

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Lékařská fakulta v Plzni

I. Interní klinika, Diabetologické centrum

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Vliv inzulínu a glykémie na oxidační stres

MUDr. Michal Žourek

Vědní obor: vnitřní nemoci

Plzeň 2006

Poděkování

Úvodem bych chtěl poděkovat všem, kteří mi s touto prací pomáhali. Především děkuji svému školiteli Doc. MUDr. Zdeňkovi Rušavému Ph.D. za podporu v mé vědecké práci a pomoc v oblasti klinické medicíny.

Dále děkuji RNDr. Jaroslavu Kunešovi DrSc. z Fyziologického ústavu AV ČR v Praze za podporu a pomoc při hodnocení a následném publikování výsledků zvířecích experimentálních prací.

Poděkování patří i ing. Ladislavu Trefilovi a laborantkám z Ústavu klinické a experimentální biochemie FN Plzeň a Prof. MUDr. Ondřeji Topolčanovi DrSc. za pomoc při stanovování a hodnocení biochemických výsledků.

V neposlední řadě patří můj dík i přítelkyni a rodičům za pochopení a neochvějnou podporu v průběhu celé mojí práce.

Přehled použitých zkratk:

Akt/PKB - protein kináza B

AOC – celková antioxidační kapacita

aPKC – atypická protein kináza C

BH4 – tetrahydrobiopterinu

CoA – koenzym A

DAG – diacylglycerol

DM – diabetes mellitus

EHC – euglykemický hyperinzulínový clamp

ERK - extracelulární regulační protein kináza

FFA – volné mastné kyseliny

GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

GLUT4 - insulin-senzitivní transportér glukózy

GPI - Glycerol-fosfatidylinositol

Grb2 – vázající protein receptoru růstového faktoru-2

Grx – glutaredoxin

GS - glykogen syntáza

GSH – redukovaný glutathion

GSSG – oxidovaný glutathion

HHC – hyperglykemický hyperinzulínový clamp

HTG – hereditární hypertriglyceridemický potkan

IPG – Inositol fosfát glycan

IR – inzulínová rezistence

IRS-1 - insulin responzivní substrát 1

MAPK - mitogen aktivovaná protein kináza

MDA – malondialdehyd

MEK - MAP kinázy kináza

NADP – nikotinamidadenin dinukleotid

NADPH – redukována forma NADP

NF- κ B – nukleární faktor κ B

NO - oxid dusnatý

NOS – oxid dusnatý syntáza

O₂⁻ - superoxidový anion

oGTT – orální glukózový toleranční test

OH⁻ - hydroxylový radikál

ONOO⁻ - peroxynitrit

p110-PI3 – katalytická podjednotka kinázy

p85-PI3 – regulační podjednotka kinázy

PARP - poly(ADP-ribóza) polymeráza

PDE 3B - Fosfodiesteráza 3B

PDK1 - fosfoinositid dependentní kináza 1

PI3-kinase – fosfatidylinositol 3 kináza

PKC – protein kináza C

PLC γ - fosfolipáza C γ

PP-1G - protein fosfatáza 1G

PTB - fosfotyrosin vázající doména

Rd – frakční rychlost utilizace glukózy

ROS – reaktivní formy kyslíku

RSK(p90^{rsk}) - ribosomální S6 kináza

SH2 - src homologie 2

Shc - src homologie a kolagen vázající protein

SOS - Son of sevenless

TBARS – substance reagující s kyselinou thiobarbiturovou

Tg – triglyceridy

Trx – thioredoxin

Obsah:	strana
1. Úvod	7
2. Přehled dosavadních znalostí	7
2.1. Metabolické účinky inzulínu	7
2.1.1. Signální cesta pro inzulín	8
2.1.2. Tkáňově specifické knockout modely	9
2.1.3. Proteiny inzulín responzivního substrátu	13
2.1.4. Regulace funkce β -buněk	14
2.1.4.1. Regulace sekrece inzulínu	14
2.1.4.2. Regulace produkce inzulínu	14
2.1.4.3. Regulace množství β -buněk	15
2.1.5. Inzulínová resistance a dysfunkce β -buněk	16
2.2. Oxidační stres	17
2.2.1. Od redox rovnováhy po oxidační stres	17
2.2.2. Základní kameny: oxid dusnatý a superoxid	18
2.2.3. Redoxní regulace systémem NO^*/O_2^-	21
2.2.4. Oxidační stres jako podklad inzulínové resistance a diabetu mellitu 2. typu	24
2.2.5. Oxidační stres jako spojovací článek inzulínové resistance, diabetu a endoteliální dysfunkce	25
3. Měření inzulínové senzitivity	29
3.1. Clampové metody	29
3.1.1. Hyperinzulínový euglykemický clamp (EHC) a Hyperinzulínový izoglykemický clamp (IHC)	29
3.1.2. Hyperglykemický clamp (HGC)	32

3.1.3. Hypoglykemický clamp (HYC)	33
3.2. Hodnocení in vivo metodik zaměřených na hodnocení IS	33
4. Zvířecí modely	35
5. Cíle práce	37
5.1. Metodika	38
5.1.1. Použitý fyziologický model	38
5.1.2. Metodika clampu na zvířecím modelu	39
5.1.3. Design experimentu	40
5.1.4. Biochemické metody měření	42
5.2. Výsledky	45
5.3. Diskuze	53
5.3. Závěry	55
Příloha 1 Děje za inzulínovým receptorem	57
Příloha 2 Příčiny inzulínové resistance	59
Příloha 3 Další metody měření inzulínové senzitivity	63
Příloha 4 Zvířecí modely inzulínové resistance	66
Příloha 5 Technika permanentní kanylace a. carotis communis a v. jugularis	74
Literatura	76
Publikace	98

1. Úvod

Problematika měření a ovlivnění syndromu inzulínové resistance (IR) stojí dlouhou dobu v popředí zájmu týmu I. Interní kliniky FN vedeného doc. Rušavým.

Vzhledem k aktuálnosti tématu oxidačního stresu a jeho vlivu na patogenezi nejrůznějších onemocnění včetně rozvoje inzulínové resistance jsem si jej vybral pro svoji dizertační práci, která byla řešena na I. interní klinice FN v Plzni ve spolupráci s Fyziologickým ústavem AV ČR v Praze.

Práce je členěna obvyklým způsobem na přehled současných poznatků o problematice, metodiku, výsledky, diskuzi a závěry.

Součástí práce je i popis experimentu na zvířeti v bdělém stavu jehož zavedení na naše pracoviště spolu s MUDr. Pavlínou Kyselovou Ph.D. bylo jedním z úkolů mé postgraduální práce.

2. Přehled dosavadních znalostí

Inzulínoreistence a některé metabolické účinky inzulínu jsou předmětem sledování ve výsledkové části (kapitola 5) a proto považuji za důležité shrnout v několika následujících kapitolách metabolické účinky inzulínu, regulaci jeho sekrece a hlavní patogenetické mechanismy rozvoje inzulínové resistance.

2.1. Metabolické účinky inzulínu

Přesto že inzulín ovlivňuje širokou škálu fyziologických procesů, nejvíce známým je pro svou regulační roli glukózové homeostázy. V odpovědi na zvýšenou hladinu glykémie dochází ke zvýšení sekrece inzulínu a tím ke stimulaci vychytávání glukózy, syntézy glykogenu a naopak inhibici glykogenolýzy a glukoneogeneze. Kromě těchto krátkodobých a dobře popsaných efektů inzulín zasahuje do řady dalších metabolických

cest, z nichž velká část je způsobena změnou exprese více než 100 genů (1). Inzulín například reguluje expresi genů zapojených do vychytávání aminokyselin, do tukového metabolismu svalů a tukové tkáně (2), růstu buněk, jejich diferenciaci a přežití (3-7).

2.1.1. Signální cesta inzulínu

Různorodý efekt inzulínu je způsoben multikomponentním signálním komplexem, který je do značné míry konzervativní napříč spektrem různých živočišných druhů (8). Vazba inzulínu na jeho receptor spouští kaskádu dějů, které ovlivňují transport glukózy, syntézu glykogenu, metabolismus lipidů, syntézu proteinů, expresi genů, růst buněk, mitogenezu a přežívání buněk.

Inzulínový receptor je přítomen ve všech buňkách obratlovců a jeho počet kolísá od cca 40 na erytrocytech po 200,000 na adipocytech a hepatocytech (9). Receptor se skládá ze dvou extracelulárních alfa podjednotek obsahujících vazebné místo pro inzulín a dvou membránových beta podjednotek s vnitřní tyrozinázovou aktivitou. Receptor inzulínu podobnému růstovému faktoru-1 (IGF-1) je strukturálně podobný inzulínovému receptoru a obsahuje z 80% stejnou aminokyselinovou sekvenci v kinázové doméně.

IGF-1 receptory sdílí spolu s inzulínovými receptory stejné transdukční signální mechanismy, ačkoli se v extracelulární doméně výrazně odlišují (10).

Je dobře známo, že vnitřní tyrozin kinázová aktivita inzulínového receptoru je nezbytná pro vlastní efekt inzulínu. Bodové mutace v ATP-vazebném místě potlačující kinázovou aktivitu kompletně ruší efekt inzulínu v buněčných kulturách (11, 12). Mutace u lidí, které zapříčiňují částečnou inhibici kinázy, jsou spojeny s těžkou inzulínovou resistencí (13, 14). Myši bez inzulínových receptorů umírají krátce po narození, zatímco lidé přežívají krátkou dobu s těžkou růstovou retardací a diabetem (15-18).

2.1.2 Tkáňově specifické knockout modely

Bližší pohled do různorodých efektů inzulínu přináší zvířecí modely s tkáňově specifickými knockout inzulínovými receptory (tabulka 1). Myši s knockout inzulínovým receptorem ve svalech (MIRKO) mají porušený efekt inzulínu ve svalech a abnormality v tukovém metabolismu, které připomínají změny u metabolického syndromu (19). Je překvapující, že zatímco mnozí věří, že sval představuje hlavní místo inzulínové resistance u diabetu, u těchto zvířat je glukózová tolerance i plazmatické hladiny inzulínu normální. Ukázalo se, že kromě svalů je nezbytná k udržení inzulínem stimulované glukózové homeostázy řada tkání. Myši s knockout inzulínovým receptorem v játrech (LIRKO) jsou extrémně inzulínorezistentní a glukózo intolerantní, což potvrzuje důležitou roli neporušené signalizační cesty pro inzulín v játrech na regulaci glukózové homeostázy a inzulínové senzitivity (20). Nicméně se u těchto myší diabetes nevyvine ani z dlouhodobého pohledu z důvodu kompenzatorní hyperinzulinémie. To potvrzuje, že k rozvoji diabetu je potřeba defektu na úrovni β -buněk.

Myši s knockout inzulínovým receptorem v β -buňkách (BIRKO) progresivně ztrácí první fázi sekrece inzulínu při zátěži glukózou a představují manifestní glukózovou intoleranci. U těchto myší se také vyvine inzulínová resistance s obezitou a hyperinzulinémií (21). Některé metabolické efekty u BIRKO myší mohou být způsobeny i chyběním inzulínového receptoru v částech mozku, které ovlivňují hmotnost a příjem energie (22). Myši s knockout inzulínovým receptorem v mozku (NIRKO) také vyvinou obezitu, inzulínovou resistenci a glukózovou intoleranci (23). Nicméně tyto studie na tkáňově specifických knockout modelech pro inzulínový receptor ukazují na podíl četných tkáňových defektů na patogenezi diabetu mellitu 2. typu.

Tabulka 1

Přehled knockout modelů myší

Mutant	Genotyp
Knockout pro inzulínový receptor	
Kompletní	Normální intrauteriní růst a vývoj Těžká hyperglykémie a ketonémie po narození vede ke smrti během 48-72 hod.
MIRKO	zvýšená tuková hmota, Tg a FFA normální glykémie, inzulinémie a glukózová tolerance
LIRKO	inzulínová resistance, těžká glukózová intolerance, nesuprimovaná HGP hyperinzulinémie zapříčiněná zvýšenou sekrecí a sníženou clearance inzulinu
BIRKO	snížená sekrece inzulinu jako odpověď na zátěž glukózou progresivní vývoj glukózové intolerance a středně těžké obezity
NIRKO	rozvoj dietou indukované obezity a inzulínové resistance hyperinzulinémie a hypertriglyceridémie porušená spermatogeneze a maturace ovariálních folikulů

Mutant	Fenotyp
Knockout pro IGF 1	
Kompletní	Letální při narození z důvodu respiračního selhání Těžká růstová retardace a rozmanité vývojové vady
Knockout pro IRS proteiny	
IRS-1	Významná inhibice růstu Lehká inzulínová resistance a glukózová intolerance bez vývoje diabetu vzhledem k přítomné kompenzatorní hyperinzulinémii
IRS-2	Inzulínová resistance ve svalech a játrech spojená s abnormální funkcí β -buněk vede k rozvoji diabetu U mužů vede dehydratace a hyperosmolární koma ke smrti
IRS-3	Tělesná hmotnost a plazmatická hladina inzulínu a glukózy srovnatelná se zvířaty bez knockoutu
IRS-4	Lehké růstové defekty u mužského pohlaví Lehké defekty v reprodukci a lehká porucha glukózové homeostázy

Mutant	Genotyp
Knockout pro signální protein Inzulín/IGF-1	
PI 3 kináza	Zvýšená inzulínová senzitivita, hypoglykémie a zvýšený glukózový transport způsobený přepnutím na alternativní cestu (p50)
p85 regulační podjednotka	Ukazuje roli PI-3 kinázy v metabolismu glukózy
Akt/PKB-2	Inzulínová resistance ve svalech a játrech spojená se zvýšením hmotnosti pankreatických ostrůvků Glukózová intolerance a hyperinzulinismus
p70 ^{s6K} -1	Bez inzulínové resistance Menší velikost β -buněk spojená se snížením hmotnosti β -buněk, obsahem inzulínu a jeho sekrecí
Knockout pro glukózové transportéry	
GLUT4 (kompletní)	Inzulínová resistance s mírnou glukózovou intolerancí, růstová retardace a snížení tukové tkáně Hyperinzulinémie, srdeční hypertrofie, pokles laktátu a FFA
GLUT4 (svaly)	Inzulínová resistance, lačná hyperglykémie, glukózová intolerance – větší efekt než u knockoutu pro inzulínový receptor ve svalech
GLUT4 (tuková tkáň)	Významně porušené inzulínem navozené vychytávání glukózy v adipocytech Inzulínová resistance ve svalech a játrech vedoucí ke glukózové intoleranci a hyperinzulinémii

2.1.3. Proteiny inzulin receptorového substrátu

Vazba inzulinu na receptor aktivuje tyrozin kinázu, což vede k autofosforylaci tyrozinových reziduí na β -podjednotce receptoru. Tento děj vede k fosforylaci několika proteinových substrátů, primárně proteinů inzulin receptorového substrátu (IRS). Tyto proteiny hrají důležitou regulační roli mezi inzulinovým receptorem a kaskádou postreceptorových dějů. Do této doby byly identifikovány čtyři savčí IRS proteiny (24-27). IRS-1 ovlivňuje růst somatických buněk a zprostředkovává efekt inzulinu ve svalové a tukové tkáni (28-31). IRS-2 hraje důležitou roli v přežívání a růstu β -buněk, efektu inzulinu na játra, růst mozku, reprodukci a příjem potravy (32-36). IRS-3 a IRS-4 jsou predominantně exprimovány v tukové a neuroendokrinní tkáni a jejich přesná úloha je stále předmětem dalších výzkumů (37, 38).

Genové knockout experimenty prokázaly klíčovou roli IRS-1 a IRS-2 v postreceptorové kaskádě dějů. Ačkoli IRS-1 deficientní myši přežívají, vykazují významný defekt v embryonálním i postnatálním vývoji (28, 29). Tyto myši jsou také inzulinorezistentní, s porušenou glukózovou tolerancí a dalšími rysy metabolického syndromu jako je hypertriglyceridémie a hypertenze (28, 29, 39). Nicméně i přes inzulinovou resistenci se u nich diabetes nikdy nevyvine z důvodu přítomné kompenzatorní hypersekrece inzulinu (28). Naproti tomu se u IRS-2 deficientních myší rychle vyvine diabetes a tato porucha je většinou fatální u mladých myší mužského pohlaví a středněvěkých myší ženského pohlaví (33). IRS-3 a IRS-4 nemají závažný fenotyp. Děje za inzulinovým receptorem jsou podrobněji popsány v příloze 1 (strana 56)

2.1.4. Regulace funkce β -buněk

Plasmatická koncentrace glukózy je hlavní regulační jednotkou funkce β -buněk, ačkoli se na regulaci podílí řada dalších faktorů jako ostatní cukry, aminokyseliny, volné mastné kyseliny, hormony, růstové faktory a některé farmakologické látky.

2.1.4.1. Regulace sekrece inzulínu

Glukóza je klíčovým regulátorem sekrece inzulínu. Expozice glukózou zvyšuje poměr ATP:ADP a spouští uzavření ATP-senzitivních K^+ kanálů. Tento děj způsobí depolarizaci membrány a stimuluje otevření napěťově řízených Ca^{2+} kanálů. Výsledný vtok Ca^{2+} pak zvyšuje koncentraci cytosolického Ca^{2+} a spouští exocytózu. Tento efekt je mediovaný protein kinázou C nebo přímou stimulací sekrečních granul.

Kromě glukózy jako hlavního stimulu se na spouštění sekrece může podílet řada dalších molekul jako FFA, aminokyseliny a ketokyseliny (46, 47). Navíc se na sekreci inzulínu podílí množství hormonů a neuromediátorů jako GLP-1, který zvyšuje hladinu cAMP a aktivuje protein kinázu C prostřednictvím specifických G proteinů (48). Jiná aktivační cesta začíná vazbou cholinergních agonistů na muskarinové receptory, což stimuluje produkci inositol trifosfátu (IP3) a diacylglycerolu (DAG) a tím zvýšení intracelulární koncentrace kalcia a aktivaci protein kinázy C (49-51).

2.1.4.2 Regulace produkce inzulínu

Proinzulín, prekursor molekuly inzulínu je regulován hladinou glukózy na transkripční i posttranskripční úrovni (52). Stimulační efekt glukózy je specifický pro inzulín, jelikož biosyntéza proinzulínu může být až 30x zvýšena na translační úrovni, zatímco celková syntéza proteinu je zvýšena jen 2x (53-55). Glukózou indukované zvýšení mRNA proproinzulínu je spojeno se zvýšením biosyntézy proinzulín konvertujícího enzymu

(PC2 a PC3) (56, 57). Paralelně k proinzulínu zvýšená biosyntéza PC2 a PC3 vysvětluje schopnost B-buněk reagovat na změny glukózové homeostázy.

Za normálních podmínek stimuluje glukóza jak biosyntézu proinzulínu, tak i sekreci inzulínu. Na tomto procesu se ale mohou podílet i další nutrienty. Zvýšená hladina FFA například zvyšuje bazální sekreci inzulínu u potkanů (58). Nicméně zvýšená hladina FFA nestimuluje proporcionálně i syntézu proinzulínu a tím ve svém důsledku vede k poklesu celkového množství inzulínu v β -buňce (58, 59). Tento mechanismus pak může vysvětlovat jak se chronicky zvýšené FFA podílí na rozvoji dysfunkce β -buňky a patogenezi diabetu mellitu 2. typu (58).

2.1.4.3 Regulace množství β -buněk

Dynamická rovnováha množství β -buněk je důležitým faktorem v udržení glukózové homeostázy. Počet β -buněk ovlivňuje množství faktorů, například: změny v rychlosti replikace, neogenezi a buněčné smrti (nekróza i apoptóza) (60). Ačkoli jsou β -buňky u dospělého jedince obecně dobře diferencovány s asi pouze 0,5% buněk v mitóze, může být proliferace β -buněk zvýšena nutrienty jako glukóza a aminokyseliny (61, 62).

Normální růst buněk je ovlivňován glukózou na nejrůznějších úrovních zahrnujících mitogenezu, syntézu DNA a buněčnou proliferaci. Akt/PKB a p70^{S6K} transgení myši modely ukazují, že velikost β -buněk může být kontrolována signálními cestami Akt/PKB, mTOR a p70^{S6K} přes aktivaci kinázy IRS-2/PI 3 (43, 44, 63).

IGF-1 stimuluje proliferaci β -buněk až 50-ti násobným zvýšením stimulace mitogeneze (64). Zvýšená proliferace β -buněk je sice glukózo-dependentní, ale vyžaduje také aktivaci PI 3 kinázy a IRS-2, což vede k aktivaci MAPK a p70^{S6K} (64). Tato data ukazují na důležitou roli IRS-2 v regulaci množství β -buněk. Navíc se k efektu IGF-1

uplatňuje i stimulace glukózo-dependentní mitogeneze β -buněk cestou růstového hormonu (GH).

Nedávné experimenty pomohly objasnit povahu glukózové dependence IGF-1 stimulované proliferace β -buněk. Glukóza je schopna nezávisle na ostatních faktorech aktivovat MAPK (64, 65). I když může glukóza do značné míry zvýšit aktivitu PI 3 kinázy, přesto tento děj nevede k aktivaci Akt/PKB v β -buňkách (66). Navíc, Akt/PKB může být aktivován přímo přes IGF-1 nezávisle na glukóze v β -buňce. Nicméně glukóza přes Akt/PKB přímo aktivuje cestu mTOR/p70^{s6K} (66). Nutrienty a růstové faktory tedy regulují mitogenezu změnami jemné rovnováhy mezi signálními cestami MAPK a PI 3 kinázy v β -buňce (66).

2.1.5. Inzulínová resistance a dysfunkce β -buněk

Data získaná od knockout myších modelů ukazují, že defekty v klíčových signálních proteinech jako IRS-1 a IRS-2 vedou ke vzniku inzulínové resistance v periferních tkáních (28, 29, 33). Tento pohled posilují znalosti o vlivu porušené signální cesty inzulínu na rozvoj periferní inzulínové resistance a také o vlivu zvýšených koncentrací FFA a akumulaci tuků intracelulárně na sníženou inzulínovou senzitivitu (67). Zvýšené hladiny cirkulujících FFA jsou spojeny s mnohočetnými abnormalitami v inzulínové signální kaskádě zahrnující sníženou tyrozinovou fosforylaci IRS-1, sníženou aktivitu PI 3 kinázy a zvýšenou aktivitu PKC (68, 69). Konečným důsledkem je pak snížená translokace GLUT4, což vede k významnému poklesu transportu glukózy ve svalech (68).

Ačkoli je koncept inzulínové resistance v β -buňkách relativně nový, důkazy získané od IRS-2, Akt/PKB a p70^{s6K} knockout myší podporují hypotézu vzniku dysfunkce β -buněk u diabetu mellitu 2. typu v důsledku defektní signální kaskády IGF-1 (70, 33, 44, 63).

Zatímco se hromadí důkazy o inhibici signální kaskády inzulínu v kosterním svalu zvýšenou hladinou tuků, stále není zcela jasné, zda akumulace tuku v β -buňkách také inhibuje signální cestu inzulínu ve slinivce. Zvýšené plasmatické hladiny FFA, které jsou běžně přítomné u pacientů s diabetes mellitus 2. typu, mají lipotoxický účinek na pankreas a objevují se i důkazy o podílu FFA na zvýšené apoptóze β -buněk a tím i rozvoji dysfunkce β -buněk (71, 72). Nedávno se objevila i hypotéza, že u obézních jedinců intracelulárně akumulovaný tuk v β -buňkách může vést k inhibici zvýšení masy β -buněk a tím zabránění kompenzace periferní inzulínové resistance a rozvoji diabetu mellitu 2. typu u těchto jedinců (73). Navíc se k efektu tuku na signální cesty inzulínu a IGF-1 v β -buňce přidává i toxický efekt vysokých hladin glukózy (glukotoxicita) na rozvoj apoptózy β -buněk (74). Při zvýšených koncentracích glukózy je snížen glukózo-dependentní IGF-1 stimulační efekt na proliferaci β -buněk, což ukazuje na další nežádoucí efekt hyperglykémie na funkce β -buňky (64, 75).

2.2. Oxidační stres

Vybrané parametry oxidačního stresu jsou předmětem sledování ve výsledkové části (kapitola 5) a proto jsou v následujících kapitolách popsány hlavní oxidoredukční děje, jejich regulace a propojení se syndromem inzulínové resistance.

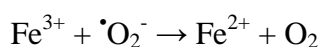
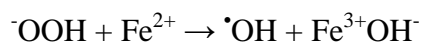
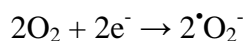
2.2.1. Od redox rovnováhy po oxidační stres

Chemie oxidoredukčních pochodů je pro životní pochody zcela zásadní, protože pouze přesun elektronů nebo vodíkových protonů je spojen se získáváním energie ve formě ATP. Proto není jistě překvapením, že jsou redoxní reakce zapojeny do regulace mitochondriálních a glykolytických pochodů. Patofyziologický koncept porušené redoxní rovnováhy je označován jako oxidační stres.

Tento pojem označuje situaci, ve které fyziologický redoxní stav hlavních buněčných oxidoredukčních systémů jako glutathion, askorbát, vitamin E, lipoová kyselina, NADPH a NADP je posunut směrem k oxidovanému stavu. Buňky tento stav nedokáží dlouho tolerovat, což vede k rozličným patofyziologickým konsekvencím jako je peroxidace lipidů, zlomy vláken DNA a oxidace proteinů. Situace, ve které jsou tyto parametry měřitelné, ukazuje na většinou ireverzibilní poškození oxidativním mechanismem. Naproti tomu redoxní regulace popisuje reverzibilní fázi krátkodobých fyziologických reakcí. Oxidační reakce vedoucí k posttranslačním modifikacím proteinů (glutathiolace, S-nitrosilace, methionin sulfoxidace, formace disulfidů) nebo ke změnám v oxidačním stavu kovů je za podmínek funkční redoxní regulace navracena zpět do klidového stavu redukčními pochody.

2.2.2 Základní kameny: oxid dusnatý a superoxid

Do objevu oxidu dusnatého (NO) jako intra a intercelulárního posla (78), byly znalosti o buněčné redoxní chemii omezeny na elektronový transportní řetězec, tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) a jejich interakce s makromolekulami a antioxidačním systémem (78). Jako hlavní ROS odpovědné za nekrózu a apoptózu byly identifikovány peroxid vodíku a hydroxylové radikály odvozené od superoxidového anionu za katalýzy železem (viz rovnice).



Dle současného konsenzu dochází při překročení buněčných antioxidačních kapacit k napadání buněčné organické hmoty vysoce reaktivními radikály $\cdot\text{OH}$. Očividnou diskrepancí stále zůstává zařazení $\cdot\text{O}_2^-$ do ROS, ačkoli chemické vlastnosti tohoto radikálu jsou spíše redukční než oxidační. Proto byla také dlouho nejasná role superoxid dismutázy (SOD), neboť při pH 7 zůstává chemická přeměna superoxidových radikálů dostatečně rychlá k udržení jeho množství v mikromolárním rozpětí. Tento pohled se dramaticky změnil po objevu role oxidu dusnatého ($\cdot\text{NO}$) jako signální molekuly (79, 79).

Jeho rychlá reakce se superoxidem, která převyšuje rychlost katalýzy Cu,Zn-SOD, efektivně snižuje intracelulární hladinu oxidu dusnatého pod úroveň potřebnou k aktivaci guanylát cyklázy a tím mění funkci superoxidu na intracelulárního antagonistu oxidu dusnatého (80, 81).

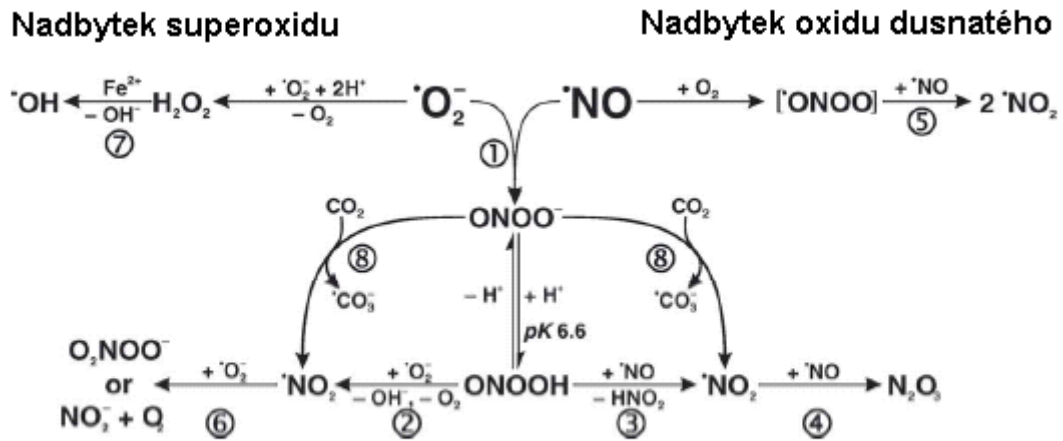


Po zařazení superoxidu jako selektivního oxidantu pro $\cdot\text{NO}$, byla také objevena jeho inhibiční schopnost bazální aktivity guanylyl cyklázy (82). A tedy tvorba cGMP guanylát cyklázou může být blokována přímo i nepřímo přes superoxid a oxid dusnatý. Podobný fenomén byl nalezen i pro calcineurin (83).

Obrázek 2 ukazuje schéma možných reakcí oxidu dusnatého a superoxidu.

Obrázek 2

Reakce mezi superoxidem a oxidem dusnatým



- 1 - Hlavní produkt reakce mezi adekvátním množstvím oxidu dusnatého a superoxidu je peroxynitrit (ONOO[•]).
- 2, 3 - Při lehkém nadbytku jedné z forem dochází k posunu směrem k produkci dusíkatých radikálů (•NO₂).
- 4 - Větší nadbytek NO vede k produkci N₂O₃ a k nitrosylaci.
- 5 - Relativně vysoké koncentrace •NO a O₂ jsou nezbytné pro autoxidaci •NO.
- 6 - Jestliže •O₂⁻ převyší •NO může dojít k formování peroxynitritu (O₂NOO[•]) nebo nitritu.
- 7 - Vyšší koncentrace •O₂⁻ než •NO vede cestou Fentonovy reakce k formování radikálů •OH a tím navození toxicity se všemi známkami oxidačního stresu.
- 8 - Přítomnost vysokých koncentrací oxidu uhličitého v biologickém systému (až 1 mmol) posunuje degradační dráhu ONOO[•] směrem k tvorbě •NO₂.

2.2.3. Redoxní regulace systémem $\cdot\text{NO}/\cdot\text{O}_2^-$

Radikály jsou obecně velmi reaktivní molekuly, což je dáno přítomností nepárového elektronu. Ale v případě $\cdot\text{NO}$ a $\cdot\text{O}_2^-$ je nepárový elektron dostatečně stabilní a reaguje jen s omezeným spektrem buněčných molekul. Tyto molekuly jsou buď sami o sobě radikály nebo přechodné kovy s nepárovým elektronem. Dokonce i při nízkých hladinách $\cdot\text{NO}$ a $\cdot\text{O}_2^-$ je jejich reaktivita s těmito molekulami vysoká, zatím co se reakce s molekulami s párovým elektronem objevují jen zřídka. Při fyziologicky nízkých intracelulárních koncentracích $\cdot\text{NO}$ a $\cdot\text{O}_2^-$ tak může být jednoduchá chemie popsána na obrázku 2 vysvětlením buněčných redoxních reakcí a fyziologické regulace. Spektrum možných chemických redoxních stavů pak představuje možnosti s pouze přítomným $\cdot\text{NO}$, s nadbytkem $\cdot\text{NO}$ nad $\cdot\text{O}_2^-$, s adekvátním množstvím obou radikálů nebo s nadbytkem $\cdot\text{O}_2^-$. Z těchto stavů pak pramení možné fyziologické reakce jako nitrosylace, nitrozace, oxidace thiolů, methionionová sulfoxidace a nitrace tyrosinu a v případě nadbytku superoxidového radikálu i vlastní kaskáda oxidačního stresu a poškození volnými radikály.

Vzhledem k dosud získaným poznatkům lze odvodit scénář buněčné regulace, ve kterém je redoxní signalizace rovnocenná roli Ca^{2+} nebo fosforylaci. Neboť všichni zmínění hráči spolu utváří síť vztahů a propojení jako Ca^{2+} spouštěná oxidace nebo Ca^{2+} a superoxidem regulovaný calcineurin (83). PKC stimuluje NADPH oxidázu a její produkt superoxidový radikál dále zvyšuje aktivitu PKC. Mnoho buněk obsahuje enzym NO syntázu (NOS-1 nebo NOS-3) a pokud přijmeme za prokázanou i existenci mitochondriální NOS, pak všechny buňky uvolňují $\cdot\text{NO}$ po stimulaci Ca^{2+} (84). Tento děj pak vede k aktivaci kaskády $\cdot\text{NO}/\cdot\text{O}_2^-$ jak již bylo zmíněno výše.

Bylo prokázáno, že vedle uvolňování oxidu dusnatého, hraje v redoxní regulaci klíčovou roli právě formování superoxidu. Proto všechny systémy uvolňující $\cdot\text{O}_2^-$

potřebují několikastupňovou kontrolu. Jednak systémy jako NADPH oxidáza, mitochondrie, xantin oxidáza nebo NO syntáza potřebují speciální aktivační mechanismus. A dále jejich aktivace probíhá kaskádovitě s postupně se zvyšující hladinou superoxidu, která odpovídá aktuálnímu stavu buněčné aktivace. Obvykle jsou NADPH oxidázy nízko výkonné systémy, které jsou receptorově spouštěny fosforylací cytosolické podjednotky (85). Protrahované a zvýšené uvolňování superoxidu může vést k otevření mitochondriálních permeabilních pórů (PTP) a tím umožnění vzniku dalších superoxidových radikálů (86). Následně může dojít k aktivaci xantin oxidázy, oxidaci tetrahydrobiopterinu (BH₄), konverzi NOS na oxidovanou formu a tím další tvorbě superoxidu.

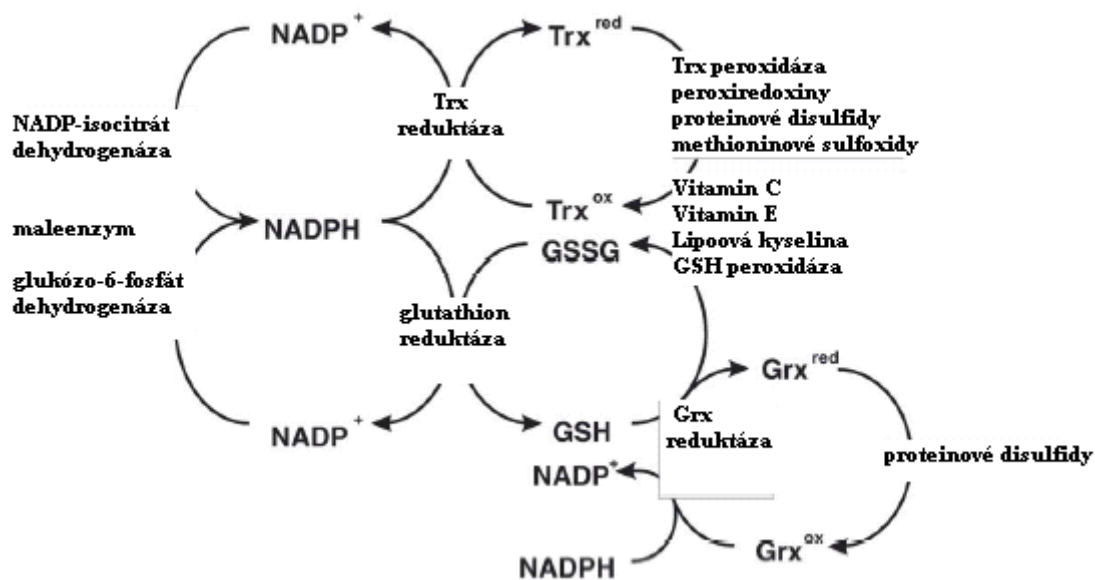
Aby proces oxidačních postranslačních modifikací zůstal reverzibilní, musí zde být možnost aktivace redučních dějů k obnovení výchozího stavu. A dále zde musí být zachována možnost aktivace redukčních dějů v libovolném bodě oxidačních modifikací s výjimkou proteolýzy, např: proteolytická konverze xantin oxidázy nebo kaspázy.

Bohužel přesný mechanismus redukčních pochodů redoxních dějů není doposud plně pochopen a popsán a neexistuje jasné rozdělení reverzibilních redoxních pochodů od ireverzibilního oxidačního stresu.

Dalším nevyřešeným bodem je mechanismus smysluplné regulace oxido/redukčních pochodů k zabránění redukce pokud má dále pokračovat oxidační děj a opačně. Podle současných poznatků je možná hypotéza redoxní regulace vlastními poskytovateli redukčního ekvivalentu, jako je inhibice NADP⁺ dependentní isocitrát dehydrogenázy S-nitrozací (87). Zahrnutím pozorované aktivace aldozo reduktázy S-nitrozací můžeme odvodit efektivní regulační mechanismus formování cytosolického NADPH, který slouží jako řídicí jednotka redukčních kaskád (obrázek 3).

Obrázek 3

Redukční složky redoxní regulace



NADPH představuje hlavní běžný reduktant. Je kontinuálně regenerován NADP^+ dependentní isocitrát dehydrogenázou, maleenzymem a glukózo-6-fosfát dehydrogenázou. Systémy thioredoxinu (Trx) a glutaredoxinu (Grx) spolu s redukovaným glutathionem (GSH) jsou přímo spojeny s hladinami buněčného NADPH.

Redukované formy Trx a Grx poskytují redukční ekvivalent pro redukci disulfidů, methioninových sulfoxidů, peroxiredoxinů a Trx peroxidázy.

Oba mohou regenerovat oxidovanou GSH peroxidázu, vitamíny C, E a lipoovou kyselinu.

2.2.4. Oxidační stres jako podklad inzulínové resistance a diabetu mellitu 2. typu

Hlavními tkáněmi patogeneze inzulínové resistance jsou svaly a tuková tkáň. Když přísun kalorií přesáhne energetický výdej dojde ke generování množství mitochondriálního NADH (mNADH) a ROS mechanismem substrátem indukovaného zvýšení aktivity cyklu trikarboxylových kyselin (88). Jako prevence formování ROS funguje NADP dependentní inhibice inzulínem stimulovaného vychytávání nutrientů (pyruvát, FFA) a jejich vstup do mitochondrie. Zda je primárním zdrojem energie překrmovaného svalu glukóza nebo FFA nebylo dosud jednoznačně vyřešeno a je zdrojem kontroverzních názorů. V obou případech vede přísun substrátu do citrátového cyklu ke generování mitochondriálního acetyl-CoA a NADH (88). Acetyl-CoA získaný buď z glukózy přes pyruvát nebo z β -oxidace mastných kyselin je pak sloučen s oxaloacetátem za vzniku citrátu, který vstupuje do citrátového cyklu a je konvertován na isocitrát. NAD⁺ dependentní isocitrát dehydrogenáza generuje NADH. V případě, že excesivní přísun NADH nemůže být metabolizován oxidativní fosforylací nebo jiným mechanismem, dochází ke zvyšování mitochondriálního protonového gradientu s přesunem singletových elektronů na kyslík a formování volných kyslíkových radikálů jako je superoxidový anion (89). Jednou z cest jak zabránit generování velkého množství NADH je inhibice oxidace FFA (90). Intracelulární vzestup koncentrace FFA vede k poklesu translokace GLUT4 receptorů na plasmatickou membránu, což vede k rozvoji resistance na inzulínem stimulované vychytávání glukózy ve svalech a tukové tkáni (91-93). V tomto případě pak inzulínová resistance funguje jako kompenzatorní ochranný mechanismus před oxidačním poškozením, které by bylo navozeno dalším inzulínem stimulovaným vychytáváním glukózy.

Tato teorie byla také podpořena mnoha in vitro a zvířecími studiemi, kde antioxidanty dokázaly zlepšit inzulínovou senzitivitu (94). Stejně tak klinické studie prokázaly zlepšení inzulínové senzitivity u inzulín-resistentních jedinců po léčbě vitamínem E, vitamínem C nebo glutathionem (94, 95).

2.2.5. Oxidační stres jako spojovací článek inzulínové resistance, diabetu a endoteliální dysfunkce

Situace, při které známé množství inzulínu navodí v organismu nebo in vitro systému menší biologický účinek než se očekává, je označena termínem inzulínová resistance (IR). V klinickém pojetí svědčí pro IR současný nález hyper a/nebo euglykémie při hyperinzulinémii vyvolané jako kompenzatorní odpověď na snížený biologický účinek inzulínu. Příčiny IR jsou podrobněji rozebrány v příloze 2 (strana 58).

Z počátku je v případě inzulínoresistance zachována normální glukózová tolerance kompenzatorní hyperinzulinémií. Porušená glukózová tolerance vznikne v případě dalšího zhoršení inzulínoresistance a/nebo v případě poklesu kompenzatorní hypersekrece inzulínu. Vzestup hladiny inzulínu, FFA a glykémie může zvýšit produkci ROS a oxidační stres, stejně jako aktivovat stres senzitivní kaskády (96). Toto ve svém důsledku pak může zhoršit inzulínovou sekreci i vlastní efekt inzulínu a tím zrychlit vývoj diabetu mellitu 2. typu.

Porušená glukózová tolerance (IGT), to znamená postprandiální hyperglykémie s normální glykemií na lačno, je spojena s oxidačním stresem (97). U pacientů s IGT běžně dochází ke ztrátě časně fáze sekrece inzulínu (98).

Sekrece inzulínu v odpovědi na intravenózně podanou glukózu je bifázická. První fáze je rychlé uvolnění inzulínu do krevního oběhu jako reakce na vstřebávání cukrů nebo smíšeného jídla (99). Rychlé zvýšení koncentrace inzulínu v portální krvi a jeho vazba

na receptory jaterních buněk je nezbytná k promptní supresi jaterní produkce glukózy a snížení rychlosti vzestupu glykémie (98). Na zvířecích a lidských experimentech bylo prokázáno, že selektivní vyřazení časné fáze sekrece inzulínu u zdravých jedinců vede k IGT s velkými výkyvy glykemií (98). U nediabetických subjektů je ztráta časné sekrece inzulínu determinantou pozdějšího vývoje diabetu (98). Tato zásadní role časné fáze sekrece inzulínu byla podpořena i průkazem zlepšení glukózové tolerance při zatížení glukózou i smíšeným jídlem po obnovení časné fáze sekrece inzulínu (98). Oxidační stres postihuje specificky in vivo právě časnou fázi sekrece inzulínu, jelikož pozdní fáze může být obnovena účinkem antioxidantů (94). Navíc bylo prokázáno, že nadprodukce ROS v mitochondriích je potentním mechanismem poškození glukózou navozené časné fáze sekrece inzulínu (100).

Řada studií prokázala, že postprandiální glykémie je lepší predikátor kardiovaskulárního rizika než glykovaný hemoglobin, který v sobě odráží jak postprandiální tak i lačnou glykémii (97). Postprandiální glykémie tak může přímo ovlivňovat kardiovaskulární komplikace přes oxidačním stresem zprostředkovaným toxickým efektem na endotel (101).

Opakovaná expozice hyperglykémii a zvýšené hladině FFA může časem vést k ireverzibilní dysfunkci β -buněk (102). V počátečních fázích je toto poškození charakterizované defektní expresí inzulínového genu, které je reverzibilní (103).

Glukózová a lipidová toxicita vede k postupně narůstajícímu ireverzibilnímu poškození buněčných komponent produkce inzulínu (98).

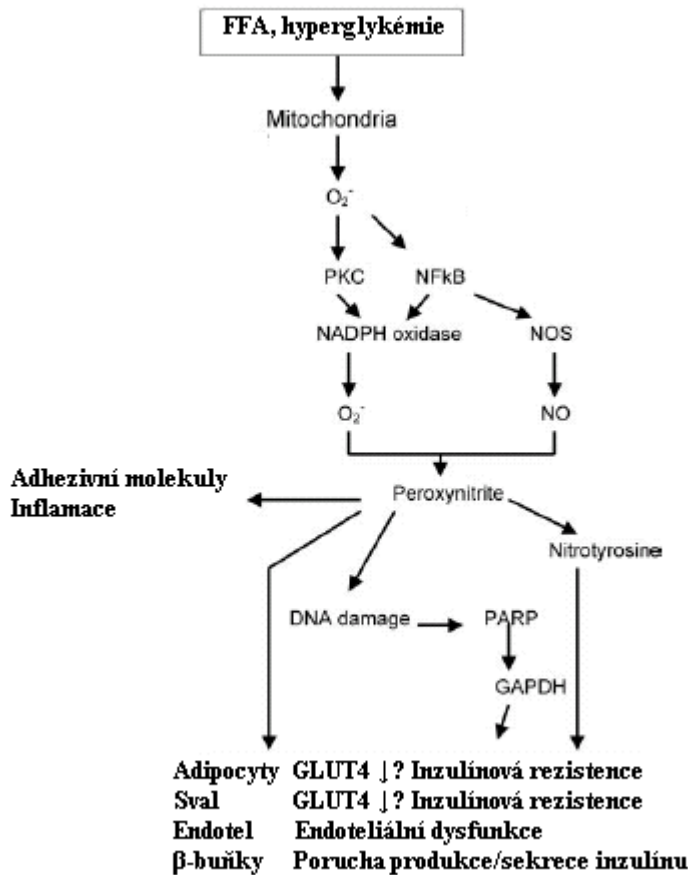
Poslední studie na zvířecích modelech diabetu 2. typu prokázaly, že progresivní snížení počtu β -buněk je spojeno se zvýšeným oxidačním stresem (104). Při delším přetrvávání hyperglykémie zde glukotoxicita vedla k poškození sekrece inzulínu β -buňkou, jejímu selhání a progresivní ztrátě masy β -buněk (104).

U zvířecích modelů i lidí byly v poslední době intenzivně zkoumány také vaskulární funkce. Konstantním nálezem u zvířecích modelů s diabetem navozeným alloxanem nebo streptozotocinem byla poškozená endotelem mediovaná vasodilatace (105, 106). Stejně tak byla prokázána endoteliální dysfunkce u lidí s inzulin dependentním i inzulin non-dependentním diabetem (107, 108). A oxidační stres se ukazuje jako hlavní mediátor endoteliální dysfunkce u diabetu.

S ohledem na současné znalosti můžeme říct, že oxidační stres hraje klíčovou roli ve vzniku diabetu mellitu 2. typu a kardiovaskulárních nemocí.

Vztah hyperglykémie a FFA k poškození buněk oxidačním stresem je ukázán na obrázku 4.

Obrázek 4



V buňkách způsobuje hyperglykémie a FFA nadprodukcí superoxidu v mitochondriích a nadprodukcí oxidu dusnatého cestou NOS, zatímco aktivované PKC a NF-κB vedou k expresi enzymu NADPH.

NADPH generuje velké množství superoxidu. Superoxid spolu s oxidem dusnatým formuje silně reaktivní peroxynitrit, který poškozují DNA.

Poškození DNA je stimulem pro aktivaci jaderného enzymu poly(ADP-ribóza) polymerázu (PARP).

Aktivace poly(ADP-ribóza) polymerázy vede k poklesu aktivity glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH).

Výsledkem této kaskády je snížení exprese GLUT4 v adipocytech a svaích a tím navození inzulínové rezistence.

Dále endoteliální dysfunkce v buňkách endotelu a pokles produkce a sekrece inzulínu β-buňkami.

3. Metody měření inzulínové senzitivity

Měření inzulínové senzitivity (IS) nebo inzulínové resistance (IR) má velký význam pro výzkum patogeneze hyperglykémie a IGT u DM 2. typu, predikci rizika metabolických poruch, a hodnocení účinnosti terapeutického režimu u diabetu mellitu 2. typu. Inzulínová senzitivita kvantifikuje účinek inzulínu na metabolismus glukózy (jaterní produkci glukózy a její utilizaci periferními tkáněmi).

3.1. Clampové metody

Clampové „zámkové“ metody jsou považovány za "zlatý standard" měření IS (111).

Glykemický clamp je vyšetření, které umožňuje navodit a libovolnou dobu udržovat požadovanou hladinu glykémie a inzulínémie pomocí kontinuálního infuzního podání inzulínu a glukózy.

Podle hodnot cílové glykémie rozlišujeme testy hyperglykemické, euglykemické, izoglykemické a hypoglykemické.

3.1.1. Hyperinzulínový euglykemický clamp (EHC) a Hyperinzulínový izoglykemický clamp (IHC)

Euglykemický clamp je test, při kterém je hladina glykémie udržována na hodnotě lačné normoglykémie zdravého jedince tj. 4,5-5 mmol/L. Jako izoglykemický clamp je označováno vyšetření, při kterém je cílovou hodnotou opět lačná glykémie daného jedince, ale ta nemusí být fyziologická – např. glykémie 10 mmol/L u nemocného s diabetem.

EHC a IHC umožňují kvantifikaci utilizace glukózy – užívají se k měření inzulínové senzitivity (IS) či inzulínové rezistence (IR).

Hyperinzulinémií navodíme konstantní infúzí inzulínu a poklesu glykémie bráníme současnou variabilní infúzí glukózy. Uvedená infúze inzulínu navodí supresi endogenní produkce glukózy játry a na druhé straně zvýší utilizaci glukózy v periferních tkáních. Za těchto podmínek je veškeré množství infundované glukózy využito tkáněmi a platí proto následující vztah (77)

$$GIR = \Delta R_d - \Delta HPG$$

GIR - rychlost infúze glukózy (glucose infusion rate)

ΔR_d - inzulínem navozené zvýšení utilizace glukózy

ΔHPG - navozený pokles v endogenní produkci glukózy játry.

Inzulínová infúze: Používá se krátkodobě působící inzulín v množství přepočítaném na věk, pohlaví, hmotnost a tělesný povrch pacienta. Lze si zvolit různé infúzní rychlosti podle požadované cílové koncentrace inzulínu v plasmě, která může být v oblasti fyziologických hodnot, ale i submaximálních a supramaximálních hodnot.. Konstantní rychlost inzulínové infúze se uvádí buď v mU na tělesný povrch (40 mU/m = cca 100 uU/ml koncentrace inzulínu v plasmě), nebo v mU vztažených na hmotnost a časovou jednotku (např. $1 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} = 60\text{-}70 \text{ uU/ml}$). Vzhledem k adsorbci inzulínu na stěny infúzního setu je nutné k zamezení tohoto jevu obohatit roztok s inzulínem o malé množství krve pacienta, plasmy nebo albuminu.

Někteří autoři ještě doporučují současnou intravenózní aplikaci noradrenalinu a propranololu (112) nebo somatostatinu (113, 114) k potlačení endogenní produkce inzulínu.

Monitorování glykémie a úpravu rychlosti infúze glukózy je nutno provádět často, nejlépe v pětiminutových intervalech, aby se zabránilo nadměrným výkyvům glykémie od požadované hodnoty. Přibližně po 2 hodinách bývá dosažen rovnovážný stav "steady state", kdy se rychlost infúze glukózy rovná rychlosti metabolismu glukózy celého organismu, to znamená, že množství glukózy infundované do organismu vyjadřuje míru inzulínem zprostředkované utilizace glukózy (M-hodnota, vyjádřená v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Výsledná M-hodnota se koriguje na hmotnost pacienta, jeho tělesný povrch a ztráty glukózy močí (cca $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (111).

Při úplné supresi endogenní produkce glukózy játry se množství glukózy infundované (GIR) v průběhu clampu ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) rovná její utilizaci organismem. Podle DeFronza se rychlost infúze glukózy u zdravých jedinců pohybuje v rozmezí $4,5\text{-}9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. U pacientů s inzulínovou rezistencí je na udržení euglykémie potřeba infundovat mnohem menší množství glukózy, maximálně $5,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. U pacientů s porušenou glukózovou tolerancí je potřeba glukózy redukována přibližně o 24 %, u pacientů s DM 2. typu až o 58 % v porovnání se zdravými jedinci (115).

EHC používá konstantní hladinu glykémie pro všechny vyšetřované jedince. Cílem této metody je měnit rychlost infúze glukózy tak, aby hodnota euglykémie byla udržována na fyziologické hladině normoglykémie 5 mmol/L , nezávisle od bazální glykémie na počátku clampu. Výhodou tohoto vyšetření je, že při porovnávání výsledků máme k dispozici M-hodnotu získanou od pacientů při stejné hodnotě glykémie. Nevýhodou je větší pracnost a delší doba trvání clampu, než se dosáhne fáze plateau (po cca 120 min. clampu). Dále se musí brát v úvahu i fakt, že výsledek M-hodnoty je ovlivněn bazální glykemií na počátku clampu. Je všeobecně známo, že samotná hyperglykémie vede k snížení inzulínosenzitivity (toxický účinek glukózy) (116). Pokud má totiž pacient

bazální glykémii nad 7 mmol/L, pak je pravděpodobné, že během snižování glykémie na 5 mmol/L může dojít k vyplavení kontraregulačních hormonů. K tomu dochází především u pacientů s dlouhodobou hyperglykemií, kteří hodnotu 5 mmol/L mohou vnímat již jako hypoglykémii.

Proto byla vypracována metoda IHC spočívající ve vyšetřování pacienta na hodnotě jeho bazální glykémie na počátku clampu. Pro objektivizaci výsledků se pak používá hodnota metabolické clearance glukózy. Ta se vypočítá jako poměr rychlosti utilizace glukózy k hodnotě aktuální glykémie (Rd/G). Zabrání se tak násilnému snižování glykémie a riziku vyvolání kontraregulační odpovědi na inzulínovou infúzi. Uvedený vztah však není proporcionální a nezohledňuje situaci, kdy část utilizace glukózy je saturovatelná již při glykémii nalačno. Proto není možné použít výpočet metabolické clearance glukózy u jedinců s rozdílnými glykémii nalačno (117).

3.1.2. Hyperglykemický clamp (HGC)

Technika HGC je dobře reprodukovatelná metoda hodnocení senzitivity B-buněk na glukózu a kvantifikaci inzulínové senzitivity. Pomocí HGC můžeme také hodnotit časnou a pozdní fázi sekrece inzulínu, poznatky přínosné pro zkoumání patogeneze DM 2. typu.

Podstatou HGC je akutní zvýšení koncentrace plazmatické glukózy ve fázi plateau na předem stanovenou hyperglykemickou hodnotu (nejčastěji 12 mmol/L) a udržovat tuto glykémii pomocí variabilní kontinuální infúze glukózy nejméně po dobu 2 hodin.

M-hodnota během závěrečné 30 min. periody HGC vyjadřuje míru tolerance glukózy (rozdíl od EHC, kde je měřítkem účinku inzulínu a IR). A v tomto případě je také nezbytná korekce M- hodnoty ztrátami glukózy v moči.

Koncentrace IRI v plasmě během HGC je měřítkem sekrece inzulínu. Časnou fází sekrece hodnotíme během prvních 10 min. clampu, pozdní fází sekrece z hladin IRI měřených obvykle v 90.-120. minutě clampu. Sekreční odpověď na hyperglykémii lze vyjádřit jako plochu pod křivkou IRI (AUC) vypočítanou lichoběžníkovou metodou (118).

3.1.3. Hypoglykemický clamp (HYC)

Je metodou, která je považovaná za zlatý standard v testování reakce kontraregulačních hormonů na hypoglykémii (119). Pro vyšetřovaného je tato metoda bezpečnější než inzulínový toleranční test (120), neboť je spojena s nižším rizikem vzniku závažné hypoglykémie. Reakce na hypoglykémii je závislá na stupni hypoglykémie a k hormonální odpovědi dochází s určitou latencí. Již při glykémii 3,7 mmol/L dochází k vzestupu koncentrace glukagonu, adrenalinu a růstového hormonu v plasmě, při nižších hodnotách, kolem 3,2 mmol/L stoupá kortizol (119). Také rychlost nástupu odpovědi na hypoglykémii je rychlejší u glukagonu a adrenalinu (asi od 20. minuty, s maximem v 30.-40. minutě od navození hypoglykémie). Kortizol a růstový hormon mají vzestup s maximem mezi 50.-70. minutou. Reakci na hypoglykémii sledujeme během HYC při jedné zvolené hladině glykémie, po nejméně 20 minutové stabilizaci, po níž následují odběry vzorků krve (118).

3.2. Hodnocení in vivo metodik zaměřených na hodnocení IS

EHC měl původně sloužit k hodnocení IS, zatímco pomocí HGC se zjišťovala hodnota glukózou stimulovaná sekrece inzulínu. DeFronzo a spol. zjistili významnou korelaci ($r=0,816$, $p< 0,001$) mezi množstvím podané glukózy (M) během EHC a množstvím glukózy infundované po dobu HGC. Obě hodnoty se dělí aktuální plasmatickou

koncentrací inzulínu (M/I poměr) (111). Tato korelace umožňuje používání HGC jak k hodnocení inzulínové sekrece, tak i k zjištění IS u toho stejného pacienta v ten samý den vyšetření. EHC i HGC tak poskytují srovnatelné hodnoty IS pro metabolismus glukózy v případě, že se výsledky vyjadřují v hodnotách clearance glukózy na koncentraci plasmatického inzulínu. To umožňuje používat HGC také jako metodu pro hodnocení IS u pacienta během jediného vyšetření (121).

Technika clampu poskytuje významné výhody v porovnání s rutinně používanými non steady state technikami:

1. udržováním bazální hladiny glykémie po podání inzulínu se vyhneme hypoglykemickým reakcím a s nimi spojeným nevhodným neuroendokrinním odpovědím.
2. stanovení "steady state" hladiny inzulínu v plasmě dovoluje vypočítat metabolickou clearanci inzulínu. Rychlost metabolismu glukózy můžeme vypočítat každých 5 minut (vzhledem k 5ti minutovým intervalům měření glykémie), můžeme proto sledovat časový průběh změn tkáňové senzitivity inzulínu. To může poskytnout informace o mechanismu inzulínové resistance.
3. clampové techniky na rozdíl od jiných vyšetření ve spojení s podáním izotopem značené glukózy umožňují kvantifikaci endogenní produkce glukózy a jejího využití.
4. Clampové metody nabízejí celou řadu kombinací s dalšími technikami, které umožňují detailní pohled nejen na jednotlivé úrovně glukoregulace a intermediálního metabolismu, ale i pochodů souvisejících s řízením dalších buněčných funkcí.

Další metody měření inzulínové senzitivity jsou zmíněny v příloze 3 (strana 62)

4. Zvířecí modely

Vzhledem k tomu, že inzulínoreistence je velice heterogenní polygenně determinované onemocnění, jsou pro její výzkum používány různé zvířecí modely. Limitujícím faktorem interpretace výsledků na těchto modelech je však fakt, že tyto skupiny zvířat jsou oproti lidské populaci geneticky homogenní.

Inzulínoreistentní stavy u laboratorních zvířat se dělí do tří základních kategorií: geneticky podmíněné, nutričně indukované a farmakologicky navozené (122).

V našem experimentu jsme použili inbrední polygenní model metabolického syndromu v podobě hereditárně hypertriglyceridemického potkana (hHTG). hHTG potkan byl vyšlechtěn doc. Vránou v Praze selektivním křížením Wistar potkanů s vyšší odpovědí plasmatických triglyceridů na zátěž v podobě krmení vysokosacharósovou či fruktósovou dietou (149). Endogenní hypertriglyceridémie je u hHTG potkanů přítomná nalačno i postprandiálně. Zvýšená in vivo lipogeneza v játrech, zvýšená sekrece Tg z jater a nezměněná postheparinová aktivita lipoproteinové lipázy v plasmě u hHTG potkanů poukazují na hyperprodukční typ hypertriglyceridémie (149). Kromě Tg jsou v séru zvýšeny i hladiny FFA (150). In vivo účinek inzulínu měřený pomocí euglykemického hyperinzulinémického clampu je u hHTG nižší. Snížení inzulímem indukované utilizace glukózy může být částečně výsledkem redukce schopnosti inzulínu přijímat glukózu do cílových tkání (kosterní svaly, tuk) (151), a/nebo snížení počtu glukózových transportéru (152). Se zřetelem na to, že v játrech nebyly nalezené rozdíly ve složení membránových lipidů, fluidity plasmatické membrány, autofosforylace inzulínového receptoru a ani aktivity tyrozin kinázy (153) se předpokládá, že snížený účinek inzulínu in vivo není v játrech lokalizován na úrovni inzulínových receptorů, ale na postreceptorové úrovni (154). U hHTG potkanů byly dále zjištěny zvýšené hodnoty systolického, diastolického a středního tlaku (155, 156), které korelují s hladinou Tg v

plasmě a se zvýšeným obsahem sodíku v erythrocytech (155). Krmení hHTG potkanů vysokosacharósovou dietou vede k prohloubení hypertriglyceridémie a ke zhoršení biologického účinku inzulínu *in vivo*. Zvýšeným přísunem ω -3 mastných kyselin s dlouhým řetězcem se hypertriglyceridémie upravuje (157) a zároveň dochází ke zlepšení biologického účinku inzulínu *in vivo*. To potvrzuje klíčovou úlohu změněné dostupnosti cirkulujících Tg a ve tkáních akumulovaných Tg pro regulaci biologického účinku inzulínu (152).

Další zvířecí modely inzulínové resistance jsou představeny v příloze 4 (strana 65)

5. Úvod k experimentu

Na naše pracoviště byla ve spolupráci s dr. Kyselovou zavedená metodika clampů na živém zvířeti, která je v České republice unikátní a umožňuje měření nejrůznějších parametrů *in vivo*. V první fázi jsme se věnovali otázce škodlivosti krátkodobé hyperinzulinémie a hyperglykémie na potkanech kmene Wistar. Podařilo se nám prokázat, že krátkodobá hyperinzulinémie snižuje některé parametry oxidačního stresu (182) a proto by mohlo být u diabetiků 2. typu s postprandiálními hyperglykémiami vhodné časné zahájení inzulínoterapie.

V poslední době je věnována značná pozornost otázce vlivu normoglykémie a inzulínu na morbiditu a mortalitu nemocných (práce hlavně z oblasti intenzivní medicíny) a dosud nebylo jednoznačně rozhodnuto o podílu normoglykémie a infúze inzulínu *per se* na snížení morbidity a mortality kriticky nemocných. Vzhledem k zaměření našeho pracoviště na měření inzulínové senzitivity, oxidačního stresu, inzulínu a glykémie u diabetiků bylo cílem dizertační práce:

Cíle práce

1. Zavedení a rozvoj měření inzulínové resistance *in vivo* metodou clampů na laboratorních potkanech.
2. Stanovení inzulínové resistance hHTG potkanů bez předchozí stimulace vysokosacharidovou dietou.
3. Zjištění zda exogenní infúze inzulínu může zlepšit parametry oxidačního stresu během krátkodobé hyperglykémie a euglykémie při clampovém vyšetření na modelu metabolického syndromu u laboratorního potkana.

5.1. Metodika

Euglykemický hyperinzulínový clamp a hyperglykemický clamp je klasicky užíván k testování inzulínové resistance.

V našem experimentu jsme k oddělení efektu glykémie a infúze inzulínu použili již popsaný euglykemický hyperinzulínový clamp (EHC) a jeho modifikaci hyperglykemický hyperinzulínový clamp (HHC). Jedná se o modifikaci originálního postupu zavedeného prof. Klimešem na Ústavu experimentální endokrinologie SAV v Bratislavě. Po navození stabilizovaných podmínek při euglykémii a hyperglykémii pak byly provedeny krevní odběry ke stanovení parametrů oxidačního stresu.

5.1.1. Použitý fyziologický model

K experimentu byli použiti samci laboratorních potkanů kmene hHTG a Wistar (kontrolní skupina) ve stáří 3 měsíců, o hmotnosti 300-350 g. Potkani Wistar byli dodáni firmou AnLab s.r.o. (Praha, ČR) a potkany hHTG jsme získali z pracoviště dr. Kazdové (IKEM, Praha, ČR). Zvířata byla chována za standardních podmínek s dvanáctihodinovým světelným režimem, krmena standardní peletovou dietou a napájena vodou *ad libitum*.

Během čtrnáctidenní aklimatizace v našem chovatelském zařízení byla zvířata zvykána na těsný kontakt s experimentátorem, manipulaci s nimi a na pobyt v metabolických klecích, aby byly vyloučeny stresové reakce zvířat během experimentu. Všechny experimenty byly prováděny po schválení Etickou komisí.

5.1.2. Metodika clampu na zvířecím modelu:

Všem zvířatům byla operačně zavedena kanyla do v. jugularis (podávání infuzí) a art. car. comm. (odběr vzorků) – podrobný postup operace je popsán v příloze 5 (strana 73)

Použité roztoky během clampu:

Roztok inzulínu: 20 IU (200 ul) krátkodobého inzulínu (Actrapid HM Penfill, Novo Nordisk, Kodaň, Dánsko) naředěno ve 20 ml fyziologického roztoku po přidání cca 5 kapek krve potkana k zabránění adheze inzulínu na stěny infuzního setu.

Roztok glukózy: 40% glukóza (Glucosum, Léčiva, Praha, ČR) byla naředěna 10% glukózou v poměru 2,5:1 na výslednou koncentraci roztoku 30%.

Fyziologický roztok: 0,9g/L NaCl (B Braun, Německo)

Přístroje:

infuzní pumpy B Braun (Německo)

glukózový analyzátor Hemocue (Švédsko)

Příprava pokusných zvířat před clampem:

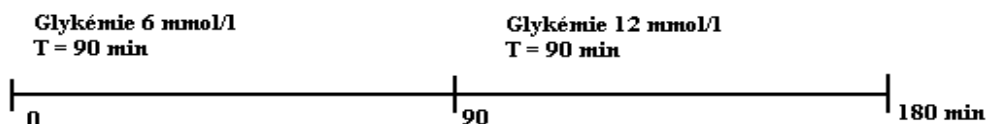
Clampové vyšetření jsme prováděli po 3 denní rekonvalescenci zvířat po operaci. Před vlastním experimentem zvíře lačnilo min 12 hodin.

V den experimentu byla obnovena průchodnost kanyl u zvířat. Kanyla do v. jugularis sloužila k podávání kontinuální konstantní infúze inzulínu a variabilní infúze glukózy. Kanyla z a. carotis communis sloužila k odběru kontrolních vzorků krve. Zvířata byla po té umístěna po jednom do metabolických klecí a ponechána 30 minut v klidu, aby se adaptovala na změnu prostředí. Během pobytu v metabolických klecích měla zvířata neomezený přístup k vodě.

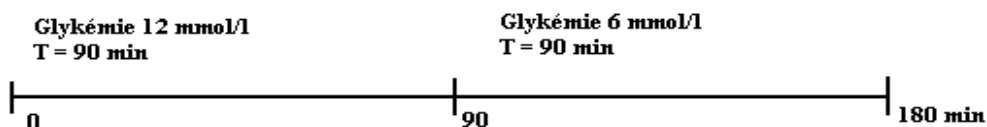
5.1.3. Design experimentu

Celkem 40 laboratorních potkanů (20 potkanů kmene hHTG a 20 potkanů kmene Wistar) podstoupilo po náhodném rozdělení jeden z následujících typů clampu.

Clamp 1 - EHC v trvání 90min s následujícím HHC také v trvání 90min



Clamp 2 - HHC v trvání 90min s následujícím EHC také v trvání 90min



Experiment	Počet zvířat (n)	Kmen potkana	Clamp 1	Clamp2
1	5	hHTG	inzulín	-----
2	5	hHTG	-----	inzulín
3	5	hHTG	fyzilogický roztok	-----
4	5	hHTG	-----	fyzilogický roztok
5	5	Wistar	inzulín	-----
6	5	Wistar	-----	inzulín
7	5	Wistar	fyzilogický roztok	-----
8	5	Wistar	-----	fyzilogický roztok

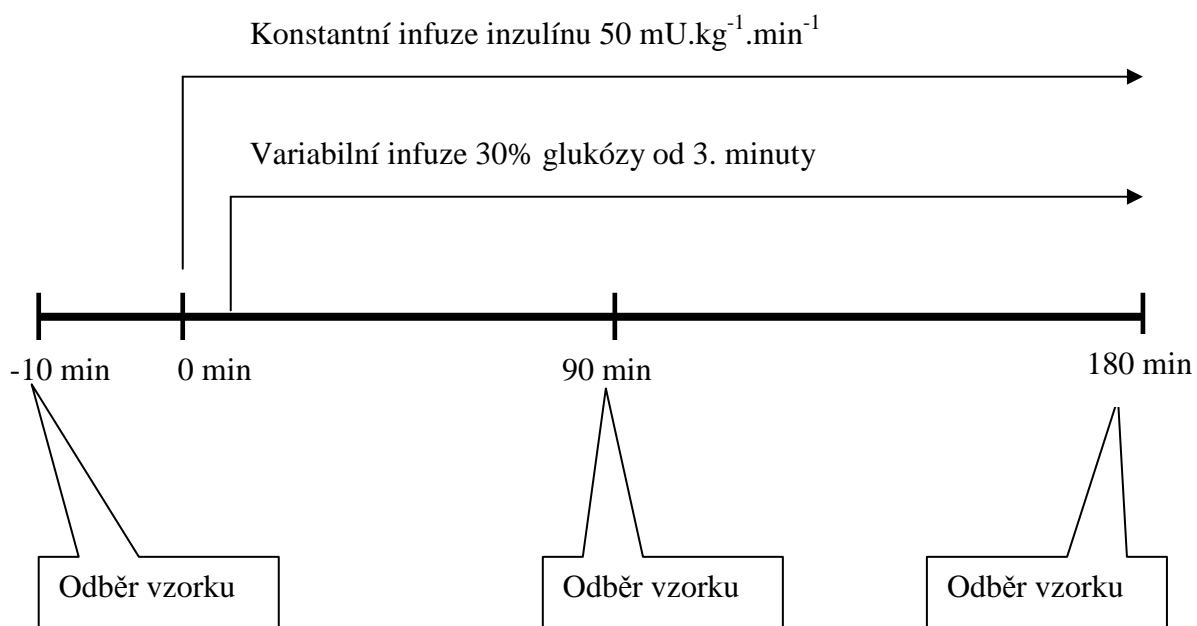
V experimentech s fyziologickým roztokem byla infuze inzulínu nahrazena fyziologickým roztokem o stejné rychlosti infuze.

Překřížení glykemií bylo použito k zamezení ovlivnění naměřených hodnot dobou trvání clampu a pořadím glykemií v clampu (6 a poté 12 mmol/L nebo 12 a následně 6 mmol/L). Před vlastním hodnocením pak byly sloučeny naměřené hodnoty při odpovídajících glykemiích během clampu 1 a 2. Tím jsme získali následující 4 skupiny:

skupina	Číslo provedeného experimentu
hHTG – inzulín	1 + 2
hHTG – fyziologický roztok	3 + 4
Wistar – inzulín	5 + 6
Wistar – fyziologický roztok	7 + 8

Vlastní provedení clampů a časování odběrů krve (1 mL) k laboratorním vyšetřením je patrné z následujícího obrázku.

Design clampu



Glykémie byla kontrolována v 5 minutových intervalech

5.1.4. Biochemické metody měření

Z odebraných vzorků krve byla stanovena hladina: MDA, celkové antioxidační kapacity, glutathionu oxidovaného i redukovaného, albuminu, triglyceridů a kyseliny močové.

Parametr	Zkratka	Souprava	Výrobce	Jednotky
Malondialdehyd	MDA	Elisa reader		mmol/L
Celková antioxidační kapacita	AOK	TAS	Randox	mmol/L
Redukovaný glutathion	GSH	Bioxytech	Oxis	μmol/L
Oxidovaný glutathion	GSSG	Bioxytech	Oxis	μmol/L
Albumin	--	Human 10560	Human Gesellschaft	g/L
Triglyceridy	Tg	Dialab D96386	Dialab	mmol/L
Kyselina močová	--	DOT AAU803	DOT	μmol/L

Komentáře k laboratorním stanovením:

AOK: ABTS inkubované s peroxidázou a peroxidem vodíku tvoří radikál ABTS⁺. Ten je relativně stabilní a je možné ho měřit při 600 nm. Antioxidanty séra potlačují vznik tohoto radikálu. AOK je vyjadřována jako ekvivalent standardu Troloxu. Měření se provádí na analyzátoru Hitachi 717.

MDA: Malondialdehyd a jiné degradační produkty peroxidace reagují s dvěma molekulami kyseliny barbiturové (TBA) v kyselém prostředí na barevný produkt, který se po extrakci n-butanolem měří při 532 nm použitím Elisa-readru.

GSH/GSSG: Redukovaný glutathion (GSH) s volnou thiolovou skupinou představuje hlavní tkáňový antioxidant, který poskytuje redukční ekvivalent pro glutathionperoxidázu. Během tohoto procesu je GSH oxidován na GSSG. GSSG je následně redukován na GSH prostřednictvím glutathionreduktázy. Zvýšený oxidační stres pak vede v buňkách k poklesu poměru GSH/GSSG, což je dáno hromaděním oxidovaného GSSG.

Statistická analýza: Vzhledem k neparametrickému rozložení dat bylo použito Wilcoxonova testu pro párové veličiny a Mann-Whitney testu pro nepárové. Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako median a interquartilové rozpětí.

5.2. Výsledky

Ke studii metabolických změn v rámci syndromu inzulínové resistance jsme vybrali potkany kmene hHTG, kteří představují neobézní model metabolického syndromu s hypertenzí, hypertriglyceridemií a inzulínovou resistencí (156). Potkani kmene Wistar byli zvoleni jako kontrolní skupina zvířat z fyziologickými metabolickými poměry. Velikost souboru byla volena tak, aby po sloučení naměřených hodnot odpovídajících skupin za stejné glykémie vznikla dostatečně početná skupina umožňující statistické zpracování s dostatečně nízkou variabilitou.

Vstupní charakteristika

V rámci Wistar a hHTG potkanů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v počáteční hladině albuminu, Tg a kyseliny močové. Statisticky významně vyšší byly bazální hladiny Tg, kyseliny močové a poměr GSH/GSSG u hHTG potkanů ve srovnání s Wistar potkany (tabulka 1).

Tabulka 1

Biochemické parametry za bazálních podmínek

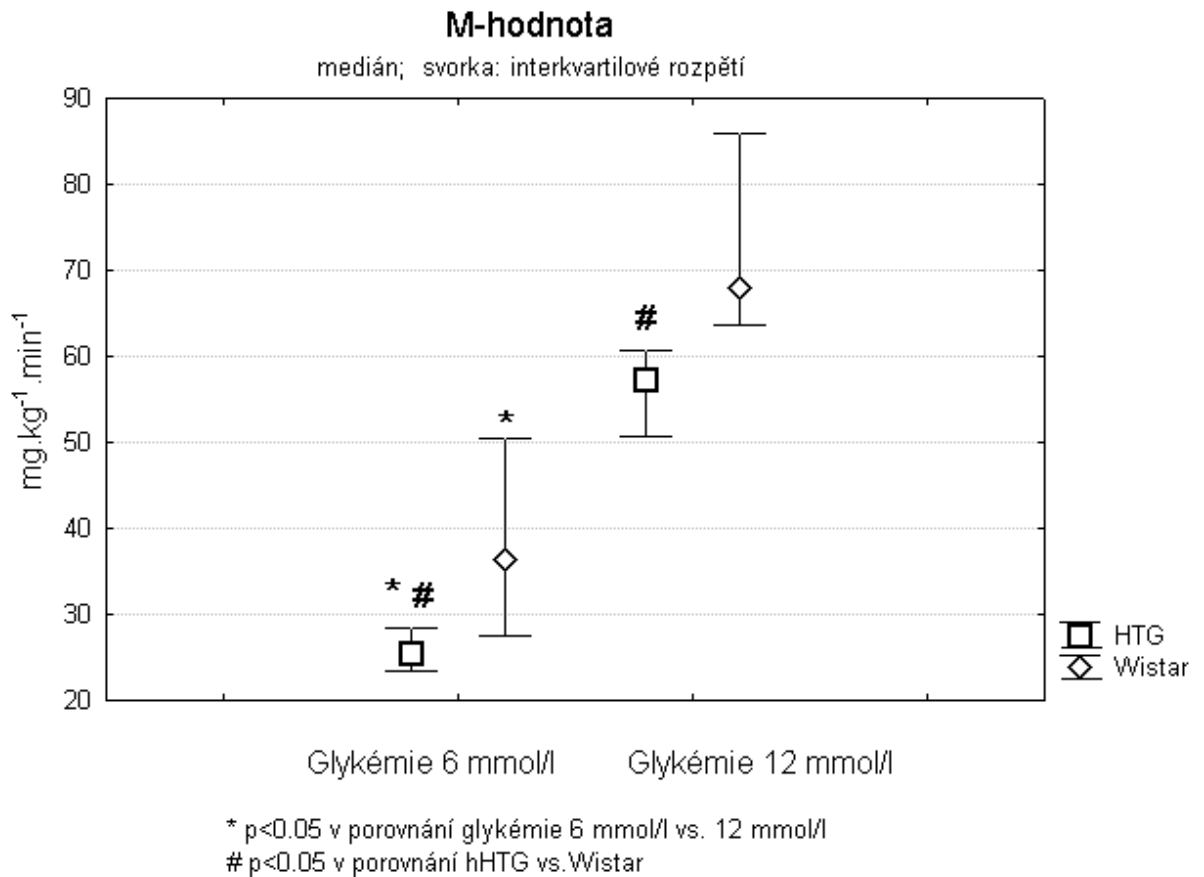
	Albumin (g/L) median (low – high)	Triglyceridy (mmol/L) median (low – high)
hHTG – inzulín	36.2 (35.6 - 36.7)	0.43 (0.41 - 0.50)

hHTG – fyz. roztok	37.1 (36.5 - 37.4)	0.43 (0.40 - 0.49)
Wistar – inzulín	36.3 (35.8 - 37.4)	0.28 (0.26 - 0.30)*
Wistar – fyz. roztok	36.4 (35.2 - 37.3)	0.29 (0.26 - 0.31)*
*p<0.05 v porovnání s odpovídajícími skupinami hHTG		
	Kyselina močová (μmol/L) median (low – high)	GSH/GSSG median (low – high)
hHTG – inzulín	29.0 (25.0 - 43.8)	9.43 (7.60 - 10.00)
hHTG – fyz. roztok	28.5.7 (23.8 - 41.2)	8.54 (6.75 - 9.89)
Wistar – inzulín	18.5 (12.1 - 20.2)*	1.85 (1.16 - 2.52)#
Wistar – fyz. roztok	17.8 (13.0 - 18.9)*	1.94 (1.42 - 2.17)#
*p<0.05 v porovnání s odpovídajícími skupinami hHTG # p<0.01 v porovnání s odpovídajícími skupinami hHTG		

Vyšetření inzulínové senzitivity

Jako parametr hodnocení inzulínové sensitivity jsme použili M-hodnotu ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) měřenou v průběhu posledních 30 minut každého clampu (graf 1).

Graf 1



Jak je patrné z grafu M-hodnota hHTG potkanů byla statisticky významně nižší v porovnání s Wistar potkany a to na obou vyšetřovaných hladinách glykémie.

Při glykémii 6 mmol/L byla 25.46 (23.41 - 28.45) vs 36.30 (27.49 - 50.42) a při glykémii 12 mmol/L byla 57.18 (50.78 - 60.63) vs. 68.00 (63.61 - 85.92). To znamená, že hHTG potkani byli inzulinorezistentní i bez stimulace vysokosacharózovou dietou.

Antioxidační kapacita

Celková antioxidační kapacita (AOK) se za bazálních podmínek nelišila mezi potkany hHTG a Wistar. Ke statisticky významným změnám nedošlo ani v průběhů clampů s

různými hladinami glykémie (tabulka 2). Koeficient variace metody stanovení AOK byl 2.9%.

Tabulka 2

Celková antioxidační kapacita (AOC)

AOC (mmol/L)			
median (low – high)			
Skupina	Počáteční stav	Glykémie 6 mmol/L	Glykémie 12 mmol/L
hHTG – insulin	0.83 (0.80 - 0.89)	0.81 (0.77 - 0.90)	0.77 (0.72 - 0.89)
Wistar – insulin	0.85 (0.80 - 0.99)	0.81 (0.75 - 0.91)	0.88 (0.79 - 0.93)
hHTG – fyz. roztok	0.86 (0.82 - 0.89)	0.83 (0.80 - 0.86)	0.84 (0.81 - 0.86)
Wistar – fyz. roztok	0.89 (0.83 - 0.96)	0.86 (0.81 - 0.95)	0.90 (0.86 - 0.94)

Redox stav

Poměry GSH/GSSG byly signifikantně vyšší v průběhu všech clampů u hHTG potkanů ve srovnání s kontrolní skupinou Wistar potkanů (tabulka 3 a graf 2). Dále došlo u

hHTG potkanů při glykémii 6 mmol/L k signifikantnímu zvýšení poměru GSH/GSSG během infuze inzulínu. Tento efekt byl sice částečně potlačen glykemií 12 mmol/L, ale zůstal statisticky významně vyšší oproti bazálním hodnotám. U Wistar potkanů jsme nepozorovali žádné signifikantní změny (tabulka 3 a graf 2). Koeficient variace metody stanovení GSH byl 3.11% a pro GSSG 7.61%.

Tabulka 3

Poměr redukovaného/oxidovaného glutathionu (GSH/GSSG)

Skupina	GSH/GSSG			
	median (low – high)			
	Glykémie 6 mmol/L		Glykémie 12 mmol/L	
hHTG – inzulín	10.02 (9.90 - 11.42) ^{*,#}	} P=0.002	7.42 (7.15 - 7.89) [#]	} P=0.003
hHTG – fyz. roztok	6.01 (5.83 – 6.43) [#]		6.16 (5.74 - 7.05) [#]	
Wistar – insulin	3.18 (1.44 – 3.69)	} NS	2.11 (1.69 - 2.93)	} NS
Wistar- fyz. roztok	2.93 (2.24 – 3.42)		3.08 (2.10 - 5.30)	

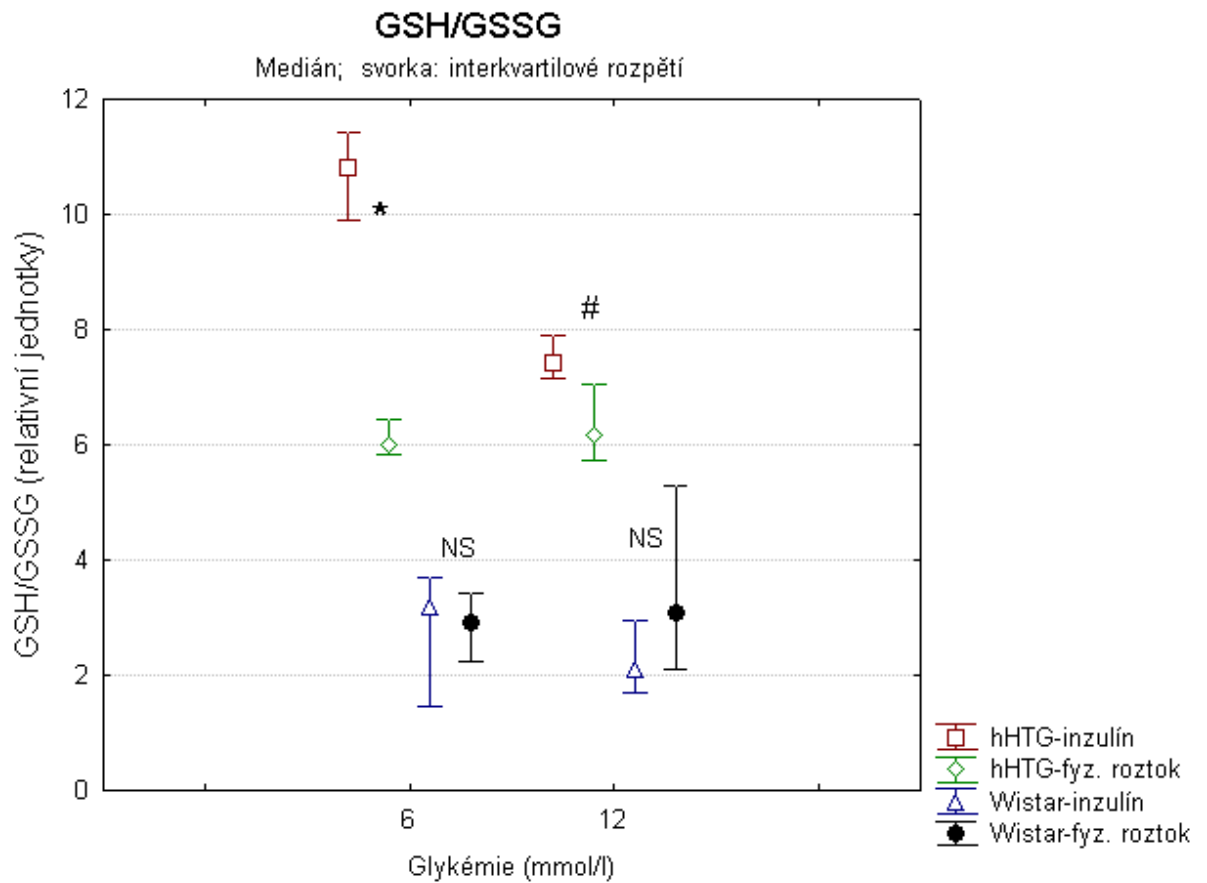
\$ p<0.05 v porovnání s glykemií 12 mmol/L

* p<0.01 v porovnání s glykemií 12 mmol/L

p<0.01 v porovnání s odpovídajícími skupinami potkanů Wistar

Graf 2

Poměr redukovaného/oxidovaného glutathionu (GSH/GSSG)



$p < 0.01$ při glykémii 12 mmol/L

* $p < 0.01$ při glykémii 6 mmol/L

K rozlišení efektu glykémie od inzulínové infúze jsme použili poměr GSH/GSSG měřeném během infúze inzulínu k GSH/GSSG během infúze fyziologickým roztokem.

Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v tabulce 4, při glykémii 6 mmol/L byl

poměr GSH/GSSG téměř 2x zvýšen u hHTG potkanů infundovaných inzulínem, zatím co u Wistar potkanů jsme podobný efekt nepozorovali. A dále hyperglykemií 12 mmol/L navozený pokles poměru GSH/GSSG u hHTG potkanů byl signifikantně zmírněn infúzí inzulínu. A opět u skupin Wistar potkanů nedošlo k žádným signifikantním změnám (tabulky 3 a 4 a graf 3).

Tabulka 4

Poměr GSH/GSSG během inzulínové infúze ku GSH/GSSG při infúzi fyziologickým roztokem

Skupina	Poměr GSH/GSSG	
	median (low – high)	
	Glykémie 6 mmol/L	Glykémie 12 mmol/L
hHTG	1.76 (1.57 - 1.93) ^{*#}	1.14 (1.09 - 1.36) [#]
Wistar	0.84 (0.69 - 1.40)	0.62 (0.44 - 1.15)

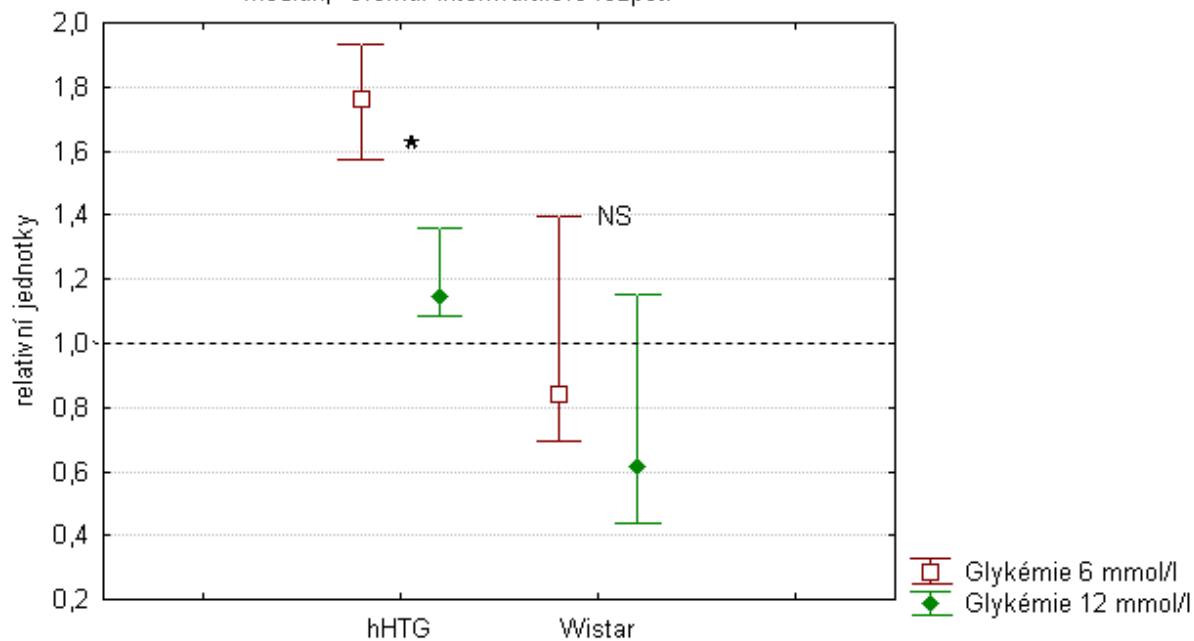
* p<0.05 v porovnání s glykemií 12 mmol/L

p<0.05 v porovnání s odpovídajícími skupinami potkanů Wistar

Mezi potkany kmene Wistar nedošlo k signifikantním změnám

Graf 3

Poměr GSH/GSSH skupin infundovaných inzulínem ku GSH/GSSG skupin infundovaných fyziologickým roztokem
 Medián; svorka: interkvartilové rozpětí



---- zobrazuje hodnotu stejného efektu inzulínové infuze a fyziologického roztoku, vyšší hodnoty znamenají větší efekt inzulínu

* $p < 0.05$ v porovnání s glykemií 12 mmol/L

5.3. Diskuze

Hereditární hypertrygliceremický potkan (hHTG) představuje model neobézního metabolického syndromu s hypertenzí, hypertriglyceridemií a inzulínorezistencí. Tento kmen je relevantním modelem familiární hypercholesterolemie a metabolického syndromu a je dobře použitelný pro měření metabolismu lipidů a inzulínové resistance (156). Skupiny hHTG a Wistar potkanů se za bazálních podmínek mezi sebou nelišily v hladině albuminu a tělesné hmotnosti. Vyšší hodnoty triglyceridů a kyseliny močové svědčily pro přítomnost metabolického syndromu u hHTG potkanů. Inzulínorezistence hHTG potkanů byla potvrzena naměřenými M-hodnotami jak při normoglykémii 6 mmol/L tak i při hyperglykémii 12 mmol/L. Inzulínorezistence potkanů kmene hHTG byla prokázána i bez předchozí stimulace vysokosacharidovou dietou, která je obvykle užívána ke zvýraznění metabolických vlastností tohoto zvířecího modelu (149, 175).

Celková antioxidační kapacita se signifikantně neměnila v průběhu clampů u obou kmenů zvířat (hHTG a Wistar) a nebyla ovlivněna glykemií ani infuzí inzulínu. Tento nálezn odpovídá i výsledkům našich předchozích prací (182). Stejně tak jsme neměřili ani hladiny TBARS jako markeru peroxidace lipidů, protože během našich minulých experimentů jsme pozorovali pouze minimální změny v hladině MDA v průběhu clampů (182). Nález pouze nevýznamných změn v hladinách MDA je v souladu i z dalšími pracemi provedenými na pacientech s diabetes mellitus 2. typu (183).

Již za bazálních podmínek signifikantně zvýšený poměr GSH/GSSG u hHTG potkanů ve srovnání s potkany kmene Wistar svědčí pro chronickou aktivaci antioxidačního systému při vyšší produkci ROS v rámci metabolického syndromu. Poměr GSH/GSSG zůstával během clampů u potkanů kmene hHTG vyšší jak s inzulínovou infuzí, tak i bez ní. Inzulínová infuze ale byla schopna dále signifikantně zvýšit poměr GSH/GSSG nad

hodnoty dosažené bez inzulínové infuze. Navíc inzulín snížil hyperglykémii navozený pokles poměru GSH/GSSG. Oproti tomu jsme nepozorovali žádné statisticky významné změny u kontrolní skupiny potkanů kmene Wistar.

Výše popsané změny by mohly být vysvětleny inzulínem, protože inzulín dokáže suprimovat prozánětlivé transkripční faktory (184, 185). Navíc inzulín suprimuje produkci ROS a expresi p47^{phox}, klíčové komponenty NADPH oxidázy, což je enzym, jehož působením vzniká superoxidový radikál. Výše uvedené prokazuje potentní antioxidační efekt inzulínu (184, 186). Mezi další důležité účinky inzulínu patří vasodilatace a inhibice agregace trombocytů. Tyto efekty jsou způsobeny zvýšeným uvolňováním oxidu dusnatého (NO) a zvýšením aktivity NO syntázy endotelu a trombocytů (190, 191).

Infúze glukózy má prozánětlivý efekt, který může být přítomen i bez zvýšení glykémie nad fyziologické hranice a dokonce i přes zachovalou endogenní sekreci inzulínu (192, 193). Glukóza aktivuje klíčové, inzulínem suprimovatelné prozánětlivé transkripční faktory (193, 186) a vede ke zvýšené produkci ROS a zvýšení exprese p47^{phox} (192). Dochází pak k poklesu biologické dostupnosti NO vzhledem ke zvýšení hladiny superoxidového radikálu, který formuje NO na peroxynitrit. A tedy, hyperglykémie indukuje oxidační stres, zánětlivou odpověď, vasokonstrikci a agregaci trombocytů.

V posledních letech byl prokázán relativní deficit NO u samců potkanů kmene hHTG ve srovnání s normotenzními potkany Lewis (187). Dále je známo, že oxidační stres je spojen s nadprodukcí superoxidového radikálu. Rychlá reakce NO se superoxidem pak efektivně snižuje intracelulární hladiny NO pod úroveň nutnou k aktivaci guanylát cyklázy. Navíc v případě nadbytku superoxidu nad NO může docházet k tvorbě peroxynitritu a hydroxylových radikálů (188, 189). Stimulace NO syntázy inzulínem s

následným zvýšením hladin NO, by pak mohlo vysvětlit námi pozorovaný vzestup poměru GSH/GSSG u potkanů kmene Wistar.

V posledních letech se objevilo množství klinických studií, které prokázaly benefit infúze inzulínu během kardiochirurgických výkonů (194), u pacientů s popáleninami (195) a u kriticky nemocných (196, 197).

Na podkladě výše uvedených dat můžeme odvodit, že inzulín je schopen snižovat intracelulární oxidační stres cestou zvýšení poměru GSH/GSSG. Podobných výsledků bylo dosaženo i v humánních experimentech, kde byl prokázán vliv inzulínu na snížení oxidačního stresu cestou zvýšení poměru GSH/GSSG u diabetiků 2. typu (183).

S ohledem na naše výsledky (jaké.....)e zdá, že pozitivní ovlivnění poměru GSH/GSSG je spíše způsobeno inzulínem *per se* než udržením normoglykémie u inzulínorezistentních zvířat.

5.4. Závěry

- 1) Na naše pracoviště se podařilo zavést ve spolupráci s dr. Kyselovou metodiku clampového vyšetření na zvířeti v bdělém stavu, která je ve světě ojedinělá pro svou náročnost. Podobné vyšetření nebylo dosud prováděno na žádném pracovišti v ČR.
- 2) Experiment prokázal inzulínorezistenci u potkanů kmene hHTG bez předchozí stimulace vysokosacharidovou dietou – model kompenzovaného metabolického syndromu.
- 3) Experimentální výsledky ukazují signifikantní vzestup oxidačního stresu u hHTG potkanů bez exogenní infuze inzulínu při hyperglykémii. Exogenní infuze inzulínu významně zlepšila redox stav hHTG potkanů při normoglykémii i hyperglykémii.
- 4) Experiment jasně prokázal v poslední době uznanou hypotézu, že hyperglykémie je rizikovějším faktorem oxidačního stresu než krátkodobá hyperinzulinémie. Experiment tedy podporuje současný klinický postup při léčbě diabetiků 2. typu s časným převodem na inzulínoterapii po selhání léčby perorálními antidiabetiky.
- 5) Experiment je v souladu se současným pohledem na udržování normoglykémie infúzí inzulínu u skupiny kriticky nemocných pacientů, kde bylo prokázáno významné snížení mortality. Dosud však nebylo jednoznačně zjištěno, zda pozitivním efektem je sama normoglykémie či inzulín *per se*. Experiment prokázal, že zlepšení parametrů oxidačního stresu při inzulínovou infúzí navozené normoglykémii, je spíše dáno inzulínem *per se*, než normoglykemií.

Práce byla podporována grantem Karlovy Univerzity, LFUK v Plzni MSM 21620814

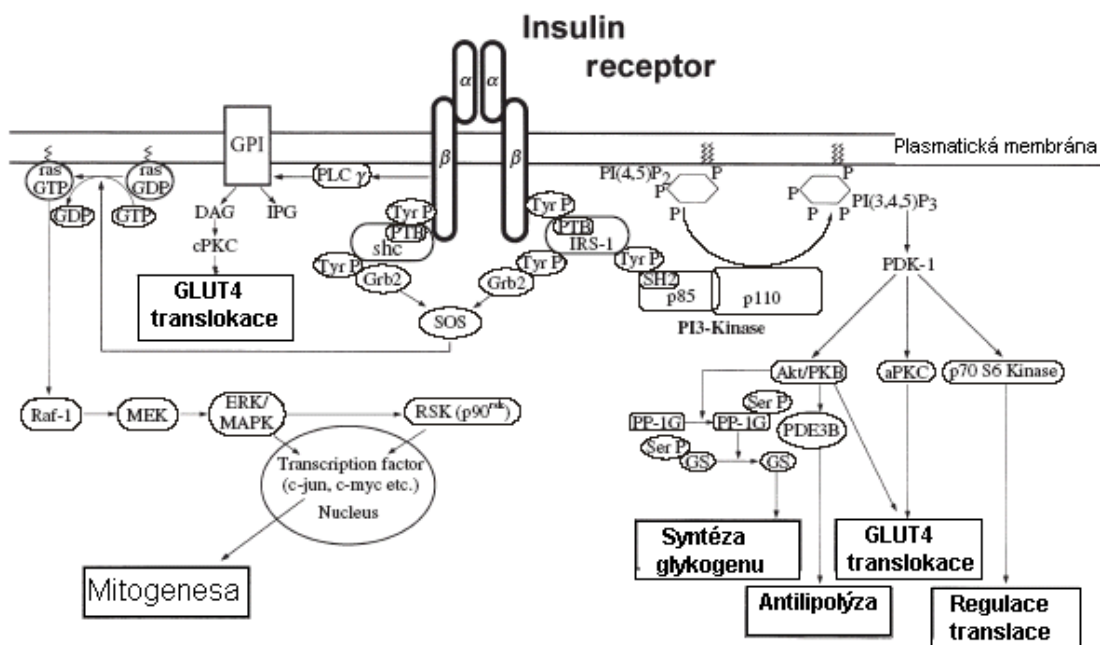
Příloha 1

Děje za inzulínovým receptorem

Zatímco IRS proteiny jsou součástí časných dějů inzulínové signální kaskády, je to právě tvorba řady dalších signálních proteinů, které jsou odpovědné za unikátní odpověď rozličných buněk a tkání na inzulín. V průběhu stimulace inzulínem dochází k vazbě tyrozin fosforylačních míst IRS proteinů na Src-homology-2 (SH2) domény různorodých postreceptorových signálních molekul jako jsou fosfatidylinositol 3-kináza (PI 3 kináza), růstový faktor receptor vázajícího proteinu 2 (Grb-2) a SH2-obsahující protein-tyrozin fosfatázu 2 (SHP-2) – obrázek 1. Výsledný efekt inzulínu v každé jednotlivé buňce závisí na tom, které efektorové molekuly jsou exprimovány a zahrnuty do signálního komplexu a která signální cesta je tím výsledně aktivována (8). Ve svalech skeletu a tukové tkáni způsobuje inzulínem stimulovaná PI 3 kináza zvýšení exprese nebo translokace GLUT4 a GLUT1 transportérů a tím i zvýšení utilizace glukózy (40-42). V pankreatických β -buňkách pravděpodobně ovlivňuje přežívání β -buněk PI 3 kinázová kaskáda (34, 43, 44). A koneckonců, inzulínem stimulovaná PI 3 kináza silně aktivuje syntézu proteinů ve většině buněk, které jsou regulovány mTOR (mammalian target of rapamycin) cestou. Alternativně dochází aktivací proteinu Grb-2 ke stimulaci genové transkripce cestou kaskády mitogen aktivované proteinové kinázy (MAPK) (45).

Obrázek 1

Schématický model signální kaskády inzulínu



Legenda:

- IRS-1 - insulin responzivní substrát 1
- PI3-kinase – Fosfatidylinsoitol 3 kináza
- p85 - PI3 – regulační podjednotka kinázy
- p110 - PI3 – katalytická podjednotka kinázy
- PDK1 - Fosfoinositid dependentní kináza 1
- aPKC – atypická protein kináza C
- Akt/PKB - protein kináza B
- PP-1G - protein fosfatáza 1G
- GS - glykogen syntáza
- PDE 3B - Fosfodiesteráza 3B
- Shc - src homologie a kolagen vázající protein
- Grb2 – vázající protein receptoru růstového faktoru-2
- SOS - Son of sevenless
- MAPK - Mitogen aktivovaná protein kináza
- ERK - extracelulární regulační protein kináza
- MEK - MAP kinázy kináza
- RSK(p90^{rsk}) - ribosomální S6 kináza
- PLCγ - fosfolipáza Cγ
- GPI - Glycerol-fosfatidylinositol
- IPG – Inositol fosfát glycan
- DAG – Diacylglycerol
- PTB - fosfotyrosine vázající doména
- SH2 - src homologie 2

Příloha 2

Příčiny inzulínové resistance

Primární příčiny IR

Primární poruchy biologického účinku inzulínu jsou projevem genetické dispozice a mohou být lokalizované buď na úrovni cílových tkání nebo mimo ně.

Mimo cílové tkáně jde o geneticky podmíněnou tvorbu anomální molekuly inzulínu nebo o neúplnou přeměnu proinzulínu na inzulín. V případě tohoto defektu je patrná hyperinzulinémie, resp. hyperproinzulinémie při normální či zvýšené glykémii nalačno. Podání exogenního inzulínu tuto metabolickou poruchu kompletně upraví.

Receptorové mechanismy IR představují asi 1-2% všech případů. Je pro ně typický rodinný výskyt a časný nástup těžkých forem IR typu A již v dětství. Doposud je známo přes 70 různých mutací genu pro inzulínový receptor. Usuzuje se, že mutace alfa podjednotky mají mírnější klinické projevy než mutace beta podjednotky. V důsledku mutací dochází ke snížení množství mRNA pro inzulínový receptor, k defektní přeměně proreceptoru na alfa a beta podjednotku, zvýšenému odbourávání receptoru, poruchám vazby inzulínu či k ovlivnění tyrozínkinázy inzulínového receptoru. Klinicky se tyto mutace inzulínového receptoru projevují syndromem IR typu A a jeho variantami.

Syndrom inzulínoreistence typu A je charakterizován výraznou endogenní hyperinzulinémií s poruchou či bez poruchy tolerance glukózy, acanthosis nigricans (kožní léze s hyperpigmentací a hyperkeratózou a typickým výskytem v axille, na zátylku, v antekubitálních a popliteálních jamkách neznámé etiopatogeneze) a ovariální hypergonadismus.

Rabson-Mendehallův syndrom zahrnuje pineální hyperplazii, dentální dysplázii a jiné dysmorfie.

Pseudoakromegalii charakterizují zhrubělé rysy tváře, rozšíření mezizubních štěrbin a svalová hypertrofie při normálních hladinách růstového hormonu a IGF-I.

Leprechaunismus je vzácný kongenitální syndrom typický intrauterinně retardovaným růstem, dysmorfickou tváří, acanthosis nigricans a extrémní IR. Leprechaunismem postižená novorozená děvčátka mohou mít polycystická ovária, hirsutismus a klitorimegalii.

Lipodystrofie vede u pacientů k absenci tukové tkáně (úplná kongenitální lipoatrofie nazývaná syndrom Berardinelli-Seip) nebo u parciální formy k variabilní regionální lipoatrofii či hypertrofii.

K základním projevům syndromu IR typu A patří i výrazná hypertriglycerolémie a hepatosplenomegalie. Kromě poruch vazby inzulínu, exprese receptorů, aktivity tyrozínkinázy a postreceptorového přenosu inzulínového signálu byla navíc u těchto pacientů zjištěna resistance na antilipolytický účinek inzulínu. Přesný mechanismus vzniku tohoto syndromu však není dosud znám.

Také defekty mitochondriální DNA jsou příčinou vzácných onemocnění spjatých s IR. Jako příklad lze uvést Wolframův syndrom, vzácné autozomálně recesivní onemocnění vzniklé mutací mitochondriální DNA, zvané též DIDMOAD: diabetes insipidus, diabetes mellitus, optická atrofie, sensorineurální hluchota (deafness).

Sekundární příčiny IR

Sekundární faktory ovlivňující citlivost cílových tkání na inzulín a pro druhotný charakter těchto poruch svědčí to, že po odstranění příčiny většinou dojde k obnovení fyziologického účinku inzulínu. Zvýšená sekrece glukokortikoidu, glukagonu,

katecholaminů a růstového hormonu, ke které dochází v rámci specifických endokrinopatií nebo při stresu, vede k IR. Glukagon působí proti inzulínu především na jaterní úrovni, ostatní kontraregulační hormony účinkují i na úrovni periferních cílových tkání. Růstový hormon snižuje počet inzulínových receptorů a inhibuje transport glukózy. Glukokortikoidy indukují IR buď přímo snížením množství nebo aktivity glukózových transportérů, nebo nepřímo zvýšením hladin glukagonu a FFA. Katecholamíny antagonizují účinek inzulínu stimulací glukoneogeneze, glykogenolýzy, lipolýzy a inhibicí periferního využití glukózy beta-adrenergickým mechanismem.

Samotná hyperinzulinémie vede k snížení počtu inzulínových receptorů na povrchu buněk (down-regulace). IR najdeme proto také u pacientů s inzulínem nebo ji lze navodit u zdravých pacientů infuzí inzulínu. Inzulínoreistence se vyskytuje také při různých patofyziologických stavech jako je diabetická ketoacidóza, urémie, jaterní cirhóza, puberta, gravidita, hladovění a stárnutí. Její příčiny v těchto stavech jsou velmi různorodé a zahrnují vlivy od změny pH, přes tvorbu uremických peptidů inhibujících využití glukózy, až po kolísání hormonálních hladin v procesu dospívání, stárnutí či těhotenství.

Jako syndrom inzulínoreistence typu B označujeme IR vzniklou následkem tvorby autoprotilátek proti inzulínovému receptoru. Jedná se většinou o polyklonální IgG protilátky vznikající v rámci jiných autoimunitních stavů. Protilátky vedou k inhibici vazby inzulínu a/nebo k urychlení degradace inzulínového receptoru či postreceptorové desenzitizaci cílových buněk. V typickém případě vzniká dekompenzovaný diabetes, acanthosis nigricans a ovariální hypergonadismus (u premenopauzálních žen). Protireceptorové protilátky se mohou chovat nejen jako antagonisté, ale také jako agonisté inzulínu, v tomto případě stav pacientů kolísá mezi diabetem, remisí a hypoglykemií. U většiny pacientů se nacházejí klinické nebo laboratorní známky

systemového autoimunitního onemocnění (lupus erythematosus, primární biliární cirhóza apod.)

Příčiny inzulínorezistence

Primární poruchy mimo cílových tkání (účinek inzulínu po exogenním podání je normální)

Abnormální molekula inzulínu
Neúplná přeměna proinzulínu

Primární poruchy na úrovni cílových tkání (porucha přetrvává i po aplikaci exogenního inzulínu)

Mutace genů pro inzulínový receptor
Syndromy IR Typu A a jeho varianty

Defekty jiných genů důležitých pro účinek inzulínu

Glukózové transportéry
Glukokináza a její regulační protein
Mitochondriální t-RNA

Substráty pro tyrozinkinázu inzulínového receptoru nebo meziprodukty přenosu inzulínového signálu

Enzymy uskladnění a oxidace glukózy
Enzymy metabolismu glycidů, lipidů a proteinu

**Sekundární faktory ovlivňující citlivost tkání na inzulín
(porucha se může normalizovat po odstranění vyvolávající příčiny)**

Patofyziologické situace

Stres, Hladovění
Urémie, Cirhóza, Ketoacidóza
Obezita, diabetes nebo hyperglykémie

Fyziologické situace

Puberta, Senium, Gravidita

Specifické hormonální nebo metabolické faktory

Glukokortikoidy (např. Cushingův syndrom)
Růstový hormon (akromegalie)
Katecholaminy (feochromocytom)
Glukagon (syndrom glukagonomu)
Hormony štítné žlázy (tyreotoxikóza)
Hyperinzulinémie (inzulinom)
Hyperglykémie (diabetes mellitus)
Neesterifikované mastné kyseliny

Autoprotilátky proti inzulínovému receptoru

Syndromy IR Typu B

Příloha 3

Další metody měření inzulínové senzitivity

Index IR nalačno (FIRI)

jedná se o poměr součinu lačné glykémie a inzulínémie nalačno ku součinu předpokládané glykémie 5 mmol/L a inzulínémie 5uU/ml navržený Duncanem pro epidemiologické a prospektivní studie.

Glykémie nalačno x Inzulínémie nalačno

FIRI= -----

25

Orální glukózo toleranční test (oGTT) se současným stanovením hladiny imunoreaktivního inzulínu (IRI)

Jde o nejjednodušší metodu měření IS, pomocí které získáme poměr mezi glukózou a inzulínem (G/I), který dále slouží k výpočtu indexu tkáňové senzitivity. Tato metoda má velmi nízkou reprodukovatelnost a variační koeficient jednotlivých vyšetření se pohybuje až okolo 20%. Další nevýhodou je vzájemný zpětnovazební vztah inzulínémie a glykémie, které navíc nejsou konstantní, ale dynamicky se mění, což má dopad na interpretaci výsledku.

Inravenózní glukózo-toleranční test (ivGTT)

IvGTT se používá s dostatečnou přesností na hodnocení časně a pozdní fáze sekrece inzulínu po bolusovém intravenózním podání 5-25 g glukózy. Vzhledem k intravenóznímu podání neposkytuje tato metoda maximální stimul pro hodnocení IS. Z dosažených koncentrací glukózy v plasmě můžeme vypočítat čistou rychlost frakčního mizení glukózy- frakční clearance glukózy, pro kterou se používají hodnoty naměřené mezi 10.-30. minutou vyšetření (rychlost poklesu glykémie během prvních 10 minut je výrazně dána distribucí glukózy). Hodnota funkční clearance glukózy vyjadřuje součet poklesu produkce glukózy a současně zvýšení jejího vychytávání a utilizace, to znamená dvou dějů podílejících se společně na snižování koncentrace glukózy a závislých na IS.

Hlavní nevýhodou testu je fakt, že jakýkoliv stupeň deficitu inzulínové sekrece se automaticky odrazí na vyšším stupni inzulínové senzitivity. Test nerozlišuje mezi sekrecí a účinkem inzulínu. Hodnota clearance glukózy je ovlivněna jednak stupněm inzulínové odpovědi na bolus glukózy, jednak senzitivitou tkání na účinky inzulínu a glukózy. Navzdory těmto nevýhodám patří měření ivGTT k rutinní metodice měření IS.

Minimální model

Bergman a spol. uvedli v roce 1987 tzv. minimální model (intravenózní glukózo-toleranční test s častým odběrem vzorků - FSIGTT) který slouží k výpočtu kvantitativního indexu (76, 77).

Index IS (SI) reprezentuje zvýšení frakční rychlosti utilizace glukózy (R_d) úměrné jednotce zvýšení plasmatické koncentrace inzulínu ($\text{uU}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). K výpočtu indexu IS je nutný počítačový software (např. MINMOD, Copyright R.N. Bergman). Schopnost glukózy per se snižovat svoji vlastní koncentraci nezávisle na inzulínu buď inhibicí jaterní produkce glukózy nebo zvyšováním periferní utilizace glukózy je

definována jako "glukózová efektivnost" (SG). Průměrné hodnoty SI jsou $5,1 \times 10^{-4}$ uU.ml⁻¹.min⁻¹ a SG rovno 0,036 min⁻¹ (77).

Pro přesné hodnocení indexu IS je však potřebná adekvátní sekrece inzulínu, což může být problémem u jedinců s vyšším stupněm poruchy glukózové tolerance (109). Pro tyto případy se přistupuje k určitým modifikacím testu s podáním tolbutamidu nebo somatostatinu. Těmito postupy se výrazně zlepšila přesnost hodnocení indexu Si a bylo dosaženo poměrně slušné korelace s hodnotami IS získanými pomocí clampových studií u lidí ($r=0,89$, $P<0,001$) (110).

Příloha 4

Zvířecí modely inzulínové resistance

Geneticky podmíněné modely IR

1. Jednoduché modely obezity a/nebo DM 2.typu

Vznikly spontánní genovou mutací v inbredním chovu. Klasickým příkladem jsou ob/ob (obese) myši, u kterých je znám deficit leptinu (123) a které se vyskytují v několika fenotypových variacích vzniklých genovými mutacemi. Např. kmen C 57 BL/Ks ob/ob myši je typický diabetem a inzulínopením, zatímco u C57BL/6J ob/ob myši se vyskytuje jen přechodná inzulínoreistence, která je kompenzována hypertrofií B-buněk (124). Tíže diabetického postižení je tedy závislá na genových mutacích v dané inbrední linii (125).

Obezita ob/ob myši se vyvíjí již ve věku 4 týdnů jako následek deficiencie leptinu, hyperfagie a hypometabolismu (124). Kromě obezity se u tohoto modelu vyskytuje i celá řada metabolických a hormonálních abnormalit včetně defektní termogeneze a poškozené sekrece gonadotropinu vedoucí k infertilitě (124). Zajímavostí je, že ob/ob myši jsou do odstavu inzulínosenzitivní s normální hladinou glukosy a inzulínu v cirkulaci a ve věku 4 týdnů, kdy se začne projevovat deficit leptinu, se vyvíjí hyperglykemie a hyperinzulinémie (126).

Db/db myši představují fenotyp, který je metabolicky podobný ob/ob myším (124.). Byla u nich prokázána mutace v oblasti leptinového receptoru, která znemožňuje přenos signálu (127, 128). Byla tak potvrzena domněnka, že ob/ob a db/db myši jsou

fenotypově podobné, při čemž jedna linie nedokáže tvořit funkční leptin a druhá je leptin nesenzitivní (129).

U fa/fa potkanů (130) se nachází jiná mutace na leptinovém receptoru, jejíž efekt je extracelulární a redukuje afinitu receptoru pro leptin (131, 132, 133, 134). Metabolický profil fa/fa potkanů je charakterizován obezitou z hyperfagie a sníženého energetického výdeje, hyperglykemií, hyperinzulinémií a progredující inzulínovou resistencí po odstavu. Dále hyperlipidemií, jmenovitě hypertriglyceridemií a hypercholesterolemií a hypoglukagonemií (135). Dále u nich byla zjištěna snížená exprese lipoproteinlipázy a dalších enzymů lipidového metabolismu (136) a zvýšená lipogeneza v játrech a tukové tkáni (137) a polydipsie (138).

Fat/fat myši jsou charakteristické pomalu se vyvíjející obezitou předcházející hyperinzulinémií (139). Příčinou je defekt genu pro carboxypeptidázu E (CPE) v místě mutace (Ser202Pro). CPE se podílí na přeměně prohormonu, včetně proinzulínu a u mutací postižených zvířat chybí v pankreatu a v hypofýze (140). Defektní přeměna proinzulínu způsobí kompenzační hyperinzulinémií, ale je zachována inzulínová senzitivita. Ne všechny z těchto myší jsou hyperglykemické. Tento fakt svědčí o tom, že na vzniku tohoto fenotypu se podílí mechanismus defektní přeměny nejen proinzulínu, ale i neuroendokrinních hormonů včetně POMC (prekursor MSH), které se společně podílejí na regulaci energetické bilance organismu a jejichž dysbalance vede ke vzniku obezity (140).

Tub mutace vznikla spontánně u myší linie C57BL/6J a způsobuje pomalu vznikající obezitu a hyperinzulinémií, bez vzniku hyperglykémie nebo hyperkortikosteronemie (141). Funkce tub genu není dosud uspokojivě známa, k jeho expresi dochází v mozku, testes, ovariu, tlustém střevě a oku (142, 143).

2. Inbrední polygenní modely obezity a diabetu 2. typu

Polygenní zvířecí modely se velice podobají člověku a poskytují tak možnost zkoumat interakce, příčiny a následky.

Goto-Kakizaki potkan (GK) byl vyšlechtěn z Wistar potkanů selektivním křížením (bratr x sestra) zvířat s porušenou glukózovou tolerancí. Předností GK potkanů je skutečnost, že pokles biologického účinku inzulínu není provázen obezitou. Potkani mají zvýšenou aktivitu hepatálních glykolytických a glukoneogenetických metabolických drah s následnou inzulinorezistencí (144).

Cohenuv neobézní hyperinzulinemický inzulinorezistentní potkan byl vyšlechtěn inbredním křížením normálních potkanů, kteří měli po dvouměsíční syntetické sacharósové dietě s deficitem mědi největší poruchu glukózové tolerance (145).

U KK myši se vyvíjí na věku a dietě závislá obezita, inzulinová resistance a lehká hyperglykémie v závislosti na hypertrofii a degranulaci B-buněk pankreatu (145). Diabetes 2. typu je u těchto zvířat spojen s polyfagií, polyurií a vzrůstající glukoneogenezou. Lehká obezita u KK myši se mnohonásobí při křížení s linií Ay, kde potom generace AAy myši je typická monstrózní obezitou a na dietě nezávislým diabetem (145). Tato zvířata představují vhodný model ke studiu fyziologických a metabolických faktorů obezity.

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat (OLETF) je inbrední linie potkanů, u kterých se v dospělém věku vyvíjí hyperglykémie pouze u samců (146). Zvířata jsou kongenitálně hyperfagická a oproti kontrolním zvířatům samci akumulují více tuk v

abdominální oblasti (147). Tento stav je provázen hyperinzulinémií, hypertriglyceridémií a hyperglykémií (148).

3. Indukování mutantů

Chemická nebo elektrolytická destrukce v hypothalamu je dlouho známým zákrokem k navození obezity u hlodavců. Například myším je podávána thioglukosa obsahující zlato, která selektivně destruuje centra metabolismu v hypothalamu a navodí tak hyperfagii s následnou obezitou, hyperinzulinémií a hyperglykémií (158) také způsobí defektní termogenezu v hnědé tukové tkáni (159) a zvýší se syntéza volných mastných kyselin v porovnání se zdravými zvířaty (160). Adrenalektomie u těchto zvířat způsobí redukci tělesné hmotnosti, pokles inzulinémie a glykémie a dojde k významnému zlepšení glukózové tolerance (161).

Další možností navození hypotalamických lézí je injekční podání glutamátu sodného a přímá elektrolytická destrukce (122).

S rozmachem molekulární biologie vznikají další speciální zvířecí laboratorní modely. Přímým zásahem do genetické výbavy zvířete vznikají transgenní modely (jedná se o zvířata exprimující ve zvýšené míře gen pro nějaký specifický enzym) např. SREBP myši (162). Zablokováním exprese genu pro určitý enzym vznikají tzv. knock-out zvířata (163), např. NPY knockout myši (164).

Zvířata s nutričně indukovanou IR

Jako nutričně indukovaná inzulinorezistence se označuje porucha biologického účinku inzulinu, která se projeví buď v důsledku zvýšeného kalorického příjmu anebo při změněném složení základních živin v dietě. Tento stav je možné dosáhnout: 1. krmením normálních laboratorních potkanů nebo myši vysokoenergetickou dietou (122,

165). 2. v případě pouštního potkana "Psammomys obesus" je možné inzulinoresistenci (plus obezitu, hyperinzulinémií a hyperlipidémií bez hypertenze) vyvolat krmením standardní dietou ad libitum (166), 3. u myši kmene C57BL/6J vzniká IR po vysokotukové dietě kombinované s vysokosacharósovu dietou (167).

Vysokotuková dieta

Krmení zvířat dietou obsahující až 70 kalorických procent tuku se již po 14-21 dnech projeví zvýšením Tg a NEMK v plasmě (168) a vznikem inzulinoresistence jak v periferních tkáních, tak i v játrech (169). Inzulínová resistance v tomto případě vzniká pravděpodobně na podkladě zvýšené nabídky mastných kyselin, které inhibují utilizaci glukózy v kosterním svalu (170) a zároveň stimulují tvorbu glukózy v játrech (171). Některé studie prokázaly snížení sekreční aktivity B- buněk pankreatu při dlouhodobém zvýšení hladiny MK a/nebo Tg (172).

Efekt diety s vysokým obsahem nasyceného tuku je dáván do souvislosti s porušením metabolické rovnováhy ve prospěch akumulace tělesného tuku, který se hromadí v důsledku poruchy jeho energetického využití (168). Zvýšená nabídka zásobních lipidů snižuje v souladu s Randlovým cyklem utilizaci glukózy v kosterním svalu a zasahuje i do procesu oxidativní a neoxidativní utilizace glukózy v játrech a svalech.

Četné studie prokázaly, že biologický účinek inzulínu, za předpokladu, že se celkový obsah tuku v dietě nemění (zvířata jsou krmena izokalorickou dietou), závisí též na složení mastných kyselin v dietě. Dieta bohatá na satureovaný tuk (hovězí luj) zapříčiní průkaznou inzulinoresistenci. Také diety s deficitem n-3 polynenasycených MK a/nebo s vysokým poměrem n-6/n-3 PNMK mohou přispívat ke vzniku inzulinové resistance (169). Na druhé straně substituce n-3 PNMK s dlouhým řetězcem do diety bohaté na n-6 PNMK zlepšuje biologický účinek inzulínu (169).

Vysokosacharósová diéta

Již od poloviny našeho století (173) je známo, že obohacení diety o sacharózu nebo fruktózu při zachování jejího kalorického obsahu, způsobí zvýšení plasmatických hladin Tg a NEMK (174, 175) vlivem nadprodukce VLDL- triglyceridů v játrech (149, 176) s jejich následným uvolněním do cirkulace. Jelikož se celkové množství Tg v játrech nezvyšuje, nastává po krmení vysokosacharózovou dietou výrazná akumulace Tg v kosterních svalech a v srdci (177, 154). Dále kromě vzestupu NEMK nalačno i postprandiálně (149) dochází k hyperinzulinémii nalačno (pravděpodobně jako projev kompenzační reakce B-buněk pankreatu na IR) při současné euglykémii. Akumulace Tg (po tukové i sacharóзовé dietě) a nadbytek Tg v cirkulaci po krmení sacharózou pozitivně koreluje se snížením biologického účinku inzulínu (165). Během dlouhodobého krmení potkanů vysokosacharózovou dietou byla pozorována tři stádia rozvoje metabolického syndromu IR (178). Po 3 až 5 týdnech se vyvinula fáze indukce, kdy zvířata byla hypertriglyceridemická a hyperinzulinemická s poruchou glukózové tolerance, mezi 5 až 8 týdny nastalo období normalizace výše popsaných parametrů a po 8 týdnu se rozvinula výrazná porucha glukózové tolerance s hyperglykemií a hypertriglyceridemií.

Farmakologicky navozené zvířecí modely

K experimentálnímu navození diabetu se užívá látek selektivně toxických pro B-buňky pankreatu. Jedná se hlavně o streptozotocin obsahující vysoce reaktivní nitrosureu ve svém řetězci (122).

Diabetogenní účinek streptozotocinu byl objeven v Upjohn Laboratories během jeho testování jako potencionálního antibiotika produkovaného *Streptomyces achromogens*.

Zjistilo se, že kromě širokého spektra antibiotických účinků selektivně destruuje B-buňky pankreatu již po jednom injekčním podání (122). Jeho efekt je závislý na druhu zvířete a podané dávce, která se pohybuje od 50 do 200 mg/kg hmotnosti. Diabetes lze navodit u potkanů, psů, myší, křečků, opic, miniprasat a králíků. Podáním STZ dojde většinou k navození tak velkého inzulínového deficitu, že zvířata po aplikaci přežívají jen krátkodobě. Snížením podané dávky na 35 mg/kg u potkanů nedojde k zničení všech B- buněk a prodlouží se přežívání pokusných zvířat. Diabetes mellitus 2. typu lze experimentálně navodit několika způsoby:

1. Streptozotocínový diabetes vyvolaný v neonatálním období

Tento model lze navodit intraperitoneální aplikací streptozotocinu v dávce 90 mg/kg ve 2. den života. Jednorázové podání STZ v neonatálním období se projeví po 8 týdnech poruchou sekrece inzulínu a hyperglykemií diagnostikovatelnou pouze v nasyceném stavu či při zátěži glukózou. Za bazálních podmínek mají zvířata hladinu glykémie a inzulínu v rozmezí fyziologických hodnot (179). Příčina je v tom, že B- buňky pankreatu novorozených potkanů mají na rozdíl od dospělých zvířat schopnost částečné regenerace (180).

Pokud se však podá stejné celkové množství streptozotocinu novorozeným potkanům rozdělené do dvou dávek po 45 mg/kg tělesné hmotnosti s týdenním odstupem, navodí se u experimentálních zvířat trvalá hyperglykémie již v průběhu prvního měsíce jejich života (181). V dalších měsících jejich života se pak glykémie ještě zvyšuje.

2. DM 2. typu navozený v dospělém věku vysokotukovou dietou a aplikací STZ

Dospělé potkany je nutno krmit 2-3 týdny vysokotukovou dietou s obsahem 70 kalorických procent nasyceného tuku. Po 3 týdnech na high-fat dietě se podá

intravenózně (nejlépe do ocasní vény) streptozotocin v dávce 0,19 mmol/kg. Streptozotocin se těsně před podáním rozpouští v 0,1 mol/L citrátovém pufru o pH=4,5. Během 3 dnů dojde k ireverzibilnímu vzestupu glykémie na hodnoty okolo 20-30 mmol/L za současné inzulínoresistence navozené dietou s vysokým obsahem tuků.

Příloha 5

Technika permanentní kanylace a. carotis communis a v. jugularis

Byla použita modifikovaná metodika podle Koopmans et al 1991.

Roztoky a anestetika:

Fyziologický roztok s heparinem : 0,9 % roztok NaCl + heparin 10 IU/ml

Anestetika:

2% ROMETAR (xylazin hydrochlorid, Spofa, Praha, ČR) v dávce 10 mg/kg tělesné hmotnosti potkana

5% NARKAMON (ketamin hydrochlorid, Spofa, Praha, ČR) v dávce 75 mg/kg tělesné hmotnosti potkana

Obě složky byly smíchány v poměru 1:3 a podány intraperitoneálně, čímž byla zajištěna dostatečně hluboká anestézie v trvání cca 45 min.

Materiál:

- pinzeta oční zahnutá 2 ks
- pinzeta oční rovná 1 ks
- chirurgické nůžky rovné ostré
- oční nůžky zahnuté (k nástřihu cév)
- cévní svorky 2 ks
- jehelec
- šicí jehly chirurgické

- cévní silikonové kanyly

1. pro v.jugularis: Silastic 0,025 x 0,047 inch (vnější x vnitřní Ø) 508-002, Dow Corning, USA
2. pro a. carotis : Silastic 0,020 x 0,037 inch (vnější x vnitřní Ø) 508-003, Dow Corning, USA

- jehly Luer černé 0,7 x 35 mm (jehla je zkrácená na cca 3 cm a její hrot je ztupený)

- jehly Luer žluté 0,9 x 38 mm (jehla je zkrácená na cca 3 cm a její hrot je ztupený)

- filtrační papír, buničina, chirurgické hedvábní, obvazové tampóny

Postup:

1. Minimálně 8 hod. lačnicí zvíře je uspáno i.p. aplikací anestetik.
2. Potkan se položí na záda, oči potkana se přikryjí tampony namočenými ve fyziologickém roztoku (ochrana před vysycháním rohovky a před intenzivním zářením operační lampy)
3. Operační místo na krku se zbaví srsti a paramediálně vpravo se provede cca 1 cm dlouhý nástřih kůže.
4. Pomocí zahnutých očních pinzet se tupě vypreparuje v. jugularis.
5. Kraniálně se provede podvaz vény a kaudálně se po nepatrném nástřihu vény zavede připravená kanyla naplněná sterilním fyziologickým roztokem s heparinem.
6. Kanyla se zavede asi 3,5-4 cm do vény a fixuje chirurgickým hedvábím.
7. Aspirací a následnou aplikací nepatrného množství fyziologického roztoku se otestuje průchodnost kanyly.
8. Chirurgickou nití se kanyla velmi jemně ještě fixuje k okolním tkáním, aby se zabránilo její event. dislokaci.
9. Opět s pomocí zahnutých očních pinzet se tupě vypreparuje a. carotis communis.

10. Kraniálně se provede podvaz tepny a kaudálně se výše popsaným způsobem zavede kanyla cca 3 cm kaudálně do cévy.
11. Po kontrole průchodnosti kanyly opět provedeme její fixaci k cévě a ještě pojistnou fixaci k okolním tkáním.
12. Na dorsu lebky zvířete provedeme cca 3 mm velký nástřih kůže, kterým zavedeme rovnou pinzetu a v podkoží vytvoříme tunel vedoucí k operační ráně.
13. Obě kanyly zasvorkujeme cévními svorkami, jejich volné konce uchopíme do zavedené pinzety a podkožním tunelem vyvedeme za uši zvířete.
14. Opět napojíme kanyly, znovu vyzkoušíme jejich průchodnost. Upravíme konečnou délku obou kanyl, která by měla být cca 3 cm od těla zvířete.
15. Obě kanyly zakončíme uzlíkem a obalíme lepicí páskou, aby si je zvíře nemohlo v pooperační době odkousat.
16. Nakonec zašijeme operační ránu několika stehy.
17. Operované zvíře umístíme do speciální vyhřívané nádoby v poloze na boku a sledujeme až do úplného probuzení z narkózy.

Naoperovaná zvířata je nutno umístit jednotlivě do přiměřeně velkých přepravek, aby nedošlo k vzájemnému odkousání kanyl zvířaty. Musí být zajištěn bezproblémový přístup zvířat k vodě a potravě *ad libitum*.

Literatura:

1. O'Brien RM, Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev* 1996;**76**:1109–61.
2. Yenush L, White MF. The IRS-signalling system dutiny insulin and cytokine action. *Bioessays* 1997;**19**:491–500.
3. Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by insulin. *Annu Rev Physiol* 1994;**56**:321–48.
4. Randazzo PA, Morey VA, Polishook AK, Jarett L. Characterization of the growth of murine fibroblasts that express human insulin receptors. I. The effect of insulin in the absence of other growth factors. *Exp Cell Res* 1990;**190**:25–30.
5. Taub R, Roy A, Dieter R, Koontz J. Insulin as a growth factor in rat hepatoma cells. Stimulation of proto-oncogene expression. *J Biol Chem* 1987;**262**:10893–7.
6. Sell SM, Reese D, Ossowski VM. Insulin-inducible changes in insulin receptor mRNA splice variants. *J Biol Chem* 1994;**269**:30769–72.
7. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P *et al.* Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 1996;**12**:106-9.
8. Withers DJ, White M. Perspective. The insulin signaling system – a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology* 2000;**141**:1917–21.
9. White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997;**40** (Suppl. 2):S2–17.
10. Benito M, Valverde AM, Lorenzo M. IGF-I: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;**28**:499–510.

11. Chou CK, Dull TJ, Russell DS, Gherzi R, Lebowitz D, Ullrich A *et al.* Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J Biol Chem* 1987;**262**:1842–7.
12. McClain DA, Maegawa H, Lee J, Dull TJ, Ulrich A, Olefsky JM. A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biologic activity and does not undergo endocytosis. *J Biol Chem* 1987;**262**:14663–71.
13. Odawara M, Kadowaki T, Yamamoto R, Shibasaki Y, Tobe K, Accili D *et al.* Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Science* 1989;**245**:66–8.
14. Moller DE, Yokota A, White MF, Pazianos AG, Flier JS. A naturally occurring mutation of insulin receptor alanine 1134 impairs tyrosine kinase function and is associated with dominantly inherited insulin resistance. *J Biol Chem* 1990;**265**:14979–85.
15. Wertheimer E, Lu SP, Backeljauw PF, Davenport ML, Taylor SI. Homozygous deletion of the human insulin receptor gene results in leprechaunism. *Nat Genet* 1993;**5**:71–3.
16. Krook A, Brueton L, O’Rahilly S. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene in infant with leprechaunism. *Lancet* 1993;**342**:277–8.
17. Hone J, Accili D, Psiachou H, Alghband-Zadeh J, Mitton S, Wertheimer E *et al.* Homozygosity for a null allele of the insulin receptor gene in a patient with leprechaunism. *Hum Mutat* 1995;**6**:17–22.
18. Jospe N, Kaplowitz PB, Furlanetto RW. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene of a patient with severe congenital insulin resistance: leprechaunism and the role of the insulin-like growth factor receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;**45**:229–35.

19. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D *et al.* A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 1998;**2**:559–69.
20. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA *et al.* Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 2000;**6**:87–97.
21. Mauvais-Jarvis F, Virkamaki A, Michael MD, Winnay JN, Zisman A, Kulkarni RN *et al.* A model to explore the interaction between muscle insulin resistance and beta-cell dysfunction in the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;**49**:2126–34.
22. Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;**404**:661–71.
23. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC *et al.* Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000;**289**:2122–5.
24. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA *et al.* Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991;**352**:73–7.
25. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MGJ, Glasheen E *et al.* Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 1995;**377**:173–7.
26. Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997;**272**:11439–43.
27. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997;**272**:21403–7.

28. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, Johnson RS *et al.* Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994;**372**:186–90.
29. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T *et al.* Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994;**372**:182–6.
30. Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R *et al.* Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 1996;**16**:3074–84.
31. Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF *et al.* Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 2000;**105**:199–205.
32. Rother KI, Imai Y, Caruso M, Beguinot F, Formisano P, Accili D. Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *J Biol Chem* 1998;**273**:17491–7.
33. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S *et al.* Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998;**391**:900– 4.
34. Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. IRS-2 coordinates IGF-1 receptor-mediated betacell development and peripheral insulin signalling. *Nat General* 1999;**23**:32– 40.
35. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism *in vivo*. *J Biol Chem* 2000;**275**:38990– 4.

36. Burks DJ, de Mora JF, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH *et al.* IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 2000;**407**:377–82.
37. Liu SC, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *J Biol Chem* 1999;**274**:18093–9.
38. Numan S, Russell DS. Discrete expression of insulin receptor substrate-4 mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;**72**:97–102.
39. Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J *et al.* Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest* 1998;**101**:1784–8.
40. Robinson LJ, Razzack ZF, Lawrence JCJ, James DE. Mitogen-activated protein kinase activation is not sufficient for stimulation of glucose transport or glycogen synthase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1993;**268**:26422–7.
41. Clarke JF, Young PW, Yonezawa K, Kasuga M, Holman GD. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem J* 1994;**300**:631–5.
42. Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* 1994;**269**:3568–73.
43. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB *et al.* Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 2001;**292**:1728–31.

44. Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE *et al.* Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med* 2001;**7**:1133–7.
45. Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R *et al.* The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J* 1993;**12**:1929–36.
46. Prentki M, Tornheim K, Corkey BE. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 1997;**40** (Suppl. 2):S32– 41.
47. Deeney JT, Prentki M, Corkey BE. Metabolic control of beta-cell function. *Semin Cell Dev Biol* 2000;**11**:267–75.
48. Thorens B. Glucagon-like peptide-1 and control of insulin secretion. *Diabete Metab* 1995;**21**:311–18.
49. Wollheim CB, Biden TJ. Second messenger function of inositol 1,4,5-trisphosphate. Early changes in inositol phosphates, cytosolic Ca²⁺, and insulin release in carbamylcholine-stimulated RINm5F cells. *J Biol Chem* 1986;**261**:8314–19.
50. Hughes SJ, Chalk JG, Ashcroft SJ. The role of cytosolic free Ca²⁺ and protein kinase C in acetylcholine-induced insulin release in the clonal beta-cell line, HIT-T15. *Biochem J* 1990;**267**:227–32.
51. Persaud SJ, Jones PM, Sugden D, Howell SL. The role of protein kinase C in cholinergic stimulation of insulin secretion from rat islets of Langerhans. *Biochem J* 1989;**264**:753–8.
52. Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 2000;**275**:31555–8.

53. Guest PC, Baillyes EM, Rutherford NG, Hutton JC. Insulin secretory granule biogenesis. Co-ordinate regulation of the biosynthesis of the majority of constituent proteins. *Biochem J* 1991;**274** (1):73–8.
54. Grimaldi KA, Siddle K, Hutton JC. Biosynthesis of insulin secretory granule membrane proteins. Control by glucose. *Biochem J* 1987;**245**:567–73.
55. Wicksteed B, Herbert TP, Alarcon C, Lingohr MK, Moss LG, Rhodes CJ. Cooperativity between the preproinsulin mRNA untranslated regions is necessary for glucosestimulated translation. *J Biol Chem* 2001;**276**:22553–8.
56. Skelly RH, Schupp GT, Ishihara H, Oka Y, Rhodes CJ. Glucose-regulated translational control of proinsulin biosynthesis with that of the proinsulin endopeptidases PC2 and PC3 in the insulin-producing MIN6 cell line. *Diabetes* 1996;**45**:37–43.
57. Schupp GT, Rhodes CJ. Specific co-ordinated regulation of PC3 and PC2 gene expression with that of preproinsulin in insulin-producing beta TC3 cells. *Biochem J* 1996;**313** (1):259–68.
58. Bollheimer LC, Skelly RH, Chester MW, McGarry JD, Rhodes CJ. Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic β cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *J Clin Invest* 1998;**101**:1094–101.
59. Skelly RH, Bollheimer LC, Wicksteed BL, Corkey BE, Rhodes CJ. A distinct difference in the metabolic stimulusresponse coupling pathways for regulating proinsulin biosynthesis and insulin secretion that lies at the level of a requirement for fatty acyl moieties. *Biochem J* 1998;**331** (2):553–61.
60. Bonner-Weir S. Beta-cell turnover. its assessment and implications. *Diabetes* 2001;**50** (Suppl. 1):S20–4.

61. Brockenbrough JS, Weir GC, Bonner-Weir S. Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats. *Diabetes* 1988;**37**:232–6.
62. Swenne I. Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus *Diabetologia* 1992;**35**:193–201.
63. Pende M, Kozma SC, Jaquet M, Oorschot V, Burcelin R, Le Marchand-Brustel Y *et al.* Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 2000;**408**:994–7.
64. Hugl SR, White MF, Rhodes CJ. Insulin-like growth factor I (IGF-I) -stimulated pancreatic beta-cell growth is glucosedependent. Synergistic activation of insulin receptor substratemediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem* 1998;**273**:17771–9.
65. Khoo S, Cobb MH. Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:5599–604.
66. Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, Hugl SR, Snow L, Kahn BB *et al.* Differential activation of protein kinase B and p70S6K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 2001;**276**:21110–20.
67. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;**106**:171–6.
68. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW *et al.* Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 1999;**103**:253–9.
69. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D *et al.* Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999;**48**:1270–4.

70. Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 1999;**96**:329–39.
71. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesitydependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995;**44**:863–70.
72. Unger RH, Zhou YT. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes* 2001;**50** (Suppl. 1):S118–21.
73. Rhodes CJ. IGF-I and GH post-receptor signaling mechanisms for pancreatic beta-cell replication. *J Mol Endocrinol* 2000;**24**:303–11.
74. Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S *et al.* Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca²⁺ concentration. *J Biol Chem* 1998;**273**:33501–7.
75. Cousin SP, Hugl SR, Myers MGJ, White MF, Reifel-Miller A, Rhodes CJ. Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent. signal transduction via janus kinase 2 (JAK2) /signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling. *Biochem J* 1999;**344** (3):649–58.
76. Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR, Cobelli C. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *AmJ Physiol* 1979;**236**: E667-E677
77. Bergman RN, Hope ID, Yang YJ, Watanabe RM, Meador MA, Youn YH, Ader M
Assesment of insulin sensitivity in vivo: A critical review. *Diabetes/Metabolism Reviews* 1998;**5**: 411- 429
78. Ignarro L, Buga G, Wood K, Byrns R, Chaudhuri G. Endotheliumderived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:9265–9.

79. Murad F, Mittal C, Arnold W, Katsuki S, Kimura H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1978;9:145–58.
80. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64:97–112.
81. Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424–37.
82. Brune B, Schmidt KU, Ullrich V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem* 1990;192:683–8.
83. Namgaladze D, Hofer HW, Ullrich V. Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe²⁺–Zn²⁺ center at the enzyme active site. *J Biol Chem* 2002;277:5962–9.
84. Alvarez S, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1472–8.
85. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93:1464–76.
86. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C817–33.
87. Lee J, Yang E, Park J. Inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by peroxynitrite. Implications for cytotoxicity and alcohol-induced liver injury. *J Biol Chem* 2003;278: 51360–71.
88. Maddux BA, See W, Lawrence JC Jr., Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of α -lipoic acid. *Diabetes*. 2001;50:404–410.
89. Nishikawa T, Edelstein D, Du X-L, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek M, Beebe D, Oates P, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M: Normalizing mitochondrial

- superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. **404**: 787–790, 2000.
90. Williamson JR, Cooper RH. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett*. 1980;117:K73–K85.
91. Tretter L, Adam-Vizi V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of alpha-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci*. 2000;20: 8972–8979.
92. Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3–L1 adipocytes. *Diabetes*. 1998;47:1562–1569.
93. Talior I, Yarkoni M, Bashan N, Eldar-Fielman H. Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC delta activation in adipocytes of obese, insulin-resistant mice. *Am J Physiol*. 2003;285:E295–E302.
94. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and B-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003;**52**: 1–8.
95. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*. 2000; 49:27–29.
96. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*. 2003;52:1–8.
97. Ceriello A. The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia*. 2003;46:M9–M16.
98. Del Prato S. Loss of early insulin secretion leads to postprandial hyperglycaemia. *Diabetologia*. 2003;46:M2–M8.

99. Kahan SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003;46:3–19.
100. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300:216–222.
101. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H: Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 2003; 52: 581–587.
102. Poitout V, Robertson RP. Minireview: secondary beta-cell failure in type 2 diabetes - a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*. 2002;143:339–342.
103. Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defence mechanism. *Diabetes*. 2003;52:2338–2345.
104. Bast A, Wolf G, Oberbaumer I, Walther R. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2002;45:867–876.
105. Meraji S, Jayakody L, Senaratne PJ, Thomson ABR, Kappagoda T. Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat. *Diabetes*. 1987;36: 978–981.
106. Mayhan WG. Impairment of endothelium-dependent dilatation of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *Am J Physiol*. 1989;256: H621–H625.
107. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-independent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;88:2510–2516.

108. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35:771–776.
109. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996;19:257–267.
109. Welch S, Gebhart SP, Bergman RN, Phillips LS. Minimal model analysis of intravenous glucose tolerance test-derived insulin sensitivity in diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1508-1518
110. Bergman RN, Prager R, Volund A, Olefsky JM. Equivalence of the insulin sensitivity index in man derived by the minimal model method and the euglycemic glucose clamp. *J Clin Invest* 1987; 79: 790-800
111. DeFronzo RA, Tobin JD, Andreas R. Glucose clamp technique: A method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: E214-E223
112. Reaven G, Berstein R, Davis B, Olefsky JM. Non-ketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance. *Am J Med* 1976; 60: 80-88
113. Harano Y, Ohgaku S, Hidaka H, Haneda K, Kikkawa R, Shigeta Y, Abe H. Glucose, insulin and somatostatin infusion for the determination of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45: 1124-1127
114. Nagulesparan M, Savage P, Unger R, Bennett A. A simplified method using somatostatin to assess in vivo insulin resistance over a range of obesity. *Diabetes* 1979; 28: 980-983
115. Kolterman OG, Gray RS, Griffin J. Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in NIDDM. *J Clin Invest* 1981; 68: 957-969
116. Yki-Järvinen H. Glucose toxicity. *Endocrine Reviews* 1992; 13:147-163

117. Gottesman I, Mandarino L, Gerich J. Use of glucose uptake and glucose clearance for the evaluation of insulin action in vivo. *Diabetes* 1984; 33: 184-191
118. Pelikánová T. Glykemický clamp – praktické provedení a využití. *DMEV* 2001; 3:172-183.
119. Gelfand RA, deFronzo RA. Hypoglycemic counterregulation in normal and diabetic man. *Ann Clin Res* 1984;16:84-93.
120. Akinmokun A, Selby PL, Ramaiya K, Alberti K. The short insulin tolerance test for determination of insulin sensitivity. A comparison with the euglycemic clamp. *Diab Med* 1992; 9:432-437
121. Mitrakou A, Vuorinen-Markkola H, Raptis G. Simultaneous assesment of insulin secretion and insulin sensitivity using hyperglycemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 379-382
122. Shafrir E. Animal models of non-insulin -dependent diabetes. *Diab Metab.* 1992; Rev 8: 179-208
123. Zhang Y, Proenca R, Mafei M, Barone M, Leopold L, Friedman J. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432
124. Friedman JM, Leibel RL. Tacling a weighty problem. *Cell* 1992; 69: 217-220
125. Wilkinson W. The genetic basis of obesity in rodents. *Current Opinion Endocrinol Diabetes* 1996; 3: 24-28
126. Genuth SM, Przybylski RJ, Rosenberg DM. Insulin resistace in genetically obese, hyperglycemic mice. *Endocrinology* 1971; 88: 1230-1238
127. Chen G, Koyama K, Yuan X, Lee Y, Zhou Y-T, O'Doherty R, Newgard C, Unger R. Disappearance of body fat in normal rats induced by adenovirus -mediated leptin gene therapy. *proc. Natl. Acad.Sci. USA* 1996; 93: 14795-14799

128. Lee GH, Proenca R, Montez J, Carrol K, Darvishzadeh J, Lee J, Friedman J.
Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; 379: 632-635
129. Coleman D. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes
in mice. *Diabetologia* 1978; 17: 141-148
130. Zucker L, Zucker T. Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered* 1961; 52: 275-278
131. Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu S, Tartaglia L, Leibel RL.
Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin)
receptor. *Science* 1996; 271: 994-996
132. Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizumo A, Kuwajima M, Shima K. Phenotype -linked
amino acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker fatty (fa/fa) ra. *Biochem
Biophys Res Comm* 1996; 22:19-26
133. Phillips D, Caddy S, Ilic V, Fielding B, Frayn K, Borthwick A, Taylor R.
Intramuscular Triglyceride and Muscle Insulin Sensitivity: Evidence for a
relationship in Nondiabetic Subjects. *Metabolism* 1996; 45(8): 947-950
134. Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N,
Hosoda K, Nakao K. Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary
DNAs-Identification of a missense mutation in Zucker Fatty (fa/fa) rats. *Biochem
Biophys Res Comm* 1996; 225: 75-83
135. Mathe D. Dyslipidemia and diabetes : Animal models. *Diabete and Metabolisme* 1995;
21: 106-111
136. Dunn FL. Management of hyperlipidemia in diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin
North Am* 1992; 21(2): 395-414
137. Langley S, York D. Glucocorticoid receptor numbers in the brain and liver of the obese
Zucker rat. In *J. Obesity* 1992; 16: 135-143

138. Bray GA, York DA. Studies on food intake of genetically obese rats. *American Journal of Physiology* 1972; 223(1): 176-179
139. Roberts SB, Greenberg AS. The new obesity genes. *Nutrition Reviews* 1996; 1: 41-49
140. Naggert J, Nishima P. Mouse models of obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 1995; 2: 513-517
141. Coleman DL, Eicher EM. Fat (fat) and Tubby (tub): Two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J. Heredity* 1990;81(6): 424-427
142. Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC. Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby: A member of a novel gene family. *Cell* 1996;85: 281-290
143. Nobben -Trauth K, Naggert JK, North MA, Nishimna PM. A candidate gene for the mouse mutation tubby. *Nature* 1996;380: 534-538
144. Goto Y, Suzuki KI, Sasaki M, Ono T, Abe S. GK rat as a model nonobese, non-insulin-dependent diabetes. Selective breeding over 35 generations. In *Lessons from Diabetes* 1998;2: 301-303, Shafrir E, Renol A
145. Cohen AM, Yanko L, Rosenmann E. Interrelation of genetics and nutrition in the production of diabetes in animals. In *Lessons from Animal Diabetes*. 1984;1: 73-80, ShafrirE, Renol AE
145. Ikeda H. KK mouse. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1994;24 (Suppl.): S313-S316
146. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hypertriglyceridemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992;41(11): 1422-8

147. Ishida K, Mizuno A, Min Z, Shima K. Which is the primary etiologic event in OLETF rats , a model of spontaneous non-insulin dependant diabetes mellitus, insulin resistance , or impaired insulin secretion. *Metabolism* 1995;44(7): 940-945
148. Sato T, Asahi Y, Nakayama N. Insulin resistance in skeletal muscle of the male OLETF rat, a new model of NIDDM. *Diabetologia* 1995;38: 1033-1041
149. Vrána A, Kazdová L. The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: An experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transpl. Proc.* 1990;22: 2579
150. Šeböková E, Klimeš I, Herrman M, Hromadová m, Bohov P, Mitková A, Huettiger M. Fish oil modifies lipid composition and liver LDL receptor activity in hypertriglyceridemic rats. *Diab Nutr Metab* 1992;5: 249-257
151. Klimeš I, Kreze A, Vozár J. *Diabetes mellitus*. Slovak Academy Press, Bratislava, 1992;str. 52-57
152. Šeböková E, Klimeš I, Štolba P. Celulárne a molekulárne mechanizmy inzulínovej rezistencie. *Vnitřní lékařství* 1995;41: 76-83
153. Ficková M, Šeboková E, Hubert P, Staedel C, Bohov P, Klimeš I, Cremel G, Macho L. Liver plasma membrane lipid composition and insulin receptor tyrosine kinase activity in HTG rats. *Horm Metab Res* 1992;24: 42-43
154. Klimeš I, Šeböková E, Vrána A. The hereditary hypertriglyceridemic rat, a new animal model of the insulin resistance syndrome. In *Lessons from animal Diabetes*. (Shafir E, Renol AE, Smith Gordon, London) 1994; pp 271-283
155. Kuneš J, Bin Talib HK, Dobešová Z, Vrána A. Erythrocyte ion transport alterations in hypertriglyceridemic rats. *Clin Sci* 1994;86: 11-13
156. Zicha J, Pecháňová O, Čačányiová S, Cebová M, Kristek F, Török J, Šimko F, Dobešová Z, Kuneš J: Hereditary hypertriglyceridemic rat: a suitable model of

- cardiovascular disease and metabolic syndrome? *Physiol. Res.* 2006; **55** (Suppl. 1): S49-S63.
157. Klimeš I, Ficková M, Švábová E. Dietary ω -3 fatty acids and insulin binding and action in liver and adipose tissue of normal and hereditary hypertriglyceridemic rat fed high sucrose diet. In *Biome branes and Nutrition* (Léger CL, Béréziat G et al.), Colloque INSERM 1998;195: 429-440
158. Marhall N, Barnett R, Mayer AJ. Hypothalamic lesions in goldthioglucose injected mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;90: 240-244
159. Cooney GJ, Astbury LD, Williams PF, Caterson ID. Insulin response in individual tissues of control and gold thioglucose-obese mice in vivo with (1-14C)2-deoxyglucose. *Diabetes* 1987;36: 152-158
160. Cooney G, Vanner M, Nicks J, Williams P, Caterson I. Changes in the lipogenic response to feeding of liver, white adipose tissue and brown adipose tissue during the development of obesity in the gold-thioglucose-injected mouse. *Biochem J* 1989;259: 651-657
161. Blair SC, Caterson ID, Cooney GJ. Effect of adrenalectomy on glucose tolerance and lipid metabolism in gold-thioglucose obese mice. *American Physiological Society* 1994;266: 993-1000
162. Horton J, Shimomura I, Brown M, Hammer R, Goldstein J, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element binding protein 2. *Journal of Clinical Investigation* 1998;101(11): 2331-2339
163. Cheta M. Animal models of type I diabetes mellitus. *J Pediatr Metab* 1998;11: 11-19
164. Errickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 1996;274 (5293): 1704-7

165. Storlien LH, Pan DA, Kriketos D, Baur LA. High fat diet- induced insulin resistance. Lessons and implications from animal studies. *Ann NY Acad Sci* 1993;683: 82-90
166. Adler JH, Kalman R, Lazarovici G, Bar-On H, Ziv E. Achieving predictable model of type 2 diabetes in sand rats. In *Lessons from Animal Diabetes* (Shafir E, Smith-Gordon, London) 1991;3: 312-214
167. Coleman D. Diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetes* 1982;3 (Suppl 1): 1-6
168. Storlien LH, James AB, Burleigh KM. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure and obesity in the rat. *Am J Physiol* 1986;251: E576-E583
169. Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe W, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and n-3 fatty acids muscle phospholipid. *Diabetes* 1991;40: 280-289
170. Han D-Ho, Hansen PA, Host HH, Holloszy JO. Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high fat diet, A reevaluation. *Diabetes* 1997;46: 1761-1767
171. Oakes ND, Bell KS, Furler SM. Diet induced Muscle Insulin Resistance in rats is ameliorated by acute dietary lipid withdrawal or a single bout exercise: Parallel between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA. *Diabetes* 1997;46: 2022-2028
172. McGarry JD, Dobbins RL. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 1999;42: 128-138
173. Arhens EH, Hirsch J, Insull W. CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 1957;295: 61-66
174. Mancini M, Mattock M, Rabaya E. Studies of the mechanism of carbohydrate-induced lipaemia in normal man. *Atherosclerosis* 1973;17: 445-454

175. Vrána A, Fábry P, Kazdová L. Effect of dietary fructose on fatty acid synthesis in adipose tissue and on triglyceride concentration in blood in the rat. *Nutr Metab* 1973;15: 305-313
176. Klimeš I, Šeboková E, Minchenko A. Dietary fish oil in hyperlipidemia and impaired insulin action - the experimental approach. A minireview. In *lipoprotein and atherosclerosis* (Hanefeld M, Jaross W, Dude H) Fisher Verlag Jena 1991;56-62
177. Šeboková E, Klimeš I, Herrman M, Minchenko A, Mitková A, Hromadová M. Modulation of the hypolipidemic effect of fish oil inhibition of adipose tissue lipolysis with acipimox, a nicotinic acid analog. *Ann NY Acad Sci* 1993;683: 183-191
178. Lombardo YB, Drago S, Mocchiutti N. Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: Relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism* 1996;45:1527-1532
179. Blondel O, Bailbé D, Portha B. Relation of insulin deficiency to impaired insulin action in NIDDM adult rats given streptozotocin as neonates. *Diabetes* 1989;38: 610-617
180. Dutrillaux MC, Portha B, Rozé C, Hollaande E. Ultrastructural study of pancreatic B cell regeneration in membrane rats after destruction by streptozotocin. *Virchows. Arch. (Cell Pathol.)* 1982;39: 173-185
181. Zlatoš L, Gvozdjáčková A, Kucharská J, Kvaszová E, Holzerová J, Kováčová M, Uličná O, Brada V. Some characteristics of cardiac mitochondrial respiration and the energy production in young and adult diabetic rats. *J Kardiol* 1997;2: 139
182. Kyselová P, Žourek M, Rušavý Z, Trefil L, Racek J: Hyperinsulinemia and Oxidative Stress. *Physiol. Res.* 2002; **51**: 591-595

183. Bravi MC, Armiento A, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, De Luca O, Moretti A and De Mattia G: Insulin decreases intracellular oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2006; **55**: 691-695.
184. Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; **86**: 3257-3265.
185. Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Kapur N and Dandona P. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; **87**: 1419-1422.
186. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest Ch, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P and Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* 2001; **345**: 1359-1367.
187. Kuneš J, Hojná S, Kadlecová M, Dobešová Z, Rauchová H, Vokurková M, Loukotová J, Pecháňová O, Zicha J: Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. *Physiol Res* 2004;**53**: S23-S34.
188. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; **300**: 216–222.
189. Garcia Soriano F, Virag L, Jagtap P, Szabo E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KG, Salzman AL, Southan GJ, Szabo C. Diabetic endothelial

- dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med.* 2001; **7**: 108–113.
190. Aljada A and Dandona P. Effect of insulin on human aortic endothelial nitric oxide synthase. *Metabolism.* 2000; **49**: 147-150.
191. Zeng G and Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1996; **98**: 894-898.
192. Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; **85**: 2970-2973.
193. Dhindsa S, Tripathy D, Mohanty P, Ghanim H, Syed T, Aljada A, Dandona P. Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor-kappaB in mononuclear cells. *Metabolism.* 2004; **53**: 330-334.
194. Furnary AP, Gao G, Grunkemeier GL, Wu Y, Zerr KJ, Bookin SO, Storm Floten H, Starr A. Continuous insulin infusion reduces mortality in patients with diabetes undergoing coronary artery bypass grafting. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003; **125**: 1007-1021.
195. Jeschke MG, Klein D and Herndon DN. Insulin treatment improves the systemic inflammatory reaction to severe trauma. *Ann. Surg.* 2004; **239**: 553-560.
196. Kinsley JS. Effect of an intensive glucose management protocol on the mortality of critically ill adult patients. *Mayo Clin. Proc.* 2004; **79**: 992-1000.
197. Langouche L, Vanhorebeek I, Vlasselaers D, Vander Perre S, Wouters PJ, Skogstrand K, Hansen TK and Van den Berghe G: Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *J. Clin. Invest.* 2005; **115**: 2277-2286.

Publikace a přednášky

Originální práce:

1. **Žourek Michal**, Kyselová Pavlína, Mudra Jiří, Krčma Michal, Jankovec Zdeněk, Lacigová Silva, Víšek Jakub, Rušavý Zdeněk: The relationship between glycaemia, insulin and oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rat – přijato k publikaci do *Physiological Research* 5/2007
2. P. Kyselová, **M. Žourek**, Z. Rušavý, M. Trefil, J. Racek, Hyperinsulinaemia and oxidative stress. *Physiol. Res.* 2002;51: 591-595, 2002
3. Z. Rušavý, H. Kordová, M. Čepelák, P. Těšínský, P. Žolková, **M. Žourek**: Vliv složení enterální výživy na energetický výdej a produkci CO₂ v období přiměřeného a nadměrného přívodu energie. *Vnitřní lékařství*, 48, 2002, č. 4, s. 298 – 301.
4. S. Lacigová, R. Kárová, Z. Roubalová, D. Čechurová, Z. Jankovec, **M. Žourek**, Z. Rušavý: Krátkodobý a dlouhodobý účinek Cerebrolysinu v léčbě bolestivé diabetické neuropatie. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* 2003;5 p. 349 - 354
5. S. Lacigová, Z. Rušavý, J. Zemanová, Z. Jankovec, **M. Žourek**, M. Krčma, D. Čechurová. Doporučená a reálná léčba v diabetologických ambulancích v České republice aneb lze léčit diabetiky dle standardů odborné společnosti?. *DMEV* 4/2004: 169-177.
6. Jankovec Z., Krcma M., Lacigova S., **Zourek M.**, Rusavy Z.: National Registry of Patients Treated with Continuous Subcutaneous Insulin Infusion (CSII) in the Czech Republic: Long-term results. *Infusystem International* 4, 3, 2005: 21-24.
7. **Zourek Michal**, Krcma Michal, Jankovec Zdenek, Rusavy Zdenek: In-line Filtration in Home Parenteral Nutrition Use – a retrospective study – odesláno k publikaci do *Clinical Nutrition*.

Přehledné práce

1. Z. Jankovec, Z. Rušavý, D. Čechurová, S. Lacigová, **M. Žourek**: Stanovení sekrece inzulínu: využití 7-bodového orálního glukózového tolerančního testu. *Plzeňský Lék. Sborník* 68, 2001: 57 – 62
2. **Žourek M.**, Lacigová S., Krčma M., Mudra J., Jankovec Z., Rušavý Z: Přehled metabolismu železa s ohledem na klinickou praxi. přijato do *DMEV*

Přednášky a postery publikované ve sbornících

1. S. Lacigová, R. Kárová, Z. Roubalová, D. Čechurová, Z. Jankovec, **M. Žourek**, Z. Rušavý: Krátkodobý a dlouhodobý efekt Cerebrolysinu na bolestivou diabetickou neuropatii. XXXVIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 17.4.- 20.4. 2002
2. **M. Žourek**, V. Frantová, K. Kovářová, P. Těšínský, Z. Rušavý: Srovnání tělesného složení u prostého hladovění a fyzické zátěže metodou BIA. 18. vědecký kongres SKVIMP ČLS JEP, Hradec Králové, 4. – 6. 4.02. Intenzivní metabolická péče a klinická výživa, editor: Z. Zadák, 2002, SKVIMP, Hradec Králové
3. K. Kovářová, L. Němec, H. Winkelhoferová, P. Těšínský, **M. Žourek**, Z. Rušavý. Domácí parenterální a enterální výživa – edukační materiál pro pacienty. Srovnání tělesného složení u prostého hladovění a fyzické zátěže metodou BIA. 18. vědecký kongres SKVIMP ČLS JEP, Hradec Králové, 4.-6. 4.02. Intenzivní metabolická péče a klinická výživa, editor: Z. Zadák, 2002, SKVIMP, Hradec Králové
4. S. Lacigová, Z. Jankovec, A. Vítová, D. Čechurová, **M. Žourek**, Z. Rušavý: Prediction of cardiovascular autonomic neuropathy in Type 1 diabetic patients. 18th International Diabetes Federation Congress. Paris, 24-29 August 2003. *Diabetes Metab* 2003, 29, 4S277

5. Z Rusavy, **M Žourek**, Z Jankovec, D Cechurova and S Iacinova: Assessment of energy expenditure and CO₂ production with different enteral feeds, 23rd International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine Brussels, Belgium, 18–21 March 2003, *Critical Care* 2003, **7**(Suppl 2):P009
6. **Žourek M**, Černý V, Schlegel M, Jankovec Z, Lacigová S, Krčma M, Rušavý Z: Optimální regulace dávkování glukózy během clampu XL. Diabetologické dny v Luhačovicích, 17.4.- 20.4. 2004
7. Jankovec Z, Lacigová S, **Žourek M**, Krčma M, Rušavý Z. Long-Term Results of continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) treatment in the Czech Republic. 65th Annual Scientific Sessions ADA. *Diabetes* 2005, 54, Suppl. 1: A494
8. Jankovec Z., Lacigova S., **Zourek M.**, Krcma M., Rusavy Z.: National Register of Patients Treated by Insulin Pump in the Czech Republic. 24th workshop of the AIDPIT study group, Igls, Austria, 23-25 January 2005. Abstracts p. 4.
9. Lacigová S, Šafránek P, Krčma M, **Žourek M**, Jankovec Z, Čechurová D, Rušavý Z. The influence of the autonomic neuropathy on the microcirculation of the skin in diabetic patients. *Neurodiab XV., EASD, Athens 2005*, 8.-11.9. Book of abstracts.
10. **Zourek M**, Rusavy Z, Janovec Z, Novak I: Insulin sensitivity and hepatic glucose production in sepsis, 25th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicině, Brusel 21-25 March 2005 *Critical Care* 2005, **9**(Suppl 1):P383
11. Jankovec Z., **Žourek M.**, Krčma M., Lacigová S., Rušavý Z., Vliv léčby inzulinovou pumpou na parametry metabolického syndromu u inzulinorezistentních pacientů s diabetem mellitem 2.typu. IX.kongres o ateroskleroze, Špindlerův Mlýn, 1.- 3.12.2005. *Diabetologie, Metabolismus, Endokrinologie, Výživa* 8. 2005; Suppl 3: s.35.

12. **Žourek M**, Rušavý Z, Jankovec Z, Novák I: Jaterní glukoneogeneze a inzulínová senzitivita v sepsi. 41. Diabetologické dny v Luhačovicích, 21. – 23.4.05. Sborník referátů.
13. Rušavý Z, Frantová V, **Žourek M**, Lacigová S, Jankovec Z: Srovnání tělesného složení zdravých dobrovolníků a diabetiků 1. typu. 41. Diabetologické dny v Luhačovicích, 21. – 23.4.05. Sborník referátů.
14. **Žourek M**, Mudra J, Víšek J, Čechurová D, Rušavý Z: Vliv inzulinémie a glykémie na oxidační stres u potkanů kmene Wistar a HTG. 42. Diabetologické dny v Luhačovicích, 20. – 22.4. 2006

Vyžádané přednášky:

1. Z. Rušavý, D. Čechurová, S. Lacigová, Z. Jankovec, **M. Žourek**: Mikrocirkulace u diabetické nohy. Večer 1. Interní kliniky. Spolek lékařů v Plzni, 17.4.2002.
2. A. Vítová, **M. Žourek**, Z. Rušavý: Trombotické komplikace centrálních žilních přístupů u domácí parenterální výživy. Technické aspekty dlouhodobé ambulantní parenterální výživy. 3. LFUK Praha , 14.11.02.
3. Z. Jankovec, Z. Rušavý, A. Vítová, **M. Žourek**: Kritická hyperkalcémie u pacientky se syndromem krátkého střeva. 4. minisymposium domácí umělé výživy, Dvůr Králové nad Labem, 6. – 7. 12.02
4. **M. Žourek**, A. Vítová, Z. Rušavý: Prevence infekčních komplikací centrálního žilního přístupu u domácí parenterální výživy. Technické aspekty dlouhodobé ambulantní parenterální výživy. 3. LFUK Praha , 14.11.02
5. **M. Žourek**, Z. Rušavý: Metabolismus železa s ohledem na klinické aspekty. 3. LFUK, 5.3.2004

6. **Žourek M.**, Černý V., Schlegel M., Rušavý Z.: Model regulace glykémie. 9. workshop Léčba diabetiků inzulínovými pumpami. Žinkovy, 30.9.2005
7. **M. Žourek**, Z. Rušavý, Parametry oxidačního stresu při clampu laboratorního potkana, Setkání řešitelů výzkumného záměru MSM 0021620814, Vidžín
8. **Žourek M**, Rušavý Z, Parametry oxidačního stresu při clampu laboratorního potkana, Setkání řešitelů výzkumného záměru MSM 0021620814, Vidžín 11/2005