

# CMPF:N YHTEYS GLUKOOOSIAINEENVAIHDUNTAAN JA PLASMAN INFLAMMAATIOMERKKIAINEISIIN

Ari Saarinen

Lääketieteen koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos / lääketiede

Huhtikuu 2021

Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Lääketieteen koulutusohjelma

Saarinen, Ari: CMPF:n yhteys glukoosiaineenvaihduntaan ja plasman inflammaatiomerkkiaineisiin

Opinnäytetutkielma, 75 sivua

Ohjaajat: tutkijatohtori Maria Lankinen, professori Ursula Schwab

Huhtikuu 2021

**Asiasanat:** CMPF, furaanirasvahappo, glukoosiaineenvaihdunta, kala, omentiini

CMPF (3-karboksi-4-metyyli-5-propyyli-2-furaanipropaanihappo) on ravinnon furaanirasvahappo, jonka saantia lisää muun muassa runsas kalansyönti. CMPF toimii elimistössä fysiologisilla pitoisuuksilla antioksidanttina, mutta aiemmissa tutkimuksissa sen on osoitettu myös olevan korkeina pitoisuuksina mm. beetasolutoksinen yhdiste ja sen kohonneiden pitoisuuksien on todettu korreloivan mm. prediabeettisten tilojen, kuten IGT (impaired glucose tolerance), IFG (impaired fasting glucose) ja raskausdiabeteksen kanssa. Tämän vuoksi tutkimuksessa oltiin erityisen kiinnostuneita CMPF:n yhteydestä elimistön glukoosiaineenvaihduntaan. Tutkimuksessa käytettiin AlfaKala-tutkimuksen aineistoa (n = 79), jossa oli neljä tutkimusryhmää – rasvaisen kalan ryhmä (n = 20), vähärasvaisen kalan ryhmä (n = 21), ALA-ryhmä (n = 18) sekä verrokkiryhmä (n = 20). Tutkimukseen osallistuneet henkilöt olivat iältään 40-70 -vuotiaita. Tutkimusasetelma oli 12 viikon satunnaistettu ja kontrolloitu interventio. Sisäänottokriteereinä oli normaali tai IFG-tasoinen veren paastoglukoosipitoisuus (5.6-7.0 mmol/l) ja korkeintaan IGT-tasoinen veren glukoosipitoisuus (alle 11.0 mmol/l) oraalisen glukoosirasituskokeen (OGTT) 2h -näytteessä. Poissulkukriteerejä olivat mm. jo todettu diabetes, krooniset intervention toteutuksen estävät sairaudet, vaikea dyslipidemia sekä vaikea ylipaino (BMI yli 32 kg/m<sup>2</sup>). Työssä vertailtiin muun muassa eroja veren CMPF-pitoisuuksissa tutkimusryhmien välillä. Tutkimuksessa osoitettiin CMPF:n saannin korreloivan tutkimuspotilaiden rasvaisen kalan syöntiin tilastollisesti merkitsevästi. Lisäksi tutkittiin CMPF:n yhteyksiä veren eri glukoosiaineenvaihdunnan mittareihin, kuten plasman (paasto)glukoosipitoisuus (OGTT), plasman insuliinipitoisuus sekä erilaisten

glukoosi- ja insuliiniaineenvaihdunnan indeksien kanssa. Tuloksina todettiin, että CMPF:n ja veren erilaisten glukoosiaineenvaihduntaa kuvaavien parametrien ja indeksien välinen korrelaatio oli satunnaista – tilastollisesti merkitseviä ( $p < 0,05$ ) korrelaatioita nähtiin vain muutaman muuttujan kohdalla. Tutkimuksessa CMPF:n todettiin korreloivan yhdessä aikapisteessä myös omentiiniin (omentiini-1), joka on eräs plasman tulehdusmerkkiaine. Muiden tulehdusmerkkiaineiden kanssa tilastollisesti merkitseviä korrelaatioita ei havaittu. Johtopäätöksenä tutkimuksen voidaan katsoa vahvistavan näkemystä siitä, että runsas rasvaisen kalan käyttö ei nosta veren CMPF-pitoisuuksia sellaiselle tasolle, että CMPF toimisi beetasolutoksisena yhdisteenä ja häiritsisi glukoosi- ja insuliiniaineenvaihduntaa.

University Of Eastern Finland, Faculty of Health Sciences

School of Medicine

Medicine

Saarinen Ari: The correlation of CMPF to the Glucose Metabolism and the Inflammatory Markers of Plasma

Thesis, 75 pages

Tutors: Maria Lankinen, PhD, Ursula Schwab, professor

April 2021

**Keywords:** CMPF, furan fatty acid, glucose metabolism, fish, omentin

CMPF (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid) is a furan fatty acid found in diet – especially diets containing a lot of fatty fish increase CMPF's intake. At the physiological concentrations, CMPF functions as an antioxidant, but the previous studies have also shown it to be beta cell toxic at higher concentrations and that at elevated concentrations CMPF has correlations with prediabetic conditions such as IGT, IFG and gestational diabetes. Because of these findings, in this study we were especially interested in the association of CMPF with the glucose metabolism in the body. The data used in the trial was that of the AlfaKala-study (n = 79) that consisted of 4 study groups – fatty fish group (n = 20), lean fish group (n = 21), ALA group (n = 18) and a control group (n = 20). The study subjects included were all 40-70 years old. The study design was a 12 weeks randomized, controlled intervention. The inclusion criteria were normal or IFG-level fasting blood glucose concentration (5.6-7.0 mmol/l) and at a maximum an IGT-level blood glucose concentration (below 11.0 mmol/l) seen at the 2 hour mark of the oral glucose tolerance test (OGTT). The exclusion criteria included, among other things, an already diagnosed diabetes, chronic illnesses that would not allow for the intervention, severe dyslipidemia and significant obesity (BMI over 32 kg/m<sup>2</sup>). This study compared, among other things, the differences in the levels of the blood concentration of CMPF between the study groups. The study showed that the intake of CMPF has a statistically significant correlation with the consumption of fatty fish by the study subjects. The association between CMPF and the various markers of glucose metabolism

such as the plasma (fasting) glucose concentration (OGTT), plasma insulin concentration and various indices of glucose and insulin metabolism over different points in time were also looked at. As a result, it was shown that the observed correlation between CMPF and the different markers of glucose metabolism was not systematic – statistically significant correlations ( $p < 0,05$ ) were only seen for a few variables. In this study, it was also found that CMPF has a correlation with omentin (omentin-1), which is an inflammatory marker found in plasma, at one point in time, which supports the observation that CMPF has an association with omentin. The study found no other statistically significant correlations between omentin and any other inflammatory markers in blood. In conclusion, the study can be seen to support the previous view that ample consumption of fatty fish does not elevate the blood CMPF concentrations to a level at which CMPF would function as a beta cell toxic substance and would interfere with glucose and insulin metabolism.

## SISÄLTÖ

<b>1 Johdanto</b>	<b>2</b>
<b>2 Tausta</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Furaanirasvahapot</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Furaanirasvahappojen rakenne ja luokittelu .....	3
2.1.2 Furaanirasvahappojen yleisyys, lähteet ja saanti .....	4
2.1.3 Furaanirasvahappojen metabolia elimistössä ja erittyminen.....	6
2.1.4 Furaanirasvahappojen antioksidatiiviset vaikutukset.....	7
2.1.5 Furaanirasvahappojen antioksidatiivisten vaikutusten mekanismit ....	8
<b>2.2 CMPF</b> .....	<b>10</b>
2.2.1 Rakenne ja lähteet .....	10
2.2.2 Kulkeutuminen elimistössä sekä erityis .....	11
2.2.3 Ravinnon vaikutus seerumin CMPF-pitoisuuksiin .....	12
2.2.4 Seerumin CMPF-pitoisuudet glukoosinsiedon ollessa normaali.....	13
2.2.5 Seerumin CMPF-pitoisuudet patologisissa tiloissa .....	14
2.2.6 CMPF toksisena metaboliittina uremiassa .....	15
2.2.7 CMPF pro-oksidanttina - AGE- ja ROS-tuotto .....	15
2.2.8 CMPF:n radikaaliadduktit .....	18
2.2.9 CMPF:n yhteys solujen glukoosimetaboliaan.....	18
2.2.10 Yhteys insuliinin eritykseen, insuliiniresistenssiin ja diabetekseen ..	20
2.2.11 CMPF:n vaikutusmekanismit beetasoluihin.....	22
2.2.12 CMPF diabeteksen progredioinnin biomarkkerina .....	25
2.2.13 Muut CMPF:n mahdolliset vaikutukset.....	26
<b>2.3 Matala-asteinen tulehdus</b> .....	<b>26</b>
2.3.1 Adipokiinit.....	27
2.3.2 Omentiini .....	27
2.3.3 Omentiini ja yhteys tulehdukseen .....	28
2.3.4 Yhteys adiponektiiniin, insuliiniherkkyyteen ja tyyppin 2 diabetekseen	28
2.3.5 Yhteys lipoproteiineihin ja lipidiaineenvaihduntaan .....	29
2.3.6 Omentiinin yhteydet lihavuuteen .....	29
2.3.7 Omentiinin vaikutukset sydän- ja verisuonitauteihin.....	31

2.3.8 Omentiini ja PCOS .....	31
2.4 Glukoosiaineenvaihdunta ja diabetes .....	32
2.4.1 Diabeteksen patogeneesi ja riskitekijät .....	32
2.4.2 Lihavuus, insuliiniresistenssi ja diabetes .....	33
2.4.3 Glukotoksisuus .....	33
2.4.4 Lipotoksisuus .....	34
2.4.5 ER-stressi .....	36
2.4.6 Oksidatiivinen stressi (ROS-tuotanto) ja diabetes.....	36
2.4.7 Mitokondriaalinen dysfunktio .....	38
2.4.8 Apoptoosi ja autofagia DM:ssä .....	38
2.4.9 AGE-tuotteet ja diabetes .....	39
2.4.10 Inflammatio ja diabetes .....	39
2.4.11 Glukoosi- ja insuliiniaineenvaihdunnan mittarit.....	39
2.6 Metabolomi ja metabolomiikka .....	40
2.6.1 Metabolomiikkatutkimuksessa käytetyt tekniikat .....	41
2.6.2 Metaboliittien tunnistaminen.....	41
2.6.3 Kohdentamaton vs. kohdennettu metabolominen tutkimus.....	42
2.6.4 Metabolomisen tutkimukset haasteet .....	42
3 Aineisto ja menetelmät .....	43
3.1 Tutkimuksessa käytetyt ruokavaliot.....	43
3.2 Mittaukset ja näytteiden otto .....	44
3.3 Metabolomiikka, massaspektrometria .....	44
3.4 Tietojen käsittelyssä ja analyysissä käytetyt ohjelmistot.....	45
4 Tulokset .....	46
5 Pohdinta .....	52
5.1 Aineisto, tutkimusasetelma ja menetelmät.....	52
5.2 Kirjallisuus ja tulokset .....	54
5.3 Johtopäätökset .....	55





# 1 Johdanto

CMPF (3-karboksi-4-metyyli-5-propyyli-2-furaanipropaanihappo) on viime vuosina mielenkiinnon kohteeksi noussut furaanirasvahappometaboliitti, jonka pitoisuuksien elimistössä on mm. todettu korreloivan kalan (etenkin rasvaisen) syöntiin (Hanhineva ym., 2015) sekä olevan yhteydessä tyyppin 2 diabeteksen (T2D) ilmentymiseen (Koppe et Poitout, 2016; Liu ym., 2016). CMPF:n kohdalla on ollut mielenkiintoista myös se, että se toisaalta vaikuttaa yhdistyvän hyvään terveyteen ja terveellisiin elämäntapoihin – CMPF:ää on runsaasti kalassa (Vetter ym., 2013; Guertin ym., 2014) ja mm. vihreissä kasviksissa (Hannemann ym., 1989; Guertin ym., 2014) – mutta toisaalta se kohoaa patologioissa kuten T2D:n eri muodoissa (Koppe et Poitout, 2016; Liu ym., 2016) sekä mm. munuaisen toiminnanhäiriöissä (Koppe ym., 2016). Tässä työssä on pyritty analysoimaan CMPF:n korrelaatioita ja käyttäytymistä yhteydessä terveyteen ja etenkin glukoosiaineenvaihduntaan tutkimushenkilöillä, jotka ovat osallistuneet kalan ja kasviöljyn vaikutuksia selvittävään tutkimukseen (Alfa-Kala). Taustaosiossa on huomioitu kaikki CMPF:ää koskeneet aiemmat tutkimukset merkittävine korrelaatioineen melko kattavasti, jotta lukijalle muodostuisi mahdollisimman kattava kuva CMPF:n merkityksestä mahdollisena uutena elimistön glukoosiaineenvaihdunnan merkkiaineena. Työssä CMPF:n todettiin korreloivan joihinkin glukoosiaineenvaihdunnan mittareihin ja indekseihin, tosin nämä yhteydet olivat pääosin satunnaisia. Toisaalta työssä havaittiin, että runsaskaan CMPF:n saanti / plasmapitoisuudet liittyen kalan syöntiin ei näytä haittaavan glukoosiaineenvaihduntaa. Toinen merkittävä yhteys, mikä työssä nähtiin, oli CMPF:n tilastollisesti merkitsevä korrelaatio omentiiniin. Omentiini-1 on adiposytokiini, jolla on vaikutusta tulehdukseen ja edelleen sitä kautta tulehdukseen linkittyviin sairauksiin, kuten sydän- ja verisuonisairaudet sekä T2D. Glukoosin ja insuliinin metabolia taas liittyy suoraan vahvasti diabeteksen eri muotoihin (T2D, raskausdiabetes ja prediabetes). Taustassa käydään läpi aiempi tutkimustieto furaanirasvahapoista mukaan lukien CMPF sekä siihen linkittyvät keskeiset osa-alueet – glukoosiaineenvaihdunta ja matalasteinen tulehdus.

## 2 Tausta

### 2.1 Furaanirasvahapot

Furaanirasvahapot (F-hapot, engl. F-acids, furan fatty acids, furanoid fatty acids) ovat luonnossa yleisesti esiintyviä rasvahappoja, joita esiintyy myös ihmisen ravinnossa. Luonnossa F-happoja löytyy mm. kaloista (Gunstone ym., 1978), nisäkkäistä (Schödel ym., 1987), äyriäisistä (Ishii ym., 1988) sekä matelijoista (Ishii ym., 1988). F-happoja on löydetty myös mm. meren bakteereista (Carballeira ym., 2000), levistä (Batna ym., 1993), hiivoista (Guth et Grosch, 1992) sekä sienistä (Hannemann ym., 1989). Ensimmäinen tunnistettu F-happo todennäköisesti oli erään kasvin siemenöljystä vuonna 1966 löydetty furaanirasvahappo (Morris ym., 1966). Tämän jälkeen F-happoja on löydetty mm. eri kalalajeista (Glass ym., 1975; Gunstone ym., 1978; Ishii ym., 1988). Syy, miksi F-hapot löydettiin niin myöhään, johtunee osin siitä, että kaasukromatografiassa niiden retentioajat ovat hyvin lähellä eräitä tyydyttymättömiä rasvahappoja (kuten 22:3n-3) (Smith, 2012).

#### 2.1.1 Furaanirasvahappojen rakenne ja luokittelu

Furaanirasvahapot (furaanikarboksyylihapot eli F-hapot) ovat yleensä tri- tai tetrasubstituoituja (useita alkyyliryhmiä sisältäviä) heterosyklisiä furaanijohdannaisia, mistä johtuen furaanihappojen synteesi on usein monimutkaista ja vaatii useita vaiheita (Spiteller, 2005). Kaikissa F-hapoissa perusrakenteena on furaanirengas (Spiteller, 2005). Yleisimmät furaanirasvahapot ovat toistensa dimetyyli- tai monometyylisubstituoituja homologeja, mutta myös jonkin verran ei-metyloituja furaanirasvahappoja on löydetty mm. kaloista (Vetter ym., 2016).

Kaikkien furaanirasvahappojen synteesiä ei tunneta vielä kovin tarkkaan, mutta tiedetään, että F-hapot syntyvät PUFA-rasvahapoista. Alun perin uskottiin, että kaikki F-hapot syntyvät LA:sta, mutta nykyisin tiedetään, että kaikki pentyylisivuketjuiset F-hapot syntyvät lipidiperoksidaatiolla linolihaposta (LA, 9,12-oktadekadienihappo) ja kaikki propyyllisivuketjuiset F-hapot 9,12-heksadekadienihaposta (Batna ym., 1993). Kaikki muut F-hapot voidaan ilmeisesti syntetisoida lisäämällä näihin näin syntyneisiin F-happohin hiiliä (asetaatia-ryhmiä) (Smith, 2012). On myös todettu, että konjugoidun LA:n eli CLA:n oksidaatio tuottaa F-happoja, jotka ovat konjugoituja

dieneja (erilaisia epoksi-oktadekadienihappoja) – näin ollen on mahdollista, että konjugoidut dieenit (muutkin kuin CLA) voisivat toimia F-happojen prekursoreina (Yurawecz ym., 1995). Kaikissa F-hapoissa on furaanirengas, joten myös pelkkä furaani voi toimia F-happojen prekursorina. Esimerkiksi F-happo F5:a on onnistuttu syntetisoimaan furaanista viiden vaiheen reaktiossa (Bach et Krüger, 1999).

Etenkin tetra-alkyyli-substituoitu furaanirengas on hyvin reaktiivinen ja erittäin harvoin luonnossa – muutoin kuin furaanirasvahapporakenneosana - esiintyvä rakenne (Ishii ym., 1988). Furaanirengas on elektronirikas (Okada ym., 1990) ja hapettuu helposti, jolloin renkaaseen muodostuu dioksoeenirakenne, joka on hyvin reaktiivinen (Spiteller, 2005; Ishii ym., 1988). Tästä johtuen luonnon F-hapot on hyvin epästabiileja ja tätä rakennetta (tetra-alkyyli-substituoitu furaanirengas) ei juuri luonnossa esiinny muualla kuin F-happojen rakenteessa (Spiteller, 2005). Glass ym. mukaan F-hapot on nimetty juoksevan numerojärjestyksen mukaan niiden eluaatioajan mukaan siten, että F-happo, jolla on lyhin eluaatioaika, on saanut nimekseen F1 (Smith, 2012). Rahn ym. suosittaa vaihtoehtoista tapaa, jossa sivuketjujen pituudet listataan ja etuliitteeksi laitetaan joko Me tai DiMe sen mukaan, onko kyse metyyli-furaani- vai ko dimetyyli-furaanirasvahaposta. Näin ollen esim. F5 olisi MeF(11,5). (Smith, 2012). Vetter ym. puolestaan suosii tapaa, jossa etuliitteen sijasta käytetään vain yhtä kirjainta kertomaan, onko kyse dimetyyli- (D) vai ko metyyli-furaanista (M) – Vetterin nomenklatuurilla esim. F5 esitetään muodossa 11M5 (Smith, 2012). Vetterin tavan käyttöä tukee se, että viime vuosina löydetty tyydyttymättömätkin F-hapot on helppo nimetä tällä notaatiolla esim. 9M5:1 (Smith, 2012). F-hapoissa F1-F8 on lyhimät sivuketjut ja niitä pidetään yleisimpinä F-happoina, mutta näiden lisäksi on löydetty myös hyvinkin pitkäketjuisia (jopa 20 hiilen sivuketjuja) tyydyttymättömiä F-happoja (Ciminiello ym., 1991).

### **2.1.2 Furaanirasvahappojen yleisyys, lähteet ja saanti**

Vaikka kasvien ja merieläinten F-happopitoisuudet ovat yleensä matalia, niitä on löydettävissä monista eri kasveista ja kalalajeista (Hannemann ym., 1989; Glass ym., 1975; Ishii ym., 1988). F-happoja muodostuu pääosin levissä, mutta myös kasvit sekä jotkin pieneliöt näyttäisivät kykenevän niitä syntetisoimaan (Spiteller, 2005). Koska kalat ja monet meren eliöt käyttävät näitä

leviä ja pieneliöitä kuten fytoplanktoneja ravintonaan, niin onkin loogista, että ihmisen ravinnon lähteistä F-happoja löytyykin eniten juuri kalasta (Vetter ym., 2013), joiden elimistöön F-happoja päätyy osana niiden ravintoa (Spiteller, 2005). Kaloissa F-hapot päätyvät osaksi fosfolipidejä (pääosin veren solujen lipideissä) ja kolesteroliestereitä (maksan lipideissä) (Spiteller, 2005; Ishii ym., 1998). Myös äyriäisissä on paljon erilaisia F-happoja – esim. eräässä tutkimuksessa pelkästään yhden äyriäislajin maksan ja haiman lipideistä löydettiin 30 erilaista F-happoa (Okajima ym., 1984). Kasvit syntetisoivat F-happoja PUFA:sta, kuten linolihaposta (LA) (Batna ym., 1993) ja kaikista yleisin luonnossa tavattava F-happo onkin juuri pentyyilisivuketjuinen F6, jota syntetisoidaan LA:sta (Spiteller, 2005).

Ihmisen ravinnossa kasvipärisiä F-happoja on kalan lisäksi esim. voissa (Guth ja Grosch, 1992) ja neitsytoliiviöljyssä (Boselli ym., 2000). Wahl ym. (2014) tutkivat mm. voin, maidon sekä 10 ravintoöljyn furaanirasvahappoja löytäen 14 eri F-happoa mm. maapähkinäöljystä, auringonkukkaöljystä ja hasselpähkinäöljystä (Wahl ym., 2014). F-happoja (mm. F5, F7 ja F10) on löydetty myös soijaöljystä, rapsiöljystä ja maissiöljystä (Wahl ym., 2014). Esim. pelkästään voista on löydetty 9 eri F-happoa (Wahl ym., 1992) ja oliiviöljystä ainakin 4 eri F-happoa (Boselli ym., 2000).

Erityisesti lohikaloissa on raportoitu olevan runsaasti F-happoja (Glass ym., 1975), mikä tukee havaintoja siitä, että F-happojen ja EPA:n pitoisuudet kulkevat usein käsi kädessä (Pacetti ym., 2010). Erään tutkimuksen mukaan F-happoja on tavattu joissakin kalalajeissa 30 mg / 100g (Pacetti ym., 2010) eli vaikka pitoisuudet ovat eikosapentaeenihappo- (EPA, C20:5n-3) ja dokosaheksaeenihappo- (DHA, C22:6n-3) pitoisuuksia paljon pienempiä, niin täysin mitättömistä pitoisuuksista ei F-happojen kohdalla ole kyse. Lisäksi, kuten myöhemmin todetaan, F-hapot ovat hyvin potentteja antioksidanteja (ks. luku 2.1.4), jolloin ne voivat pieninäkin pitoisuuksina olla monella tapaa hyödyllisiä. Kalaöljysupplementeissa on F-happoja kuten kalassakin, mutta kalaöljyssä Vetter ym. totesivat F-happoja olevan sekä pitoisuuksiltaan että määrällisesti (tutkimuksessa eri kalaöljykapseleista löydettiin yhteensä vain 7 erilaista F-happoa) vähemmän (Vetter ym., 2012) eli kala vaikuttaisi olevan kalaöljylisiä tehokkaampi furaanihappojen lähde. Maidossa on F-happoja jonkin verran ja ilmeisesti näistä ainakin osa kulkeutuu ihmiselimistöön muuttumattomana, sillä esim. ihmisen veren soluista (punasoluista ja trombosyyteistä) on

löydetty normaalisti maidossa esiintyviä furaanirasvahappoja F10 ja F8 (Wahl ym., 1994). Lisäksi äidinmaidosta on löydetty F-rasvahappoa F10 (Wahl ym., 1994).

Kaloissa F-happoja on havaittu kaikissa kalan eri kudoksissa (Spiteller, 2005), mutta etenkin kalan maksassa (Gunstone ym., 1978; Hammann ym., 2015). Nisäkkäillä, kuten ihmisellä, F-happoja on ainakin sekä maksassa että veressä – maksassa esteröitynä mm. kolesteroliin, veressä puolestaan osana fosfolipidejä (Spiteller, 2005). Kasveissa F-hapot ovat pääosin kiinni fosfolipideissä (Spiteller, 2005). F-happojen samankaltaisuus PUFA-rasvahappojen kanssa selittää sen, miksi PUFA-rasvahappojen tavoin myös F-hapot ovat usein osana fosfolipidejä (F-hapot voivat korvata PUFA:n fosfolipidissä). Se, että levät ja kasvit ovat F-happojen ainoita tuottajia, selittää sen, miksi kaloissa ja mereneliöissä F-happoja on yleensä enemmän kuin nisäkkäissä, koska merten ravintoketjuissa levien ja fytoplanktonin rooli on suuri verrattuina esim. nisäkkäiden ravintoon (Smith, 2012).

Huolimatta furaanirasvahappojen yleisyydestä luonnossa ja jopa ihmisen ravinnossa niiden saanti voi kuitenkin olla vähäistä johtuen F-happojen korkeasta reaktiivisuudesta (furaanirengasrakenne) (Wakimoto ym., 2011). Esimerkiksi hyvin todennäköisesti kalan käsittely, kuten kuumennus, tuhoaa F-happoja tehokkaasti (Wakimoto ym., 2011). Ravinnon käsittely sekä teollinen tuotanto vaikuttaisivat muutenkin vähentävän furaanirasvahappojen saantia – mm. Vetter ym. ovat todenneet, että luomuvoin furaanirasvahappopitoisuus on jopa kaksi kertaa tavallista voita korkeampi (Vetter ym., 2012). Toisaalta on huomioitava, että furaanirasvahappojen saannille ei ole olemassa saantisuosituksia, joten saannin riittävyttä on vaikea arvioida terveyden kannalta.

### **2.1.3 Furaanirasvahappojen metabolia elimistössä ja erittyminen**

Furaanirasvahapoissa (furaanikarboksylihapoissa) on joko pentyyli- tai propyyilisivuketju (Glass ym., 1975). Hannemann ym. totesivat pentyylisivuketjuisten furaanirasvahappojen saannin (ravinnosta) korreloivan niiden pilkkoutumistuotteiden pentyyliuofuraanihappojen (Glass ym., 1975) erityksen kanssa, josta voitiin päätellä, että elimistö ei kykene endogeenisten pentyylifuraanirasvahappojen synteesiin vaan ainoa furaanirasvahappojen, joissa on pentyylisivuketju, lähde ovat eksogeeniset furaanirasvahapot (Hannemann ym., 1989).

Propyyllisivuketjuisten urofuraanihappojen erityis virtsaan vaikuttaisi olevan sirkadiaanista ja ei korreloi niin tiiviisti propyyllisivuketjuisten furaanirasvahappojen saantiin ravinnosta (Hannemann ym., 1989). Näin ollen on mahdollista, että propyyllisivuketjuisia furaanirasvahappoja syntyisi myös jostakin endogeenisestä lähteestä (Hannemann ym., 1989).

#### **2.1.4 Furaanirasvahappojen antioksidatiiviset vaikutukset**

Furaanirasvahapoilla on todettu antioksidatiivisia vaikutuksia - niiden mm. on todettu suojelevan PUFA:a lipidiperoksidaatiolta (Spiteller ym., 2005, Vetter ym., 2013). Batna ym. ovatkin osoittaneet, että F-hapot suojelevat mm. LA:a hapettumiselta erittäin tehokkaasti (Batna ja Spiteller, 2000). Kasveissa F-hapot voivat lisäksi suoraan toimia PUFA-rasvahappojen korvaajina erilaisissa solurakenteissa samankaltaisen rakenteensa vuoksi (Spiteller, 2005). Pacetti ym. (2010) ovatkin raportoineet EPA:n ja F-happopitoisuuksien välisestä yhteydestä kaloissa - esim. F6-furaanirasvahapolla ja EPA:lla on positiivinen korrelaatioym, mikä tukee näkemystä siitä, että F-hapoilla on tärkeä rooli juuri PUFA-rasvahappojen peroksidaation estäjinä. Roolinsa kautta F-hapoilla saattaa olla olla rooli solujen suojautumismekanismina oksidatiiviselta stressiltä. Esim. rottakokeissa on todettu, että juuri furaanirasvahappo F6 kykenee suojelemaan aivojen astrogliomasoluja vetyperoksidialtistuksen aiheuttaman oksidatiivisen stressin aikaan saamalla solukuolemalta (Teixeira ym., 2013).

Koska F-hapot ovat rakenteellisesti PUFA:n kaltaisia ne esiintyvät usein solukalvorakenteissa, jotka ovat usein paikkoja, joissa lipidiperoksidaatiota tapahtuu - myös tämän vuoksi ne ovat todennäköisesti arvoikkaita radikaalinsieppaajia (Smith, 2012). Viherkasveissa F-happoja on etenkin kasvien vihreissä osissa - missä kaikki tärkeät happiradikaaleja tuottavat reaktiot tapahtuvat - mikä on myös osoitus siitä, että F-happojen pääasiallinen rooli on juurikin toimia osana antioksidanttipuolustusta (Smith, 2012).

Tämä F-happojen tehokas kyky siepata radikaaleja voikin osin selittää kalan ja kalaöljyjen mahdolliset mm. sydän- ja verisuonitaudeilta suojaavat ominaisuudet (Spiteller ym., 2005). Rakenteensa ja kemiallisten ominaisuuksiensa vuoksi F-hapot todennäköisesti kykenevät toimimaan osana antioksidanttipuolustusta solukalvoilla mm. orgaanisia peroksiedeja ja

hydroksyyli-radikaaleja vastaan (Okada ym., 1996). Wakimoto ym. ovat todenneet kokeessaan, että rotilla F-hapon etyyliesteri aikaan sai voimakkaan anti-inflammatorisen vasteen, joka vastasi EPA-etyyliesterin vastaavaa aktiivisuutta (Wakimoto ym., 2011). Ilmeisesti kuitenkin, koska F-happoja on kalassa määrällisesti niin paljon vähemmän kuin n-3 PUFA-rasvahappoja ja niiden löytämiseen on liittynyt alussa kuvattuja vaikeuksia, niin F-happojen antioksidatiivinen rooli on jäänyt hyvin pitkälti EPA:n varjoon (Wakimoto ym., 2011).

### **2.1.5 Furaanirasvahappojen antioksidatiivisten vaikutusten mekanismit**

Furaanirasvahapoille ominainen rakenne on heterosyklinen tetra-alkyyli-furaanirengas, jolle tyypillistä on se, että se voi kaapata kaksi radikaalia (Spiteller, 2005; Vetter ym., 2013). F-hapot ovatkin erittäin tehokkaita radikaalien sieppaajia (Spiteller, 2005). Radikaalin hyökätessä furaanirengaan kimppuun syntyy väliaikainen furaaniradikaali, joka muodostaa furaanirengaan auetessa hyvin stabiilin mesomeerisen radikaalin (Smith, 2012). Juuri tämä stabiilius mahdollistaa sen, että furaanirengas voi siepata vielä toisenkin radikaalin (esim. alkoksiradikaalin, jolloin muodostuu dienoni) (Smith, 2012). F-hapot reagoivat herkästi peroksyyliradikaalien kanssa, jolloin muodostuu kaksi karbonyyliryhmää sisältäviä, kaksoisidoksellisia yhdisteitä (Spiteller ym., 2005). F-happojen voimakkuutta radikaalin sieppaajina (etenkin singlettihapen) kuvastaa hyvin myös se, että F-happojen kykyä radikaalin sieppaukseen pidetään yhdenvertaisen tai jopa parempana kuin esim. alfa-tokoferolin tai askorbaatin (Okada ym., 1996). F-hapot estävät lipidiperoksidaatiota - joka on oksidatiivisen stressin yksi tärkeä taustatekijä (Batna et Spiteller, 2000; Vetter ym., 2013; Spiteller ym., 2005; Wakimoto ym., 2011). Vaikka in vitro F-happojen antioksidatiiviset ominaisuudet on vahvistettu, on huomattava, että in vivo -näyttöä F-hapoista ei kuitenkaan ole niin paljon (Wakimoto ym., 2011).

On huomattava, että F-happojen tehokas antioksidatiivinen vaikutus edellyttää, että F-happojen furaanirengasrakenne on intakti (Teixeira, 2013) – ravinnon F-happojen rakenne voi kuitenkin muuttua käsittelyn myötä (Wakimoto ym., 2011), mikä voi negatiivisesti vaikuttaa F-happojen kykyyn siepata radikaaleja. Erityisesti alkoksiradikaalit hyökkäävät herkästi kaksoisallyylisten (engl. doubly allylic) PUFA:jen (kaksoisallyyiset yhdisteet ovat erityisen herkkiä radikaalien hyökkäyksille ja voivat muodostaa ns. allyylisiä radikaaleja) kimppuun, jolloin muodostuu suhteellisen vakaita

alkyyliiradikaaleja, mutta jotka voivat edelleen reagoida singlettihapen kanssa muodostaen peroksiradikaaleja ( $\text{LOO}\cdot$ ) (Smith, 2012). Peroksiradikaalit voivat edelleen reagoida joko lähellä olevien PUFA-rasvahappojen kanssa, jolloin muodostuu lipidivetyperoksiedeja ( $\text{LOOH}$ ), tai voivat propagoida lisää  $\text{LOO}\cdot$ -radikaaleja (Smith, 2012).

Peroksyyliradikaalit voivat aiheuttaa huomattavaa vahinkoa soluille mm. vaurioittamalla kaksoissidoksellisia yhdisteitä, kuten kolesteroli, LA, alfa-linoleenihappo (ALA), gamma-linoleenihappo (GLA) sekä öljyhappo, jolloin näistä muodostuu reaktiivisia epoksiedeja, jotka ovat toksisia itsessään tai ne voivat muodostaa toksisia yhdisteitä (Spiteller, 2005). Koska peroksyyliradikaalit preferentiaalisesti hyökkäävät juuri usein F-happojen kimppuun, on hyvin todennäköistä, että F-hapoilla on merkittävä rooli osana antioksidatiivista puolustusjärjestelmää (Spiteller, 2005).

Lipideissä voi aina tapahtua autoksidaatiota (peroksidaatiota) – autoksidaatio on jonkin radikaalin käynnistämä ketjureaktio, joka saa aikaan rasvan tai öljyn hapettumisen (Frei, 1994). Reaktiossa syntyy yleensä lopputuotteena lipidivetyperoksiedeja, mistä syystä reaktiota kutsutaan usein lipidiperoksidaatioksi (Frei, 1994). Lipidiperoksidaatio on yksi tunnetuimmista vapaiden radikaalien aiheuttamista ketjureaktioista, jota voi tapahtua aina, kun rasva tai öljy altistuu hapelle (Frei, 1994). Lipidiperoksidaatio on siis radikaalien aikaan saama reaktio, jossa usein etenkin alkoksiradikaalit hyökkäävät herkästi kaksoisallyylisten PUFA:n, kuten LA:n kimppuun, jolloin muodostuu suhteellisen vakaita alkyyliiradikaaleja, mutta jotka reagoidessaan singlettihapen kanssa muodostavat peroksiradikaaleja ( $\text{LOO}\cdot$ ) (Smith, 2012). Kaksoisallyyliset vetyatomit ovat PUFA-rasvahapoille tyypillinen rakenne, jossa kahden hiili-hiilikaksoissidoksen väliin jää kaksi yksittäistä vetyatomia (Frei, 1994). LA sekä arakidonihappo (AA) ovat tyypillisiä PUFA:ja, joissa on kaksoisallyylinen rakenne. Kaksoisallyyliset yhdisteet ovat rakenteensa vuoksi erityisen alttiita radikaalien hyökkäyksille, koska peroksyyliradikaalit kykenevät abstraktoimaan kaksoisallyyliset vetyatomit nopeammin kuin yksittäin esiintyvät allyyliset vetyatomit, mistä syystä PUFA:t hapettuvat paljon nopeammin kuin esim. MUFA:t (Frei, 1994). Onkin huomionarvoista, että rasvahapoissa, joissa on vain yksi kaksoissidos (ts. MUFA:t kuten esim. öljyhappo 18:1n-9), ei



tapahdu ollenkaan lipidiperoksidaatiota (lukuunottamatta PUFA-rasvahappojen oksidaation yhteydessä mahdollisesti tapahtuvaa MUFA-rasvahappojen ko-oksidaatiota) (Frei, 1994).

## 2.2 CMPF

CMPF on furaanirasvahappojen endogeeninen metaboliitti, jonka tasot ihmisellä korreloivat vahvasti etenkin rasvaisen kalan syöntiin (Hanhineva ym., 2015). CMPF:n on todettu kohoavan sekä raskausajan diabeteksessa, tyypin 2 diabeteksessa että prediabeteksessa (Prentice ym., 2014). In vivo -glukoosirasituskokeissa kuten myös in vitro kokeissa (sekä ihmisten että hiirten beetasoluilla) on todettu, että korkeat CMPF-pitoisuudet ovat yhteydessä heikentyneeseen beetasolujen toimintaan (Prentice ym., 2014). On ristiriitaista, että CMPF:n kohonneet pitoisuudet on yhdistetty beetasolujen toiminnan heikentymiseen, vaikka kalaa pidetään osana terveellistä ruokavaliota ja kalan syönnin on monissa tutkimuksissa todettu jopa suojaavan tyypin 2 diabetekselta (Patel ym., 2009; Nkondjock ym., 2003; Rylander ym., 2014).

### 2.2.1 Rakenne ja lähteet

Lyhenteellä CMPF voidaan tarkoittaa joko propyyilisivuketjuista (3-karboksi-4-metyyli-5-propyyli-2-furaanipropaanihappo) tai pentyylisivuketjuista (3-karboksi-4-metyyli-5-pentyyli-2-furaanipropaanihappo) muotoa. Hanhineva ym. (2015) ovat todenneet runsaasti rasvaista kalaa sisältävän ruokavalion suurentavan näiden molempien tasoja tilastollisesti merkitsevästi, mutta erityisesti propyylisivuketjuisen CMPF:n pitoisuutta (propyylisivuketjuisen tason muutos Hanhinevan ym. (2015) interventiossa oli 2.56-kertainen verrattuna pentyylisivuketjuisen muodon vain 1.22-kertaiseen muutokseen). Hanhinevan ym. mukaan CMPF korreloi ravinnon - erityisen hyvin ravinnon rasvaisen kalan kulutuksen - kanssa, josta voidaan arvella CMPF:n olevan ihmisen metaboliialle endogeeninen furaanirasvahappometaboliitti, jonka määrä riippuu prekursorina toimivien F-happojen saannista ravinnosta. Hannemann ym. (1989) ovat kuitenkin todenneet, että propyylisivuketjuisen CMPF:n pitoisuus ei korreloi niin hyvin eritettyjen urofuraanien määrään kuin pentyylisivuketjuisten CMPF:n, joten on mahdollista, että propyylisivuketjuista CMPF:a muodostuisi elimistössä myös jonkin verran jostakin endogeenisestä furaanirasvahappolähteestä. Koska propyylisivuketjuinen CMPF näyttää assosioituvan

vahvemmin näistä kahdesta sekä kalan syötiin että tässä työssä käsiteltäviin patologioihin (kuten T2D), niin jatkossa tässä työssä CMPF:llä tarkoitetaan nimenomaan 3-karboksi-4-metyyli-5-propyyli-2-furaanipropanihappoa, jollei muuta mainita.

CMPF on metaboliitti, joka on siis hyvä biomarkkeri kalan syönnille (Hanhineva ym., 2015). Tutkimuksessa, jossa vertailtiin eri ruokavalioiden vaikutuksia plasman eri metaboliitteihin, todettiin, että etenkin rasvaisen kalan syönnin korrelaatio plasman CMPF:n kanssa oli vahvempi kuin EPA:lla ja DHA:lla, joita molempia on perinteisesti pidetty hyvinä kalankulutuksen biomarkkereina (Hanhineva ym., 2015). CMPF kuuluu furaanihappoihin, joita ravinnossa on erityisen runsaasti kalassa, mutta pieniä määriä muun muassa myös vihreissä kasviksissa, sienissä, levässä, kalaöljyissä sekä voissa (Vetter ym, 2013; Hannemann ym, 1989). Nämä muut furaanirasvahappojen lähteet eivät näyttäisi kuitenkaan vaikuttavan plasman furaanihappometaboliitin CMPF:n tasoon niin paljon kuin kala (Hanhineva ym., 2015). CMPF:ää syntyy PUFA-rasvahapoista furaanirasvahappojen metabolian kautta (Batna ym., 1993). PUFA-rasvahappojen kuumentaminen - esimerkiksi kalan paistaminen - lisää furaanirasvahappometaboliittien muodostumista (Koppe ja Poitout, 2016).

Hannemann ym. (1989) totesivat, että normaalin ravinnosta saatavien F-happojen saanti vaikuttaa pieneltä verrattuna F-happojen metaboliassa syntyvien urofuraanihappojen määrään (Glass ym., 1975; Groweiss et Kashman, 1978; Okajima ym., 1984), mutta tässä todennäköisesti syynä on voinut olla se, että Hannemann ym. käyttivät tutkimuksessaan vain yhden päivän aikana nautittuja aterioita (n = 3) ja joiden vaikutusta virtsaan seurattiin 5 päivän ajan – ehkäpä useamman päivän ajalta nautittujen aterioiden kokonaisfuraanirasvahappopitoisuudet olisivat osoittaneet selkeämmän korrelaation. Neljän viikon kalaöljylisän käyttö kolminkertaisti CMPF:n seerumipitoisuuden ja lähes kuusinkertaisti CMPF:n pitoisuuden virtsassa (Wahl ym., 1992).

### **2.2.2 Kulkeutuminen elimistössä sekä erityis**

CMPF:n pitoisuuksia eri tutkimuksissa on pääosin mitattu koehenkilöiden verestä, mutta hiirikokeissa on todettu CMPF:n pitoisuuden kohoavan eksogeenisen CMPF:n annon myötä myös munuaisissa, maksassa, luustolihaksessa, rasvakudoksessa sekä haimassa (Prentice ym., 2014),

joten on todennäköistä, että myös ihmisillä CMPF ei ainoastaan esiinny verenkierrossa, vaan CMPF:a aktiivisesti kulkeutuu myös muihin kudoksiin, mitä tukevat havainnot CMPF:a soluihin kuljettavista transporttereista mm. maksassa, aivoissa sekä erityisesti haiman beetasoluissa (Prentice ym., 2014). Virtsaan CMPF:n tiedetään erittyvän kaksoisemäksisinä urofuraanihappoina (Deguchi ym., 2005). Virtsaan CMPF erittyy normaalisti munuaisten proksimaalisten tubulussolujen OAT- (organic anionic transporter) kuljetusproteiinien kautta (Tsutsumi ym., 2002). CMPF:n kulusta solun sisälle ja solusta ulos vastaavat OAT1 (proksimaalisissa tubulussoluissa), OAT3 ja NaDC3 (kaikki kolme kuljettavat CMPF:ää solujen sisään) – näistä sekä OAT3:sta että NaDC3:sta ilmenee pääosin juuri insuliiniposiitivisissa soluissa (haiman beetasolut) (Prentice ym., 2014). Soluista ulos CMPF:a kuljettaa OAT4 (esim. proksimaalisissa tubulussoluissa) (Prentice ym., 2014).

OAT3:n uskottiin aiemmin sijaitsevan vain proksimaalisten tubulussolujen basolateraalilla solukalvoilla, mutta Prentice ym. (2014) osoittivat, että OAT3:sta esiintyy erityisen paljon myös juuri beetasoluissa (Prentice ym., 2014). On tärkeä huomata, että siinä missä beetasoluissa on runsaasti OAT3-transportteja, joita pitkin CMPF kulkee beetasoluihin, niin vastaavasti OAT4:sta (reseptori, jonka kautta CMPF kulkee soluista ulos) ei ilmennyt beetasoluissa lainkaan – toisin sanoen, CMPF:tä pääsee sisälle beetasoluihin, mutta ei lainkaan ulos, mikä tekee beetasoluista erityisen herkkiä CMPF:n kohonneille pitoisuuksille (Prentice ym., 2014).

### **2.2.3 Ravinnon vaikutus seerumin CMPF-pitoisuuksiin**

Hanhineva ym. totesivat hyvin vahvan positiivisen korrelaation runsaasti rasvaista kalaa ja marjoja sisältävän suomalaisille tavanoimaisen ruokavalion ja CMPF:n välillä (Hanhineva ym., 2015). Myös vähärasvainen kala sekä marjat näyttivät korreloivan CMPF:n kanssa (Hanhineva ym., 2015), mutta heikommin kuin rasvainen kala - rasvaisen kalan korrelaatio plasman CMPF-tasoon oli viisi kertaa voimakkaampi (Hanhineva ym., 2015). Nämä havainnot ovat linjassa aiemman tutkimustiedon kanssa: lohikalat (rasvaiset kalat) sisältävät erityisen paljon furaanirasvahappoja (Glass ym., 1975), kun taas kasvikunnan tuotteissa pitoisuudet ovat lohikaloja huomattavasti matalammat (Hannemann ym., 1989; Spiteller, 2005). Hanhinevan ym. interventiossa 12 viikon interventio suurensi terveellistä, runsaasti rasvaista kalaa ja marjoja nauttineiden tutkittavien CMPF-tasoa

merkitsevästi verrattuina verrokkeihin (Hanhineva ym., 2015). Korkein CMPF pitoisuus, mikä kalan syönnistä aikaan saatiin Lankisen ym. tutkimuksessa oli 36  $\mu\text{mol/l}$  ja keskiarvo  $12 \pm 8 \mu\text{mol/l}$  (Lankinen ym., 2015), kun tyyppin 2 diabetesta sairastavilla pitoisuudet ovat olleet luokkaa yli 100  $\mu\text{mol/l}$  (Prentice ym., 2014).

Myös kalaöljylisien käyttö suurentaa plasman CMPF-pitoisuuksia – mm. Zheng ym. (2016) ovat havainneet CMPF:n korreloivan positiivisesti kalaöljylisän käytön kanssa ja korreloivan positiivisesti myös EPA:n ja DHA:n kanssa sekä negatiivisesti seerumin triglyseridipitoisuuden kanssa (Zheng ym., 2016). Zheng ym. (2016) tutkimuksessa huomioitiin sekoittavat tekijät kuten ikä, sukupuoli, BMI sekä CMPF:n kanssa korreloivat EPA ja DHA, minkä jälkeenkin todettiin CMPF:n korreloivan negatiivisesti TG:n kanssa. Koska CMPF on vahva biomarkkeri kalan ja kalaöljyn käytölle, on luonnollista, että kalaöljylisän käyttö laskee seerumin triglyseridipitoisuutta, kuten muissa tutkimuksissa onkin todettu.

CMPF:n on todettu myös korreloivan positiivisesti vihreiden kasvien (mm. lehtisalaatti, pinaatti) sekä sipulien käyttöön ravinnossa (Guertin ym., 2014) – mikä on loogista, sillä kalan tavoin myös vihreät kasvikset sisältävät furaanirasvahappoja. Ilmeisesti korkeassa lämpötilassa keittäminen tai paistaminen saa aikaan sen, että PUFA-rasvahapoista muodostuu furanoidisia yhdisteitä (Koppe et Poutout 2016). Tämä saattaa edistää CMPF:n muodostumista, joten on mahdollista, että ravinnon käsittely voi tuottaa eksogeenistä CMPF:a, jolla voisi olla vaikutus myös seerumissa havaittaviin CMPF-pitoisuuteen.

#### **2.2.4 Seerumin CMPF-pitoisuudet glukoosinsiedon ollessa normaali**

Liun ym. tutkimuksessa (2016) mitattiin henkilöiden, joilla oli normaali glukoosinsieto (NGT, normal glucose tolerance) verestä CMPF-pitoisuuksia, jotka olivat keskimäärin  $37.14 \pm 6.35 \mu\text{mol/l}$  (Liu ym., 2016). Meert ym. (2007) puolestaan toteaa CMPF-pitoisuuden fysiologisissa oloissa olevan luokkaa 40  $\mu\text{mol/l}$ , kun taas Sassa ym. (2000) puolestaan ilmoittaa veren keskimääräiseksi CMPF-pitoisuudeksi paastotilassa 20–24  $\mu\text{mol/l}$ . In vitro -kokeissa CMPF-pitoisuudet, joita on käytetty simuloimaan fysiologista tilannetta, ovat olleet luokkaa 40–50  $\mu\text{mol/l}$  (esim. Liu ym., 2016).

ja Prentice ym., 2016), mitä voidaan pitää hyvänä estimaattina normaalipitoisuuksista edellä esitettyjen mittaustulosten perusteella.

### **2.2.5 Seerumin CMPF-pitoisuudet patologisissa tiloissa**

Plasman CMPF:n on todettu olevan (kroonisesti) koholla prediabeetikoilla (Liu ym., 2016) ja kohoavan huomattavasti sekä raskausajan diabeteksessa että tyypin 2 diabeteksessa (Prentice ym., 2014; Liu ym., 2016; Zheng ym., 2016). Liun ym. (2016) tutkimuksessa todetut kohonneet plasman CMPF-pitoisuudet olivat diabeetikoilla  $103.9 \pm 11.38 \mu\text{mol/l}$  ja prediabeetikoilla (joko todettu IGT, IFG tai molemmat)  $84.14 \pm 10.90 \mu\text{mol/l}$  (Liu ym., 2016). Liun ym. tutkimuksessa on huomattavaa, että henkilöiden, joille 5 vuoden seurannan aikana kehittyi diabetes, CMPF-tasot olivat koholla jo seurannan alussa (Liu ym., 2016).

Munuaisten kroonisessa vajaatoiminnassa (chronic kidney disease, CKD) CMPF:n munuaispuhdistuma pienenee, jolloin CMPF:tä kertyy vereen (Niwa ym., 1988). Niwa ym. ovat raportoineet ureemisilla henkilöillä tasoja  $370 \mu\text{mol/l}$  (Niwa ym., 1988), mutta jopa tasoja  $400 \mu\text{mol/l}$  on raportoitu (Meert ym., 2007). Mielenkiintoista on, että myös uremiaan – jossa siis CMPF kohoaa – liittyy hyperinsulinemiaa sekä heikentynyt ensimmäisen vaiheen insuliinieritys (Allegra ym., 1994; Nakamura ym., 1985). CMPF:n onkin todettu aiheuttavan beetasolujen toiminnan häiriöitä sekä uremiassa, T2D:ssä että GDM:ssä esiintyvillä pitoisuuksilla mm. mitokondrioiden toimintaa sekä insuliinin biosynteesiä heikentämällä (Prentice ym., 2014). On kuitenkin huomattava, että munuaisten vajaatoiminnassa käytännössä mikä tahansa elimistöön glomerulusfiltraation (GFR:n) alentuman seurauksena kertyvä biologisesti aktiivinen metaboliitti on ”ureeminen toksiini” (Vanholder R., 2008) voiden aiheuttaa vaurioita mm. radikaalimekanismien kautta (Motojima ym., 2003).

Koska patologisissa tiloissa – T2D:ssä ja esim. munuaisten kroonisessa vajaatoiminnassa (CKD) – CMPF-tasot ovat paljon fysiologista tilaa korkeammat, onkin syytä olettaa, että kohtalaisella CMPF-tasojen nousulla, minkä runsas kalan käyttö aikaan saa, ei ole haitallisia vaikutuksia sokeriaineenvaihduntaan etenkin, kun kalankäytön on muutamissa tutkimuksissa (Kaushik ym.,

2011; Zhang ym., 2013) todettu jopa suojaavan glukoosiaineenvaihdunnan häiriöiltä (Lankinen ym., 2015).

### **2.2.6 CMPF toksisena metaboliittina uremiassa**

CMPF kulkee verenkierrossa albumiiniin sitoutuneena (Niwa ym., 1988) ja on normaaleilla pitoisuuksilla harmiton metaboliitti. Kroonisessa munuaisten vajaatoiminnassa CMPF kuitenkin alkaa kertyä proksimaalisiin tubulussoluihin vahingoittaen niitä (Miyamoto ym., 2012). CMPF on merkittävä ureeminen toksiini pitoisuuksilla, joilla se esiintyy munuaisten vajaatoiminnassa (Yeung ym., 2014). Jopa 50%:lla kroonisesta munuaisten vajaatoiminnasta kärsivillä on todettu heikentynyt glukoosin sieto (IGT) tai heikentynyt paastoglukoosi (IFG) (Lorenzo ym., 2009), mikä korreloi hyvin tietoon siitä, että CMPF:llä tiedetään olevan negatiivinen vaikutus beetasoluihin korkeina pitoisuuksina, joita siis uremiassa esiintyy. Tosin on huomattava, että korkean ureapitoisuuden itsessään on todettu heikentävän beetasolujen toimintaa (Koppe ym., 2016). Uremiassa CMPF:a tubulussoluista poistavien OAT-transporttien ilmentyminen vähentyy, mikä selittää ainakin osin niitä mekanismeja, joilla CMPF alkaa kertyä tubulussoluihin (Sassa ym., 2000). Koska ureemisten toksiinien transporttereita (OAT-transportit) esiintyy munuaisten lisäksi mm. verisuonissa, veriaivoesteessä sekä luustossa (Enomoto et Niwa, 2007), on hyvin mahdollista, että CMPF voi aiheuttaa munuaisten vajaatoiminnassa vapaiden radikaalien tuottoa lisäämällä soluvaurioita muuallakin elimistössä kuin tubulussoluissa ja beetasoluissa (Miyamoto ym., 2012).

### **2.2.7 CMPF pro-oksidanttina - AGE- ja ROS-tuotto**

Furaanirasvahapot ovat yleensä potentteja antioksidantteja johtuen niiden kyvystä siepata radikaaleja (Spiteller ym., 2005). Vaikuttaa kuitenkin siltä, että furaanihappometaboliitti CMPF:llä saattaisi olla kuitenkin myös jopa täysin päinvastaisia vaikutuksia. Esim. Miryamoto ym. (2012) ovat osoittaneet, että CMPF:n haitallisuus johtunee ainakin osin siitä, että CMPF – kohdatessaan elimistössä vapaita happiradikaaleja – muodostaa CMPF-radikaaliaddukteja, jotka vaurioittavat soluja (Miryamoto ym., 2012). CMPF lisää samanaikaisesti beetaoksideatiota ja vähentää glukoosin oksidaatiota, mikä saa aikaan kehittyneiden glykaation lopputuotteiden (AGE, advanced glycation end-product) ja reaktiivisten happiradikaalien (ROS, reactive oxygen species) määrien

lisääntymistä, mikä puolestaan lisää oksidatiivista stressiä ja näyttäisi olevan ainakin osasy syy beetasolujen toiminnan heikentymiseen prediabeetikoilla (Liu ym., 2016). Liu ym. (2016) tutkivat tämän lisääntyneen ROS- ja AGE-tuoton yhteyttä apoptoosiin apoptoosia välittävien kaspasien (kaspasit 3 ja 7) avulla, mutta lisääntynyt ROS- tai AGE-tuotto ei kuitenkaan yhdistynyt lisääntyneeseen apoptoosiin soluissaym. Eli CMPF:n aikaan saama lisääntynyt AGE- eikä ROS-tuotto yksin ei vielä selitä beetasolujen tuhoa esim. diabeteksessa, mutta voi varmasti muilla edellä ja jälkempänä kuvattujen mekanismien avulla lisätä beetasolutuhoa. On myös huomattava, että matalat (fysiologiset) pitoisuudet reaktiivisia happiradikaaleja lisäävät glukoosin stimuloimaa insuliinin eritystä (GSIS) beetasoluissa, mikä auttaa beetasoluja tuottamaan normaalin vasteen esim. kohonneille FA-pitoisuuksille (Poitout et Robertson, 2008; Robson-Doucette ym., 2011) eli fysiologiset ROS-pitoisuudet eivät yleensä aiheuta ongelmia beetasolujen toiminnalle.

Liun ym. (2016) tutkimuksessa todettiin, että eksogeeninen CMPF vähensi glukoosin metaboliaa beetasoluissa, mikä sai aikaan AGE-tuotteiden lisääntynyttä muodostumista beetasoluissa (lisääntynyt glukoosipitoisuus lisää mm. proteiinien glykaatiota) sekä lisääntynyttä ROS-tuottoa FA-oksidation lisääntymisen kautta (Liu ym., 2016; Koppe et Poitout., 2016). AGE-tuotteiden puolestaan tiedetään suoraan heikentävän beetasolujen toimintaa stimuloimalla mitokondriaalisen superoksidin eritystä ja näin heikentävän insuliinin eritystä (Coughlan ym., 2011). Näyttää siltä, että AGE-tuotteiden muodostumisen ja insuliinigranuloiden kypsymisen välillä on yhteys ja sitä kautta AGE-tuotteiden ja insuliinin erityksen välillä on myös yhteys (Koppe et Poitout, 2016).

Prenticen ym. (2014) kokeissa solukalvojen CMPF-käsittely kaksinkertaisti ROS-tuoton verrattuna kontrolleihin (Prentice ym., 2014). Lisäksi todettiin CMPF:n aikaansaaman ROS-tuoton lisääntymisen olevan kumottavissa antioksidantilla (NAC, N-asetyylikysteiniini) (Prentice ym., 2014). Näyttääkin siis siltä, että CMPF heikentää glukoosin stimuloimaa insuliinin eritystä sekä insuliinin käsittelyä beetasoluissa ja että nämä muutokset ovat kuitenkin korjattavissa sopivalla antioksidantilla, joka vähentää reaktiivisten happiradikaalien muodostumista (Prentice ym., 2014). Lisääntyneen ROS-tuotannon on osoitettu moduloivan insuliinin transkriptiota (Poitout et Robertson, 2008; Kawamori ym., 2003). Lisääntynyt ROS-tuotto muuttaa AKT- ja GSK3 $\beta$ -kinaasien

aktiivisuutta (Kawamori ym., 2006), mikä vaikuttaa sekä insuliinin transkriptioon ja sitä kautta translaatioon että posttranslationaliseen muokkaukseen (Prentice ym., 2014). Lisäksi CMPF lisää etenkin rasvojen oksidaatioon vaikuttavien geenien differentiaalista ilmentymistä (Prentice ym., 2014), mistä voidaan arvella CMPF:n toimivan "kytkimenä", joka saa aikaan glukoosin hapettumisen vähentymistä ja rasvojen oksidaation lisääntymistä (Elks, 1993).

CMPF-käsittely soluissa (in vitro) aikaan saa T2D:lle tyypillisen basaalisin hyperinsulinemian (Wijendran ym., 1999) sekä heikentyneen glukoosin käytön kaikkialla elimistön kudoksissa (Prentice ym., 2014). Mielenkiintoista on, että myös uremiaan liittyy juuri basaalin hyperglykemia, hyperinsulinemia sekä ensimmäisen vaiheen heikentynyt insuliinin erityis (Allegra ym., 1994; De Marchi ym., 1987; DeFronzo 1978; Nakamura ym., 1985). Miyamoto ym. (2012) ovat todenneet, että CMPF ei itsenäisesti suurena intrasellulaaristen reaktiivisten happilajien (ROS) pitoisuuksia CMPF-pitoisuuden ollessa keskimääräisellä fysiologisella tasolla (40  $\mu\text{mol/l}$ ) (Miyamoto ym., 2012). Kuitenkin samassa tutkimuksessa todettiin, että angiotensiini II yhdessä CMPF:n kanssa suurensi vapaiden happiradikaalien määrää munuaisten tubulussoluissa (Miyamoto ym., 2012). Myös aiemmissa tutkimuksissa on todettu, että angiotensiini II stimuloi intrasellulaarista ROS-tuottoa (Agarwal ym., 2004). Vaikuttaakin siltä, että patologioissa komorbiditeetit, joihin yhdistyvät korkeat angiotensiini II -pitoisuudet saattavat komplisoida CMPF:n vaikutuksen ROS-tuottoon. Tiedetään myös, että rauta voi lisätä reaktiivisten hydroksyyli-radikaalien muodostumista Fentonin reaktion kautta (Jomova et Valko, 2011), mutta pelkkä raudan lisääminen koeasetelmaan nosti ROS-tuottoa vain vähän (Miyamoto ym., 2012).

Kuitenkin näiden kolmen (CMPF, angiotensiini II sekä rauta) todettiin aiheuttavan yhdessä kaikkein suurimman ROS-tuoton lisääntymisen (Miyamoto ym., 2012). Miyamoto ym. totesivat myös, että antioksidantin lisääminen systeemiin (NAC, N-asetyylikysteiniini) esti tehokkaasti ROS-tuottoa (Miyamoto ym., 2012). Näyttää siis siltä, että CMPF toimii ROS-tuottoa lisäävänä yhdisteenä solujen sisällä vaikka itsenäisesti (pelkkä CMPF yksin) ei kykene ROS-tuottoa lisäämään (Miyamoto ym., 2012).



### 2.2.8 CMPF:n radikaaliadduktit

Miyamoto ym. tutkivat myös CMPF:n kykyä olla interaktiossa suoraan superoksidin ( $O_2^{\cdot-}$ ) ja lipidien peroksidaatiosta muodostuvien peroksyyliradikaalien ( $LOO^{\cdot}$ ) kanssa. Miyamoto ym. (2012) osoittivat, että CMPF, reagoidessaan suoraan radikaalien, kuten  $O_2^{\cdot-}$  ja  $LOO^{\cdot}$  kanssa, kykenee muodostamaan radikaaliaddukteja. On myös mahdollista, että syntyvät CMPF-radikaaliadduktit vielä lisäksi reagoivat liuenneen hapen kanssa synnyttäen lisää superoksidia (Miyamoto ym., 2012). Kun koejärjestelyyn lisättiin radikaaleja sieppaavia yhdisteitä kuten kuparia ja sinkkiä sisältävää superoksididismutaasia (Cu-Zn-SOD), radikaalien tuotto odotetusti laski – kun taas liuenneen hapen määrää lisättiin, niin radikaalien muodostuminen lisääntyi, mistä voidaan päätellä, että CMPF:n redox-reaktioiden määrä riippuu liuenneen hapen määrästä (Miyamoto ym., 2012).

Miyamoto ym. eivät kyenneet tutkimuksessaan selvittämään reaktioissa muodostuneen CMPF-radikaaliadduktien tarkkoja rakenteita, mutta käyttäen radikaalien tunnistukseen käytettävää g-arvoa, voitiin päätellä, että yhdisteet olivat peroksyyliradikaaleja (Miyamoto ym, 2012). Koska peroksyyliradikaalit kykenevät propagoimaan radikaaliketjureaktion, voidaan olettaa CMPF:stä sen reagoidessa superoksidin tai peroksyyliradikaalin kanssa muodostuvan radikaaliaddukti, joka kykenee aikaan saamaan radikaaliketjureaktion solussa, jossa hapesta ( $O_2$ ) muodostuu radikaaleja ( $O_2^{\cdot-}$ ), jotka edelleen (raudan läsnäollessa) voivat muuntua hydroksyyliradikaaleiksi ( $OH^{\cdot}$ ), jotka kykenevät vaurioittamaan soluja (Miyamoto ym., 2012).

### 2.2.9 CMPF:n yhteys solujen glukoosimetaboliaan

Liu ym. (2016) tekivät tutkimuksia hiirillä, joiden haiman saarekkeita oli käsitelty eksogeenisellä CMPF:llä. Todettiin, että saarekkeiden käsittely CMPF:llä oli yhteydessä lisääntyneeseen glukoosin soluunottoon, vaikka Glut2-tranportterien ilmentymisessä ei havaittu muutostaym eli CMPF saa aikaan glukoosin kertymistä beetasoluihin. Verestä maksaan tulevaa ylimääräistä glukoosia käytetään usein mm. glykogeenisynteesiin (Malaisse ym., 1993), mutta etenkin kroonisessa hyperglykemiassa glukoosi alkaa kulkea myös vaihtoehtoisia reittejä mm. pentoosifosfaattireitille (PPP) (Goehring ym., 2011; Spéjel ym., 2013) ja heksosamiinibiosynteesireitille (HBP) (Kaneto ym.,

2001; Shankar ym., 1998; Tang ym., 2000) – reiteille, joiden toiminta on yhdistetty mm. beetasolujen dysfunktioon (Liu ym., 2016). On arveltu, että CMPF voisi aiheuttaa glukoosin preferentiaalisen kulkeutumisen näille vaihtoehdoisille reiteille (Liu ym., 2016).

Liu ym. (2016) tutkivatkin CMPF:n vaikutusta glukoosin metaboliaan soluissa: CMPF:n todettiin olevan yhteydessä alentuneeseen glykolyysiin sekä vähentävän myös pyruvaattidehydrogenaasin (PDH) aktiivisuutta. CMPF siis lisää glukoosin soluunottoa, mutta vähentää glykolyysiä ja heikentää glukoosin hapettamista (glukoosin käyttöä energiaksi) (Liu ym., 2016). Sen sijaan glukokinaasin – glykolyysiä rajoittavan entsyymien – ilmentymisessä ei todettu muutoksia, mistä voidaan päätellä, että CMPF ei todennäköisesti muuta solujen kykyä tuottaa glukoosi-6-fosfaattia (Liu ym., 2016). Liu ym. eivät kuitenkaan todenneet muutoksia PPP- ja HBP-reittejä säätelevien avainentsyymien aktiivisuuksissa ym. Kaiken kaikkiaan nämä tulokset tarkoittavat, että CMPF ei saa aikaan ylimääräisen glukoosin preferentiaalista kulkeutumista näille vaihtoehdoisille reiteille, mutta vähentää kuitenkin glykolyysiä (Liu ym., 2016).

Toisessa tutkimuksessa Liu ym. (2016) tutkivat eksogeenisen CMPF:nannon vaikutuksia mittaamalla muutoksia mitokondrioiden solukalvopotentiaalissa annettaessa hiirille glukoosia – verrokkhiirille glukoosin anto aiheutti voimakkaan mitokondrioiden solukalvojen hyperpolarisaation, mutta hiirillä, joille oli aiheutettu ruokavalion avulla insuliiniresistenssi sekä annettu eksogeenistä CMPF:a, solukalvopotentiaalin muutos oli selkeästi vaimeampi. Kuitenkin annettaessa samoille hiirille lisäksi palmitaattia, solukalvon hyperpolarisaatio olikin jopa terveitä kontrolleja voimakkaampaa (Liu ym., 2016). Mittaamalla hapenkulutusta, Liu ym. (2016) pystyivät päättämään, että hiirillä, jotka oli lihotettu ruokavaliolla ja, jotka olivat saaneet eksogeenistä CMPF:ää, glukoosin hapettuminen oli alentunut, mutta rasvahappo-oksidaatio lisääntynyt verrattuna kontrolleihin. Myöhemmin Liu ym. toistivat kokeen ihmisten haiman saarekesoluilla, ja tulos oli samanlainen kuin hiirimalleilla saadut tulokset ym. On myös mielenkiintoista huomata, että transportterin, jonka kautta CMPF kulkee soluihin, spesifinen inhibitio sen sijaan ehkäisee CMPF:n negatiiviset vaikutukset insuliinin synteesiin (Prentice ym., 2014).

### **2.2.10 Yhteys insuliinin eritykseen, insuliiniresistenssiin ja diabetekseen**

Beetasolujen toiminnan heikkenemisen syyksi diabeteksessa on esitetty sekä beetasolumassan vähentymistä että insuliinin erittymisen muutoksia (Buchanan ja Xiang, 2005; Kim ym., 2010; Retnakaran ym., 2010), mutta kuten edellä on esitetty, niin kokeissa ei kuitenkaan havaittu CMPF:n assosioituvan beetasolumassan eikä alfasolumassan vähentymiseen, solujen apoptoosiin tai dedifferentiaatioon (Prentice ym., 2014), joten CMPF vaikutus beetasoluihin vaikuttaisi olevan nimenomaan beetasolujen toiminnan, kuten insuliinierityksen heikentyminen. Vaikuttaa siis vahvasti siltä, että mekanismina toimisi ainakin osin CMPF-välitteinen oksidatiivisen stressin (ROS- ja AGE-tuoton) lisääntyminen.

T2D:n alkuvaiheessa kompensatorisena mekanismina beetasolumassa sekä tätä kautta insuliinieritys lisääntyvät (Butler ym., 2003; Kahn 2003; Weyer ym., 1999). Prentice ym. ovat hiirikokeissa todenneet 7 päivän kuluttua eksogeenisen CMPF:n annosta CMPF:a saaneilla hiirillä merkittävästi kohonneen plasman paastoglukoosi- ja -insuliinipitoisuuden, heikentyneen glukoosinsiedon OGTT:ssa, merkittävästi alentuneen glukoosin stimuloiman insuliinin erityksen (GSIS, glucose-stimulated insulin secretion) sekä alentuneen insuliinipitoisuuden glukoosirasituksessa (Prentice ym., 2014). Myös muissa eläinkokeissa on todettu CMPF:n korkeiden tasojen heikentävän glukoosin sietoa (Lindström, 2010; Wang ja Liao, 2012).

On kuitenkin huomattava, että vaikka glukoosin stimuloima insuliinin erityks heikentyi, niin 7 päivän eksogeenisellä CMPF:n annolla oli yhteys sekä aterian jälkeiseen hyperinsulinemiaan että hyperglukagonemiaan (Prentice ym., 2014). Kohonneista insuliinipitoisuuksista huolimatta insuliiniherkkyydessä ei havaittu eroja CMPF-hiirien ja kontrollien välillä euglykeemisessä clamp -kokeessa (Prentice ym., 2014). Kuitenkin kokeet osoittivat, että vaikka insuliinivasteessa ei havaittu eroja – toisin sanoen, CMPF ei aiheuttanut insuliiniresistenssiä 7 päivässä – CMPF alensi jo 7 päivän kokeessa glukoosin käyttöä sekä heikensi glukoosin sietoa heikentämällä insuliinin eritystä hyperinsulineemisessa, euglykeemisessä tilassa (GSIS) CMPF:n pitoisuudesta riippuvalla tavalla (Prentice ym., 2014).

Liun ym. (2016) prospektiivisessä kohorttitutkimuksessa puolestaan todettiin, että prediabeetikoilla oli kroonisesti kohonnut plasman CMPF-pitoisuus ja, että niillä, joilla prediabetes puhkesi diabetekseksi 5 vuoden seurannan aikana CMPF-pitoisuus suureni huomattavan korkeaksi (Liu ym., 2016). Tutkimuksessa todettiin myös, että CMPF-pitoisuuden suureneminen johti rasvahappojen käytön lisääntymiseen glukoosin käytön sijaan, johon liittyi heikentynyt glukoosin stimuloima insuliinin erityis, lisääntynyt vapaiden happiradikaalien muodostuminen sekä proinsuliinipitoisuuksien suureneminen (Liu ym., 2016).

Prentice ym. (2012) havaitsivat lisäksi, että samoilla naisilla, joille oli GDM:n jälkeen kehittynyt IGT, CMPF-pitoisuudet olivat vieläkin korkeammat, jopa 12-kertaiset verrattuina verrokkeihin (Prentice et al., 2012). Tutkittaessa CMPF-pitoisuuksia T2D:ssä tulokset olivat hyvin samansuuntaiset. CMPF-pitoisuudet olivat T2D:lla huomattavasti suuremmat kuin kontroleilla (Prentice ym., 2014). Mielenkiintoinen oli lisäksi havainto, että T2D:ssä pitoisuudet olivat merkitsevästi suuremmat miehillä kuin naisilla (Prentice ym., 2012).

Ristiriitaisia tuloksia CMPF:n ja diabeteksen yhteydestä puolestaan raportoitiin yhdessä tutkimuksessa (Retnakaran ym., 2016), jossa todettiin, että raskausdiabeteksestä kärsivillä CMPF-pitoisuus yhdistyi kyllä huonompaan beetasolujen toimintaan sekä korkeampaan veren glukoosipitoisuuteen, mutta terveillä tätä yhteyttä ei havaittu eikä CMPF-pitoisuuden välillä löydetty merkitseviä eroja raskausdiabeteksestä sairastaneiden ja ei-GDM-verrokkien välillä (Koppe et al., 2016).

Lankinen ym. puolestaan totesivat, että kohonnut CMPF-pitoisuus ei ole yhteydessä heikentyneeseen insuliinimetaboliaan henkilöillä, joilla oli heikentynyt sokeriaineenvaihdunta ja normaali munuaisfunktio (Lankinen ym., 2015). Päinvastoin kohonnut CMPF-pitoisuus oli yhteydessä alentuneisiin insuliinipitoisuuksiin 2-tunnin sokerirasituskokeessaym. Vaikka etenkin rasvaisen kalan syönti suurentaa CMPF:n plasmapitoisuutta, kalan syönti ei kuitenkaan suurena CMPF:n pitoisuutta tasolle, joita on T2D:n yhteydessä raportoitu (Lankinen ym., 2015). Kalansyömisestä johtuvan suurentuneen CMPF-pitoisuuden ei olekaan todettu olevan yhteydessä heikentyneeseen glukoosiaineenvaihduntaan (Lankinen ym., 2015).

### 2.2.11 CMPF:n vaikutusmekanismit beetasoluihin

Ravinto ja siis etenkin kala (kalaöljy vähemmässä määrin) vaikuttavat CMPF-pitoisuuteen, mutta näyttää siltä, että CMPF-pitoisuus suurenee itsenäisesti tyypin 2 diabeteksessa sekä jo myös prediabeteksessa (IGT ja IFG) sekä kroonisessa munuaisten vajaatoiminnassa (CKD) korreloiden T2D:n kehittymiseen (Koppe ja Poitout, 2016). Tärkeimpänä mekanismina CMPF:n prodiabeettiselle vaikutukselle on nykytiedon valossa pidetty CMPF:n vaikutuksia haiman beetasoluihin. Beetasolujen toiminnan heikentymisen krooniseksi syiksi epäillään mm. glukolipotoksisuutta, tulehdusta, endoplasmisen solulimakalvoston (ER:n) stressiä sekä hapetusstressiä (Abdul-Ghani ym., 2006; Jonas ym., 2009; Poitout ja Robertson, 2008; Prentki ja Nolan 2006), jotka kaikki osaltaan vaikuttavat beetasolujen toiminnan heikentymiseen. Nämä tuskin kuitenkaan ovat syinä akuuteissa beetasolujen toiminnan heikentymisissä, kuten tapahtuu raskausajan diabeteksessa. Raskausajan diabeteksessa kuten tyypin 2 diabeteksessa beetasolujen toiminnan heikentyminen tapahtuu viikkojen sisällä insuliiniresistenssin alkamisesta (Buchanan ja Xiang, 2005). Prentice ym. (2014) ovat osoittaneet mekanistisessa tutkimuksessa, että CMPF vaikuttaa suoraan haiman beetasoluihin heikentäen niiden mitokondrioiden toimintaa, vähentää niiden glukoosin aikaan saamaa ATP:n kertymistä (heikentää solujen glukoosin aikaan saamaa ATP:n tuontantoa) sekä aiheuttavan oksidatiivista stressiä, mikä aiheuttaa transkriptiotekijöiden säätelyn häiriöitä sekä alentaa insuliinin biosynteesiä (Prentice ym., 2014).

Prentice ym. (2014) totesivat, että CMPF:n anto ei aiheuttanut merkitseviä muutoksia haiman beeta- eikä myöskään alfa-solumassaan eikä myöskään haiman saarekkeiden kokoon vaikka sekä yksittäisten saarekkeiden että koko haiman insuliinipitoisuuden todettiin merkittävästi alentuneen ja insuliinin erityksen kohonneen matalilla glukoosipitoisuuksilla (2.8 mmol/l) sekä kohonneen korkeilla glukoosipitoisuuksilla (16.7 mmol/l) CMPF-hiirillä (Prentice ym., 2014). CMPF:n glukoosi- ja insuliinimetaboliaan aiheuttamien muutosten glukoosi- ja insuliinimetaboliaan täytyy siis selittyä muulla mekanismilla kuin haiman beetasolujen koon muutoksilla. Lisäksi todettiin, että CMPF-hiirillä korkea glukoosipitoisuus ei inhiboinut glukagonin eritystä haiman saarekkeista (Prentice ym., 2014).

Liu ym. (2016) osoittivat kokeissaan, että CMPF saa aikaan metabolisia muutoksia kuten FA-oksidaation lisääntymisen ja glukoosin hapettumisen vähentymisen, mitkä aikaansaavat ROS-tuotteiden muodostumista ja lopulta proinsuliinin kertymistä (insuliinigranuloiden maturaatio heikentyy). Liu ym. (2016) tutkivat beetasolusaarekkeiden (in vitro) glukoosiherkkyyttä obeeseilla ja insuliiniresistenteilla hiirillä ja totesivat insuliinin erityksen alentuneen CMPF-käsittelyssä saarekkeissa verrattuina kontrolleihin. Liu ym. osoittivat myös, että obeeseilla insuliiniresistenteilla hiirillä eksogeenisellä CMPF-käsitellyillä saarekkeilla tehdyissä kokeissa CMPF sai aikaan insuliinin erityksen häiriön pahentumisen mm. heikentyneen beetasolujen glukoosin käytön, AGE-tuotteiden muodostumisen, oksidatiivisen stressin sekä insuliinigranuloiden maturaation ja insuliinin erityksen heikkenemisen kautta (Liu ym., 2016). Lisäksi Liu ym. totesivat FA-oksidaation ja tähän liittyvän ROS-tuoton huomattavan lisääntymisen (Liu ym., 2016).

Myös Koppen ja Poitoutin (2016) kuvaus tapahtumien kulusta korostaa glykolyysin vähentymisen ja lisääntyneen oksidatiivisen stressin roolia: CMPF-pitoisuuden alkaessa veressä kohota, CMPF:a kulkee beetasoluihin OAT3:n (Organic Anion Transporter 3) avulla. Beetasolujen sisällä CMPF lisää soluun tulevien vapaiden rasvahappojen beetaoksidaatiota, mikä puolestaan lisää ROS-tuotteiden syntyä (Koppe ja Poitout, 2016). Beetasolun sisällä CMPF lisää myös itsenäisesti ROS-tuotteiden syntyä (Koppe ja Poitout, 2016). CMPF lisää glukoosin soluunottoa, mutta beetasolun sisällä CMPF inhiboi glykolyysiä (glukoosin hapettumista), mikä lisää glukoosin pitoisuutta solussa. Tämä lisää glykaatiota, joka puolestaan lisää AGE-tuotteiden syntyä, mikä lopulta johtaa hapetusstressin lisääntymiseen (ROS-tuotteita syntyy lisää) (Koppe ja Poitout, 2016). Koppe ja Poitoutin (2016) mukaan CMPF lisää ROS-tuotteiden muodostumista peräti kolmella tapaa: suoraan CMPF:stä (radikaaliadduktit), FA-oksidaation kautta sekä glykaation lisääntymisen kautta). Beetasoluihin kertyvät ROS-tuotteet puolestaan heikentävät insuliinigranuloiden kypsymistä (proinsuliinin muuntumista insuliiniksi), mikä edelleen heikentää insuliinin eritystä johtaen lopulta beetasolujen toiminnan merkittävään heikentymiseen (haiman beetasolujen dysfunktio) (Koppe ja Poitout, 2016).

Koppe ja Poitout kuitenkin myös kyseenalaistavat, onko mm. Liu ym. (2016) toteamalla FA-oksidaation lisääntymisellä glukoosin käytön kustannuksella kuitenkaan niin suurta merkitystä toteamalla, että rasvahappojen hapettuminen on beetasoluissa yksi tai jopa kaksi suuruusluokkaa vähäisempää kuin glukoosin (Koppe et Poitout, 2016; Alcázar ym., 1997). Toisin sanoen muutokset FA-oksidaatiossa eivät välttämättä edusta merkittävää muutosta beetasolujen metaboliassa. Täten voitaisiin ajatella, että edellä kuvatuista mekanismeista juuri CMPF radikaaliadduktien sekä glykolyysin vähentymisellä voisi olla FA-oksidaation aiheuttaman ROS-tuoton lisääntymistä suurempi rooli näistä kolmesta mekanismista.

Kuten todettu CMPF-käsittely ei aikaansaanut apoptoosia eikä edes minkäänlaista dedifferentiaatiota beetasoluissa (Prentice ym., 2014) - näin ollen näyttää siltä, että todennäköisimmät mekanismit, joilla CMPF aiheuttaa beetasolujen insuliinin erityksen vähenemistä ovat joko insuliinin synteessin ja/tai sen erityksen vähentyminen (Prentice ym., 2014). Prentice ym. totesivatkin haiman saarekkeiden insuliinipitoisuuden vähenevän merkitsevästi CMPF-käsittelyllä (Prentice ym., 2014). Huomattava on, että glukagonin määrä ei ollut merkitsevästi muuttunut, eli CMPF vaikuttaa hyvin spesifiltä juurikin beetasolujen suhteen (Prentice ym., 2014). Tutkittaessa insuliinin synteesiä sekä pakkaamista granuloihin todettiin, että CMPF-käsittely ei muuttanut granuloden normaalia morfologiaa, mutta todella merkittävästi pienensi insuliinigranuloiden lukumäärää (Prentice ym., 2014), mikä antaisi viitteitä, että insuliinigranuloiden kypsymisen estyminen olisi yksi merkittävä tekijä CMPF:n välittämässä beetasoludysfunktiossa. Mielenkiintoista on, että seerumin proinsuliinin pitoisuuksien on aiemmin mm. todettu korreloivan mahdollisesti jopa paastoinsuliinia paremmin T2D:n kehittymiseen ylipainoisilla lapsilla sekä todettu olevan yhteydessä maksan IGFBP-1 (insulin-like growth factor-binding protein 1) -tuotantoon (Kamoda ym., 2006).

Yksi syy heikentyneelle insuliinin eritykselle hyperglykemiassa voisi olla rasvahappojen (esim. palmitaatin tai oleaatin) suoraan beetasoluihin kohdistama lipotoksisuus (Kharroubi ym., 2004). Erittäin mielenkiintoista on, että myös plasman EPA-pitoisuus suurenee merkitsevästi sekä GDM:ssä että T2D:ssä verrattuna NGT-verrokkeihin (Prentice ym., 2014). Kuitenkin niin kontrollien kuin diabeetikoidenkin haiman saarekkeiden käsittely EPA:lla sekä rakenteellisesti EPA:n

kaltaisella estronisulfaatilla ei vaikuttanut glukoosin stimuloimaan insuliinin eritykseen – näin ollen ainakaan monityydyttymätön EPA ei CMPF:n tavoin vaikuta haiman toimintaan CMPF:n ja EPA-pitoisuuksien välisestä merkitsevästä korrelaatiosta huolimatta (Prentice ym., 2014).

Mielenkiintoista on myös, että lääkeaine probenesidi, joka on ei-spesifi OAT (organic anionic transporter) -estäjä (Miyamoto ym., 2012) ei kyennyt estämään GSIS:n heikentymistä palmitaattilla indusoidussa GSIS:sä vaikka Prentice ym. (2014) kokeessa probenesidilla on onnistuttu ehkäisemään CMPF:n negatiivinen vaikutus) – toisin sanoen, vaikka CMPF:n kuljetuksella soluihin on merkitys GSIS:n kannalta, niin OAT-esto ei yksin riittänyt estämään rasvahappojen aiheuttamia beetasoluvaurioita (Prentice ym., 2014). Tämä on ristiriidassa sen kanssa, että aiemmin kuvatun perusteella CMPF-välitteinen beetasoluvaurio edellyttää CMPF:n pääsyä sisään haiman beetasoluihin (toisaalta on huomioitava, että Miyamoton kokeessa oli käytetty palmitaatin aikaan saamaa patologiaa).

### **2.2.12 CMPF diabeteksen progredioidin biomarkkerina**

Mekanistisilla tutkimuksilla on osoitettu, että sekä hiirillä että ihmisillä korkeat CMPF-pitoisuudet korreloivat heikentyneeseen insuliinin eritykseen (Prentice ym., 2016). On ajateltu, että CMPF voisi toimia biomarkkerina, jonka perusteella voisi ennustaa tyypin 2 diabeteksen kehittymistä. Vielä ei tiedetä tarkkoja mekanismeja, miten ja miksi joillakin ihmisillä vuosia jatkunut prediabeettinen tila (IGT ja/tai IFG) muuttuu T2D:ksi, mutta keskeisessä roolissa vaikuttaisivat olevan muutokset beetasolujen toiminnassa (beetasolujen dysfunktio) (Liu ym., 2016). On huomattava, että vaikka CMPF on potentiaalinen biomarkkeri prediabeteksesta diabetekseen, se voi olla myös potentiaalinen biomarkkeri T2D:n kehittymiselle myös muissa patologioissa esim. GDM:stä (prediabeteksen kautta) diabetekseen tai esim. kroonisessa munuaisten vajaatoiminnassa sekä munasarjojen monirakkulaoireyhtymässä (PCOS, polycystic ovary syndrome), joissa usein tavataan myös diabetekselle altistavia prodiabeettisia muutoksia.



### 2.2.13 Muut CMPF:n mahdolliset vaikutukset

CMPF:llä on ehdotettu olevan osuutta myös kilpirauhasen toiminnan häiriöihin (Lim ym., 1993) sekä neurologisiin toimintoihin munuaisten toiminnan häiriöistä kärsivillä (Costigan ym., 1996). OAT3:a on löydetty mm. glia- ja hermosoluista (Blemur ym., 2016), minkä tähden on mahdollista, että CMPF:llä todella on vaikutuksia hermoston toimintaan. Myös MS-potilaiden seerumista on löydetty merkitsevästi kohonneita CMPF-pitoisuuksia, joiden on lisäksi todettu korreloivan potilaiden sairauden oireiden aktiivisuuden kanssa (Blemur ym., 2016). CMPF saattaa lisäksi mahdollisesti inhiboida erytropoiesia sekä olla osasyllinen mm. kilpirauhasen abnormaliteetteihin (Miryamoto ym., 2012).

Eräässä tutkimuksessa CMPF:n todettiin korreloivan positiivisesti D-vitamiinin saantiin, mutta tässä selittävänä tekijänä lienee se, että kala on sekä CMPF:n että D-vitamiinin tärkeä lähde (Finkelstein ym., 2015). Myös toisessa tutkimuksessa (Vogt ym., 2016) todettiin positiivinen assosiaatio 25-OH-D3-vitamiinin ja rasvahappojen monitydyttymättömyyden sekä CMPF:n kanssa etenkin keskivartalolihavilla. Korrelaatio D-vitamiinin ja CMPF:n kanssa erityisesti lihavilla voisi johtua siitä, että reilusti ylipainoiset eivät liiku niin runsaasti ulkona, jolloin heidän D3-saantinsa auringonvalosta on vähäisempää ja siten heidän pääasiallinen D3-lähteensä on rasvainen kala, mikä selittäisi vahvan korrelaation seerumin D3-vitamiinipitoisuuden ja CMPF-pitoisuuden kanssa (Vogt ym., 2016).

## 2.3 Matala-asteinen tulehdus

Matala-asteinen tulehdus on liitetty useisiin väestön terveyden kannalta merkittävien metabolisiin sairauksiin sekä lihavuuteen (Hotamisligil, 2006). Adipokiinit ovat ryhmä rasvakudoksesta erittyviä sytokiineja (adiposytokiineja), joista osa on elimistössä tulehdusta välittäviä proinflammatorisia aineita ja osa anti-inflammatorisia. Tähän ryhmään kuuluu mm. omentiini, joka on yksi adiponektiinin (eräs tunnetuimmista anti-inflammatorisista adipokiineista) tavoin anti-inflammatorinen adipokiini ja, jonka vaikutuksia eri sairauksiin on viime vuosina alettu tutkia. Omentiini on ollut kiinnostuksen kohteena, koska sen pitoisuuden on todettu pienenevän ylipainoisilla (Ouchi ym., 2011). IL-18 on eräs proinflammatorisiin adipokiineihin kuuluva sytokiini,

jonka pitoisuuden on puolestaan todettu suurenevan lihavuudessa ja pienenevän painon laskun myötä (Ouchi ym., 2011).

### **2.3.1 Adipokiinit**

Adipokiineilla on merkittävä rooli insuliiniresistenssin synnyssä sekä siihen liittyvissä metabolisissa komplikaatioissa kuten dyslipidemiassa ja verenpainetaudissa (Rasouli ym., 2008). Sairaalloiseen lihavuuteen liittyy proinflammatorinen ja pro-oksidatiivinen tila, jolla on todettu yhteys adipokiinien säätelyn häiriöön (Catoi ym., 2014). Jotkin adipokiinit, kuten resistiini, leptiini ja adiponektiini vaikuttavat myös mm. verisuoniterveyteen vaikuttamalla suoraan endoteelisolujen toimintaan, valtimoiden sileälihassoluihin sekä verisuonten seinämien makrofageihin (Fantuzzi ym., 2007). Metabolisilla aineenvaihdunnan häiriöillä kuten lihavuudella ja T2D:lla on suora vaikutus ateroskleroosiin adipokiinien kautta (Yoo ym., 2011). Perinteisesti T2D:een ja insuliiniresistenssiin on adipokiineista usein yhdistetty adiponektiini vaikka esim. adiponektinemiaan vaikutuksista beetasoluihin ei ole täyttä varmuutta – tiedetään kuitenkin, että beetasolut ilmentävät hyvin suurissa määrin adiponektiinireseptoreita (Kharroubi ym., 2003).

### **2.3.2 Omentiini**

Omentiini (ihmisen intelegiini-1, hIntL-1, omentiini-1) on vuonna 2003 löydetty adipokiini (Yang ym., 2003), jota erittyy erityisesti omentaalisesta rasvakudoksen stromaalisista vaskulaarista soluista (Yang ym., 2006; Catoi ym., 2014). Omentiinin tekee mielenkiintoiseksi sen ilmentyminen preferentiaalisesti juuri viskeraalisessa rasvakudoksessa (omentumissa ja mesenteriumeissa). Vertailun vuoksi, esimerkiksi visfatiini – joka on toinen tutkimuksen alla viime aikoina ollut adipokiini – ei osoita samanlaista preferentiaalista ilmentymistä vaan esiintyy yhtä lailla sekä subkutaanissa että viskeraalisessa rasvakudoksessa (Berndt ym., 2005). On myös huomattava, että omentiini ei kuitenkaan ole täysin rasvakudokselle spesifi vaan omentiinin erityistä tapahtuu myös suoliston Panethin soluista (Komiya ym., 1998). Koska Panethin solujen erityys tapahtuu suolen lumeniin, niin todennäköisesti juuri Panethin solut ovatkin verenkierrossa esiintyvän omentiinin tärkein lähde (Yang ym., 2006). Tyypin 2 diabeetikoilla seerumin omentiinipitoisuuden on todettu olevan merkitsevästi pienempi verrattuna henkilöihin, joiden glukoosiainevaihdunta

on normaali (Yoo ym., 2011). Lisäksi pienen omentiinipitoisuuden on todettu olevan yhteydessä mm. sydän- ja verisuonitauteihin liittyvään endoteelin dysfunktiioon (Moreno-Navarrete ym., 2011), sepelvaltimotautiin (Shibata ym., 2011), arterioiden jäykkyyteen (Yoo ym., 2013), verisuonten sisäkerrosten paksuuteen (intima-media thickness) (Shibata ym., 2011) sekä alkavaan metaboliseen oirehtymään (Bremer ym., 2013; Jialal ym., 2013).

### **2.3.3 Omentiini ja yhteys tulehdukseen**

Omentiinia pidetään adiponektiinin tavoin anti-inflammatorisena adipokiinina (Kazama ym., 2012). Omentiinilla onkin todettu olevan käänteinen yhteys krooniseen tulehdukseen (Catoi ym., 2014). Lisäksi omentiinilla on todettu negatiivinen yhteys tuumorinekroositekijä-alfaan (Catoi ym., 2014). Vaikuttaa siltä, että tulehdus säätelee omentiini-1 -pitoisuuksia (Yoo ym., 2011). Omentiinilla näyttäisi olevan käänteinen korrelaatio myös seerumin C-reaktiivisen proteiinin (CRP) kanssa (Alissa ym., 2016), mikä myös tukisi aiempia havaintoja omentiinin anti-inflammatorisesta luonteesta.

### **2.3.4 Yhteys adiponektiiniin, insuliiniherkkyyteen ja tyypin 2 diabetekseen**

Tutkimusten mukaan omentiini korreloi positiivisesti adiponektiinin pitoisuuden kanssa (de Souza Batista ym., 2007). Omentiinipitoisuuksien on todettu pienenevän mm. lihavuudessa (de Souza Batista ym., 2007) sekä tyypin 2 diabeteksessä (Pan ym., 2010; Yan ym., 2011). Omentiinilla arvellaan myös olevan insuliiniherkkyyttä lisääviä ominaisuuksia ja sitä kautta vaikutus T2D:een (Yang ym., 2006). Lisävahvistusta omentiinin ja T2D:n väliselle yhteydelle antaa havainto, että omentiinia koodaava geeni sijaitsee kromosomialueella, joka on juurikin yhdistetty tyypin 2 diabetekseen (Schaffler ym., 2005; Xiang ym., 2004). Matalat omentiinitasot voivat olla yksi syy insuliinivälitteisen glukoosin solun oton vähenemiselle insuliiniresistenssissä (Catoi ym., 2014). Kokeissa onkin todettu rekombinantti-omentiinin tehostavan insuliinin stimuloimaa glukoosin solunottoa ihmisten sekä omentaalisissa että subkutaaneissa adiposyyteissä sekä tehostavan Akt-välitteistä signaalointia insuliinista riippumattomalla, itsenäisellä mekanismilla (Yang ym., 2006). Omentiinin suotuisaa vaikutusta insuliiniherkkyyteen tukee myös se, että plasman omentiinilla on todettu negatiivinen korrelaatio sekä veren glukoosipitoisuuteen, HOMA:an (homeostasis model

assessment of insulin resistance, ks. luku 2.4.2) että 17-beta-estradioliin PCOS:a sairastavilla (Tan ym., 2008). Sairaalloisesti lihavilla korkean veren glukoosipitoisuuden onkin todettu voivan vähentää omenttiin tuotantoa (Catoi ym., 2014). Yoo ym. (2011) tutkimuksessa todettiin, että seerumin omentiinipitoisuus oli merkitsevästi pienempi tyyppin 2 diabeetikoilla verrattuna kontroleihin sekä oli vielä pienempi, jos koehenkilöillä oli kaulavaltimoplakkiaym. On tärkeää kuitenkin huomata, että vaikka omentiini lisää glukoosin soluunottoa rasvasoluissa (etenkin viskeraalisissa), omentiinilla ei tiettävästi muutoin ole muita insuliinin kaltaisia vaikutuksia (Singh ym., 2009).

### **2.3.5 Yhteys lipoproteiineihin ja lipidiaineenvaihduntaan**

Omentiinilla on vaikutus myös ihmisen lipoproteiineihin. Omentiinilla on mm. positiivinen korrelaatio VLDL:n keskikokoon (Panagiotou, 2014), positiivinen korrelaatio HDL-pitoisuuteen (Shibata ym., 2011) sekä negatiivinen yhteys pienten VLDL-partikkeleiden kanssa (Panagiotou ym., 2014). Myös veren omentiinipitoisuuden ja kokonaiskolesterolipitoisuuden välillä on todettu yhteys (Catoi ym., 2014). Mielenkiintoista on, että omentiinilla on käänteinen yhteys irisiiniinimiseen lihaskudoksesta erittyvään myokiniiniin, jolla myös on todettu yhteys ihmisen lipoproteiiniprofiiliin (Panagiotou, 2014) ja jonka on todettu lisäävän insuliiniherkkyttä hiirillä (Bostrom ym., 2012). Irsiinillä on myös negatiivinen yhteys HDL-partikkelien pitoisuuteen - etenkin suurien HDL-partikkelien pitoisuuteen - toisin kuin omentiinilla (Panagiotou ym., 2014). Irsiinillä oli myös positiivinen, vaikkakin marginaalinen, korrelaatio VLDL:n partikkelikokoon (Panagiotou ym., 2014). Nämä tulokset antavat viitteitä, että omentiinilla olisi rooli lipoproteiinipartikkeleiden sekä pitoisuuden että koon säätelyssä (Panagiotou ym., 2014). Omentiini ja irisiini näyttäisivätkin toimivan osana lihasrasvakudoskardiovaskulaariakselia, jossa irisiini vaikuttaisi olevan pro-inflammatorinen ja aterogeeninen ja omentiinin rooli olisi toimia mahdollisesti irisiiniherkistäjänä (Panagiotou ym., 2014).

### **2.3.6 Omentiinin yhteydet lihavuuteen**

Plasman omentiinipitoisuuden on todettu pienenevän lihavuudessa (de Souza Batista ym., 2007). Omentiinilla vaikuttaisikin olevan negatiivinen yhteys ei ainoastaan insuliiniresistenssiin vaan

myös painoon sekä siihen olennaisesti liittyviin antropometriisiin mittareihin: BMI:iin ja vyötärönympärykseen (Moreno-Navarrete ym., 2010; de Souza Batista ym., 2007; Tan ym., 2008). Omenttiinilla on myös käänteinen korrelaatio leptiiniin (de Souza Batista ym., 2007), joka puolestaan on tärkeä viestiaine rasvan varastoinnin ja ruokahalun säätelyssä. Omenttiinipitoisuus siis suurenee laihdutettaessa ja onkin arveltu, että painon pudotukseen liittyvät glykeemiseen profiiliin kohdistuvat suotuisat vaikutukset välittyisivät ainakin osin juuri omenttiin kautta (Moreno-Navarrete ym., 2010). Omenttiini korreloi negatiivisesti myös paastoinsuliinin ja HOMA:n kanssa sekä positiivisesti adiponektiinin kanssa (Souza Batista ym., 2007). Painon pudotuksella on siis tärkeä rooli proinflammatoristen adiposytokiinien pitoisuuksien pienemisessä ja verenkierron adiponektiinitasojen suurenemisessa (Puglisi ym., 2008; Belza ym., 2009).

Tutkimusten mukaan painon pudotukseen liittyy omenttiinipitoisuuden suureneminen (Moreno-Navarrete ym., 2010). Moreno-Navarrete ym. tutkimuksissa intervention alussa koehenkilöiden omenttiinipitoisuudet olivat  $44.9 \pm 9.02$  ng/ml, mutta painon pudotuksen jälkeen  $53.4 \pm 8.8$  ng/ml. Tämä painon pudotus ja siihen liittynyt omenttiinipitoisuuden suureneminen yhdistyi puolestaan parantuneeseen insuliiniherkkyyteen (negatiivinen yhteys HOMA:an ja paastoinsuliinipitoisuuteen)ym. Toisaalta on mielenkiintoista huomata, että omenttiini ilmenee erityisesti viskeraalisessa (omentaalisessa) rasvakudoksessa vaikka sentraalinen (viskeraalinen) lihavuus perifeerisen sijaan on nimenomaan enemmän yhteydessä insuliiniresistenssiin, tyypin 2 diabetekseen sekä kardiovaskulaaritauteihin (Yang ym., 2006). On kuitenkin muistettava, että veren omenttiinipitoisuuteen vaikuttaa eniten nimenomaan suoliston Paneth-soluista peräisin oleva omenttiini (Yang ym., 2006). Lisäksi vaikka omenttiini lisää glukoosin solunottoa viskeraalisessa rasvassa, niin on muistettava, että myös kortisoli (etenkin kortisolin liikaeritys) lisää rasvamassaa voimakkaasti erityisesti juuri viskeraalisessa rasvakudoksessa eli omenttiinin rooli viskeraalisen rasvamassan lisääjänä ei välttämättä ole kausaalinen (Kopelman, 1994). Huomionarvoista on myös se, että kaikissa tutkimuksissa ei löydetty ollenkaan yhteyttä omenttiinipitoisuuden ja BMI:n välillä (esim. Catoi ym., 2014), vaikka seerumin omenttiinipitoisuuden tiedetään pienenevän ainakin sairaalloisessa lihavuudessa (Catoi ym., 2014).

### **2.3.7 Omentiinin vaikutukset sydän- ja verisuonitauteihin**

Omentiini (omentiini-1) ei ainoastaan toimi osana insuliinin signalointia vaan vaikuttaa, että sillä olisi myös vaikutusta anti-ateroskleroottisiin prosesseihin (Yoo ym., 2011) ja sitä kautta myös kardioprotektiivinen vaikutus (Greulich ym., 2013). Omentiini korreloi mm. käänteisesti koronaaritaudin riskiin (Alissa ym., 2016). Omentiinilla on lisäksi negatiivinen yhteys kokonaiskolesterolipitoisuuteen sekä dyslipidemiaan (Catoi ym., 2014). Omentiinilla on myös mahdollisesti verisuonia laajentava vaikutus (Yamawaki ym., 2010). Verenkierron omentiinitasojen on todettu vaikuttavan verisuonten endoteelin toimintaan henkilöillä, joilla glukoosinsieto on heikentynyt (Morreno-Navarrete ym., 2011). Omentiinin on todettu korreloivan negatiivisesti kaulavaltimoiden seinämäpaksuuteen (IMT, intima media thickness) sekä tyypin 2 diabeetikoilla (Yoo ym., 2011), metabolisesta oireyhtymästä kärsivillä (Liu ym., 2011) että terveilläkin (Shibata ym., 2011). Lisäksi omentiini korreloi positiivisesti HDL-pitoisuuden kanssa (de Souza Batista ym., 2007) ja toisaalta negatiivisesti seerumin kokonaiskolesterolipitoisuuden kanssa (Catoi ym., 2014), mikä voisi selittää ainakin osin omentiiniin liitettyjä kardioprotektiivisia vaikutuksia. Omentiinia on löydetty myös ihmisen epikardiumin rasvakudoksesta (Fain ym., 2008), mikä osaltaan selittää omentiinin merkitystä myös juuri sydämen toiminnalle.

Edellä esitetyn perusteella voisi päätellä, että omentiinilla olisi automaattisesti aina verisuoni- ja sydäntaudeilta suojaava rooli. Kuitenkin Saelyn ym. (2016) mukaan jo koronaaritautia sairastavilla veren korkea veren omentiinipitoisuus korreloi kardiovaskulaaritapahtumien lisääntyneeseen määrään, jonka perusteella voisi ajatella omentiinilla olevan etenkin jo syntyneissä patologioissa mahdollisesti myös haitallisia vaikutuksia. Toisaalta esim. El-Mesallamy ym. (2011) eivät havainneet selkeitä eroja seerumin omentiinipitoisuuksissa iskeemistä sydänsairautta sairastavien ja ei-sairastavien tyypin 2 diabeetikkojen välillä, vaikkakin pitoisuudet verrattuna terveisiin verrokkeihin olivatkin merkitsevästi pienempiä ym.

### **2.3.8 Omentiini ja PCOS**

Lihavien sekä diabeetikoiden lisäksi seerumin omentiinitasojen sekä rasvakudoksen omentiinin erityksen on todettu merkitsevästi laskevan PCOS:sta kärsivillä (de Souza Batista ym., 2007; Tan

ym., 2008)). Lisäksi PCOS-potilaiden plasman omentiinilla on todettu korrelaatio negatiivinen sekä veren glukoosipitoisuuteen, HOMA:an että 17-beta-estradioliin PCOS:a sairastavilla (Tan ym., 2008). Tämä ei liene yllättävää, sillä PCOS:n hyvin tavallisia oireita ovat sokeriaineenvaihdunnan häiriöt (insuliiniresistenssi), painon nousu sekä erilaiset hormonaaliset häiriöt (Dunaif, 1997; Wild ym., 1985).

## 2.4 Glukoosiaineenvaihdunta ja diabetes

Tyypin 2 diabeetikoilla on joko heikentynyt glukoosin sieto (IGT) ja/tai heikentynyt paastoglukoosi (IFG) tietyn aikaa ennenkuin diabetes varsinaisesti kehittyy. Kollektiivisesti näitä kahta tilaa kutsutaan nimellä prediabetes. Prediabetekseen liittyy läheisesti insuliiniresistenssi, joka puolestaan voi olla hepaattista (useimmiten IFG:ssä) tai perifeeristä (yleisempää IGT:ssä) (Ferrannini ym., 2011; Abdil-Ghani ym., 2006). Monissa tutkimuksissa on osoitettu, että plasman kohoneilla glukoosi- ja rasvahappo-aineenvaihdunnan metaboliiteilla – ns. glukolipotoksisuudella – voisi olla jopa suoraan kausaalinen rooli diabeteksen synnyssä (Poitout ym., 2010; Prentice ym., 2014). Esimerkiksi vapaiden rasvahappojen – kuten myös eräiden fosfolipidien sekä eräiden aminohappojen – rooli T2D:n patogeneesissä (sekä T2D:ssä että GDM:ssä) onkin noussut vahvasti esille (Björntorp ym., 1969; Boden, 2002, 2003; Suhre ym., 2010; Wang ym., 2011; Wurtz ym., 2012; Floegel ym., 2013).

### 2.4.1 Diabeteksen patogeneesi ja riskitekijät

Tyypin 2 diabeteksen alussa on tyypillistä beetasolumassan sekä insuliinin erityksen lisääntyminen (Butler ym., 2003; Kahn, 2003; Weyer ym., 1999). Arvellaan, että kroonisesti lisääntynyt insuliinin erityksen tarve yhdessä ympäristötekijöiden ja geneettisten tekijöiden kanssa, vaikuttaa beetasolujen toiminnan heikentymiseen, mikä aikaan saa IGT- ja IFG-ilmiasun (fenotyyppin) ilmaantumisen eli prediabeteksen alkamisen (Liu ym 2016; Abdul-Ghani and DeFronzo, 2009; Kahn, 2003). Lihavuus on edelleen yksi tärkeimmistä tyypin 2 diabeteksen riskitekijöistä (Rutter ym., 2012; Xu ym., 2014). Patogeneesissä on viime aikoina nostettu esille mm. endoplasmisen solulimakalvoston stressi (ER-stressi), glukolipotoksisuus, oksidatiivinen stressi sekä AGE-tuotteet.

### 2.4.2 Lihavuus, insuliiniresistenssi ja diabetes

Lihavuus on edelleen yksi tärkeimmistä tyypin 2 diabeteksen riskitekijöistä (Rutter ym., 2012; Xu ym., 2014). Lihavuus aiheuttaa mm. elimistön oksidatiivisen stressin lisääntymistä sekä insuliiniresistenssiä (Himmetoglu ym., 2013; Liu ym., 2014), lipidien aikaansaamaa beetasolujen dysfunktioita (Shao ym., 2013) sekä troofisten tekijöiden erityksen muutoksia (White ym., 2014; Zhang ym., 2014). Lihavuus on lähes aina yhteydessä insuliiniresistenssiin (Kahn ym., 2003). Abdominaalisella lihavuudella on vahva käänteinen korrelaatio insuliinin eritykseen ja beetasolujen toimintaan (Cnop ym., 2007). Abdominaalisen adipositeetin lisääntyminen on siis haitallista beetasoluille (Cnop, 2008) – ektooppisen rasvan kerääntyminen esimerkiksi lihavuuden seurauksena haimaan vaikuttaa suoraan beetasolujen toimintaan (Pinnick ym., 2008; Tushuizen ym., 2007). Kyse voi osin olla myös muiden rasvavarastojen (viskeraalisen rasvan ja subkutaanin rasvan) adiposyyttien sekä beetasolujen välisestä interaktiosta tai jopa beetasolujen ja lihasten välisestä interaktiosta (Cnop ym., 2007; Handschin ym., 2007).

### 2.4.3 Glukotoksisuus

Diabeteksen patogeneesille on oleellista beetasolujen tuhoutuminen apoptoosin kautta. Tässä erityisen tärkeässä roolissa vaikuttaisi olevan hyperglykemian aikaan saama glukotoksisuus sekä vapaiden rasvahappojen (FFA:t) että – vähemmässä määrin – tiettyjen lipoproteiinien välittämä lipotoksisuus. Näistä – hyperglykemiasta yhdessä vapaiden rasvahappojen ylimäärän aiheuttaman haitallisuuden kanssa – käytetään kollektiivisesti nimitystä glukolipotoksisuus. On myös arveltu, että glukolipotoksisuuden ja siitä seuraavan heikentyneen insuliinin erityksen taustalla voisi olla inkretiinien – kuten GLP-1:n – puute. Esimerkiksi juuri GLP-1:n on todettu Akt-reittiä aktivoimalla suojaavan beetasoluja glukolipotoksisuudelta (Zhou ym., 2015).

Glukotoksisuudella tarkoitetaan siis hyperglykemian kykyä vaurioittaa beetasoluja. Beetasolujen apoptoosissa lipotoksisuus on tärkeä tekijä, mutta myös hyperglykemia voi vaurioittaa beetasoluja esim. lisäämällä glykaatiota (AGE-tuotteiden syntyä). Lisäksi suuri määrä glukoosia voi lisätä beetasolutuhoa lisäämällä synergisesti vapaiden rasvahappojen lipotoksisuutta: glukoosi estää mitokondriaalista NEFA-beeta-oksidaatiota, mikä lisää lipotoksisuutta (El-Assaad ym., 2003;



Hellemans ym., 2007). Toisaalta on kuitenkin huomattava, että beetaoksidation lisääntyminen lisää ROS-yhdisteiden muodostumista, mikä lisää NEFA-rasvahappojen toksisuutta (Cnop ym., 2008).

#### **2.4.4 Lipotoksisuus**

Lipotoksisuudella tarkoitetaan veren kroonisesti kohonneiden vapaiden rasvahappotasojen beetasoluihin kohdistamia haitallisia vaikutuksia. Adiposyyttien ja beetasolujen välistä vuoropuhelua välittävät siis NEFA:t (ei-esteröidyt rasvahapot) eli vapaat rasvahapot (FFA:t) yhdessä adipokiinien kanssa työssä aiemmin käsiteltyjen adipokiinien kanssa. Sekä GDM:ssä että T2D:ssä on tyypillistä metabolisen profiilin muutokset – etenkin juuri lipidien kuten vapaiden rasvahappojen - etenkin monitydyttymättömien pitkäketjuisten rasvahappojen - pitoisuuksissa (Björntorp ym., 1969; Boden, 2002, 2003; Bomba-Opon ym., 2006). Monissa tutkimuksissa on todettu, että korkeat NEFA-tasot (FFA-tasot) – etenkin tyydyttyneet NEFA:t – yhdessä matalan adiponektiinipitoisuuden kanssa – ennustavat diabeteksen kehittymistä hyvin vahvasti (Lindsay ym., 2002; Pankow ym., 2004; Paolisso ym., 1995; Wang ym., 2003).

Hiirillä ja koirilla runsaan rasvan saannin on todettu heikentävän beetasolujen kompensatorista toimintaa insuliiniresistenssissä ja lihavuudessa (Kaiyala ym., 1999; Winzell 2007). Ihmisillä on todettu kohonneiden NEFA-tasojen aikaan saavan beetasolujen toiminnan heikentymistä etenkin ihmisillä, joilla on geneettinen alttius tyypin 2 diabetekseen (Carpentier ym., 1999; Kashyap ym., 2003; Paolisso ym., 1995). Erityisesti palmitaatin (tyydyttynyt NEFA) sekä vähemmässä määrin tyydyttymättömän oleaatin on todettu aiheuttavan apoptoosia rottien beetasoluissa (Cnop ym., 2001; Kharroubi ym., 2004). Lisäksi on erittäin mielenkiintoista huomata, että ekvimolaarisina määrinä oleaatti ja palmitaatti eivät näyttäisi olevan toksisia beetasoluille, mistä voisi päätellä, että ravinnosta on hyvä saada tasaisesti sekä tyydyttyneitä että tyydyttymättömiä rasvahappoja – ravinnon tyydyttyneet rasvahapot nimittäin kulkeutuvat nopeasti verenkierrosta myös beetasoluihin, missä ne voivat aikaan saada beetasolujen apoptoosia (Cnop ym., 2008).

Beetasoluissa on LDL-reseptoreja (Gruppung ym., 1997; Cnop ym., 2000) – LDL:n runsas endosytoosi lisää ROS-tuotteiden muodostumista, mikä voi lisätä beetasolujen apoptoosia

(beetasolujen lipotoksisuutta) (Cnop ym., 2002). Solujen sisällä LDL-partikkeleita käsitellään oksidatiivisesti, jolloin syntyy sekä kolesterolista että NEFA:sta reaktiivisia peroksideja, mikä edistää radikaalireaktioiden propagaatiota (Cnop ym., 2002). Antioksidantit ja mm. HDL-partikkelit pystyvät estämään näitä reaktioita inaktivoimalla syntyneitä reaktiivisia asyyleja (reactive fatty acyl species) (Cnop ym., 2002). Myös VLDL vaikuttaa suojaavan näiltä reaktioilta johtuen todennäköisesti siitä, että se kilpailee LDL:n kanssa LDL-reseptoreista (Cnop ym., 2002). Rungas LDL:n ja VLDL:n reseptorivälitteinen endosytoosi voi johtaa lipidien kertymiseen beetasoluihin suuriksi rasvoja varastoiviksi lysosomeiksi (Cnop ym., 2000). Korkea rasvan saanti voi puolestaan edistää beetasolujen apoptoosia sekä lisätä amyloidin kertymistä beetasoluihin (Hull ym., 2003). Myös Zucker-rotilla (toimivat mallina lihavuuden aiheuttamalle T2D:lle) on todettu, että korkeat NEFA-tasot aikaan saavat triasyyliglyserolin kertymistä haiman saarekkeisiin (Lee ym., 1994; Lee ym., 1997). Sytoplasmisen NEFA:n nousu lisää myös NO-syntaasin ilmentymistä, mikä puolestaan lisää beetasolujen typpioksidivälitteistä apoptoosia (Shimabukuro ym., 1997). Palmitaatin oleattia korkeamman lipotoksisuuden on arveltu johtuvan sen vähemmän tehokkaasta esteröitymiskyvystä (Cnop ym., 2001). MUFA-rasvahapoilla näyttää olevan myös vaikutus palmitaatin lipotoksisuuden ehkäisyssä (Maedler ym., 2003). On huomattava, että periferiassa NEFA:t aktivoivat proapoptoottisen tumatekijän NF-kB:n (Toll-reseptorien kautta), mutta beetasoluissa NEFA:t eivät tutkimusten mukaan aktivoi NF-kB:ta (Kharroubi ym., 2004; Shoelson ym., 2006).

Siinä missä subkutaani rasva säätelee elimistön leptiinitasoa niin intra-abdominaalinen rasva on tärkein plasman adiponektiinipitoisuutta ja insuliiniherkkyyttä säätelevä rasvavarasto – intra-abdominaalisen rasvavaraston kasvaminen pienentää adiponektiinipitoisuutta sekä suurentaa NEFA-pitoisuutta (Cnop ym., 2003; Cnop ym., 2002). Matala adiponektiinipitoisuus yhdessä korkean NEFA-pitoisuuden kanssa estävät insuliinin toimintaa sekä maksassa että lihaksissa, mikä johtaa lisääntyneeseen glukoneogeneesiin sekä alentuneeseen glukoosin soluunottoon ja lopulta hepaattiseen insuliiniresistenssiin (Cnop ym., 2008; Nieves ym., 2003). Samalla myös maksan lipaasin aktiivisuus laskee, minkä vuoksi HDL-partikkeleiden määrä vähenee, mutta yleensä hyvin vaarallisena pidettyjen pienten tiheiden LDL-partikkeleiden määrä suurenee (Cnop ym., 2008; Nieves ym., 2003).

### 2.4.5 ER-stressi

ER-stressi on yksi diabeteksen patogeneesiin liitettyistä mekanismeista. ER-stressi aikaan saa soluissa vasteen, jota kutsutaan UPR:ksi (unfolded protein response), jonka funktio on säädellä proteiinien laskostumista lisäämällä mm. kaitsijaproteiinien synteesiä niin, että ER:n kapasiteetti laskostumiselle ei ylitä (Kharroubi ym., 2004). Jos tämä ei onnistu, vaste johtaa solun apoptoosiin (Cnop ym., 2007). Useissa viime aikaisissa tutkimuksissa onkin löydetty ER-stressimarkkereita tyyppin 2 diabeetikkojen beetasoluista (Hartman ym., 2004; Huang ym., 2007; Laybutt ym., 2007). ER-stressin on arveltu olevan myös yksi lihavuutta ja insuliiniresistenssia yhdistävä tekijä (Nakatani ym., 2005; Ozcan ym., 2004). Muissa tutkimuksissa haiman beetasolujen heikentynyt kyky prosessoida insuliinia on yhdistetty lisääntyneeseen ER-stressiin sekä myös ROS-tuottoon (Wu et Kaufman, 2006; Kashemsant et Chan, 2006). Prentice ym. (2014) eivät kuitenkaan tutkimuksessaan onnistuneet osoittamaan haiman saarekkeiden käsittelyn CMPF:llä – joka on liitetty juuri vahvasti beetasolujen dysfunktioon - lisäävän ER-stressiin yhdistettyjen merkkiaineiden pitoisuuttaym. Mielenkiintoista on myös, että haiman beetasolujen lipotoksisuutta aikaan saavien NEFA:n on todettu lisäävän myös ER-stressiä beetasoluissa (Kharroubi ym., 2004).

### 2.4.6 Oksidatiivinen stressi (ROS-tuotanto) ja diabetes

ROS-tuotteita ja oksidatiivista stressiä voidaan pitää diabeteksen patogeneesin kannalta erittäin merkittävänä tekijänä (Maiese, 2015). Beetasolut ovat erityisen herkkiä oksidatiiviselle stressille johtuen niiden vähäisistä antioksidanttipitoisuuksista (Robertson, 2004) ja tästä syystä antioksidanttien onkin ajateltu voivan toimia T2D:n hoidon adjuvanttina, mitä tukee havainto siitä, että antioksidantin (NAC, N-asetyyli-L-kysteini) avulla oli mahdollista ehkäistä CMPF:n aiheuttamat soluvauriot (Prentice ym., 2014). Oksidatiivisella stressillä voi olla hyvin suuri vaikutus solujen tuhoutumiseen (Chong ym., 2005; Maiese, 2015; Peng ym., 2015; Xin ym., 2015). ROS-tuotteet, kuten vapaat typpiradikaaliyhdisteet (mm. typpioksidi ja peroksinitriitti), superoksidiradikaalit, hydroksiperoksidit sekä singlettihappi, aiheuttavat oksidatiivista stressiä (Kwon ym., 2015). Oksidatiivinen stressi voi aiheuttaa DNA-vaurioita, mitokondriaalisia vaurioita, muiden soluorganellien vaurioita, proteiinien laskostumisen häiriöitä sekä neuronien synaptista dysfunktioita (Maiese ym., 2012; Palma ym., 2014). On tärkeää huomata, että myös sekä akuutisti

että kroonisesti veren kohonnut glukoosipitoisuus voivat saada aikaan ROS-tuotteiden muodostumista TD2:ssa (Monnier ym., 2006), mikä on tärkeää mietittäessä kumpi on enemmän syy ja kumpi seuraus T2D:n patogeneesissä – oksidatiivinen stressi vai kohonnut veren sokeri: oksidatiivinen stressi heikentää beetasolujen toimintaa, mikä voi suurentaa veren glukoosipitoisuutta, mutta toisaalta kohonnut veren glukoosipitoisuus lisää oksidatiivista stressiä. Kohonnut verensokeri lisää oksidatiivista stressiä, mikä puolestaan lisää soluvaurioita mm. endoteelisoluissa (Zhao ym., 2007; Hou ym., 2010), neuroneissa (Fu ym., 2012), mutta myös esim. sydänlihassoluissa (Lee ym., 2012) sekä voi nostaa elimistön glutationitasoja sekä lisätä lipidiperoksidaatiota (Das ym., 2014).

Lisääntyneen ROS-tuotannon on osoitettu moduloivan insuliinin transkriptiota muuttamalla AKT:n ja GSK3 $\beta$ :n aktiivisuutta (Poitout et Robertson, 2008; Kawamori ym., 2003): normaalisti aktivoitunut AKT fosforyloi (inaktivoi) GSK3 $\beta$ :n ja FOXO1:n, mutta oksidatiivinen stressi inaktivoi AKT:n, jolloin sekä GSK3 $\beta$  että FOXO1 aktivoituvat (Kawamori ym., 2006). CMPF:n on todettu merkitsevästi vähentävän AKT:n ja GSK3 $\beta$ :n fosforylaatiota eli vähentävän AKT:n aktiivisuutta ja lisäävän GSK3 $\beta$ :n aktiivisuutta (Prentice ym., 2014). Normaalisti FOXO1 on sytosolissa (Kitamura ym., 2005), mutta CMPF-käsittely sai aikaan FOXO1:n translokaation (sekvestraation) tumaan (Prentice ym., 2014). Samoin myös PDX1, joka normaalisti on tumassa (GSK3 $\beta$ :n fosforyloimana), siirtyi CMPF-käsittelyn seurauksena tumasta sytosoliin (Prentice ym., 2014).

Koska näiden transkriptiotekijöiden (FOXO1 ja PDX1) pitoisuudet eivät muuttuneet – mikä olisi voinut selittää translokaatiota - Prentice ym. (2014) päättelivät, että CMPF:n aiheuttama oksidatiivinen stressi vaikuttaa ei ainoastaan insuliinisignointiin, vaan myös insuliinin synteisiin siirtämällä FOXO1:ta tumaan, jossa se pilkkoutuu, mikä johtaa insuliinin synteessin alentumiseen (Prentice ym., 2014). Sopivan antioksidantin avulla (NAC) translokaatio oli kuitenkin estettävissä (Prentice ym., 2014). CMPF:llä ei todettu olevan vaikutusta insuliinisignoinnin kannalta toiseen tärkeään reittiin (ERK1/2-välitteinen reitti) eli CMPF vaikuttaakin olevan vaikutukseltaan spesifi juurikin AKT:lle (Prentice ym., 2014).

### 2.4.7 Mitokondriaalinen dysfunktio

Oksidatiivinen stressi aiheuttaa mitokondrioiden toiminnan heikkenemistä (Maiese, 2015; Pérez ym., 2014). Tyypin 2 diabeetikoiden luustolihasen mitokondrioiden on todettu olevan pienempiä kuin kontrolleilla (Kelley ym., 2002). Beetasolujen glukolipotoksisuus lisää oksidatiivista stressiä ja sitä kautta mitokondrioiden dysfunktioita mm. sytokromi c:n erityksen, kaspasiaktivaation sekä apoptoosin kautta (Liu ym., 2012). Yksi mekanismi on myös UCP-proteiinien 1-5 (UCP1-UCP5, uncoupling protein 1-5) ilmentymisen ja toiminnan muutokset, joilla voi olla merkittävä vaikutus solutuhon kannalta DM:ssä (Maiese ym., 2007; Liu ym., 2013). UCP-proteiinit "irtikytkevät" soluhengityksen hapenkulutuksen elektroninsiirtoketjun (ETC) ATP-tuotannosta (ATP-syntaasi), jolloin oksidatiivinen stressi lisääntyy (Maiese ym., 2007; Liu ym., 2013). UCP-proteiinien liiallisen ilmentymisen lihaksissa on hiirillä todettukin lisäävän insuliiniherkkyyttä (Li ym., 2000). Esim. UCP3 (uncoupling protein 3) lisää insuliinin sisäänottoa, rasvahappojen oksidaatiota sekä vähentää ROS-tuotantoa (Huppertz ym., 2001). Toisaalta esim. UCP2:n (uncoupling protein 2) on todettu vähentävän glukoosin stimuloimaa insuliinin eritystä beetasoluissa (Zhang ym., 2001).

### 2.4.8 Apoptoosi ja autofagia DM:ssä

Esimerkiksi edellä mainittu oksidatiivinen stressi voi indusoida ohjelmoidun solukuoleman (apoptoosi) sekä autofagiaa (Kim ym., 2014; Nakka ym., 2014). Vaikka autofagian tarkoitus onkin usein olla sytoprotektiivista (vaurioituneita soluorganelleja hajotetaan) niin DM:ssä autofagiolla on iso rooli solujen vaurioitumismekanismina: korkean verensokerin aikaan saama lisääntynyt autofagia heikentää mm. endoteelisten progenitorisolujen toimintaa, lisää mitokondriaalista oksidatiivista stressiä että endoplasmisen retikulumin (ER) stressiä sekä estää verisuonten uudismuodostumista (Kim ym., 2014; Martino ym., 2012).

Diabeteksessa mTOR-reitti (mammalian target of rapamycin, mechanistic target of rapamycin) toimii sekä apoptoosin että autofagian pääasiallisena aktivaatioreittinä (Chong et Maiese, 2012; Maiese, 2015). mTOR-reitti on tärkeä osa sytokiini- ja kasvutekijäsignaalointia – esim. erytropoietiinin sytoprotektiiviset vaikutukset välittyvät juuri mTOR-reitin kautta (Chong et Maiese, 2012; Chong ym., 2012; Shang ym., 2012; Maiese ym., 2013; Kim ym., 2013; Jia ym., 2014; Wang

ym., 2014). Myös SIRT1-deasetylaasi-entsyymi (Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog 1, Sirtuiini-1), jonka aktiivisuus voi mahdollisesti auttaa ehkäisemään insuliiniresistenssiä, toimii juuri mTOR-signaalireitin kautta (Wang ym., 2011).

#### **2.4.9 AGE-tuotteet ja diabetes**

AGE-tuotteita syntyy kun korkea veren glukoosipitoisuus aikaan saa elimistön normaalien proteiinien ja lipidien glykaatiota. Esimerkiksi DM:ssä korkea veren glukoosipitoisuus saa aikaan hyvin voimakkaasti hapettuneita ja glykoituneita LDL-lipoproteiineja, jotka lisäävät elimistön oksidatiivista stressiä ja indusoivat mm. retinan kapillaarien perisytyteisessä apoptoosia (Fu ym., 2012). AGE-tuotteiden on osoitettu indusoivan autofagiaa sekä vaskulaaristen sileälihassolujen proliferaatiota, joka on liitetty mm. ateroskleroosiin (Hu ym., 2012). AGE-tuotteet voivat lisätä ROS-tuotteiden muodostumista sekä kaspasien aktivaatiota (Weinberg ym., 2014).

#### **2.4.10 Inflammaatio ja diabetes**

Kuten aiemmin todettu, myös T2D:n taustalla on usein matala-asteinen tulehdus, johon liittyy sytokiinien – erityisesti adiposytokiinien erityksen häiriöitä – esim. häiriintynyt adiponektiinin erityksen häiriöitä. Mielenkiintoista on, että monista diabeteksen patogeneesiin liitettyistä mekanismeista - kuten tässäkin työssä käsitellyt oksidatiivinen stressi, ER stressi, tulehdus – vaikuttaa siltä, että näistä juuri subkliininen tulehdus on vaihe, joka käynnistyy koko tautiprosessissa ensimmäisenä (Donath ja Shoelson, 2011)..

#### **2.4.11 Glukoosi- ja insuliiniaineenvaihdunnan mittarit**

Glukoositoleranssi ja insuliiniherkkyys riippuvat molemmat useista tekijöistä – mm. beetasolujen insuliinin erityksestä, insuliinin munuaispuhdistumasta, insuliinin tehosta saada aikaan glukoosin soluunottoa sekä inhiboida glukoosin tuotantoa - mistä syystä näiden mittaaminen ei aina ole yksinkertaista (Bergman, 1989). Perinteisesti insuliiniherkkyiden (SI) testauksen standardimittauksena on käytetty euglykeemistä hyperinsulinemista clamp-mittausta tai suonensisäistä glukoosirasituskoetta (IVGTT), mutta näiden lisäksi on monia sijaismarkkereita,

joiden arvoja voidaan käyttää insuliiniherkkyyden määrittämisessä pelkän paastoglukoosi- ja paastoinsuliinipitoisuuksien ohella. Näiden markkereiden määrittämisessä on usein keskeisessä roolissa oraallinen glukoosirasituskoe (OGTT). OGTT:tä käytetään usein paastoglukoosin ja -insuliinin ohella insuliiniherkkyyden (SI) määrittämiseen, mutta ongelmana on, että OGTT ei välttämättä anna kuvaa insuliinin erityksestä normaalissa fysiologisessa tilanteessa (Selimoglu ym., 2009).

Muista malleista HOMA (HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance) on yksi käytetyimmistä malleista insuliiniresistenssistä kertovien indeksien ja mittalukujen määrittämiseen (Borai ym., 2011). HOMA-indeksi huomioi sekä paastoinsuliinin että paastoglukoosin arvot (suuri HOMA-arvo kertoo suuresta riskistä ja matala pienestä riskistä insuliiniresistenssiin). HOMA on yksinkertainen indeksi, jolla kliinisessä työssä ei ole niinkään käyttöä, mutta joka on tutkimustyössä hyvä indeksi insuliiniherkkyyden arviointiin. HOMA:ssa insuliiniherkkyys (SI) määritetään plasman glukoosi- ja insuliinipitoisuuksista OGTT:ssä ja sitä pidetään kelvollisena sijaismarkkerina clamp-testille (Kanauchi ym., 2002). On kuitenkin huomattava, että mikään näistä mittareista ei välttämättä ole optimaalinen kaikkiin tilanteisiin. Esim. Brun ym. (2013) eivät pitäneet HOMA-IR:tä omassa tutkimuksessaan erityisen hyvänä insuliiniherkkyyden ennustajana (Brun ym., 2013).

## 2.6 Metabolomi ja metabolomiikka

Metabolomilla tarkoitetaan kaikkia jonkin organismin metabolian substraatteina tai tuotteina toimivia endo- tai eksogeenisiä pienimolekyylisiä yhdisteitä. Termiä metabolomi käytetään välillä synonyymina endogeeniselle metabolomille, mutta on kuitenkin huomattava, että eksogeeninen metabolomi (eksogeeniset metaboliitit) ovat yhtä lailla tärkeä ottaa huomioon tarkasteltaessa eliön fysiologiassa tai patofysiologiassa tapahtuvia muutoksia (Monteiro ym., 2013). Eksogeeninen metabolomi voidaan vielä jakaa ksenometabolomiin (kaikki elimistölle vieraat aineet mukaan lukien ravinnon yhdisteet) ja mikrobialiseen metabolomiin (suoliston mikrobiomin tuottamat yhdisteet) (Monteiro ym., 2013). Kun kaikki mahdolliset eksogeeniset ja mikrobialiset metaboliitit otetaan huomioon, ihmisen koko metabolomiin kuuluvien yhdisteiden määrä ylittää jopa 100 000 eri yhdistettä (Monteiro ym., 2013). Metabolomiikka on näiden pienimolekyylisten yhdisteiden

systemaattista analytiikkaa. Metabolomiikan suuri etu aiempiin tutkimusmenetelmiin nähden on se, että sen ei tarvitse olla kohdennettua, vaan se edustaa puolueetonta menetelmää eri tautien metaboliseen fenotyypitykseen (Rhee ym., 2012). Verrattuna genomiin (DNA), transkriptomiin (RNA) ja proteomiin (kaikki mahdolliset translaation tuotteet), metabolomi on potentiaalisesti eliön aineenvaihdunnan parhain mittari (Rhee ym., 2012).

### **2.6.1 Metabolomiikkatutkimuksessa käytetyt tekniikat**

Koska endogeenisiä metaboliitteja on hyvin erilaisia sekä molekyyllipainoltaan että polaarisuudeltaan sekä hyvin vaihtelevia pitoisuuksia, ei ole olemassa yhtä menetelmää näiden kaikkien - koko metabolomin - analysointiin kerralla. Nykyisin kaksi käytetyintä menetelmää ovat massaspektrometria (MS) sekä ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (NMR). Massaspektrometriaan on yleensä yhdistetty kromatografiaan perustuva metaboliittien erottelumenetelmä, kuten neste- tai kaasugromatografia. NMR:n edut ovat, että NMR:n käyttö ei juurikaan vaadi näytteen preparointia eikä siten myöskään tuhoa näytettä. NMR ei myöskään vaadi kromatografista erottelua eikä analyyttien ionisaatiota. NMR:n heikkous on kuitenkin sen alhainen analyttinen herkkyys sekä datan hyvin monimutkainen luonne, joista johtuen NMR:n avulla tapahtuva yhdisteiden identifioiminen ja kvantifikaatio rajoittuvat ihmisen bionesteissä yleensä alle sataan analyttiin per näyte (Rhee ym., 2012). MS:llä on korkeampi analyttinen tarkkuus ja siten MS:n käyttö mahdollistaa paljon laajemman metabolomin tutkimuksen ja soveltuu siten hyvin kohdentamattomaan tutkimukseen. Kumpaakin menetelmää voidaan kuitenkin käyttää sekä kohdennettuun että ei-kohdennettuun metabolomiikkaan (Rhee ym., 2012).

### **2.6.2 Metaboliittien tunnistaminen**

Metaboliitit voidaan tunnistaa, jos massaspektrometriasta saadaan tarkka massa-varaus-suhde ( $m/z$ ). Tunnistuksessa apuna voidaan käyttää tietokantoja (kuten METLIN ja HMDB), joihin on kerätty tietoja eri metaboliiteista (Johnson ym., 2016). Tandem-spektrometriassa identifiointi voidaan tehdä tandem-spektrofotometriassa saatavista fragmenteista (Johnson ym., 2016). Lisäksi



on mahdollista erityisillä kuvantamismenetelmillä (kuten MALDI, NIMS, DESI ja SIMS) saada selville metaboliittien sijainti kudoksenäytteissä (Johnson ym., 2016).

### **2.6.3 Kohdentamaton vs. kohdennettu metabolominen tutkimus**

Kohdentamattomassa metabolomisessa tutkimuksessa halutaan tarkastella koko metabolomia tai mahdollisimman suurta joukkoa yhdisteitä kerralla. Kohdennetussa metabolomiikassa tutkinnan kohteena on aina etukäteen päätetty sarja metaboliitteja, joiden identiteetti tunnetaan ja jotka halutaan kvantifioida, jolloin täysin puolueettoman tutkimuksen tekeminen ei ole mahdollista. Kohdentamattomassa tutkimuksessa ei voi olla etukäteen päätettyjä hypoteeseja ja tulokseksi saadaan aina suurempi joukko dataa, mikä voi johtaa uusien metaboliittien löytymiseen ja sitä kautta luoda uusia tutkimuskohteita kohdennetuille tutkimuksille (Rhee ym., 2012). Riskinä kuitenkin on, että tuloksia voidaan tulkita väärin, jos kaikkia metaboliitteja ei onnistuta luotettavasti identifioimaan (Rhee ym., 2012).

### **2.6.4 Metabolomisen tutkimukset haasteet**

Eksogeeniset metaboliitit (esimerkiksi ravinnon mukana tulevat yhdisteet) muodostavat yhden isoimmista metabolomisen tutkimuksen haasteista. Eksogeeninen metabolomi on todella laaja ja vaikuttaa jatkuvasti ihmiselimistön metabolomiin (O'Sullivan ym., 2011). Lisäksi suoliston mikrobiomin metabolomi vaikuttaa ihmiselimistön metabolomiin (Nicholson ym., 2005; Wikoff ym., 2009), joten metabolomin tutkimus on luonteeltaan hyvin kompleksia ja vielä osin alkutekijöissään. Lisäksi metabolisen fenotyypityksen metabolomiikan keinoin tekee haastavaksi se, että edes koko metabolomin tuntemus ei välttämättä riitä fenotyypin määrittämiseen, koska on huomioitava se, että metaboliitit toimivat osina biokemiallisia metaboliareittejä, joiden toiminta ei riipu pelkästään reiteillä toimivista substraateista ja tuotteista vaan myös niihin kohdistuvista lukuisista säätelytekijöistä sekä näiden kaikkien välisistä yhteyksistä toisiinsa (Monteiro ym., 2013).

### 3 Aineisto ja menetelmät

Käytetty aineisto perustui kalan ja kasviöljyn terveystvaikutuksia tutkineeseen AlfaKala-interventioon (n = 79), jossa oli neljä tutkimusryhmää – rasvaisen kalan ryhmä (n = 20), vähärasvaisen kalan ryhmä (n = 21), ALA-ryhmä (n = 18) sekä verrokkiryhmä (n = 20). osallistujilta mitattiin tietoja tutkimuksen alussa (vko 0) ja lopussa (vko 12) paino, seerumin lipidipitoisuudet, verenpaine, tulehdusmerkkiaineita, käänteisen kolesterolikuljetuksen merkkiaineita, sekä tehtiin OGTT ja otettiin verinäytteet lipidomisesta että metabolomisesta profiilista. Paino ja verenpaine mitattiin myös viikoilla 2, 4 ja 8. Lisäksi osalta osallistujista (40 henkilöä) otettiin rasvakudosnäyte. Tutkimusasetelmassa koehenkilöt oli jaettu neljään ryhmään: ALA-ryhmään, vähärasvaisen kalan ryhmään, rasvaisen kalan ryhmään sekä verrokkiryhmään. Tutkimuksen alussa toteutettiin 4 viikon run-in – jakso, jossa jokainen sai noudattaa omaa ruokavaliotaan kuitenkin siten, että jos henkilöt olivat käyttäneet kalaöljyä tai kasviöljyä lisäravinteena tai kasvisteroli- ja stanolivalmisteita, niin näiden käyttö tuli lopettaa vähintään 4 viikkoa ennen tutkimuksen alkua.

Alkuperäisen tutkimussuunnitelman mukaisesti tutkimukseen mukaan oli tarkoitus saada 100 henkilöä iältään 40–70 –vuotiaita, jotka jaettaisiin satunnaistetusti neljään ryhmään (aiempien metabolomiikkatutkimusten perusteella voidaan 25 hengen ryhmäkokoa pitää riittävänä kliinisesti merkitsevien muutosten havaitsemiseen). Sopivien kriteerit täyttävien henkilöiden löytämiseksi tutkimusta varten seulottiin 153 henkilöä, joista 96 täytti tutkimukseen osallistumiseen vaaditut kriteerit ja heidät jaettiin edellä mainittuihin neljään ryhmään satunnaisesti. 8 henkilöä kuitenkin jättäytyi pois tutkimuksesta jo 4 viikon run-in -jakson aikana, joten varsinaisen intervention aloitti 88 henkilöä. Intervention alettua 4 henkilöä keskeytti viikolla 0 ja 5 muuta viikkojen 1-3 aikana. Näin ollen intervention läpikäyneiden lopullinen määrä oli 79 henkilöä: 20 rasvaisen kalan ryhmässä, 21 vähärasvaisen kalan ryhmässä, 18 ALA-ryhmässä sekä 20 verrokkiryhmässä.

#### 3.1 Tutkimuksessa käytetyt ruokavaliot

Ruokavaliot olivat keskenään isokalorisia ja ne pohjautuivat tutkittavien tavanomaiseen ruokavalioon. Rasvaisen kalan ryhmään kuuluvat tutkimushenkilöt söivät rasvaista kalaa 4 ateriaa viikossa, joista kalaryhmän jäsenet saivat keskimäärin yhteensä n. 1 gramman EPA:aa ja DHA:ta

per päivä. Vähärasvaisen kalan ryhmään kuuluneet söivät vähärasvaista kalaa 4 ateriaa viikossa vähärasvaista kalaa. Molempien kalaryhmien jäsenet sekä verrokkiryhmä ohjeistettiin käyttämään oliiviöljyä kasviöljynä. ALA-ryhmään kuuluneet nauttivat ALA:aa 10 g per päivä camelinaöljynä. Verrokkiryhmä söi vähärasvaista lihaa (siipikarjaa, porsaan lihaa tai nautaa). Verrokkiryhmä sekä ALA-ryhmä saivat kuitenkin syödä kalaa yhden kala-aterian viikossa. Koehenkilöt pitivät kirjaa syömisistään neljän päivän ajan kerrallaan ennen tutkimuksen alkua sekä viikkojen 3, 7 ja 11 aikana, jotta koehenkilöiden ruokavalioiden toteutumisesta saatiin riittävästi tietoa. Lisäksi koehenkilöt kirjasivat ylös päivittäisen kalan sekä ALA-ryhmä camelinaöljyn käyttönsä.

### 3.2 Mittaukset ja näytteiden otto

Tutkimuksen aikana tehdyt biokemialliset mittaukset, kuten seerumin tulehdusmerkkiaineiden mittaukset tehtiin Itä-Suomen yliopiston Kuopion kampuksella sekä Itä-Suomen laboratoriokeskus ISLAB:issa käytössä olevaa metodologiaa hyödyntäen. Verinäytteiden otoaista huolehtivat koulutettu laboratoriohenkilökunta ja rasvakudosnäytteen otosta lääkäri.

### 3.3 Metabolomiikka, massaspektrometria

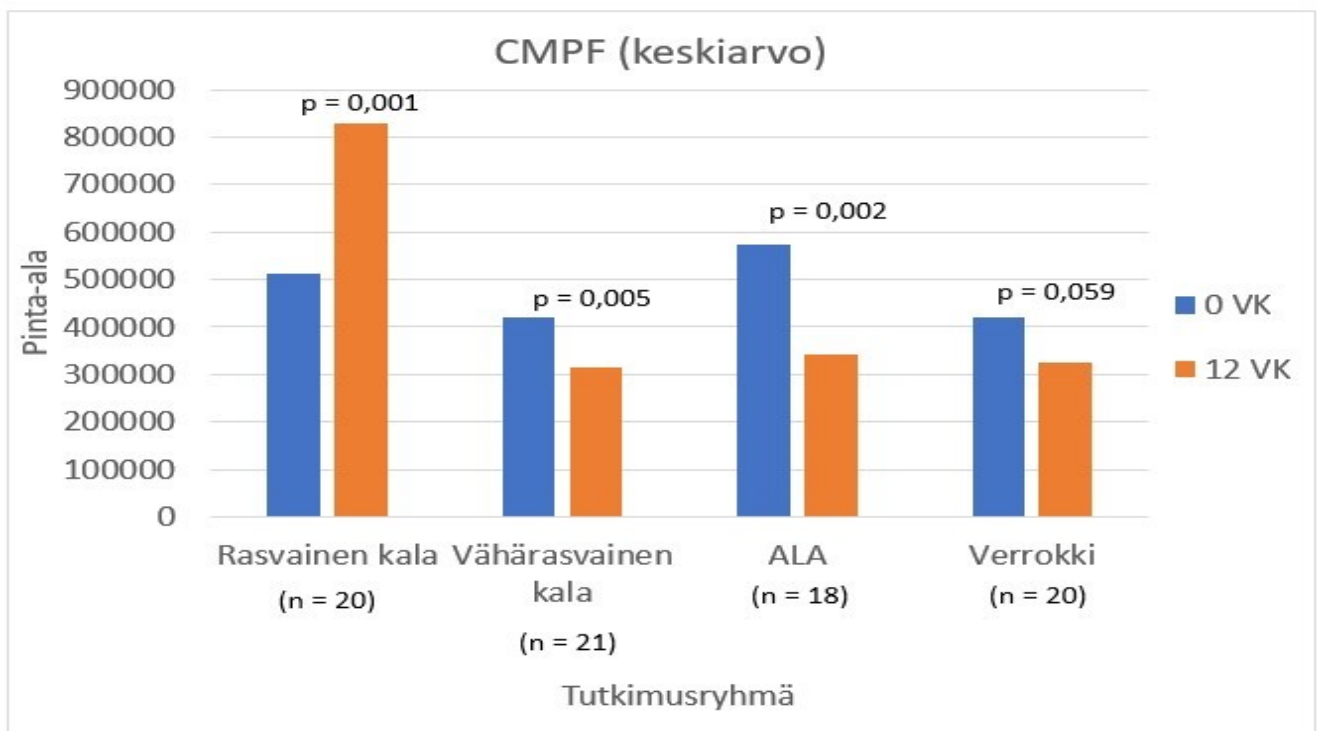
Analytiikkaan käytettiin LC-qTOF-massaspektrometriaa (LC-qTOF-MS), joka sopii hyvin ei-kohdennettuun metaboliittien profilointiin (Hanhineva ym., 2015). Tuloksena saatiin metabolominen profiili, josta tosin tässä työssä käytettiin koko profiilin sijasta vain CMPF-tulosta. Analyysit tehtiin Biokeskus Suomen Itä-Suomen yliopiston metabolomiikkalaboratoriossa. Varsinaiseen analyttien käsittelyyn ja erotteluun käytettävä laitteisto (LC-qTOF-MS) koostuu sekä käänteisen vaiheen että hydrofiiliseen erotteluun perustuvasta kromatografiasta, johon on yhdistetty metaboliittien erottelua varten qTOF-MS-analysaattori. Erottelussa käytetään sekä positiivista että negatiivista elektronisuihkuionisaatiota (ESI), joka mahdollistaa polariteetiltaan että pH-arvoiltaan hyvin erilaisten metaboliittien tunnistamisen. Datan analysointi käsittää datan esikäsittelyn, tilastoanalyysin sekä varsinaisen yhdisteiden tunnistuksen.

### 3.4 Tietojen käsittelyssä ja analyysissä käytetyt ohjelmistot

Yhdisteiden tunnistus sekä yhdisteiden suhteellinen kvantifikaatio toteutettiin käyttämällä metabolomiikkadatan käsittelyyn soveltuvaa avoimen lähdekoodin analysointiohjelmaa (XCMS, Scripts Center for Metabolomics and Mass Spectrometry). Tilastollisessa analyysissä käytettiin sekä monimuuttuja-analyysia että yhden muuttujan analyysia (mm. regressioanalyysia) hyödyntäen muun muassa R-ohjelmointikieltä. Varsinainen metaboliittien tunnistus perustui metaboliittien massojen vertailuun, spektrin tunnistukseen, MS/MS-fragmentaatioon sekä käytössä olevien metabolomitietokantojen (kuten Metlin ja HMD) sekä MS/MS spektritietokantojen käyttöön. Varsinaisen metabolomiikkatyövaiheen jälkeen (metaboliittien eristys ja tunnistus) ruokavalioon liittyvien muuttujien ja metaboliittien välisten korrelaatioiden löytämiseksi työssä käytettiin tilastovertailut mahdollistavia työkaluja, kuten SPSS (IBM Inc, Armonk, NY, versio 23).

## 4 Tulokset

Tutkimuksessa todettiin, että rasvaisen kalan syöjillä CMPF:n seerumtaso suureni 62%, kun taas kaikissa muissa tutkimusryhmissä (vähärasvainen kala, ALA-ryhmä ja verrokkiryhmä) CMPF:n seerumtaso pieneni. CMPF-piikkien pinta-alat metabolomiikka-analyysissä (0 vko ja 12 vko) tutkimusryhmittäin on esitetty kuvassa 1. P-arvot ovat ryhmien sisäisestä vertailusta (Wilcoxonin testi, 0 vs. 12 vko).



**Kuvio 1.** CMPF-piikkien pinta-alat metabolomiikka-analyysissä (0 vko ja 12 vko) tutkimusryhmittäin. P-arvot ovat ryhmien sisäisestä vertailusta (Wilcoxonin testi, alku vs. loppu).

Tutkimuksessa nähtiin myös suora yhteys kalan omega-3-sarjan pitkäketjuisten rasvahappojen ja CMPF:n välillä. Tämä yhteys nähtiin mm. sekä fosfolipideistä että punasolujen kalvomembraaneista mitatuissa osuuksissa EPA:n ja DHA:n kohdalla. ALA:n kohdalla sen sijaan nähtiin negatiivinen korrelaatio CMPF:n kanssa esim. fosfolipideissä (fold change) ( $r = -0.268$ ,  $p = 0.023$ ,  $n = 72$ ). Korrelaatiot on esitetty taulukoissa 1 ja 2.

TAULUKKO 1. Fosfolipidien EPA:n, DHA:n ja ALA:n korrelaatiot CMPF-piikin pinta-alaan.

LC-PUFA (n-3)	Viikko	Korrelaatio (Spearman)	P-arvo	n
20:5 (EPA <sup>a</sup> )	0 (baseline)	0,597	< 0,001	76
22:6 (DHA <sup>b</sup> )	0 (baseline)	0,514	< 0,001	76
18:3 (ALA <sup>c</sup> )	0 (baseline)	-0,258	0,024	76
20:5 (EPA)	12	0,507	< 0,001	75
22:6 (DHA)	12	0,609	< 0,001	75
18:3 (ALA)	12	-0,199	0,087	75
20:5 (EPA)	FC <sup>d</sup>	0,457	< 0,001	72
22:6 (DHA)	FC	0,556	< 0,001	72
18:3 (ALA)	FC	-0,268	0,023	72

<sup>a</sup> EPA, eikosapentaenihappo; <sup>b</sup> DHA, dokosaheksaenihappo; <sup>c</sup> ALA = alfa-noleenihappo; <sup>d</sup> FC = fold change

TAULUKKO 2. Punasolujen solukalvojen EPA:n, DHA:n ja ALA:n korrelaatiot CMPF-piikin pinta-alaan.

LC-PUFA (n-3)	Viikko	Korrelaatio (Spearman)	P-arvo	n
20:5 (EPA <sup>a</sup> )	0 (baseline)	0,739	< 0,001	76
22:6 (DHA <sup>b</sup> )	0 (baseline)	0,600	< 0,001	76
18:3 (ALA <sup>c</sup> )	0 (baseline)	-0,139	0,232	76
20:5 (EPA)	12	0,546	< 0,001	75
22:6 (DHA)	12	0,626	< 0,001	75
18:3 (ALA)	12	-0,176	0,131	75
20:5 (EPA)	FC <sup>d</sup>	0,530	< 0,001	72
22:6 (DHA)	FC	0,605	< 0,001	72
18:3 (ALA)	FC	-0,197	0,097	72

<sup>a</sup> EPA, eikosapentaenihappo; <sup>b</sup> DHA, dokosaheksaenihappo; <sup>c</sup> ALA = alfa-noleenihappo; <sup>d</sup> FC = fold change

Ruokapäiväkirjoista lasketut ravinnosta saatujen EPA:n, DHA:n ja ALA:n sekä CMPF:n välillä nähtiin myös yhteys siten, että EPA:n ja DHA:n saanti korreloivat CMPF:n tason kanssa positiivisesti, kun taas ALA:n saannin ja CMPF:n välillä oli käänteinen korrelaatio (taulukko 3). Taulukossa 3 on esitetty CMPF:n korrelaatiot tutkimushenkilöiden rasvahappojen saantiin ravinnosta.

TAULUKKO 3. Ravinnon EPA:n, DHA:n ja ALA:n korrelaatiot CMPF-piikin pinta-alaan.

LC-PUFA (n-3)	Viikko	Korrelaatio (Spearman)	P-arvo	n
20:5 (EPA <sup>a</sup> )	0 (baseline)	0,364	0,001	76
22:6 (DHA <sup>b</sup> )	0 (baseline)	0,314	0,006	76
18:3 (ALA <sup>c</sup> )	0 (baseline)	0,161	0,164	76
20:5 (EPA)	11	0,540	< 0,001	75
22:6 (DHA)	11	0,4636	< 0,001	75
18:3 (ALA)	11	-0,114	0,328	75
20:5 (EPA)	FC <sup>d</sup>	0,670	< 0,001	72
22:6 (DHA)	FC	0,654	< 0,001	72
18:3 (ALA)	FC	-0,277	0,018	72

<sup>a</sup> EPA, eikosapentaenihappo; <sup>b</sup> DHA, dokosaheksaenihappo; <sup>c</sup> ALA = alfa-noleenihappo; <sup>d</sup> FC = fold change

Tulehduksiin liittyvistä tekijöistä todettiin CMPF:n tasojen ja omentiini-1:n välillä positiivinen tilastollisesti merkitsevä korrelaatio baseliinissa ( $r = 0.327$ ,  $p = 0.004$ ,  $n = 76$ ) ja negatiivinen korrelaatio FC:ssa ( $r = -0,221$ ,  $p = 0,062$ ,  $n = 72$ ). CMPF:n ja omentiinin väliset yhteydet ovat esitetty taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Omentiinin korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan.

Yhdiste	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
Omentiini-1	0 (baseline)	0,327	0,004	76
Omentiini-1	12	0,104	0,373	75
Omentiini-1	FC <sup>a</sup>	-0,221	0,062	72

<sup>a</sup> FC, fold change

Tulehdukseen omentiinin kautta löydetyistä yhteydestä huolimatta muiden mitattujen tulehdusmarkkerien IL-10, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) ja IL-18 kohdalla merkitseviä korrelaatioita tulehdusmerkkiaineiden ja CMPF:n välillä ei nähty. Esim. IL-18:n kohdalla havaittiin systemaattinen negatiivinen korrelaatio CMPF:n seerumpitoisuuden kanssa kaikissa aikapisteissä, mutta mikään näistä ei osoittautunut tilastollisesti merkitseväksi korrelaatioksi (viikon 12 korrelaation p-arvon 0.068 ollen kuitenkin lähellä tilastollista merkitsevyyttä) (taulukko 5).

TAULUKKO 5. IL-18:n seerumpitoisuuden korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan.

Yhdiste	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
IL-18 <sup>a</sup>	0 (baseline)	-0,142	0,220	76
IL-18	12	-0,212	0,068	75
IL-18	FC <sup>b</sup>	-0,198	0,096	72

<sup>a</sup> IL-18, interleukiini-18 (interleukin-18); <sup>b</sup> FC, fold change

Yhteyksiä glukoosiaineenvaihdunnan eri merkkiaineisiin nähtiin, mutta lähinnä satunnaisesti. Merkittävimminä korrelaatioina nähtiin plasman 2 tunnin glukoosipitoisuuden korrelaatio OGTT:ssa viikolla 0 ( $r = -0,270$ ,  $p = 0,019$ ,  $n = 76$ ) ja 30 min FC-arvossa ( $r = 0,285$ ,  $p = 0,015$ ,  $n = 72$ ). Nämä korrelaatiot ovat esitetty taulukoissa 6-8.

TAULUKKO 6. Plasman glukoosipitoisuuden korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan (viikko 0).

Parametri / koe	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
Paastoglukoosi (plasma) / OGTT <sup>a</sup> (0 min)	0	0,068	0,560	76
Glukoosi (plasma) / OGTT (30 min)	0	0,077	0,508	76
Glukoosi (plasma) / OGTT (60 min)	0	-0,124	0,288	75
Glukoosi (plasma) / OGTT (120 min)	0	-0,270	0,019	76

<sup>a</sup> OGTT, oraalinen glukoosirasituskoe

TAULUKKO 7. Plasman glukoosipitoisuuden korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan (viikko 12).

Parametri / koe	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
Paastoglukoosi (plasma) / OGTT <sup>a</sup> (0 min)	12	0,030	0,796	75
Glukoosi (plasma) / OGTT (30 min)	12	0,062	0,595	75
Glukoosi (plasma) / OGTT (60 min)	12	0,046	0,695	74
Glukoosi (plasma) / OGTT (120 min)	12	-0,059	0,614	75

<sup>a</sup> OGTT, oraalinen glukoosirasituskoe

TAULUKKO 8. Plasman glukoosipitoisuuden korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan (fold change).

Parametri / koe	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
Paastoglukoosi (plasma) / OGTT <sup>a</sup> (0 min)	FC <sup>b</sup>	0,070	0,559	72
Glukoosi (plasma) / OGTT (30 min)	FC	0,285	0,015	72
Glukoosi (plasma) / OGTT (60 min)	FC	0,164	0,173	71
Glukoosi (plasma) / OGTT (120 min)	FC	-0,006	0,957	72

<sup>a</sup> OGTT, oraalinen glukoosirasituskoe; <sup>b</sup> FC, fold change

Plasman paastoglukoosin tavoin myös plasman insuliinipitoisuudessa nähtiin merkitsevä korrelaatio 30 min FC-arvossa ( $r = 0.281$ ,  $p = 0.017$ ,  $n = 72$ ) CMPF:n vastaavaan plasmapitoisuuteen. Insuliinipitoisuuksissa tämä tilastollisesti merkitsevä korrelaatio oli kuitenkin yksittäinen löydös (muissa aikapisteissä ei nähty systemaattisesti tilastollisesti merkitseviä korrelaatioita). Plasman insuliinipitoisuuden korrelaatiot CMPF:ään eri aikapisteissä on esitetty taulukoissa 9-11.

TAULUKKO 9. Plasman insuliinipitoisuuden korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan (0 vk).

Parametri / koe	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
Insuliini / OGTT <sup>a</sup> (0 min)	0	0,001	0,991	76
Insuliini / OGTT (30 min)	0	-0,088	0,452	76
Insuliini / OGTT (60 min)	0	-0,087	0,459	75
Insuliini / OGTT (120 min)	0	-0,163	0,160	76

<sup>a</sup> OGTT, oraalinen glukoosirasituskoe



TAULUKKO 10. Plasman insuliinipitoisuuden korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan (12 vk).

Parametri / koe	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
Insuliini / OGTT <sup>a</sup> (0 min)	12	-0,110	0,346	75
Insuliini / OGTT (30 min)	12	-0,077	0,509	75
Insuliini / OGTT (60 min)	12	-0,017	0,884	74
Insuliini / OGTT (120 min)	12	-0,139	0,233	75

<sup>a</sup> OGTT, oraallinen glukoosirasituskoee

TAULUKKO 11. Plasman insuliinipitoisuuden korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan (fold change).

Parametri / koe	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
Insuliini / OGTT <sup>a</sup> (0 min)	FC <sup>b</sup>	0,192	0,105	72
Insuliini / OGTT (30 min)	FC	0,281	0,017	72
Insuliini / OGTT (60 min)	FC	0,223	0,061	71
Insuliini / OGTT (120 min)	FC	-0,022	0,852	72

<sup>a</sup> OGTT, oraallinen glukoosirasituskoee; <sup>b</sup> FC, fold change

Muiden glukoosiaineenvaihduntaa mittaavien indeksien kohdalla ei juuri tilastollisesti merkitseviä korrelaatioita ollut. Muutamien kohdalla nähtiin yksittäinen tilastollisesti merkitsevä korrelaatio, esimerkiksi Matsuda-indeksin muutos ( $r = -0,280$ ,  $p = 0,017$ ,  $n = 72$ ). Systemaattisesti kaikissa aikapisteissä ei kuitenkaan yhdenkään indeksin tai parametrin kohdalla nähty merkitseviä korrelaatioita. CMPF:n ja keskeisten glukoosiaineenvaihduntaa mittaavien indeksien väliset korrelaatiot on esitetty taulukoissa 12-15.

TAULUKKO 12. Matsuda-indeksin korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan eri aikapisteissä.

Parametri / koe	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
Matsuda-indeksi (MI <sup>a</sup> )	0	0,069	0,556	76
Matsuda-indeksi (MI)	12	0,074	0,531	75
Matsuda-indeksi (MI)	FC <sup>b</sup>	-0,280	0,017	72

<sup>a</sup> MI, Matsuda-indeksi; <sup>b</sup> FC, fold change

TAULUKKO 13. Insuliiniherkkyyden (Si) korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan.

Parametri / koe	Viikko	Korrelaatio (r)	P-arvo	n
Insuliiniherkkyys (Si <sup>a</sup> )	0	0,203	0,102	66
Insuliiniherkkyys (Si)	12	0,065	0,603	66
Insuliiniherkkyys (Si)	FC <sup>b</sup>	-0,215	0,099	60

<sup>a</sup> Si, insuliiniherkkyys; <sup>b</sup> FC, fold change

TAULUKKO 14. Akuutin insuliinivasteen (AIRg) korrelatio CMPF-piikin pinta-alaan.

<b>Parametri / koe</b>	<b>Viikko</b>	<b>Korrelaatio (r)</b>	<b>P-arvo</b>	<b>n</b>
AIRg <sup>a</sup>	0	-0,211	0,082	69
AIRg	12	-0,082	0,515	66
AIRg	FC <sup>b</sup>	0,142	0,266	63

<sup>a</sup> AIRg, akuutti insuliinivaste glukoosille; <sup>b</sup> FC, fold change

TAULUKKO 15. HOMA-IR:n korrelaatio CMPF-piikin pinta-alaan.

<b>Parametri / koe</b>	<b>Viikko</b>	<b>Korrelaatio (r)</b>	<b>P-arvo</b>	<b>n</b>
HOMA-IR <sup>a</sup>	0	-0,001	0,994	76
HOMA-IR	12	-0,101	0,387	75
HOMA-IR	FC <sup>b</sup>	0,184	0,122	72

<sup>a</sup> HOMA-IR, Homeostasis Model Reassessment Insulin Resistance -indeksi; <sup>b</sup> FC, fold change

## 5 Pohdinta

Tutkimuksessa hyödynnettiin laajaa aineistoa, jossa oli aluksi useita eri metaboliitteja ja dataa, joka oli kerätty useiden kuukausien ajalta (vuosilta 2013-2014) tutkimukseen osallistuneilta henkilöiltä. Metaboliiteista tähän työhön valikoitiin kuitenkin vain yksi (CMPF), koska CMPF:n tiedettiin jo aiempien tutkimusten perusteella olevan yhteydessä sekä glukoosiaineenvaihduntaan että tulehdusmerkkiaineisiin. Datan käsittelyyn osallistui useita ihmisiä tutkimuksen eri vaiheissa ja analyysejä tehtiin erilaisilla mm. Itä-Suomen Yliopiston laitteilla kuten massaspektrometrillä ja kromatografilla sekä lisäksi yhdisteiden tunnistamiseen käytettiin erilaisia tietokantoja.

### 5.1 Aineisto, tutkimusasetelma ja menetelmät

Tutkimuksessa oli hyvin toteutettu vertaisarvioidun, satunnaistetun tutkimuksen periaatteet. Verinäytteet oli kerätty viikolla 0 ja viikolla 12. Lisäksi oli kerätty kattavasti tietoa erilaisista muuttujista. Tutkimusasetelma oli selkeä ja mahdollisti hyvin vertailun rasvaisen kalan, vähärasvaisen kalan ja ALA:n välillä sekä vertailun verrokkiryhmään. Myös tutkimuksen alussa toteutettu run in -jakso, jonka aikana tehtiin ns. "wash-out", auttoi varmistamaan, että tutkimushenkilöiden ennen tutkimuksen alkua noudattamien ruokavalioiden vaikutus tutkimuksen aikaisiin mittaustuloksiin minimoitui. Myös tutkimuksen sisäänotto- ja poissulkukriteerit olivat tarkoin määritellyt ja esim. jo diabetekseen sairastuneet rajattiin tutkimuksen ulkopuolelle (kuten myös esim. hyvin ylipainoiset henkilöt). Lisäksi tutkimushenkilöt oli satunnaistettu tutkimusryhmiin, mikä tutkimuksen luotettavuuden kannalta on välttämätöntä.

Tutkimuksen luotettavuutta ja yleistettävyyttä heikentävinä seikkoina voidaan puolestaan nähdä, että tutkimushenkilöt olivat kaikki vähintään 40-vuotiaita (40-70-vuotiaita) eli tutkimuksen tuloksia ei voida siis suoraan esittää pätevän esim. lapsien ja nuorten kohdalla, vaikkakin on vaikea teorian valossa nähdä miksei rasvaisen kalan syönti pääsääntöisesti aikaan saisi vastaavanlaisia tuloksia myös nuoremmilla (tai vanhemmilla). Myös kaikissa ryhmissä koko intervention loppuunsaattaneiden määrä jäi keskeytysten vuoksi melko pieneksi – alun seulontavaiheen jälkeen tutkimukseen otettiin mukaan 153 tutkimushenkilöä, mutta lopulliseen aineistoon jäi keskeytysten takia kuitenkin vain 79 – esimerkiksi rasvaisen kalan ryhmässä oli lopulta vain 20

henkilöä, minkä vuoksi voidaan esittää kysymys, onko otos riittävän laaja ja olisiko tulokset voineet olleet erilaisia, jos otos olisi ollut suurempi.

Lisäksi tulosten luotettavuuden suhteen voisi miettiä onko tutkimushenkilöiden ruokavalion toteutumisen seurantaan käytetty itsenäinen ruokapäiväkirjan pito (neljänä päivänä ennen tutkimuksen alkua sekä kolme kertaa tutkimuksen aikana kaikesta syödyistä ravinnosta sekä lisäksi päivittäin kaikesta kalan ja kasviöljyjen käytöstä) riittävä tieteellinen tarkkuus – onko ollut esimerkiksi mahdollista, että tutkimushenkilöt ovat unohtaneet kirjata syömiään tai mahdollisesti erehtyessään syömään tutkimusasetelman kieltämiä ruoka-aineita eivät olisi näitä kirjanneet tai kirjanneet tietoa väärin. Toisaalta on kuitenkin huomattava, että tämänlaiseen pitkäkestoiseen ja tarkkaa seuranta vaativaan interventiotutkimukseen, ruokapäiväkirjan pito on tarkin mahdollinen käytettävissä ja toteutettavissa oleva menetelmä. Veren kuvan muutoksia tarkasteltaessa nähdäänkin, että tulokset korreloivat erittäin hyvin ravinnon mm. eri omega-rasvahappojen saantiin eli vaikuttaa siltä, että sekä ruokapäiväkirjamerkinnot että kirjanpito kalan ja camelinaöljyn käytöstä, oli tutkimuksessa toteutettu huolella.

Laitteisto mm. tutkimuksessa olennaisessa roolissa olleille metabolomiikka-analyysille oli Itä-Suomen yliopiston massapektrometri (LC-qTOF-MS). Käytettävä tekniikka on riittävän edistynyt tarkkan ja luotettavan metabolomiikka-analyysin tekoon. Tosin mahdollisena virhelähteenä on metaboliittien identifioinnin epäonnistuminen, koska identifiointia ei ole mahdollista tehdä automatisoidusti vaan identifikaatio perustuu isoista tietokannoista löytyvään tietoon ja siihen nojautuvaan päättelyyn, joka tapahtuu mm. tutkittavien yhdisteiden eri fragmenttikokojen yms. perusteella. Tällöin on mahdollista, että tutkittaessa täysin uusia metaboliitteja, yhdisteen tunnistaminen väärin voi aiheuttaa merkittävän virheen. Kuitenkin tässä tutkimuksessa keskeinen metaboliitti CMPF oli jo aiemmin löydetty eikä ollut enää ”tuntematon” metaboliitti eli tässä tapauksessa siltäkään, että kaikkia (uusia) metaboliitteja, joita datasta löytyi ei olisikaan kyetty tunnistamaan, ei juuri olisi ollut merkitystä, koska tutkimus keskittyi vain CMPF:n korrelaatioihin jo tunnettuihin plasman merkkiaineisiin.

## 5.2 Kirjallisuus ja tulokset

Sekä kirjallisuuden että tässäkin työssä saatujen tulosten perusteella näyttää siltä, että CMPF on metaboliitti, joka korreloi vahvasti muun muassa rasvaisen kalan syöntiin (Hanhineva ym., 2015). Rasvaisen kalan syönti on perinteisesti yhdistetty - lähinnä niiden pitkäketjuisten omega-3-rasvahappojen vuoksi - mm. sydänsairauksia ehkäisevään ruokavalioon, mutta kirjallisuuden valossa näyttää vahvasti siltä, että plasman korkeat CMPF-pitoisuudet kohoavat korkeiksi myös monissa glukoosiaineenvaihdunnan häiriöissä (Koppe et Poutout, 2016; Liu ym., 2016). CMPF:llä näyttääkin olevan siis ristiriitainen rooli - kohtuullisilla pitoisuuksilla se ei vaikuta haittaavan glukoosiaineenvaihduntaa, mutta korkeina pitoisuuksia se näyttää aikaan saavan jopa beetasolujen dysfunktiota (Prentice ym., 2014). Erityisesti ongelmia nähdään, jos potilaalla on munuaisten toiminnassa ongelmia (Koppe ym., 2016). Kirjallisuuden valossa vaikuttaa kuitenkin siltä, CMPF on luonnollinen ravinnon furaanirasvahapoista muodostuva metaboliitti, jonka pitoisuudet eivät normaalioloissa nouse glukoosiaineenvaihduntaa haittaavan korkeiksi (rasvaista) kalaa syömällä (Lankinen ym., 2015). Kohonneisiin CMPF-pitoisuuksiin liitetty haitallisuus johtuu ainakin osin siitä, että reagoidessaan vapaiden happiradikaalien kanssa CMPF muodostaa CMPF-radikaaliaddukteja, jotka kykenevät vaurioittamaan soluja (Miryamoto ym., 2012). Todennäköisesti näitä addukteja syntyy aina pieniä määriä - kun oletetaan, että CMPF:ää on aina jonkin verran veressä (Sassa ym., 2000). Kun CMPF:ää on veressä korkeita pitoisuuksia niin tällöin lienee perusteltua olettaa, että myös näiden CMPF:stä syntyvien adduktienkin pitoisuus on korkeampi, mikä voi selittää ainakin osin, miksi korkeilla pitoisuuksilla CMPF:llä on glukoosiaineenvaihdunnalle negatiivinen vaikutus. Tilannetta tarkasteltaessa lienee kuitenkin syytä huomioida mm. elimistön kokonaisantioksidanttistatus sekä oksidatiivisen stressin määrä sen sijaan, että tarkasteltaisiin vain CMPF:n nousua isoloidusti patologioiden taustamekanismina. Eli kyse voi olla siitä, että CMPF:n muuttuminen haitalliseksi (beetasolutoksiseksi) edellyttää esimerkiksi elimistössä jo olevaa tulehdustilaa ja siihen liittyvää oksidatiivista stressiä. Jos asia on näin, CMPF:n rooli perimmäisenä kausaalisenä agenttina ei liene niin merkittävä. Toisaalta on mielenkiintoista huomata, että CMPF:llä on korrelaatio adipokiineihin kuuluvan omentiinin (omentiini-1), jolla on anti-inflammatorinen vaikutus ja joka mm. korreloi negatiivisesti lihavuuden (Moreno-Navarrete ym., 2010; Catoi ym., 2014), ja tyyppin 2 diabeteksen kehittymisen kanssa (Pan

ym., 2010) eli teorian valossa kohonneiden CMPF-pitoisuuksien tulisi kuitenkin korreloida – ainakin fysiologisilla pitoisuuksilla - myös terveyttä edistäviin seikkoihin.

Aiemmin tehdyissä tutkimuksissa (esim. Prentice ym., 2014) on todettu eksogeenisen CMPF:nannon yhdistyvän heikentyneeseen glukoosimetaboliaan (esim. IGF, IGT ja heikentynyt OGTT) ja insuliinin eritykseen. Toisaalta kuten Lankinen ym. (2015) ovat aiemmin osoittaneet, fysiologisilla pitoisuusalueilla CMPF assosioituu jopa parantuneisiin OGTT-arvoihin ja insuliinin eritykseen (Lankinen ym., 2015). Tässä tutkimuksessa havaittiin CMPF:n suora korrelaatio rasvaisen kalan syöntiin, mutta ei havaittu yhteyttä, että lisääntynyt plasman CMPF olisi yhteydessä glukoosimetabolian tai insuliiniaineenvaihdunnan mittareihin tai merkkiarvoihin ainakaan negatiivisella tavalla - CMPF:n ja glukoosin sekä insuliinin plasma-arvojen välillä nähtiin muutamissa kohdin korrelaatioita, mutta pääsääntöisesti korrelaatiot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Näin ollen voisi ajatella, että CMPF:n beetasolutoksiset, muut mahdolliset glukoosi- tai insuliiniaineenvaihduntaan vaikuttavat sekä mahdolliset muut haitalliset vaikutukset, ovat vain erittäin korkeilla pitoisuuksilla nähtäviä vaikutuksia. Työn tulosten perusteella CMPF ei siis fysiologisilla pitoisuuksilla vaikuttaisi haittaavan glukoosiaineenvaihduntaa. Vaikuttaakin siltä, että CMPF on metaboliitti, joka fysiologisilla pitoisuuksilla on siis vaikutuksiltaan neutraali tai mahdollisesti jopa hyvään terveyteen korreloiva merkkiaine, mutta korkeilla (patologisilla) pitoisuuksilla insuliinieritystä heikentävä beetasolutoksinen metaboliitti, joka voi ennustaa patologioita, kuten tyypin 2 diabeteksen kehittymistä.

### 5.3 Johtopäätökset

Työssä nähtiin, että CMPF:n yhteydet glukoosiaineenvaihdunnan häiriöihin eivät ole kovin merkittävät, vaikka syödään runsaastikin rasvaista kalaa, jonka kulutus korreloi kohonneisiin CMPF-pitoisuuksiin. Kuitenkin tiedetään, että hyvin korkeina pitoisuuksina CMPF on beetasolutoksinen – näin ollen jatkotutkimuksia tarvitaan selvittämään tarkemmin näitä pitoisuuksia. Lisäksi tässä työssä tarkasteltiin pääosin vain CMPF:n yhteyksiä eri merkkiaineisiin – merkkiaineet ovat kuitenkin vain usein sijaismarkkereita erilaisille tautitapahtumille – joten tarvitaan vielä lisää tutkimuksia, jotta nähdään, mitkä ovat CMPF:n varsinaiset vaikutukset terveyteen. Monissa patologioissa, kuten diabeteksessä ja sydän- ja verisuonitaudeissa sairauden

taustalla ovat myös lipidiaineenvaihdunnan häiriöt, joten jatkotutkimusta tarvitaan myös CMPF:n korrelaatioista ja vaikutuksista lipidiaineenvaihduntaan ja mahdollisesti myös sitä kautta muun muassa T2D:n syntyyn.

## Lähteet

- Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care*. 2006;29:1130–1139.
- Abdul-Ghani MA, DeFronzo R. Pathophysiology of prediabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2009; 9: 193–199.
- Agarwal R, Campbell RC, Warnock DG. Oxidative stress in hypertension and chronic kidney disease: role of angiotensin II. *Semin Nephrol.* 2004;24:101–114.
- Alcázar, O. ym. Stimulation of islet protein kinase C translocation by palmitate requires metabolism of the fatty acid. *Diabetes*. 1997;46:1153–1158.
- Alissa E, Al-Salmi M, Alama N, Ferns G. Role of omentin-1 and C-reactive protein in obese subjects with subclinical inflammation. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*. 2016;3:7–11.
- Allegra V, Luisetto G, Mengozzi G, Martimbianco L, Vasile A. Glucose-induced insulin secretion in uremia: role of 1 alpha,25(HO)2-vitamin D3. *Nephron*. 1994;68:41–47.
- Bach T, Krüger L. The preparation of 2,3,5-tri- and 2,3-disubstituted furans by regioselective palladium(0)-catalyzed coupling reactions: application to the syntheses of rosefuran and the F5 furan fatty acid. *European Journal of Organic Chemistry*. 1999;9:2045–2057.
- Batna A, Scheinkönig J, Spiteller G. *Biochim. Biophys. Acta*. 1993;171:1166.
- Batna A, Spiteller G. *Lipids*. 1994;70:179.
- Belza A, Toubro S, Stender S, Astrup A. Effect of diet-induced energy deficit and body fat reduction on high-sensitive CRP and other inflammatory markers in obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33:456–464.
- Bergman R. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes*. 1989;38:1512–1527.
- Berndt J, Kloting N, Kralisch S, ym. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*. 2005;54:2911–2916.
- Björntorp P, Bergman H, Varnauskas E. Plasma free fatty acid turnover rate in obesity. *Acta Med. Scand*. 1969;185:351–356.



- Blemur D, Mir F, Sadiq S. Elevated levels of the furan fatty acid metabolite, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) in the serum of multiple sclerosis patients. *Neurology*. 2016; 86.
- Boden G. Obesity and diabetes mellitus—how are they linked? *West Indian Med. J.* 2002;51:51–54.
- Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 2003;111:121–124.
- Bomba-Opon D, Wielgos M, Szymanska M, Bablok L. Effects of free fatty acids on the course of gestational diabetes mellitus. *Neuroendocrinol.* 2006;27:277–280.
- Borai A, Livingstone C, Kaddam I, Ferns G. Selection of the appropriate method for the assessment of insulin resistance. *BMC Med Res Methodol.* 2011;23:158.
- Boselli E, Grob K, Lercker G. Determination of Furan Fatty Acids in Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:2868–2873.
- Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481:463–468.
- Bremer A, Jialal I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *Journal of obesity*. 2013;2013:393192.
- Brun J, Ghanassia E, Fédou C, Bordenave S, Raynaud de Mauverger E, Mercier J. Assessment of insulin sensitivity (SI) and glucose effectiveness (SG) from a standardized hyperglucidic breakfast test in type 2 diabetics exhibiting various levels of insulin resistance. *Acta Diabetol.* 2013;50:143–53.
- Buchanan T, Xiang A. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 2005;115:485–491.
- Butler A, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza R, Butler P.  $\beta$ -Cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52:102–110.
- Carballeira N, Guzmán A, Nechev J, Lahtchev K, Ivanova A, Stefanov K. *Lipids*. 2000;35:1371.
- Carpentier A, Mittelman SD, Lamarche B, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am. J. Physiol.* 1999;276:E1055–E1066.
- Catoi A, Suciú S, Parvu A, et al. Increased Chemerin and Decreased Omentin-1 Levels in Morbidly Obese Patients Are Correlated With Insulin Resistance, Oxidative Stress and Chronic Inflammation. *Clujul Medical.* 2014;87.

- Chong Z, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*. 2005;75:207–246.
- Chong Z, Maiese K. Mammalian target of rapamycin signaling in diabetic cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*. 2012;11.
- Chong Z, Shang Y, Wang S, Maiese K. Shedding new light on neurodegenerative diseases through the mammalian target of rapamycin. *Progress in Neurobiology*. 2012;99:128–148.
- Ciminiello P, Fattorusso E, Magno S, Mangoni A, Ialenti A, Di Rosa M. *Experientia*. 1991;47:739.
- Coughlan M ym. Advanced glycation end products are direct modulators of b-cell function. *Diabetes*. 2011;60:2523–2532.
- Cnop M, Gruppig A, Hoorens A, Bouwens L, Pipeleers-Marichal M, Pipeleers D. Endocytosis of low-density lipoprotein by human pancreatic  $\beta$ -cells and uptake in lipid-storing vesicles, which increase with age. *Am. J. Pathol.* 2000;156:237–244.
- Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes*. 2001;50:1771–1777.
- Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of islet  $\beta$ -cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology*. 2002;143:3449–3453.
- Cnop M, Landchild M, Vidal J, ym. The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations: distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes*. 2002;51:1005–1015.
- Cnop M, Havel P, Utzschneider K, ym. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*. 2003;46:459–469.
- Cnop M, Vidal J, Hull RL, ym. Progressive loss of  $\beta$ -cell function leads to worsening glucose tolerance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:677–682.
- Cnop M. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochemical Society Transactions*. 2008;36.
- Costigan MG, Callaghan CA, Lindup WE. Hypothesis: is accumulation of a furan dicarboxylic acid (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid) related to the neurological abnormalities in patients with renal failure. *Nephron*. 1996;73:169–73.

- Das A, Durrant D, Koka S, Salloum F, Xi L, Kukreja R. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition with rapamycin improves cardiac function in type 2 diabetic mice: potential role of attenuated oxidative stress and altered contractile protein expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014;289:4145–4160.
- de Fronzo R. Pathogenesis of glucose intolerance in uremia. *Metabolism*. 1978; 27: 1866–1880.
- Deguchi T, Kouno Y, Terasaki T, Takadate A, Otagiri M. Differential contributions of rOat1 (Slc22a6) and rOat3 (Slc22a8) to the in vivo renal uptake of uremic toxins in rats. *Pharm. Res*. 2005;22:619–627.
- De Marchi S, Cecchin E, Villalta D, Tesio F. Serum reverse T3 assay for predicting glucose intolerance in uremic patients on dialysis therapy. *Clin. Nephrol*. 1987;27:189–198.
- De Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, ym. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes*. 2007;56:1655–61.
- Donath M, Shoelson S. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:98–107.
- Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. 1997;18:774–800.
- El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, ym. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic  $\beta$ -cell death. *Endocrinology*. 2013;144:4154–4163.
- Elks M. Chronic perfusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release. *Endocrinology*. 1993;133:208–214.
- El-Mesallamy HO, El-Derany MO, Hamdy NM. Serum omentin-1 and chemerin levels are interrelated in patients with Type 2 diabetes mellitus with or without ischaemic heart disease. *Diabet Med*. 2011;28:1194–1200.
- Enomoto A, Niwa T. Roles of organic anion transporters in the progression of chronic renal failure. *Ther Apher Dial*. 2007;11:S27–31.
- Fantuzzi G, Mazzone T: Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:996–1003.
- Ferrannini E, Gastaldelli A, Iozzo P. Pathophysiology of prediabetes. *Med Clin North Am*. 2011;95:327–339.

- Finkelstein J, Pressman E, Cooper E, Kent T, Bar H, O'Brien K. Vitamin D Status Affects Serum Metabolomic Profiles in Pregnant Adolescents. *Reproductive Sciences*. 2015; 22:685–695.
- Floegel A, Stefan N, Yu Z, ym. Identification of Serum Metabolites Associated With Risk of Type 2 Diabetes Using a Targeted Metabolomic Approach. *Diabetes*. 2013;62:639–648.
- Frayling TM. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat. Rev. Genet*. 2007;8:657–662.
- Frei B. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. Academic Press 1994.
- Fu D, Wu M, Zhang J ym. Mechanisms of modified LDL induced pericyte loss and retinal injury in diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2012;55:3128–3140.
- Glass R, Krick T, Sand D, Rahn C, Schlenk H. Furanoid fatty acids from fish lipids. *Lipids*. 1975;10:695–702.
- Goehring I, Sauter NS, Catchpole G, ym. Identification of an intracellular metabolic signature impairing beta cell function in the rat beta cell line INS-1E and human islets. *Diabetologia*. 2001;54:2584–2594.
- Groweiss A, Kashman Y. A new furanoid fatty acid from the soft corals *Sarcophyton glaucum* and *gemmatum*. *Experientia*. 1978;34:299.
- Gruppig A, Cnop M, Van Schravendijk C, Hannaert J, Van Berkel T, Pipeleers D. Low density lipoprotein binding and uptake by human and rat islet  $\beta$ -cells. *Endocrinology*. 1997;138:4064–4068.
- Guertin K, Moore S, Sampson J, Huang W ym. Metabolomics in nutritional epidemiology: identifying metabolites associated with diet and quantifying their potential to uncover diet-disease relations in populations. *Am J Clin Nutr*. 2014;100:208–217.
- Gunstone FD, Wijesundera RC, Scrimgeour CM. The components of lipids from marine and freshwater species with special reference to furan-containing fatty acids. *J. Sci. Food Agric*. 1978;29:539–550.
- Guth H, Grosch W. Furan fatty acids in butter and butter oil, *Z. Lebensm. Unters. Forsch*. 1992;194:360–362.
- Handschin C, Choi CS, Chin S, ym. Abnormal glucose homeostasis in skeletal muscle-specific PGC-1 $\alpha$  knockout mice reveals skeletal muscle-pancreatic  $\beta$ -cell crosstalk. *J. Clin. Invest*. 2007;117:3463–3474.

- Hanhineva K, Lankinen M, Pedret A, ym. Nontargeted Metabolite Profiling Discriminates Diet-Specific Biomarkers for Consumption of Whole Grains, Fatty Fish, and Bilberries in a Randomized Controlled Trial. *The Journal of Nutrition*. 2015;145:7–17.
- Hannemann K, Puchta V, Simon E, Ziegler H, Ziegler G, Spiteller G. The common occurrence of furan fatty acids in plants. *Lipids* 1989;24:296–298.
- Hartman MG, Lu D, Kim ML, ym. Role for activating transcription factor 3 in stress-induced  $\beta$ -cell apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24:5721–5732.
- Hellemans K, Kerckhofs K, Hannaert JC, Martens G, Van Veldhoven P, Pipeleers D. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -retinoid X receptor agonists induce  $\beta$ -cell protection against palmitate toxicity. *FEBS J.* 2007;274:6094–6105.
- Himmetoglu S, Teksoz S, Zengin K, Yesim T, Taskn M, Dincer Y. Serum levels of fetuin a and 8-hydroxydeoxyguanosine in morbidly obese subjects. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 2013;121:505–508.
- Hou J, Chong, Z, Shang Y, Maiese K. FOXO3a governs early and late apoptotic endothelial programs during elevated glucose through mitochondrial and caspase signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010;321:194–206.
- Hu P, Lai D, Lu P, Gao J, He H. ERK and Akt signaling pathways are involved in advanced glycation end product-induced autophagy in rat vascular smooth muscle cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2012;29:613–618.
- Huang CJ, Lin CY, Haataja L, ym. High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated  $\beta$ -cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007;56:2016–2027.
- Hull RL, Andrikopoulos S, Verchere C, ym. Increased dietary fat promotes islet amyloid formation and  $\beta$ -cell secretory dysfunction in a transgenic mouse model of islet amyloid. *Diabetes*. 2003;52:372–379.
- Huppertz C, Fischer B, Kim Y ym. Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:12520–12529.
- Ishii K, Okajima H, Okada Y, Watanabe H. Studies on Furan Fatty Acids of Salmon Roe Phospholipids. *J. Biochem.* 1988;103:836–839.

- Jialal I, Devaraj S, Kaur H, Adams-Huet B, Bremer A. Increased chemerin and decreased omentin-1 in both adipose tissue and plasma in nascent metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98:E514–517.
- Johnson C, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016.
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283:65–87.
- Jonas JC, Bensellam M, Duprez J, Elouil H, Guiot Y, Pascal SM. Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2009;4:65–81.
- Kahn S. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003;46:3–19.
- Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Port D, Schwartz MW. Reduced  $\beta$ -cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *Am. J. Physiol*. 1999;277:E659–E667.
- Kamoda T, Saitoh H, Inudoh M, Miyazaki K, Matsui A. The serum levels of proinsulin and their relationship with IGFBP-1 in obese children. *Diabetes Obes. Metab*. 2006;8:192–196.
- Kanauchi M, Tsujimoto N, Hashimoto T. Validation of simple indices to assess insulin sensitivity based on the oral glucose tolerance test in the Japanese population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002;55:229–235.
- Kaneto H, Xu G, Song KH, ym. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J. Biol. Chem*. 2001;276:31099–31104.
- Kashemsant N, Chan C. Impact of uncoupling protein-2 overexpression on proinsulin processing. *J. Mol. Endocrinol*. 2006;37:517–526.
- Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, ym. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52:2461–2474.
- Kaushik M, Mozaffarian D, Spiegelman D, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Long-chain omega-3 fatty acids, fish intake, and the risk of type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:613–620.

- Kawamori D, Kajimoto Y, Kaneto H, ym. Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Diabetes*. 2003;52:2896–2904.
- Kawamori D, Kaneto H, Nakatani Y, ym. The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. *J. Biol. Chem*. 2006;281:1091–1098.
- Kazama K, Usui T, Okada M, Hara Y, Yamawaki H. Omentin plays an anti-inflammatory role through inhibition of TNF-alpha-induced superoxide production in vascular smooth muscle cells. *European journal of pharmacology*. 2012;686:116–123.
- Kelley D, He J, Menshikova E, Ritov V. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:2944–2950.
- Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2003;312:1118–1122.
- Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor- $\kappa$ B and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology*. 2004;145:5087–5096.
- Kim H, Toyofuku Y, Lynn F, ym. Serotonin regulates pancreatic b cell mass during pregnancy. *Nat. Med*. 2010;16:804–808.
- Kim J, Jung Y, Sun H ym. Erythropoietin mediated bone formation is regulated by mTOR signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012;113:220–228.
- Kim K, Shin Y, Akram M ym. High glucose condition induces autophagy in endothelial progenitor cells contributing to angiogenic impairment. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2014;37:1248–1252.
- Kitamura Y, Kitamura T, Kruse J, ym. FoxO1 protects against pancreatic b cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab*. 2005;2:153–163.
- Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S. Cloning of the novel gene intelectin, which is expressed in intestinal paneth cells in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251:759–762.
- Kopelman PG. Hormones and obesity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1994;8:549–575.
- Koppe L, Poitout V. CMPF: A biomarker for Type 2 Diabetes Mellitus Progression? *Trends in Endocrinology and Metabolism*. CellPress. 2016.

- Koppe L, Nyam E, Vivot K, ym. Urea impair beta cell glycolysis and insulin secretion in chronic kidney disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126.
- Kwon S, Hong S, Ma S, Lee S, Jang C. 3',4',7-trihydroxyflavone prevents apoptotic cell death in neuronal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;80:41–51.
- Lankinen M, Hanhineva K, Kolehmainen M, ym. CMPF Does Not Associate with Impaired Glucose Metabolism in Individuals with Features of Metabolic Syndrome. *PLOS ONE*. 2015.
- Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, ym. Endoplasmic reticulum stress contributes to  $\beta$ -cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50:752–763.
- Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson J, McGarry J, Unger R.  $\beta$ -Cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulindependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte– $\beta$ -cell relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:10878–10882.
- Lee Y, Hirose H, Zhou Y, Esser V, McGarry J, Unger R. Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats: a role in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes*. 1997;46:408–413.
- Lee Y, Hong Y, Lee S, Chang K. Autophagy contributes to retardation of cardiac growth in diabetic rats. *Laboratory Animal Research*. 2012;28:99–107.
- Li B, Nolte L, Ju J ym. Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Nature Medicine*. 2000;6:1115–1120.
- Lim CF, Bernard BF, de Jong M, Docter R, Krenning EP, Hennemann G. A furan fatty acid and indoxyl sulfate are the putative inhibitors of thyroxine hepatocyte transport in uremia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76:318–324.
- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, ym. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*. 2002;360:57–58.
- Lindström, P. Beta-cell function in obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2010;654:463–477.
- Ling S, Birnbaum Y, Nanhwan M, ym. Dickkopf-1 (DKK1) phosphatase and tensin homolog on chromosome 10 (PTEN) crosstalk via microRNA interference in the diabetic heart. *Basic Research in Cardiology*. 2013;108.
- Liu J, Li J, Li W, Wang C. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Research*. 2013;2013.



- Liu Y, Palanivel R, Rai E, ym. Adiponectin stimulates autophagy and reduces oxidative stress to enhance insulin sensitivity during high fat diet feeding in mice. *Diabetes*. 2014; 64:36–48.
- Liu Y, Prentice K, Eversley J, ym. Rapid Elevation in CMPF May Act As a Tipping Point in Diabetes Development. *Cell Reports*. 2016;14:2889–2900.
- Liu Z, Stanojevic V, Brindamour L, Habener J. GLP1-derived nonapeptide GLP1(28-36)amide protects pancreatic beta-cells from glucolipotoxicity. *Journal of Endocrinology*. 2012;213:143–154.
- Lorenzo C, ym. Risk of type 2 diabetes among individuals with high and low glomerular filtration rates. *Diabetologia*. 2009;52:1290–1297.
- Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinass G, Donath M. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic  $\beta$ -cell turnover and function. *Diabetes*. 2003;52:726–733.
- Maiese K, Morhan S, Zhao Z. Oxidative stress biology and cell injury during Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Current Neurovascular Research*. 2007;4:63–71.
- Maiese K, Chong Z, Wang S, Shang Y. Oxidant stress and signal transduction in the nervous system with the PI 3-K, Akt, and mTOR cascade. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13:13830–13866.
- Maiese K, Chong Z, Shang Y, Wang S. mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. *Trends in Molecular Medicine*. 2013;19:51–60.
- Maiese K. mTOR: driving apoptosis and autophagy for neurocardiac complications of diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 2015;6:217–224.
- Maise K. *New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus*. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015.
- Malaisse WJ, Maggetto C, Leclercq-Meyer V, Sener A. Interference of glycogenolysis with glycolysis in pancreatic islets from glucose-infused rats. *J. Clin. Invest.* 1993;91:432–436.
- Martino L, Masini M, Novelli M ym. Palmitate activates autophagy in INS-1E  $\beta$ -cells and in isolated rat and human pancreatic islets. *PLoS ONE*. 2012;7.
- Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, ym. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate. *Biochemical Pharmacology*. 2012;84:1207–1214.

- Monnier L, Mas E, Ginet C *ym*. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *Journal of the American Medical Association*. 2006;295:1681–1687.
- Monteiro M, Carvalho M, Bastos M, Guedes de Pinho P. Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery: Advances and Challenges. *Current Medicinal Chemistry*. 2013;20:257-271.
- Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Ortega F, Gómez-Ambrosi J, Ricart W, Frühbeck G, Fernández-Real J. Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutrition & Metabolism*. 2010;7:27.
- Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Castro A, Sabater M, Ricart W, Fernandez-Real J. Circulating omentin as a novel biomarker of endothelial dysfunction. *Obesity*. 2011;19:1552–1559.
- Motojima M, Hosokawa A, Yamato H, Muraki T, Yoshioka T. Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF-kappaB and free radical in proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2003;63:1671–1680.
- Meert N, Schepers E, De Smet R, Argiles A, Cohen G, Deppisch R, *ym*. Inconsistency of reported uremic toxin concentrations. *Artif Organs*. 2007;31:600–611.
- Morris L, Marshall M, Kelly W. *Tetrahedron Letters*. 1966;36:4249–4253.
- Nakamura Y, Yoshida T, Kajiyama S, Kitagawa Y, Kanatsuna T, Kondo M. Insulin release from column-perifused isolated islets of uremic rats. *Nephron*. 1985;40:467–469.
- Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, *ym*. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J. Biol. Chem*. 2005;280:847–851.
- Nakka V, Prakash-babu P, Vemuganti R. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and autophagy: potential therapeutic targets for acute CNS injuries. *Molecular Neurobiology*. 2014.
- Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3:431-438.
- Nieves D, Cnop M, Retzlaff B, *ym*. The atherogenic lipoprotein profile associated with obesity and insulin resistance is largely attributable to intra-abdominal fat. *Diabetes*. 2003; 52: 172–179.
- Niwa T, Takeda N, Maeda K, Shibata M, Tatematsu A. Accumulation of furancarboxylic acids in uremic serum as inhibitors of drug binding. *Clin Chim Acta*. 1988;173:127–138.

- Niwa T, Yazawa T, Kodama T, Uehara Y, Maeda K, Yamada K. Efficient removal of albumin-bound furancarboxylic acid, an inhibitor of erythropoiesis, by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron*. 1990;56:241–245.
- Niwa T, Aiuchi T, Nakaya K, Emoto Y, Miyazaki T, Maeda K. Inhibition of mitochondrial respiration by furancarboxylic acid accumulated in uremic serum in its albumin-bound and non-dialyzable form. *Clin Nephrol*. 1993;39:92–96.
- Nkondjock A, Receveur O. Fish-seafood consumption, obesity, and risk of type 2 diabetes: an ecological study. *Diabetes Metab*. 2003;29:635–642.
- Okada Y, Okajima H, Konishi H. Antioxidant effect of naturally occurring furan fatty acids on oxidation of linoleic acid in aqueous dispersion. *J Am Oil Chem Soc*. 1990;67:858–862.
- Okada Y, Kaneko M, Okajima H. Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furan fatty acids. *Biol Pharm Bull*. 1996;19:1607–1610.
- Okajima H, Ishii K, Watanabe H. *Chem. Pharm. Bull*. 1984;32:3281–3286.
- O’Sullivan A, Gibney MJ, Brennan L. Dietary intake patterns are reflected in metabolomic profiles: potential role in dietary assessment studies. *Am J Clin Nutr*. 2011;93:314–321.
- Ouchi N, Parker J, Lugus J, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:85–97.
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306:457–461.
- Pacetti D, Alberti F, Boselli E, Frega NG. Characterisation of furan fatty acids in Adriatic fish. *Food Chem*. 2004;122:209–215.
- Palma H, Wolkmer P, Gallio M, et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014;386:199–210.
- Pan H, Guo L, Li Q. Changes of serum omentin-1 levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010;88:29–33.
- Panagiotou G, Mu L, Na B, Mukamal K, Mantzoros C. Circulating Irisin, Omentin-1, and Lipoprotein Subparticles in Adults at Higher Cardiovascular Risk. *Metabolism*. 2014;63:1265–1271.

- Pankow JS, Duncan BB, Schmidt MI, ym. Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care*. 2004;27:77–82.
- Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia*. 1995;38:1213–1217.
- Paolisso G, Gambardella A, Amato L, ym. Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia*. 1995;38:1295–1299.
- Patel P, Sharp S, Luben R, ym. Association between type of dietary fish and seafood intake and the risk of incident type 2 diabetes: the European prospective investigation of cancer (EPIC)-Norfolk cohort study. *Diabetes Care*. 2009;32:1857–1863.
- Peng S, Zhao S, Yan F ym. HDAC2 selectively regulates FOXO3a-mediated gene transcription during oxidative stress-induced neuronal cell death. *Journal of Neuroscience*. 2015;35:1250–1259.
- Pérez-Gallardo R, Noriega-Cisneros R, Esquivel-Gutiérrez E ym. Effects of diabetes on oxidative and nitrosative stress in kidney mitochondria from aged rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2014;46:511–518.
- Pinnick KE, Collins SC, Londos C, Gauguier D, Clark A, Fielding BA. Pancreatic ectopic fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition. *Obesity*. 2008;16:522–530.
- Poitout V, Robertson, RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr. Rev.* 2008;29:351–366.
- Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fonte´s G. Glucolipotoxicity of the pancreatic b cell. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010;1801:289–298.
- Prentice K, Luu L, Allister E, ym. The furan fatty acid metabolite CMPF is elevated in diabetes and induces  $\beta$  cell dysfunction. *Cell Metabolism*. 2014;19:653–666.
- Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1802–1812.
- Puglisi MJ, Fernandez ML. Modulation of C-Reactive Protein, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and Adiponectin by diet, exercise, and weight loss. *J Nutr*. 2008;138:2293–2296.
- Raper NR, Cronin FJ, Exler J. Omega-3 fatty acid content of the US food supply. *J. Am. College Nutr.* 1992;11:304.
- Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:64–73.

- Retnakaran R, Qi Y, Sermer M, Connelly P, Hanley A, Zinman B. b-cell function declines within the first year postpartum in women with recent glucose intolerance in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010; 33:1798–1804.
- Rhee E, Gerszten R. Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. *Clin Chem*. 2012;58:139–147.
- Robson-Doucette C, Sultan S, Allister E, ym. b-cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion. *Diabetes*. 2011;60:2710–2719.
- Rutter M, O'Donnell C, Massaro J, Fox C, Hoffmann U. Fasting glucose, obesity, and coronary artery calcification in community-based people without diabetes. *Diabetes Care*. 2012; 35: 1944–1950.
- Rylander C, Sandanger T, Engeset D, Lund E. Consumption of lean fish reduces the risk of type 2 diabetes mellitus: a prospective population based cohort study of norwegian women. *PLoS One*. 2014;9.
- Saely C, Leiharer A, Muendlein A, ym. Coronary patients with high plasma omentin are at a higher cardiovascular risk. *Data in Brief*. 2016;6:158–161.
- Sassa T, Matsuno H, Niwa M, ym. Measurement of furancarboxylic acid, a candidate for uremic toxin, in human serum, hair, and sweat, and analysis of pharmacological actions in vitro. *Arch. Toxicol*. 2000;73:649–654.
- Schaffler A, Neumeier M, Herfarth H, Furst A, Scholmerich J, Buchler C. Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1732:96–102.
- Schödel R, Spitteller G. *Liebigs Annalen der Chemie*. 1987;459.
- Selimoglu H, Duran C, Kiyici S, ym. Comparison of composite whole body insulin sensitivity index derived from mixed meal test and oral glucose tolerance test in insulin resistant obese subjects. *Endocrine*. 2009;36:299–304.
- Shao S, Yang Y, Yuan G, Zhang M, Yu X. Signaling molecules involved in lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *DNA and Cell Biology*. 2013;32:41–49.
- Shang Y, Chong Z, Wang S, Maiese K. Prevention of  $\beta$ -amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL. *Aging*. 2012;4:187–201.

- Shankar RR, Zhu JS, Baron AD. Glucosamine infusion in rats mimics the beta-cell dysfunction of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1998;47:573–577.
- Shibata R, Takahashi R, Kataoka Y, ym. Association of a fat-derived plasma protein omentin with carotid artery intima-media thickness in apparently healthy men. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2011;34:1309–1312.
- Shibata R, Ouchi N, Kikuchi R, ym. Circulating omentin is associated with coronary artery disease in men. *Atherosclerosis*. 2011;219:811–814.
- Shibata R, Takahashi R, Kataoka Y, ym. Association of a fat-derived plasma protein omentin with carotid artery intima-media thickness in apparently healthy men. *Hypertens Res*. 2011.
- Shimabukuro M, Ohneda M, Lee Y, Unger R. Role of nitric oxide in obesity-induced  $\beta$ -cell disease. *J. Clin. Invest*. 1997;100:290–295.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest*. 2006;116:1793–1801.
- Singh B, Arora S, B. Goswami B, Mallika V. Metabolic syndrome: A review of emerging markers and management. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2009;3:240–254.
- Smith A. On the Synthesis of Furans and Furan Fatty Acids. A Thesis Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy At Cardiff University. 2012.
- Spégel P, Sharoyko VV, Goehring I, ym. Time-resolved metabolomics analysis of b-cells implicates the pentose phosphate pathway in the control of insulin release. *Biochem. J*. 2013;450:595–605.
- Spiteller G. Furan fatty acids: occurrence, synthesis, and reactions. Are furan fatty acids responsible for the cardioprotective effects of a fish diet? *Lipids*. 2005;40:755–771.
- Suhre K. ym. Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS One*. 2010;5:E13953.
- Tan BK, Adya R, Farhatullah S, ym. Omentin-1, a novel adipokine, is decreased in overweight insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome: ex vivo and in vivo regulation of omentin-1 by insulin and glucose. *Diabetes*. 2008;57:801–808.
- Tang J, Neidigh JL, Cooksey RC, McClain DA. Transgenic mice with increased hexosamine flux specifically targeted to beta-cells exhibit hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance. *Diabetes*. 2000;49:1492–1499.

- Teixeira A, Cox R, Egmond M. Furan fatty acids efficiently rescue brain cells from cell death induced by oxidative stress. *Food & function*. 2013;4:1209–1215.
- Tsutsumi Y, Deguchi T, Takano M, Takadate A, Lindup W, Otagiri M. Renal disposition of a furan dicarboxylic acid and other uremic toxins in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303:880–887.
- Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, ym. Pancreatic fat content and  $\beta$ -cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:2916–2921.
- Vanholder R., van Laecke S, Glorieux Griet. What is new in uremic toxicity? *Pediatric Nephrology*. 2008;23:1211–1221.
- Vetter W, Laure S, Wendlinger C, Mattes A, Smith A, Knight D. Determination of Furan Fatty Acids in Food Samples. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2012;89:1501–1508.
- Vetter W, Wendlinger C. Furan fatty acids—valuable minor fatty acids in food. *Lipid Technology*. 2013;25:7–10.
- Vetter W, Ulms K, Wendlinger C, van Rijn J. Novel non-methylated furan fatty acids in fish from a zero discharge aquaculture system. *NFS Journal*. 2016;2:8–14.
- Vogt S, Wahl S, Kettunen J, ym. Characterization of the metabolic profile associated with serum 25-hydroxyvitamin D: a cross-sectional analysis in population-based data. *International Journal of Epidemiology*. 2016;1469–1481.
- Wahl H, Tetschner B, Liebich H. The effect of dietary fish oil supplementation on the concentration of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid in human blood and urine. *J. High Resolut. Chromatogr*. 1992;15:815–818.
- Wahl H, Chrzanowski A, Liebich H, Hoffmann A. Identification of Furan Fatty Acids as Minor Components of Human Lipids by Multidimensional GC-MSD. *Gerstel Global Analytical Solutions Ap-pNote 4*. 1994.
- Wakimoto T, Kondo H, Nii H, ym. Furan fatty acid as an anti-inflammatory component from the green-lipped mussel *Perna canaliculus*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2011;108:17533–17537.
- Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol. Biol*. 2012;821:421–433.
- Wang G, Ni Y, Zhou X, Zhang W. The AKT/mTOR pathway mediates neuronal protective effects of erythropoietin in sepsis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2014;385:125–132.

- Wang L, Folsom AR., Zheng ZJ, Pankow JS, Eckfeldt JH. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003;78:91–98.
- Wang R, Kim H, Xiao C, Xu X, Gavrilova O, Deng C. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation.* 2011;121:4477–4490.
- Wang T, Larson MG, Vasan RS, ym. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med.* 2011;17:448–453.
- Weinberg E, Maymon T, Weinreb M. AGEs induce caspase-mediated apoptosis of rat BMSCs via TNF $\alpha$  production and oxidative stress. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2014;52:67–76.
- Weyer C, Bogardus C, Mott D, Pratley R. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1999;104:787–794.
- White MF. IRS2 integrates insulin/IGF1 signalling with metabolism, neurodegeneration and longevity. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2014;16:4–15.
- Wijendran V, Bendel R, Couch S, ym. Maternal plasma phospholipid polyunsaturated fatty acids in pregnancy with and without gestational diabetes mellitus: relations with maternal factors. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999;70:53-61.
- Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, ym. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:3698–3703.
- Wild RA, Painter RD, Coulson PB, Carruth KB, Ranney RB: Lipoprotein lipid concentrations and cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;61:946–951.
- Winzell MS, Magnusson C, Ahren B. Temporal and dietary fat content-dependent islet adaptation to high-fat feeding-induced glucose intolerance in mice. *Metabolism.* 2007;56:122–128.
- Wu J, Kaufman R. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ.* 2006;13:374–384.
- Würtz P, Mäkinen VP, Soininen P, ym. Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults. *Diabetes.* 2012;61:1372–1380.



- Xiang K, Wang Y, Zheng T, et al. Genome-wide search for type 2 diabetes/impaired glucose homeostasis susceptibility genes in the Chinese: significant linkage to chromosome 6q21-q23 and chromosome 1q21-q24. *Diabetes*. 2004;53:228-234.
- Xin Y, Yuan B, Yu B, et al. Tet1-mediated DNA demethylation regulates neuronal cell death induced by oxidative stress. *Scientific Reports*. 2015;5:7645.
- Xu E, Schwab M, Marette A. Role of protein tyrosine phosphatases in the modulation of insulin signaling and their implication in the pathogenesis of obesity-linked insulin resistance. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2014;15:79-97.
- Yamawaki H, Tsubaki N, Mukohda M, Okada M, Hara Y. Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;393:668-672.
- Yan P, Liu D, Long M, Ren Y, Pang J, Li R. Changes of serum omentin levels and relationship between omentin and adiponectin concentrations in type 2 diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2011;119:257-263.
- Yang R, Xu A, Pray J, Hu H, et al. Cloning of omentin, a new adipocytokine from omental fat tissue in humans. *Diabetes*. 2003.
- Yang R, Lee M, Hu H, et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 2006;290:E1253-1261.
- Yeung C, Shen D, Thummel K, Himmelfarb J. Effects of chronic kidney disease and uremia on hepatic drug metabolism and transport. *Kidney Int*. 2014;85:522-528.
- Yoo H, Hwang S, Hong H, et al. Association of circulating omentin-1 level with arterial stiffness and carotid plaque in type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology*. 2011;10:103.
- Zhang C, Baffy G, Perret P, et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity,  $\beta$  cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*. 2001;105:745-755.
- Zhang M, Picard-Deland E, Marette A. Fish and Marine Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Consumption and Incidence of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:501015.

Zhang Y, Wang L, Dey S ym. Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15:10296–10333.

Zhao Z, Yan C, Maiese K. Vascular injury during elevated glucose can be mitigated by erythropoietin and Wnt signaling. *Current Neurovascular Research*. 2007;4:194–204.

Zheng J, Lin M, Imamura F, ym. Serum metabolomics profiles in response to n-3 fatty acids in Chinese patients with type 2 diabetes: a double-blind randomised controlled trial. *Nature*. 2016;6:29522.

Zhou J, Wu J, Zheng F, Jin M, Li H. Glucagonlike peptide-1 analog-mediated protection against cholesterol induced apoptosis via mammalian target of rapamycin activation in pancreatic betaTC-6 cells. *Journal of Diabetes*. 2015;7:231–239.