



**UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2023r.



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Justyna Kubacka

Znaczenie wybranych aminokwasów i ich metabolitów w ocenie ryzyka kardiometabolicznego u kobiet w średnim wieku

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Anna Stefańska, prof. UMK

Bydgoszcz 2023r.

*Pani **dr hab. n. med. Annie Stefańskiej, prof. UMK**
pragnę podziękować za poświęcony czas, cenne uwagi oraz nieocenioną pomoc w
przygotowaniu niniejszej rozprawy*

*Pracę dedykuję moim kochanym Rodzicom
dziękując za wsparcie i wiarę w moje możliwości*

SPIS TREŚCI

1	WYKAZ SKRÓTOW UŻYTYCH W PRACY.....	6
2	LISTA PUBLIKACJI	9
3	WSTĘP.....	10
4	CEL PRACY.....	13
4.1	Publikacja nr 1	13
4.2	Publikacja nr 2	13
4.3	Publikacja nr 3	13
4.4	Publikacja nr 4	13
5	METODY BADAWCZE ZASTOSOWANE W PRACACH ORYGINALNYCH.....	14
5.1	Materiał badany	14
5.1.1	Publikacja nr 3	14
5.1.2	Publikacja nr 4	14
5.2	Metody badawcze	14
5.3	Analiza statystyczna.....	15
6	PODSUMOWANIE PRAC POGLĄDOWYCH	16
6.1	Publikacja nr 1	16
6.2	Publikacja nr 2	16
7	PODSUMOWANIE WYNIKÓW PRAC ORYGINALNYCH	17
7.1	Publikacja nr 3	17
7.2	Publikacja nr 4	18
8	OMÓWIENIE I DYSKUSJA	20
9	OGRANICZENIA PRAC ORYGINALNYCH.....	27
10	WNIOSKI	28

11	IMPLIKACJE PRAKTYCZNE	29
12	PIŚMIENNICTWO	30
13	STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	40
14	STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM/ SUMMARY.....	43
15	KSEROKOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCE W CYKL ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	45
15.1	KOPIA PUBLIKACJI NR.1	45
15.2	KOPIA PUBLIKACJI NR.2	53
15.3	KOPIA PUBLIKACJI NR.3	64
15.4	KOPIA PUBLIKACJI NR.4	82
16	ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ.....	93
17	OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	96
18	OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORÓW ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	97

1 WYKAZ SKRÓTOW UŻYTYCH W PRACY

3HAA	kwasy 3-hydroksyantranilowy (<i>3-hydroxyanthranilic acid</i>)
3HAO	3,4 dioksygenaza kwasu 3-hydroksyantranilowego (<i>3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase</i>)
3Kyn	3-hydroksykinurenina (<i>3-hydroxykynurenine</i>)
AA	kwasy antranilowy (<i>anthranilic acid</i>)
AGEs	Zaawansowane produkty glikacji (<i>advanced glycated end products</i>)
ALT	aminotransferaza alaninowa (<i>alanine transaminase</i>)
BCAAs	aminokwasy o rozgałęzionym łańcuchu alifatycznym (<i>branched chain amino acids</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (<i>body mass index</i>)
CCa	wapń skorygowany względem albuminy (<i>albumin-corrected calcium</i>)
CRP	białko C-reaktywne (<i>C-reactive protein</i>)
CVD	choroby sercowo- naczyniowe (<i>cardiovascular diseases</i>)
DG	grupa z dysglikemią (<i>dysglycemic group</i>)
eGFR	szacunkowy wskaźnik filtracji kłębuszkowej (<i>estimated glomerular filtration rate</i>)
FLI	wskaźnik stłuszczenia wątroby (<i>fatty liver index</i>)
GGT	gamma-glutamylotransferazy (<i>gamma glutamyltransferase</i>)
GSIS	wydzielanie insuliny stymulowane glukozą (<i>glucose-induced insulin secretion</i>)
HbA1c	hemoglobina glikowana (<i>glycated hemoglobin</i>)

HOMA-IR	wskaźnik insulinooporności (homeostasis model assessment - insulin resistance)
HDL-C	cholesterol frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (<i>high-density lipoprotein cholesterol</i>)
IDO	2,3- dioksygenaza idoloaminy (<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>)
KAT	aminotransferaza kinureninowa (<i>kynurenine aminotransferase</i>)
KMO	hydroksylaza kinureninowa (<i>kynurenine-3-monooxygenase</i>)
KTR	współczynnik kinurenina/tryptofan (<i>kynurenine/tryptophan ratio</i>)
KP	szlak kinureninowy tryptofanu (<i>kynurenine pathway</i>)
Kyn	kinurenina (<i>kynurenine</i>)
Kyna	kwask kinureninowy (<i>kynurenic acid</i>)
KYNU	kinureninaza (<i>kynureninase</i>)
mTOR	ssaczy cel rapamycyny (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
NAD+	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NAm	nikotynamid (<i>nicotinamide</i>)
NG	grupa z normoglikemią (<i>normoglycemic group</i>)
NMDA	receptor N-metylo-D-asparaginowy (<i>N-methyl D-aspartate</i>)
QA	kwask chinolinowy (<i>quinolinic acid</i>)
TCa	wapń całkowity (<i>total calcium</i>)
T2D	cukrzyca typu 2 (<i>type 2 diabetes</i>)
TDO	2,3 dioksygenaza tryptofanu (<i>tryptophan 2,3- dioxygenase</i>)

Trp	tryptofan (<i>tryptophan</i>)
TSH	hormon tyreotropowy (<i>thyroid-stimulating hormone</i>)
XA	kwas ksanturenowy (<i>xanturenic acid</i>)

2 LISTA PUBLIKACJI

Niniejsza praca została przygotowana w oparciu o cykl czterech opublikowanych prac:

1. Kubacka J., Stefańska A., Znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych, W: Choroby XXI wieku: diagnostyka, prewencja i leczenie / Danielewska Alicja, Mołdoch-Mendoń Izabela (red.), 2022, Lublin, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., s.152-162, ISBN 978-83-67104-55-5

Punktacja MNiSW: 20.000; udział doktoranta: 85%

2. Kubacka J., Stefańska A., Znaczenie aminokwasów rozgałęzionych (BCAA) w insulinooporności i cukrzycy typu 2, W: Najnowsze metody profilaktyki, rozpoznawania i leczenia chorób / Maciąg Kamil, Talarek K. (red.), 2020, Lublin, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., s.87-94, ISBN 978-83-66489-11-0

Punktacja MNiSW: 20.000; udział doktoranta: 85%

3. Kubacka, J.; Cembrowska, P.; Sypniewska, G.; Stefanska, A. The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status. *Nutrients* 2021, 13, 3307. <https://doi.org/10.3390/nu13103307>

Punktacja MNiSW=140; IF=6.706; udział doktoranta: 60%

4. Kubacka, J.; Staniszevska, M.; Sadok, I.; Sypniewska, G.; Stefanska, A. The Kynurenine Pathway in Obese Middle-Aged Women with Normoglycemia and Type 2 Diabetes. *Metabolites* 2022, 12, 492. <https://doi.org/10.3390/metabo12060492>

Punktacja MNiSW=100; IF= 5.581; udział doktoranta: 55%

3 WSTĘP

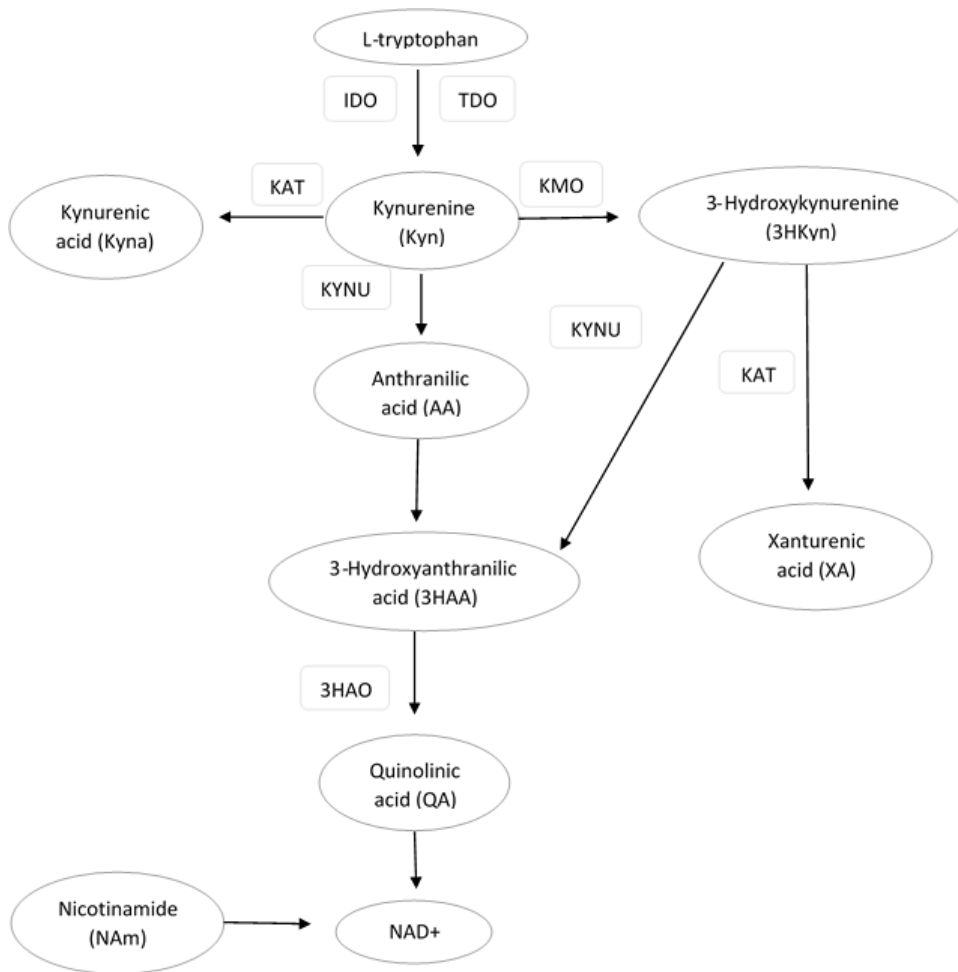
Otyłość, dyslipidemia, zaburzenia gospodarki węglowodanowej i nadciśnienie tętnicze należą do czynników zwiększających ryzyko rozwoju chorób sercowo- naczyniowych (*cardiovascular disease, CVD*). Zaburzenia te często współwystępują razem stanowiąc jedną z głównych przyczyn śmiertelności na całym świecie. Stan taki określany jest mianem zespołu kardiometabolicznego.

Badania ostatnich lat wskazują na rosnące zainteresowanie rolą aminokwasów rozgałęzionych (takich jak BCAA) i aromatycznych, w tym w szczególności tryptofanu (Trp), w rozwoju zaburzeń kardiometabolicznych. Tryptofan przekształcany jest w kilka aktywnych biologicznie metabolitów, z których najbardziej znanym jest serotonina. Jednak tylko niewielki procent Trp metabolizowany jest do serotoniny. Ponad 95% całkowitej puli dostępnego tryptofanu w ustroju przekształcane jest na drodze szlaku kinureninowego (*kynurenine pathway, KP*, Ryc. 1) w kinureninę (Kyn) i produkty jej rozpadu, czego kulminacją jest wytwarzanie dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD⁺), ważnego komórkowego źródła energii [1]. Dowiedziono, że stężenie tryptofanu w surowicy, kinureniny i dalszych jego metabolitów powstałych na drodze niniejszego szlaku, między innymi takich jak: kwas kinureninowy (Kyna), 3-hydroksykinurenina (3HKyn), kwas chinolinowy (QA), mogą być związane z występowaniem zaburzeń metabolicznych. Rozregulowany szlak KP został powiązany z wieloma jednostkami chorobowymi, w tym m.in. z zaburzeniami neurodegeneracyjnymi, stwardnieniem rozsianym, depresją, schizofrenią oraz zaburzeniami czynności nerek i wątroby. Z tego powodu metabolity i enzymy KP stanowią potencjalne cele farmakologiczne i diagnostyczne zarówno w stanie homeostazy jak i w stanie jej zaburzenia [2-8]. Nierównowagę poziomów krążących metabolitów KP odnotowano również w otyłości i zaburzeniach metabolicznych związanych z otyłością, takich jak choroby sercowo-naczyniowe (*cardiovascular disease, CVD*) i cukrzyca typu 2 (type 2 diabetes, T2D) [9,10]. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku aminokwasów takich jak: leucyna, izoleucyna i walina, określanych mianem aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu alifatycznym (*branched chain amino acids, BCAAs*). Poza dobrze znaną rolą BCAAs w metabolizmie białek mięśniowych, w ciągu ostatniej dekady obserwuje się wzrost zainteresowania rolą tych aminokwasów w zaburzeniach kardiometabolicznych, zwłaszcza w otyłości, insulinooporności i T2D. Dotychczasowe doniesienia sugerują, że

podwyższony poziom krążących BCAAs koreluje z otyłością i zwiększonym ryzykiem insulinooporności oraz cukrzycy typu 2 zarówno w modelach ludzkich, jak i zwierzęcych [11-13]. Stwierdzono również, że BCAAs przyczyniają się do rozwoju insulinooporności związanej z otyłością [13]. Podwyższone stężenie tych aminokwasów może pojawić się nawet na kilka lat przed rozwojem pełnoobjawowej cukrzycy typu 2 [14]. Jednak związek między BCAAs a innymi czynnikami ryzyka kardiometabolicznego jest mniej znany.

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy była ocena znaczenia wymienionych aminokwasów i ich metabolitów w ocenie ryzyka kardiometabolicznego. Skoncentrowano się na konwencjonalnych czynnikach ryzyka CVD, takich jak hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze, stan zapalny, stłuszczenie wątroby i obniżony szacowany współczynnik przesączania kłębuszkowego (eGFR). Ponieważ homeostaza wapnia odgrywa rolę w metabolizmie glukozy i aminokwasów [15,16], a także jest uznawana za czynnik ryzyka kardiometabolicznego [17], zbadano również związek między stężeniem wapnia we krwi a BCAAs w odniesieniu do stanu glikemii. W związku z tym, że niekorzystne zmiany kardiometaboliczne są szczególnie często obserwowane u kobiet w okresie okołomenopauzalnym i pomenopauzalnym, w niniejszej pracy zdecydowano się na analizę aminokwasów i ich metabolitów w grupie kobiet w średnim wieku od 40 do 60 lat .

Wykrycie zmian w metabolizmie aminokwasów, na wiele lat przed wystąpieniem objawów chorobowych, może mieć kluczowe znaczenie dla wczesnej diagnozy i opracowania nowych, skutecznych interwencji terapeutycznych. Bardziej szczegółowe zrozumienie tych mechanizmów może pomóc w identyfikacji nowych biomarkerów, które mogą wspierać zarówno obserwację, jak i leczenie pacjentów z zaburzeniami kardiometabolicznymi, w tym z T2D.



Ryc.1 Schematyczne przedstawienie szlaku przemian tryptofanu na drodze szlaku kinureninowego. IDO-2,3-dioksygenaza idoloaminy; TDO-2,3 dioksygenaza tryptofanu; KAT- aminotransferaza kinureninowa; KMO-3-hydroksylaza kinureninowa; KYNU- kinureninaza; 3HAO-3,4 dioksygenaza kwasu 3-hydroksyantranilowego; NAm- nicotynamid; NAD⁺- niacyna.

4 CEL PRACY

Celem zasadniczym niniejszej pracy była ocena zależności pomiędzy stężeniem aminokwasów rozgałęzionych (BCAA) i tryptofanu oraz wybranych metabolitów tryptofanu z uznanymi kardiometabolicznymi czynnikami ryzyka u kobiet z normoglikemią i dysglikemią, w tym z cukrzycą typu 2.

W każdej z publikacji składających się na przedstawioną dysertację postawiono cele szczegółowe.

4.1 Publikacja nr 1

Dokonanie przeglądu i analizy aktualnej literatury naukowej na temat znaczenia aminokwasów takich jak: tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina, glicyna, arginina glutamina oraz aminokwasy rozgałęzione BCAA, w zaburzeniach metabolicznych prowadzących do rozwoju chorób sercowo- naczyniowych.

4.2 Publikacja nr 2

Dokonanie przeglądu i analizy aktualnej literatury naukowej na temat roli leucyny, izoleucyny i waliny (BCAAs) w rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2.

4.3 Publikacja nr 3

Przedstawienie zależności między całkowitym stężeniem aminokwasów rozgałęzionych (BCAAs) w surowicy krwi a czynnikami ryzyka kardiometabolicznego w grupie 349 kobiet w średnim wieku podzielonych na dwie podgrupy w zależności od statusu glikemicznego.

4.4 Publikacja nr 4

Ocena związku tryptofanu i jego metabolitów z szlaku kinureninowego z występowaniem T2D i kardiometabolicznych czynników ryzyka w grupie 128 otyłych kobiet w średnim wieku.

5 METODY BADAWCZE ZASTOSOWANE W PRACACH ORYGINALNYCH

5.1 Materiał badany

5.1.1 Publikacja nr 3

Materiał badany stanowiły próbki krwi, pozyskane od 349 kobiet w wieku od 40 do 60 lat. Badane kobiety podzielono na dwie podgrupy: grupę z normoglikemią (NG, n = 184) i grupę z dysglikemią (DG, n = 165).

5.1.2 Publikacja nr 4

Materiał badany stanowiły próbki krwi, pozyskane od 128 otyłych kobiet w wieku od 41 do 60 lat. Badane kobiety podzielono na dwie podgrupy: grupę z normoglikemią (NG, n = 65) i grupę z cukrzycą typu 2 (T2D, n = 63).

5.2 Metody badawcze

We wszystkich próbkach surowicy oznaczono parametry biochemiczne takie jak: stężenie trójglicerydów (TG), cholesterolu HDL (HDL-C), kreatyniny, białka C-reaktywnego (CRP), aminotransferazy alaninowej (ALT), gamma-glutamylotransferazy (GGT), insuliny, hormonu tyreotropowego (TSH). Osocze wykorzystano do oznaczenia stężenia glukozy, a krew pełną EDTA do oznaczenia hemoglobiny glikowanej (HbA1c). Obliczono wskaźnik HOMA-IR. Wskaźnik eGFR obliczono za pomocą wzoru CKD-EPI.

Na potrzeby **publikacji 3**, w próbkach surowicy oznaczono również stężenie wapnia całkowitego (TCa). Obliczono wskaźnik stłuszczenia wątroby (FLI) oraz stężenie wapnia skorygowanego względem albuminy (CCa). Oznaczenie stężenia całkowitych BCAAs (suma L-leucyny, L-izoleucyny i L-waliny) wykonano testem enzymatycznym z odczytem kolorymetrycznym.

Na potrzeby **publikacji 4** we współpracy z Katolickim Uniwersytetem Lubelskim w Lublinie, w surowicy oznaczono stężenia tryptofanu (Trp), kinureniny (Kyn), 3-hydroxykinureniny (3-HKyn), kwasu kinureninowego (Kyna) i kwasu chinolinowego (QA),

które analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu z jonizacją elektrorozpylającą/ potrójną kwadrupolową spektrometrią mas (UHPLC-ESI-MS/MS). Stężenia tryptofanu i poszczególnych metabolitów KP wykorzystano do obliczenia następujących stosunków: stosunek Kyn/Trp (KTR), który odzwierciedla aktywność enzymu IDO; stosunek Kyna/Kyn (KAT), który odzwierciedla aktywność enzymu KAT; stosunek 3HKyn/Kyn (KMO), który odzwierciedla aktywność enzymu KMO oraz stosunek Kyna/3HKyn i stosunek Kyna/QA, które odzwierciedlają brak równowagi pomiędzy poszczególnymi metabolitami szlaku KP.

W obu pracach oryginalnych wykorzystano również dane dotyczące pomiarów antropometrycznych: wzrostu, masy ciała, obwodu talii i bioder. Zmierzono dwukrotnie skurczowe i rozkurczowe ciśnienie krwi oraz obliczono wskaźnik masy ciała BMI.

Kryteria wykluczenia były następujące: cukrzyca typu 1 w wywiadzie, choroba układu krążenia (CVD) w wywiadzie oraz ciężka lub umiarkowana przewlekła choroba nerek. Wszystkie badane kobiety miały stężenie CRP < 10mg/l, TSH < 4,94μIU/ml i eGFR > 60ml/min/1,73m².

Dane dotyczące wieku, palenia tytoniu, nawyków żywieniowych, aktywności fizycznej, stanu menopauzy i przyjmowanych leków uzyskano za pomocą szczegółowej ankiety. Cukrzycę typu 2 rozpoznano na podstawie pomiaru stężenia glukozy na czczo w osoczu ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l) powtarzanego przez dwa kolejne dni lub stężenia hemoglobiny glikowanej $\geq 6,5\%$ (48mmol/mol) lub według samodzielnego zgłoszenia na podstawie diagnozy lekarskiej, w której rozpoznano cukrzycę oraz zastosowano leki hipoglikemizujące. Normoglikemię zdefiniowano jako stężenie glukozy na czczo < 5,6mmol/l (100mg/dl). Kategorie otyłości zostały sklasyfikowane na podstawie obliczenia wskaźnika BMI. Klasa 1: BMI od 30 do < 35; klasa 2: BMI od 35 do < 40; klasa 3: BMI ≥ 40 kg/m².

5.3 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono metodami szczegółowo opisanymi w oryginalnych anglojęzycznych wersjach publikacji 3 i 4.

6 PODSUMOWANIE PRAC POGLĄDOWYCH

6.1 Publikacja nr 1

W pierwszej pracy przeglądowej omówiono znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych, które są modulatorami wydzielania insuliny. Pokróctce zdefiniowano pojęcie i zakres zaburzeń, które współistniejąc razem, w znacznym stopniu zwiększają częstość występowania chorób sercowo-naczyniowych. Zwrócono uwagę na aminokwasy, takie jak: glicyna, arginina, glutamina oraz grupy aminokwasów, takie jak aminokwasy rozgałęzione (BCAA) i aromatyczne (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina), które są ściśle związane z otyłością i zaburzeniem gospodarki węglowodanowej. Cukrzyca typu 2 związana jest z ogólnoustrojowym rozregulowanym środowiskiem metabolicznym, które, mimo, iż koncentruje się głównie na glukozie, wyraźnie obejmuje również kwasy tłuszczowe i aminokwasy. Coraz więcej dowodów naukowych pojawiających się w ostatnich latach sugeruje, że powyższe aminokwasy mogą regulować rozmaite procesy metaboliczne, w tym metabolizm glukozy i lipidów.

6.2 Publikacja nr 2

Celem drugiej pracy przeglądowej było przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat znaczenia aminokwasów rozgałęzionych BCAA w rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2. Omówiono pokrótce budowę i metabolizm aminokwasów rozgałęzionych BCAA. Opisano związek BCAA z tkanką tłuszczową, która będąc źródłem hormonów i cytokin prozapalnych została uznana za ważny element rozwoju insulinooporności indukowanej otyłością. Omówiono również aspekt suplementacji BCAA i jej związku z insulinoopornością oraz przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat roli BCAA w insulinooporności i cukrzycy typu 2.

7 PODSUMOWANIE WYNIKÓW PRAC ORYGINALNYCH

7.1 Publikacja nr 3

Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały, że:

1. Stężenie całkowitych BCAAs w surowicy było istotnie wyższe w grupie kobiet z dysglikemią ($p < 0,0001$), nawet po dostosowaniu analizy statystycznej do wieku, BMI i statusu menopauzalnego (Tabela 1 w źródłowym manuskrypcie nr 3).
2. Adjustowana do wieku i BMI analiza korelacji wykonana oddzielnie w grupach kobiet NG i DG wykazała słabe ($0,2 > \text{współczynnik korelacji} < 0,4$) lecz istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem BCAAs a wartościami TCa, CCa, HbA1c, glukozy, HDL-C i wskaźnika TG/HDL-C tylko w grupie DG. Również wykazaliśmy istotne korelacje z CRP, HDL-C, TG, FLI i eGFR, ale zależności te stały się nieistotne statystycznie po adjustacji do wieku i BMI. Porównanie współczynników korelacji pomiędzy grupą NG i DG wykazało statystycznie istotnie wyższe współczynniki korelacji dla zależności pomiędzy BCAAs i TCa, CCa, HbA1c, glukozą oraz HOMA-IR w grupie DG w porównaniu do grupy NG (Tabela 2 w źródłowym manuskrypcie nr 3).
3. Modele analizy dwuczynnikowej ANOVA wykazały, że współwystępowanie stanu dysglikemii (DG) z wartościami BCAAs powyżej mediany związane są istotnie statystycznie z wyższymi stężeniami TCa ($p = 0,00031$), CCa ($p = 0,007$), i HbA1c ($p = 0,00038$) oraz z występowaniem hipertriglicydemii ($p = 0,033$) (Rycina 1 w źródłowym manuskrypcie nr 3).
4. Adjustowana do wieku i BMI analiza regresji logistycznej wykazała, że wzrost stężenia BCAAs o $10 \mu\text{mol/L}$ istotnie zwiększa szansę wystąpienia stężenia powyżej 75-tego percentyla dla TCa ($> 2,45 \text{ mmol/L}$), CCa ($> 2,38 \text{ mmol/L}$) i HbA1c ($> 39 \text{ mmol/mol}$) oraz stężenia HDL-C poniżej 45 mg/dL w grupie DG. Podobnych istotnych zależności nie zaobserwowano w grupie NG (Tabela 3 w źródłowym manuskrypcie nr 3).
5. Analiza krzywych ROC wykazała, że stężenie BCAAs ma dobrą wartość prognostyczną dla występowania CCa $> 2,38 \text{ mmol/L}$ w grupie DG i występowania wartości FLI > 60 w grupie NG. Dodatkowo, wartości krzywych AUC wskazały na zadawalającą wartość prognostyczną dla

podwyższonego stężenia HbA1c, TCa i FLI w grupie DG oraz CRP w grupie NG. Wartości AUC były statystycznie istotnie wyższe w grupie DG w porównaniu do grupy NG dla predykcji TCa i CCa powyżej 75-tego percentyla (Tabela 4 w źródłowym manuskrypcie nr 3).

6. Z uwagi, iż w przeprowadzonych analizach statystycznych stężenia BCAAs wykazały istotny związek z TCa, CCa i HbA1c, oceniliśmy zależności pomiędzy stężeniem wapnia i HbA1c. Analiza korelacji Spearmana wykazała istotne statystycznie korelacje pomiędzy TCa, CCa i HbA1c tylko w grupie DG [TCa ($r = 0.40$, $p < 0.0001$) i CCa ($r = 0.46$, $p < 0.0001$)]. Związek HbA1c ze stężeniem BCAA, TCa i CCa był niezależny od wieku i BMI w grupie DG, co wykazano w modelu regresji wieloczynnikowej (opis wyników strona 9 w źródłowym manuskrypcie nr 3).

W podsumowaniu całość przedstawionych wyników wskazuje przede wszystkim na istotny związek, niezależny od wieku i BMI, pomiędzy stężeniem całkowitych BCAAs z TCa, CCa, HbA1C oraz parametrami gospodarki lipidowej, w grupie z dysglikemią, w której stężenia BCAAs są istotnie wyższe.

7.2 Publikacja nr 4

Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały, że:

1. Podstawowe porównanie badanych grup otyłych kobiet z normoglikemią (NG) i T2D wskazało, iż obie grupy istotnie statystycznie różniły się wiekiem, parametrami gospodarki węglowodanowej, lipidowej, aktywnością enzymów wątrobowych i eGFR. Natomiast obie grupy były ujednoczone wobec wskaźnika BMI, kategorii otyłości, aktywności fizycznej i spożywania alkoholu oraz statusu menopauzalnego. Zbilansowanie grup szczególnie w zakresie BMI wydaje się szczególnie istotne z uwagi na wpływ masy ciała na szlak KP (Tabela 1 w źródłowym manuskrypcie nr 4).

2. W grupie otyłych kobiet z współistniejącą cukrzycą typu 2 (T2D) odnotowano istotnie statystycznie wyższe wartości Trp, Kyna, Kyna/QA i Kyna/3HKyn w porównaniu z grupą kobiet otyłych z normoglikemią (Tabela 2 w źródłowym manuskrypcie nr 4).

3. Analiza regresji logistycznej wykazała, że stężenia Trp i Kyna oraz wartości stosunku Kyna/3HKyn były najsilniej związane z występowaniem T2D, nawet po uwzględnieniu czynników zakłócających. Model regresji z Trp i stosunkiem Kyna/3HKyn jako zmiennymi niezależnymi tłumaczył 20% zmienności dla występowania T2D (Tabela 4 w źródłowym manuskrypcie nr 4).

4. Analiza korelacji Spearman wykonana oddzielnie w grupie kobiet z normoglikemią i T2D, wykazała różny wzór istotnych korelacji, co szczególnie znalazło odzwierciedlenie w wyższych współczynnikach korelacji pomiędzy Trp i jego metabolitami a wartością BMI w grupie z normoglikemią w porównaniu do grupy z T2D (Tabela 5 w źródłowym manuskrypcie nr 4).

W podsumowaniu całość przedstawionych wyników wskazuje, że wzrost stężenia Trp i Kyna wraz z towarzyszącym wzrostem wartości wskaźnika Kyna/3HKyn związany jest z występowaniem cukrzycy typu 2 u otyłych kobiet w średnim wieku.

8 OMÓWIENIE I Dyskusja

Zaburzenia kardiometaboliczne oraz choroby sercowo- naczyniowe (ang. *cardiovascular disease, CVD*) stanowią coraz większe wyzwanie zdrowotne na całym świecie ze względu na ich systematycznie zwiększającą się częstość występowania, zwłaszcza wśród kobiet [18]. Kardiometaboliczne czynniki ryzyka takie jak: otyłość, nadciśnienie, zaburzenia regulacji metabolizmu glukozy i dyslipidemia, określane mianem zespołu metabolicznego, są szczególnie często obserwowane u kobiet po menopauzie [19,20]. Zespół kardiometaboliczny wiąże się również z podwyższonym ryzykiem zdarzeń sercowo-naczyniowych. Z tego względu wciąż poszukuje się nowych biomarkerów, które umożliwiłyby szybszą i dokładniejszą identyfikację osób z grupy zwiększonego ryzyka zachorowania, a także umożliwiających monitorowanie indywidualnego ryzyka metabolicznego, jak również miałyby potencjalne znaczenie terapeutyczne.

Obie prace przeglądowe włączone w skład niniejszej dysertacji miały na celu omówienie na podstawie aktualnej wiedzy znaczenia wybranych aminokwasów w tym aminokwasów rozgałęzionych BCAAs i aromatycznych np. tryptofanu w zaburzeniach metabolicznych takich jak otyłość, insulinooporność czy T2D.

W ostatnich latach, niezależnie od siebie, wzrasta zainteresowanie rolą aminokwasów rozgałęzionych BCAAs oraz tryptofanu i jego metabolitów pochodzących ze szlaku kinureninowego (KP) w zaburzeniach kardiometabolicznych, zwłaszcza w kontekście rozwoju otyłości, insulinooporności i T2D. Zarówno BCAAs (leucyna, izoleucyna i walina) jak i tryptofan należą do aminokwasów egzogennych, dostarczanych wraz z dietą. Uważa się jednak, że to nie sama ilość spożywanych aminokwasów, ale przede wszystkim zmiany w ich metabolizmie są przyczyną związku z zaburzeniami kardiometabolicznymi. Ogólnoustrojowy stan zapalany o niskim stopniu nasilenia oraz otyłość, związane są z przekierowaniem szlaku kinureninowego w kierunku wytwarzania metabolitów tryptofanu niższego rzędu. Metabolity te osłabiają układ odpornościowy na różne sposoby [21,22] i biorą udział w patologicznych mechanizmach będących podstawą chorób metabolicznych. Dostępne dane literaturowe dotyczące aktywności różnych gałęzi KP są ograniczone i prawdopodobnie ich proporcje różnią się w zależności od tkanki i typu komórek, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w różnych stanach chorobowych. Dowiedziono, że stężenie tryptofanu i jego metabolitów w surowicy,

między innymi takich jak: kinurenina, kwas kinureninowy, 3-hydroksykinurenina, kwas chinolinowy, mogą być związane z występowaniem cukrzycy typu 2, jednak dostępne dane literaturowe w tym zakresie są niespójne. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku innych aminokwasów, takich jak: leucyna, izoleucyna i walina, określanymi mianem BCAAs (ang. *branched chain amino acids*). Poza dobrze znaną rolę BCAAs w metabolizmie białek mięśniowych, w ciągu ostatniej dekady obserwuje się wzrost zainteresowania rolą tych aminokwasów w insulinooporności i cukrzycy typu 2. Badania wskazują, że rodzaj przyjmowanej diety i jej kaloryczność nie wpływają istotnie na związek BCAAs z insulinoopornością i cukrzycą [13,23,24]. Związek ten głównie determinują zmiany w ich metabolizmie, takie jak np. zmniejszony katabolizm tych aminokwasów w otyłości i insulinooporności, co skutkuje ich akumulacją w organizmie [25,26]. Związek BCAAs z otyłością i insulinoopornością został udokumentowany w wielu pracach, jednak nadal poszukuje się czynników metabolicznych związanych z kardiometabolicznym oddziaływaniem BCAAs.

W celu pogłębienia wiedzy w zakresie związku aminokwasów rozgałęzionych BCAA oraz tryptofanu i jego metabolitów pochodzących ze szlaku KP z zaburzeniami kardiometabolicznymi, przebadano grupę kobiet w średnim wieku. Na potrzeby pracy o związku BCAAs z czynnikami kardiometabolicznymi badaną grupę kobiet podzielono na dwie podgrupy: grupę z normoglikemią i grupę z dysglikemią. Natomiast na cele pracy dotyczącej tryptofanu i jego metabolitów, skupiono się na kobietach wyłącznie otyłych z normoglikemią i T2D. Do badań zakwalifikowano kobiety w średnim wieku ponieważ w tym przedziale wiekowym kobiety wchodzi w okres około i pomenopauzalny, który sprzyja zaburzeniom kardiometabolicznym. Ponadto wcześniejsze badania sugerują, iż związek BCAAs z zaburzeniami metabolicznymi zależy od płci i u kobiet jest słabszy [27,28], a stężenia metabolitów KP są niższe u kobiet i zmieniają się w różnych kategoriach wiekowych, szczególnie przed 40 rokiem życia i po 60 roku życia [29,30].

Wyniki pierwszej publikacji oryginalnej, oceniającej stężenie BCAAs wskazują, że stan dysglikemii predysponuje kobiety w średnim wieku do występowania niezależnego od BMI i wieku, istotnego związku pomiędzy stężeniem całkowitych BCAAs a stężeniem wapnia, HbA1c i glukozy. Zaobserwowano również istotne korelacje z CRP, HDL-C, TG, FLI i eGFR, ale zależności te zostały częściowo wyjaśnione przez BMI i wiek badanych, z wyjątkiem korelacji

z HDL-C. Wyniki te również zostały potwierdzone w analizie regresji logistycznej, gdzie wzrost stężenia BCAAs o 10 $\mu\text{mol/L}$ istotnie zwiększał szansę wystąpienia stężenia powyżej 75-tego percentyla dla TCa, CCa i HbA1c oraz stężenia HDL-C poniżej 45 mg/dL grupie DG. Podobnych istotnych zależności nie zaobserwowano w grupie NG. Dodatkowo wykazano, że współwystępowanie dysglikemii z wartościami BCAAs powyżej mediany związane jest z istotnie wyższymi stężeniami wapnia, HbA1c oraz występowaniem hipertriglicydemii. Dane literaturowe potwierdzają zależności pomiędzy BCAAs a czynnikami kardiometabolicznymi takimi jak otyłość [31,32], insulinooporność, T2D [13,23,27,31,33,34-36], dyslipidemia [37-39], stłuszczenie wątroby [40-43] czy stany zapalne [44,45]. Jednak zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, nowatorska w przedstawionej pracy wydaje się obserwacja dotycząca związku pomiędzy stężeniem BCAAs a poziomami wapnia w połączeniu z podwyższonym stężeniem glukozy, HbA1c i w słabszym stopniu z poziomem parametrów lipidowych. Struktura niniejszej pracy nie jest w stanie wyjaśnić zależności przyczynowo skutkowej. Możemy jedynie opierać się na danych literaturowych, w których badano mechanizmy związane z udziałem BCAAs w stanach fizjologii i patofizjologii. Związek BCAAs z zaburzeniem gospodarki węglowodanowej z jednej strony tłumaczony jest ograniczonym enzymatycznym katabolizmem BCAAs towarzyszącym otyłości i insulinooporności, co powoduje akumulację tych aminokwasów [25,10]. Z drugiej strony sugeruje się mechanizmy wskazujące, iż same BCAAs mogą promować insulinooporność poprzez aktywację kompleksu 1 kinazy mTOR (mTORC1) z nasiloną fosforylacją substratu - białka rybosomalnego S6 kinazy 1 (S6K1). Nasilona aktywacja szlaku mTORC1/S6K1 wzmacnia insulinooporność, poprzez blokowanie sygnalizacji insuliny [46-48]. W niniejszej pracy zaobserwowano także, że współwystępowanie dysglikemii z podwyższonymi stężeniami BCAAs związane jest z istotnie wyższymi stężeniami HbA1c, co może być po części tłumaczone faktem, iż przewlekłe podwyższone stężenia BCAAs generują stres oksydacyjny, który w połączeniu z hiperglikemią może przyczynić się do wzrostu stężenia HbA1c i końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs) [49,50]. Kolejną obserwacją w pracy było wykazanie istotnego związku pomiędzy stężeniem BCAAs a stężeniem wapnia w surowicy, zarówno oznaczonego jako wapń całkowity oraz w przeliczeniu na wapń całkowity skorygowany o stężenie albuminy. Istotnie wyższe stężenia wapnia, jak i HbA1c zaobserwowano przy współwystępowaniu dysglikemii z podwyższonymi wartościami BCAAs. W kolejnych analizach zaobserwowano, iż stężenie wapnia koreluje dodatnio z HbA1c tylko w grupie kobiet z dysglikemią. Jednocześnie w modelu

regresji wieloczynnikowej w grupie kobiet z dysglikemią, wykazano, że stężenie HbA1c istotnie dodatnio koreluje z BCAA i stężeniem wapnia, niezależnie od BMI i wieku. Podobnych zależności nie zaobserwowano w grupie kobiet z normoglikemią. Dane literaturowe wskazują, na związek pomiędzy podwyższonym stężeniem krążącego wapnia a występowaniem ryzyka T2D, co zostało podsumowane w metaanalizie Zhu i wsp. [51]. Wykazano również związek stężenia wapnia z insulinoopornością i upośledzoną tolerancją glukozy [52,53]. Jednak niektóre badania nie potwierdzają tych zależności [54,55], jak również są niezgodne co do relacji pomiędzy HbA1c a stężeniem wapnia [56-58]. Zależność pomiędzy stężeniem krążącego wapnia a gospodarką węglowodanową jest najczęściej tłumaczona poprzez zależny od receptorów wapniowych (CaR) mechanizm regulujący sekrecję insuliny indukowanej glukozą przez komórki beta trzustki [15,59-61]. Cytowane prace naukowe odnoszą się oddzielnie do związku pomiędzy stężeniem BCAAs lub wapnia z zaburzoną gospodarką węglowodanową. Jednak według naszej najlepszej wiedzy nie ma badania, które łączyłoby oba te parametry w powiązaniu ze statusem glikemicznym. W celu wyjaśnienia zaobserwowanych dodatknych zależności pomiędzy dysglikemią, stężeniem HbA1c, BCAAs oraz wapniem, dokonano przeglądu literatury, na podstawie której można jedynie zasugerować pewną hipotezę, która wskazuje na udział szlaku mTOR. Jak wspomniano powyżej, wysokie stężenia BCAAs aktywują szlak kinazy mTORC1/S6K1, powodując insulinooporność. Zaobserwowano również, że do aktywacji szlaku mTORC1/S6K1 w odpowiedzi na aminokwasy, zwłaszcza leucynę, wymagane są jony wapnia (Ca^{2+}). Mercan i wsp. wykazali, że aktywacja S6K1 przez leucynę w mioblastach szkieletowych wymaga mobilizacji wewnątrzkomórkowego wapnia (Ca^{2+}), w którym pośredniczy białko fosfataza tyrozynowa SHP-2 w sposób zależny od inozytolu-1,4,5-trifosforanu. Co ciekawe, wzrost Ca^{2+} jest specyficzny dla leucyny, ponieważ izoleucyna nie indukowała Ca^{2+} w podobnych warunkach eksperymentu [62]. Inne badania wskazują, że dodanie leucyny do środowiska reakcji nasila regulację syntetazy ATP, glukokinazy i cytozolowych jonów wapnia [63]. Wydaje się zatem, że BCAAs mogą regulować metabolizm glukozy w procesach zależnych od jonów wapnia, choć jak zaznaczają autorzy, mechanizmy te jeszcze nie są do końca wyjaśnione. Wyniki niniejszej pracy wskazują również na istotny ujemny związek pomiędzy BCAA a HDL-C, który był niezależny od wieku, BMI i statusu glikemicznego, jak również zaobserwowano dodatni związek pomiędzy hipertryglicerydemią a współwystępowaniem dysglikemii z podwyższonymi stężeniami BCAA. Otrzymane wyniki są po części spójne z obserwacjami innych autorów, którzy również wykazali związek pomiędzy

podwyższonymi stężeniami BCAAs a poziomami TG i HDL-C, zarówno w populacji europejskiej, japońskiej czy chińskiej [37-39]. Zależności pomiędzy dyslipidemią a stężeniem BCAA mogą być tłumaczone za pomocą kilku mechanizmów zaproponowanych przez innych autorów i opisanych w manuskrypcie źródłowym [64-67].

Wyniki drugiej publikacji oryginalnej dotyczącej związku tryptofanu i jego metabolitów z kardiometaboliicznymi czynnikami ryzyka i T2D u otyłych kobiet w średnim wieku wskazują, że otyłe kobiety z cukrzycą typu 2 mają istotnie wyższe stężenia tryptofanu (Trp), kwasu kinureninowego (Kyna) oraz wskaźników Kyna/QA i Kyna/3HKyn. Analiza regresji logistycznej wykazała, że stężenia Trp, Kyna i wskaźnika Kyna/3HKyn były najsilniej związane z występowaniem T2D nawet po uwzględnieniu potencjalnych czynników zakłócających. Taka kombinacja wyników może sugerować, że metabolizm Trp jest przesunięty w kierunku Kyna, z jednoczesnym wzrostem stosunku Kyna/ 3HKyn. Analizy statystyczne wskazały również, że model z Trp i stosunkiem Kyna/3HKyn tłumaczy w 20% zmienność występowania T2D. Wcześniejsze publikacje, zarówno kliniczno-kontrolne [68-71] jak i prospektywne [9,68,72,73] często dawały niespójne wyniki w tym temacie. Przyczyną takich rozbieżności, szczególnie w przypadku badań z małą wielkością próby, mógł być brak ujednoczenia badanych grup wobec czynników zakłócających, szczególnie wskaźnika BMI. Dlatego nasze grupy badane z normoglikemią i T2D nie różniły się istotnie wartością BMI, jak również innymi potencjalnymi czynnikami zakłócającymi np. statusem menopauzalnym. Podobnie jak w poprzedniej pracy oryginalnej, skupiono się na kobietach w średnim wieku, gdyż ten okres życia u kobiet sprzyja zaburzeniom kardiometabolicznym. Dodatkowo do badania włączono wyłącznie kobiety otyłe, gdyż połączenie otyłości z okresem około i pomenopauzalnym szczególnie naraża kobiety na ryzyko powikłań metabolicznych. Ponadto w danych literaturowych znaleziono tylko jedną pracę, która odnosiła się wyłącznie do kobiet otyłych w średnim wieku z populacji europejskiej, jednak w tej pracy kobiety były znacznie bardziej otyłe, a autorzy nie zaobserwowali różnicy w stężeniu Trp i jego metabolitów pomiędzy grupą z T2D i bez [68]. Wyniki innych doniesień literaturowych są po części zgodne z naszymi obserwacjami, wskazującymi, że stężenie Trp [72] i Kyna [29,69-71] są wyższe u osób z T2D. W innych pracach nie zaobserwowano różnicy w stężeniu Trp [29,70,71] lub jego stężenia były istotnie niższe [69]. Wzrostowi Kyna u kobiet z T2D towarzyszył spadek 3HKyn, co zostało odzwierciedlone we wzroście wartości stosunku Kyna/3HKyn. W danych literaturowych nie ma informacji odnoszących się do wskaźnika

Kyna/3HKyn w kontekście cukrzycy. Występują jedynie doniesienia wskazujące na wyższe stężenia 3HKyn w cukrzycy [29,69,71] lub brak związku tego metabolitu z cukrzycą [70]. W celu wyjaśnienia naszej obserwacji można jedynie hipotetycznie założyć, że wzrost stosunku Kyna/3HKyn jest konsekwencją przesunięcia metabolizmu Trp w kierunku Kyna lub wynika z nasilonego katabolizmu 3HKyn do kwasu ksanturenowego (XA), który ma potwierdzone działanie diabetogenne [69,70]. Niespodziewanie w niniejszej pracy nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami w wartościach kynreniny (Kyn) i stosunku Kyn/Trp (KTR), który odzwierciedla aktywność enzymuIDO-1. Szczególnie dobrze udokumentowane są podwyższone wartości wskaźnika KTR u pacjentów otyłych [68,74,75] czy ze zdarzeniami sercowymi [72]. Natomiast znaczenie KTR u pacjentów z T2D jest mniej jasne. W kilku badaniach również nie zaobserwowano różnicy w wartościach KTR u osób z T2D w porównaniu do osób nie obciążonych T2D [68,70]. W badaniu norweskim wykazano, że ocena KTR wyliczonego na podstawie pomiaru metabolitów w moczu jest lepszym predyktorem T2D niż wynikające z pomiarów w osoczu [9]. Brak różnicy w wartościach KTR pomiędzy grupami może również wynikać z faktu, iż grupy były ujednocicane pod kątem BMI czy stężenia markerów stanu zapalnego.

Jak wskazano powyżej, w niniejszej pracy zaobserwowano istotny związek z występowaniem T2D dla trzech parametrów: Trp, Kyna i stosunku Kyna/3HKyn. W celu wyjaśnienia mechanizmów tych zależności posłużono się danymi literaturowymi, które wskazują, że zarówno Trp jak i Kyn i Kyna regulują sekrecję insuliny indukowaną glukozą (GSIS) przez komórki beta trzustki oraz syntezę glukozy w wątrobie, a te regulacje mogą zostać zaburzone np. w stanie zapalnym [76,77]. Ponadto Trp wpływa na metabolizm lipidów [78]. Dane literaturowe wskazują na pozytywny związek pomiędzy Trp i insulinoopornością, jak i innych czynników, tj. stężenie TG czy ciśnienie krwi. W niniejszej pracy zaobserwowano również zależność między Trp i TG, a związek ten był silniejszy u kobiet z T2D. Ponad 95% spożywanego Trp jest metabolizowane w szlaku KP. Pierwszym metabolitem w tym szlaku jest kynurenina (Kyn), która reguluje wiele procesów metabolicznych, będąc endogennym ligandem dla receptora węglowodorów aromatycznych (AHR). W niniejszej pracy zaobserwowano jedynie słabe korelacje pomiędzy enzymami wątrobowymi i stężeniem Kyn. Brak związku Kyn z T2D może po części wynikać z faktu, iż większość badanych kobiet z T2D była leczona metforminą, która może obniżyć stężenie Kyn [79,80]. Kyn następnie metabolizowana jest do trzech kolejnych metabolitów,

z których badano dwa: Kyna i 3HKyn. Według literatury 3HKyn jest metabolitem prooksydacyjnym, procukrzycowym oraz o funkcji neurotoksycznej. W niniejszej pracy niespodziewanie stężenia 3HKyn były niższe w grupie T2D, jednak równocześnie w tej grupie wykazywały tendencje do dodatnich korelacji z HOMA-IR oraz neopteryną. Analiza korelacji pomiędzy metabolitami KP wykazała ujemne zależności między 3HKyn a Kyna i QA, co może wspierać hipotezę, że u otyłych kobiet dochodzi do przesunięcia szlaku KP w kierunku Kyna z obniżeniem syntezy QA. Rola wzrostu stężenia Kyna jest również nie końca jasna. Kyna jest antagonistą lub agonistą kilku receptorów w tym receptora N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), receptora sprzężonego z białkiem G 35 (GPR35) i receptora AHR. Ponadto reguluje GSIS. Choć badania z udziałem zwierząt wskazują na przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne i neuroprotektoryjne działanie Kyna [81-84], to w badaniach z udziałem ludzi stwierdzany jest pozytywny związek pomiędzy Kyna a insulinoopornością [69-71]. W niniejszym badaniu stężenia Kyna były wyższe u kobiet otyłych z T2D i wykazywały słabą tendencję do dodatniej korelacji z HbA1c. Natomiast u otyłych kobiet z normoglikemią zaobserwowano ujemne korelacje Kyna z BMI i CRP, co może wskazywać na jej protekcyjne działanie.

9 OGRANICZENIA PRAC ORYGINALNYCH

Najważniejszym ograniczeniem oby prac oryginalnych jest mała wielkość grup badanych, co uniemożliwiło wykonanie wieloczynnikowych adjustacji analiz statystycznych. Oba badania ukazały statystyczne zależności między badanymi parametrami, natomiast struktura tych badań nie pozwalała ocenić zależności przyczynowo skutkowej. Zaproponowano jedynie pewne potencjalne mechanizmy wyjaśniające zaobserwowane zależności na podstawie przeglądu literatury. Do oznaczenia BCAAs wykorzystano metodę enzymatyczną, która mierzy całkowite BCAAs bez podziału na poszczególne aminokwasy (walinę, izoleucynę i leucynę). Jednak według danych literaturowych stężenia całkowitych BCAAs związane są z czynnikami metabolicznymi w podobnym stopniu lub silniej w porównaniu do poszczególnych składkowych aminokwasów [74]. Ponadto metoda enzymatyczna wykazywała silną korelację z metodą HPLC [75]. Obok stężenia wapnia nie oznaczono stężenia witaminy D i parathormonu (PTH), jednakże jak wskazuje literatura, związek pomiędzy stężeniem wapnia a parametrami gospodarki węglowodanowej pozostawał istotny po adjustacji do tych parametrów. Innym ograniczeniem był brak oznaczenia wszystkich metabolitów szlaku KP, a szczególnie kwasu ksanturenowego (XA) oraz aktywnej formy witaminy B6 (fosforan pirydoksalu (5-P-5)). Założono jedynie, że poziom witaminy B6 nie różnił się istotnie między grupami, z uwagi na brak różnicy w nawykach żywieniowych, masie ciała oraz w nasileniu stanu zapalnego pomiędzy grupami.

10 WNIOSKI

1. Stan dysglikemii predysponuje kobiety do istotnych pozytywnych związków pomiędzy całkowitym stężeniem BCAAs a poziomem wapnia i HbA1c niezależnie od wskaźnika BMI i wieku. Wykazano również słabsze lecz istotne statystycznie związki pomiędzy stężeniem BCAAs a parametrami lipidowymi, tj. stężenie HDL-C i hipertriglicydemia.
2. Ukazane zależności mogą potencjalnie odzwierciedlać mechanizmy zależne od stężenia wapnia łączące BCAAs z zaburzeniami metabolicznymi.
3. Wzrost stężenia Trp i Kyna wraz z towarzyszącym wzrostem wartości wskaźnika Kyna/3HKyn związany jest z występowaniem cukrzycy typu 2 u otyłych kobiet w średnim wieku.
4. Różne wzorce korelacji między kinureninami a czynnikami metabolicznymi u otyłych kobiet w grupie NG i T2D znajdują odzwierciedlenie przede wszystkim w silniejszym związku między BMI i metabolitami KP u kobiet z normoglikemią.
4. Przedstawione wyniki z prac oryginalnych i pogładowych wskazują na istotny udział aminokwasów rozgałęzionych i aromatycznych oraz ich metabolitów w zaburzeniach kardiometabolicznych u kobiet w średnim wieku.

11 IMPLIKACJE PRAKTYCZNE

Wyniki wskazujące na związek pomiędzy stężeniami wybranych aminokwasów i ich metabolitów z czynnikami ryzyka kardiometabolicznego mogą mieć znaczenie w aspekcie terapeutycznym i diagnostycznym. Modyfikacja szlaku kinureninowego może być potencjalnym celem terapeutycznym cukrzycy typu 2 u otyłych kobiet. Ponadto oznaczenia stężenia tryptofanu, metabolitów szlaku KP oraz aminokwasów rozgałęzionych BCAA mogą służyć jako potencjalne narzędzie diagnostyczne, prognostyczne lub rokownicze zaburzeń kardiometabolicznych, w tym cukrzycy typu 2 u kobiet w średnim wieku.

12 PIŚMIENICTWO

1. Bender D.A., Effects of a dietary excess of leucine on the metabolism of tryptophan in the rat: a mechanism for the pellagrigenic action of leucine, *Br J Nutr.* 1983, 50 (1), 25–32.
2. Badawy A.A.B., Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects, *Int J Tryptophan Res.* 2017, 10, 1–20.
3. Okuda S., Nishiyama N., Saito H., Katsuki H., 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity, *J. Neurochem.* 1998, 70 (1), 299–307.
4. Sadok I., Jędruchniewicz K., Rawicz-Pruszyński K., Staniszevska M., UHPLC-ESI-MS/MS Quantification of Relevant Substrates and Metabolites of the Kynurenine Pathway Present in Serum and Peritoneal Fluid from Gastric Cancer Patients—Method Development and Validation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22 (13), 6972.
5. Badawy A.A.B., Dougherty D.M., Assessment of the Human Kynurenine Pathway: Comparisons and Clinical Implications of Ethnic and Gender Differences in Plasma Tryptophan, Kynurenine Metabolites, and Enzyme Expressions at Baseline and after Acute Tryptophan Loading and Depletion, *Int. J. Tryptophan Res.* 2016, 9, 31–49.
6. Berge R.K., Cacabelos D., Señarís R., Nordrehaug J.E., Nygård O., Skorve J., Bjørndal B., Hepatic steatosis induced in C57BL/6 mice by a non- β oxidizable fatty acid analogue is associated with reduced plasma kynurenine metabolites and a modified hepatic NAD⁺/NADH ratio. *Lipids Health Dis.* 2020, 19 (1), 94.
7. Cheng Y., Li Y., Benkowitz P., Lamina C., Köttgen A., Sekula P., The relationship between blood metabolites of the tryptophan pathway and kidney function: a bidirectional Mendelian randomization analysis, *Sci Rep.* 2020, 10 (1), 12675.
8. Gęca K., Rawicz-Pruszyński K., Mlak R., Sadok I., Polkowski W.P., Staniszevska M., Kynurenine and Anthranilic Acid in the Peritoneum Correlate With the Stage of Gastric Cancer Disease, *Int J Tryptophan Res.* 2022, 15, 11786469211065620.
9. Rebnord E.W., Strand E., Midttun Ø., Svingen G.F.T., Christensen M.H.E., Ueland P.M., Mellgren G., Njølstad P.R., Tell G.S., Nygård O.K., Pedersen E.R., The kynurenine: tryptophan ratio as a predictor of incident type 2 diabetes mellitus in individuals with coronary artery disease, *Diabetologia.* 2017, 60 (9), 1712–1721.

10. Sulo G., Vollset S.E., Nygård O., Midttun Ø., Ueland P.M., Eussen S.J., Pedersen E.R., Tell G.S. Neopterin and kynurenine- tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study, *Int J Cardiol.* 2013, 168 (2), 1435–1440.
11. Lynch C.J., Adams S.H., Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2014, 10 (12), 723–736.
12. White P.J., Lapworth A.L., An J., Wang L., McGarrah R.W., Stevens R.D., Ilkayeva O., George T., Muehlbauer M.J., Bain J.R., Trimmer J.K., Brosnan M.J., Rolph T.P., Newgard C.B., Branched-chain amino acid restriction in Zucker-fatty rats improves muscle insulin sensitivity by enhancing efficiency of fatty acid oxidation and acyl-glycine export. *Mol Metab.* 2016, 5 (7), 538–551.
13. Newgard C.B., An J., Bain J.R., Muehlbauer M.J., Stevens R.D., Lien L.F., Haqq A.M., Shah S.H., Arlotto M., Slentz C.A., Rochon J., Gallup D., Ilkayeva O., Wenner B.R., Yancy W.S. Jr., Eisenson H., Musante G., Surwit R.S., Millington D.S., Butler M.D., Svetkey L.P., A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance, *Cell Metab.* 2009, 9 (4), 311–326.
14. Wang T.J., Larson M., Vasan R.S., Cheng S., Rhee E.P., McCabe E., Lewis G.D., Fox C.S., Jacques P.F., Fernandez C., O'Donnell C.J., Carr S.A., Mootha V.K., Florez J.C., Souza A., Melander O., Clish C.B., Gerszten R.E., Metabolite profiles and the risk of developing diabetes, *Nat Med.* 2011, 17 (4), 448–453.
15. Mears D., Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca(2⁺)channels, *J Membr Biol.* 2004, 200 (2), 57–66.
16. Conigrave A.D., Franks A.H., Brown E.M., Quinn S.J., L-amino acid sensing by the calcium-sensing receptor: A general mechanism for coupling protein and calcium metabolism?, *Eur J Clin Nutr.* 2002, 56 (11), 1072–1080.
17. Reid I.R., Gamble G.D., Bolland M.J., Circulating calcium concentrations, vascular disease and mortality: a systematic review, *J Intern Med.* 2016, 279 (6), 524–540.
18. Gerdtts E., Regitz-Zagrosek V., Sex differences in cardiometabolic disorders, *Nat Med.* 2019, 25 (11), 1657–1666.
19. Grundy S.M., Brewer H.B. Jr., Cleeman J.I., Smith S.C. Jr., Lenfant C., Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition, *Circulation.* 2004, 109 (3), 433–438.

20. Regitz-Zagrosek V., Lehmkuhl E., Weickert M.O., Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease, *Clin Res Cardiol.* 2006, 95 (3), 136–147.
21. Haq S., Grondin J.A., Khan W.I., Tryptophan-derived serotonin-kynurenine balance in immune activation and intestinal inflammation, *FASEB J.* 2021, 35 (10):e21888.
22. Kanova M., Kohout P., Tryptophan: A Unique Role in the Critically Ill, *Int J Mol Sci.* 2021, 22 (21), 11714.
23. Barceló A., Morell-Garcia D., Salord N., Esquinas C., Pérez G., Pérez A., Monasterio C., Gasa M., Fortuna A.M., Montserrat J.M., Mayos M., A randomized controlled trial: Branched-chain amino acid levels and glucose metabolism in patients with obesity and sleep apnea, *J Sleep Res.* 2017, 26 (6), 773–781.
24. Tremblay F., Lavigne C., Jacques H., Marette A., Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance, *Annu Rev Nutr.* 2007, 27, 293–310.
25. Pan A., Sun Q., Bernstein A.M., Schulze M.B., Manson J.E., Willett W.C., Hu F.B., Red meat consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis, *Am J Clin Nutr.* 2011, 94 (4), 1088–1096.
26. Bendinelli B., Palli D., Masala G., Sharp S.J., Schulze M.B., Guevara M., van der A.D., Sera F., Amiano P., Balkau B., Barricarte A., Boeing H., Crowe F.L., Dahm C.C., Dalmeijer G., de Lauzon-Guillain B., Egeberg R., Fagherazzi G., Franks P.W., Krogh V., Huerta J.M., Jakszyn P., Khaw K.T., Li K., Mattiello A., Nilsson P.M., Overvad K., Ricceri F., Rolandsson O., Sánchez M.J., Slimani N., Sluijs I., Spijkerman A.M., Teucher B., Tjonneland A., Tumino R., van den Berg S.W., Forouhi N.G., Langeberg C., Feskens E.J., Riboli E., Wareham N.J., Association between dietary meat consumption and incident type 2 diabetes: The EPIC-InterAct study, *Diabetologia.* 2013, 56 (1), 47–59.
27. Flores-Guerrero J.L., Osté M.C.J., Kieneker L.M., Gruppen E.G., Wolak-Dinsmore J., Otvos J.D., Connelly M.A., Bakker S.J.L., Dullaart R.P.F., Plasma Branched-Chain Amino Acids and Risk of Incident Type 2 Diabetes: Results from the PREVEND Prospective Cohort Study, *J Clin Med.* 2018, 7 (12), 513.
28. Würtz P., Soininen P., Kangas A., Rönnemaa T., Lehtimäki T., Kähönen M., Viikari J.S., Raitakari O.T., Ala-Korpela M., Branched-chain and aromatic amino acids are predictors of insulin resistance in young adults, *Diabetes Care.* 2012, 36 (3), 648–655.

29. Pedersen E.R., Tuseth N., Eussen S.J., Ueland P.M., Strand E., Svingen G.F., Midttun Ø., Meyer K., Mellgren G., Ulvik A., Nordrehaug J.E., Nilsen D.W., Nygård O., Associations of plasma kynurenines with risk of acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015, 35 (2), 455–462.
30. De Bie J., Guest J., Guillemin G.J., Grant R. Central kynurenine pathway shift with age in women, *J Neurochem.* 2016, 136 (6), 995–1003.
31. Shah S.H., Crosslin D.R., Haynes C.S., Nelson S., Turer C.B., Stevens R.D., Muehlbauer M.J., Wenner B.R., Bain J.R., Laferrère B., Gorroochurn P., Teixeira J., Brantley P.J., Stevens V.J., Hollis J.F., Appel L.J., Lien L.F., Batch B., Newgard C.B., Svetkey L.P., Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss, *Diabetologia.* 2012, 55 (2), 321–330.
32. Huffman K.M., Shah S.H., Stevens R.D., Bain J.R., Muehlbauer M., Slentz C.A., Tanner C.J., Kuchibhatla M., Houmard J.A., Newgard C.B., Kraus W.E., Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women, *Diabetes Care.* 2009, 32 (9), 1678–1683.
33. Wolak-Dinsmore J., Gruppen E.G., Shalurova I., Matyus S.P., Grant R.P., Gegen R., Bakker S.J., Otvos J.D., Connelly M.A., Dullaart R.P.F., A novel NMR-based assay to measure circulating concentrations of branched-chain amino acids: Elevation in subjects with type 2 diabetes mellitus and association with carotid intima media thickness, *Clin Biochem.* 2018, 54, 92–99.
34. Batch B.C., Shah S.H., Newgard C.B., Turer C.B., Haynes C., Bain J.R., Muehlbauer M., Patel M.J., Stevens R.D., Appel L.J., Newby L.K., Svetkey L.P., Branched chain amino acids are novel biomarkers for discrimination of metabolic wellness, *Metabolism.* 2013, 62 (7), 961–969.
35. Wiklund P., Zhang X., Pekkala S., Autio R., Kong L., Yang Y., Keinänen-Kiukaanniemi S., Alen M., Cheng S., Insulin resistance is associated with altered amino acid metabolism and adipose tissue dysfunction in normoglycemic women, *Sci Rep.* 2016, 6, 24540.
36. Fiehn O., Garvey W.T., Newman J., Lok K.H., Hoppel C.L., Adams S., Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women, *PLoS One.* 2010, 5 (12), e15234.

37. Yang P., Hu W., Fu Z., Sun L., Zhou Y., Gong Y., Yang T., Zhou H., The positive association of branched-chain amino acids and metabolic dyslipidemia in Chinese Han population, *Lipids Health Dis.* 2016, 15, 120.
38. Mook-Kanamori D.O., Römisch-Margl W., Kastenmüller G., Prehn C., Petersen A.K., Illig T., Gieger C., Wang-Sattler R., Meisinger C., Peters A., Adamski J., Suhre K., Increased amino acids levels and the risk of developing of hypertriglyceridemia in a 7-year follow-up, *J Endocrinol Investig.* 2014, 37 (4), 369–374.
39. Yamakado M., Nagao K., Imaizumi A., Tani M., Toda A., Tanaka T., Jinzu H., Miyano H., Yamamoto H., Daimon T., Horimoto K., Ishizaka Y., Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population, *Sci Rep.* 2015, 5, 11918.
40. Donnelly K.L., Smith C.I., Schwarzenberg S.J., Jessurun J., Boldt M.D., Parks E.J., Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *J Clin Investig.* 2005, 115 (5), 1343–1351.
41. Berg E.H.V.D., Flores-Guerrero J.L., Gruppen E.G., De Borst M.H., Wolak-Dinsmore J., Connelly M.A., Bakker S.J.L., Dullaart R.P.F., Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident type 2 diabetes: Role of circulating branched-chain amino acids, *Nutrients.* 2019, 11 (3), 705.
42. Gaggini M., Carli F., Bugianesi E., Gastaldelli A., Rosso C., Buzzigoli E., Marietti M., Della Latta V., Ciociaro D., Abate M.L., Gambino R., Cassader M., Bugianesi E., Gastaldelli A., Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance, *Hepatology.* 2018, 67 (1), 145–158.
43. Sunny N.E., Kalavalapalli S., Bril F., Garrett T.J., Nautiyal M., Mathew J.T., Williams C.M., Cusi K. Cross-talk between branched-chain amino acids and hepatic mitochondria is compromised in nonalcoholic fatty liver disease, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015, 309 (4), E311–E319.
44. Hamaya R., Mora S., Lawler P.R., Cook N.R., Ridker P.M., Buring J.E., Lee I.-M., Manson J.E., Tobias D.K. Association of plasma branched-chain amino acid with biomarkers of inflammation and lipid metabolism in women, *Circ Genom Precis Med.* 2021, 14 (4), e003330.

45. Sun L., Hu C., Yang R., Lv Y., Yuan H., Liang Q., He B., Pang G., Jiang M., Dong J., Yang Z., Association of circulating branched-chain amino acids with cardiometabolic traits differs between adults and the oldest-old, *Oncotarget*. 2017, 8 (51), 88882–88893.
46. Laplante M., Sabatini D.M., mTOR signaling in growth control and disease, *Cell*. 2012, 149 (2), 274–293.
47. Sengupta S., Peterson T.R., Sabatini D.M., Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress, *Mol Cell*. 2010, 40 (2), 310–322.
48. Saha A.K., Xu J., Lawson E., Deoliveira R., Brandon A.E., Kraegen E.W., Ruderman N. Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle, *Diabetes*. 2010, 59 (10), 2426–2434.
49. Zhenyukh O., Civantos E., Ruiz-Ortega M., Sánchez M.S., Vázquez C., Peiró C., Egado J., Mas S., High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation, *Free Radic Biol Med*. 2017, 104, 165–177.
50. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Mel’Nikova T.I., Porozov Y.B., Terentiev A.A., Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases, *Oxid Med Cell Longev*. 2019, 2019, 1–14.
51. Zhu J., Xun P., Bae J.C., Kim J.H., Kim D.J., Yang K., He K., Circulating calcium levels and the risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis, *Br J Nutr*. 2019, 122 (4), 376–387.
52. Becerra-Tomás N., Estruch R., Bulló M., Casas R., Díaz-López A., Basora J., Fitó M., Serra-Majem L., Salas-Salvadó J., Increased serum calcium levels and risk of type 2 diabetes in individuals at high cardiovascular risk, *Diabetes Care*. 2014, 37 (11), 3084–3091.
53. Hagström E., Hellman P., Lundgren E., Lind L., Ärnlov J., Serum calcium is independently associated with insulin sensitivity measured with euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp in a community-based cohort, *Diabetologia*. 2006, 50 (2), 317–324.
54. Najeeb Q., Aziz R., Hamid S., To evaluate the levels of glycated hemoglobin, serum calcium, magnesium, phosphate, uric acid and microalbuminuria in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus, *Int J Res Med Sci*. 2014, 2 (4), 1462-1465.
55. Kanchana N., Saikumar P., Serum Calcium Levels In Type 2 Diabetes Mellitus, *IOSR-JDMS* 2014, 13 (8), 1-3.

56. Akter S., Eguchi M., Kochi T., Kabe I., Nanri A., Mizoue T., Association of Serum Calcium and Phosphate Concentrations with Glucose Metabolism Markers: The Furukawa Nutrition and Health Study, *Nutrients*. 2020, 12 (8), 2344.
57. Hassan S.A.E., Elsheikh W.A.R., Rahman N.I.A., Elbagir N.M., Serum Calcium Levels in Correlation with Glycated Hemoglobin in Type 2 Diabetic Sudanese Patients, *Adv. Diabetes Metab.* 2016, 4 (4), 59–64.
58. Marshnil R.W., Mythili C., Correlation of serum calcium levels with glycated hemoglobin in type 2 diabetes mellitus patient-a comparative study, *IJSR*. 2018, 7 (8), 4–6.
59. Gray E., Muller D., Squires P., Asare-Anane H., Huang G.-C., Amiel S., Persaud S., Jones P.M., Activation of the extracellular calcium-sensing receptor initiates insulin secretion from human islets of Langerhans: involvement of protein kinases, *J Endocrinol.* 2006, 190 (3), 703–710.
60. Henquin J.C., Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000, 49 (11), 1751–1760.
61. Curry D.L., Bennett L.L., Grodsky G.M., Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas, *Am J Physiol.* 1968, 214 (1), 174–178.
62. Mercan F., Lee H., Kolli S., Bennett A.M., Novel role for SHP-2 in nutrient-responsive control of s6 kinase 1 signaling, *Mol Cell Biol.* 2012, 33 (2), 293–306.
63. Yang J., Wong R.K., Park M., Wu J., Cook J.R., York D.A., Deng S., Markmann J., Naji A., Wolf B.A., Gao Z., Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic β -cells, *Diabetes*. 2006, 55 (1), 193–201.
64. Halama A., Horsch M., Kastenmüller G., Möller G., Kumar P., Prehn C., Laumen H., Hauner H., Hrabě de Angelis M., Beckers J., Suhre K., Adamski J., Metabolic switch during adipogenesis: From branched chain amino acid catabolism to lipid synthesis, *Arch Biochem Biophys.* 2016, 589, 93–107.
65. Ortiz J.A., Gil-Gómez G., Casaroli-Marano R.P., Vilaró S., Hegardt F.G., Haro D., Transfection of the ketogenic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase cDNA into Mev-1 cells corrects their auxotrophy for mevalonate, *J Biol Chem.* 1994, 269 (46), 28523–28526.
66. Bakan I., Laplante M., Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation, *Curr Opin Lipidol.* 2012, 23 (3), 226–234.

67. Han J., Wang Y., mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism, *Protein Cell*. 2018, 9 (2), 145–151.
68. Favennec M., Hennart B., Caiazza R., Leloire A., Yengo L., Verbanck M., Arredouani A., Marre M., Pigeyre M., Bessede A., Guillemin G.J., Chinetti G., Staels B., Pattou F., Balkau B., Allorge D., Froguel P., Poulain-Godefroy O., The kynurenine pathway is activated in human obesity and shifted toward kynurenine monooxygenase activation, *Obesity (Silver Spring)*. 2015, 23 (10), 2066–2074.
69. Matsuoka K., Kato K., Takao T., Ogawa M., Ishii Y., Shimizu F., Masuda J., Takada A., Concentrations of various tryptophan metabolites are higher in patients with diabetes mellitus than in healthy aged male adults, *Diabetol Int*. 2016, 8 (1), 69–75.
70. Oxenkrug G.F., Increased Plasma Levels of Xanthurenic and Kynurenic Acids in Type 2 Diabetes, *Mol Neurobiol*. 2015, 52 (2), 805–810.
71. Munipally P.K., Agraharm S.G., Valavala V.K., Gundae S., Turlapati N.R., Evaluation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients, *Arch Physiol Biochem*. 2011, 117 (5), 254–258.
72. Chen T., Zheng X., Ma X., Bao Y., Ni Y., Hu C., Rajani C., Huang F., Zhao A., Jia W., Tryptophan Predicts the Risk for Future Type 2 Diabetes, *PLoS One*. 2016, 11 (6), e0162192.
73. Yu E., Papandreou C., Ruiz-Canela M., Guasch-Ferre M., Clish C.B., Dennis C., Liang L., Corella D., Fitó M., Razquin C., Lapetra J., Estruch R., Ros E., Cofán M., Arós F., Toledo E., Serra-Majem L., Sorlí J.V., Hu F.B., Martinez-Gonzalez M.A., Salas-Salvado J., Association of Tryptophan Metabolites with Incident Type 2 Diabetes in the PREDIMED Trial: A Case-Cohort Study, *Clin Chem*. 2018, 64 (8), 1211–1220.
74. Mangge H., Summers K.L., Meinitzer A., Zelzer S., Almer G., Prassl R., Schnedl W.J., Reininghaus E., Paulmichl K., Weghuber D., Fuchs D., Obesity-related dysregulation of the tryptophan-kynurenine metabolism: Role of age and parameters of the metabolic syndrome, *Obesity (Silver Spring)*. 2014, 22 (1), 195–201.
75. Boulet M.M., Chevrier G., Grenier-Larouche T., Pelletier M., Nadeau M., Scarpa J., Prehn C., Marette A., Adamski J., Tchernof A., Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015, 309 (8), E736–E746.

76. Wolowczuk I., Hennart B., Leloire A., Bessede A., Soichot M., Taront S., Caiazzo R., Raverdy V., Pigeyre M., ABOS Consortium, Guillemin G.J., Allorge D., Pattou F., Froguel P., Poulain-Godefroy O., Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: An attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012, 303 (2), R135–R143.
77. Liu J.J., Raynal S., Bailbe D., Gausseres B., Carbonne C., Autier V., Movassat J., Kergoat M., Portha B., Expression of the kynurenine pathway enzymes in the pancreatic islet cells. Activation by cytokines and glucolipotoxicity, *Biochim Biophys Acta.* 2015, 1852 (5), 980–991.
78. Fears R., Murrell E.A., Tryptophan and the control of triglyceride and carbohydrate metabolism in the rat, *Br J Nutr.* 1980,43 (2), 349–356.
79. Marchetti P., Masiello P., Benzi L., Cecchetti P., Fierabracci V., Giannarelli R., Gregorio F., Brunetti P., Navalesi R., Effects of metformin therapy on plasma amino acid pattern in patients with maturity-onset diabetes, *Drugs Exp Clin Res.* 1989, 15 (11–12), 565–570.
80. Do M.T., Kim H.G., Tran T.T., Khanal T., Choi J.H., Chung Y.C., Jeong T.C., Jeong H.G., Metformin suppresses CYP1A1 and CYP1B1 expression in breast cancer cells by down-regulating aryl hydrocarbon receptor expression, *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014, 280 (1), 138–148.
81. Munn D.H., Mellor A.L., Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses, *Trends Immunol.* 2013, 34 (3), 137–143.
82. DiNatale B.C., Murray I.A., Schroeder J.C., Flaveny C.A., Lahoti T.S., Laurenzana E.M., Omiecinski C.J., Perdew G.H., Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling, *Toxicol Sci.* 2010, 115 (1), 89–97.
83. Klein C., Patte-Mensah C., Taleb O., Bourguignon J.J., Schmitt M., Bihel F., Maitre M., Mensah-Nyagan A.G., The neuroprotector kynurenic acid increases neuronal cell survival through neprilysin induction, *Neuropharmacology.* 2013, 70, 254–260.
84. Scholz O., Welters A., Lammert E., Role of NMDA Receptors in Pancreatic Islets, *NMDA Recept.* 2017, 30, 121–134.

85. Tobias D.K., Lawler P.R., Harada P.H., Demler O.V., Ridker P.M., Manson J.E., Cheng S., Mora S., Circulating branched-chain amino acids and incident cardiovascular disease in a prospective cohort of US women, *Circ Genom Precis Med.* 2018, 11 (4), 1–9.
86. Beckett P.R., Hardin D.S., Davis T.A., Nguyen H.V., Wray-Cahen D., Copeland K.C., Spectrophometric assay for measuring branched-chain amino acid concentrations: Application for measuring the sensitivity of protein metabolism to insulin, *Anal Biochem.* 1996, 240 (1), 48–53.

13 STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Zaburzenia kardiometaboliczne oraz choroby sercowo- naczyniowe (ang. *cardiovascular disease*, CVD) stanowią coraz większe wyzwanie zdrowotne na całym świecie ze względu na ich systematycznie zwiększającą się częstość występowania, zwłaszcza wśród kobiet. Z tego względu wciąż poszukuje się nowych biomarkerów, które umożliwiłyby szybszą i dokładniejszą identyfikację osób z grupy zwiększonego ryzyka zachorowania, a także umożliwiających monitorowanie indywidualnego ryzyka metabolicznego, jak również miałyby potencjalne znaczenie terapeutyczne.

Celem zasadniczym niniejszej pracy była ocena zależności pomiędzy stężeniem aminokwasów rozgałęzionych (BCAAs) i tryptofanu oraz wybranych metabolitów tryptofanu z uznanymi kardiometabolicznymi czynnikami ryzyka u kobiet z normoglikemią i dysglikemią, w tym z cukrzycą typu 2.

W skład niniejszej dysertacji wchodzi cztery opublikowane artykuły naukowe. Celem dwóch pierwszych publikacji, będących **pracami przeglądowymi**, była analiza i omówienie na podstawie aktualnej wiedzy znaczenia wybranych aminokwasów, w tym aminokwasów rozgałęzionych BCAAs i aromatycznych, m.in. tryptofanu, w zaburzeniach metabolicznych takich jak otyłość, insulinooporność i cukrzyca typu 2, prowadzących do rozwoju chorób sercowo- naczyniowych.

Celem pierwszej z prac oryginalnych było przedstawienie zależności między całkowitym stężeniem aminokwasów rozgałęzionych BCAAs w surowicy krwi a czynnikami ryzyka kardiometabolicznego w grupie 349 kobiet w wieku od 40 do 60 lat podzielonych na dwie podgrupy w zależności od statusu glikemicznego: grupę z normoglikemią (NG, n = 184) i grupę z dysglikemią (DG, n = 165). Oznaczono stężenie całkowitych BCAAs (suma L-leucyny, L-izoleucyny i L-waliny) oraz wapnia całkowitego (TCa). Obliczono wskaźnik stłuszczenia wątroby (FLI) oraz stężenie wapnia skorygowanego względem albuminy (CCa).

W obu **pracach oryginalnych** w próbkach krwi oznaczono również parametry biochemiczne takie jak: stężenie trójglicerydów (TG), cholesterolu HDL (HDL-C), kreatyniny, białka C-reaktywnego (CRP), aminotransferazy alaninowej (ALT), gamma-glutamylotransferazy (GGT), insuliny, hormonu tyreotropowego (TSH), glukozy, hemoglobiny glikowanej (HbA1c).

Obliczono wskaźnik HOMA-IR oraz eGFR. Zmierzono dwukrotnie skurczowe i rozkurczowe ciśnienie krwi oraz obliczono wskaźnik masy ciała BMI.

Wyniki analizy statystycznej wykazały, że stężenie całkowitych BCAAs w surowicy było istotnie wyższe w grupie kobiet z dysglikemią ($p < 0,0001$). Analiza regresji logistycznej adjustowana do wieku i BMI wykazała, że wzrost stężenia BCAAs o 10 $\mu\text{mol/L}$ istotnie zwiększał szansę wystąpienia stężenia powyżej 75-tego percentyla dla TCa, CCa i HbA1c oraz stężenia HDL-C poniżej 45 mg/dL grupie DG. Podobnych istotnych zależności nie zaobserwowano w grupie NG. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskowano, że stan dysglikemii predysponuje kobiety do istotnych związków pomiędzy całkowitym stężeniem BCAAs a poziomem wapnia, HbA1c i wybranymi parametrami lipidowymi niezależnie od wskaźnika BMI i wieku. Ukazane zależności mogą odzwierciedlać potencjalne mechanizmy łączące BCAA z zaburzeniami metabolicznymi, zależne od stężenia wapnia.

Celem drugiej **pracy oryginalnej** była ocena związku tryptofanu i jego metabolitów z szlaku kinureninowego (KP) z występowaniem cukrzycy typu 2 i kardiometabolicznych czynników ryzyka w grupie 128 otyłych kobiet w wieku od 41 do 60 lat podzielonych na dwie grupy: grupę z normoglikemią (NG, $n = 65$) i grupę z cukrzycą typu 2 (T2D, $n = 63$). W surowicy oznaczono stężenia tryptofanu (Trp), kinureniny (Kyn), 3-hydroksykinureniny (3-HKyn), kwasu kinureninowego (Kyna) i kwasu chinolinowego (QA). Obliczono stosunki: Kyn/Trp (KTR), Kyna/Kyn (KAT), 3HKyn/Kyn (KMO), Kyna/3HKyn oraz Kyna/QA. W grupie otyłych kobiet z współistniejącą cukrzycą typu 2 odnotowano znacznie wyższe wartości Trp, Kyna, Kyna/QA i Kyna/3HKyn w porównaniu z grupą kobiet otyłych z normoglikemią. Analiza regresji logistycznej wykazała, że stężenia Trp i Kyna oraz wartości stosunku Kyna/3HKyn były najsilniej związane z występowaniem T2D, nawet po uwzględnieniu czynników zakłócających. Model regresji z Trp i stosunkiem Kyna/3HKyn jako zmiennymi niezależnymi tłumaczył 20% zmienności dla występowania T2D. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskowano, że wzrost stężenia Trp i Kyna wraz z towarzyszącym wzrostem wartości wskaźnika Kyna/3HKyn związany jest z występowaniem cukrzycy typu 2 u otyłych kobiet w średnim wieku.

Przedstawione wyniki z prac oryginalnych i poglądowych wskazują na istotny udział aminokwasów rozgałęzionych i aromatycznych oraz ich metabolitów w zaburzeniach

kardiometabolicznych u kobiet w średnim wieku, co może mieć znaczenie w aspekcie terapeutycznym i diagnostycznym.

14 STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM/ SUMMARY

Cardiometabolic disorders and cardiovascular disease (CVD) are an increasing health challenge worldwide due to their steadily increasing prevalence, especially among women. For this reason, new biomarkers are still being searched for, which would facilitate faster and more accurate identification of people at increased risk of developing the disease, make it possible to monitor the level of individual metabolic risk, and which may be of potential therapeutic importance.

The main aim of this study was to assess the relationship between the concentration of branched-chain amino acids (BCAAs), tryptophan, selected tryptophan metabolites, and recognized cardiometabolic risk factors among women with normoglycemia and dysglycemia, including type 2 diabetes.

This dissertation consists of four scientific papers. The purpose of the first two papers (available as review articles), was to analyze and discuss, based on current knowledge, the role of selected amino acids, including branched-chain and aromatic amino acids, e.g. tryptophan, in metabolic disorders such as obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes, leading to the development of cardiovascular diseases.

The aim of the first of the two original papers was to present the relationship between the total concentration of branched-chain amino acids (BCAA) in the blood serum and cardiometabolic risk factors in a group of 349 women aged 40 to 60 divided into two subgroups depending on the glycemic status: the group with normoglycemia (NG, n = 184) and the dysglycemic group (DG, n = 165). The concentration of total BCAAs (sum of L-leucine, L-isoleucine and L-valine) and total calcium (TCa) was determined. Fatty Liver Index (FLI) and albumin-corrected calcium (CCa) were calculated.

In both original papers, biochemical parameters such as triglycerides (TG), HDL cholesterol (HDL-C), creatinine, C-reactive protein (CRP), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), insulin, thyroid stimulating hormone (TSH), glucose, glycated hemoglobin (HbA1c) were also determined in blood samples. HOMA-IR and eGFR were calculated. The systolic and diastolic blood pressures were measured twice and the body mass index (BMI) was calculated.

It was observed that serum total BCAA concentrations were significantly higher in the group of women with dysglycaemia ($p < 0.0001$). Logistic regression analysis, adjusted for age and BMI showed that an increase in BCAA concentrations by 10 $\mu\text{mol/L}$ significantly increased the chance of occurrence of concentrations above the 75th percentile for TCa, CCa and HbA1c, and HDL-C concentrations below 45 mg/dL in the DG group. Similar significant relationships were not observed in the NG group. Based on the obtained results, it was concluded that the state of dysglycemia predisposes women to significant relationships between the total concentrations of BCAA and the level of calcium, HbA1c and selected lipid parameters, regardless of BMI and age. The relationships shown may reflect the potential mechanisms linking BCAAs with metabolic disorders, depending on the concentration of calcium.

The aim of the second original paper was to assess the relationship between tryptophan and its metabolites from the kynurenine pathway (KP), and the occurrence of type 2 diabetes and cardiometabolic risk factors in a group of 128 obese women aged 41 to 60 divided into two groups: a group with normoglycemia (NG, $n = 65$) and the group with type 2 diabetes (T2D, $n = 63$). Tryptophan (Trp), kynurenine (Kyn), 3-hydroxykynurenine (3-HKyn), kynurenic acid (Kyna) and quinolinic acid (QA) concentrations were determined in the serum. Following ratios were calculated: Kyn/Trp (KTR), Kyna/Kyn (KAT), 3HKyn/Kyn (KMO), Kyna/3HKyn and Kyna/QA. Significantly higher values of Trp, Kyna, Kyna/QA and Kyna/3HKyn were observed in the group of obese women with concomitant type 2 diabetes, compared to the group of obese women with normoglycaemia. Logistic regression analysis showed that Trp and Kyna concentrations and Kyna/3HKyn ratio values were mainly related to the occurrence of T2D, even after adjusting for confounding factors. The regression model with Trp and Kyna/3HKyn ratio as independent variables explained 20% of the variance of T2D incidence. Based on the obtained results, it was concluded that the increase in Trp and Kyna concentrations, along with the accompanying increase in the value of the Kyna/3HKyn index, is associated with the occurrence of type 2 diabetes among middle-aged obese women.

The presented results from both original and review papers indicate the significant role of branched and aromatic amino acids and their metabolites in cardiometabolic disorders among middle-aged women, which may be of therapeutic and diagnostic importance.

15 KSEROKOPIE PUBLIKACJI WCHODZĄCE W CYKL ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

15.1 KOPIA PUBLIKACJI NR.1

Justyna Kubacka¹, Anna Stefańska²

Znaczenie aminokwasów rozgałęzionych (BCAA) w insulinooporności i cukrzycy typu 2

1. Wstęp

Aminokwasy rozgałęzione (BCAA – *branched-chain amino acid*) to aminokwasy posiadające w swojej strukturze rozgałęziony boczny łańcuch alifatyczny. Należą do nich: leucyna, izoleucyna i walina, które nie tylko są składnikami białek, ale też regulują wiele procesów fizjologicznych w organizmie człowieka. Poza dobrze znaną rolą BCAA w metabolizmie białek mięśniowych, w ciągu ostatniej dekady obserwuje się wzrost zainteresowania rolą BCAA także w insulinooporności i cukrzycy.

2. Cel pracy i metody

Celem pracy jest przybliżenie aktualnego stanu wiedzy na temat znaczenia aminokwasów rozgałęzionych BCAA w rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2, które stanowią powszechny problem zdrowotny zarówno w Polsce jak i na świecie. Podejmowany temat jest ważny przez wzgląd na obserwowany wzrost zachorowalności na cukrzycę typu 2 oraz trudności we wczesnej identyfikacji czynników przyczyniających się do rozwoju insulinooporności.

W niniejszej pracy dokonano przeglądu i analizy aktualnej literatury naukowej na temat roli leucyny, izoleucyny i waliny w rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2.

3. Aminokwasy rozgałęzione (BCAA – *branched amino acid*)

Aminokwasy rozgałęzione w organizmie ludzkim występują głównie w tkance mięśniowej, stanowiąc 14 – 18% wszystkich aminokwasów budujących białka tej tkanki. BCAA należą do grupy aminokwasów egzogennych, co oznacza, że organizm ludzki nie potrafi ich syntetyzować, powszechnie uznaje się więc, że muszą być dostarczane wraz z pożywieniem [2]. Niemniej nowe doniesienia sugerują, że niewielkie ilości tych aminokwasów mogą być także syntetyzowane przez mikrobiom jelit [1]. Całkowita koncentracja aminokwasów rozgałęzionych w krwiobiegu wynosi 0,3–0,4 mM/dl i w porównaniu z innymi aminokwasami jest relatywnie wysoka. Zapotrzebowanie dorosłego człowieka na leucynę kształtuje się na poziomie 40 mg/ kg masy ciała/ dobę, na walinę 17–25 mg/kg masy ciała, na izoleucynę około 19 mg/ kg masy ciała/ dobę. BCAA obecne są w surowcach i produktach spożywczych zawierających białko [2] stanowiąc średnio od 2 do 5% energetyczności diety [1]. Niedobory tych aminokwasów odnotowuje się niezwykle rzadko. Dotyczą one osób nie spożywających wystarczającej ilości białek pokarmowych przez dłuższy czas oraz przewlekle chorujących, zwłaszcza osób dotkniętych chorobami nerek i wątroby. Przewlekle niedobory aminokwasów rozgałęzionych w diecie prowadzić mogą do katabolizmu białek mięśniowych, zahamowania wzrostu oraz odbudowy tkanek [2]. W ostatniej dekadzie pojawia się coraz więcej dowodów naukowych sugerujących, że oporność na insulinę i cukrzyca typu 2 są

¹ justynakubacka@wp.pl, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, www.cm.umk.pl

² diag.ka@wp.pl, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, www.cm.umk.pl

również związane z rozregulowaniem metabolizmu aminokwasów rozgałęzionych (BCAA), co powoduje zwiększenie BCAA w krwiobiegu [3].

3.1. Znaczenie BCAA

Podstawową rolą BCAA jest udział w syntezie białek, a także neuroprzekazników. Ponadto BCAA, głównie leucyna, wykazują funkcje regulatorowe. Szczególną rolę pełnią BCAA w mięśniach szkieletowych, są bowiem nie tylko substratami do syntezy białek, ale również nasilają ich syntezę oraz hamują ich degradację. Zarówno nadmiar, jak i niedobór BCAA może prowadzić do zaburzenia funkcjonowania ustroju. Homeostaza BCAA jest regulowana na etapie ich katabolizmu, poprzez zmiany aktywności kluczowego enzymu, kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów (BCKD) [6].

Aminokwasy rozgałęzione są wykorzystywane bezpośrednio w mięśniach. Są niezbędne do budowania, oraz odbudowy białek mięśniowych stanowiąc około 25% puli tych białek [2]. Pomocne w zapobieganiu destrukcji tej tkanki podczas treningu, są substratem energetycznym dla mięśni w przypadku wyczerpania się glikogenu mięśniowego. Spożyte przed treningiem pomagają w zmniejszeniu zespołu opóźnionego bólu mięśniowego [4].

3.2. Metabolizm BCAA

BCAA pochodzące z diety lub uwalniane z rozpadu białek pojawiają się w krwiobiegu, gdzie następnie są transportowane do tkanek, w których mogą być utlenione lub włączone do nowo zsyntetyzowanego białka. W zdecydowanej większości BCAA są metabolizowane w mięśniach szkieletowych, a ich katabolizm obejmuje dwa ważne etapy. Pierwszy z nich stanowi odwracalna reakcja transaminacji przekształcająca BCAA w ketonokwasy o rozgałęzionym łańcuchu (BCKA). W tej reakcji ważną rolę odgrywa rozgałęziony enzym o nazwie aminotransferaza aminokwasowa (BCAT). Kolejny etap katabolizmu BCAA jest nieodwracalny i pośredniczy w nim mitochondrialny kompleks dehydrogenazy ketonowej o rozgałęzionym łańcuchu (BCKD). Ten etap enzymatyczny skutkuje oksydacją BCKA, prowadząc do produkcji NADH, CO₂ i innych produktów końcowych [23, 24]. Zmiany w BCAT i BCKD mogą mieć znaczący wpływ na katabolizm BCAA. Z powodu zmienionego metabolizmu tych aminokwasów niektóre potencjalnie toksyczne związki pośrednie w szlaku katabolicznym BCAA mogą się kumulować, co prowadzi do upośledzenia funkcji komórek, a nawet całych narządów [25].

Metabolizm BCAA jest znany jako istotny element patofizjologii wielu chorób wieloczynnikowych, takich jak zespół metaboliczny, nowotwory i choroby wątroby [23]. Liczne badania wykazały, że zwiększone stężenia krążących BCAA, prawdopodobnie związane z dysfunkcją BCKD, są związane także z otyłością i cukrzycą typu 2 u ludzi [18, 19].

4. Insulinooporność i cukrzyca typu 2

Insulina jest hormonem anabolicznym wydzielanym przez komórki beta wysp trzustkowych. Powoduje między innymi odkładanie glikogenu w wątrobie i mięśniach szkieletowych, zwiększa wychwyt aminokwasów przez tkanki i nasila syntezę białka. Zaburzenie transmisji sygnału komórkowego insuliny stanowi molekularne podłoże rozwoju insulinooporności (IR – *insulin resistance*), czyli stanu upośledzonej

odpowiedzi biologicznej tkanek na insulinę. W wyniku insulinooporności w różnych tkankach występują zaburzenia metaboliczne, stanowi ona też główny czynnik patogenetyczny cukrzycy typu 2 [27].

Cukrzyca (*diabetes mellitus*) definiowana jest jako grupa chorób metabolicznych charakteryzująca się hiperglikemią (podwyższonym poziomem glukozy we krwi) wynikającą z defektu produkcji lub działania insuliny. Przewlekła hiperglikemia wiąże się z uszkodzeniem, zaburzeniem czynności i niewydolnością różnych narządów, szczególnie oczu, nerek, nerwów, serca i naczyń krwionośnych [5].

Szacuje się, że na cukrzycę choruje w Polsce blisko 2,97 mln dorosłych osób, a liczba chorych z każdym rokiem wzrasta. Światowa Organizacja Zdrowia donosi, że na świecie liczba chorujących wzrosła ze 108 mln w 1980 r. do 422 mln osób w 2014 r. [4].

4.1. BCAA w insulinooporności i cukrzycy typu 2

Po raz pierwszy podwyższone stężenie leucyny, izoleucyny i waliny w osoczu pacjentów z zaburzeniami sygnalizacji insulinowej opisano w latach 70. [10]. Szereg opublikowanych badań potwierdziło tę zależność [11,12].

W ostatnich latach potwierdzono silny związek między podwyższonym poziomem BCAA w osoczu a opornością na insulinę zarówno w modelach ludzkich jak i zwierzęcych [7,8]. Mechanizm takiego oddziaływania nie został dotąd poznany. Sugeruje się, że krążące aminokwasy mogą bezpośrednio promować oporność na insulinę, prawdopodobnie przez zakłócenie sygnalizacji insuliny w mięśniach szkieletowych [13]. Obecnie uważa się, że zwiększone poziomy BCAA mogą stanowić potencjalny marker wczesnego wykrywania insulinooporności, a następnie ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 [14,21]. Wzrost tych aminokwasów w osoczu zaobserwowano na więcej niż 10 lat przed rozwinięciem cukrzycy [13]. Allam-Ndoul i wsp. dowiedli, że stężenia BCAA w osoczu mogą służyć jako lepszy marker IR niż poziom glukozy w osoczu [32].

Oprócz insulinooporności kluczową rolę w patogenezie cukrzycy typu 2 odgrywa także upośledzone wydzielanie insuliny. W tym kontekście należy zauważyć, że wiele aminokwasów, zwłaszcza aminokwasy o rozgałęzionym łańcuchu, są modulatorami wydzielania insuliny. W związku z tym, innym możliwym mechanizmem, dzięki któremu wzrost stężenia BCAA w krwiobiegu może promować rozwój cukrzycy, jest hiperinsulinemia prowadząca do wyczerpania komórek beta trzustki [13].

Możliwość identyfikacji osób znajdujących się w grupie ryzyka rozwoju cukrzycy w przyszłości jest szczególnie istotna ze względu na mnogość powikłań związanych z tym schorzeniem oraz istnienie skutecznych rozwiązań profilaktycznych. Mimo, że tradycyjne czynniki ryzyka takie jak wzrost BMI (*body mass index*), stężenia glukozy na czczo oraz czynniki genetyczne mogą dostarczyć kluczowych informacji na temat zwiększonego ryzyka rozwoju pełnoobjawowej cukrzycy, to jednak nie u wszystkich osób choroba ta się rozwinię. Zauważono, że ryzyko rozwoju cukrzycy związane z podwyższonym poziomem BCAA było porównywalne lub wyższe niż ryzyko związane z wyższym wiekiem, poziomem glukozy na czczo lub wskaźnikiem masy ciała BMI [13]. Co więcej, poziom BCAA w ustroju dodatnio koreluje z parametrami klinicznymi oporności na insulinę i homeostazy glukozy, takimi jak BMI, obwód talii, wskaźnik HOMA-IR, hemoglobina glikowana (HbA_{1c}) oraz stężenie glukozy we

krwi na czczo. Wyższe poziomy leucyny, izoleucyny i waliny w krwiobiegu zostały również powiązane z bezpośrednim wyższym ryzykiem kardiometabolicznym [30]. W badaniu z udziałem prawie 3000 ochotników populacji japońskiej wykazano silną dodatnią korelację między poziomem BCAA a ilością trzewnej tkanki tłuszczowej, HOMA-IR oraz poziomem insuliny na czczo [15]. W badaniu liczącym blisko sześćdziesiąt kobiet, Boulet i wsp. wykazali, że w porównaniu z waliną i izoleucyną, leucyna wykazała najwyższą korelację z HOMA-IR [22]. Nie bez znaczenia jest także płeć badanych. U otyłych mężczyzn częściej obserwowano wyższy poziom BCAA i silniejszy pozytywny związek z IR w porównaniu z kobietami.

4.1.1. Związek BCAA z tkanką tłuszczową

Istotną rolę w metabolizmie BCAA odgrywa również tkanka tłuszczowa, która będąc źródłem hormonów i cytokin prozapalnych została uznana za ważny element rozwoju insulinooporności indukowanej otyłością [16]. Zaburzenia metaboliczne związane z utlenianiem glukozy i kwasów tłuszczowych spowodowane poborem nadmiaru pokarmu lub otyłością prowadzą do dysfunkcji mitochondriów, wpływając na rozwój insulinooporności. Ograniczenie utleniania kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej wiąże się ze zwiększonym katabolizmem BCAA w mięśniach szkieletowych i gromadzeniem lipidowych związków pośrednich, takich jak acylokarnityny, które zakłócają działanie insuliny. Stąd poziomy acylokarnityn w surowicy lub osoczu także mogą być uznane za marker IR [31]. W badaniach obserwacyjnych przeprowadzonych z udziałem ludzi zaobserwowano ujemną korelację między poziomem hormonu tkanki tłuszczowej – adiponektyną, wykazującej między innymi działanie zwiększające insulinooporność tkanek, a poziomem BCAA w surowicy [17]. Pomimo zmienionego poziomu BCAA w krążeniu obwodowym, metabolizm BCAA także w tkance docelowej, takiej jak podskórna tkanka tłuszczowa (SAT) i trzewna tkanka tłuszczowa (VAT), wykazuje znaczące zmiany u pacjentów otyłych i opornych na insulinę [22]. U osób otyłych obserwuje się zwykle zwiększony poziom BCAA w krwiobiegu [17]. Z kolei utrata masy ciała u osób otyłych powoduje intensywny spadek poziomu leucyny, izoleucyny i waliny w krwiobiegu, a także poprawę odpowiedzi na insulinę [33].

4.1.2. Związek między suplementacją BCAA a insulinoopornością

Zastanawiające jest także czy suplementacja aminokwasami BCAA zaburzy dodatkowo metabolizm glukozy, niemniej wpływ wzorców żywieniowych na poziom leucyny, izoleucyny i waliny w ustroju również nie został w pełni poznany. Przez długi czas prezentowano korzystny wpływ suplementacji na regulację masy ciała, syntezę białek mięśniowych i homeostazę glukozy zarówno u ludzi jak i zwierząt, u których zastosowano suplementację BCAA lub dietę obfitującą w te aminokwasy [26]. W niektórych badaniach wykazano, że suplementacja BCAA wpływała korzystnie na profil metaboliczny badanych. Niemniej nadmierne spożycie BCAA wraz z dietą, podobnie jak wyższe poziomy BCAA w krwiobiegu, zostały powiązane z rozwojem insulinooporności [40]. Zwiększona podaż BCAA w diecie może nieznacznie wpływać na zwiększony poziom BCAA w ustroju, co najczęściej tłumaczy się właściwościami insulintropowymi aminokwasów lub zmniejszonym obciążeniem glikemicznym diet wysokobiałkowych. Porównując leucynę, izoleucynę i walinę, największą efektywność suplementacji obserwowaną jako wzrost stężenia w krwiobiegu

obserwuje się w przypadku leucyny [20]. Co ciekawe, wzbogacenie diety wyłącznie w leucynę (z pominięciem waliny i izoleucyny) powodowało poprawę wrażliwości insulinowej [26].

W badaniach przeprowadzonych na gryzoniach zauważono, że suplementacja BCAA u zwierząt karmionych dietą wysokotłuszczową wywołuje podobny stopień oporności na insulinę w porównaniu do zwierząt karmionych wyłącznie dietą wysokotłuszczową. Wydaje się prawdopodobne, że szkodliwe działanie BCAA wymaga obecności diety wysokotłuszczowej. Potwierdza to obserwacja, że karmienie gryzoni wysokotłuszczową dietą z BCAA powoduje także akumulację niecałkowicie utlenionych wspomnianych wcześniej metabolitów – acylokarnityn lipidowych, które mogą przyczyniać się do wzrostu oporności na insulinę w porównaniu ze zwierzętami karmionymi standardową dietą z BCAA [11].

Woo i wsp. badali dwanaście otyłych osób (w stanie przedcukrzycowym) w trakcie i po suplementacji aminokwasami BCAA w ilości 20g przez okres czterech tygodni. Suplementacja aminokwasów rozgałęzionych nie wpływała na metabolizm glukozy u osób otyłych w stanie przedcukrzycowym [9]. Z kolei badania epidemiologiczne dostarczają informacji, że wyższe spożycie BCAA wraz z dietą jest odwrotnie związane z ryzykiem otyłości [28, 29], zwłaszcza typu wisceralnego, a także ryzykiem kardiometabolicznym u mężczyzn w średnim wieku [8].

Związek między dietą, poziomem BCAA w ustroju i IR nie jest jednoznaczny i wymaga dalszych badań.

5. Podsumowanie

Do tej pory zdecydowana większość literatury naukowej koncentrowała się na analizie roli oraz suplementacji BCAA w kontekście metabolizmu i budowania masy mięśniowej. Tymczasem w ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na inny aspekt oddziaływania BCAA w ustroju – związek pomiędzy wzrostem poziomów tych aminokwasów a zaburzeniami metabolicznymi. Liczne badania z udziałem zarówno ludzi jak i zwierząt wykazały, że zwiększone stężenia aminokwasów rozgałęzionych (BCAA) zarówno w osoczu jak i w moczu są dodatnio związane z opornością na insulinę i mogą przewidywać rozwój pełnoobjawowej cukrzycy w przyszłości. Zaobserwowano, że zwiększone stężenie tych aminokwasów w ustroju może pojawić się nawet na kilkanaście lat przed rozwojem pełnoobjawowej cukrzycy typu 2. Jednak to, czy podwyższone poziomy BCAA w krwiobiegu są przyczyną, czy wtórną konsekwencją insulinooporności i cukrzycy typu 2, pozostaje niejasne. Stąd przypuszczenia, że BCAA być może będą mogły w przyszłości stanowić potencjalny marker przewidywania ryzyka rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2. W przyszłości konieczne wydaje się być prowadzenie dalszych prac naukowych pozwalających zgłębić znaczenie i wykorzystanie tych aminokwasów w przewidywaniu ryzyka pojawienia się zaburzeń metabolicznych i tym samym zastosowanie adekwatnej profilaktyki. Niniejsza praca stanowi próbę usystematyzowania aktualnego stanu wiedzy i podsumowania najnowszych dostępnych badań naukowych w tym zakresie tematycznym. Wydaje się być także uzasadnione, aby w przyszłych badaniach wyraźnie oddzielić działanie każdego z BCAA, ponieważ obecne dane wskazują, że nie wszystkie są w takim samym stopniu powiązane z kardiometabolicznymi czynnikami ryzyka.

Literatura:

1. Neinast M., Murashige D., Arany Z., *Branched Chain Amino Acids*, Annual Review of Physiology, 10, (2019), 139-164.
2. Harris R.A., Joshi M., Jeoung N.H., Obayashi M., *Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism*, Journal of Nutrition, 135, (2005), 1527–1530.
3. Yoon M.S., *The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism*. Nutrients, 8, (2016), 1-13.
4. NFZ o zdrowiu cukrzyca, Warszawa, 2019: https://zdrowedane.nfz.gov.pl/pluginfile.php/205/mod_resource/content/4/nfz_o_zdrowiu_cukrzyca.pdf, 10.05.2020.
5. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2019: https://journals.viamedica.pl/diabetologia_praktyczna/article/view/64158/48208, 10.05.2020.
6. Harris R.A., Joshi M., Jeoung N.H., Obayashi M., *Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism*, Journal of Nutrition, 135, (2005), 1527S-1530S.
7. Lynch C.J., Adams S.H., *Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance*, Nature Reviews, Endocrinology, 10, (2014), 723-736.
8. White P.J., Lapworth A.L., An J., Wang L., McGarrah R.W., Stevens R.D., Ilkayeva O., George T., Muehlbauer M.J., Bain J.R., Trimmer J.K., Brosnan M.J., Rolph T.P., Newgard C.B., *Branched-chain amino acid restriction in Zucker-fatty rats improves muscle insulin sensitivity by enhancing efficiency of fatty acid oxidation and acyl-glycine export*, Molecular Metabolism, 5, (2016), 538-551.
9. Woo S.L., Yang J., Hsu M., Yang A., Zhang L., Lee R.P., Gilbuena I., Thames G., Huang J., Rasmussen A., Carpenter C.L., Henning S.M., Heber D., Wang Y., Li Z., *Effects of branched-chain amino acids on glucose metabolism in obese, prediabetic men and women: a randomized, crossover study*, American Journal of Clinical Nutrition, 1, (2019), 1569-1577.
10. Felig P., Marliss E., Ohman J.L., Cahill C.F. Jr., *Plasma amino acid levels in diabetic ketoacidosis*, Diabetes, 19, (1970), 727–728.
11. Newgard C.B., An J., Bain J.R., Muehlbauer M.J., Stevens R.D., Lien L.F., Haqq A.M., Shah S.H., Arlotto M., Slentz C.A., Rochon J., Gallup D., Ilkayeva O., Wenner B.R., Yancy Jr W.S., Eisenson H., Musante G., Surwit R.S., Millington D.S., Butler M.D., Svetkey L.P., *A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance*, Cell Metabolism, 9, (2009), 311–326.
12. Yousri N.A., Mook-Kanamori D.O., Selim M.M., Takiddin A.H., Al.-Homsy A., Al.-Mahmoud K.A.S., Karoly E.D., Krumsiek J., Do K.T., Neumaier U., Mook – Kanamori M.J., Rowe J., Chidiac O.M., McKeon C., Al. Muftah W.A., Kader S.A., Kastenmüller G., Suhre K., *A systems view of type 2 diabetes-associated metabolic perturbations in saliva, blood and urine at different timescales of glycaemic control*, Diabetologia, 58, (2015), 1855–1867.
13. Wang T.J., Larson M.G., Vasan R.S., Heng S., Rhee E.P., McCabe E., Lewis G.D., Fox C.S., Jacques P.F., Fernandez C., O'Donnell C.J., Carr S.A., Mootha V.K., Florez J.C., Souza A., Melander O., Clish C.B., Gerszten R.E., *Metabolite profiles and the risk of developing diabetes*, Nature Medicine 17, (2011), 448–453.
14. Giesbertz P., Daniel H., *Branched-chain amino acids as biomarkers in diabetes*, Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 19, (2016), 48-54.
15. Yamakado M., Nagao K., Imaizumi A., Tani M., Toda A., Tanaka T., Jinzu H., Miyano H., Yamamoto H., Daimon T., Horimoto K., Ishizaka Y., *Plasma free amino acid profiles predict four-year risk of developing diabetes, metabolic syndrome, dyslipidemia, and hypertension in Japanese population*, Scientific Reports, 5, (2015), 1-12.
16. Cummins T.D., Holden C.R., Sansbury B.E., Gibb A.A., Shah J., Zafar N., Tang Y., Hellmann J., Rai S.N., Spite M., Bhatnagar A., Hill B.G., *Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity*, American Journal of Physiology. Endocrinology and

- Metabolism, 307, (2014), E262–E277
17. Nakamura H., Jinzu H., Nagao K., Noguchi Y., Shimba N., Miyano H., Watanabe T., Iseki K., *Plasma amino acid profiles are associated with insulin, C-peptide and adiponectin levels in type 2 diabetic patients*, Nutrition & Diabetes, 4, (2014), 1-8.
 18. Giesbertz P., Padberg I., Rein D., Ecker J., Höfle A.S., Spanier B., Daniel H., *Metabolite profiling in plasma and tissues of ob/ob and db/db mice identifies novel markers of obesity and type 2 diabetes*, Diabetologia, 58, (2015), 2133–2143.
 19. Lackey D.E., Lynch C.J., Olson K.C., Mostaedi R., Ali M., Smith W.H., Karpe F., Humphreys S., Bedinger D.H., Dunn T.N., Thomas A.P., Oort P.J., Kieffer D.A., Amin R., Bettaieb A., Haj F.G., Permana P., Anthony T.G., Adams S.H., *Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity*, American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 304, (2013), E1175–E1187.
 20. Okekunle A.P., Zhang M., Wang Z., Onwuka J.U., Wu X., Feng R., Li C., *Dietary branched-chain amino acids intake exhibited a different relationship with type 2 diabetes and obesity risk: a meta-analysis*, 56, (2019), Acta diabetologica, 1-9.
 21. Zhao X., Han Q., Liu Y., Sun C., Gang X., Wang G., *The Relationship between Branched-Chain Amino Acid Related Metabolomic Signature and Insulin Resistance: A Systematic Review*, Journal of diabetes research, (2016), 1-12.
 22. Boulet M. M., Chevrier G., Grenier-Larouche T., Pelletier M., Nadeau M., Scarpa J., Prehn C., Marette A., Adamski J., Thernof A., *Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk*, American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 309, (2016), E736–E746.
 23. Burrage L. C., Nagamani S.C.S., Campeau P. M., Lee B. H., *Branched-chain amino acid metabolism: from rare Mendelian diseases to more common disorders*, Human Molecular Genetics, 23, (2014), R1–R8.
 24. Lu J., Xie G., Jia W., Jia W., *Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids*. Frontiers of Medicine in China, 7, (2013), 53–59.
 25. She P., Van Horn C., Reid T., Hutson S. M., Cooney R. N., Lynch C. J., *Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism*. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 293, (2007), E1552–E1563.
 26. Pedroso J.A.B., Zampieri T.T., Donato J., *Reviewing the effects of l-leucine supplementation in the regulation of food intake, energy balance, and glucose homeostasis*, Nutrients, 7, (2015), 3914–3937.
 27. Matulewicz N., Karczewska-Kupczewska M., *Insulinooporność a przewlekła reakcja zapalna*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 70, (2016), 1245-1257.
 28. Li Y.C., Li Y., Chen Y., Zi T.Q., Du S.S., Jiang Y.S., Feng R.N., Sun C.H., *The ratio of dietary branched-chain amino acids is associated with a lower prevalence of obesity in young Northern Chinese adults: an internet-based cross-sectional study*, Nutrients, 7, (2015), 9573–9589.
 29. Cogate P.G., A de Oliveira A.J.N., Alfenas R.C., Hermsdorff H.H.M., *Consumption of branched-chain amino acids is inversely associated with central obesity and cardiometabolic features in a population of Brazilian middle-aged men: potential role of leucine intake*, Journal of Nutrition Health & Aging 19, (2015), 771–777.
 30. Ruiz-Canela M., Toledo E., Clish C.B., Hruby A., Liang L., Salas-Salvadó J., Razquin C., Corella D., Estruch R., Ros E., Fitó M., Gómez-Gracia E., Arós .F, Fiol M., Lapetra J., Serra-Majem L., Martínez-González M.A., Hu F.B., *Plasma Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial*, Clinical Chemistry, 62, (2016), 582-592.
 31. Nie C., He T., Zhang W., Zhang G., Ma X., *Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism*, International Journal of Molecular Sciences, 19, (2018), 1-16.
 32. Allam-Ndoul B., Guénard F., Garneau V., Barbier O., Pérusse L., Vohl M., *Associations between branched chain amino acid levels, obesity and cardiometabolic complications*. Integrative Obesity and Diabetes, 1, (2015), 157–162.

33. Shah S.H., Crosslin D.R., Haynes C.S., Nelson S., Turer C.B., Stevens R.D., Muehlbauer M.J., Wenner B.R., Bain J.R., Laferrre B., Gorroochurn P., Teixeira J., Brantley P.J., Stevens V.J., Hollis J.F., Appel L.J., Lien L.F., Batch B., Newgard C.B., Svetkey L.P., *Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss*, 55, (2012), *Diabetologia*, 321-330.

Znaczenie aminokwasów rozgałęzionych (BCAA) w insulinooporności i cukrzycy typu 2

Streszczenie

Aminokwasy rozgałęzione (BCAA – *branched-chain amino acid*) to aminokwasy posiadające w swojej strukturze rozgałęziony boczny łańcuch alifatyczny. Należą do nich: leucyna, izoleucyna i walina, które nie tylko są składnikami białek, ale też regulują wiele procesów fizjologicznych w organizmie człowieka. BCAA należą do grupy aminokwasów egzogennych, co oznacza, że organizm ludzki nie potrafi ich syntetyzować, muszą więc być dostarczane wraz z pożywieniem. Źródłem pokarmowym tych aminokwasów są pokarmy zawierające białka, głównie mięso i nabiał. Poza dobrze znaną rolę BCAA w metabolizmie białek mięśniowych, w ciągu ostatniej dekady obserwuje się wzrost zainteresowania rolą BCAA także w cukrzycy. Pomimo pozytywnego wpływu aminokwasów rozgałęzionych na zdrowie metaboliczne, zaobserwowano, że podwyższenie poziomu BCAA w osoczu koreluje ze wzrostem ryzyka insulinooporności i cukrzycy typu 2. Ponadto opisano związki wyższych poziomów izoleucyny, leucyny i waliny z upośledzoną tolerancją glukozy i otyłością.

Słowa kluczowe: aminokwasy rozgałęzione, BCAA, cukrzyca

The importance of branched chain amino acids (BCAAs) in insulin resistance and type 2 diabetes

Abstract

Branched chain amino acids (BCAA) are amino acids having a branched aliphatic side chain in their structure. These include: leucine, isoleucine and valine, which are not only components of proteins, but also regulate many physiological processes in the human body. BCAAs belong to the group of exogenous amino acids, which means that the human body is not able to synthesize them, so they must be supplied with food. The food source of these amino acids are foods containing proteins, mainly meat and dairy products. In addition to the well-known role of BCAA in muscle protein metabolism, there has been an increase in interest in the role of BCAA in diabetes over the past decade. Despite the positive effect of branched chain amino acids on metabolic health, it has been observed that an increase in plasma BCAA levels correlates with an increased risk of insulin resistance and type 2 diabetes. In addition, it has described relationships between higher levels of isoleucine, leucine and valine with impaired glucose tolerance and obesity.

Keywords: branched chain amino acids, BCAAs, diabetes

Justyna Kubacka¹, Anna Stefańska²

Znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych

1. Wprowadzenie

Aminokwasy (ang. *amino acids*, AA) definiowane są jako substancje organiczne zawierające w swojej budowie zarówno grupy aminokwasowe, jak i kwasowe. Ze względu na różnice w łańcuchach bocznych, AA mają znacząco różne właściwości i funkcje biochemiczne [1]. Aminokwasy są podstawowymi elementami syntezy białek, biorą udział w biosyntezie cząsteczek sygnałowych, takich jak neuroprzekaźniki i hormony peptydowe. Odgrywają również rolę w syntezie wielu innych cząsteczek, takich jak nukleotydy, poliaminy, glukozyminy, kreatyna i pokrewne węglowodany [2]. Ponieważ aminokwasy są powszechnie zaangażowane w różne szlaki metaboliczne, wyczerpanie lub akumulacja ich metabolitów, obserwowane w niektórych chorobach metabolicznych, prawdopodobnie aktywuje różne patomechanizmy [3].

2. Zaburzenia metaboliczne

Zaburzenia metaboliczne stanowią coraz większe wyzwanie zdrowotne na całym świecie ze względu na ich systematycznie zwiększającą się częstość występowania. Stanowią one grupę zaburzeń, w których nagromadziły się różne współzależne stany patologiczne, obejmujące otyłość, niealkoholowa stłuszczeniową chorobę wątroby (ang. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), dyslipidemię, nietolerancję glukozy, insulinooporność (ang. *insulin resistance*, IR), nadciśnienie i cukrzycę typu 2 (ang. *type 2 diabetes*, T2D), które współistniejąc razem, w znacznym stopniu zwiększają częstość występowania chorób sercowo-naczyniowych (ang. *cardiovascular disease*, CVD) [4, 5]. Częstość zachorowania na te zaburzenia wzrasta z każdym rokiem, zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. Choroby sercowo-naczyniowe są główną przyczyną umieralności na świecie, odpowiadając za prawie jedną trzecią wszystkich zgonów [6].

3. Aminokwasy w zaburzeniach metabolicznych

Obecne badania nad patogenezą zaburzeń metabolicznych koncentrują się głównie na otyłości brzusznej, lipotoksyczności i insulinooporności. Zaburzenia metaboliczne wiążą się także ze zmianą w metabolizmie niektórych aminokwasów. Cukrzyca typu 2 związana jest z ogólnoustrojowym rozregulowanym środowiskiem metabolicznym, które, choć koncentruje się głównie na glukozie, wyraźnie obejmuje również kwasy tłuszczowe i aminokwasy. Ostatnie badania metabolomiczne i lipidomiczne wykazały, że poziomy niektórych aminokwasów w osoczu mogą wzrosnąć podczas insulinooporności. W szczególności aminokwasy rozgałęzione i aromatyczne, takie jak leucyna,

¹ justynkakubacka@wp.pl, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

² diag.ka@wp.pl, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

izoleucyna, walina i tyrozyna, są ściśle związane z ryzykiem rozwoju otyłości trzewnej, insulinooporności i cukrzycy typu 2 w przyszłości [7, 8]. Innym z aminokwasów, na który także zwrócono uwagę w tym aspekcie w ostatnich latach jest glicyna należąca do grupy aminokwasów alifatycznych, której znacznie obniżone poziomy w insulinooporności, cukrzycy typu 2 i otyłości, zaobserwowano zarówno w badaniach z udziałem ludzi, jak i zwierząt [9-12]. W obszernym prospektywnym badaniu z 7-letnim okresem obserwacji, wykazano związek z wystąpieniem T2D nie tylko dla wybranych aminokwasów (np. fenyloalanina), ale również dla niektórych cukrów 6-węglowych, jak i kwasów tłuszczowych [13].

Zmiany w profilu aminokwasów w osoczu we wczesnym stadium chorób, spowodowane są głównie otyłością i stanem zapalnym związanym z insulinoopornością, dlatego w większości przypadków zmiany te mogą być odwracalne poprzez zastosowanie odpowiednich interwencji (m.in. żywieniowych, farmakologicznych lub chirurgicznych), zwiększających insulino-wrażliwość.

3.1. Glicyna

Glicyna jest endogennym aminokwasem tworzącym białko o najmniejszej masie cząsteczkowej. Fizjologiczne stężenie glicyny w osoczu waha się między 200 a 300 $\mu\text{mol/L}$. Poza rolę budulcową uczestniczy ona w ekspresji genów oraz jest niezbędna do syntezy glutationu [14]. Niektóre doniesienia sugerują, że glicyna może być warunkowo niezbędna, ponieważ jej ilość syntetyzowana *in vivo* w określonych warunkach bywa niewystarczająca do zaspokojenia potrzeb metabolicznych organizmu. Glicyna odgrywa kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych związanych z chorobami metabolicznymi, a jej przewlekły niedobór może w dłuższej perspektywie wpływać na rozwój tych zaburzeń [15]. Analiza dostępnej literatury sugeruje, że kluczowe szlaki metaboliczne glicyny mogą się różnić w zależności od rodzaju zaburzenia metabolicznego [16]. W badaniach obserwacyjnych obniżone stężenia glicyny w osoczu powiązано między innymi z T2D, NAFLD i otyłością [12, 17-19]. W badaniu grupy dorosłych Japończyków zaobserwowano, że stężenie glicyny było dodatnio skorelowane z insulino-wrażliwością i odwrotnie skorelowane z insulinoopornością [20]. Glicyna miała również największy związek ze zmianą wrażliwości na insulinę, mierzoną za pomocą kłamy hiperinsulinowo-euglikemicznej u 399 osób bez cukrzycy [21]. Obniżone stężenie glicyny w osoczu może stanowić silny czynnik predykcyjny incydentów nietolerancji glukozy i T2D [22]. Stwierdzono także, że poziomy glicyny w osoczu są o 9 do 13% niższe u pacjentów z NAFLD, niezależnie od tego, czy u badanych występowała otyłość [17]. Co więcej, w ostatnich latach wskazano na użyteczność wskaźnika GSG (glutaminian-seryna-glicyna), który łączy trzy aminokwasy zaangażowane w syntezę glutationu jako potencjalnego biomarkera NAFLD. Zaobserwowano, że wskaźnik ten jest w znacznym stopniu podwyższony u dorosłych osób z NAFLD potwierdzonym biopsją w porównaniu z grupą kontrolną oraz, że wskaźnik ten jest związany z enzymami wątrobowymi i insulinoopornością wątroby [17]. Wskaźnik GSG może być również użyteczny w wykrywaniu NAFLD w populacji pediatrycznej o zwiększonym ryzyku zachorowania niezależnie od tradycyjnych czynników ryzyka [23]. Sugeruje się, że obniżone stężenie glicyny w osoczu może być spowodowane kilkoma potencjalnymi mechanizmami: zmniejszeniem wchłaniania jelitowego, zmniejszoną biosyntezą oraz zwiększonym katabolizmem lub wydalaniem wraz z moczem [16]. Z kolei interwencje mające na celu

poprawę homeostazy glukozy, takie jak ćwiczenia fizyczne i chirurgia bariatryczna, wiązały się ze wzrostem poziomu glicyny [18, 24]. Również suplementacja glicyną wpływa na poprawę metabolizmu glukozy [25]. Metabolizm ludzkiej glicyny jest zmieniony u osób z otyłością, cukrzycą i NAFLD, a te zaburzenia mogą mieć kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia podwyższonego ryzyka sercowo-naczyniowego związanego z tymi schorzeniami. Glicyna jest obecnie uznawana za istotny marker osocza zaburzeń metabolicznych, jednak nadal nie jest jasne, czy spadek poziomu glicyny jest przyczynowo związany z ich patogenezą.

3.2. Aminokwasy rozgałęzione (ang. *branched chain amino acid*, BCAA)

Aminokwasy rozgałęzione, do których zalicza się leucynę (Leu), izoleucynę (Ile) i walinę (Val), są aminokwasami niezbędnymi, to znaczy, że muszą być dostarczane wraz z pożywieniem. Głównymi producentami tych aminokwasów są bakterie jelitowe, zwłaszcza *Escherichia coli* [26]. Oprócz dobrze znanej roli BCAA w metabolizmie białek mięśniowych, w ciągu ostatnich lat wyraźnie wzrosło zainteresowanie rolą BCAA w chorobach kardiometabolicznych, zwłaszcza w kontekście otyłości, insulinooporności i cukrzycy. Zaobserwowano, że zarówno aminokwasy rozgałęzione, jak i aromatyczne są dodatnio skorelowane ze wskaźnikiem masy ciała (*body mass index*, BMI), obwodem talii, trzewną tkanką tłuszczową, skurczowym ciśnieniem krwi (*systolic blood pressure*, SBP), rozkurczowym ciśnieniem krwi (*diastolic blood pressure*, DBP), dysglikemią oraz poziomami insuliny i trójglicerydów [27-29]. Stwierdzono również, że podwyższone poziomy krążących BCAA korelują z otyłością i zwiększonym ryzykiem insulinooporności oraz cukrzycy typu 2 zarówno w modelach ludzkich, jak i zwierzęcych [30,31].

Dowiedziano, że u pacjentów z T2D stężenia aminokwasów rozgałęzionych mogą być 1,5-krotnie lub nawet 2-krotnie wyższe niż u osób zdrowych [32,33], a podwyższone stężenie tych aminokwasów może pojawić się nawet na kilka lat przed rozwojem pełnoobjawowej cukrzycy [34]. Podwyższone stężenie aminokwasów aromatycznych i rozgałęzionych zaobserwowano zarówno u pacjentów z cukrzycą typu 1, jak i typu 2 [35, 30]. Zmienione poziomy BCAA odnotowano także w przypadku otyłości. Newgard i wsp. (2009) [7], wykazali zwiększone stężenie tych aminokwasów i ich metabolitów u osób otyłych w porównaniu z osobami szczupłymi. Autorzy stwierdzili, że związek ten prawdopodobnie wynika z nadmiernego poboru BCAA wraz z dietą oraz ze zwiększonego przepływu ich metabolitów przez szlaki kataboliczne. W innym badaniu zaobserwowano zmniejszoną ekspresję i aktywność enzymów odpowiadających za rozkład BCAA w tkance tłuszczowej u osób otyłych, z T2D i IR i wiązało się to z zaburzeniami metabolicznymi, które uległy poprawie po utracie masy ciała [36]. Osoby niezdrowe metabolicznie, w porównaniu z osobami metabolicznie zdrowymi, miały istotnie niższą ekspresję genów związanych z katabolizmem BCAA [37].

Przez wiele lat nie było jasne, czy podwyższone stężenia BCAA są przyczyną czy wtórną konsekwencją insulinooporności. Dostępne dane potwierdzają jednak hipotezę, że wzrost BCAA w osoczu najprawdopodobniej jest konsekwencją insulinooporności. Niedawno opublikowany raport randomizacji Mendla również potwierdza tę hipotezę, wskazując, że wskaźnik HOMA-IR jest związany przyczynowo z wyższymi poziomami BCAA na czczo [38]. Dobrze udokumentowano, że otyłość i insulinooporność są związane ze zmniejszonym katabolizmem BCAA spowodowanym obniżoną aktyw-

nością kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -keto-kwasów (BCKDC), co skutkuje akumulacją BCAA i ketokwasów rozgałęzionych [39]. Łącznie, obecne dowody sugerują, że podwyższone poziomy BCAA we krwi mogą być wczesnymi sygnałami pogorszenia kontroli glikemii i wrażliwości na insulinę [40].

3.3. Aminokwasy aromatyczne (ang. *aromatic amino acid*, AAA)

Aminokwasy aromatyczne obejmują fenyloalaninę (Phe), tyrozynę (Tyr) i tryptofan (Trp). Aktualnie istnieje zapotrzebowanie na identyfikację nowych biomarkerów zaburzeń metabolicznych, które umożliwiłyby wczesne wyodrębnienie osób z największym ryzykiem wystąpienia chorób kardiometabolicznych, a także umożliwiających monitorowanie indywidualnego ryzyka metabolicznego, tak, by możliwe było opracowanie i wdrożenie odpowiednich strategii interwencyjnych. Aktualne dowody pochodzące z badań różnych środowisk etnicznych przemawiają za zastosowaniem profilu aminokwasów rozgałęzionych i aminokwasów aromatycznych jako biomarkerów określających zdrowie metaboliczne. Podobnie jak w przypadku BCAA, wykazano ścisły związek między zmianami profili AAA a cukrzycą typu 2, chorobami układu sercowo-naczyniowego, insulinoopornością i otyłością [41, 42]. Podwyższone poziomy tych aminokwasów w osoczu są związane ze zwiększeniem mediatorów prozapalnych i pogorszeniem ogólnego stanu metabolicznego [43]. Obszerne badanie obserwacyjne Framingham Offspring Study prowadzone z udziałem ponad dwóch tysięcy osób przez okres 12 lat wykazało, że poziomy BCAA i AAA są istotnie związane z przyszłym rozwojem cukrzycy [34], a także z rozwojem choroby sercowo-naczyniowej [44]. Potencjalnym mechanizmem leżącym u podstaw związku między AAA i insulinoopornością może być metabolizm AAA do katecholamin, które zmieniają czynność wątroby prowadząc do hiperinsulinemii i dyslipidemii [45]. Obserwacje te sugerują, że niektóre zaburzenia w metabolizmie AAA mogą być częścią wczesnych, jeszcze nie w pełni poznanych zmian metabolicznych poprzedzających rozwój zaburzeń kardiometabolicznych. To sprawia, że zarówno AAA, jak i BCAA mogą stanowić potencjalne, nowe i wczesne biomarkery tych zaburzeń.

Jednym z AAA na który w ostatnim czasie zwrócono szczególną uwagę w kontekście zaburzeń metabolicznych jest tryptofan, ponieważ badania z ostatniej dekady ujawniły złożone i sprzeczne działanie tego aminokwasu i jego metabolitów w regulacji funkcji układu sercowo-naczyniowego [46]. Szlak kinureninowy (ang. *kynurenine pathway*, KP) stanowi główną drogę katabolizmu tryptofanu, odpowiadając za blisko 90% jego degradacji w wątrobie [47]. Szlak ten jest inicjowany przez 2,3-dioksygenazę indoloaminy (ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO) i 2,3-dioksygenazę tryptofanu (ang. *tryptophan 2,3-dioxygenase*, TDO), enzymy, które katalizują konwersję Trp do kinureniny (ang. *kynurenine*, Kyn). Kyn jest dalej przekształcana w następujące metabolity KP (kinureniny): kwas kinureninowy (Kyna), 3-hydroksykinureninę (3HKyn), kwas antranilowy (AA) i kwas chinolinowy (QA). 3HKyn może być enzymatycznie przekształcany w kwas ksanturenowy (XA) [47]. Przez wiele lat rozregulowanie szlaku kinureninowego było badane głównie w kontekście zaburzeń depresyjnych i neurodegeneracyjnych, jednak dopiero w ostatnich latach zwrócono uwagę, że zarówno enzymy, jak i metabolity tego szlaku mogą wpływać także na zwiększenie częstości występowania chorób sercowo-naczyniowych poprzez regulację stanu zapalnego i zwiększenie aktywacji immunologicznej. Brak równowagi w poziomach krążących metabolitów

KP odnotowano również w otyłości, chorobie sercowo-naczyniowej i cukrzycy typu 2 [48, 49]. Jednak dane dotyczące tych metabolitów w odniesieniu do T2D są skąpe i często sprzeczne w badaniach na ludziach [50, 51], stąd potrzeba dalszych badań wyjaśniających możliwe mechanizmy związku kinurenin z zaburzeniami metabolicznymi.

3.4. Arginina

Na przestrzeni lat wiele badań potwierdziło znaczenie argininy w promowaniu zdrowia układu krążenia poprzez wytwarzanie gazowego tlenu azotu (NO) przez enzym syntazę NO (ang. *NO synthase*, NOS). Uwalnianie NO przez komórki śródbłonna reguluje przepływ krwi i ciśnienie krwi poprzez hamowanie napięcia tętniczego. Ponadto NO łagodzi rozwój miażdżycy poprzez blokowanie odpowiedzi zapalnej w obrębie ściany naczynia. W przeciwieństwie do leucyny, która hamuje wytwarzanie NO przez śródbłonek, wysokie stężenia argininy w osoczu zwiększają dostępność NO i poprawiają wrażliwość naczyń na insulinę. Także homoarginina, pochodna argininy, wykazuje korzystne działanie w układzie krążenia. Niski poziom homoargininy może być niezależnym czynnikiem prognozującym śmiertelność z powodu chorób układu krążenia, podczas gdy wysoki jej poziom wiąże się ze zmniejszoną śmiertelnością. Mechanizm ochronnego oddziaływania homoargininy nie jest znany, ale najprawdopodobniej obejmuje jej zdolność do stymulowania wytwarzania NO poprzez bycie substratem dla NOS [52-54].

Coraz więcej dowodów klinicznych wskazuje, że suplementacja argininy może zmniejszyć otyłość, obniżyć ciśnienie tętnicze krwi, przeciwdziałać utlenianiu i normalizować dysfunkcję śródbłonna, aby doprowadzić do remisji cukrzycy typu 2. Suplementacja diety arginina powoduje obniżenie stężenia glukozy i homocysteiny w osoczu jednocześnie poprawiając relaksację zależną od śródbłonna (wskaźnik funkcji sercowo-naczyniowej) w obu modelach cukrzycy; typu 1 i typu 2 [55]. Leczenie arginina zmniejszyło poziom białej tkanki tłuszczowej, zwiększając jednocześnie masę brązowej tkanki tłuszczowej u szczurów Zucker z T2D i szczurów z otyłością wywołanych dietą. Arginina i/lub jej metabolity (NO i poliaminy) mogą nasilać proliferację, różnicowanie i funkcję brązowych adipocytów. Ponadto, zarówno masa mięśni szkieletowych, jak i wrażliwość na insulinę zostały wzmocnione w odpowiedzi na suplementację argininy poprzez mechanizmy obejmujące wzrost sygnalizacji mTOR i NO w mięśniach [52]. Podobne obserwacje poczyniono w badaniu z udziałem ludzi, gdzie długotrwałe doustne podawanie argininy spowodowało obniżenie masy tłuszczowej u dorosłych osób otyłych z cukrzycą typu 2 [56]. Zatem suplementacja diety arginina może potencjalnie stanowić jeden z elementów wspomagania leczenia zaburzeń metabolicznych.

3.5. Glutamina

Glutamina to najobficiej występujący i najbardziej wszechstronny aminokwas występujący w organizmie [57]. Jest ona ważnym substratem niezbędnym do syntezy białek, lipidów, puryn, pirymidyn, aminocukrów, fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADPH), glukozaminy, przeciwutleniaczy i wielu innych szlaków biosyntetycznych zaangażowanych w regulację funkcji komórek. Jednak pomimo dobrze znanego wpływu glutaminy na stan zdrowia, jej oddziaływanie na układ sercowo-naczyniowy zostało udokumentowane stosunkowo niedawno [58]. We wspomnianym wcześniej, przelomowym badaniu kohortowym autorstwa Cheng S. i wsp. (2012) [28],

doniesiono, że stosunek glutaminy do glutaminianu w osoczu jest ujemnie skorelowany ze wskaźnikiem masy ciała (ang. *body mass index*, BMI), triglicerydami, insuliną i ciśnieniem krwi oraz dodatnio skorelowany z lipoproteinami o wysokiej gęstości (ang. *high-density lipoprotein*, HDL), co wiąże się z niższym ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu 2. Tymczasem stężenia glutaminianu i BCAA w osoczu zostały w tym badaniu powiązane z niekorzystnymi parametrami metabolicznymi [28].

Pozytywne oddziaływanie glutaminy obejmujące m.in. obniżenie skurczowego ciśnienia krwi i stężenia glukozy na czczo, odnotowano także stosując suplementację u osób z T2D przez okres 6 tygodni [59]. Za potencjalne mechanizmy korzystnego oddziaływania glutaminy na zdrowie kardiometaboliczne uważa się przede wszystkim jej zdolność do stymulacji uwalniania insuliny przez komórki β trzustki, transkrypcję genów insulinozależnych i zwiększoną dyspozycję insuliny oraz zwiększone uwalnianie peptydu glukagonopodobnego 1 [60].

4. Podsumowanie

Coraz więcej dowodów sugeruje, że niektóre aminokwasy mogą regulować różne procesy metaboliczne, w tym metabolizm glukozy i lipidów. Dane pochodzące zarówno z populacji amerykańskich, europejskich, jak i azjatyckich wiążą glicynę, BCAA i AAA z insulinoopornością, T2DM i ryzykiem kardiometabolicznym. Jednak pomimo wielu przeprowadzonych do tej pory badań różnego rodzaju z udziałem zarówno zwierząt, jak i ludzi pochodzących z różnych populacji, mechanizm zmienionego metabolizmu aminokwasów w patologiach związanych z zaburzeniami metabolicznymi nie jest jeszcze w pełni poznany. Wiele dowodów wskazuje na to, że aminokwasy odgrywają fundamentalną rolę w układzie sercowo-naczyniowym, niektóre z nich na poziomie etiopatologii zaburzeń metabolicznych, inne zaś (m.in. glutamina i glicyna), mogą stanowić potencjalne elementy wspomaganie leczenia tych zaburzeń. Z pewnością patogeneza zaburzeń metabolicznych jest wieloczynnikowa i złożona, dlatego potrzeba większej ilości danych celem pogłębienia i uzupełnienia obecnej wiedzy na temat najlepszych interwencji służących do leczenia rozregulowanego środowiska metabolicznego. Dotychczasowe wyniki sugerują, że zmiany stężeń aminokwasów rozgałęzionych i aromatycznych zidentyfikowane przy użyciu technik metabolomicznych, jak również kolejne metabolity tych aminokwasów, mogą być przydatne w identyfikacji nowych biomarkerów kardiometabolicznych.

Literatura

1. Brosnan J.T., *Amino acids, then and now – a reflection on Sir Hans Krebs's contribution to nitrogen metabolism*, IUBMB Life, 52, 2001, s. 265-270.
2. Yahyaoui R., Perez-Frias J., *Amino Acid Transport Defects in Human Inherited Metabolic Disorders*, International journal of molecular sciences, 21, 2019.
3. Kölker S., *Metabolism of amino acid neurotransmitters: the synaptic disorder underlying inherited metabolic diseases*, Journal of Inherited Metabolic Disease, 41, 2018, s. 1055-1063.
4. Diehl A.M., Day C., Cause D.C., *Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis*, The New England journal of medicine, 377, 2017, s. 2063-2072.
5. Agus A., Clement K., Sokol H., *Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders*, Gut, 70, 2021, s. 1174-1182.
6. Benjamin E.J., Blaha M.J., Chiuve S.E., Cushman M., Das S.R., Deo R., de Ferranti S.D., Floyd J., Fornage M., Gillespie C., Isasi C.R., Jiménez M.C., Jordan L.C., Judd S.E., Lackland D., Lichtman J.H., Lisabeth L., Liu S., Longenecker C.T., Mackey R.H.,

- Matsushita K., Mozaffarian D., Mussolino M.E., Nasir K., Neumar R.W., Palaniappan L., Pandey D.K., Thiagarajan R.R., Reeves M.J., Ritchey M., Rodriguez C.J., Roth G.A., Rosamond W.D., Sasson C., Towfighi A., Tsao C.W., Turner M.B., Virani S.S., Voeks J.H., Willey J.Z., Wilkins J.T., Wu J.H., Alger H.M., Wong S.S., Muntner P., *American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2017 update*, *Circulation*, 135, 2017.
7. Newgard C.B., An J., Bain J.R., Muehlbauer M.J., Stevens R.D., Lien L.F., Haqq A.M., Shah S.H., Arlotto M., Slentz C.A., Rochon J., Gallup D., Ilkayeva O., Wenner B.R., Yancy W.S., Eisensohn H., Musante G., Surwit R.S., Millington D.S., Butler M.D., Svetkey L.P., *A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance*, *Cell Metabolism*, 9, 2009, s. 311-326.
 8. Würtz P., Mäkinen V.P., Soininen P., Kangas A.J., Tukiainen T., Kettunen J., Savolainen M.J., Tammelin T., Viikari J.S., Rönnemaa T., Kähönen M., Lehtimäki T., Ripatti S., Raitakari O.T., Järvelin M.R., Ala-Korpela M., *Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults*, *Diabetes*, 61, 2012, s. 1372-1380.
 9. Lustgarten M.S., Price L.L., Phillips E.M., Fielding R.A., *Serum glycine is associated with regional body fat and insulin resistance in functionally-limited older adults*, *PLoS One*, 8, 2013.
 10. Palmer N.D., Stevens R.D., Antinozzi P.A., Anderson A., Bergman, R.N., Wagenknecht, L.E., Newgard C.B., Bowden D.W., *Metabolomic profile associated with insulin resistance and conversion to diabetes in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study*, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100, 2015.
 11. Felig P., Marliss E., Cahill G.F.Jr., *Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity*, *The New England journal of medicine*, 281, 1969, s. 811-816.
 12. Okekunle A.P., Li Y., Liu L., Du S., Wu X., Chen Y., Li Y., Qi J., Sun C., Feng R., *Abnormal circulating amino acid profiles in multiple metabolic disorders*, *Diabetes research and clinical practice*, 132, 2017, s. 45-58.
 13. Floegel A., Stefan N., Yu Z., Mühlenbruch K., Drogan D., Joost H.G., Fritsche A., Häring H.U., Hrabě de Angelis M., Peters A., Roden M., Prehn C., Wang-Sattler R., Illig T., Schulze M.B., Adamski J., Boeing H., Pischon T., *Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach*, *Diabetes*, 62, 2013, s. 639-648.
 14. Durkin P.J., Friedberg F. *The synthesis of glutathione in torula utilis studied with 14C-carboxyl labeled glycine*, *Biochimica et biophysica acta*, 9, 1952, s. 105-106.
 15. Meléndez-Hevia E., De Paz-Lugo P., Cornish-Bowden A., Cárdenas M.L., *A weak link in metabolism: The metabolic capacity for glycine biosynthesis does not satisfy the need for collagen synthesis*, *Journal of biosciences*, 34, 2009, s. 853-872.
 16. Imenshahidi M., Hossenzadeh H., *Effects of glycine on metabolic syndrome components: a review*, *Journal of endocrinological investigation*, 45, 2022, s. 927-939.
 17. Gaggini M., Carli F., Rosso C., Buzzigoli E., Marietti M., Della Latta V., Ciociaro D., Abate M.L., Gambino R., Cassader M., Bugianesi E., Gastaldelli A., *Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance*, *Hepatology*, 67, 2018, s. 145-158.
 18. Glynn E.L., Piner L.W., Huffinan K.M., Slentz C.A., Elliot-Penry L., AbouAssi H., White P.J., Bain J.R., Muehlbauer M.J., Ilkayeva O.R., Stevens R.D., Porter Starr K.N., Bales C.W., Volpi E., Brosnan M.J., Trimmer J.K., Rolph T.P., Newgard C.B., Kraus W.E., *Impact of combined resistance and aerobic exercise training on branchedchain amino acid turnover, glycine metabolism and insulin sensitivity in overweight humans*, *Diabetologia*, 58, 2015, s. 2324-2335.

19. Drabkova P., Sanderova J., Kovarik J., Kandar R., *An assay of selected serum amino acids in patients with type 2 diabetes mellitus*, Advances in clinical of experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University, 24, 2015, s. 447-451.
20. Takashina C., Tsujino I., Watanabe T., Sakaue S., Ikeda D., Yamada A., Sato T., Ohira H., Otsuka Y., Oyama-Manabe N., Ito Y.M., Nishimura M., *Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance*, Nutrition&metabolism, 13, 2016.
21. Gall W.E., Beebe K., Lawton K.A., Adam K.P., Mitchell M.W., Nakhle P.J., Ryals J.A., Milburn M.V., Nannipieri M., Camastra S., Natali A., Ferrannini E., RISC Study Group, *α -hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population*, PLoS ONE, 5, 2010.
22. Wang-Sattler R., Yu Z., Herder C., Messias A.C., Floegel A., He Y., Heim K., Campillos M., Holzapfel C., Thorand B., Grallert H., Xu T., Bader E., Huth C., Mittelstrass K., Döring A., Meisinger C., Gieger C., Prehn C., Roemisch-Margl W., Carstensen M., Xie L., Yamanaka-Okumura H., Xing G., Ceglarek U., Thiery J., Giani G., Lickert H., Lin X., Li Y., Boeing H., Joost H.G., de Angelis M.H., Rathmann W., Suhre K., Prokisch H., Peters A., Meitinger T., Roden M., Wichmann H.E., Pischon T., Adamski J., Illig T., *Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics*, Molecular systems biology, 8, 2012.
23. Leonetti S., Herzog R., Caprio S., Santoro N., Trico D., *Glutamate-Serine-Glycine Index: A Novel Potential Biomarker in Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, Children (Basel), 7, 2020.
24. Tulipani S., Palau-Rodriguez M., Minarro Alonso A., Cardona F., Marco-Ramell A., Zonja B., Lopez de Alda M., Munoz-Garach A., Sanchez-Pla A., Tinahones F.J., Andres-Lacueva C., *Biomarkers of morbid obesity and prediabetes by metabolomic profiling of human discordant phenotypes*, Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry, 463, 2016, s. 53-61.
25. Gonzalez-Ortiz M., Medina-Santillan R., Martinez-Abundis E., von Drateln C.R., *Effect of glycine on insulin secretion and action in healthy first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus patients*, Hormone and Metabolic Research, 33, 2001, s. 358-360.
26. Berg J.M., Stryer L., Tymoczko J.L., Gatto G.J., *Biochemistry. 8th ed.*, Macmillan Education, London UK, 2015, s. 41-46.
27. Yamakado M., Nagao K., Imaizumi A., Tani M., Toda A., Tanaka T., Jinzu H., Miyano H., Yamamoto H., Daimon T., Horimoto K., Ishizaka Y., *Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population*, Scientific reports, 5, 2015.
28. Cheng S., Rhee E.P., Larson M.G., Lewis G.D., McCabe E.L., Shen D., Palma M.J., Roberts L.D., Dejan A., Souza A.L., Deik A.A., Magnusson M., Fox C.S., O'Donnell C.J., Vasani R.S., Melander O., Clish C.B., Gerszten R.E., Wang T.J., *Metabolite Profiling Identifies Pathways Associated With Metabolic Risk in Humans*, Circulation, 125, 2012, s. 2222-2231.
29. Kubacka J., Cembrowska P., Sypniewska G., Stefanska A., *The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status*, Nutrients, 13, 2021.
30. Lynch C.J., Adams S.H., *Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance*, Nature reviews, Endocrinology, 10, 2014, s. 723-736.
31. White P.J., Lapworth A.L., An J., Wang L., McGarrah R.W., Stevens R.D., Ilkayeva O., George T., Muehlbauer M.J., Bain J.R., Trimmer J.K., Brosnan M.J., Rolph T.P., Newgard C.B., *Branched-chain amino acid restriction in Zucker-fatty rats improves muscle insulin sensitivity by enhancing efficiency of fatty acid oxidation and acyl-glycine export*, Molecular Metabolism, 5, 2016, s. 538-551.

32. Savolainen O., Fagerberg B., Vendelbo Lind M., Sandberg A.-S., Ross A.B., Bergström G., *Biomarkers for predicting type 2 diabetes development-Can metabolomics improve on existing biomarkers?*, PLoS ONE, 12, 2017.
33. Guasch-Ferré M., Hruby A., Toledo E., Clish C.B., Martínez-González M.A., Salas-Salvadó J., Hu F.B., *Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis*, Diabetes Care, 39, 2016, s. 833-846.
34. Wang T.J., Larson M.G., Vasani R.S., Cheng S., Rhee E.P., McCabe E., Lewis G.D., Fox C.S., Jacques P.F., Fernandez C., O'Donnell C.J., Carr S.A., Mootha V.K., Florez J.C., Souza A., Melander O., Clish C.B., Gerszten R.E., *Metabolite profiles and the risk of developing diabetes*, Nature medicine, 17, 2011, s. 448-453.
35. Bloomgarden Z., *Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link?*, Journal of Diabetes, 10, 2018, s. 350-352.
36. Laferrère B., Pietiläinen K., Boirie Y., *Weight Loss and Branched Chain Amino Acids and Their Metabolites, Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition: Volume 2*, Humana Press, Springer Science Business Media, New York, USA, 2015, s. 251-262.
37. Lackey D.E., Lynch C.J., Olson K.C., Mostaedi R., Ali M., Smith W.H., Karpe F., Humphreys S., Bedinger D.H., Dunn T.N., Thomas A.P., Oort P.J., Kieffer D.A., Amin R., Bettaieb A., Haj F.G., Permana P., Anthony T.G., Adams S.H., *Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity*, American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 304, 2013.
38. Mahendran Y., Jonsson A., Have C.T., Allin K.H., Witte D.R., Jørgensen M.E., Grarup N., Pedersen O., Kilpeläinen T.O., Hansen T., *Genetic evidence of a causal effect of insulin resistance on branched-chain amino acid levels*, Diabetologia, 2017, 60, s. 873-878.
39. Zhou M., Shao J., Wu C.Y., Shu L., Dong W., Liu Y., Chen M., Wynn R.M., Wang J., Wang J., Gui W.J., Qi X., Lusis A.J., Li Z., Wang W., Ning G., Yang X., Chuang D.T., Wang Y., Sun H., *Targeting BCAA catabolism to treat obesity-associated insulin resistance*, Diabetes, 68, 2019, s. 1730-1746.
40. Krebs M., Krssak M., Bernroider E., Anderwald C., Brehm A., Meyerspeer M., Nowotny P., Roth E., Waldhäusl W., Roden M., *Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans*, Diabetes, 51, 2002, s. 599-605.
41. Weng L., Quinlivan E., Gong Y., Beitelshes A.L., Shahin M.H., Turner S.T., Chapman A.B., Gums J.G., Johnson J.A., Frye R.F., Garrett T.J., Cooper-DeHoff R.M., *Association of branched and aromatic amino acids levels with metabolic syndrome and impaired fasting glucose in hypertensive patients*, Metabolic syndrome and related disorders, 13, 2015, s. 195-202.
42. Nagao K., Yamakado M., *The role of amino acid profiles in diabetes risk assessment*, Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 19, 2016, s. 328-335.
43. Newgard C.B., *Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance*, Cell metabolism, 15, 2012, s. 606-614.
44. Magnusson M., Lewis G.D., Ericson U., Orho-Melander M., Hedblad B., Engström G., Ostling G., Clish C., Wang T.J., Gerszten R.E., Melander O., *A diabetes-predictive amino acid score and future cardiovascular disease*, European heart journal, 34, 2013, s. 1982-1989.
45. Bi X., Henry C.J., *Plasma-free amino acid profiles are predictors of cancer and diabetes development*, Nutrition&diabetes, 7, 2017.
46. Song P., Ramprasath T., Wang H., Zou M.H., *Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases*, Cellular and Molecular Life Sciences, 74, 2017, s. 2899-2916.
47. Badawy A.A., *Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects*, International Journal of tryptophan research, 10, 2017.

48. Chen T., Zheng X., Ma X., Bao Y., Ni Y., Hu C., Rajani C., Huang F., Zhao A., Jia W., *Tryptophan Predicts the Risk for Future Type 2 Diabetes*, PLoS One, 11, 2016.
49. Matsuoka K., Kato K., Takao T., Ogawa M., Ishii Y., Shimizu F., Masuda J., Takada A., *Concentrations of various tryptophan metabolites are higher in patients with diabetes mellitus than in healthy aged male adults*, Diabetology International, 6, 2016, s. 69-75.
50. Munipally P.K., Agraham S.G., Valavala V.K., Gundae S., Turlapati N.R., *Evaluation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients*, Archives of physiology and biochemistry, 117, 2011, s. 254-258.
51. Li M., Kwok M.K., Fong S.S.M., Schooling C.M., *Indoleamine 2,3-dioxygenase and ischemic heart disease: a Mendelian Randomization study*, Scientific reports, 9, 2019.
52. Wu G., Meininger C.J., *Nitric oxide and vascular insulin resistance*, Biofactors, 35, 2009, s. 21-27.
53. Durante W., *Regulation of l-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells*, Cell biochemistry and biophysics, 35, 2001, s. 19-34.
54. Forstermann U., Sessa W.C., *Nitric oxide synthase: regulation and function*, European heart journal, 33, 2012, s. 829-837.
55. Hu S., Han M., Razaeei A., Li D., Wu G., Ma X., *L-Arginine Modulates Glucose and Lipid Metabolism in Obesity and Diabetes*, Current protein&peptide science, 18, 2017, s. 599-608.
56. Lucotti P., Setola E., Monti L.D., Galluccio E., Costa S., Sandoli E.P., Fermo I., Rabaiotti G., Gatti R., Piatti P., *Beneficial effect of a longterm oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients*, American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 291, 2006.
57. Cruzat V., Rogero M.M., Keane K.N., Curi R., Newsholme P., *Glutamine: metabolism and immune function, supplementation, and clinical translation*, Nutrients, 2018, 10, s. 1564.
58. Bertero T., Perk D., Chan S.Y., *The molecular rationale for therapeutic targeting of glutamine metabolism in pulmonary hypertension*, Expert opinion of therapeutic targets, 23, 2019, s. 511-524.
59. Mansour A., Tehrani M.R.M., Qorbani M., Heshmat R., Larijani B., Hosseini S., *Effect of glutamine supplementation on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes*, Nutrition, 31, 2015, s. 119-126.
60. Greenfield J.R., Farooqi I.S., Keogh J.M., Henning E., Habib A.M., Blackwood A., Reimann F., Holst J.J., Gribble F.M., *Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, type 2 diabetic patients*, The American journal of clinical nutrition, 89, 2009, s. 106-113.

Znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych

Streszczenie

Zaburzenia metaboliczne stanowią grupę zaburzeń obejmujących różne współzależne stany patologiczne do których należą: otyłość, niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby, dyslipidemia, nietolerancja glukozy, insulinooporność, nadciśnienie i cukrzyca typu 2, które współwystępując razem, w znacznym stopniu zwiększają częstość występowania chorób sercowo-naczyniowych. Dotychczasowe doniesienia wskazują, że aminokwasy odgrywają fundamentalną rolę w fizjologii i patologii układu sercowo-naczyniowego. Aminokwasy są podstawowymi elementami syntezy białek, biorą też udział między innymi w biosyntezie cząsteczek sygnałowych, takich jak neuroprzekazniki i hormony peptydowe. Liczne doniesienia naukowe potwierdziły znaczenie argininy w promowaniu zdrowia naczyń poprzez wytwarzanie gazowego tlenku azotu. Niedawno wykazano również, że aminokwasy aromatyczne i rozgałęzione modulują funkcję naczyń poprzez tworzenie licznych metabolitów, w tym gazów (amoniak, tlenek węgla, siarkowodór i dwutlenek siarki). Te aminokwasy i ich metabolity zachowują homeostazę naczyń poprzez regulację krytycznych procesów komórkowych, w tym proliferację, migrację, różnicowanie, apoptozę, kurczliwość i starzenie. Ponadto niektóre z nich wywierają silne działanie przeciwzapalne i przeciwutleniające w układzie krążenia

oraz blokują akumulację lipidów w ścianach tętnic. Jednak w niektórych przypadkach metabolizm tych aminokwasów poprzez dyskretne szlaki skutkuje wytwarzaniem związków, które sprzyjają chorobom naczyń. Słowa kluczowe: zaburzenia metaboliczne, cukrzyca typu 2, kardiometaboliczne czynniki ryzyka, aminokwasy rozgałęzione, aminokwasy aromatyczne

The importance of selected amino acids in metabolic disorders

Abstract

Metabolic disorders are a group of disorders including various interdependent pathological conditions, including obesity, non-alcoholic fatty liver disease, dyslipidemia, glucose intolerance, insulin resistance, hypertension and type 2 diabetes, which together significantly increase the incidence of cardiovascular diseases. Previous reports indicate that amino acids play a fundamental role in the physiology and pathology of the cardiovascular system. Amino acids are the basic elements of protein synthesis, they also take part in the biosynthesis of signaling molecules such as neurotransmitters and peptide hormones. Numerous scientific reports have confirmed the importance of arginine in promoting vascular health through the production of nitric oxide gas. Aromatic and branched amino acid have also recently been shown to modulate vessel function by forming numerous metabolites, including gases (ammonia, carbon monoxide, hydrogen sulfide, and sulfur dioxide). These amino acids and their metabolites maintain vascular homeostasis by regulating critical cellular processes including proliferation, migration, differentiation, apoptosis, contractility, and aging. In addition, some of them exert a strong anti-inflammatory and antioxidant effect in the circulatory system and block the accumulation of lipids in the artery walls. In some cases, however, the metabolism of these amino acids via discrete pathways results in the production of compounds that promote vascular disease.

Keywords: metabolic disorders, type 2 diabetes, cardiometabolic risk factors, branched chain amino acid, aromatic amino acid

Article

The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status

Justyna Kubacka ^{*}, Paulina Cembrowska, Grazyna Sypniewska ^{*} and Anna Stefanska

Department of Laboratory Medicine, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, Poland; paulina.cembrowska@wp.pl (P.C.); grazynaodes@interia.pl (G.S.); diag.ka@wp.pl (A.S.)

* Correspondence: justynkakubacka@wp.pl

Abstract: We examined the glycemic status-stratified relationships between total serum branched-chain amino acid (BCAA) concentrations and cardiometabolic risk factors in middle-aged Caucasian women. The study included 349 women divided into 2 subgroups: a normoglycemic group (NG, $n = 184$) and a dysglycemic group (DG, $n = 165$). Blood samples, anthropometric parameters, and blood pressure were measured. HOMA-IR, albumin-corrected calcium (CCa), and fatty liver index (FLI) were calculated. BCAA concentrations were higher in the women with dysglycemia. BCAAs moderately correlated with BMI and FLI in the NG group and with BMI, FLI, total calcium (TCa), CCa, HbA1c, TG/HDL-C, and HDL-C in the DG group. After adjusting for age and BMI, correlations for TCa, CCa, HbA1c, HDL-C, and TG/HDL-C remained significant. The coexistence of increased BCAAs with dysglycemic status was associated with markedly higher concentrations of TCa, CCa, HbA1c, and TG, which were not observed in the DG women with low level of BCAAs. Multiple regression showed that TCa or CCa, age and BCAAs were significantly associated with HbA1c independently of BMI only in the DG group. We conclude that dysglycemia in particular predisposes women to a significant relationship between total BCAAs and circulating calcium and HbA1c, and that these relationships are independent of BMI and may reflect the pathophysiological calcium-dependent mechanisms connecting BCAAs with metabolic disturbances.

Keywords: branched chain amino acids; cardiometabolic risk factors; glycated hemoglobin; circulating calcium



Citation: Kubacka, J.; Cembrowska, P.; Sypniewska, G.; Stefanska, A. The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status. *Nutrients* **2021**, *13*, 3307. <https://doi.org/10.3390/nu13103307>

Academic Editor: Roberto Cangemi

Received: 15 August 2021

Accepted: 19 September 2021

Published: 22 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Branched-chain amino acids (BCAAs) possess a branched aliphatic side chain in their structure. This group of amino acids includes leucine, isoleucine, and valine, which are not only components of proteins, but also regulate many physiological processes in the human body [1]. BCAAs are mainly found in muscle tissue, constituting 14–18% of all amino acids that build the proteins of this tissue. They belong to the group of exogenous amino acids that must be supplied to the body through the diet [2]. BCAAs are present in raw materials and food products containing both vegetable and animal proteins. The main food sources with the highest BCAA contents are meat, fish, grains, dairy products, vegetables, and eggs [2,3]. Nevertheless, some reports suggest that a small number of these amino acids can also be synthesized by the gut microbiome [4,5]. In addition to the well-known role of BCAAs in the metabolism of muscle proteins, there has been an increasing interest in the role of BCAAs in cardiometabolic diseases, especially in the context of obesity, insulin resistance, and diabetes. It has been found that elevated levels of circulating BCAAs correlate with obesity, and an increased risk of insulin resistance (IR), and type 2 diabetes mellitus (T2DM) in both human and animal models [6–8]. It was also found that BCAAs contribute to the development of obesity-associated insulin

resistance [8]. An increased concentration of these amino acids may even appear several years before the development of full-blown type 2 diabetes [9]. However, whether BCAAs are simply markers of insulin resistance or directly contribute to insulin resistance remains uncertain. It has been suggested that circulating BCAAs increase negative feedback (by activating the target mammalian rapamycin) to the insulin receptor 1 substrate, which promotes insulin resistance and impairs glucose metabolism [8]. The relationship between BCAAs and other cardiometabolic risk factors is less well known. Yang et al. found that BCAA concentrations are positively associated with the risk factors of coronary artery disease (CAD), e.g., carotid intima-media thickness (cIMT), BMI, blood pressure, fasting blood glucose, TG, apoB, apoB/apoAI ratio, and CRP, and negatively with HDL-C [10]. A recent study has suggested that BCAAs could present lipid-related cardiovascular (CVD) risks to some extent by affecting lipid metabolism in the Chinese population [11]. It was found that the association between BCAAs and CVD risk is much more pronounced in women who developed T2DM prior to a CVD event and the authors conclude that impaired BCAA metabolism may represent a pathway underlying the pathophysiology that links the risks of T2D and CVD [12]. Mels et al. also observed that BCAAs are independently related to blood pressure and cIMT in individuals with high HbA1c levels, which may suggest that BCAAs play a role in cardiovascular health, especially in the conditions of hyperglycemia [13].

Because of previous evidence suggesting that the glycemic status of subjects may be related with the cardiometabolic effects of BCAAs, we aim to evaluate the association of total BCAA concentrations with selected cardiometabolic risk factors in women with normoglycemic and dysglycemic status. We focused on the conventional risk factors for CVD, such as hyperlipidemia, hypertension, increased inflammatory state, fatty liver, and decreased estimated glomerular filtration rate (eGFR). As calcium homeostasis plays a role in glucose and amino acid metabolism [14,15], as well as being recognized as a cardiometabolic risk factor [16], we also examined the relationship between circulating calcium concentration and BCAAs in relation to glycemic status. We studied a group of middle-aged women because this group is especially exposed to an increased risk of developing an unfavorable cardiometabolic profile. Moreover, some earlier studies suggest that the relationship between BCAAs and glycemic status is weaker in women than in men [17,18]. Therefore, we hypothesized that a dysglycemic state is associated with the cardiometabolic effect of BCAAs in middle-aged women.

2. Materials and Methods

2.1. Participants

The study included 349 Caucasian women. The women were selected from a group of women who had previously participated in a cardiometabolic risk factors study at the Department of Laboratory Medicine of the Nicolaus Copernicus University in Bydgoszcz, Poland between 2016 and 2019. The exclusion criteria were as follows: history of CVD, diabetes mellitus type 1, familial hypercholesterolemia, severe or moderate chronic kidney disease (CKD), and thyroid and parathyroid disorders. All the women had serum CRP < 10 mg/L, and thyroid stimulating hormone (TSH) < 4.94 μ IU/mL, TC < 8 mmol/L, GFR > 60 mL/min/1.73 m². Age, smoking habits and physical activity, menopausal status, medical history, and medications were investigated using a medical questionnaire. Height (cm), weight (kg), and waist circumferences (WC, cm) were measured using standard methods. Systolic and diastolic blood pressures were measured twice in accordance with standard procedures, in the sitting position after at least 10 min of rest. Postmenopausal status was defined as the permanent cessation of menstruation for at least 12 months. Smoking status was classified as current smoker, ex-smoker, and nonsmoker. Physical activity was classified as never (0 point), sporadically (1 point), more than once a month (2 points), once a week (3 points), 3 to 4 times a week (4 points), and every day (5 points). Hyperlipidemia was defined as triglycerides \geq 150 mg/dL (1.7 mmol/L) total cholesterol \geq 190 mg/dL (5.0 mmol/L), LDL-cholesterol \geq 115 mg/dL (3.0 mmol/L) and

HDL-cholesterol ≤ 45 mg/dL (1.2 mmol/L) or use of lipid-lowering medications due to a previous diagnosis. Hypertension was defined as $\geq 140/90$ mmHg or use of hypertension treatment [13]. Type 2 diabetes was diagnosed according to a fasting glucose level in plasma ≥ 126 mg/dL (≥ 7.0 mmol/L) repeated on two consecutive days, or HbA1c above or equal to 6.5% (48 mmol/mol) or self-reported, physician-diagnosed diabetes and the use of glucose-lowering medications for diabetes. Impaired fasting glucose (prediabetes) was indicated by a fasting glucose level in plasma of 5.6–6.9 mmol/L (100–125 mg/dL) and a normal fasting glucose of < 5.6 mmol/L (100 mg/dL) [19]. An insulin-resistant state was diagnosed in women with HOMA-IR > 2.3 [20]. The median cutoff value for BCAAs was used [475.0 μ mol/L (422.8–566.4); $n = 349$]. The 75th percentile cutoff values for total calcium (TCa), albumin-corrected calcium (CCa) and glycated hemoglobin (HbA1c) were used [2.36 mmol/L (2.27–2.45); 2.26 mmol/L (2.20–2.38); 37.0 mmol/mol (33.0–39.0) $n = 349$, respectively].

The study participants continued their normal omnivorous diet regimen. None of them followed an elimination or high-protein diet. Dietary supplements, including BCAAs, calcium, vitamin D and protein supplements (e.g., whey, casein), were not used either.

The women were divided into 2 groups. A normoglycemic group (NG, $n = 184$): women with a normal fasting glucose, without a history of diabetes, and with HOMA-IR < 2.3 . A dysglycemic group (DG, $n = 165$): women with at least one of the following criteria: diabetes, prediabetes, HOMA-IR ≥ 2.3 .

2.2. Blood Sampling & Laboratory Analyses

Blood samples were collected in the early morning (7.00–9.00 a.m.) after an overnight fast (12 h). The serum was assayed for TC, LDL-C HDL-C, TG, creatinine, CRP, gamma glutamyltransferase (GGT), total calcium, and albumin, and the plasma was measured for glucose (Horiba ABX Pentra 400), and TSH (ARCHITECT ci8200, Abbott Diagnostics). The serum insulin concentration was determined using a sandwich ELISA method: Insulin: DRG MedTek, with intra-assay precision of 2.8–4.0%, and inter-assay precision of 2.6–3.6%; BCAAs were assayed using a colorimetric enzyme test (Kit Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany for the in vitro determination of total BCAAs as a sum of L-leucine, L-isoleucine and L-valine in serum) with intra-assay precision of 4.2–5.5%, and inter-assay precision of 3.7–8.9%. The EDTA blood samples were analyzed for glycated hemoglobin (HbA1c) using a Bio-Rad VARIANT II turbo (HPLC). The HOMA-IR value was calculated by dividing the fasting insulin concentration (mU/L) and the glucose concentration (mmol/L) by 22.5 [20]. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the CKD-EPI creatinine equation. A normal eGFR was defined as greater than 90 mL/min/1.73 m² [21]. The fatty liver index (FLI) was calculated using the following formula:

$$\text{FLI} = (e^{0.953 \times \log_e(\text{triglycerides})} + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log_e(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{waist circumference} - 15.745) / (1 + e^{0.953 \times \log_e(\text{triglycerides})} + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log_e(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{waist circumference} - 15.745) \times 100.$$

High risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) was defined as FLI ≥ 60 [22].

Albumin-corrected calcium was calculated using the formula: corrected calcium (mmol/L) = serum total calcium + 0.02 * (40 – serum albumin (g/L) [23].

The study protocol was approved by the Bioethics Committee at the Nicolaus Copernicus University in Torun, Collegium Medicum in Bydgoszcz, and written informed consent was obtained from all the women.

2.3. Statistical Analysis

The data were presented as means \pm standard deviation SD (Gaussian distribution) or medians and 25th and 75th percentiles (non-Gaussian distribution). The Shapiro–Wilk test was applied to test the Gaussianity. The variables were compared using the Student's *t*-test (Gaussian) or the Mann–Whitney *U* test (non-Gaussian). To test for the significance of difference between two percentages or correlation coefficients we used the chi-square (Fisher

exact) test. Significant differences between groups were also tested with the analysis of covariance (ANCOVA) with adjustment for BMI, age, and menopausal status. Parameters with non-Gaussian distribution were normalized by natural log transformation. Pearson and partial correlation coefficients were computed to assess the associations between BCAAs and various parameters (log-transformed variables). In multiple linear regression analysis, BMI, age, BCAAs, TCa or CCa were assayed as independent variables and HbA1c as a dependent variable. We applied two-way ANOVA models to evaluate the association between values of the dependent variables (cardiometabolic risk factors) and the qualitative factors: NG or DG group and BCAA concentrations above or below their median. Logistic regression was applied to examine the associations of BCAA concentration with cardiometabolic risk factors. In all the logistic models, BCAAs were included, and odds ratios (ORs) were calculated for a 10 unit increase in BCAAs. Additional logistic regression models were adjusted for age and BMI. The significance of BCAA coefficients in the logistic models was tested using Wald chi-squared statistics. The goodness of fit of the models was evaluated using the Hosmer and Lemeshow chi-square test. Additionally, ROC curves were constructed for single laboratory parameters and the area under each curve was calculated with a 95% confidence interval (AUC, 95% CI; thresholds with sensitivity and specificity). A comparison of independent ROC curves was performed. During sample size determination, a significance level of 0.05 was applied for parametric two-tailed t-Student tests with a power level of 0.9. For nonparametric Mann–Whitney tests, the minimum sample size required was increased by 15%. According to the pilot study, BCAA concentrations for the first 63 women in the DG group and for the first 59 in the NG group were 556 ± 93 and 452 ± 80 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Based on these results, we calculated that enrolment of 184 women in the NG group and 165 women in the DG group would provide a power of 100% to show a significant difference in BCAA concentrations. We decided to obtain such a high power to be able to perform credible multivariate analyses. The level of statistical significance was set as 0.05 (Statistica 13.3, StatSoft or MedCalc statistical software).

3. Results

The basal characteristics of the groups are shown in Table 1. BCAA concentrations were significantly higher in the women with dysglycemia in comparison to those with normoglycemia. This difference was still significant after adjusting for BMI, age, and menopausal status (Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of the women.

Parameters	Women with Normoglycemia <i>n</i> = 184	Women with Dysglycemia <i>n</i> = 165	<i>p</i>
BCAAs [$\mu\text{mol/L}$]	433.0 (407.2–493.8)	545.0 (468.1–620.9) §	<0.0001
Age [years]	48.4 \pm 6.0	51.2 \pm 5.5	<0.0001
BMI [kg/m^2]	24.1 (21.9–28.4)	31.2 (25.8–37.7)	<0.0001
WC [cm]	82.5 (76.5–91.5)	98.0 (87.0–110.0)	<0.0001
Glucose [mmol/L]	5.1 (4.8–5.2)	5.8 (5.4–6.9)	<0.0001
TC [mmol/L]	5.6 \pm 1.0	5.5 \pm 1.2	0.18
LDL-C [mmol/L]	3.5 \pm 0.9	3.4 \pm 1.0	0.06
HDL-C [mmol/L]	1.6 (1.4–1.9)	1.4 (1.2–1.7)	<0.0001
TG [mmol/L]	1.0 (0.8–1.3)	1.5 (1.1–2.0)	<0.0001
TG/HDL-C	3.4 (3.0–4.0)	3.7 (3.3–4.5)	<0.0001
Creatinine [mg/dL]	0.76 \pm 0.11	0.78 \pm 0.12	0.11
eGFR [ml/min/1.73 m^2]	94.1 (84.8–101.7)	89.6 (78.5–100.4)	0.008

Table 1. Cont.

Parameters	Women with Normoglycemia <i>n</i> = 184	Women with Dysglycemia <i>n</i> = 165	<i>p</i>
CRP [mg/L]	0.82 (0.33–1.76)	1.70 (0.77–4.23)	<0.0001
HbA1c [mmol/mol]	36.0 (33.0–37.0)	39.0 (36.0–44.5)	<0.0001
TSH [mIU/L]	1.4 (1.1–2.0)	1.4 (1.0–2.1)	0.8
Insulin [μIU/mL]	5.1 (3.7–6.9)	10.0 (6.3–13.0)	<0.0001
HOMA-IR	1.11 (0.79–1.56)	2.6 (1.9–3.6)	<0.0001
TCa [mmol/L]	2.32 (2.26–2.40)	2.40 (2.30–2.51)	<0.0001
CCa [mmol/L]	2.24 (2.18–2.32)	2.33 (2.22–2.44)	<0.0001
Albumin [g/L]	44.0 (42.9–45.6)	43.7 (42.4–45.9)	0.40
FLI	16.0 (8.1–37.7)	64.4 (30.4–93.5)	<0.0001
GGT [U/L]	17.4 (13.8–21.9)	22.4 (16.4–33.3)	<0.0001
SBP [mmHg]	118 (109–130)	130 (120–140)	<0.0001
DBP [mmHg]	78 (71–84)	80 (78–88)	<0.0001
Postmenopausal status [%]	38	56	0.0004
Lipid lowering therapy [%]	11	28	0.0001
Hypertension treatment [%]	13	45	<0.0001
Diabetes [%]	0	43	<0.0001
Obesity [BMI ≥ 30%]	30	70	<0.0001
Current smoker [%]	17	20	0.47
Physically active: never or sporadically [%]	31	32	0.84

Notes: Means ±SD or medians (25th and 75th percentiles) or percentage; WC—waist circumference; SBP—Systolic blood pressure; DBP—Diastolic blood pressure; eGFR—estimated glomerular filtration rate (CKD-EPI); FLI—Fatty Liver Index; § Difference in BCAA concentration was still significant after adjusting for BMI, age and menopausal status ($p < 0.0001$); CCa—albumin-corrected calcium; TCa—total calcium.

As shown in Table 2, all parameters were statistically significantly correlated ($p < 0.05$) with BCAA concentrations, except the DBP values in all the women. After adjustment for BMI and age, the correlations with LDL-C, TC/HDL-C, eGFR, FLI, CRP, and SBP became statistically insignificant. After considering the glycemic status, BCAA concentration was moderately ($0.4 \leq r < 0.6$) correlated with BMI and FLI in the NG group and with BMI, FLI, TCa, CCa, HbA1c, and TG/HDL-C in the DG group in unadjusted models. The unadjusted and adjusted correlation coefficients for TCa, CCa, HbA1c, HOMA-IR, and glucose were significantly higher in the DG group in comparison to the NG group ($p < 0.0001$; $p = 0.002$; $p = 0.004$, $p = 0.05$, $p = 0.05$ respectively; Table 2). Because BCAA concentrations are very strongly associated with BMI and tend to increase with age, we adjusted all the correlations to BMI and age. After adjustment, we observed that most of the correlations became statistically insignificant or were still significant but with very weak correlation coefficients ($r < 0.2$), especially in the NG group. Adjusted correlation coefficients were classified as weak ($0.2 \leq r < 0.4$) and were still statistically significant for eGFR (NG group), TCa, CCa, HbA1c, glucose, HDL-C, and TG/HDL-C (DG group) (Table 2).

Table 2. Unadjusted and adjusted correlation coefficients between BCAAs and cardiometabolic risk factors.

Parameters	Total Group r0/r0 *	Women with Normoglycemia r1/r1 *	Women with Dysglycemia r2/r2 *	<i>p</i> Unadjusted r1 vs. r2
Age	0.24/-	0.17/-	0.25/-	ns
BMI	0.61/-	0.49/-	0.54/-	ns
TCa	0.37/0.17	0.05 ^{ns} /-	0.46/0.31	<0.0001
CCa	0.47/0.21	0.23/0.06 ^{ns}	0.51/0.33	0.002
HbA1c	0.47/0.27	0.12 ^{ns}	0.41/0.30	0.004
HOMA-IR	0.41/0.18	0.07 ^{ns}	0.27/0.16	0.05
Glucose	0.40/0.32	0.10 ^{ns}	0.30/0.26	0.05
TC	-0.22/-0.13	-0.17/-0.18	-0.22/-0.09 ^{ns}	ns
LDL-C	-0.20/-0.09 ^{ns}	-0.12 ^{ns} /-	-0.19/-0.07 ^{ns}	ns
HDL-C	-0.46/-0.20	-0.33/-0.17	-0.46/-0.26	ns
TG	0.38/0.14	0.19/0.07 ^{ns}	0.33/0.14 ^{ns}	ns
TG/HDL-C	0.47/0.20	0.28/0.12 ^{ns}	0.43/0.21	ns
TC/HDL-C	0.28/0.10 ^{ns}	0.18/0.04 ^{ns}	0.28/0.15 ^{ns}	ns
eGFR	-0.29/-0.11 ^{ns}	-0.28/-0.22	-0.23/-0.02 ^{ns}	ns
FLI	0.57/0.10 ^{ns}	0.49/0.008 ^{ns}	0.48/0.10 ^{ns}	ns
CRP	0.44/0.08 ^{ns}	0.36/0.17	0.35/0.04 ^{ns}	ns
SBP	0.18/0.004 ^{ns}	0.06 ^{ns} /-	0.08 ^{ns} /-	ns
DBP	0.07 ^{ns} /-	-0.02 ^{ns} /-	-0.09 ^{ns} /-	ns

Notes: r—correlation coefficient; All correlations were statistically significant $p < 0.05$ except for correlations flagged with ns; ns—not significant; CCa—albumin-corrected calcium; TCa—total calcium; r0, r1, r2—unadjusted correlation coefficients; r0 *, r1 *, r2 * correlation coefficients adjusted for age and BMI.

We applied two-way ANOVA models (Figure 1) to evaluate the association between values of the cardiometabolic risk factors, e.g., corrected Ca, total Ca, and CRP etc. with glycemic status (NG or DG group) and BCAA concentrations above or below their median (475 $\mu\text{mol/L}$). This analysis aims to examine how the coexistence of NG or DG status with an elevated BCAA concentration affects the values of cardiometabolic risk factors. In summary of the comparisons of the NG and DG women after defining subgroups according to the values of BCAAs, we observed that the differences in values of TCa, CCa, and HbA1c, and the occurrence of hypertriglyceridemia were statistically significantly higher between the NG and DG groups when the women had BCAA concentrations above 475 $\mu\text{mol/L}$ in comparison to women with BCAA concentrations below 475 $\mu\text{mol/L}$. In other words, these results may suggest that the coexistence of increased BCAA values (above the median) with dysglycemic status is associated with markedly higher concentrations of TCa, CCa, HbA1c, and TG (p for difference between NG and DG in women with BCAAs $> 475 \mu\text{mol/L}$: all $p < 0.0001$), which was not observed in women with BCAA values below the median (p for difference between NG and DG in women with BCAAs $< 475 \mu\text{mol/L}$: 0.90; 0.71; 0.01; 0.16; respectively), while the increases in the values of HOMA-IR, CRP, and FLI, the occurrence of hypertension or HDL-C $< 45\text{mmol/L}$ or their treatment, or a decrease in eGFR in the DG group were not statistically different between BCAA subgroups (Figure 1).

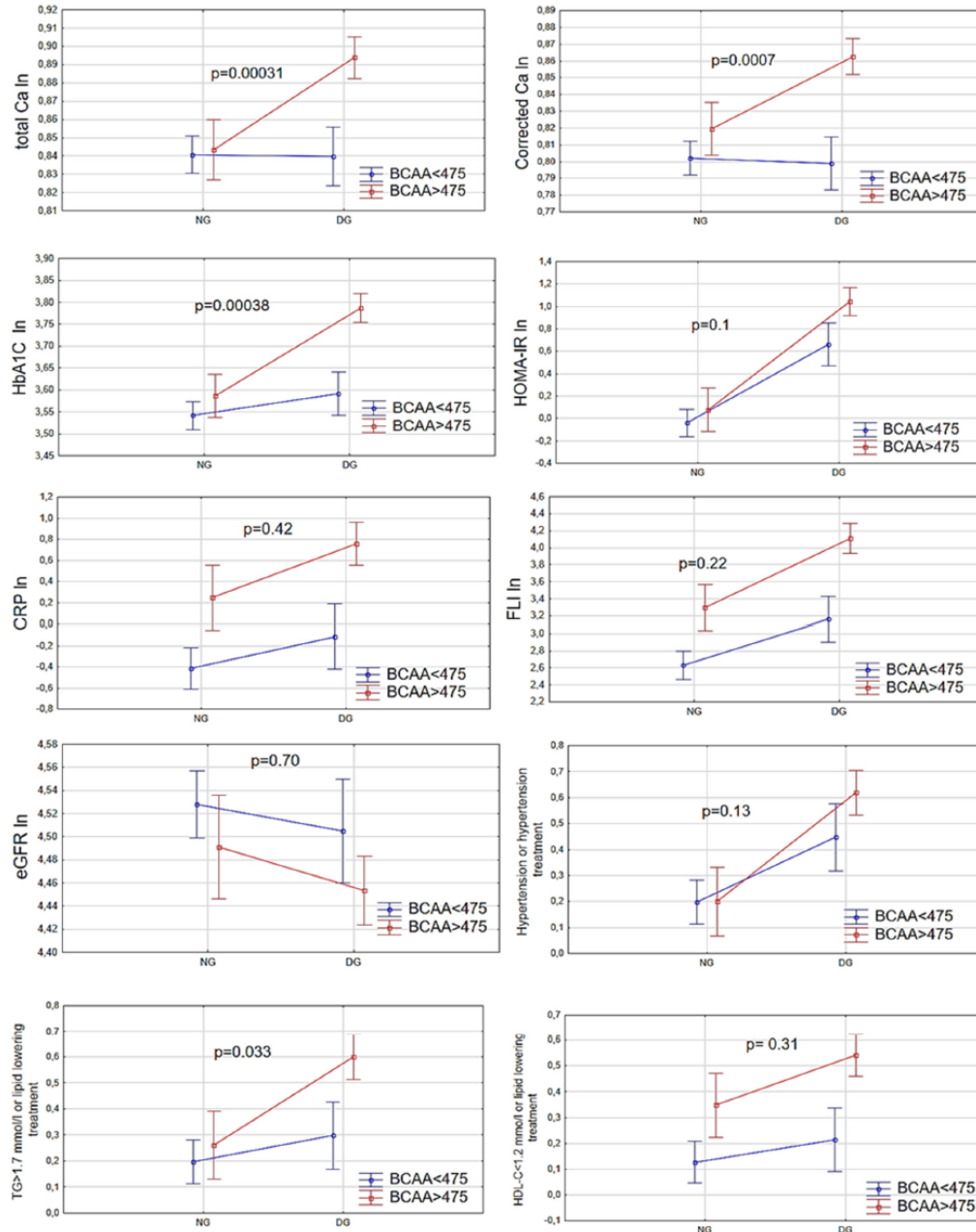


Figure 1. Results of cardiometabolic risk factors in relation to glycemic status (NG, DG) and BCAA concentrations above or below their median (475 $\mu\text{mol/L}$) in the women. Two-way ANOVA; the glycemic status and BCAA subgroups as the qualitative factors, and total Ca, corrected Ca, HbA1c, HOMA-IR, CRP, FLI, eGFR, hypertension or hypertension therapy, and dyslipidemia (HDL < 1.2 mmol/L, TG > 1.7 mmol/L or lipid-lowering treatment) as dependent variables. NG—normoglycemic group, DG—dysglycemic group.

To assess the association between BCAAs and cardiometabolic risk factors in total, and in both NG and DG groups separately, we performed logistic regression- and

ROC curve- analyses. As shown in Table 3, the BCAA serum levels were significantly associated with the probability of all cardiometabolic risk factors in all groups, except TC/HDL-C > 4.5 (DG group) and TC/HDL-C > 4.5, TG > 1.7, HbA1c > 39 and hypertension or hypertension treatment (NG group). In the unadjusted models, each 10 $\mu\text{mol/L}$ increase in BCAA concentrations increased the probability of cardiometabolic risk factors between 2% for TC/HDL-C > 4.5 in the DG group and 19% for FLI > 60 in the NG group. We observed higher associations of BCAA concentration with CcA > 2.38 mmol/L, TCa > 2.45 mmol/L, and HbA1c > 39 mmol/mol in the DG group in comparison to the NG group in the crude models, while the associations between BCAAs and FLI > 60 or CRP > 3.0 mg/L were stronger in the NG group. After adjusting for BMI and age, models for HbA1c > 39 mmol/mol (in total and DG group), CcA > 2.38 mmol/L (in total and DG group), TCa > 2.45 mmol/L (in total and DG group), eGFR < 90 (in total and NG group), HDL < 1.2 mmol/L (in total and DG group), and TG > 1.7 mmol/L (in total) were still statistically significant (Table 3). After additional adjustment for glycemic status (in total group), models for CcA > 2.38 mmol/L (OR 95%CI 1.07 (1.03–1.12)), TCa > 2.45 mmol/L (OR 95%CI 1.05 (1.01–1.09)), HbA1c > 39 mmol/mol (OR 95%CI 1.04 (1.0–1.09)) and eGFR < 90 (OR 95%CI 1.04 (1.0–1.07)) were still statistically significant ($p < 0.05$).

Table 3. Associations of BCAAs with cardiometabolic risk factors in logistic regression models.

Cardiometabolic Risk Factor	Total Group	NG Group	DG Group	Total Group	NG Group	DG Group
	Unadjusted ORs (95%CI) per10 unit increase in BCAAs			Adjusted for age and BMI ORs (95%CI) per10 unit increase in BCAAs		
CcA > 2.38 [mmol/L]	1.15 (1.11–1.19) \$	1.11 (1.04–1.18) &	1.16 (1.10–1.22) \$	1.09 (1.05–1.14) \$	1.03 (0.96–1.11)	1.13 (1.07–1.19) \$
TCa > 2.45 [mmol/L]	1.11 (1.08–1.15) \$	1.07 (1.01–1.13) *	1.12 (1.07–1.17) \$	1.07 (1.03–1.11) &	1.01 (0.94–1.07)	1.10 (1.05–1.15) \$
HbA1c > 39 [mmol/mol]	1.10 (1.07–1.13) \$	1.03 (0.97–1.10)	1.11 (1.06–1.15) \$	1.10 (1.06–1.15) \$	1.03 (0.95–1.10)	1.09 (1.04–1.14) &
FLI > 60	1.17 (1.13–1.21) \$	1.19 (1.15–1.25) \$	1.13 (1.08–1.17) \$	1.04 (0.97–1.09)	1.06 (0.95–1.15)	0.98 (0.90–1.04)
eGFR < 90 mL/min/1.73 m ²	1.06 (1.03–1.09) \$	1.09 (1.04–1.15) &	1.06 (1.03–1.09) *	1.04 (1.0–1.07) *	1.08 (1.02–1.15) *	1.02 (0.97–1.06)
TG > 1.7 [mmol/L]	1.06 (1.04–1.09) \$	1.03 (0.98–1.09)	1.04 (1.07–1.08) *	1.04 (1.0–1.07) *	0.98 (0.92–1.04)	1.03 (0.99–1.07)
HDL < 1.2 [mmol/L]	1.09 (1.06–1.12) \$	1.09 (1.04–1.16) &	1.07 (1.03–1.12) *	1.05 (1.01–1.08) &	1.04 (0.97–1.12)	1.05 (1.10–1.09) *
CRP > 3.0 [mg/L]	1.10 (1.07–1.13) \$	1.12 (1.05–1.20) &	1.07 (1.03–1.11) &	1.0 (0.96–1.05)	0.90 (0.91–1.07)	0.99 (0.95–1.04)
TC/HDL-C > 4.5	1.05 (1.02–1.07) &	1.03 (0.98–1.08)	1.02 (0.99–1.06)	1.01 (0.98–1.04)	0.97 (0.92–1.0)	1.01 (0.97–1.05)
Hypertension or therapy	1.07 (1.04–1.10) \$	1.03 (1.0–1.08)	1.04 (1.0–1.10) *	1.02 (0.98–1.05)	0.98 (0.92–1.05)	0.99 (0.96–1.04)

Notes: ORs—odd ratios, CI—confidence interval; * $p < 0.05$; & $p < 0.001$; \$ $p < 0.0001$; CcA—albumin-corrected calcium; TCa—total calcium; eGFR—estimated glomerular filtration rate; FLI—Fatty Liver Index; NG—normoglycemic group, DG—dysglycemic group.

ROC curve analyses revealed that BCAAs had good diagnostic accuracy for prediction of the occurrence of CcA > 2.38 mmol/L (DG; AUC (95CI) 0.84 (0.76–0.89); sensitivity 89% and specificity 73%) and FLI > 60 (NG; AUC (95CI) 0.85 (0.79–0.91); sensitivity 81% and specificity 75%), according to the AUC value in the ROC analysis, and fair diagnostic accuracy for the prediction of the occurrence of TCa > 2.45 mmol/L (DG), HbA1c > 39 mmol/mol (DG), FLI > 60 (NG), CRP > 3.0 mg/dL (NG) (Table 4).

Table 4. AUC values for associations between BCAAs and cardiometabolic risk factors according to glycemic status.

Cardiometabolic Risk Factor	Total Group AUC (95% CI)	NG Group AUC (95% CI)	DG Group AUC (95% CI)	<i>p</i> NG vs. DG
CCa > 2.38 mmol/L	0.81 (0.76–0.85)	0.67 (0.59–0.74)	0.83 (0.76–0.89)	0.043
TCa > 2.45 mmol/L	0.75 (0.69–0.79)	0.61 (0.54–0.69)	0.77 (0.69–0.83)	0.048
HbA1c > 39 mmol/mol	0.76 (0.70–0.80)	0.60 (0.52–0.68)	0.73 (0.63–0.78)	0.115
FLI > 60	0.84 (0.79–0.88)	0.85 (0.79–0.91)	0.75 (0.68–0.82)	0.111
eGFR < 90 mL/min/1.73 m ²	0.65 (0.60–0.71)	0.67 (0.59–0.74)	0.65 (0.59–0.71)	0.621
TG > 1.7 mmol/L	0.69 (0.63–0.74)	0.57 (0.47–0.63)	0.63 (0.55–0.77)	0.273
HDL < 1.2 mmol/L	0.75 (0.69–0.79)	0.67 (0.59–0.74)	0.68 (0.60–0.75)	0.874
CRP > 3.0 mg/L	0.77 (0.72–0.81)	0.79 (0.71–0.84)	0.68 (0.60–0.76)	0.191
TC/HDL-C > 4.5	0.65 (0.59–0.70)	0.58 (0.49–0.65)	0.57 (0.50–0.66)	0.817
Hypertension or therapy	0.67 (0.61–0.72)	0.54 (0.46–0.62)	0.60 (0.51–0.67)	0.487

Notes: Area under the curve (AUC), confidence interval (CI), CCa—albumin-corrected calcium; TCa—total calcium; eGFR—estimated glomerular filtration rate; FLI—Fatty Liver Index; NG—normoglycemic group, DG—dysglycemic group.

As our previous results showed that dysglycemic status has the biggest impact on the relationship between BCAAs and serum calcium or HbA1c concentrations, we decided to evaluate the additional correlation and multiple regression analyses between these parameters. We found that HbA1c did not correlate significantly with TCa ($r = 0.09$, $p = 0.25$) or CCa concentrations ($r = 0.14$, $p = 0.06$) in the normoglycemic group, while we observed a significant relationship between HbA1c and TCa ($r = 0.40$, $p < 0.0001$) or CCa ($r = 0.46$, $p < 0.0001$) in the dysglycemic group.

In order to examine which parameters are most strongly related to values of HbA1c, we analyzed the multiple regression between HbA1c (dependent variable) and BCAAs, serum calcium (CCa or TCa), BMI and age (independent variables) in the DG group. We observed that BCAAs, TCa or CCa, and age were significantly associated with HbA1c concentration independently of BMI values (BMI was insignificant in these models) in the dysglycemic group (model with TCa: $R^2 = 0.28$, $p < 0.0001$; TCa beta 0.21, $p = 0.017$; BCAAs beta = 0.3, $p = 0.0008$; age beta = 0.18, $p = 0.03$) or (model with CCa: $R^2 = 0.28$, $p < 0.0001$; CCa beta = 0.29, $p = 0.0009$; BCAAs beta = 0.23, $p = 0.005$; age beta = 0.16, $p = 0.03$).

4. Discussion

The main finding of this study is that dysglycemic status predisposed individuals to a significant positive association between concentration of total BCAAs and circulating calcium, HbA1c, glucose, and HOMA-IR, and these relationships were independent of BMI and age. We also found significant correlations with CRP, HDL-C, TG, FLI, and eGFR, but these relationships were partially explained by BMI and age, except for HDL-C, which correlated with BCAAs independent of BMI and age. The relationships between BCAA concentrations and conventional cardiometabolic risk factors like dysglycemia, dyslipidemia, fatty liver disease, and inflammation have been shown by other authors. However, to the best of our knowledge, the relationship between concentration of BCAAs and serum calcium in combination with glycemic status has not been studied so far.

4.1. The Relationship of BCAAs with the Assessments of Glycemic Status

In this study, the total BCAA concentrations were significantly higher in the DG women even after adjusting for BMI and age, which suggests that dysglycemic status per se was associated with higher concentrations of BCAAs. The relationship between BCAAs and insulin-resistance and diabetes is well known [8,17,24–27]. We also observed statistically significant correlations between BCAAs and glucose, HbA1c and HOMA-IR values in all the studied women. Some earlier studies found that the concentrations of BCAAs are lower in women than in men and the relationship between glycemic status and insulin resistance is weaker in women in comparison to men, especially at a young age and with a normoglycemic status [17,18]. On the other hand, the positive relationship between BCAAs and HOMA-IR, regardless of gender, age, T2DM, or BMI, has been shown

by other authors [24,25]. In this study, we found that the relationship of total BCAAs to HOMA-IR was significantly weaker in normoglycemic middle-aged women in comparison to dysglycemic women, and this relationship persisted after adjustment for BMI and age in the dysglycemic state. Contrary to our correlation results, Wiklund et al. found that normoglycemic women with high HOMA-IR (above median HOMA-IR > 1.56) had higher serum BCAA concentrations in comparison to low HOMA-IR normoglycemic women and the authors concluded that this insulin resistance was associated with increased serum BCAA levels in the normoglycemic state [27]. This difference may be partially explained by the fact that our normoglycemic women had the more efficient glucose metabolism (a lower median of HOMA-IR), which could weaken the pathophysiological relationships between BCAAs and insulin resistance. Moreover, the results of two-way ANOVA showed that the NG women with high BCAA concentrations had only slightly higher HOMA-IR, which may suggest that in the normoglycemic condition without insulin resistance (HOMA-IR < 2.3) increased BCAA concentrations have a weaker association with glucose metabolism.

In this study, the relationship between BCAAs and HbA1c was stronger in the dysglycemic group of women than in the normoglycemic one. The probability of a high HbA1c with each 10 $\mu\text{mol/L}$ increase in BCAA concentration was about 4 times lower in the NG group in comparison to the DG group (3% vs. 11%). Moreover, the coexistence of increased BCAA values with dysglycemic status was associated with markedly higher concentrations of HbA1c. Although previous studies have extensively described the relationship between BCAAs and HOMA-IR, so far only individual, isolated studies have also considered the relationship between BCAAs and HbA1c. Fiehn et al. observed that concentrations of leucine and valine increased with an increase in HbA1c in obese African American women [28]. In 2017, Barceló et al. observed that isoleucine levels were associated with HbA1c even more strongly than with HOMA-IR in subjects with morbid obesity and sleep apnea [29]. Mels et al. observed that, in individuals with impaired glucose metabolism and elevated levels of glycated hemoglobin (HbA1c > 5.6%), BCAA concentrations were significantly higher than in the group with low HbA1c levels [13]. Therefore, our results are consistent with other observations which have been performed in obese and dysglycemic women. To the best of our knowledge, the relationship between BCAA and HbA1c values in normoglycemic Caucasian women without insulin resistance has not been studied so far. However, our results for HbA1c seem to be consistent with our results for HOMA-IR.

4.2. Potential Pathophysiology Linked BCAAs with Dysglycemia

Various factors are involved in the regulation of circulating concentrations of BCAAs. The most important of these are dietary, genetic, and metabolic factors. With regard to dietary factors, we know that dietary proteins and amino acids are important modulators of glucose metabolism and insulin sensitivity [30]. The consumption of certain protein products, such as increased consumption of processed red meat in particular, which is also a source of BCAAs, has been linked to biomarkers of inflammation, the development of type 2 diabetes, and cardiovascular disease [31,32]. It is worth noting, however, that among the total pool of amino acids contained in red meat, BCAAs do not exceed 16%; the rest are other essential and non-essential amino acids, especially large neutral amino acids, the intake of which, along with the daily diet, significantly exceeds the intake of BCAAs [33]. It is of note that amino acids other than BCAAs that are found in food proteins may also be connected to insulin secretion or insulin resistance as well as having a potential influence on BCAA metabolism and utilization. For this reason, it would be important to analyze the plasma concentrations of other amino acids, e.g., glutamine, to understand this complex issue [34–36]. Our women continued their normal omnivorous diet regimen. None of them followed an elimination or high protein diet or took BCAA protein supplements. There are also reports suggest that protein intake and total calories do not significantly affect the relationship between BCAAs and insulin resistance or diabetes risk [9,37]. In the longitudinal Nurses' Health Study, high total dietary BCAA intake was associated with a risk of T2DM only among women with high plasma BCAA concentrations at baseline, which may

suggest that factors other than dietary intake may determine plasma BCAA levels [38]. It is a very controversial issue whether BCAAs are a cause or consequence of insulin resistance. There is much evidence supporting the hypothesis that an increase in plasma BCAAs may be a consequence of insulin resistance. It is well-documented that obesity and insulin-resistance are associated with reduced catabolism of BCAAs caused by lowered activity of the branched-chain α -keto-acid dehydrogenase complex (BCKDC), which results in accumulation of BCAAs and branched-chain-ketoacids [39,40]. In 2013, Lackey et al. found that metabolically unhealthy obese humans had lower BCAA catabolic enzyme expression in white adipose tissue (WAT) in comparison to obese healthy subjects and improvement in glucose utilization in adipocytes was associated with higher expression of BCAA catabolic enzymes in adipocytes and WAT [41]. A recently published Mendelian randomization report also supports this hypothesis, indicating that HOMA-IR is causally related to higher circulating fasting BCAA levels according to genetic risk score analysis [42]. It was also found that therapies with BCAAs did not raise the concentrations of glucose in patients with liver cirrhosis [43,44] and prolonged essential amino acid supplementation (with 62% BCAAs) did not decrease insulin sensitivity in healthy older adults with moderate protein intake [45]. Moreover, BCAA levels were decreased with improvement in HbA1c values after glucose-lowering therapies in T2DM patients [46]. On the other hand, other studies suggest that accumulation of BCAAs may have a negative effect on insulin sensitivity and can play a causal role in the development of insulin resistance and T2DM. One possible mechanism is that BCAAs promote insulin resistance by activating the mammalian target of the rapamycin 1 complex (mTORC1) and ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1). High concentrations of BCAAs activate the mTORC1/S6K1 kinase pathway, resulting in insulin resistance through the phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), leading to blocked insulin signaling [47,48]. Moreover, Saha et al. observed that incubation of rat skeletal muscle with moderately elevated concentrations of leucine or glucose suppresses 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and concomitantly increases mTORC1/S6K1 signaling and protein synthesis and leads to insulin resistance [49]. The results of our two-way ANOVA suggest that DG status is mainly associated with an increase in HOMA-IR values with a lower impact of high BCAAs, while an increase in the concentration of HbA1c is statistically stronger when dysglycemia coexists with high BCAA values. We hypothesize that this may be explained by the fact that chronic exposure to moderately elevated BCAA values added to hyperglycemia or pro-inflammatory conditions could decrease the threshold of mTOR phosphorylation and increase reactive oxygen species (ROS) formation [50]. The accumulation of ROS results in the induction of a glycoxidation reaction, which may lead to the elevated endogenous production of HbA1c and advanced glycation end-products (AGEs) [51]. We also observed that, even after adjustment for age, BMI and glycemic status, the association between BCAAs and HbA1c persisted, which may suggest that different mechanisms regulate this relationship.

4.3. The Association between BCAAs and Serum Calcium Concentration in Relation to Glycemic Status

As our results showed that dysglycemic status has the biggest impact on the relationship between BCAAs and serum calcium or HbA1c concentrations, we decided to evaluate more precisely the relationship between these parameters. We found higher concentrations of serum calcium in the DG group in comparison to the NG group. HbA1c concentrations were significantly positively related with serum calcium concentrations independently of BMI and age in the dysglycemic women, while we did not observe such a relationship in the normoglycemic group. The concentration of serum calcium may be used as a cardiometabolic risk factor because many studies have confirmed the positive association of circulating calcium levels with a higher risk of vascular disease and death, which was presented in a meta-analysis of Reid et al. However, as the authors of this meta-analysis emphasize, the determination of causality in this relationship is difficult [16]. Many studies have provided evidence that higher circulating calcium levels are associated with an increased risk of T2DM, which was recently summarized in a meta-analysis of

Zhu et al. [52]. It has also been found that elevated serum calcium concentrations are associated with insulin resistance and impaired glucose tolerance [53–55]. But the results of some case–control and cross-sectional studies do not support these observations [56,57]. Additionally, the data on the correlation between serum calcium concentration and HbA1c values are inconsistent. Akter et al. found that serum calcium levels are positively associated with HbA1c among apparently healthy Japanese adults [58]. In contrast, Hassan et al. and Marshnil et al. observed a negative relationship between serum calcium and HbA1c in T2DM patients [59,60]. These differences may be partially explained by the use of different calcium measurements or heterogeneous study populations. The concentration of serum calcium may be analyzed as total calcium, albumin-corrected calcium, or ionized calcium. The measurement of ionized calcium seems to be the best form because it represents the physiologically active proportion of calcium in the serum, but the method of its measurement is difficult and for that reason it is not routinely used, even in research studies [61]. In this study, we analyzed total calcium and albumin-corrected calcium. The adjustment of calcium concentration for albumin is advisable because approximately 40% of Ca in the serum is bound to albumin [62]. Nevertheless, our results for total calcium and albumin-corrected calcium are generally consistent, although the correlation coefficient values for total calcium and BCAAs were weaker than for albumin-corrected calcium, especially in the normoglycemic women. Differences were also observed among both sexes and ethnic groups [63,64]. The pathophysiological connection between serum calcium concentration and glucose metabolism is mainly explained by the function of the calcium-sensing receptor (CaR), which is expressed in pancreatic islets of Langerhans [65]. Glucose-dependent insulin secretion from the pancreatic β -cells is a process that is regulated by the calcium-dependent signaling pathway [14,66,67] and a high calcium concentration may induce β -cell dysfunction [63]. Moreover, it was observed that calcium status impacts insulin sensitivity and glucose transport in adipocytes and skeletal muscle through regulating the glucose transporter type 4 (GLUT4) expression [68,69].

As mentioned above, the relationships between insulin-resistance or diabetic state and BCAAs or serum calcium have been presented by other authors but, to the best of our knowledge, there is no evidence concerning the relationship between serum calcium and BCAA concentrations in relation to the assessment of glycemic status.

Our results show that the coexistence of increased BCAA values with dysglycemic status is associated with markedly higher concentrations of serum calcium, which is not observed in dysglycemic women with BCAA values below the median. These results may suggest that the coexistence of elevated BCAA levels with a dysglycemic state is closely related with circulating calcium concentration. In the normoglycemic women, we did not observe such differences between BCAA subgroups. Moreover, our multiple regression analysis showed a positive association between HbA1c and serum calcium and BCAAs independently of BMI only in the dysglycemic women.

4.4. Potential Pathophysiology Linked BCAAs Metabolism with Circulating Calcium Concentration

We hypothesize that the mTOR signaling pathway may have linked the BCAAs to calcium and glucose metabolism. However, the results of our study are not able to establish a cause-and-effect relationship between these factors. As mentioned above, high concentrations of BCAAs may activate the mTORC1/S6K1 kinase pathway, resulting in insulin resistance. It has also previously been observed that calcium ions (Ca^{2+}) are required for mTORC1 and S6K1 activation in response to amino acids, especially leucine. Mercan et al. showed that activation of S6K1 by leucine requires the mobilization of intracellular calcium (Ca^{2+}), which is mediated by the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in an inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent manner in skeletal myoblasts. Interestingly, the increase in Ca^{2+} is specific to leucine since isoleucine did not induce a Ca^{2+} response under similar conditions [70]. However, a thorough understanding of how amino acids control Ca^{2+} -mediated activation of S6K1 has yet to be fully attained. Therefore, our findings may suggest that a dysglycemic state with elevated BCAAs and serum calcium concentrations

may reflect the increased mTORC1 activation. Moreover, it was also found that prolonged culture with leucine upregulates ATP synthase, glucokinase, and cytosolic Ca^{2+} and results in glucose-induced insulin secretion in rat β -cell islets [71]. Glucose also inhibits leucine's effects on insulin secretion via allosteric inhibition of glutamate dehydrogenase [72]. Thus, it seems that leucine and glucose in calcium-dependent processes may regulate metabolism using different mechanisms which are not fully understood. In this study, we measured serum calcium, but most of the above-mentioned reactions involve cytosolic calcium. There is some evidence which links serum calcium to its cytosolic level. The elevated concentration of serum calcium reflects its extracellular level, which may be related with impairment of voltage-gated calcium channels, which are necessary for insulin secretion [73]. Moreover, Aoki et al. observed that an increased serum calcium concentration led to calcium influx into arterial smooth muscle, which increases cytosolic calcium [74].

4.5. The Relationship of BCAAs with Other Conventional Cardiometabolic Risk Factors

In our study, we also observed a statistically significant negative correlation between total BCAAs and HDL-C concentration and positive correlations between BCAAs and TG or TG / HDL-C values in all the women even after adjustment for age and BMI. Additionally, our results suggest that the relationship between total BCAAs and HDL-C is independent of BMI, age, and glycemic status, while the relationship with TG is stronger in dysglycemic conditions and is mainly explained by obesity. Moreover, our two-way ANOVA showed that the coexistence of elevated BCAA values with dysglycemia particularly predisposes women to significantly higher concentrations of TG. Our findings are partially consistent with previous reports. Two prospective studies showed that increased serum BCAA concentrations are associated with an increased risk of elevated TG concentration in European and Japanese populations [75,76]. Another Chinese study showed that total BCAA concentrations are associated not only with elevated TG levels but also with lowered HDL-C levels, independent of fasting blood glucose, and the ORs for reduced HDL-C and raised TG were higher in a high HbA1c group in comparison to a low HbA1c group [11]. In 2019, Fukushima et al. observed similar relationships between BCAAs and lipids in subjects without T2DM in a cross-sectional study of the Asian population [66]. We also found negative weak correlations of total BCAAs with TC and LDL-C. The data on TC and LDL-C association with BCAA concentrations are inconsistent. One study found positive weak correlations and another a lack of such a relationship [11,76,77]. Therefore, both our results and the results of other authors suggest that an increased concentration of BCAAs may be associated with dyslipidemia. The relationship between dyslipidemia and BCAAs may be explained by several potential mechanisms. The products of BCAA catabolism are involved in the biosynthesis of lipids. Leucine can be degraded to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, which is one of the intermediates of the cholesterol synthesis pathway [78,79]. There is also a hypothesis that an increase in isoleucine degradation is associated with the accumulation of odd chain fatty acids (propionyl-CoA, a product of isoleucine degradation, might be a substrate for odd chain fatty acid synthesis) [78]. It was also reported that leucine in the mTOR signaling pathway promotes lipid synthesis by activating the sterol regulatory element-binding transcription factor-1, which is a master transcriptional regulator of insulin-stimulated fatty acid synthesis [80–82]. Additionally, high concentrations of BCAAs impair glucose metabolism and are positively associated with NAFLD risk, which impairs lipid homeostasis leading to upregulation of hepatic de novo lipogenesis and accumulation of triglycerides [83,84].

We also demonstrated a positive correlation between BCAAs and FLI values which was independent of glycemic status but became significantly attenuated after adjusting for BMI and age. We observed a similar tendency for a relationship between CRP and BCAAs. The results of our logistic regression and ROC analyses showed that these relationships were even stronger in the normoglycemic than the dysglycemic women. FLI is a simple algorithm based on waist circumference, BMI, TG, and GGT for the prediction of NAFLD risk [22]. Therefore, loss of statistical significance after adjustment for BMI may be explained

simply by the fact that both these parameters, BCAAs and FLI values, are strongly related to BMI. The relationship between FLI and BCAAs has recently been observed by Berg et al. In this large-scale study among a Caucasian population without T2DM at baseline, FLI was related to total BCAAs independently of many factors, including insulin-resistance and β -cell function (the authors did not adjust for BMI) [84]. The pathophysiological mechanism of the relationship between liver dysfunction and BCAAs is complex, bidirectional, and linked to obesity and insulin resistance, and these relationships have been widely described by others [85–89]. Our results also suggest that the relationship between CRP and BCAA concentrations is independent of glycemic status and is mainly explained by BMI values. Most recently, Hamaya et al. showed a positive relationship between CRP and BCAAs which was independent of established CVD risk factors, including BMI, in a cross-sectional analysis of 19,472 women without a history of T2DM, CVD [90]. On the other hand, Sun et al. did not observe a relationship between BCAAs and CRP or IL-6 in a Chinese cohort (317 men and 294 women) [91]. In vitro studies showed that in cultured human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), high BCAA concentrations promote oxidative stress from NADPH oxidase and mitochondria, the release of pro-inflammatory cytokines mediated by the activation of the nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), and the migration of PBMC via the activation of the mammalian target of rapamycin (mTORC1) axis [50]. Taken together, it seems that obesity related chronic diseases like insulin-resistance, NAFLD, inflammation, and dyslipidemia are linked to elevated circulating BCAAs, and these relationships may be explained by different mechanisms and, what is more, the cause-and-effect relationship is complex and not fully understood.

Our study has some limitations. The first limitation is the small size of the study groups. For this reason, we could not perform multifactor adjustments of our analyses. The second is the use of the enzymatic method for BCAAs, which measured only total BCAAs (as a sum of leucine, isoleucine, and valine). As was previously observed, the correlation between total BCAA concentrations measured by HPLC and by enzymatic analysis was excellent [92]. The enzymatic method for BCAAs is easy to perform, fast, and relatively cheap and does not require any highly specialized equipment, so it would be used in most clinical laboratories. Moreover, most previous studies have shown that the concentration of total BCAAs is associated with metabolic factors to a similar extent as individual BCAAs or even that this relationship is stronger [12]. Another limitation of our study is the lack of measurement of parathyroid hormone (PTH), phosphorus, and vitamin D, which are involved in the regulation of circulating calcium concentration. However, it was observed that an association between elevated serum calcium concentration and glucose, insulin resistance, or T2DM remained significant even after adjusting for these parameters [63]. Moreover, our study is not able to establish the biological mechanisms or causality responsible for the relationship between circulating calcium and BCAAs. We only showed the statistical relationships between these parameters and suggested some potential mechanisms based on the literature review.

5. Conclusions

In conclusion, total BCAA concentrations are associated with dysglycemia, dyslipidemia, inflammation, and NAFLD risk. The dysglycemic state in particular strongly predisposes women to significant positive relationships between total BCAAs and circulating calcium and HbA1c independent of BMI, and these relationships may potentially reflect the pathophysiological calcium-dependent mechanisms connecting BCAAs with metabolic disturbances.

Author Contributions: Conceptualization, J.K., A.S.; methodology, J.K., A.S., P.C.; software, A.S., J.K.; formal analysis, A.S.; investigation, J.K., A.S.; resources, P.C., A.S.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, J.K., A.S.; writing—review and editing, A.S., J.K.; visualization, J.K., A.S., G.S.; supervision, A.S.; project administration, A.S., J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Nicolaus Copernicus University in Toruń functioning at Collegium Medicum in Bydgoszcz (approval number KB 392/2018). All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations of the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wu, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* **2009**, *37*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Harris, R.A.; Joshi, M.; Jeoung, N.H.; Obayashi, M. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1527S–1530S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Górska-Warsewicz, H.; Laskowski, W.; Kulykovets, O.; Kudlińska-Chylak, A.; Czczotko, M.; Rejman, K. Food products as sources of protein and amino acids—the case of Poland. *Nutrients* **2018**, *10*, 1977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Neinast, M.; Murashige, D.; Arany, Z. Branched chain amino acids. *Annu. Rev. Physiol.* **2019**, *81*, 139–164. [[CrossRef](#)]
5. Saad, M.J.; Santos, A.; Prada, P.O. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology* **2016**, *31*, 283–293. [[CrossRef](#)]
6. Lynch, C.J.; Adams, S. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 723–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. White, P.J.; Lapworth, A.L.; An, J.; Wang, L.; McGarrah, R.W.; Stevens, R.D.; Ilkayeva, O.; George, T.; Muehlbauer, M.J.; Bain, J.R.; et al. Branched-chain amino acid restriction in Zucker-fatty rats improves muscle insulin sensitivity by enhancing efficiency of fatty acid oxidation and acyl-glycine export. *Mol. Metab.* **2016**, *5*, 538–551. [[CrossRef](#)]
8. Newgard, C.B.; An, J.; Bain, J.R.; Muehlbauer, M.J.; Stevens, R.D.; Lien, L.F.; Haqq, A.M.; Shah, S.H.; Arlotto, M.; Slentz, C.A.; et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* **2009**, *9*, 311–326. [[CrossRef](#)]
9. Wang, T.J.; Larson, M.; Vasan, R.S.; Cheng, S.; Rhee, E.P.; McCabe, E.; Lewis, G.D.; Fox, C.S.; Jacques, P.F.; Fernandez, C.; et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 448–453. [[CrossRef](#)]
10. Yang, R.; Dong, J.; Zhao, H.; Li, H.; Guo, H.; Wang, S.; Zhang, C.; Wang, S.; Wang, M.; Yu, S.; et al. Association of branched-chain amino acids with carotid intima-media thickness and coronary artery disease risk factors. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99598. [[CrossRef](#)]
11. Yang, P.; Hu, W.; Fu, Z.; Sun, L.; Zhou, Y.; Gong, Y.; Yang, T.; Zhou, H. The positive association of branched-chain amino acids and metabolic dyslipidemia in Chinese Han population. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 120. [[CrossRef](#)]
12. Tobias, D.K.; Lawler, P.R.; Harada, P.H.; Demler, O.V.; Ridker, P.M.; Manson, J.E.; Cheng, S.; Mora, S. Circulating branched-chain amino acids and incident cardiovascular disease in a prospective cohort of US women. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2018**, *11*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Mels, C.M.; Schutte, A.E.; Schütte, R.; Huisman, H.W.; Smith, W.; Fourie, C.M.; Kruger, R.; Van Rooyen, J.M.; Malan, N.T.; Malan, L. The link between vascular deterioration and branched chain amino acids in a population with high glycated haemoglobin: The SABPA study. *Amino Acids* **2013**, *45*, 1405–1413. [[CrossRef](#)]
14. Mears, D. Regulation of insulin secretion in islets of langerhans by Ca²⁺ Channels. *J. Membr. Biol.* **2004**, *200*, 57–66. [[CrossRef](#)]
15. Conigrave, A.D.; Franks, A.H.; Brown, E.M.; Quinn, S.J. L-amino acid sensing by the calcium-sensing receptor: A general mechanism for coupling protein and calcium metabolism? *Eur. J. Clin. Nutr.* **2002**, *56*, 1072–1080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Reid, I.R.; Gamble, G.D.; Bolland, M.J. Circulating calcium concentrations, vascular disease and mortality: A systematic review. *J. Intern. Med.* **2016**, *279*, 524–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Flores-Guerrero, J.L.; Osté, M.C.J.; Kieneker, L.M.; Gruppen, E.G.; Wolak-Dinsmore, J.; Otvos, J.D.; Connelly, M.A.; Bakker, S.J.L.; Dullaart, R.P.F. Plasma branched-chain amino acids and risk of incident type 2 diabetes: Results from the PREVENT prospective cohort study. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Würtz, P.; Soininen, P.; Kangas, A.; Rönnemaa, T.; Lehtimäki, T.; Kähönen, M.; Viikari, J.S.; Raitakari, O.T.; Ala-Korpela, M. Branched-chain and aromatic amino acids are predictors of insulin resistance in young adults. *Diabetes Care* **2012**, *36*, 648–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes—2018. *Diabetes Care* **2018**, *41*, S13–S27. [[CrossRef](#)]
20. Radikova, Z.; Koska, J.; Huckova, M.; Ksinantova, L.; Imrich, R.; Vigas, M.; Trnovec, T.; Langer, P.; Sebockova, E.; Klimes, I. Insulin sensitivity indices: A proposal of cut-off points for simple identification of insulin-resistant subjects. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2006**, *114*, 249–256. [[CrossRef](#)]

21. Levey, A.S.; Stevens, L.A.; Schmid, C.H.; Zhang, Y.L.; Castro, A.F., III; Feldman, H.I.; Kusek, J.W.; Eggers, P.; Van Lente, F.; Greene, T.; et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* **2009**, *150*, 604–612. [[CrossRef](#)]
22. Bedogni, G.; Bellentani, S.; Miglioli, L.; Masutti, F.; Passalacqua, M.; Castiglione, A.; Tiribelli, C. The fatty liver index: A simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* **2006**, *6*, 33. [[CrossRef](#)]
23. Bushinsky, D.A.; Monk, R.D. Calcium. *Lancet* **1998**, *352*, 306–311. [[CrossRef](#)]
24. Wolak-Dinsmore, J.; Gruppen, E.G.; Shalaurova, I.; Matyus, S.P.; Grant, R.P.; Gegen, R.; Bakker, S.J.; Otvos, J.D.; Connelly, M.A.; Dullaart, R.P. A novel NMR-based assay to measure circulating concentrations of branched-chain amino acids: Elevation in subjects with type 2 diabetes mellitus and association with carotid intima media thickness. *Clin. Biochem.* **2018**, *54*, 92–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shah, S.H.; Crosslin, D.R.; Haynes, C.S.; Nelson, S.; Turer, C.B.; Stevens, R.D.; Muehlbauer, M.J.; Wenner, B.R.; Bain, J.R.; Laferriere, B.; et al. Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss. *Diabetologia* **2011**, *55*, 321–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Batch, B.C.; Shah, S.H.; Newgard, C.B.; Turer, C.B.; Haynes, C.; Bain, J.R.; Muehlbauer, M.; Patel, M.J.; Stevens, R.D.; Appel, L.J.; et al. Branched chain amino acids are novel biomarkers for discrimination of metabolic wellness. *Metabolism* **2013**, *62*, 961–969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wiklund, P.; Zhang, X.; Pekkala, S.; Autio, R.; Kong, L.; Yang, Y.; Keinänen-Kiukaanniemi, S.; Alen, M.; Cheng, S. Insulin resistance is associated with altered amino acid metabolism and adipose tissue dysfunction in normoglycemic women. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24540. [[CrossRef](#)]
28. Fiehn, O.; Garvey, W.T.; Newman, J.; Lok, K.H.; Hoppel, C.L.; Adams, S. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Barceló, A.; Morell-Garcia, D.; Salord, N.; Esquinas, C.; Pérez, G.; Pérez, A.; Monasterio, C.; Gasa, M.; Fortuna, A.M.; Montserrat, J.M.; et al. A randomized controlled trial: Branched-chain amino acid levels and glucose metabolism in patients with obesity and sleep apnea. *J. Sleep Res.* **2017**, *26*, 773–781. [[CrossRef](#)]
30. Tremblay, F.; Lavigne, C.; Jacques, H.; Marette, A. Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu. Rev. Nutr.* **2007**, *27*, 293–310. [[CrossRef](#)]
31. Pan, A.; Sun, Q.; Bernstein, A.M.; Schulze, M.B.; Manson, J.E.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Red meat consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *94*, 1088–1096. [[CrossRef](#)]
32. Bendinelli, B.; Palli, D.; Masala, G.; Sharp, S.J.; Schulze, M.B.; Guevara, M.; van der, A.D.; Sera, F.; Amiano, P.; Balkau, B.; et al. Association between dietary meat consumption and incident type 2 diabetes: The EPIC-InterAct study. *Diabetologia* **2013**, *56*, 47–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Huffman, K.M.; Shah, S.H.; Stevens, R.D.; Bain, J.R.; Muehlbauer, M.; Slentz, C.A.; Tanner, C.J.; Kuchibhatla, M.; Houmard, J.A.; Newgard, C.B.; et al. Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes Care* **2009**, *32*, 1678–1683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Vangipurapu, J.; Stancáková, A.; Smith, U.; Kuusisto, J.; Laakso, M. Nine amino acids are associated with decreased insulin secretion and elevated glucose levels in a 7.4-year follow-up study of 5,181 Finnish men. *Diabetes* **2019**, *68*, 1353–1358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kelly, A.; Li, C.; Gao, Z.; Stanley, C.A.; Matschinsky, F.M. Glutaminolysis and insulin secretion: From bedside to bench and back. *Diabetes* **2002**, *51*, S421–S426. [[CrossRef](#)]
36. Krebs, M.; Brehm, A.; Krssak, M.; Anderwald, C.H.; Bernroider, E.; Nowotny, P.; Roth, E.; Chandramouli, V.; Landau, B.R.; Roden, M. Direct and indirect effects of amino acids on hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetologia* **2003**, *46*, 917–925. [[CrossRef](#)]
37. Tai, E.S.; Tan, M.L.S.; Stevens, R.D.; Low, Y.L.; Muehlbauer, M.J.; Goh, D.L.M.; Ilkayeva, O.R.; Wenner, B.R.; Bain, J.R.; Lee, J.J.M.; et al. Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia* **2010**, *53*, 757–767. [[CrossRef](#)]
38. Tobias, D.K.; Clish, C.; Mora, S.; Li, J.; Liang, L.; Hu, F.B.; Manson, J.E.; Zhang, C. Dietary intakes and circulating concentrations of branched-chain amino acids in relation to incident type 2 diabetes risk among high-risk women with a history of gestational diabetes mellitus. *Clin. Chem.* **2018**, *64*, 1203–1210. [[CrossRef](#)]
39. Zhou, M.; Shao, J.; Wu, C.-Y.; Shu, L.; Dong, W.; Liu, Y.; Chen, M.; Wynn, R.M.; Wang, J.; Wang, J.; et al. Targeting BCAA catabolism to treat obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* **2019**, *68*, 1730–1746. [[CrossRef](#)]
40. Burrage, L.C.; Nagamani, S.C.; Campeau, P.M.; Lee, B.H. Branched-chain amino acid metabolism: From rare Mendelian diseases to more common disorders. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, R1–R8. [[CrossRef](#)]
41. Lackey, D.E.; Lynch, C.J.; Olson, K.C.; Mostaedi, R.; Ali, M.; Smith, W.H.; Karpe, F.; Humphreys, S.; Bedinger, D.; Dunn, T.N.; et al. Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity. *Am. J. Physiol. Metab.* **2013**, *304*, E1175–E1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mahendran, Y.; Jonsson, A.; Have, C.T.; Allin, K.H.; Witte, D.R.; Jørgensen, M.E.; Grarup, N.; Pedersen, O.; Kilpeläinen, T.O.; Hansen, T. Genetic evidence of a causal effect of insulin resistance on branched-chain amino acid levels. *Diabetologia* **2017**, *60*, 873–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Morioka, S.; Kanai, K.; Kako, M.; Nakajima, T.; Yoshimi, T.; Masaka, M.; Sudo, K.; Kanno, T. Effects of branched chain amino acid infusion on glucose metabolism in cirrhotic patients with encephalopathy. *Gastroenterol. Jpn.* **1983**, *18*, 553–559. [[CrossRef](#)]

44. Ruiz-Margáin, A.; Macías-Rodríguez, R.; Ríos-Torres, S.; Román-Calleja, B.; Guerrero, O.M.; Rodríguez-Córdova, P.; Torre, A. Effect of a high-protein, high-fiber diet plus supplementation with branched-chain amino acids on the nutritional status of patients with cirrhosis. *Revista Gastroenterología México* **2018**, *83*, 9–15. [[CrossRef](#)]
45. Randolph, A.C.; Markofski, M.M.; Rasmussen, B.B.; Volpi, E. Effect of essential amino acid supplementation and aerobic exercise on insulin sensitivity in healthy older adults: A randomized clinical trial. *Clin. Nutr.* **2019**, *39*, 1371–1378. [[CrossRef](#)]
46. Iwasa, M.; Ishihara, T.; Mifuji-Moroka, R.; Fujita, N.; Kobayashi, Y.; Hasegawa, H.; Iwata, K.; Kaito, M.; Takei, Y. Elevation of branched-chain amino acid levels in diabetes and NAFL and changes with antidiabetic drug treatment. *Obes. Res. Clin. Pr.* **2015**, *9*, 293–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Laplante, M.; Sabatini, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **2012**, *149*, 274–293. [[CrossRef](#)]
48. Sengupta, S.; Peterson, T.R.; Sabatini, D.M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 310–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Saha, A.K.; Xu, J.; Lawson, E.; DeOliveira, R.; Brandon, A.E.; Kraegen, E.W.; Ruderman, N. Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes* **2010**, *59*, 2426–2434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Zhenyukh, O.; Civantos, E.; Ruiz-Ortega, M.; Sánchez, M.S.; Vázquez, C.; Peiró, C.; Egido, J.; Mas, S. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. *Free. Radic. Biol. Med.* **2017**, *104*, 165–177. [[CrossRef](#)]
51. Moldogazieva, N.T.; Mokhsoev, I.M.; Mel’Nikova, T.I.; Porozov, Y.B.; Terentiev, A.A. Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1–14. [[CrossRef](#)]
52. Zhu, J.; Xun, P.; Bae, J.C.; Kim, J.H.; Kim, D.J.; Yang, K.; He, K. Circulating calcium levels and the risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Nutr.* **2019**, *122*, 376–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Becerra-Tomás, N.; Estruch, R.; Bulló, M.; Casas, R.; Díaz-López, A.; Basora, J.; Fitó, M.; Serra-Majem, L.; Salas-Salvadó, J. Increased serum calcium levels and risk of type 2 diabetes in individuals at high cardiovascular risk. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 3084–3091. [[CrossRef](#)]
54. Lorenzo, C.; Hanley, A.J.; Rewers, M.J.; Haffner, S.M. Calcium and phosphate concentrations and future development of type 2 diabetes: The insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetologia* **2014**, *57*, 1366–1374. [[CrossRef](#)]
55. Hagström, E.; Hellman, P.; Lundgren, E.; Lind, L.; Årnlöv, J. Serum calcium is independently associated with insulin sensitivity measured with euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp in a community-based cohort. *Diabetologia* **2006**, *50*, 317–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Najeeb, Q.; Aziz, R.; Hamid, S. To evaluate the levels of glycated hemoglobin, serum calcium, magnesium, phosphate, uric acid and microalbuminuria in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Res. Med Sci.* **2014**, *2*, 1462. [[CrossRef](#)]
57. Kanchana, N.; Saikumar, P. Serum calcium levels in type 2 diabetes mellitus. *IOSR-JDMS* **2014**, *13*, 109–114.
58. Akter, S.; Eguchi, M.; Kochi, T.; Kabe, I.; Nanri, A.; Mizoue, T. Association of serum calcium and phosphate concentrations with glucose metabolism markers: The furukawa nutrition and health study. *Nutrients* **2020**, *12*, 2344. [[CrossRef](#)]
59. Hassan, S.A.E.; Elsheikh, W.A.R.; Rahman, N.I.A.; Elbagir, N.M. Serum calcium levels in correlation with glycated hemoglobin in type 2 diabetic sudanese patients. *Adv. Diabetes Metab.* **2016**, *4*, 59–64. [[CrossRef](#)]
60. Marshnil, R.W.; Mythili, C. Correlation of serum calcium levels with glycated hemoglobin in type 2 diabetes mellitus patient-a comparative study. *IJSR* **2018**, *7*, 4–6.
61. Buege, M.J.; Do, B.; Lee, H.C.; Weber, D.M.; Horowitz, S.B.; Feng, L.; Qing, Y.; Shank, B.R. Corrected calcium versus ionized calcium measurements for identifying hypercalcemia in patients with multiple myeloma. *Cancer Treat. Res. Commun.* **2019**, *21*, 100159. [[CrossRef](#)]
62. Peacock, M. Calcium metabolism in health and disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *5*, S23–S30. [[CrossRef](#)]
63. Sun, G.; Vasdev, S.; Martin, G.; Gadag, V.; Zhang, H. Altered calcium homeostasis is correlated with abnormalities of fasting serum glucose, insulin resistance, and β -cell function in the newfoundland population. *Diabetes* **2005**, *54*, 3336–3339. [[CrossRef](#)]
64. Rooney, M.R.; Pankow, J.S.; Sibley, S.D.; Selvin, E.; Reis, J.P.; Michos, E.D.; Lutsey, P.L. Serum calcium and incident type 2 diabetes: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *104*, 1023–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Gray, E.; Muller, D.; Squires, P.; Asare-Anane, H.; Huang, G.-C.; Amiel, S.; Persaud, S.; Jones, P.M. Activation of the extracellular calcium-sensing receptor initiates insulin secretion from human islets of langerhans: Involvement of protein kinases. *J. Endocrinol.* **2006**, *190*, 703–710. [[CrossRef](#)]
66. Henquin, J.-C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* **2000**, *49*, 1751–1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Curry, D.L.; Bennett, L.L.; Grodsky, G.M. Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol. Content* **1968**, *214*, 174–178. [[CrossRef](#)]
68. Draznin, B.; Sussman, K.E.; Eckel, R.H.; Kao, M.; Yost, T.; Sherman, N.A. Possible role of cytosolic free calcium concentrations in mediating insulin resistance of obesity and hyperinsulinemia. *J. Clin. Investig.* **1988**, *82*, 1848–1852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Park, S.; Scheffler, T.L.; Gunawan, A.M.; Shi, H.; Zeng, C.; Hannon, K.M.; Grant, A.L.; Gerrard, D.E. Chronic elevated calcium blocks AMPK-induced GLUT-4 expression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2009**, *296*, C106–C115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

70. Mercan, F.; Lee, H.; Kolli, S.; Bennett, A.M. Novel role for SHP-2 in nutrient-responsive control of s6 kinase 1 signaling. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *33*, 293–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Yang, J.; Wong, R.K.; Park, M.; Wu, J.; Cook, J.R.; York, D.A.; Deng, S.; Markmann, J.; Naji, A.; Wolf, B.A.; et al. Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic β -cells. *Diabetes* **2006**, *55*, 193–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Li, C.; Najafi, H.; Daikhin, Y.; Nissim, I.B.; Collins, H.W.; Yudkoff, M.; Matschinsky, F.M.; Stanley, C. Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2853–2858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Jing, X.; Li, D.-Q.; Olofsson, C.; Salehi, A.; Surve, V.V.; Caballero, J.; Ivarsson, R.; Lundquist, I.; Pereverzev, A.; Schneider, T.; et al. Cav2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 146–154. [[CrossRef](#)]
74. Aoki, K.; Miyagawa, K. Correlation of increased serum calcium with elevated blood pressure and vascular resistance during calcium infusion in normotensive man. *J. Hypertens.* **1990**, *8*, 579–583. [[CrossRef](#)]
75. Mook-Kanamori, D.O.; Römisch-Margl, W.; Kastenmüller, G.; Prehn, C.; Petersen, A.K.; Illig, T.; Gieger, C.; Wang-Sattler, R.; Meisinger, C.; Peters, A.; et al. Increased amino acids levels and the risk of developing of hypertriglyceridemia in a 7-year follow-up. *J. Endocrinol. Investig.* **2014**, *37*, 369–374. [[CrossRef](#)]
76. Yamakado, M.; Nagao, K.; Imaizumi, A.; Tani, M.; Toda, A.; Tanaka, T.; Jinzu, H.; Miyano, H.; Yamamoto, H.; Daimon, T.; et al. Plasma free amino acid profiles predict four-year risk of developing diabetes, metabolic syndrome, dyslipidemia and hypertension in Japanese population. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11918. [[CrossRef](#)]
77. Fukushima, K.; Harada, S.; Takeuchi, A.; Kurihara, A.; Iida, M.; Fukai, K.; Kuwabara, K.; Kato, S.; Matsumoto, M.; Hirata, A.; et al. Association between dyslipidemia and plasma levels of branched-chain amino acids in the Japanese population without diabetes mellitus. *J. Clin. Lipidol.* **2019**, *13*, 932–939.e2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Halama, A.; Horsch, M.; Kastenmüller, G.; Möller, G.; Kumar, P.; Prehn, C.; Laumen, H.; Hauner, H.; de Angelis, M.H.; Beckers, J.; et al. Metabolic switch during adipogenesis: From branched chain amino acid catabolism to lipid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *589*, 93–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Ortiz, J.A.; Gil-Gómez, G.; Casaroli-Marano, R.P.; Vilaró, S.; Hegardt, F.G.; Haro, D. Transfection of the ketogenic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase cDNA into Mev-1 cells corrects their auxotrophy for mevalonate. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 28523–28526. [[CrossRef](#)]
80. Bakan, I.; Laplante, M. Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Curr. Opin. Lipidol.* **2012**, *23*, 226–234. [[CrossRef](#)]
81. Han, J.; Wang, Y. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism. *Protein Cell* **2018**, *9*, 145–151. [[CrossRef](#)]
82. Horton, J.D.; Goldstein, J.L.; Brown, M.S. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 1125–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Donnelly, K.L.; Smith, C.I.; Schwarzenberg, S.J.; Jessurun, J.; Boldt, M.D.; Parks, E.J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 1343–1351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Berg, E.H.V.D.; Flores-Guerrero, J.L.; Gruppen, E.G.; De Borst, M.H.; Wolak-Dinsmore, J.; Connelly, M.A.; Bakker, S.J.L.; Dullaart, R.P.F. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident type 2 diabetes: Role of circulating branched-chain amino acids. *Nutrients* **2019**, *11*, 705. [[CrossRef](#)]
85. Sacks, D.; Baxter, B.; Campbell, B.C.V.; Carpenter, J.S.; Cognard, C.; Dippel, D.; Eesa, M.; Fischer, U.; Hausegger, K.; Hirsch, J.A.; et al. Multisociety consensus quality improvement revised consensus statement for endovascular therapy of acute ischemic stroke. *Int. J. Stroke* **2018**, *13*, 612–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Gaggini, M.; Carli, F.; Bugianesi, E.; Gastaldelli, A.; Rosso, C.; Buzzigoli, E.; Marietti, M.; Della Latta, V.; Ciociaro, D.; Abate, M.L.; et al. Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatology* **2018**, *67*, 145–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Sunny, N.E.; Kalavalapalli, S.; Bril, F.; Garrett, T.J.; Nautiyal, M.; Mathew, J.T.; Williams, C.M.; Cusi, K. Cross-talk between branched-chain amino acids and hepatic mitochondria is compromised in nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Physiol. Metab.* **2015**, *309*, E311–E319. [[CrossRef](#)]
88. Koliaki, C.; Szendroedi, J.; Kaul, K.; Jelenik, T.; Nowotny, P.; Jankowiak, F.; Herder, C.; Carstensen, M.; Krausch, M.; Knoefel, W.T.; et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.* **2015**, *21*, 739–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Bodoy, S.; Fotiadis, D.; Stoeger, C.; Kanai, Y.; Palacín, M. The small SLC43 family: Facilitator system I amino acid transporters and the orphan EEG1. *Mol. Asp. Med.* **2013**, *34*, 638–645. [[CrossRef](#)]
90. Hamaya, R.; Mora, S.; Lawler, P.R.; Cook, N.R.; Ridker, P.M.; Buring, J.E.; Lee, I.-M.; Manson, J.E.; Tobias, D.K. Association of plasma branched-chain amino acid with biomarkers of inflammation and lipid metabolism in women. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2021**, *14*. [[CrossRef](#)]
91. Sun, L.; Hu, C.; Yang, R.; Lv, Y.; Yuan, H.; Liang, Q.; He, B.; Pang, G.; Jiang, M.; Dong, J.; et al. Association of circulating branched-chain amino acids with cardiometabolic traits differs between adults and the oldest-old. *Oncotarget* **2017**, *8*, 88882–88893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Beckett, P.R.; Hardin, D.S.; Davis, T.A.; Nguyen, H.V.; Wray-Cahen, D.; Copeland, K.C. Spectrophometric assay for measuring branched-chain amino acid concentrations: Application for measuring the sensitivity of protein metabolism to insulin. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 48–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

The Kynurenine Pathway in Obese Middle-Aged Women with Normoglycemia and Type 2 Diabetes

Justyna Kubacka ¹, Magdalena Staniszewska ², Ilona Sadok ², Grazyna Sypniewska ¹ and Anna Stefanska ^{1,*}

¹ Department of Laboratory Medicine, Collegium Medicum, Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, 87-110 Torun, Poland; justynkakubacka@wp.pl (J.K.); odes@cm.umk.pl (G.S.)

² Laboratory of Separation and Spectroscopic Method Applications, Centre for Interdisciplinary Research, Faculty of Science and Health, The John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, Poland; magdalena.staniszewska@kul.pl (M.S.); ilona.sadok@kul.pl (I.S.)

* Correspondence: zuzanna@cm.umk.pl

Abstract: We examined the relationships of tryptophan (Trp) and the metabolites of the kynurenine pathway (KP) to the occurrence of type 2 diabetes (T2D) and metabolic risk factors in obese middle-aged women. The study included 128 obese women divided into two subgroups: a normoglycemic group (NG, $n = 65$) and a T2D group ($n = 63$). The concentrations of serum tryptophan (Trp), kynurenine (Kyn), 3-hydroxykynurenine (3HKyn), quinolinic acid (QA), and kynurenic acid (Kyna) were analyzed using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization/triple quadrupole mass spectrometry. Blood biochemical parameters and anthropometric parameters were measured. The women with T2D had significantly higher Trp, Kyna, Kyna/QA ratio, and Kyna/3HKyn ratio values than the NG women. Logistic regression analysis showed that the concentrations of Trp and Kyna and the values of the Kyna/3HKyn ratio were most strongly associated with T2D occurrence, even after controlling for confounding factors. The model with Trp level and Kyna/3HKyn ratio accounted for 20% of the variation in the presence of T2D. We also showed a different pattern of correlations between kynurenines and metabolic factors in the NG and T2D women, which was mostly reflected in the stronger relationship between BMI and KP metabolites in the NG obese women. An increase in Trp and Kyna levels with an accompanying increase in Kyna/3HKyn ratio value is associated with the occurrence of T2D in obese middle-aged women.

Keywords: tryptophan; kynurenine pathway; type 2 diabetes; obese women; kynurenic acid; 3-hydroxykynurenine



Citation: Kubacka, J.; Staniszewska, M.; Sadok, I.; Sypniewska, G.; Stefanska, A. The Kynurenine Pathway in Obese Middle-Aged Women with Normoglycemia and Type 2 Diabetes. *Metabolites* 2022, 12, 492. <https://doi.org/10.3390/metabo12060492>

Academic Editors: Sam Emerson and Stephanie Kurti

Received: 27 April 2022

Accepted: 28 May 2022

Published: 29 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Tryptophan (Trp) is an aromatic essential amino acid that plays an important role in the metabolic processes of the human body. The main food sources with the highest Trp contents are meat, fish, chocolate, eggs, and legumes [1]. The kynurenine pathway (KP) is the major route of Trp catabolism. This pathway is initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), the enzymes that catalyze the conversion of Trp to kynurenine (Kyn). Kyn is further converted into the following KP metabolites (kynurenines): kynurenic acid (Kyna), 3-hydroxykynurenine (3HKyn), anthranilic acid (AA), and quinolinic acid (QA). 3HKyn can be enzymatically converted to xanthurenic acid (XA) [2,3] (Figure 1). A dysregulated KP has been linked to various diseases, including neurodegenerative disorders, multiple sclerosis, depression, schizophrenia, cancer, and renal or hepatic disorders. For this reason, KP metabolites and enzymes are potential pharmacological and diagnostic targets for disease control and homeostasis [2,4–9]. An imbalance in the levels of circulating KP metabolites has also been reported in obesity and obesity-related metabolic disorders, such as cardiovascular disease (CVD) and type 2

diabetes (T2D) [10,11]. It is well known that obesity and inflammatory states are associated with a redirection of the KP in favor of the breakdown of Trp into downstream products reflected by increased serum Kyn levels [12–15]. The concentration of serum Trp and its metabolites, such as Kyn, Kyna, XA, 3HKyn, QA, and KP enzymes, were found to be associated with T2D [16–18]. However, the data on these metabolites in relation to T2D are often contradictory in human studies [19,20]. It is also known that the regulation of KP is affected by many factors, e.g., body mass, age, gender, and inflammatory state [12,21]. These different covariates may influence the results of human studies, especially in those with small sample sizes. For this reason, we decided to compare two groups of middle-aged obese women with T2D and normoglycemia (NG), which were matched for body mass and other possible confounding factors. We evaluated obese middle-aged women because they are more likely to have metabolic disturbances that increase the risk of T2D, which is partially associated with aging and the menopause [22]. Hormonal changes during the menopause are associated with the redistribution of adipose tissue accompanied with inflammatory changes that may affect the KP. The loss of estrogens may also affect the concentrations of Trp and KP metabolites [6]. Moreover, some earlier studies suggest that the serum concentrations of KP metabolites are lower in women and differ across different age categories, especially those below 40 and above 60 [23,24]. To the best of our knowledge, only one study has been published that refers to obese middle-aged European women from the ABOS cohort (Biological Atlas of Severe Obesity) [13]. In this study, however, the women presented with more severe obesity than in our group. We hypothesized that the concentrations of Trp and its KP metabolites are associated with the occurrence of T2D and metabolic risk factors in middle-aged obese women. A better understanding of the kynurenine pathway may be helpful in the assessment of diagnostic and therapeutic usefulness of the components of this pathway for cardiometabolic disturbances in middle-aged obese women.

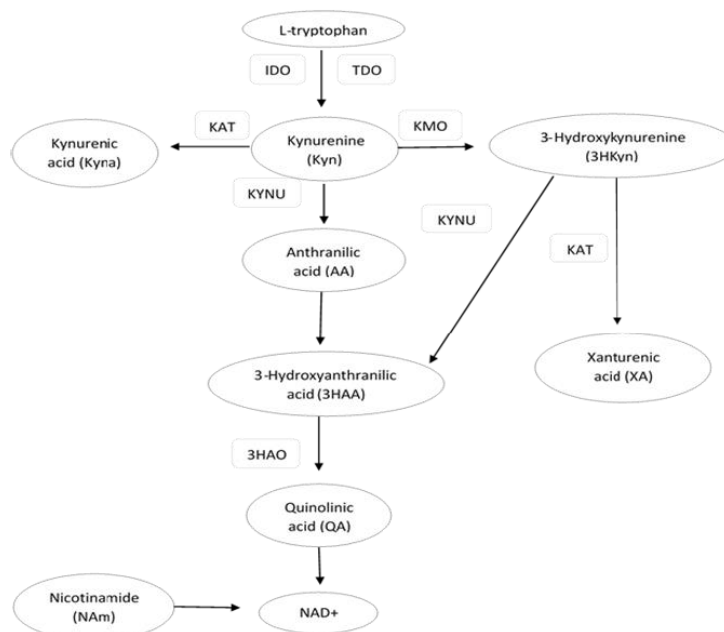


Figure 1. Schematic illustration of some major steps, metabolites, and substrates involved in the kynurenine pathway (KP). IDO—indoleamine 2,3-dioxygenase; TDO—tryptophan 2,3-dioxygenase; KAT—kynurenine aminotransferase; KMO—kynurenine-3-monooxygenase; 3HAO—3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase; KYNU—kynureninase.

2. Results

The characteristics of the study participants are shown in Table 1. The groups of women with and without T2D were matched for BMI, WC obesity categories, physical activity, menopausal status, smoking habits, and alcohol consumption but differed significantly in terms of age. Neither group differed significantly in terms of TSH or concentrations of proinflammatory markers (CRP, neopterin). Statistically significant differences in the values of glucose, HbA1c, HOMA-IR, HDL-C, TG, ALT, AST, GGT, and eGFR were observed between the groups.

Table 1. The basal characteristics of obese normoglycemic (NG) and T2D women.

Parameters	NG Women <i>n</i> = 65	T2D Women <i>n</i> = 63	<i>p</i>
Age (years)	50.0 ± 5.0	53.2 ± 5.0	<0.001
BMI (kg/m ²)	36.5 ± 6.2	36.6 ± 6.3	0.91
WC (cm)	106.8 ± 16.4	107.7 ± 13.9	0.76
Glucose (mmol/L)	5.2 (4.8–5.4)	7.0 (5.9–8.1)	<0.0001
HDL-C (mmol/L)	1.4 (1.2–1.7)	1.2 (1.0–1.4)	0.001
TG (mmol/L)	1.3 (0.9–1.6)	1.7 (1.3–2.2)	0.0001
ALT (U/L)	18.7 (14.2–23.8)	22.7 (17.8–30.4)	0.009
GGT (U/L)	20.7 (14.6–25.8)	25.2 (18.9–33.7)	0.011
Creatinine (mg/dl)	0.76 (0.72–0.88)	0.81 (0.73–0.89)	0.23
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	91.9 (80.2–96.4)	83.1 (71.7–92.4)	0.04
CRP (mg/L)	2.3 (1.0–3.9)	3.3 (1.3–5.9)	0.08
HbA1c (mmol/mol)	37.0 (34.0–38.0)	45.0 (42.0–58.0)	<0.0001
Insulin (μIU/mL)	9.0 (6.7–12.1)	10.5 (5.8–15.0)	0.29
TSH (mIU/L)	1.48 (1.14–2.10)	1.34 (1.01–2.05)	0.31
HOMA-IR	2.0 (1.6–2.9)	3.3 (1.9–5.5)	0.0005
Neopterin (nmol/L)	7.0 (5.0–8.9)	7.3 (4.2–10.4)	0.61
SBP (mmHg)	130 (120–140)	130 (120–140)	0.69
DBP (mmHg)	80 (80–90)	80 (80–85)	0.45
Lipid-lowering treatment (%)	16	43	0.0008
Hypertension treatment (%)	33	62	0.01
Metformin treatment (%)	0	76	<0.0001
Menopausal status (% postmenopausal)	50	62	0.11
Physical activity (% never or sporadically)	32	35	0.72
Alcohol consumption (% never or sporadically)	94	95	0.80
Smoker (% current)	12	19	0.27
Obesity categories 1/2/3 (%)	54/18/28	45/31/24	0.67

Means ± SD or medians (25th and 75th percentiles) or %.

The concentrations of Trp and KP metabolites are shown in Table 2. The levels of Trp and Kyna and the values of Kyna/QA and Kyna/3HKyn ratios were significantly higher in the women with T2D. All statistically significant differences in the values of KP metabolites remained significant after controlling for age.

Table 3 shows Spearman correlation coefficients between Trp and its KP metabolites (kynurenines), and the metabolic factors. We observed only weak or very weak correlations between the analyzed parameters. The Trp concentration correlated significantly with TG. The kynurenines and their ratios most strongly correlated with BMI, TG, ALT, GGT, creatinine, and eGFR. We also analyzed the correlation between Trp and KP metabolites in the overall study group. We found statistically significant (all *p* < 0.05) correlations between Trp and 3HKyn (*r* = 0.30), Kyn and QA (*r* = 0.34), 3HKyn and QA (*r* = −0.41), and Kyna and 3HKyn (*r* = −0.25).

Table 2. The values of tryptophan and KP metabolites in obese NG and T2D women.

Parameters	NG Women <i>n</i> = 65	T2D Women <i>n</i> = 63	<i>p</i>	<i>p</i> *
Trp (μmol/L)	55.0 (50.0–58.5)	59.2 (51.6–70.8)	0.009	0.033
Kyn (μmol/L)	1.39 (1.20–1.84)	1.53 (1.17–1.86)	0.76	0.76
Kyna (μmol/L)	0.097 (0.078–0.117)	0.110 (0.093–0.128)	0.01	0.033
3HKyn (μmol/L)	0.30 (0.21–0.44)	0.28 (0.18–0.41)	0.04	0.08
QA (μmol/L)	0.16 (0.10–0.37)	0.15 (0.10–0.24)	0.36	0.40
KTR	24.9 (20.6–33.6)	22.6 (18.8–35.2)	0.30	0.38
KMO	0.20 (0.13–0.32)	0.20 (0.10–0.31)	0.22	0.31
KAT	0.060 (0.048–0.088)	0.072 (0.052–0.097)	0.11	0.18
Kyna/QA	0.54 (0.29–0.87)	0.72 (0.45–1.13)	0.02	0.05
Kyna/3HKyn	0.32 (0.14–0.48)	0.47 (0.34–0.77)	0.008	0.033

Means ± SD or medians (25th and 75th percentiles); Trp (tryptophan); Kyn (kynurenine); Kyna (kynurenic acid); 3HKyn (3-hydroxykynurenine); QA (quinolinic acid); KMO (3HKyn/Kyn ratio); KAT (Kyna/Kyn ratio); *p* *—corrected; *p*-value after applying Benjamini–Hochberg correction.

Table 3. The Spearman rank correlation coefficients in all the women.

Parameter	Trp	Kyn	Kyna	3HKyn	QA	KTR	KMO	KAT	Kyna/QA	Kyna/3HKyn
Age	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BMI	0.21 *	-	-0.18 *	0.31 \$@	-0.34 \$@	-	0.23 *	-0.20 *	0.23 *@	-0.26 #@
WC	-	-	-0.22 *	0.22 *	-0.29 #@	-	0.10 *	-0.18 *	0.18 *	-0.22 *
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HOMA-IR	0.18 *	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HDL-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TG	0.30 #@	-	-	-	-0.28 #@	-0.21 *	-	-	0.28 #@	-
ALT	-	0.27 #@	-	-	-	-	-	-0.25 #@	-	-
GGT	0.18 *	0.24 #	-0.19 *	-	-	-	-	-0.31 \$@	-	-
HbA1c	0.18 *	-	0.23 *	-	-	-	-	0.20 *	0.19 *	0.22 *
CRP	-	-	-	-	-0.19 *	-	-	-	-	-
Neopterin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatinine	0.22 *	-	0.20 *	-	-0.26 #@	-	-	-	0.33 \$@	-
eGFR	-0.24 #	-	-0.18 *	-	0.28 #@	-	-	-	-0.35 \$@	0.20 *

(-) not statistically significant before correction; * *p* < 0.05; # *p* < 0.01; \$ *p* < 0.001; @—statistically significant after applying Benjamini–Hochberg correction.

The association between Trp and its metabolites with T2D was also examined in the logistic regression models (Table 4). The KP metabolites and their ratios that were significantly different between the NG and T2D women were included separately in logistic regression models as independent variables. We found that all unadjusted models were statistically significant. The values of Trp, Kyna, Kyna/3HKyn ratio, and Kyna/QA ratios were positively associated with T2D occurrence.

The models for Trp, Kyna, and Kyna/3HKyn were statistically significant after adjusting for age, BMI, eGFR values, GGT concentration, and hypertriglyceridemia. According to the Nagelkerke R-squared, Trp accounted for 7.4% of the variation in the presence of T2D in the unadjusted model. Kyna, Kyna/3HKyn ratio, and Kyna/QA ratio had values of the Nagelkerke R-squared in the unadjusted models of 7.5%, 8.3%, and 6.1%, respectively. The models with Trp (*p* = 0.006) and Kyna (*p* = 0.01) as independent variables accounted for 15% of the variation in the presence of T2D according to the Nagelkerke R-squared, while the model with Trp (*p* = 0.001) and Kyna/3HKyn ratio (*p* = 0.001) accounted for 20% of the variation in the presence of T2D.

Finally, we analyzed the Spearman correlation coefficients separately in the NG and T2D obese women to evaluate if the relationship between KP metabolites and metabolic factors depends on glycemic status (Table 5). We observed a different pattern of correlations in the NG and T2D women.

Table 4. The associations between Trp and KP metabolites with T2D in logistic regression models.

Independent Variables	Odds Ratios (95% CI) per 1SD Increase in Value of Independent Variable					
	Model Unadjusted	Model Adjusted for BMI	Model Adjusted for Age	Model Adjusted for eGFR	Model Adjusted for GGT	Model Adjusted for Hipertg&
Trp	1.81* (1.13–2.88)	1.81* (1.12–2.90)	1.68* (1.02–2.74)	1.78* (1.09–2.91)	1.73* (1.11–3.0)	1.75* (1.06–2.88)
Kyna	2.50# (1.28–4.70)	2.37# (1.24–4.53)	2.48# (1.27–4.84)	1.99* (1.07–3.71)	2.51# (1.29–4.92)	2.27* (1.89–4.33)
Kyna/3HKyn	1.92# (1.21–2.70)	1.83# (1.19–2.80)	1.90# (1.23–2.92)	1.75# (1.15–2.65)	1.91# (1.25–2.98)	1.66* (1.10–2.51)
Kyna/QA	1.81* (1.08–3.04)	1.82* (1.08–3.08)	1.69 (0.98–2.91)	1.62 (0.94–2.79)	1.81* (1.07–2.99)	1.69 (0.99–2.87)

& hypertriglyceridemia; TG ≥ 150 mg/dL and/or lipid-lowering treatment; CI (confidence interval). All models achieved statistical goodness of fit. * $p < 0.05$; # $p < 0.01$. Nagelkerke R-squared of unadjusted models: Trp 0.073; Kyna 0.075; 3HKyn 0.052, Kyna/3HKyn ratio 0.083, Kyna/QA ratio 0.061; the statistically significant associations remained significant after applying Benjamini–Hochberg correction.

Table 5. The Spearman rank correlation coefficients between Trp, KP metabolites, and metabolic factors according to glycemc status.

Parameter	NG Correlation Coefficients/T2D Correlation Coefficients									
	Trp	Kyn	Kyna	3HKyn	QA	KTR	KMO	KAT	Kyna/QA	Kyna/3HKyn
BMI	0.29/-	-/-	-0.43@/-	0.66@/-	-0.60@/-	-0.34@/-	0.60@/-	-0.29/-	0.41@/-	-0.63@/-
WC	0.24/-	-/-	-0.40@/-	0.46@/-	-0.50@/-	-0.36@/-	0.48@/-	-0.34@/-	0.32@/-	-0.48@/-
Glucose	-/-	-/-	-0.26/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
HOMA-IR	-/-	-/-	-/-	-/0.30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/–0.28
HDL-C	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
TG	-/0.29	-/-	-0.24/-	0.31@/-	-0.33@/-	-/–0.27	0.26/-	-/-	-/-	-0.29/-
ALT	-/-	0.27/ 0.28	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-0.33/ –0.26	-/-	-/-
GGT	-/-	0.25/ 0.30	-/–0.32	-/-	-/-	-/-	-/-	-0.35@/ –0.40	-/-	-/-
HbA1c	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
CRP	-/-	-/-	-0.34@/-	0.35@/-	-0.30/-	-/-	0.34@/-	-/-	-/-	-0.37@/-
Neopterin	-/-	-/-	-/-	-/0.32	-/-	-/-	-/-	-/-	-/0.32	-/–0.26
Creatinine	0.29/-	-/-	-/-	-/-	-0.27/-	-/-	-/-	-/-	0.33 @/0.29	-/-
eGFR	-0.26/-	-/-	-/-	-/-	0.29/-	-/-	-/-	-/-	-0.32@/ –0.28	-/-

(-) not statistically significant before correction; NG (normoglycemic women); T2D (type 2 diabetes women). @—Statically significant after applying Benjamini–Hochberg correction; text in bold/italic means T2D correlation coefficients.

The values of BMI and WC were only significantly correlated with individual KP metabolites in the NG women. The CRP concentration correlated with Kyna and 3HKyn in the NG women, while the neopterin concentration had a tendency to correlate with 3HKyn in the T2D women. We also analyzed correlations between Trp and KP metabolites separately in the NG and T2D women. We found statistically significant correlations (all $p < 0.05$) between Trp and 3HKyn ($r = 0.50$) in the T2D women and Kyna and 3HKyn ($r = -0.47$) in the NG group. 3HKyn also correlated with QA in both the NG and T2D groups ($r = -0.50$; $r = -0.38$, respectively).

3. Discussion

3.1. The Relationship of Trp and Individual KP Metabolites with T2D

Our results showed that the obese T2D women had significantly higher Trp, Kyna, Kyna/QA ratio, and Kyna/3HKyn ratio values than the obese NG women. Our logistic regression analysis showed that the concentration of Trp and Kyna and values of Kyna/3HKyn ratio were most strongly associated with T2D occurrence, even after controlling for confounding factors. This combination of results may suggest that the Trp metabolic pathway shifts towards Kyna with an accompanying increase in Kyna/3HKyn ratio value in obese middle-aged women with T2D. The model with Trp level and Kyna/3HKyn ratio

accounted for 20% of the variation in the presence of T2D. Additionally, we showed a different pattern of correlations between KP metabolites and metabolic factors in the NG and T2D obese women.

In previous case–control [13,17–19] and prospective studies [10,13,16,25], the most well-documented relationship was the one between T2D and Trp, while KP metabolites have been analyzed much less often. The results of these prospective and case–control studies are inconsistent and were performed across different populations. Moreover, the case–control studies were often performed on small groups without adjustment for BMI, age, or gender. The association of KP metabolites with T2D with larger cohorts of prediabetes and T2D patients was also analyzed. These studies were statistically controlled for confounding factors and were focused on an evaluation of the relationship between KP metabolites and the risk of diabetes-related disorders, e.g., acute myocardial infarction, cognitive impairment, and all-cause mortality [23,26]. In this study, we matched the groups to BMI and obesity categories as well as to other possibly confounding factors. It seems that the exclusion of these confounding factors, especially the difference in BMI between groups, is absolutely essential for a better evaluation of the relationship between T2D and KP in a study with a small sample size.

Our results are partially in line with the results of other authors. Like them, we found higher concentrations of Trp [16] and Kyna [17–19,23] in T2D individuals. Some studies found no difference in Trp [18,19,23] or even lower Trp concentrations in diabetic patients, which was usually explained by the fact that Trp is metabolized to a greater extent in T2D patients than in nondiabetic subjects [17]. So far, only one study has been published that refers to obese European women from the ABOS cohort [13]. In this study, the authors did not show the differences in Trp, Kyn, KTR, Kyna, XA, or QA levels between obese women with and without diabetes [13].

Along with higher Kyna values, we observed a very weak tendency for 3HKyn concentrations to decrease, which was reflected in a significant increase in the Kyna/3HKyn ratio in the T2D obese women. Our finding that the Kyna/3HKyn ratio increases in T2D subjects has not been reported in the literature so far. As mentioned above, few studies have analyzed only 3HKyn, and three studies showed higher concentrations of it in T2D [17,19,23], whereas one did not show the difference in 3HKyn between diabetic and non-diabetic subjects [18]. To explain our results, we can only hypothesize that this increase in the Kyna/3HKyn ratio may be a consequence of the shift to Kyna or the enhancement of 3HKyn metabolism towards XA, which is recognized as a pro-diabetogenic metabolite [17,18].

Unexpectedly, we did not find any differences in Kyn and KTR values between the groups, which was also the case in the obese women from the ABOS cohort [13]. However, in some studies, higher levels of Kyn were observed in the T2D individuals [18,19]. The lack of differences in Kyn concentration may also be related to the fact that out of our T2D women, 79% were on metformin therapy. It was found that metformin might elevate the plasma levels of Trp and inhibit TDO expression in the liver, which may decrease the levels of Kyn in T2D women [27,28]. The higher activity of IDO-1 (KTR) is well-documented in obese subjects [12–14] and patients with cardiac events [16], and it is positively associated with inflammation [29], but the association between KTR and diabetes is less clear. A Norwegian study showed that KTR in the urine, but not in the plasma, was a strong predictor of T2D occurrence during 7 years of follow-up [10]. Other studies such as ours did not find an association between KTR and the occurrence of T2D [13,18]. It seems that the lack of difference in KTR may have partially been caused by the fact that our groups were matched for BMI and concentration of neopterin and CRP. Moreover, although the serum/plasma Kyn/Trp ratio (KTR) is commonly used to measure IDO activity, the enzyme activity indirectly calculated by the ratio of the product to the substrate is not perfect. Importantly, this ratio reflects not only IDO activity, but also TDO. Moreover, it was observed that Kyn undergoes almost complete reabsorption at very low plasma concentrations, but it is excreted to a greater extent via the renal route at the elevated serum levels that may occur in T2D. For this reason, a Norwegian prospective study

concluded that urine KTR may potentially represent a more sensitive indicator of systemic Trp degradation than serum/plasma KTR [10].

3.2. The Relationship between Tryptophan and KP Metabolites with the Cardiometabolic Risk Factors

Along with Kyn and Kyna, Trp regulates glucose-induced insulin secretion (GSIS) in the pancreatic beta-cells and hepatic glucose production, and these processes may be altered when inflammation occurs [30]. The exposure of pancreatic islets to IFN- γ increased the levels of IDO and Kyn and potentiated GSIS by the normal islets [31]. It was also observed that moderate intakes of Trp affect fatty acid and triglyceride metabolism under physiological conditions and may be involved in the control of lipid metabolism in a variety of metabolic states [32]. Some human studies have shown that Trp and its metabolites are positively related to insulin resistance and other metabolic risk factors such as TG concentration and blood pressure [13,16,25]. In this study, we observed only a weak positive correlation between Trp and TG concentration, and this relationship was stronger in the T2D women.

More than 95% of dietary Trp is degraded in the KP, partially to QA, which is converted further to individual kynurenines, which are bioactive in different tissues. Kyn is the first KP metabolite. Kyn is an endogenous ligand for the human aryl hydrocarbon receptor (AHR), which regulates many genes and metabolic pathways, including immune response and glucose metabolism [31,33]. Recent animal studies have found that the Kyn-activated AHR caused an increase in body mass, adiposity, hepatic lipid deposition, and the disruption of glucose homeostasis, and can regulate GSIS in beta cells [34]. Human studies have indicated that Kyn correlated with BMI and decreased after bariatric surgery in T2D patients [35,36]. In this study, we did not observe significant correlations between Kyn and BMI or carbohydrate parameters, but we showed a weak correlation between Kyn and the activity of the liver enzyme ALT.

Kyn is further metabolized into the three downstream metabolites: Kyna, 3HKyn, and anthranilic acid (AA). We analyzed the first two because alterations were observed in them in T2D [3]. 3HKyn is recognized as being a pro-diabetogenic, pro-oxidant metabolite with a neurotoxicity function [4,19,37–39]. In this study, we only observed a weak positive tendency towards a correlation between 3HKyn and HOMA-IR and neopterin in the T2D women and positive correlations between BMI and CRP in the NG group.

Analysis of the correlations between kynurenines showed that 3HKyn correlated negatively with Kyna and QA, which may support the hypothesis that Kyna weakens the pathway toward 3HKyn synthesis, and that the formation of NAD from QA is impaired when the 3HKyn concentration increases in obese women. Moreover, the positive correlation between Trp and 3HKyn may suggest that KP is more shifted towards 3HKyn synthesis in obese T2D women with higher concentrations of Trp.

The role of increased levels of Kyna in T2D is still unclear. Kyna is recognized as an antagonist of the N-methyl-d-aspartate receptor (NMDAR) and as an endogenous agonist of the G-protein-coupled receptor 35 (GPR35) and AHR [2,40,41]. The effects of Kyna on NMDAR are associated with a neuroprotective function and may be associated with anti-diabetic properties through an increase in β -cell function and survival [42,43]. Kyna regulates GSIS and glucagon secretion [33,44]. Moreover, it was found that Kyna increases energy utilization by activating GPR35, which stimulates lipid metabolism and thermogenic and anti-inflammatory gene expression in adipose tissue. This suppresses weight gain in animals fed a high-fat diet and improves glucose tolerance [45]. All these animal studies support the theory that Kyna may have anti-diabetic properties. In humans, a positive relationship between Kyna and insulin resistance has been suggested [17–19], and the prooxidant properties of Kyna were observed in patients with proliferative diabetic retinopathy [19]. In this study, we only observed a very weak tendency towards a positive correlation between Kyna and HbA1c in the whole group of women and negative correlations between Kyna and BMI and CRP in the NG women.

The strength of this study is that our NG and T2D women were middle-aged and from a European population, as well as being matched for BMI, WC, concentration of inflammatory markers, physical activity, alcohol consumption, smoking habits, and menopausal status, and were also free of CKD, CVD, and acute inflammation (CRP < 10 mg/L). Because our groups differ in terms of age, eGFR, and GTP, we additionally adjusted our results to these parameters. Adjustment to confounding factors seems to be important as the concentration of Trp and its metabolites could be affected by many factors [6,12–14,21]. For example, the serum concentrations of KP metabolites were higher in men [21,23]; were lower in juvenile males; increased with age in adults, especially those above 60 years old [12,24,46,47]; and differed between ethnic groups, e.g., lower Kyna was observed in Caucasian women [6]. Additionally, liver and kidney function are associated with Trp metabolism [7,8].

As a limitation of the present study, we have to mention the small sample size. For this reason, we could not perform multifactor adjustments of our analyses. Another limitation is the lack of determination of the remaining metabolites of the KP, especially XA. Additionally, we did not measure the plasma concentrations of vitamin B-6 (pyridoxal 5'-phosphate; P5P), but we only hypothesize that the concentration of P5P was not statistically different between the groups since both of them presented similar inflammation status and dietary patterns. Moreover, our study does not allow us to establish the biological mechanisms or causality responsible for the relationship between circulating KP metabolites and glycemic status. We only showed the statistical relationships between these parameters and suggested some potential mechanisms based on the literature review. Because we analyzed a selected group of obese women, our results are not fully representative of the general population. Further investigation is warranted and will include a larger cohort and additional KP metabolites.

4. Materials and Methods

4.1. Participants

The study included 128 obese Caucasian women between the ages of 41 and 60. These women were selected from a group included in a previous cardiometabolic risk factor study performed at the Department of Laboratory Medicine of the Nicolaus Copernicus University in Bydgoszcz, Poland, in the years from 2016 to 2019. The exclusion criteria were as follows: history of diabetes mellitus type 1, history of cardiovascular disease (CVD), and severe or moderate chronic kidney disease (CKD). All the women were obese with a BMI ≥ 30 kg/m² and had serum C-reactive protein (CRP) < 10 mg/L, thyroid stimulating hormone (TSH) < 4.94 μ IU/mL, and eGFR > 60 mL/min/1.73 m². Age, smoking status, alcohol consumption habits and physical activity, menopausal status, medical history, and medications were investigated using a medical questionnaire. Height (cm), weight (kg), waist circumferences (WC, cm), and systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were measured using standard methods. Postmenopausal status was defined as the permanent cessation of menstruation for at least 12 months [48]. Smoking status was classified as current smoker, ex-smoker, and non-smoker. Physical activity and alcohol consumption were classified as never (0 point), sporadically (1 point), more than once a month (2 points), once a week (3 points), 3 to 4 times a week (4 points), and every day (5 points). Obesity categories were classified as class 1: BMI of 30 to <35; class 2: BMI of 35 to <40; class 3: BMI ≥ 40 kg/m². T2D was diagnosed according to a fasting glucose level in plasma ≥ 126 mg/dL (≥ 7.0 mmol/L) repeated on two consecutive days, or HbA1c above or equal to 6.5% (48 mmol/mol), or self-reported, physician-diagnosed diabetes and the use of glucose-lowering medications for diabetes. The normoglycemic state was indicated by a fasting glucose level in plasma < 5.6 mmol/L (100 mg/dL) [49]. The study participants continued their normal omnivorous diet regimen. None of them followed an elimination or high-protein diet. Dietary supplements, including vitamin B complex, Trp, 5-hydroxytryptophan (5-HTP), and protein supplements (e.g., whey, casein) were not used either.

The obese women were divided into two groups: (1) a normoglycemic group (NG; $n = 65$): women with normal fasting glucose, without a history of diabetes, and (2) a T2D group (T2D; $n = 63$).

4.2. Blood Sampling and Laboratory Analyses

Fasting venous blood samples were collected in the early morning for all parameters. The parameters of triglycerides (TG), HDL-cholesterol (HDL-C), creatinine, CRP, alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyltransferase (GGT), insulin, and TSH were measured in the serum, while the plasma was used for glucose measurement, and EDTA whole blood was used to determine glycated hemoglobin (HbA1c) as previously described [50]. The HOMA-IR value was calculated [51]. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the CKD-EPI creatinine equation [52]. Hypertriglyceridemia was defined as triglycerides ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) or the use of lipid-lowering medications due to a previous diagnosis [53]. Trp and KP metabolites were analyzed in previously deep-frozen serum samples using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization/triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) as described by Sadok et al. [5] with some modifications (Supplementary Materials).

The concentrations of Trp and individual KP metabolites were used to calculate the following ratios: the Kyn/Trp ratio (KTR), which reflects IDO activity; the Kyna/Kyn ratio (KAT), which reflects KAT activity; the 3HKyn/Kyn ratio (KMO), which reflects KMO activity; and the Kyna/3HKyn ratio and the Kyna/QA ratio, which reflect the imbalance between kynurenes.

The study protocol was approved by the Bioethics Committee at the Nicolaus Copernicus University in Torun and Collegium Medicum in Bydgoszcz, and written informed consent was obtained from all the study participants (approval number KB 392/2018).

4.3. Statistical Analysis

The data were presented as means \pm standard deviation SD (Gaussian distribution) or medians and 25th and 75th percentiles (non-Gaussian distribution). The Shapiro–Wilk test was applied to test the Gaussianity. The variables were compared using Student’s *t*-test (Gaussian) and the Mann–Whitney *U* test (non-Gaussian). To test for the significance of difference between the percentages, we used the chi-squared test. Parameters with non-Gaussian distribution were normalized by natural log transformation. The Spearman rank correlation coefficients were computed. Logistic regression based on variables transformed to *z*-scores was applied. Goodness of fit was evaluated by Hosmer and Lemeshow chi-square. Trp and individual KP metabolites and their ratios were included separately in logistic regression models as independent variables, with T2D as the dependent variable. All logistic regression models were adjusted for age, BMI, eGFR, GGT, and hypertriglyceridemia. The significance of the logistic models was tested by the Wald chi-squared statistic. To correct *p*-values, the Benjamini–Hochberg procedure was applied to risk factor results to reduce the potential for type 1 error. During sample size determination, a significance level of 0.05 was applied for parametric two-tailed Student’s *t*-tests with a power level of 0.9. For nonparametric Mann–Whitney tests, the minimum sample size required was increased by 15%. According to the pilot study, we calculated that enrolment of 65 women in the NG group and 63 women in the T2D group would provide a power of 94% to show a significant difference in Trp concentrations. We decided to obtain such a high power to be able to perform credible multivariable analyses. The level of statistical significance was set as 0.05 (Statistica 13.3, StatSoft or MedCalc statistical software).

5. Conclusions

T2D occurrence is mainly associated with an increase in Trp and Kyna concentrations with an accompanying increase in the Kyna/3HKyn ratio value. The different patterns of correlations between kynurenes and metabolic factors in the obese NG and T2D women are mostly reflected in the stronger relationship between BMI and KP metabolites in the NG

women. These results may support the hypothesis that a modification in the kynurenine pathway may be a potential therapeutic target for diabetes in obese women. Moreover, KP metabolites may serve as a potential diagnostic tool for cardiometabolic disturbances and T2D in obese women. However, future studies are required to verify our findings in a larger group of obese middle-aged women.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo12060492/s1>, File: Quantitative analysis of Trp and KP metabolites in serum samples and preparation of serum and calibration standards for UHPLC-ESI-MS/MS analysis; Table S1: DMRM acquisition parameters DMRM acquisition parameters.

Author Contributions: Conceptualization, J.K., A.S.; writing—original draft preparation, J.K.; methodology, laboratory analysis, J.K., A.S., I.S., M.S.; statistical analysis, A.S.; investigation, J.K., A.S.; data curation, A.S.; writing—review and editing, A.S., M.S.; visualization, J.K., A.S., G.S.; supervision, A.S.; project administration, A.S., J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Nicolaus Copernicus University in Toruń functioning at Collegium Medicum in Bydgoszcz (approval number KB 392/2018). All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations of the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge the use of the services and facilities of the Center for Interdisciplinary Research of The John Paul II Catholic University of Lublin in Lublin, Poland, supported by the European Union from European Regional Development Fund under the Operational Programme Development of Eastern Poland 2007–2013 (agreement POPW.01.03.00-06-003/09-00). The authors thank Katarzyna Jędruchiewicz, from Maria Curie-Skłodowska University (Lublin, Poland) for the help in sample preparation for chromatographic measurements.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. National Research Council (US). *Subcommittee on the Tenth Edition of the Recommended Dietary Allowances. Recommended Dietary Allowances*, 10th ed.; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 1989. [CrossRef]
2. Badawy, A.A.B. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *Int. J. Tryptophan Res.* **2017**, *10*, 1–20. [CrossRef] [PubMed]
3. Kiluk, M.; Lewkowicz, J.; Pawlak, D.; Tankiewicz-Kwedlo, A. Crosstalk between Tryptophan Metabolism via Kynurenine Pathway and Carbohydrate Metabolism in the Context of Cardio-Metabolic Risk—Review. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2484. [CrossRef] [PubMed]
4. Okuda, S.; Nishiyama, N.; Saito, H.; Katsuki, H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 299–307. [CrossRef]
5. Sadok, I.; Jędruchiewicz, K.; Rawicz-Pruszyński, K.; Staniszevska, M. UHPLC-ESI-MS/MS Quantification of Relevant Substrates and Metabolites of the Kynurenine Pathway Present in Serum and Peritoneal Fluid from Gastric Cancer Patients—Method Development and Validation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6972. [CrossRef] [PubMed]
6. Badawy, A.A.B.; Dougherty, D.M. Assessment of the Human Kynurenine Pathway: Comparisons and Clinical Implications of Ethnic and Gender Differences in Plasma Tryptophan, Kynurenine Metabolites, and Enzyme Expressions at Baseline and after Acute Tryptophan Loading and Depletion. *Int. J. Tryptophan Res.* **2016**, *9*, 31–49. [CrossRef] [PubMed]
7. Berge, R.K.; Cacabelos, D.; Señaris, R.; Nordrehaug, J.E.; Nygård, O.; Skorve, J.; Bjørndal, B. Hepatic steatosis induced in C57BL/6 mice by a non- β oxidizable fatty acid analogue is associated with reduced plasma kynurenine metabolites and a modified hepatic NAD⁺/NADH ratio. *Lipids Health Dis.* **2020**, *19*, 94. [CrossRef] [PubMed]
8. Cheng, Y.; Li, Y.; Benkowitz, P.; Lamina, C.; Köttgen, A.; Sekula, P. The relationship between blood metabolites of the tryptophan pathway and kidney function: A bidirectional Mendelian randomization analysis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12675. [CrossRef]

9. Geça, K.; Rawicz-Pruszyński, K.; Mlak, R.; Sadok, I.; Polkowski, W.P.; Staniszevska, M. Kynurenine and Anthranilic Acid in the Peritoneum Correlate With the Stage of Gastric Cancer Disease. *Int. J. Tryptophan Res.* **2022**, *15*, 11786469211065620. [[CrossRef](#)]
10. Rebnord, E.W.; Strand, E.; Midttun, Ø.; Svingen, G.F.T.; Christensen, M.H.E.; Ueland, P.M.; Mellgren, G.; Njølstad, P.R.; Tell, G.S.; Nygård, O.K.; et al. The kynurenine: Tryptophan ratio as a predictor of incident type 2 diabetes mellitus in individuals with coronary artery disease. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1712–1721. [[CrossRef](#)]
11. Sulo, G.; Vollset, S.E.; Nygård, O.; Midttun, Ø.; Ueland, P.M.; Eussen, S.J.; Pedersen, E.R.; Tell, G.S. Neopterin and kynurenine-tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *168*, 1435–1440. [[CrossRef](#)]
12. Mangge, H.; Summers, K.L.; Meinitzer, A.; Zelzer, S.; Almer, G.; Prassl, R.; Schnedl, W.J.; Reininghaus, E.; Paulmichl, K.; Weghuber, D.; et al. Obesity-related dysregulation of the tryptophan-kynurenine metabolism: Role of age and parameters of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* **2014**, *22*, 195–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Favennec, M.; Hennart, B.; Caiazzo, R.; Leloire, A.; Yengo, L.; Verbanck, M.; Arredouani, A.; Marre, M.; Pigeyre, M.; Bessede, A.; et al. The kynurenine pathway is activated in human obesity and shifted toward kynurenine monooxygenase activation. *Obesity (Silver Spring)* **2015**, *23*, 2066–2074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Boulet, M.M.; Chevrier, G.; Grenier-Larouche, T.; Pelletier, M.; Nadeau, M.; Scarpa, J.; Prehn, C.; Marette, A.; Adamski, J.; Tchernof, A. Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2015**, *309*, E736–E746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Thomas, S.R.; Stocker, R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep.* **1999**, *4*, 199–220. [[CrossRef](#)]
16. Chen, T.; Zheng, X.; Ma, X.; Bao, Y.; Ni, Y.; Hu, C.; Rajani, C.; Huang, F.; Zhao, A.; Jia, W. Tryptophan Predicts the Risk for Future Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162192. [[CrossRef](#)]
17. Matsuoka, K.; Kato, K.; Takao, T.; Ogawa, M.; Ishii, Y.; Shimizu, F.; Masuda, J.; Takada, A. Concentrations of various tryptophan metabolites are higher in patients with diabetes mellitus than in healthy aged male adults. *Diabetol. Int.* **2016**, *8*, 69–75. [[CrossRef](#)]
18. Oxenkrug, G.F. Increased Plasma Levels of Xanthurenic and Kynurenic Acids in Type 2 Diabetes. *Mol. Neurobiol.* **2015**, *52*, 805–810. [[CrossRef](#)]
19. Munipally, P.K.; Agraharm, S.G.; Valavala, V.K.; Gundae, S.; Turlapati, N.R. Evaluation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients. *Arch. Physiol. Biochem.* **2011**, *117*, 254–258. [[CrossRef](#)]
20. Li, M.; Kwok, M.K.; Fong, S.S.M.; Schooling, C.M. Indoleamine 2,3-dioxygenase and ischemic heart disease: A Mendelian Randomization study. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8491. [[CrossRef](#)]
21. Deac, O.M.; Mills, J.L.; Shane, B.; Midttun, Ø.; Ueland, P.M.; Brosnan, J.T.; Brosnan, M.E.; Laird, E.; Gibney, E.R.; Fan, R.; et al. Tryptophan Catabolism and Vitamin B-6 Status Are Affected by Gender and Lifestyle Factors in Healthy Young Adults. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 701–707. [[CrossRef](#)]
22. Paschou, S.A.; Anagnostis, P.; Pavlou, D.I.; Vryonidou, A.; Goulis, D.G.; Lambrinouadaki, I. Diabetes in Menopause: Risks and Management. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2019**, *17*, 556–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pedersen, E.R.; Tuseth, N.; Eussen, S.J.; Ueland, P.M.; Strand, E.; Svingen, G.F.; Midttun, Ø.; Meyer, K.; Mellgren, G.; Ulvik, A.; et al. Associations of plasma kynurenines with risk of acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 455–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. De Bie, J.; Guest, J.; Guillemin, G.J.; Grant, R. Central kynurenine pathway shift with age in women. *J. Neurochem.* **2016**, *136*, 995–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yu, E.; Papandreou, C.; Ruiz-Canela, M.; Guasch-Ferre, M.; Clish, C.B.; Dennis, C.; Liang, L.; Corella, D.; Fitó, M.; Razquin, C.; et al. Association of Tryptophan Metabolites with Incident Type 2 Diabetes in the PREDIMED Trial: A Case-Cohort Study. *Clin. Chem.* **2018**, *64*, 1211–1220. [[CrossRef](#)]
26. Ottosson, F.; Smith, E.; Fernandez, C.; Melander, O. Plasma Metabolites Associate with All-Cause Mortality in Individuals with Type 2 Diabetes. *Metabolites* **2020**, *10*, 315. [[CrossRef](#)]
27. Marchetti, P.; Masiello, P.; Benzi, L.; Cecchetti, P.; Fierabracci, V.; Giannarelli, R.; Gregorio, F.; Brunetti, P.; Navalesi, R. Effects of metformin therapy on plasma amino acid pattern in patients with maturity-onset diabetes. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1989**, *15*, 565–570.
28. Do, M.T.; Kim, H.G.; Tran, T.T.; Khanal, T.; Choi, J.H.; Chung, Y.C.; Jeong, T.C.; Jeong, H.G. Metformin suppresses CYP1A1 and CYP1B1 expression in breast cancer cells by down-regulating aryl hydrocarbon receptor expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *280*, 138–148. [[CrossRef](#)]
29. Christensen, M.H.E.; Fadnes, D.J.; Røst, T.H.; Pedersen, E.R.; Andersen, J.R.; Våge, V.; Ulvik, A.; Midttun, Ø.; Ueland, P.M.; Nygård, O.K.; et al. Inflammatory markers, the tryptophan-kynurenine pathway, and vitamin B status after bariatric surgery. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192169. [[CrossRef](#)]
30. Wolowczuk, I.; Hennart, B.; Leloire, A.; Bessede, A.; Soichot, M.; Taront, S.; Caiazzo, R.; Raverdy, V.; Pigeyre, M.; ABOS Consortium; et al. Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: An attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2012**, *303*, R135–R143. [[CrossRef](#)]

16 ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy

KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 392/2018

Bydgoszcz, 22.05.2018 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **22.05.2018 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

dr hab. n. med. Anna Stefańska
Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie:

- **prof. dr hab. n. med. Grażyna Odrowąż-Sypniewska, dr hab. n. med. Anna Stefańska, lek. Roma Szczepańska-Mikołajewska, mgr Paulina Cembrowska, mgr Justyna Kubačka,**

w sprawie badania:

„Związek szlaku katabolizmu tryptofanu z zaburzeniami depresyjnymi i zwiększonym ryzykiem kardiometabolicznym.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.k.s.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także

klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (22.05.2018 r.) do końca 2021 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu: każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

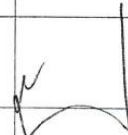
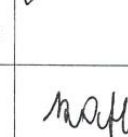
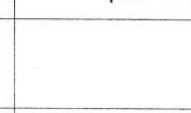
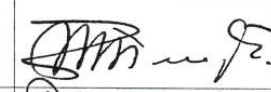
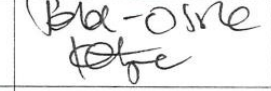
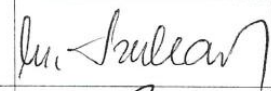
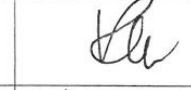
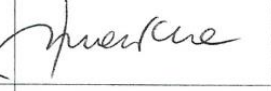
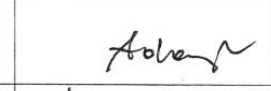
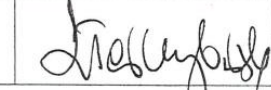
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

dr hab. n. med. Anna Stefańska
Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 22.05.2018 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Poletek-Żygas	Z - ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukałski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adameczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		

17 OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ


Bydgoszcz, 14.02.2023r.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie prac przeglądowych pt.: Znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych, W: Choroby XXI wieku: diagnostyka, prewencja i leczenie / Danielewska Alicja, Mołdoch-Mendoń Izabela (red.), 2022, Lublin oraz Znaczenie aminokwasów rozgałęzionych (BCAA) w insulinooporności i cukrzycy typu 2, W: Najnowsze metody profilaktyki, rozpoznawania i leczenia chorób / Maciąg Kamil, Talarek K. (red.), 2020, Lublin, polegał na sporządzeniu przeglądu i analizy aktualnej literatury naukowej oraz przygotowaniu manuskryptów oraz dostosowaniu manuskryptów do wymogów technicznych wydawcy.

Mój wkład w przygotowanie prac oryginalnych pt.: The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status; *Nutrients* 2021, 13, 3307 oraz The Kynurenine Pathway in Obese Middle-Aged Women with Normoglycemia and Type 2 Diabetes; *Metabolites* 2022, 12, 492, polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, współuczestniczeniu w kompletowaniu grupy badanej oraz wykonywaniu oznaczeń wybranych biomarkerów, przygotowaniu manuskryptu w tym interpretacji wyników i opracowanie wniosków, oraz dostosowaniu manuskryptów do wymogów technicznych wydawcy.

Justyna Kubacka



18 OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORÓW ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Prof. dr hab. Grażyna Sypniewska
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz, 10.02.2023r

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie prac oryginalnych

1. The Kynurenine Pathway in Obese Middle-Aged Women with Normoglycemia and Type 2 Diabetes; Kubacka J., Staniszewska M., Sadok I., Sypniewska G., Stefańska A.

Metabolites 2022, 12, 492

2. The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status. Kubacka J., Cembrowska p., sypniewska G., Stefańska A.

Nutrients 2021, 13, 3307

polegał na udziale w wizualizacji oraz akceptacji końcowych wersji manuskryptów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w artykułów przez mgr Justynę Kubacką jako części rozprawy doktorskiej w formie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

PIECZĄTKA
Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej
prof. dr hab. Grażyna Odrowąż-Sypniewska
Pieczęćka i podpis

Lublin, 08.02.2023

dr hab. Magdalena Staniszewska prof. KUL
Instytut Nauk o Zdrowiu
Wydział Medyczny
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
ul. Konstantynów 1 J, 20-708 Lublin
tel. 81-454-5621
email: magdalena.staniszewska@kul.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie niniejszej pracy:

Kubacka, J.; Staniszewska, M.; Sadok, I.; Sypniewska, G.; Stefanska, A. The Kynurenine Pathway in Obese Middle-Aged Women with Normoglycemia and Type 2 Diabetes. *Metabolites* 2022, 12, 492

obejmował nadzór nad wykonaniem analizy poziomu tryptofanu i jego metabolitów w próbkach surowicy za pomocą metody UHPLC-ESI-MS/MS, opracowanej w Pracowni Metod Separacji i Spektroskopii w Interdyscyplinarnym Centrum Badań Naukowych KUL oraz korektę merytoryczną na etapie przygotowania manuskryptu do druku.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w artykułu przez mgr Justynę Kubacką jako części rozprawy doktorskiej w formie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.



dr hab. Magdalena Staniszewska, prof. KUL

dr hab. Anna Stefańska, prof. UMK
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz, 14.02.2023r.

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie obu prac poglądowych:

- 1) Znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych, W: Choroby XXI wieku: diagnostyka, prewencja i leczenie / Danielewska Alicja, Mołdoch-Mendoń Izabela (red.), 2022, Lublin,
- 2) Znaczenie aminokwasów rozgałęzionych (BCAA) w insulinooporności i cukrzycy typu 2, W: Najnowsze metody profilaktyki, rozpoznawania i leczenia chorób / Maciąg Kamil, Talarek K. (red.), 2020, Lublin, polegał na nadzorze merytorycznym oraz ocenie ostatecznej wersji manuskryptów.

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie obu prac oryginalnych:

- 1) The Kynurenine Pathway in Obese Middle-Aged Women with Normoglycemia and Type 2 Diabetes; *Metabolites* 2022, 12, 492
- 2) The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status; *Nutrients* 2021, 13, 3307, polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, nadzorowaniu projektu badawczego, analizie statystycznej wyników, pomocy w wykonaniu oznaczeń wybranych markerów oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu, ocenie merytorycznej oraz ocenie ostatecznej wersji manuskryptów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w artykułów przez mgr Justynę Kubacką jako składowych rozprawy doktorskiej w formie cyklu prac opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Pieczętka i podpis

ADIUNKT
Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej

dr hab. Anna Stefańska, prof. UMK

dr n. med. Paulina Cembrowska

Łódź, 10.02.2023r.

Syneo Sp. o.o.

Laboratorium Medyczne Syneo Łódź

ul. Krakusa 28 Łódź

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt.: The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status; *Nutrients* 2021, 13, 3307, polegał na udostępnieniu danych antropometrycznych oraz biochemicznych dla wybranych grup kobiet oraz udostępnieniu wcześniej pozyskanych przeze mnie próbek materiału biologicznego w celu wykonania dodatkowych oznaczeń.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w artykułu przez mgr Justynę Kubacką jako części rozprawy doktorskiej w formie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

podpis

13409 | dr n. med. PAULINA CEMBROWSKA
DIAGNOSTA LABORATORYJNY
p.o. KIEROWNIKA
Laboratorium Medyczne SYNEVO Łódź
10-02-2023

Lublin, 10.02.2023r.

dr Ilona Sadok
Katedra Chemii
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Medyczny
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, Polska
ilona.sadok@kul.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstawanie pracy pt.: The Kynurenine Pathway in Obese Middle-Aged Women with Normoglycemia and Type 2 Diabetes; *Metabolites* 2022, 12, 492, polegał na oznaczeniu stężenia tryptofanu i jego metabolitów za pomocą zoptymalizowanej i zwalidowanej metody UHPLC-MS/MS z wykorzystaniem aparatury dostępnej w KUL.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w artykułu przez mgr Justynę Kubacką jako części rozprawy doktorskiej w formie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

Sadok Ilona