]. Autori vo svojej štúdii [1] preukázali, že 52-týždňová liečba liraglutidom (predtým aj 8-týždňová prísna nízko-kalorická diéta s dobrou redukciou hmotnosti) upravila plazmatické hladiny C16:0-ceramidu a C16:0-glycosylceramidu v porovnaní s kontrolnou podskupinou pacientov liečených placebom (plazmatické hladiny ceramidov upravené neboli), pričom v oboch podskupinách vždy išlo o obéznych pacientov. Aj v štúdii LEADER (s liraglutidom) sa preukázala lepšia KV-prognóza pacientov na liečbe liraglutidom než na liečbe placebovej.

Tukové tkanivo v hrudníku tvorí, ale aj secernuje ceramidy, obzvlášť typ C16:0-ceramidu. Tieto ceramidy majú endokrinný nepriaznivý prozápalový vplyv na cievnú stenu, včítane zmeny oxido-redukčného stavu. Zmena oxido-redukčného stavu podporuje následne endotelovú dysfunkciu a tiež aterogenézu, a preto asociuje aj s KV-prognózou, včítane KV-mortality. Zdá sa, že GLP1-RA tu naopak pomáhajú.

Literatúra

1. Akawi N, Checa A, Antonopoulos AS et al. Fat-secreted ceramides regulate vascular redox state and influence outcomes in patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2021; 77(20): 2494–2513. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2021.03.314>>.
2. Akoumianakis I, Sanna F, Margaritis M et al. Adipose tissue-derived WNT5A regulates vascular redox signaling in obesity via USP17/RAC1-mediated activation of NADPH oxidases. *Sci Transl Med* 2019; 11(510): eaav5005. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aav5005>>.
3. Margaritis N, Antonopoulos AS, Digby J et al. Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation* 2013; 127(22): 2209–2221. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001133>>.
4. Xia JY, Holland WL, Kusminski CM et al. Targeted induction of ceramide degradation leads to improved systemic metabolism and reduced hepatic steatosis. *Cell Metab* 2015; 22(2): 266–278. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.007>>.
5. Yamaguchi M, Miyashita Y, Kumagai Y et al. Change in liver and plasma ceramides during D-galactosamine-induced acute hepatic injury by LCMS/MS. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14(15): 4061–4064. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.05.046>>.
6. Havulinna AS, Sysi-Aho M, Hilvo M et al. Circulating ceramides predict cardiovascular outcomes in the population-based FINRISK 2002 cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36(12): 2424–2430. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307497>>.
7. Laaksonen R, Ekroos K, Sysi-Aho M, et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J* 2016; 37(25):1967–1976. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehw148>>.
8. Javaheri A, Allegood JC, Cowart LA et al. Circulating ceramide 16:0 in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Coll Car-*

- diol 2020; 75(17): 2273–2275. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2020.02.062>>.
9. Lemaitre RN, Jensen PN, Hoofnagle A et al. Plasma ceramides and sphingomyelins in relation to heart failure risk. *Circ Heart Fail* 2019; 12(17): e005708. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005708>>.
10. Wang DD, Toledo E, Hruby et al. Plasma ceramides, Mediterranean diet and incident cardiovascular disease in the PREDIMED trial (Prevencon con Dieta Mediterranea). *Circulation* 2017; 135(21): 2028–2040. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024261>>.
11. Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2017; 120(4): 713–735. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326>>.
12. Antoniades C, Shirodaria C, Crabtree M et al. Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 2007; 116(24): 2851–2859. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.704155>>.
13. Cavus E, Karakas M, Ojeda FM et al. Association of circulating metabolites with risk of coronary heart disease in a European population: results from the Biomarkers for Cardiovascular risk Assessment in Europe (BiomarCARE) Consortium. *JAMA Cardiol* 2019; 4(12): 1270–1279. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1001/jamacardio.2019.4130>>.
14. Bruce CR, Risis S, Babb JR et al. Overexpression of sphingosine kinase 1 prevents ceramide accumulation and ameliorates muscle insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 2012; 61(12): 3148–3155. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.2337/db12-0029>>.
15. Schiffmann S, Hartmann D, Fuchs S et al. Inhibitors of specific ceramide synthases. *Biochimie* 2012; 94(2): 558–565. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.007>>.
16. Mirani M, Favacchio G, Serone E et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in a real world type 2 diabetes cohort. *Pharmacol Res* 2018; 137: 270–279. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.09.003>>.