

**KONTRAKTILNÍ FUNKCE
A SYMPATICKÁ INERVACE
DIABETICKÉHO SRDCE
LABORATORNÍHO POTKANA**

**CONTRACTILE FUNCTIONS AND
SYMPATHETIC INNERVATION OF
THE ALBINO RAT DIABETIC HEART**

JITKA ŠVÍGLEROVÁ

**Ústav fyziologie Lékařské fakulty v Plzni,
Univerzita Karlova v Praze**

Plzeň 2005

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí Ústavu fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni doc. MUDr. Janě Slavíkové, CSc., která vytváří teoretické i praktické zázemí pro experimentální práci pregraduálních i postgraduálních studentů. Svému školiteli doc. MUDr. Pavlovi Pučelíkovi, CSc. bych ráda poděkovala za četné diskuse, ve kterých mě seznamoval s radostmi i záležitostmi výzkumné práce. Za významnou pomoc a podporu při sepsání výsledků mé práce bych ráda poděkovala svému kolegovi MUDr. Milanovi Štenglovi, Ph.D., který, přestože byl plně vytížen prací v zahraničí, si vždy našel čas, aby mi poskytl cenné rady a připomínky při řešení disertační práce a bez jehož pomoci by tato práce vznikala jen stěží. Dále děkuji za přínosnou spolupráci své kolegyni MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D., která mi velice ochotně poskytovala nejen své zkušenosti a znalosti, ale i morální podporu. Můj dík patří také MUDr. Lukášovi Nalosovi za důležitou pomoc při obsluze laboratoře a počítačových programů a hlavně za přátelskou pracovní atmosféru. Ráda bych rovněž poděkovala MUDr. Zbyňkovi Tonarovi, který prováděl všechna imunohistochemická vyšetření. V neposlední řadě musím poděkovat také ing. Bartákovi za technickou pomoc při práci v laboratoři a všem laborantkám, které se podílely na přípravě pokusů – paní Holické a Vernerové, slečnám Hesové, Chocholaté a Kuškové.

Nakonec chci poděkovat manželovi Vladimírovi za pochopení, které mi během postgraduálního studia poskytl. Svým dětem, Johance a Vládičkovi jsem vděčná za trpělivost, se kterou na mě doma čekaly a za optimismus, se kterým mě povzbuzovaly do další činnosti. Proto jim tuto práci připisuji.

Obsah

Poděkování	3
Obsah	5
Seznam zkratk a symbolů	7
1. Úvod	9
1.1. Kontrakce srdeční buňky	12
1.1.1. Uvolnění vápníku ze sarkoplazmatického retikula	13
1.1.2. Sarkoplazmatické retikulum	16
1.1.3. Odčerpání vápníku z cytoplazmy	17
1.1.4. Kontraktilní aparát kardiomyocytu	19
1.2. Autonomní regulace srdeční činnosti	20
1.3. Kardiovaskulární aparát a diabetes mellitus	22
1.3.1. Diabetická angiopatie	22
1.3.2. Diabetická kardiomyopatie	25
1.3.3. Kardiovaskulární autonomní neuropatie	26
1.3.4. Postižení myokardu laboratorního potkana v důsledku streptozotocinového diabetu	27
1.4. Kardiovaskulární aparát a inzulin	30
1.5. Diabetické srdce a inzulin	33
1.6. Cíl disertace	34
2. Metody	37
2.1. Zvířata	39
2.2. Experimentální model diabetu	39
2.2.1. Indukce streptozotocinového diabetu	39
2.2.2. Ověření diabetického modelu	40
2.2.3. Dlouhodobé sledování diabetických potkanů	45
2.3. Měření kontraktility	52
2.3.1. Volba preparátu	52
2.3.2. Příprava preparátu	53
2.3.3. Registrace srdeční kontrakce, sledované parametry	54
2.3.4. Roztoky a chemikálie	56
2.4. Příprava tkáně pro stanovení noradrenalinu	57
2.5. Uvolňování noradrenalinu	57

2.5.1. Bazální a stimulované uvolňování noradrenalinu	57
2.5.2. Uvolňování noradrenalinu pod vlivem desipraminu	59
2.5.3. Uvolňování NA v bezvápníkovém prostředí	60
2.6. Stanovení koncentrace noradrenalinu	60
2.7. Prezentace výsledků a statistika	61
3. Výsledky a diskuse	63
3.1. Účinek inzulínu na kontrakci papilárního svalu kontrolních a diabetických potkanů	65
3.1.1. Úvod	67
3.1.2. Výsledky	68
3.1.3. Diskuse	88
3.2. Uvolňování noradrenalinu v srdečních síních laboratorního potkana	95
3.2.1. Úvod	97
3.2.2. Výsledky	99
3.2.3. Diskuse	107
4. Závěr	111
5. Literatura	121
Seznam publikací autorky	147

Seznam zkratek a symbolů

ADP	adenosindifosforečná kyselina
AGE	pozdní produkty glykace
ATP	adenosintrifosforečná kyselina
a.u.	arbitrární jednotky
CaMK	kalmodulin-dependetní kináza
CF	síla kontrakce
CICR	vápníkem indukované uvolnění vápníku
CPA	cyklopiazonová kyselina
DAN	diabetická autonomní neuropatie
DM	diabetes mellitus
ECC	elektromechanická vazba, vazba mezi excitací a kontrakcí
I_{CaL}	vápníkový proud L-typu
I_{CaT}	vápníkový proud T-typu
i.p.	intraperitoneálně
i.v.	intravenózně
KAN	kardiovaskulární autonomní neuropatie
KER	draslíkem stimulované uvolňování
L-NAME	nitro-L-arginin metylester
i.u.	mezinárodní jednotky
MN	membránové napětí
mRNA	informační ribonukleová kyselina
NA	noradrenalin
NCX	Na^+ - Ca^{2+} výměník
NO	oxid dusnatý

PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PL	fosfolamban
PMCA	sarkolemální Ca^{2+} -ATPáza
R/2	poločas relaxace
RIA	radioimmunoassay
RP	perioda nečinnosti
RyR	ryanodinový receptor
SERCA	Ca^{2+} -ATPáza sarkoplazmatického retikula
SR	sarkoplazmatické retikulum
STZ	streptozotocin
STZ1	diabetická zvířata 1 měsíc po aplikaci streptozotocinu
STZ4	diabetická zvířata 4 měsíce po aplikaci streptozotocinu
STZ7	diabetická zvířata 7 měsíců po aplikaci streptozotocinu
TTP	čas od začátku do vrcholu kontrakce
$[\text{X}]_e$	extracelulární koncentrace iontu
$[\text{X}]_i$	intracelulární koncentrace iontu

1. ÚVOD

Diabetes mellitus (DM) představuje v rozvinutých společnostech významný medicínský problém. Za posledních 20 let se výskyt diabetu v naší republice zdvojnásobil a postihuje asi 6,5% populace. DM se dělí na DM 1. typu (dříve inzulin-dependentní diabetes mellitus), DM 2. typu (dříve inzulin non-dependentní diabetes mellitus) a diabetes, který je součástí jiných onemocnění. Kardiovaskulární komplikace se u diabetiků vyskytují až desetkrát častěji než v nediabetické populaci a jsou příčinou téměř 70% úmrtí diabetických pacientů. Vzhledem ke klinickému významu problému a značné neúplnosti znalostí o působení diabetu na srdeční sval jsme se rozhodli touto problematikou zabývat. Vyvinuli jsme experimentální model DM 1. typu a zaměřili jsme se na studium vlivu diabetu a inzulinu na kontraktilitu a autonomní regulaci myokardu. Cílem bylo přispět k pochopení mechanismů působení diabetu na srdce a jeho regulaci. Vzhledem k tomu, že se kardiovaskulární komplikace vyskytují ve zvýšené míře i u léčených diabetiků, věnovali jsme se rovněž působení inzulinu na srdeční činnost ve snaze pomoci optimalizovat stávající a vypracovávat nové terapeutické možnosti.

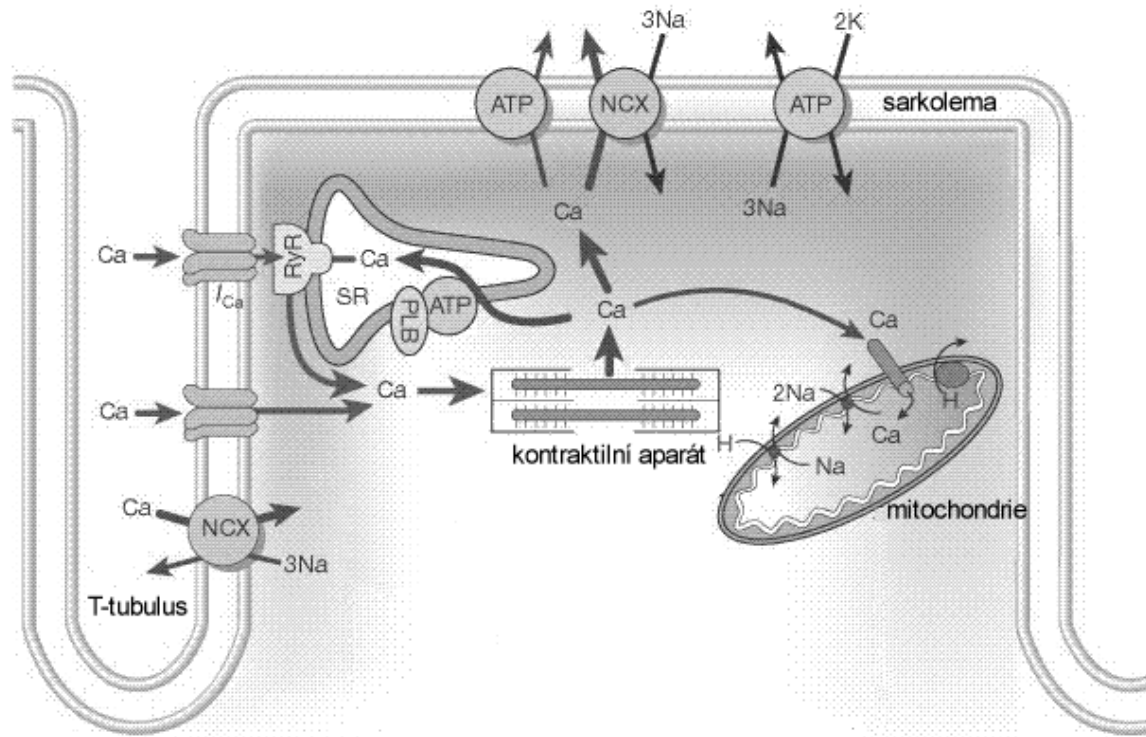
Výsledky experimentů týkající se kontraktility papilárních svalů i uvolňování noradrenalinu navazují na výzkumné zaměření našeho pracoviště, které se již více než tři desítky let věnuje jak studiu kontraktilních vlastností myokardu, tak i autonomní regulaci srdce laboratorního potkana v období postnatálního vývoje. V roce 1998 se Ústav fyziologie připojil k Výzkumnému záměru I. interní kliniky LF UK v Plzni, zaměřenému právě na studium endokrinopatií.

1.1. Kontrakce srdeční buňky

Děje zajišťující kontrakci srdečního svalu jsou zahájeny akčním napětím (AN), které se šíří po membráně srdeční buňky. Intracelulární koncentrace vápníku ($[Ca^{2+}]_i$) je za klidových podmínek 10^{-7} mol/l. Během AN dochází vlivem depolarizace k otevření sarkolemálních vápníkových kanálů L-typu, jimiž do srdeční buňky proudí vápenaté ionty po elektrochemickém gradientu. Zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ aktivuje uvolnění vápníku z terminálních cisteren sarkoplazmatického retikula (SR), které je hlavním intracelulárním zdrojem vápníku. Vápník uvolněný ze SR se společně s vápníkem proudícím do buňky z extracelulárního prostředí naváže na bílkovinu troponin C, což umožní tvorbu příčných můstků mezi kontraktilními bílkovinami aktinem a myozinem a jejich vzájemný posuv, který vede ke kontrakci celého kardiomyocytu. V této fázi se $[Ca^{2+}]_i$ zvyšuje až na 10^{-5} mol/l. Proces, při kterém elektrický vzruch šířící se po membráně buňky způsobuje mechanickou odpověď téže buňky, se označuje jako elektromechanická vazba (excitation-contraction coupling, ECC) neboli vazba mezi excitací a kontrakcí. Elektromechanická vazba v myokardu je na rozdíl od kosterního svalu závislá na přísunu vápníku z extracelulárního prostředí a normální kontrakce srdečního svalu tedy nemůže dlouhodobě probíhat v bezvápníkovém prostředí (New a Trautwein, 1972).

Základní podmínkou pro ukončení kontrakce a zahájení relaxace je snížení intracelulární koncentrace vápníku. K odčerpání Ca^{2+} z cytoplazmy slouží čtyři základní transportní systémy – Ca^{2+} -ATPáza SR (SERCA), sodíko-vápníkový výměník (NCX), sarkolemální Ca^{2+} -ATPáza a mitochondriální vápníkový transportér. V savčím myokardu hrají důležitou úlohu zejména

SERCA a NCX, zbylé dva transportní systémy jsou méně významné (Bers, 2002).



Obr. 1. Hospodaření s vápníkem v komorovém kardiomyocytu.

NCX – Na⁺-Ca²⁺-výměník, RyR – ryanodinový receptor, PLB – fosfolamban, SR – sarkoplazmatické retikulum, ATP – systém aktivního transportu, I_{Ca} – vápníkový proud L typu (upraveno podle Berse, 2002).

1.1.1. Uvolnění vápníku ze sarkoplazmatického retikula

Vápníkový kanál L-typu

Vápníkové kanály L-typu (I_{CaL}) se nacházejí na membráně všech kardiomyocytů, jejich největší výskyt je v komorových kardiomyocytech, zejména v oblasti T-tubulů, kde jsou lokalizovány v těsné blízkosti ryanodinových receptorů SR (Scriven et al., 2000). Aktivace vápníkových kanálů nastává při membránovém napětí (MN) kolem -30 mV. Vápník proudící

po elektrochemickém gradientu do kardiomyocytu aktivovaným kanálem I_{CaL} difunduje k SR a otevírá vápníkové kanály SR. Tento proces, kdy proud vápníku z extracelulárního prostředí způsobí uvolnění vápníku ze SR, se označuje jako „vápníkem indukované uvolnění vápníku“ (calcium-induced calcium release, CICR) a byl poprvé popsán Fabiatiem v roce 1975. Bylo prokázáno, že kanál I_{CaL} hraje rozhodující roli při uvolnění vápníku ze SR a jeho přítomnost je pro CICR nezbytná (Eisner et al., 1998).

Inaktivace kanálů I_{CaL} probíhá pomalu a je závislá na MN a $[Ca^{2+}]_i$ (Lee et al., 1985). Vápník uvolněný ze SR kromě toho, že aktivuje kontraktální aparát, přispívá k inaktivaci I_{CaL} (Sipido et al., 1995), která je zprostředkována bílkovinou kalmodulinem a brání nadměrnému vstupu vápníku do buňky (Peterson et al., 1999). Kanál je možno farmakologicky zablokovat dihydropyridiny (např. nifedipin), fenyalkylaminy (např. verapamil) či benzothiazepiny (např. diltiazem) (v přehledu McDonald et al., 1994).

Alternativní cesty vedoucí k uvolnění vápníku ze SR

Vápníkový kanál T-typu (I_{CaT}) se nachází zejména v membráně buněk převodního systému srdečního (Hirano et al., 1989), v komorové svalovině je jeho výskyt sporadický (Mitra a Morad, 1986). Kanál je aktivován při MN kolem -60 mV. Inaktivace I_{CaT} nastává při MN -50 mV, na rozdíl od I_{CaL} probíhá rychle a je pouze napěťově závislá (Catterall, 2000). Bylo prokázáno, že za určitých okolností je I_{CaT} schopen spustit uvolnění vápníku ze SR (Sipido et al., 1998), ale za fyziologických podmínek se na tomto procesu podílí pouze malou měrou a jeho vliv je překryt převažujícím účinkem I_{CaL} .

NCX je sarkolemální transportní mechanismus, který vyměňuje ionty sodíku a vápníku mezi extra- a intracelulárním prostředím. Byly identifikovány tři izoformy NCX, přičemž v srdci se vyskytuje izoforma NCX1 (Quednau et al., 1997). Transsarkolemální výměna iontů probíhá elektrogenně v poměru $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ (Hinata et al., 2002). V závislosti na aktuálním MN a koncentračním gradientu obou iontů může NCX pracovat ve dvou režimech - v normálním, kdy je vápník vypuzován z buňky a sodík teče do buňky, a v obráceném režimu, kdy vápník vstupuje do buňky a sodík je vypuzován z buňky ven. Pokud by tedy NCX pracoval v reverzním modu, mohl by se pravděpodobně podílet na CICR v srdeční buňce. Tato domněnka byla opakovaně prokázána tím, že byl spuštěn CICR jak v přítomnosti blokátorů I_{CaL} (Leblanc a Hume, 1990), tak i při pozitivním MN, kdy je I_{CaL} inaktivován (Levi et al., 1994). Bylo však zjištěno, že nárůst intracelulární koncentrace vápníku vlivem proudu NCX je ve srovnání s mohutným I_{CaL} méně výrazný a pomalejší. NCX tedy pravděpodobně přispívá k uvolňování vápníku ze SR, avšak postavení I_{CaL} je v tomto procesu dominantní (Sipido et al., 1997).

Za určitých specifických podmínek se na procesu uvolnění Ca^{2+} ze SR mohou podílet další mechanismy, jako je např. napětím aktivované uvolnění vápníku (Ferrier a Howlett, 2001), inozitol (1,4,5)-trifosfát (Perez et al., 1997), vápníkový proud citlivý k tetrodotoxinu (Chen-Izu et al., 2001) či tzv. „přesmyk vodivosti“ (slip-mode conductance), při kterém vstupuje vápník do buňky kanály rychlého sodíkového proudu (Santana et al., 1998). Možný příspěvek alternativních cest vtoku vápníku do kardiomyocytu je však kontroverzní a za hlavní spouštěč uvolnění vápníku ze SR v srdečním svaly je považován I_{CaL} (Eisner et al., 1998).

1.1.2. Sarkoplazmatické retikulum

Hlavní funkcí SR je skladovat vápenaté ionty, uvolňovat je do cytoplazmy a odčerpávat z cytoplazmy zpět do SR.

Ryanodinové receptory

Membrána SR je vybavena kanály uvolňujícími vápník (release channels), jejichž přítomnost je nezbytná pro normální průběh ECC. Svůj název dostaly podle rostlinného alkaloidu ryanodinu, který je schopen modulovat jejich vodivost (Lai a Meissner, 1989). Proto bývají tyto kanály nazývány ryanodinovými receptory (RyR).

Až dosud byly identifikovány tři izoformy RyR: izoforma RyR1 je charakterická pro kosterní sval, RyR2 pro myokard a izoforma RyR3 je všudypřítomná (MacLennan et al., 2002). RyR se skládá ze čtyř shodných podjednotek. Větší část receptoru je obrácena do cytoplazmy, menší část prochází membránou SR (Samso a Wagenknecht, 1998). Největší koncentrace RyR je na terminálních cisternách junkčního SR v blízkosti T-tubulů, kde je nevyšší denzita I_{CaL} (Scriven et al., 2000). Vzhledem k tomu, že vzdálenost mezi terminální cisternou a T-tubulem je asi 10 nm, jsou RyR v těsné blízkosti sarkolemy srdeční buňky (Lai a Meissner, 1989).

RyR jsou na membráně SR rozmístěny v pravidelných intervalech (až 100 RyR na 200 nm membrány). V závislosti na živočišném druhu připadá na každých 100 RyR od 10 do 25 kanálů I_{CaL} , což je dostatečný počet nutný pro aktivaci RyR. Hlavním podnětem pro otevření RyR je zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. Nejúčinnější aktivace RyR je zajištěna prostřednictvím vápníku tekoucího do buňky kanály I_{CaL} , pravděpodobně vzhledem ke vzájemnému geometrickému uspořádání RyR a I_{CaL} (Wier a Balke, 1999).

Vodivost kanálů RyR je rovněž ovlivněna množstvím Ca^{2+} uvnitř SR. Vzrůstající intrasarkoplazmatická koncentrace vápníku zvyšuje citlivost RyR k $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a tím i pravděpodobnost otevření RyR (Shannon et al., 2000, Lukyanenko et al., 1996). Naopak nízká koncentrace Ca^{2+} uvnitř SR brání proběhnutí CICR, a tím úplnému vyčerpání vápníku ze SR. Ryanodinové receptory SR jsou aktivovány mikromolárními koncentracemi $[\text{Ca}^{2+}]_i$, vyšší, tedy milimolárními koncentracemi $[\text{Ca}^{2+}]_i$, kanály inhibují (Meissner a Henderson, 1987). Kanály lze rovněž uvést do otevřeného stavu kofeinem (O'Neill a Eisner, 1990), ATP či cyklickou ADP-ribózou, blokáda je možná pomocí hořčičku (Meissner a Henderson, 1987), u izoformy RyR1 také dantrolenem (Zhao et al., 2001).

Kalsekvestrin

Vápenaté ionty jsou uvnitř SR navázány na bílkovinu kalsekvestrin, který je lokalizován zejména v terminálních cisternách SR (MacLennan a Wong, 1971). Kalsekvestrin má sice malou afinitu, ale zato velkou vazebnou kapacitu pro vápník; jedna molekula kalsekvestrinu může navázat 40-50 Ca^{2+} iontů (MacLennan et al., 2002). Pomocí kalsekvestrinu je vápník vázán uvnitř SR a díky tomu je zde asi 10 000krát vyšší koncentrace vápníku než v okolní cytoplazmě. Retikulum má tak schopnost během krátké doby uvolnit nebo kumulovat velké množství Ca^{2+} .

1.1.3. Odčerpání vápníku z cytoplazmy

Ca^{2+} -ATPáza sarkoplazmatického retikula (SERCA)

SERCA se nachází zejména na membráně longitudinálních tubulů SR. Hlavní funkcí SERCA je odčerpávat vápník z cytoplazmy do SR a vytvořit tak

podmínky nezbytné pro zahájení relaxace. V tkáních byly identifikovány tři typy SERCA, z nichž každý má několik izoform. Izoforma charakteristická pro srdeční sval se označuje jako SERCA2a (Tada a Toyofuku, 1996). Při rozštěpení jedné molekuly ATP přenesou pumpa do retikula 2 molekuly vápníku (MacLennan et al., 2002).

Podíl SERCA na odstraňování vápníku z cytoplazmy savčích kardiomyocytů je závislý na živočišném druhu. V srdci potkana je prostřednictvím SERCA odčerpáno až 92 % z celkového množství odstraněného vápníku, u ostatních živočišných druhů (králík, fretka, kočka, morče) je tento podíl nižší a činí asi 70-75% (Bers, 1997).

Činnost SERCA je nepřímo regulována pomocí fosfolambanu (PL). Jedná se o protein, který ovlivněním SERCA zasahuje významným způsobem do regulace srdeční kontraktility (Koss a Kranias, 1996). Nefosforylovaný PL snižuje afinitu SERCA k vápníku a tlumí tak její efektivitu. Inhibičnímu vlivu fosfolambanu na SERCA je naopak zabráněno jeho fosforylací (Simerman a Jones, 1998). Fosforylace PL je zajišťována například fosforylovanou cAMP-dependentní proteinkinázou A (Li et al., 2000) nebo Ca^{2+} /kalmodulin-dependentní proteinkinázou (Narayanan a Xu, 1997). Mezi látky stimulující činnost SERCA patří hormony štítné žlázy (Kiss et al., 1994) a inzulin (Algenstaedt et al., 1997). Aktivace SERCA tedy urychluje odčerpávání Ca^{2+} z cytoplazmy do SR, čímž se urychluje nástup relaxace a zvyšuje nálož vápníku uvnitř SR dostupného pro další ECC .

Sodíko-vápníkový výměník (NCX)

Činnost NCX v normálním režimu, kdy vypuzuje vápník z buňky, se rovněž podílí na zahájení procesu relaxace. U některých živočišných druhů (fretka, králík, kočka, morče, pes, lidský myokard) odstraňuje NCX během relaxace až jednu třetinu Ca^{2+} z cytoplazmy, v srdci laboratorního potkana a myši je jeho vliv na odčerpání vápníku zanedbatelný (Bers, 1997).

1.1.4. Kontraktilní aparát kardiomyocytu

Základní kontraktilní jednotkou kardiomyocytu je sarkomera. Jedná se o útvar ohraničený dvěma Z-liniemi. Sarkomera je tvořena tlustými a tenkými myofilamenty a regulačními proteiny.

Tenká myofilamenta obsahující bílkoviny aktin, tropomyozin a troponin, jsou ukotvena z jedné strany do Z-linií, z druhé strany se zanořují mezi tlustá myofilamenta. Základ tenkého myofilamenta tvoří dvojitá α -šroubovice fibrilárního aktinu, na němž jsou v pravidelných intervalech umístěna aktivní místa sloužící k interakci mezi aktinem a hlavou myozinu. Dlouhé molekuly tropomyozinu v klidovém stavu kryjí aktivní místa aktinu. Molekuly troponinu jsou umístěny v pravidelných intervalech podél tropomyozinové molekuly. Po navázání Ca^{2+} na vazebné místo troponinu dojde ke konformační změně molekuly troponinu, což způsobí následný pohyb tropomyozinu a odkrytí aktivních míst aktinu.

Základem tlustého filamenta je bílkovina myozin, která vytváří osovou strukturu vlákna a dvě hlavy. Hlava myozinu má ATP-ázovou aktivitu a obsahuje vazebná místa pro aktin (Brady, 1991).

Podstatou kontrakce je chemická reakce mezi tenkými a tlustými myofilamenty spojená s opakovanou tvorbou příčných můstků a pohybem hlavy myozinu, což vede k zasouváním tenkých mezi tlustá myofilamenta. Během tohoto procesu dochází k přibližování Z-linií, a tím i ke zkracování sarkomery a následně celé srdeční buňky. Nezbytnou podmínkou pro zahájení této reakce je dostatečné zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a přísun energie ve formě ATP. Síla kontrakce je závislá na vzájemném postavení aktinových a myozinových filament a je tedy ovlivněna počáteční délkou sarkomery (Frank-Starlingův zákon). Výsledná síla kontrakce stoupá se vzrůstající $[Ca^{2+}]_i$, jedná se o sigmoidální závislost. Tato pozitivní závislost je modulována různými mechanickými a neurohumorálními faktory (Bers, 2002).

1.2. Autonomní regulace srdeční činnosti

Spontánní činnost srdeční svaloviny je pod vlivem obou komponent periferní části autonomního nervového systému. Sympatikus vykazuje účinky kardioexcitační (pozitivně inotropní, chronotropní, dromotropní a bathmotropní), na rozdíl od parasympatiku, jehož účinky jsou kardioinhibiční. Obě části autonomního nervového systému pracují na principu zesíleného antagonismu (Levy, 1971). Eferentní část sympatické a parasympatické inervace má dvouneuronovou strukturu. Buněčná těla pregangliových sympatických neuronů se nacházejí v intermediolaterálních jádrech postranních rohů horních segmentů hrudní míchy (Th1 - Th5-6). Pregangliová vlákna vystupují z míchy předními míšními kořeny a cestou rami communicantes albi vstupují do paravertebrálních ganglií (Barr a Kiernan, 1988). Synapse mezi pregangliovými a postgangliovými neurony se nacházejí

v krčních a v horních hrudních gangliích (Levy a Martin, 1995). Postgangliová vlákna (nervi cardiaci) inervují pracovní svalovinu síní a komor.

Buněčná těla parasymptických pregangliových neuronů jsou uložena v nucleus dorsalis nervi vagi, event. v nucleus ambiguus prodloužené míchy (Levy a Martin, 1995). Vlákna těchto neuronů opouštějí prodlouženou míchu prostřednictvím bloudivých nervů, jejichž větve (rami cardiaci) se v hrudníku stávají součástí srdeční nervové pleteně. Pregangliová parasymptická vlákna se přepojují na postgangliové neurony v gangliích srdečního plexu v těsné blízkosti srdce a v intramurálních gangliích. Parasymptická inervace je v síních mnohem hustší než v komorách, kde slouží převážně k modulaci aktivity sympatiku a k inervaci koronárních cév (Löffelholz a Pappano, 1985).

Nervová vlákna terminální srdeční pleteně jsou v intervalech 5 - 15 μm charakteristicky zesílena do varikozit, které obsahují synaptické váčky (vezikuly). V místech varikozit bývá buněčná membrána ztluštělá a v její těsné blízkosti jsou váčky zhuštěny. Přenos informace z nervových vláken na kardiomyocyty je realizován chemicky, prostřednictvím přenašečů (mediátorů), které jsou uloženy v synaptických váčkách. Mediátory se uvolňují postupně při šíření akčních potenciálů po nervovém vlákně (uvolňování "en passant"; Burnstock, 1986; Löffelholz a Pappano, 1985) a vážou se na specifické receptory lokalizované v membránách srdečních buněk. Konečný efekt stimulace autonomních neuronů závisí na jejich vzruchové aktivitě, množství uvolněného mediátoru, hustotě specifických receptorů v postsynaptické membráně a jejich afinitě k příslušnému mediátoru, na účinku modulujících látek a mnoha dalších faktorech. Klasickým přenašečem vzruchu z postgangliových sympatických vláken na srdeční buňky je noradrenalin (NA)

a příslušná nervová vlákna jsou označována jako adrenergní. Acetylcholin je mediátorem postgangliových parasympatických vláken, která jsou označována jako cholinergní (Lundberg, 1996).

1.3. Kardiovaskulární aparát a diabetes mellitus

Kardiovaskulární komplikace DM zahrnují mikrovaskulární a makrovaskulární postižení, diabetickou kardiomyopatii a kardiovaskulární autonomní neuropatii jako součást diabetické autonomní neuropatie. Výše zmíněné patologické procesy většinou probíhají současně a navzájem se ovlivňují.

1.3.1. Diabetická angiopatie

Vaskulární komplikace diabetu se řadí mezi nejčastější příčiny smrti u diabetických pacientů. Diabetická mikroangiopatie postihuje kapiláry včetně přilehlých arteriol a venul a klinicky se manifestuje zejména jako diabetická retinopatie, nefropatie a neuropatie. Makroangiopatie postihují artérie a projevují se arteriosklerózou. Diabetes urychluje a zhoršuje průběh aterosklerotického poškození cév a zvyšuje zejména riziko vzniku mozkových příhod, postižení koronárních a periferních cév. Mikrovaskulární komplikace se častěji vyskytují u DM 1. typu a makrovaskulární spíše u typu druhého. Obě poruchy se navzájem ovlivňují, např. mikroangiopatické poškození vasa vasorum zhoršuje makroangiopatické poškození větších cév.

Mechanismus vzniku diabetických angiopatií není ještě zcela objasněn, ale pravděpodobně se jedná o kombinaci příčin, kdy se metabolická (hyperglykémie a dyslipidémie) a hemodynamická porucha projeví u geneticky

disponovaného jedince (Gugliucci, 2000). Strukturálním podkladem angiopatie je ztluštění bazální membrány cév, které vede následně k jejich okluzi a tkáňové hypoxii (Lorenzi, 1992). Závažnost změn většinou koreluje s hladinou glukózy v krvi; hyperglykémie urychluje a zhoršuje průběh vaskulárních komplikací. O příčinách vzniku diabetické angiopatie existuje celá řada hypotéz, mezi které patří aldozoreduktázová teorie, vliv pozdních produktů glykace, změna aktivity proteinkinázy C (PKC), oxidační stres, pseudohypoxie, alterace lipoproteinového metabolismu či aktivace cytokinů (Gugliucci, 2000), přičemž jako nejvíce pravděpodobné jsou uváděny první tři teorie.

Enzym aldozoreduktáza, jehož aktivita se zvyšuje v důsledku hyperglykémie, stimuluje v tkáních nezávislých na inzulínu přeměnu glukózy na sorbitol a jeho produkt fruktózu. Tyto látky poškozují integritu buněčné membrány, negativně ovlivňují buněčný metabolismus a další funkce buňky (Gabbay, 1973). Kromě toho se sorbitol a fruktóza kumulují v cévní stěně a jako látky osmoticky aktivní vážou vodu, což mechanicky poškozují tkáň. Kofaktorem přeměny glukózy na sorbitol je nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), který je mimo jiné nezbytný pro vznik oxidu dusnatého (NO) z argininu. Zvýšená transformace glukózy na sorbitol snižuje dostupnost NADPH pro další děje, klesá tvorba NO, což vede k vasokonstrikci a ke zhoršenému krevnímu zásobení tkání (Gabbay, 1973; Greene et al., 1988).

Změny aktivity PKC způsobené diabetem jsou závislé na typu tkáně. Útlum aktivity PKC v nervové tkáni byl popsán v souvislosti s diabetickou neuropatií (Greene et al., 1992). Naopak v hladké svalovině cévní stěny je aktivita PKC (zejména izoformy β) zvýšena pravděpodobně vlivem diacylglycerolu. Syntéza diacylglycerolu je stimulována hyperglykemií (Koya a

King, 1998). Stimulace PKC zvyšuje citlivost buněk hladké svaloviny stěny cév k vazokonstrikčním látkám, což vede k poklesu průtoku krve tkáněmi. (Gugliucci, 2000).

Je známo, že zvýšená nabídka glukózy vede k neenzymatickému připojení cukru k proteinům neboli glykaci. Tento jev byl u diabetických pacientů popsán v souvislosti se vznikem glykovaného hemoglobinu, který je používán jako spolehlivý marker průběhu onemocnění (Stevens, 1977). Kromě vzniku časných produktů glykace, mezi které patří například výše zmíněný glykovaný hemoglobin, iniciuje dlouhodobá hyperglykémie další fázi glykace, zahrnující sérii reakcí, jež vedou ke vzniku tzv. pozdních produktů glykace (advanced glycation end-products, AGE; Njoroge a Monnier, 1989). AGE se ukládají ve stěně cév, kde způsobují ztluštění bazální membrány, pokles elasticity pojivové tkáně a aktivaci komplementu s následným vznikem zánětlivé reakce. K tvorbě AGE dochází i u nediabetických pacientů a tyto produkty jsou zodpovědné za některé příznaky stárnutí tkání (hromadění pigmentu, pokles elasticity tkání aj.). Zvýšená produkce AGE u diabetiků tyto změny urychluje (Gugliucci, 2000). Glykaci a oxidaci podléhají rovněž tuky (zejm. LDL- lipoproteiny o nízké hustotě), jejich modifikované molekuly se pak ukládají v cévní stěně a dávají vznik aterosklerotickým plátům.

Vzhledem k tomu, že existuje úzká příčinná souvislost mezi hyperglykemií, dyslipidemií a rozvojem vaskulárních komplikací, je důležité u diabetických pacientů vhodným způsobem a včas regulovat glykémii a hladinu lipidů v krvi.

1.3.2. Diabetická kardiomyopatie

Existence diabetické kardiomyopatie byla stanovena na základě zjištění, že myokardiální dysfunkci lze diagnostikovat i u pacientů-diabetiků, kteří nemají žádné známky ischemické choroby srdeční, poškození chlopenního aparátu nebo hypertenzi (Paillole et al., 1989). Mechanismus vzniku diabetické kardiomyopatie není zcela objasněn. Až dosud bylo zjištěno několik potenciálně patogenetických faktorů, které se při vzniku a rozvoji kardiomyopatie uplatňují. Mezi nejdůležitější vyvolávající faktory se řadí metabolické poruchy (deplece glukózového transportéru GLUT-4, vzestup hladiny volných mastných kyselin, nedostatek karnitinu, změny vápníkového hospodářství), myokardiální fibróza (spojená se vzestupem hladiny angiotenzinu II, IGF-I a zánětlivých cytokinů), poškození malých cév (mikroangiopatie se zhoršením koronárního průtoku a endoteliální dysfunkcí), autonomní neuropatie, doprovázená denervací a změnami koncentrace katecholaminů v srdci, a inzulinová rezistence (Fang et al., 2004). Produkce ATP v diabetickém kardiomyocytu je téměř výhradně závislá na utilizaci volných mastných kyselin, což podstatně zvyšuje nároky srdeční tkáně na dodávku kyslíku a vede ke kumulaci toxických meziproduktů metabolismu volných mastných kyselin a k inhibici metabolismu glukózy (Lopaschuk, 2002). Toxicita oxidačních produktů metabolismu volných mastných kyselin na srdce je potencována hyperglykemií (Young et al., 2002).

Diabetická kardiomyopatie je charakterizovaná v časně fázi diastolickou a v pozdní fázi systolickou dysfunkcí (Mahgoub a Abd-Alfattah, 1998), hypertrofií srdečních buněk (Gargiulo et al., 1998) a v konečné fázi i srdečním selháním (Jarret, 1989). Pro diastolickou dysfunkci srdeční komory je

charakteristické prodloužení izovolumické relaxace, zhoršení časné fáze plnění komor a zvýšení plnění síní (Schannwell et al., 2002). Tento stav vzniká v důsledku myokardiální fibrózy, která je pravděpodobně způsobena kumulací AGE v srdeční tkáni (Bauters et al., 2003). AGE se mimo jiné rovněž podílejí na narušení kalciového metabolismu srdečních buněk (Ziegelhoffer et al., 1997). Při diabetické kardiomyopatii dochází k intracelulární retenci vápníku doprovázené vzestupem $[Na^+]_i$ (Dhalla et al., 1985). Některé experimenty prováděné na transgenních myších prokázaly, že se na komorové dysfunkci může také podílet zvýšená aktivita PKC- β , která vede k hypertrofii levé komory, nekróze srdečních buněk a multifokální fibróze srdeční tkáně (Wakasaki et al., 1997). Jak již bylo zmíněné dříve, jednou z příčin zvýšené aktivity PKC- β může být hyperglykémie (Koya a King, 1998).

1.3.3. Kardiovaskulární autonomní neuropatie

Mezi poměrně pozdě diagnostikované a málo prozkoumané komplikace diabetu patří diabetická autonomní neuropatie (DAN), která postihuje více než 50% diabetiků. Postižení autonomní inervace kardiovaskulárního aparátu vede k rozvoji kardiovaskulární autonomní neuropatie (KAN). KAN postihuje aferentní i eferentní složku autonomní inervace a klinicky se manifestuje tachykardií (Ziegler, 1994), ortostatickou hypotenzí (Low et al., 1975), asymptomatickou ischemií myokardu (Marchant et al., 1993) a intolerancí fyzické zátěže (Roy et al., 1989). Přítomnost KAN zvyšuje riziko náhlé srdeční smrti, ischemické choroby srdeční či chronického srdečního selhání (Gerritsen et al., 2001).

Na vzniku KAN se podílí metabolické poškození nervových vláken, autoimunitní vlivy, nedostatek neurohumorálních růstových faktorů a poruchy cévního zásobení nervů vznikající v důsledku diabetické mikroangiopatie (Vinik, 1999). Metabolické poškození nervových vláken je způsobeno zejména zvýšenou přeměnou glukózy na sorbitol či na jeho produkt fruktózu. K destruuujícímu účinku sorbitolu a fruktózy v nervových vláknech přispívá již výše zmíněný osmotický účinek. NADPH, který se účastní přeměny glukózy na sorbitol, má přímý toxický účinek na nervovou tkáň. Kromě toho bylo zjištěno, že hyperglykémie snižuje vychytávání inozitolu, který je důležitý pro tvorbu myelinových pochev a neuronálních membrán. Důsledkem jsou změny membránového napětí a porucha elektrogenese nervových buněk (Greene et al., 1988). Na vzniku nervové hypoxie se kromě mikroangiopatického poškození vasa nervorum podílí vasokonstrikce vznikající v důsledku aktivace PKC (Veves a King, 2001). Na druhou stranu, aktivita PKC v nervových buňkách je vlivem hyperglykémie inhibována, pravděpodobně v důsledku nedostatku inozitolu, což vede ke snížení aktivity $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázy}$, poklesu vodivosti nervů a k degenerativním změnám axonů a Schwannových buněk (Greene et al., 1992).

1.3.4. Postižení myokardu laboratorního potkana v důsledku streptozotocinového diabetu

DM 1. typu experimentálně navozený podáním streptozotocinu (STZ) laboratornímu potkanovi snižuje sílu kontrakce a to jak *in vivo* (Dowell et al., 1986) tak u izolovaných preparátů, kdy se pokles kontrakce projevuje výrazným snížením srdečního výdeje (Penpargkul et al., 1980; Vadlamudi et

al., 1982). U experimentů prováděných na izolovaných kardiomyocytech STZ potkanů byla popsána redukce zkrácení a prodloužený čas zkrácení srdečních buněk (Okoyama et al., 1994; Yu et al. 1994). Při sledování síly kontrakce papilárních svalů už výsledky tak jednoznačné nejsou. Někteří autoři prokázali negativně inotropní účinek dlouhodobého STZ diabetu (Cameron et al., 1989), na druhou stranu byly popsány experimenty, ve kterých není žádný rozdíl v síle kontrakce papilárního svalu mezi kontrolními a diabetickými potkany (Fein et al., 1980; Takeda et al., 1988).

Již za 4 týdny po indukci diabetu dochází v pracovních buňkách komorové svaloviny k závažným změnám v hospodaření s vápníkem. Ty zahrnují pokles aktivity SERCA (Ganguly et al., 1983), který je pravděpodobně způsoben snížením afinity SERCA k vápníku (Kim et al., 2001), poklesem koncentrace (Netticadan et al. 2001) a exprese mRNA pro SERCA (Kim et al., 2001). Navzdory tomu existují práce, ve kterých pokles exprese mRNA pro SERCA v srdci diabetického potkana prokázán nebyl (Zarain-Herzberg et al., 1994). Exprese mRNA pro PL i koncentrace této bílkoviny byla v srdci diabetického potkana zvýšena, což pravděpodobně přispívá ke snížené funkci SERCA u diabetických potkanů. V úrovni fosforylace PL nebyl zaznamenán rozdíl mezi zdravými a diabetickými zvířaty (Kim et al., 2001). Diabetické poškození SR bylo doprovázeno i sníženou afinitou ryanodinových receptorů SR k vápníku (Yu et al., 1994), aniž by docházelo k redukci jejich počtu (Bidasee et al., 2001). Proud nesený sarkolemálním NCX je v srdci diabetických potkanů rovněž snížen ve srovnání s kontrolními zvířaty (Makino et al., 1987; Chattou et al., 1999). Redukce proudu NCX byla vysvětlena poklesem koncentrace NCX a exprese mRNA pro NCX (Hattori et al., 2000).

Ke změnám vápníkového hospodářství v diabetickém srdci přispívá také snížení aktivity sarkolemální Ca^{2+} -ATPázy (Heyliger et al., 1987). Poškození transportních mechanismů odčerpávajících vápník z cytoplazmy vede k intracelulárnímu hromadění Ca^{2+} , což může přispívat k dalšímu rozvoji diabetické kardiomyopatie (Makino et al., 1987).

Změny vyvolané STZ diabetem lze pozorovat i na úrovni kontraktálního aparátu, kde dochází ke zpomalení rychlosti tvorby příčných můstků (Ishikawa et al., 1999). Při dlouhodobém trvání STZ diabetu je V_1 izoforma myozinu nahrazována izoformou V_3 s nižší ATPázovou aktivitu (Malhotra a Sanghi, 1997). Snížení aktivity myozinové ATPázy bylo možné potlačit podáním hormonů štítné žlázy, z čehož vyplývá, že změna aktivity myozinové ATPázy nemusí být způsobena nedostatkem inzulínu, ale může být důsledkem hypofunkce štítné žlázy, která bývá doprovodným jevem STZ diabetu (Dillmann, 1982).

STZ diabetes rovněž ovlivňuje elektrické vlastnosti srdečních buněk. Dochází k redukci proudu I_{CaL} (Chattou et al., 1999; Nobe et al., 1990). V experimentech s blokátorem I_{CaL} nitrendipinem byl zjištěn snížený počet vazebných míst pro tento blokátor (Lee et al., 1992). Dále byla prokázána redukce repolarizujícího draslíkového proudu v srdečních síních a komorách diabetických potkanů, která vedla k prodloužení akčního napětí (Jourdon a Feuvray, 1993). V diabetických preparátech bylo rovněž prokázáno snížení aktivity Na^+ - K^+ -ATPázy (Ziegelhöffer et al., 2003) a Na^+ - H^+ -výměníku (Lagadig-Grossmann et al., 1988).

Aplikace STZ vedla také k degenerativním změnám sympatických nervů laboratorního potkana, které byly pozorovány již za 24 hodin po podání STZ

(Monckton a Pehowich, 1980). Rozvoj autonomní neuropatie u STZ diabetu byl rovněž prokázán řadou funkčních studií (Kimball et al., 1992). Byla popsána klidová bradykardie, snížené cirkadiánní kolísání srdeční frekvence a pokles tonu sympatické a parasympatické inervace za klidových podmínek (Hicks et al., 1998).

Multifaktoriální příčiny rozvoje diabetického poškození srdce dokládají experimenty, při kterých byly různými intervencemi potlačeny či zmírněny projevy srdečního poškození. U STZ potkanů bylo prokázáno, že adrenomedulin normalizuje hodnoty srdečního výdeje (Dobrzynski et al., 2002). Blokátor angiotenzin konvertujícího enzymu cilazapril zlepšuje koronární průtok a sílu stahu levé srdeční komory (Udayachalerm et al., 2001), Poklesu síly srdeční kontrakce lze rovněž zabránit bosentanem, což je blokátor endotelinového receptoru (Verma et al., 2001). L-NAME a blokátor I_{CaL} nifedipin normalizují hodnoty srdeční frekvence (Smith et al., 1997; Shah et al., 1995). Další blokátor I_{CaL} verapamil zamezuje změnám na úrovni kontraktálního aparátu (Afzal et al., 1989). Kromě toho bylo zjištěno, že intervence upravující plazmatickou koncentraci lipidů u STZ potkanů, například podávání cholinu a methioninu (Heyliger et al., 1986), karnitinu (Rodrigues et al., 1990) a probukolu (Tada et al., 1992) zpomalují rozvoj diabetické kardiomyopatie.

1.4. Kardiovaskulární aparát a inzulin

Příčinou DM 1. typu je absolutní nedostatek inzulinu (inzulinopenie). Inzulin, hormon produkovaný β -buňkami Langerhansových ostrůvků

endokrinní části pankreatu, významným způsobem zasahuje do metabolismu cukrů, tuků a lipidů. Kromě toho má inzulin i řadu méně známých nemetabolických účinků včetně vlivu na kardiovaskulární aparát. Z časového hlediska lze účinky inzulinu rozdělit na bezprostřední, kdy inzulin moduluje membránovou permeabilitu, transmembránový přenos či fosforylaci některých enzymů, a na dlouhodobé účinky ovlivňující proteosyntézu buňky.

Bylo zjištěno, že inzulin ovlivňuje permeabilitu membrány vzrušivých tkání a způsobuje hyperpolarizaci. Vzestup membránového napětí je vysvětlován redukcí permeability membrány pro sodík (Zierler a Wu, 1988) a zvýšenou aktivitou $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázy}$, kterou popsali LaManna a Ferrier (1981). Naproti tomu Gupta et al. (1986) stimulaci $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázy}$ inzulinem v srdečních buňkách neprokázali. Inzulin rovněž ovlivňuje krevní oběh – jeho podání vede k vazodilataci a zvýšení průtoku v kosterním svalu (Yki-Järvinen a Utriainen, 1998), při stavu hyperglykémie a hypetriglyceridémie zvyšuje plazmatickou koncentraci blokátoru plazminogenového aktivátoru a působí tak antifibrinolyticky (Calles-Ascandon et al., 1998), u inzulinorezistentních pacientů vykazoval i proagregační efekt (Baldi et al., 1996). Stimulací sympatické části autonomního nervového systému zrychluje inzulin srdeční frekvenci, zvyšuje hodnotu systolického tlaku a zvyšuje hladinu noradrenalinu v plazmě (Rowe et al., 1981).

Inzulin také významným způsobem zasahuje do vápníkového hospodářství kardiomyocytů. Bylo popsáno, že v srdci laboratorního potkana stimuluje I_{CaL} . Tento účinek je závislý na dávce inzulinu a je pravděpodobně zprostředkován cestou proteinkinázy A (Aulbach et al., 1999). Podobný vliv inzulinu na proteinkinázu A byl nalezen i v lidských kardiomyocytech (Maier et

al., 1999). Na druhou stranu, v srdci diabetických pacientů nebyl stimulační vliv inzulínu na vápníkový proud L-typu prokázán (Maier et al., 2001).

V 80. letech minulého století bylo zjištěno, že inzulín stimuluje proud nesený NCX (Kato a Kako, 1988; Gupta et al., 1986). Později bylo prokázáno, že efekt inzulínu na NCX je inhibován v přítomnosti blokátoru PKC staurosporinu a existuje tedy možná spojitost mezi účinkem inzulínu na NCX a signální cestou PKC (Ballard et al., 1994).

Poměrně málo dostupných informací je známo o přímém účinku inzulínu na SERCA. Studie Gupty et al. (1989) prokázaly stimulační účinek inzulínu na SERCA2 v kardiomyocytech prasete. Později byla popsána možná interakce mezi substrátem inzulínového receptoru a dvou izoform vápníkové pumpy (SERCA1, SERCA2), která je ovlivňována inzulínem stimulovanou tyrozinkinázovou cestou (Algenstaedt et al., 1997).

Účinek inzulínu na sílu srdeční kontrakce vykazuje mezidruhové rozdíly. Pozitivně inotropní účinek inzulínu byl zaznamenán v srdci morčete (von Arnim a Bolte, 1980), králíka (Snow, 1976), kočky a kotěte (Lee a Downing, 1976). V srdci prasete byl popsán bifázický efekt inzulínu; iniciální negativně inotropní účinek byl následován zesílením srdeční kontrakce (Lee a Downing, 1976). Složitost inotropního působení inzulínu dokumentují výsledky experimentů prováděných na myokardu veverky, kde inzulín vykazoval negativně inotropní účinek u bdělých zvířat. Výjimku tvořila tzv. letní skupina zvířat, u které nižší dávka inzulínu vedla k zesílení kontrakce, zatímco vyšší dávka inzulínu vyvolala negativně inotropní efekt. U hibernujících zvířat nebyla síla kontrakce inzulínem významně ovlivněna (Nakipova et al., 2000). Informace o účinku inzulínu na sílu srdeční kontrakce u laboratorního potkana jsou poněkud

nejednotné. Literární zdroje informují o pozitivně inotropním (Sethi et al., 1991), negativně inotropním (Farah a Alousi, 1981), popřípadě žádném účinku inzulinu na sílu srdeční kontrakce (Ren et al., 1999; Schmidt a Koch, 2002).

1.5. Diabetické srdce a inzulin

STZ zvířata, která jsou dlouhodobě léčena inzulinem, vykazují normalizaci hodnot srdeční frekvence a krevního tlaku (Pfaffman, 1980). Pravidelné podávání inzulinu diabetickým zvířatům rovněž zabránilo změnám síly kontrakce papilárního svalu, poklesu aktivity myozinové ATPázy a náhradě V_1 izoformy myozinu za izoformu V_3 (Fein et al., 1984). Inzulinová léčba vedla nejprve k normalizaci biochemických parametrů (normoglykémie), s určitým časovým odstupem došlo i k úpravě změn vznikajících působením diabetu na srdce. Úroveň úpravy funkčních vlastností srdce je přímo úměrná době podávání inzulinu (Fein et al., 1981).

Akutní aplikace inzulinu na levokomorový papilární sval potkanů s krátkodobým diabetem (5-7 dní) vedla k vzestupu síly kontrakce, avšak trvání kontrakce ani relaxace nebylo inzulinem ovlivněno. V izolovaných kardiomyocytech diabetických zvířat inzulin zvyšoval výskyt vápníkových přechodů (Ren et al., 1999).

Včasná a správně vedená léčba diabetiků inzulinem snižuje rychlost rozvoje kardiovaskulárních komplikací (Srikanthan a Hsueh, 2004). Dosud nezodpovězenou otázkou však zůstává, zda diabetičtí pacienti více profitují z metabolických účinků inzulinu či z přímého účinku inzulinu na srdce nebo se na léčebném procesu podílí kombinace obou faktorů.

1.6. Cíle disertace

Z výše uvedeného přehledu je zřejmé, že interakce diabetu a inzulínu v srdečním svalu jsou nesmírně komplexní a dosud nejasné. Dlouhodobé podávání inzulínu zabrání rozvoji některých změn, které se objevují v důsledku působení diabetu na srdce a jeho inervaci. Nicméně u většiny studií experimentálního diabetu je aplikace inzulínu zahájena bezprostředně po indukci diabetu, což nekorresponduje s klinickými podmínkami, kdy je u diabetiků léčba zahájena s různě dlouhým časovým odstupem po nástupu onemocnění. Informace o přímém působení inzulínu na srdce nekompenzovaných diabetických subjektů jsou poměrně sporé a v oblasti srdeční kontraktility protichůdné. Tuto otázku jsme se proto rozhodli prozkoumat podrobněji. V rámci disertační práce jsme se zabývali akutním jednorázovým účinkem inzulínu na kontraktilitu izolovaného papilárního svalu intaktního potkana a potkana s dlouhodobým (16 týdnů) nekompenzovaným diabetem. Cílem bylo prozkoumat, zda inzulín vykazuje přímé účinky na srdeční kontraktilitu bez současné hyperglykémie a zda jsou tyto účinky v diabetickém srdci změněny.

Druhé téma řešené v předložené disertační se vztahuje k srdeční diabetické neuropatii (viz výše). Informace o autonomní regulaci při diabetu jsou dosud omezené a data mapující vliv dlouhodobého diabetu na sympatickou inervaci srdečního svalu nejsou jednotná. Změna autonomní regulace diabetických jedinců může být podmíněna změnami v uvolňování mediátorů nebo změnou buněčnou odpovědí (alterace nitro-buněčných signálních kaskád). V rámci disertační práce jsme se zaměřili na první možnost, tedy jakým způsobem nekompenzovaný diabetes ovlivňuje srdeční

metabolismus jednoho z hlavních autonomních mediátorů – noradrenalinu, včetně sledování jeho tkáňové koncentrace, uvolňování a zpětného vychytávání.

2. METODY

2.1. Zvířata

K pokusům jsme použili dospělé laboratorní potkany kmene Wistar z konvenčního chovu firmy VELAZ (Praha, ČR). Počet laboratorních potkanů v jedné kleci byl maximálně pět. Zvířata měla volný přístup k potravě a vodě, pokud nebylo v rámci experimentu nutné provádět odběry nalačno. Do pokusu byla zvířata zařazena nejdříve po dvoutýdenní adaptaci. Všechny experimenty na zvířatech byly prováděny v souladu s Evropskou směrnicí pro ochranu obratlovců pro experimentální a další vědecké účely (European Directive for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, 86/609/EU) a byly schváleny Odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Obě studie prezentované v této disertační práci probíhaly současně. Laboratorní zvířata jsme rozdělili dle pohlaví, pro experimenty zabývající se kontraktilitou jsme používali samce, pokusy studující autonomní regulaci byly prováděny na samicích laboratorního potkana. V budoucnu budou pokusy prováděny na zvířatech opačného pohlaví, abychom mohli zohlednit i případné pohlavní rozdíly.

2.2. Experimentální model diabetu

2.2.1. Indukce streptozotocinového diabetu

K vyvolání diabetu jsme používali STZ (Sigma-Aldrich, USA). STZ byl rozpuštěn v citrátovém pufru (pH 4,5) a podán jednorázově do ocasní žíly laboratorního potkana v dávce 65 mg/kg (Junod et al., 1967; Stauffacher et al., 1970; Ganda et al., 1976). Kontrolním zvířatům byl aplikován citrátový pufr v adekvátním objemu.

2.2.2. Ověření diabetického modelu

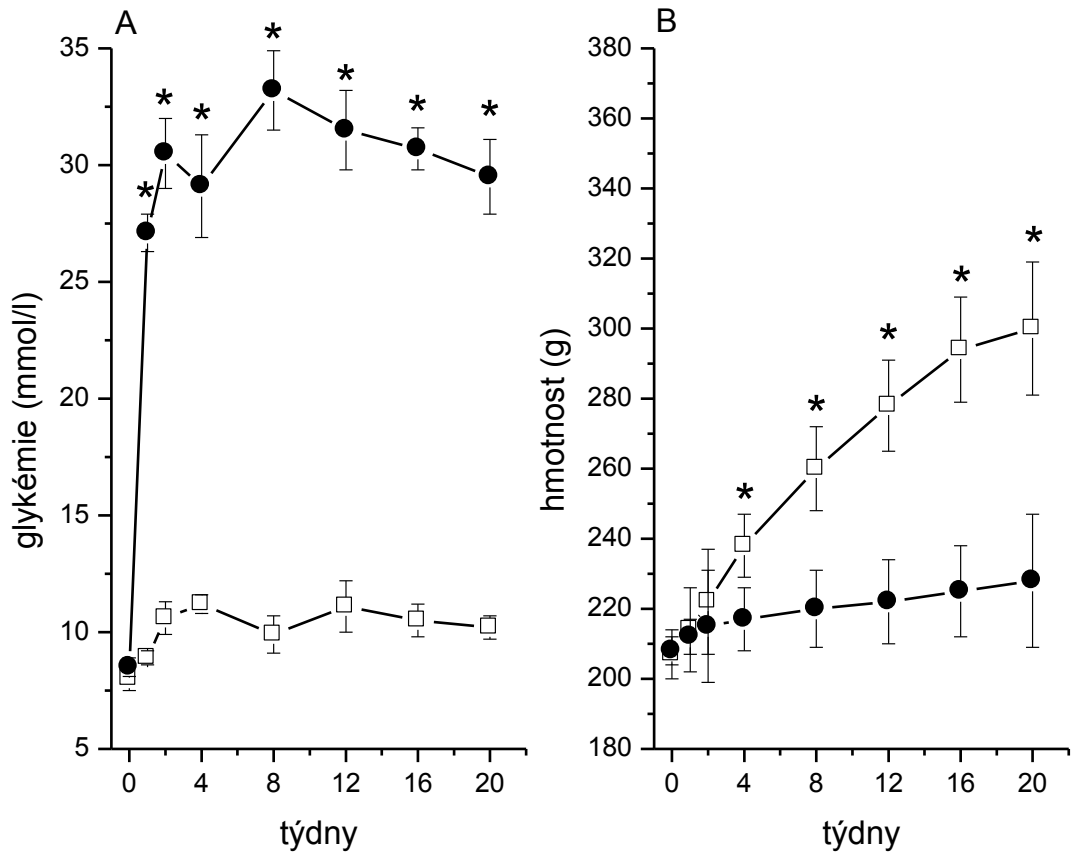
U experimentálních zvířat jsme pravidelně sledovali hladinu glukózy v krvi a tělesnou hmotnost. Dále jsme měřili hladinu glukózy v moči, plazmatickou koncentraci inzulínu, koncentraci inzulínu v pankreatu, prováděli jsme glukózový toleranční test a histologické vyšetření pankreatické tkáně.

Glykémie

Glykémie v krvi byla měřena vždy před aplikací STZ (event. citrátového pufru), 48 hodin po aplikaci STZ (event. citrátového pufru) a dále v týdenních intervalech až do 20. týdne, u vybraných pokusů každý měsíc až do jednoho roku po prvním podání STZ (event. citrátového pufru). Krev byla odebírána pomocí skleněných heparinizovaných kapilár z retrobulbárního plexu. Před odběrem byla zvířata uvedena do lehké éterové narkózy. Odebraná krev byla vypuštěna do zkumavek s odparkem K_2EDTA (draselná sůl etylendiaminotetraoctové kyseliny). Ke stanovení glykémie byl použita enzymatická metoda (Bio-La-Test, Lachema, Brno, Česká republika), při níž je glukóza oxidována kyslíkem za katalýzy glukózooxidázou na peroxid vodíku a glukonát. Vzniklý peroxid vodíku byl stanoven oxidační kopulací se substituovaným fenolem a 4-aminofenazonem za katalýzy peroxidázou. Absorbance vzniklého vzorku byla stanovována na spektrofotometru (Spekol, NDR) proti slepému vzorku při vlnové délce 492 nm a porovnána s hodnotou standardu.

Těsně před usmrcením zvířete jsme měřili glykémii osobním glukometrem Accutrend[®] GC (Roche Diagnostics, Švýcarsko) pomocí

diagnostických proužků. Krev byla odebrána z retrobulbárního plexu do skleněných heparinizovaných kapilár.



Obr. 2.1. Hodnota glykémie (A) a tělesné hmotnosti (B) u kontrolních a diabetických potkanů.

Prázdné čtverce: kontrolní potkani (n=20), jednorázová aplikace citrátového pufru.
 Plné kroužky: diabetičtí potkani (n=25) – jednorázová aplikace STZ v citrátovém pufru. * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat, $p < 0,05$.

Jednorázová aplikace STZ do ocasní žíly dospělého laboratorního potkana (stáří 60 dnů) vedla k významnému vzestupu hladiny glukózy v krvi.

Glykémie u STZ zvířat byla zvýšena již 24 hodin po injekci STZ, a to na hodnoty vyšší než 20 mmol/l. Tato výrazná hyperglykémie se u STZ zvířat udržela po celou dobu pokusu (obr. 2.1.A). Pokud u STZ potkanů dva dny po aplikaci STZ nedosahovala glykémie hodnoty 18 mmol/l, byla zvířata z pokusu vyřazena. U kontrolních potkanů, kterým byl aplikován pouze citrátový pufr, nedošlo k vzestupu glykémie nad 12 mmol/l po celou dobu experimentu (obr. 2.1.A).

Tělesná hmotnost

Ve stejných časových intervalech jako koncentraci glukózy v krvi jsme sledovali hmotnost zvířat.

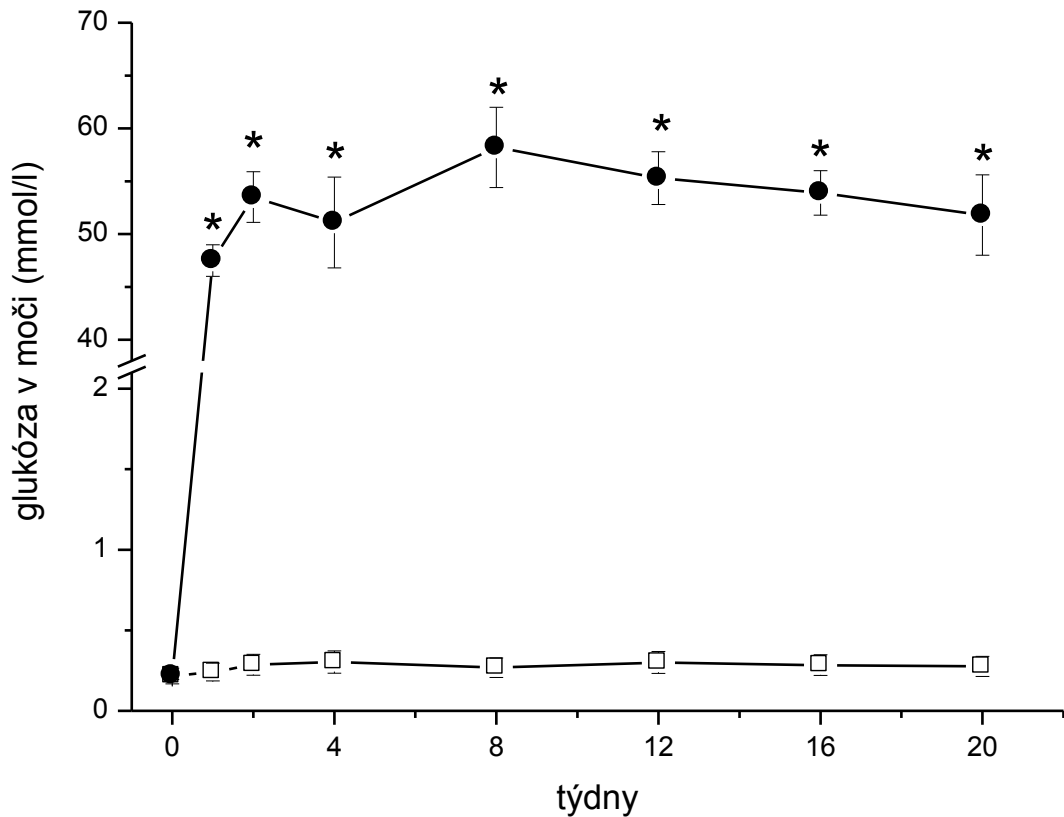
Hmotnost kontrolních potkanů progresivně rostla po celou dobu experimentu (obr. 2.1.B) z výchozí hodnoty 207 ± 7 g (stáří 60 dnů) až na 300 ± 19 g (stáří 200 dnů), zatímco u STZ potkanů tělesná hmotnost stagnovala a nebyla statisticky významně odlišná na začátku a na konci pokusu (obr. 2.1.B) – výchozí hodnota 208 ± 4 g (stáří 60 dnů) a 228 ± 19 g (stáří 200 dnů).

Glykosurie

Pro stanovení koncentrace glukózy v moči byla zvířata umístěna do metabolických klecí a moč byla sbírána do zkumavek po dobu tří hodin. Získaný vzorek moči byl zředěn destilovanou vodou v poměru 1:10 a dále zpracován stejným způsobem jako vzorek krve pomocí Bio-La-Testu.

Při měření glykosurie jsme u nelačných kontrolních zvířat zaznamenali pouze stopové množství glukózy v moči před i po aplikaci citrátového pufru (obr. 2.2).

U nelačných diabetických zvířat se hodnota glukózy v moči výrazně zvýšila již během prvního týdne po aplikaci STZ a po celou dobu experimentu se udržovala na hodnotách vyšších než 45 mmol/l (obr. 2.2).



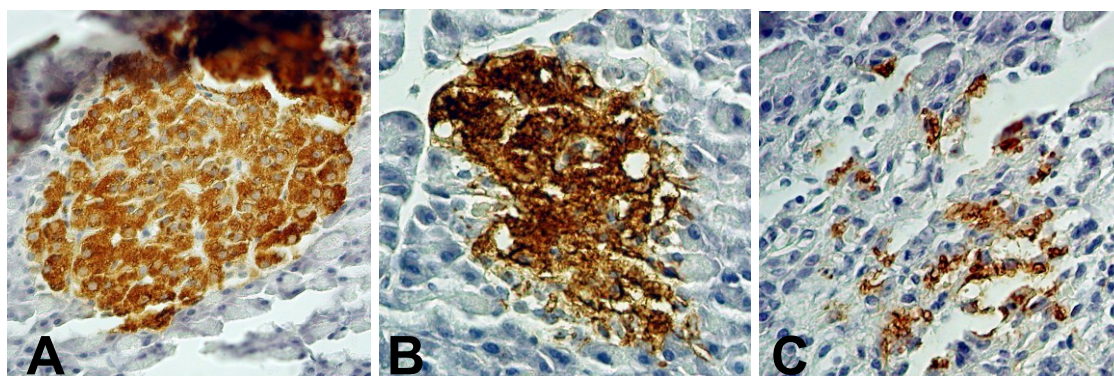
Obr. 2.2. Hodnota koncentrace glukózy v moči u kontrolních a diabetických laboratorních potkanů.

Prázdné čtverce: kontrolní potkani (n=20), jednorázová aplikace citrátového pufru.
Plné kroužky: diabetičtí potkani (n=25) – jednorázová aplikace STZ v citrátovém pufru. * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat, $p < 0,05$.

Imunohistochemie pankreatu

Slinivka břišní byla vyňata bezprostředně po usmrcení zvířete a fixována 4% formaldehydem. Vzorek tkáně byl vložen do parafinu a nakrájen

na řezy o tloušťce 5 μm . Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována roztokem peroxidu vodíku (1 díl) a metanolu (50 dílů). Řezy byly inkubovány s primární polyklonální morčecí protilátkou (1:150; Dako, CA, USA) po dobu dvanácti hodin při teplotě 4°C. Dále jsme použili Novostain Super ABC Universal Kit (Novocastra Laboratories Ltd., VB) a aplikovali jsme sekundární protilátku (45 min, 37°C) a avidin-biotin peroxidázový komplex (45 min, 37°C). Nakonec byla tkáň obarvena Gillovým hematoxylinem (30 s; Bio-Optica, Itálie).



Obr. 2.3. Histologické snímky Langerhansových ostrůvků pankreatu kontrolních potkanů (A) a diabetických potkanů za 24 hodin (B) a 48 hodin (C) po aplikaci STZ.

Endokrinní část pankreatů kontrolních potkanů obsahovala hojné množství ostrůvků pravidelné architektiky s vysokou imunoreaktivitou na inzulin (A). Jeden den po aplikaci STZ došlo k úbytku ostrůvků a ke snížení pozitivitu na inzulin (B). Po 48 hodinách působení STZ byl vyjádřen významný úbytek ostrůvků a buněk tvořících inzulin (C).

Histologický nález pankreatické tkáně STZ potkanů korespondoval s rostoucí glykemií, kdy 24 hodin po aplikaci STZ měla zvířata glykémii $20,2 \pm 1,2$ mmol/l (n=6) a ve vzorcích pankreatické tkáně byl menší počet Langerhansových ostrůvků s nepravidelnou architektikou, které vykazovaly sníženou imunoreaktivitu na inzulin (obr. 2.3.B). Po 48 hodinách měli STZ

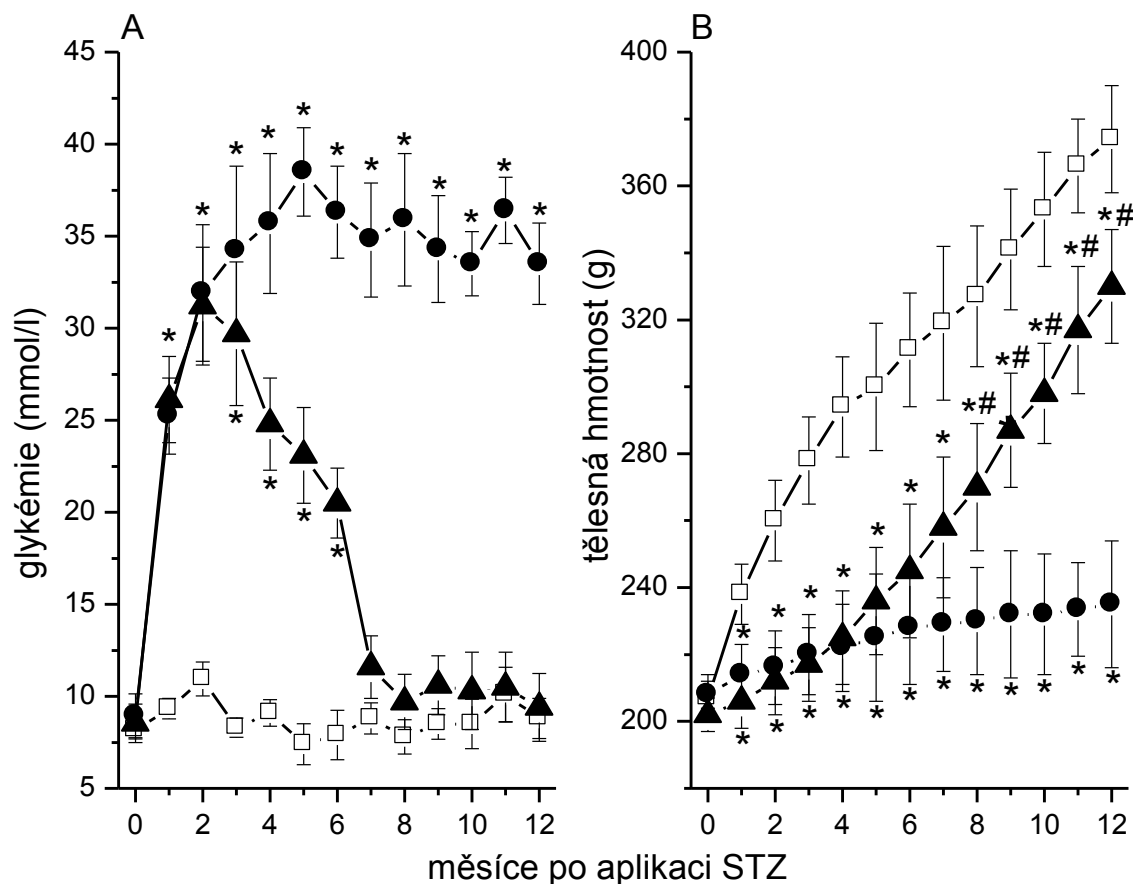
potkani (n=5) glykémii $23,1 \pm 1,1$ mmol/l, endokrinní část jejich pankreatů obsahovala ostrůvky nepravidelné stavby pouze ojediněle a buňky ostrůvků vykazovaly slabou až nulovou pozitivitu na inzulin (obr. 2.3.C).

2.2.3. Dlouhodobé sledování diabetických potkanů

Během prvních pěti měsíců po aplikaci STZ jsme u laboratorních potkanů nacházeli charakteristické známky DM 1. typu. Vzhledem k tomu, že jsme hodlali studovat srdeční tkáň zvířat s chronickým diabetem, zajímalo nás, zda jsou dosažené výsledky trvalé a zda budou zvířata vykazovat známky diabetu dlouhodobě, tj. za jeden rok po indukci diabetu. Protože jsme v žádném ze sledovaných parametrů nenalezli významné mezipohlavní rozdíly, použili jsme zvířata obou pohlaví (n=200). Téměř 25% potkanů uhynulo před dokončením experimentu. U zbývajících zvířat (n=152) jsme pravidelně každý měsíc stanovovali koncentraci glukózy v krvi a na základě hodnot glykémie jsme zvířata rozdělili do dvou skupin. V první skupině označené STZa (n=92) byla zvířata, jejichž glykémie neklesla pod 18 mmol/l ve sledovaném období 12 měsíců. Do druhé skupiny (STZb; n=60) byla zařazena zvířata, u nichž byla glykémie v prvních šesti měsících po indukci diabetu vyšší než 18 mmol/l, avšak v druhém půlroce nepřesáhla hodnotu 13 mmol/l. Ostatní zvířata byla z experimentu vyřazena. Hodnoty glykemií v jednotlivých měsících pokusu jsou uvedeny na obrázku 2.4.A.

Tělesná hmotnost všech STZ zvířat se v prvních šesti měsících pokusu nezměnila, na rozdíl od kontrolních potkanů, jejichž hmotnost progresivně rostla. Ani ve druhém půlroce se hmotnost potkanů STZa neměnila, zatímco u

skupiny zvířat STZb jsme registrovali pravidelné přírůstky hmotnosti. Vývoj hmotnosti potkanů dokumentuje obrázek 2.4.B.



Obr. 2.4. Hodnoty glykémie (A) a tělesné hmotnosti (B) u laboratorního potkana v průběhu jednoho roku.

Prázdné čtverce: kontrolní potkani (n=40), jednorázová aplikace citrátového pufru.

Plné kroužky: STZa potkani (n=92) – jednorázová aplikace STZ v citrátovém pufru,

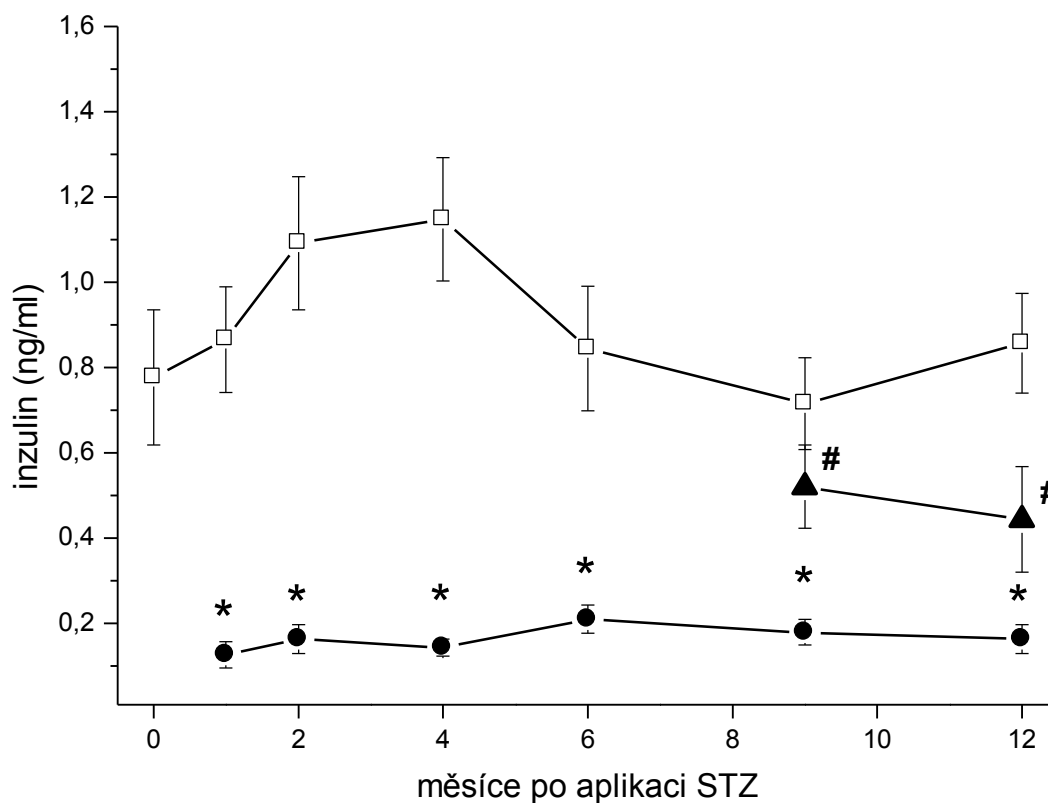
glykémie >18 mmol/l po celou dobu experimentu. Plné trojúhelníky: STZb potkani

(n=60) - jednorázová aplikace STZ v citrátovém pufru, glykémie >18 mmol/l v prvním

*půlroce pokusu a <13 mmol/l v druhém půlroce pokusu. * statisticky významný rozdíl*

ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat, # statisticky významný

rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u zvířat skupiny STZa, p<0,05.



Obr. 2.5. Koncentrace inzulínu v plazmě u laboratorního potkana v průběhu jednoho roku.

Prázdné čtverce: kontrolní potkani (n=40), jednorázová aplikace citrátového pufru. Plné kroužky: STZa potkani (n=92) – jednorázová aplikace STZ v citrátovém pufru, glykémie >18 mmol/l po celou dobu experimentu. Plné trojúhelníky: STZb potkani (n=60) - jednorázová aplikace STZ v citrátovém pufru, glykémie >18 mmol/l v prvním půlroce pokusu a <13 mmol/l ve druhém půlroce pokusu. * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat ($p < 0,01$). # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u zvířat skupiny STZa ($p < 0,05$).

Stanovení koncentrace inzulinu v plazmě

Odebraná krev byla smíchána s protisrážlivým činidlem K₂EDTA a centrifugována (1000 x g, 4°C, 15 min). Poté jsme do zkumavek odsáli plazmu a skladovali jsme ji při teplotě -20°C. Koncentrace inzulinu v plazmě byla stanovena pomocí komerčního RIA setu (LINCO Research, MO, USA), který obsahuje potkaní inzulin značený I¹²⁵ a antisérum získané od morčete obsahující protilátky proti inzulinu.

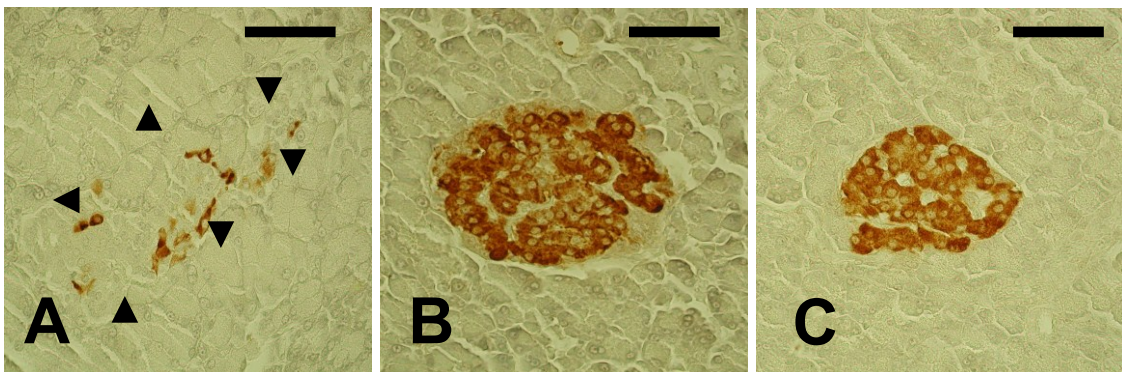
Obrázek 2.5 dokumentuje plazmatickou koncentraci inzulinu u potkanů zařazených do dlouhodobého pokusu. U zvířat STZa byla koncentrace inzulinu v plazmě až pětikrát nižší než u odpovídajících kontrolních zvířat, zatímco u skupiny STZb byla plazmatická koncentrace vyšší než u skupiny STZa a blížila se k hodnotám naměřeným u kontrolních zvířat.

Stanovení koncentrace inzulinu v pankreatické tkáni

Slinivka břišní byla vyjmuta co nejdříve po usmrcení zvířete a očištěna od okolních tkání. Poté jsme pankreatickou tkáň zmrazili, zvážili a zhomogenizovali při teplotě 4°C v 10 objemech kyselého alkoholového roztoku (75% [vol/vol] etanolu, 23,5% redestilované vody a 1,5% 10 mol/l HCl). Homogenát jsme centrifugovali (5000 x g, 4°C, 20 min), supernatant jsme odsáli a skladovali při teplotě -20°C. Koncentrace inzulinu v pankreatické tkáni jsme stanovili pomocí komerčního RIA setu (LINCO Research, MO, USA).

Koncentrace inzulinu v pankreatické tkáni kontrolních zvířat stáří 3 měsíce byla $18,7 \pm 2,2$ ng/g a významně se neměnila s přibývajícím věkem, kdežto pankreatická koncentrace inzulinu u skupiny STZa byla výrazně nižší ve srovnání s kontrolami ($1,25 \pm 0,21$ ng/g na konci prvního měsíce po aplikaci

STZ) a neměnila se v průběhu experimentu, tj. $1,97 \pm 0,32$ ng/g v devátém a $1,68 \pm 0,21$ ng/g ve dvanáctém měsíci po aplikaci STZ. U skupiny STZb se koncentrace inzulinu v pankreatu zvýšila v druhém půlroce pokusu, dosahovala hodnot $10,3 \pm 1,5$ ng/g (9.měsíc) a $13,8 \pm 1,7$ ng/g (12. měsíc). Tyto hodnoty nebyly statisticky významně odlišné od hodnot naměřených u příslušných kontrol.



Obr. 2.6. Imunohistochemické mikrosnímky endokrinní části pankreatu potkanů STZa (A), STZb (B) a kontrolních zvířat (C).

Distribuce buněk imunopozitivních na přítomnost inzulinu a architektura Langerhansových ostrůvků pankreatů STZb (B) odpovídá nálezům intaktních zvířat (C). Atrofické ostrůvky v pankreatech STZa (A) obsahují minimum zachovalých β -buněk, které jsou rozptýleny mezi převládajícími inzulin-negativními buňkami. Úsečka odpovídá 50 μ m.

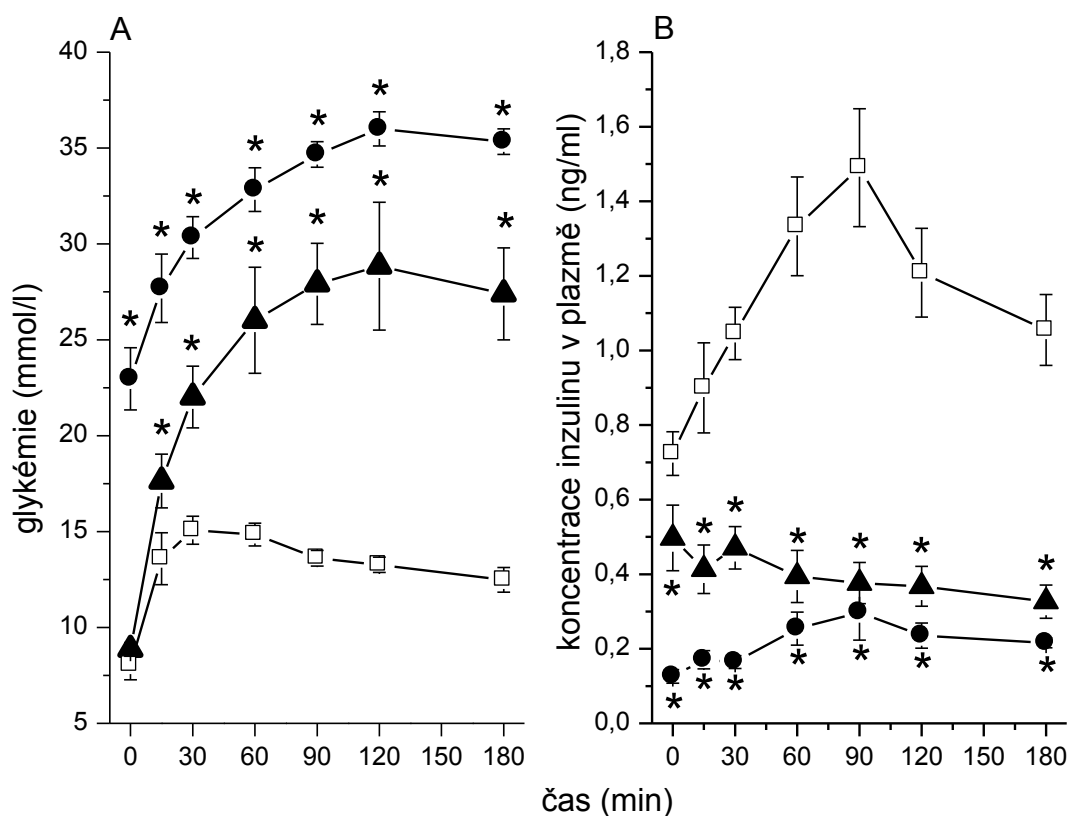
Rozdíl koncentrace inzulinu v pankreatické tkáni mezi skupinami zvířat STZa a STZb byl patrný i u histologických preparátů. Vzorky pankreatu odebrané od potkanů STZb obsahovaly dobře ohraničené ostrůvky se zachovalými β -buňkami (obr. 2.6.B) a vykazovaly podobnost se vzorky kontrolních zvířat (obr. 2.6.C). V pankreatické tkáni potkanů STZa byl menší počet malých ostrůvků, které měly nepravidelný tvar a ve srovnání

s kontrolami byly hůře ohraničené. Buňky obsahující inzulin nebyly přítomny vůbec nebo jen v minimálním počtu (obr. 2.6.A).

Glukózový toleranční test

Glukózový toleranční test jsme prováděli u laboratorních potkanů po dvanáctihodinovém lačnění. Zvířata jsme anestezovali uretanem (1,5 g/kg tělesné hmotnosti). Glukózu (2 g/kg) jsme aplikovali intraperitoneálně. Ve vzorcích krve z retrobulbárního plexu, které jsme odebírali 15, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 minut po podání glukózy, jsme stanovovali glykémii a plazmatickou koncentraci inzulinu.

Přestože jsme v pokročilých stádiích onemocnění nenalezli významný rozdíl v glykémii a v plazmatické koncentraci inzulinu mezi kontrolními a STZb potkany, průběh glukózového tolerančního testu byl u výše zmíněných skupin zvířat odlišný. Průběh glykemické křivky glukózového tolerančního testu prováděného v 9. a 12. měsíci experimentu vykazoval u STZb zvířat patologické hodnoty podobně jako u skupiny STZa a výrazně se lišil od průběhu křivky získané od kontrolních zvířat (obr. 2.7.A). Obě skupiny STZ zvířat reagovaly na glukózovou zátěž sníženou sekrecí inzulinu ve srovnání s kontrolní skupinou (obr. 2.7.B).



Obr. 2.7. Glykemická křivka (A) a plazmatická koncentrace inzulínu (B) při glukózovém tolerančním testu u kontrolních a diabetických potkanů 12 měsíců po aplikaci STZ.

Prázdné čtverce: kontrolní potkani (n=40), jednorázová aplikace citrátového pufru.

Plné kroužky: STZa potkani (n=92). Plné trojúhelníky: STZb potkani (n=60).

* statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat, $p < 0,05$.

Výsledky dlouhodobého sledování STZ potkanů ukazují, že prvních 6 měsíců po indukci diabetu byl model DM 1. typu stabilní a vykazoval charakteristické laboratorní známky diabetu, zatímco v druhém půlroce u cca 40% přeživších potkanů došlo ke spontánní úpravě glykémie, koncentrace inzulínu v plazmě a v pankreatické tkáni. Navzdory tomu, výsledky

glukózového tolerančního testu těchto zvířat vykazovaly známky porušené glukózové tolerance. U zbývajících potkanů (cca 60%) laboratorní výsledky svědčily pro přetrvávání těžkého diabetu. Při plánování dalších pokusů bylo nutno počítat se skutečností, že se u starších zvířat s těžkým diabetem zvyšuje mortalita a že u určité části přežívajících zvířat dochází k částečné spontánní regeneraci. Při studiu kontraktálních vlastností a inervace srdce jsme do pokusu zařazovali pouze ta zvířata, jejichž glykémie byla vyšší než 18 mmol/l.

2.3. Měření kontraktility

2.3.1. Volba preparátu

Vzhledem k tomu, že jsme v experimentech hodlali použít poměrně intenzivní intervence do vápníkového hospodářství, které nejsou slučitelné s *in vivo* situací, bylo nutné zvolit vhodný izolovaný preparát. Do úvahy přicházely izolované perfundované srdce, multiceulární preparát nebo izolované kardiomyocyty. Proti použití izolovaného perfundovaného srdce hovořilo obtížné sledování frekvenčně závislých jevů. Při pokusech na izolovaných kardiomyocytech lze dostupnými metodami měřit pouze kontrakci nezatížené buňky („unloaded contraction“). Dále bychom u tohoto typu preparátu vyloučili vzájemné ovlivnění buněk a vliv změn prostředí v mezibuněčných prostorech (kumulace iontů, metabolických zplodin apod.). Proto jsme se rozhodli provést experimenty na multiceulárním preparátu. Vzhledem k zaměření práce na sledování síly svalové kontrakce byl potřebný preparát se stejnosměrným uspořádáním svalových vláken. Tomuto požadavku nejlépe vyhovoval papilární sval. Při volbě místa odběru svalů

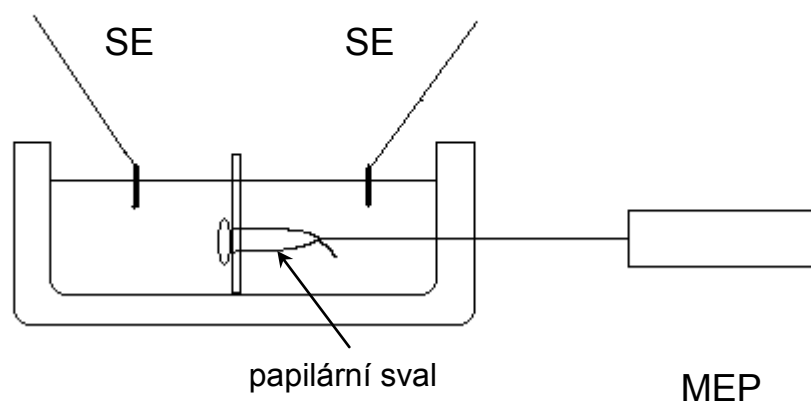
hovořil pro pravou komoru fakt, že pravokomorové papilární svaly jsou ve srovnání s levokomorovými svaly podstatně tenčí a prostá difúze kyslíku z pracovního roztoku zabezpečí dostatečné okysličení preparátu bez hypoxických ložisek uvnitř preparátu.

2.3.2. Příprava preparátu

Laboratorním potkanům byl intraperitoneálně aplikován heparin (500 i.u.) a deset minut poté byli anestetizováni intraperitoneální injekcí uretanu (1,5 g/1 kg). Srdce bylo rychle vyjmuto z dutiny hrudní a vloženo do Tyrodova roztoku, kde byly z pravé srdeční komory vystřiženy vhodné papilární svaly. Preparát byl upnut bází do otvoru přepážky dvoukomorové stimulační lázně s Tyrodovým roztokem a šlašinkový konec byl silonovou nití připojen k mechanoelektrickému převaděči F30 (Hugo Sachs, SRN) (obr. 2.8). Pro pokusy jsme použili pouze ty svaly, které nevykazovaly spontánní aktivitu. Měření byla provedena v pseudoizometrickém režimu. Klidové napětí svalu bylo nastaveno tak, aby síla kontrakce dosahovala 90-95% maxima při stimulační frekvenci 1 Hz. Sval byl elektricky stimulován pravoúhlými impulsy přiváděnými prostřednictvím optoizolační jednotky z komerčního stimulatoru Pulsemaster A300 (WPI, USA). Délka stimulačního pulsu byla 1 ms, amplituda byla o 50% vyšší než nalezený stimulační práh.

Během úvodní třicetiminutové stabilizace jsme preparát stimulovali frekvencí 1 Hz. Při vlastním experimentu jsme použili následující intervence:

- různé frekvence stimulace (3; 2; 1; 0,5; 0,3; 0,2; 0,1 Hz) v ustáleném stavu
- vliv periody nečinnosti - ustálený stav (stimulační frekvence 1 Hz) byl přerušen různě dlouhou periodou nečinnosti (10, 30, 60, 120, 300 s).



Obr. 2.8. Schéma komůrky pro měření na multicelulárním preparátu.

MEP – mechanoelektrický převaděč, SE – stimulační elektroda. Baze pravokomorového papilárního svalu je upevněna v otvoru přepážky oddělující levou a pravou část experimentální komůrky. Šlašinkový konec preparátu je pomocí nitě připojen k mechanoelektrickému převaděči.

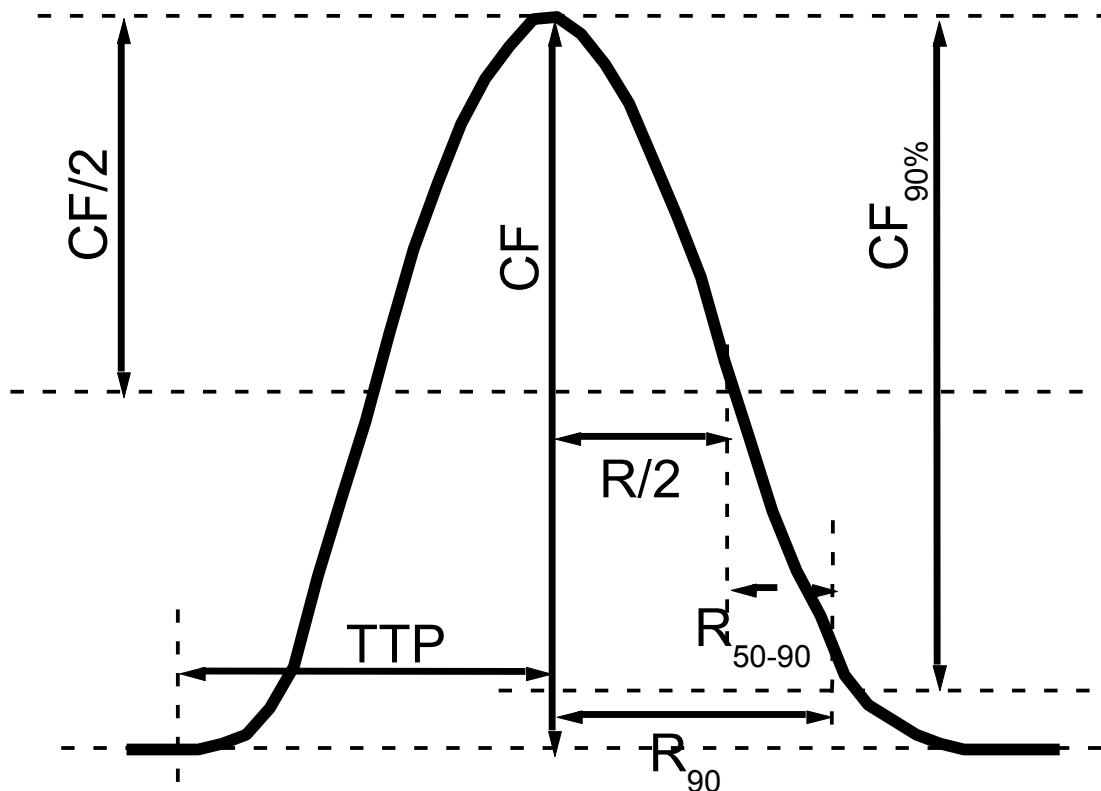
2.3.3. Registrace srdeční kontrakce, sledované parametry

Při pokusech na papilárních svalech jsme sledovali jak časové, tak i mechanické parametry (obr. 2.9). Klidová tenze odpovídala nule. Signál z mechanoelektrického snímače byl zesílen a časově derivován jednotkou zkonstruovanou na Ústavu fyziologie (ing. Barták). Výstupní signál z jednotky byl přiveden do A/D převodníku (ADVANTECH PCL-812/PG) a zpracován programem DiSys (Merlin, Česká republika).

1) mechanické parametry

- a) CF – je maximální intenzita izometrické kontrakce. Udáváno v arbitrárních jednotkách (a.u.).

- b) $CF_{\text{post-rest}}/CF_{\text{SS}}$ – poměr síly kontrakce 1. stahu po periodě nečinnosti a síly stahu před periodou nečinnosti.
- 2) časové parametry – všechny časové parametry jsou udávány v milisekundách.
- a) TTP – čas do vrcholu kontrakce měřený od začátku kontrakce do okamžiku, kdy kontrakce dosáhla maximální hodnoty.
- b) R/2 – poločas relaxace je časový interval měřený od okamžiku, kdy kontrakce dosáhla maximální hodnoty do okamžiku, kdy kontrakce poklesla na polovinu maximální hodnoty.
- c) R_{90} - časový interval měřený od okamžiku, kdy kontrakce dosáhla maximální hodnoty do okamžiku, kdy kontrakce poklesla na 10% maximální hodnoty.
- d) R_{50-90} – časový interval měřený od okamžiku, kdy síla kontrakce klesla na polovinu maximální hodnoty do okamžiku, kdy kontrakce poklesla na 10% maximální hodnoty.



Obr. 2.9. Sledované parametry kontrakce papilárního svalu

CF – síla kontrakce, TTP – čas do vrcholu kontrakce, R – relaxace.

2.3.4. Roztoky a chemikálie

Při měřeních na papilárních svalech jsme používali modifikovaný Tyrodův roztok (složení v mmol/l: NaCl 137; KCl 4,5; MgCl₂ 1; CaCl₂ 2; glukóza 10; Hepes 5; pH upraveno na 7,4 pomocí NaOH). Ve vybraných pokusech byla koncentrace CaCl₂ snížena na třetinu (0,67 mmol/l) nebo zvýšena na trojnásobek (6 mmol/l). Zásobní roztok, který trvale protékal experimentální lázní rychlostí 6-10 ml/min, byl oxygenován čistým O₂ a zahříván na teplotu 36°C.

Inzulin byl rozpuštěn v 1 ml 1M HCl, přidán do Tyrodova roztoku a poté bylo znovu upraveno pH roztoku pomocí NaOH. Nifedipin byl rozpuštěn v 1 ml

dimetyl sulfoxidu a poté přidán do roztoku, který byl chráněn před světlem. Inzulin byl použit v koncentraci 2,8 mg/l (= 80 i.u./l), nifedipin a kyselina cyklopiazonová byly užity v koncentraci 3 μ mol/l. Veškeré chemikálie byly od firmy Lachema nebo Sigma.

2.4. Příprava tkáně pro stanovení noradrenalinu

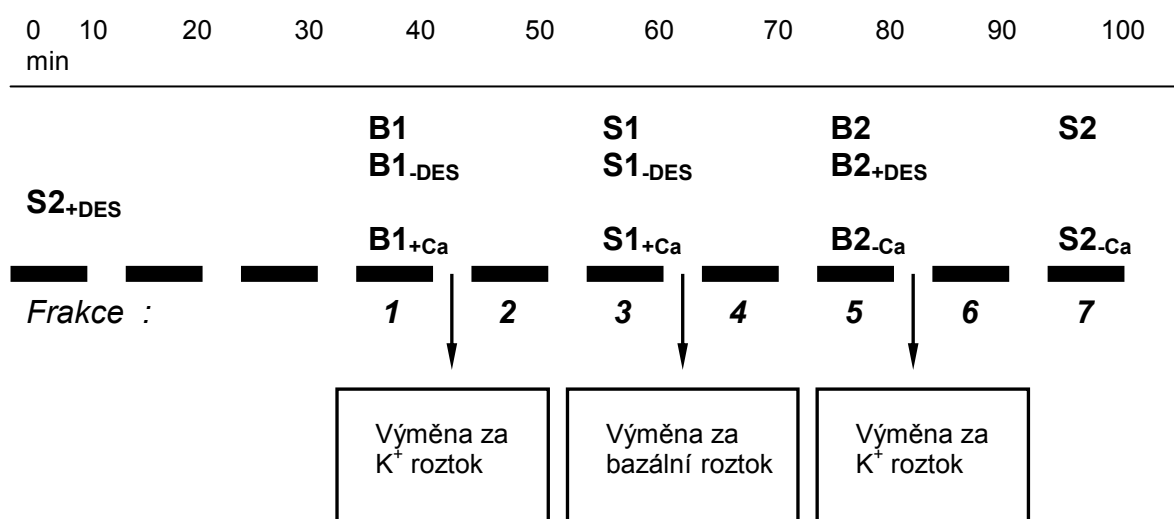
Potkani byli usmrceni dekapitací. Srdce bylo rychle vyjmuto a propláchnuto ledově chladným fyziologickým roztokem. Při další preparaci, kterou jsme prováděli rovněž v ledově chladném fyziologickém roztoku, jsme srdce očistili od tukové a vazivové tkáně a rozdělili na pravou síň a levou síň včetně mezisíňového septa. Po zvážení byly vzorky extrahovány v 0,4 mol/l HClO_4 a centrifugovány po dobu 20 minut při 5000 x g. Ze vzniklého supernatantu jsme odebrali 150 μ l a přidali k němu 1000 μ l destilované vody. Koncentrace NA byla měřena metodou RIA pomocí diagnostického setu firmy IBL Hamburg (Německo).

2.5. Uvolňování noradrenalinu

2.5.1. Bazální a stimulované uvolňování noradrenalinu

Po dekapitaci zvířete jsme rychle vyjmuli srdce a vypreparovali srdeční síně v oxygenovaném Krebsově-Henseleitově roztoku tohoto složení (v mmol/l): NaCl 113; NaHCO_3 25; KCl 4,75; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,19; glukóza 11,1; Na_2EDTA 0,029; kyselina askorbová 0,289. Ke stanovení množství NA uvolněného ze srdečních síní za bazálních podmínek a po stimulaci uvolňování vysokou koncentrací K^+ v perfuzním roztoku jsme použili temperovaných (37°C) komůrek o objemu cca 0,5 ml promývaných roztokem

pomocí peristaltické pumpy o vysoké přesnosti (ICN, Švýcarsko). Komůrky byly zhotoveny v Ústředních dílnách LF UK v Plzni podle dokumentace laskavě poskytnuté Sylvii Bourgoin a Michele Pohlem z INSERM U288 v Paříži (Pohl et al., 1989). V pokusech jsme srdeční síně sdružovali tak, aby hmotnost tkáně byla 70 - 100 mg. Vypreparované síně jsme promývali rychlostí 0,15 ml/min bazálním roztokem, který byl oxygenován směsí O₂ a CO₂ v poměru 95%:5%. V přípravných experimentech jsme určili, kdy se uvolňování NA po vložení tkáně do komůrek ustálí a v jakých intervalech je nejvhodnější stanovit bazální a stimulovaný výdej mediátoru.



Obr. 2.10. Schéma perfuzního experimentu

Thusté úsečky vyjadřují 10minutová sběrná období při rychlosti perfuze 0,15 ml/min.

Koncentrace NA byla měřena ve frakcích č. 1, 3, 5 a 7, označených B1, S1, B2 a S2.

Okamžitě po sběru frakcí B1 a B2 byl bazální roztok vyměněn za roztok s 50 mmol/l

KCl a po sběru frakce S1 byl naopak stimulační roztok vyměněn zpět za bazální.

Indexy označují přítomnost (+) či absenci (-) dané látky v perfuzním roztoku: DES –

desipramin (10⁻⁷ nebo 10⁻⁶ mol/l); Ca – vápenaté ionty.

Časové schéma experimentu ukazuje obrázek 2.10. Po 30 minutách promývání tkáně se výdej NA ustálil a mohl být zahájen sběr 10minutových frakcí při teplotě 0°C. Bazální výdej NA byl stanoven ve frakcích 1 a 5, které jsme označili jako B1 a B2. Okamžitě po sběru B1 a B2 bylo uvolňování NA stimulováno depolarizací 50 mmol/l KCl v perfuzním roztoku, ve kterém jsme úměrně snížili koncentraci NaCl, aby osmolalita roztoku zůstala zachována. Zbývajícím složením stimulačního roztoku bylo stejné jako u bazálního roztoku. Stimulované uvolňování NA bylo stanoveno ve frakcích 3 a 7, označených S1 a S2.

Po ukončení experimentu jsme perfuzáty zmrazili, tkáně zvážili a extrahovali pomocí 0,1 mol/l HClO₄, abychom stanovili obsah NA v tkáni pomocí diagnostického setu firmy IBL Hamburg (Německo).

2.5.2. Uvolňování noradrenalinu pod vlivem desipraminu

Desipramin (DES) se používá jako inhibitor zpětného vychytávání NA neuronálním transportérem (Dart et al., 1984; Bogdanski, 1985). Jeho účinek na uvolňování NA byl u všech skupin kontrolních zvířat a u diabetických zvířat 1 měsíc po indukci diabetu (STZ1) ověřován stejným experimentálním protokolem, kdy byly použity dvě koncentrace DES (10⁻⁶ a 10⁻⁷ mol/l). U potkanů se čtyř- a sedmiměsíčním diabetem (STZ4 a STZ7) byl použit v koncentraci 10⁻⁶ mol/l. Bazální a stimulovaný výdej NA byl měřen bez DES (frakce B1_{-DES} a S1_{-DES}) a v přítomnosti DES v perfuzním roztoku (frakce B2_{+DES} a S2_{+DES}).

2.5.3. Uvolňování NA v bezvápníkovém prostředí

Abychom odlišili podíl NA uvolněného kalcium-dependentní exocytózou od podílu NA uvolněného kalcium-independentním přenašečem, provedli jsme měření výdeje NA v bezvápníkovém prostředí. K měření bazálního výdeje NA v nepřítomnosti vápníku (B_{2-Ca}) byl základní perfuzní roztok modifikován (složení v mmol/l): NaCl 118; $NaHCO_3$ 25; KCl 4,75; $MgSO_4$ 1,19; glukóza 11,1; Na_2EDTA 0,029; kyselina askorbová 0,289. Ke stimulovanému výdeji NA v bezvápníkovém prostředí byl použit roztok bez vápenatých iontů, ve kterém byla koncentrace KCl zvýšena na 50 mmol/l a úměrně tomu byla snížena koncentrace NaCl.

2.6. Stanovení koncentrace noradrenalinu

Koncentraci NA jsme stanovili v tkáňových extraktech a v perfuzátu síní při uvolňování *in vitro* RIA metodou. Využívali jsme diagnostickou soupravu Catecholamine TriCatTM firmy IBL Hamburg (Německo). NA byl extrahován z biologického materiálu a enzymaticky konvertován katechol-O-metyltransferázou. Další postup byl analogický klasické RIA, založené na kompetici značeného a neznačeného antigenu o limitované množství protilátky. Po dosažení rovnovážného stavu byl komplex antigen-protilátka precipitován a centrifugován. Vázaná aktivita precipitátu byla měřena na gama čítači. Koncentrace NA v neznámých vzorcích byla zjišťována pomocí standardní křivky. Rozsah stanovení byl 0,1 - 10 ng/ml, specifita protilátky (v %): noradrenalin 100; normetanefrin 0,38; dopamin 0,09; adrenalin 0,6.

Získané koncentrace jsme přepočítali na 1 g tkáně při stanovení obsahu NA v srdečních síních nebo vyjádřili v ng/g/min při měření množství NA uvolněného z promývané tkáně.

2.7. Prezentace výsledků a statistika

Jednotlivé výsledky jsou v práci uvedeny jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM). Při testování statistické významnosti rozdílů průměrů byl použit podle okolností párový nebo nepárový Studentův t-test a při srovnání více souborů analýza rozptylu ANOVA. Rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$ jsou považovány za statisticky významné a v grafech jsou označeny symboly * nebo #. Při počítačovém zpracování výsledků, grafů a statistiky jsme použili software Origin (Microcal Software, USA), statistické hodnocení jsme prováděli pomocí statistiky BMDP (BMDP Inc., USA).

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1. Účinek inzulínu na kontrakci papilárního svalu kontrolních a diabetických potkanů

3.1.1. Úvod

Jednou z nejzávažnějších komplikací DM 1. typu je diabetická kardiomyopatie, která v konečné fázi může vést až k srdečnímu selhání (Jarret, 1989). Včasné a správné zahájení léčby diabetu inzulinem dokáže zabránit vlivu diabetu na myokard nebo alespoň oddálit fatální důsledky diabetu na srdeční tkáň (Fein et al., 1981; Schaible et al., 1983; Srikanthan a Hsueh, 2004). O přímém účinku inzulinu na srdeční kontrakci jak intaktních tak diabetických zvířat existují v dostupné literatuře jen ojedinělé informace, které jsou, jak již bylo zmíněno dříve, rozporuplné (Farah a Alousi, 1981; Sethi et al., 1991; Ren et al., 1999; Schmidt a Koch, 2002). Akutní účinek inzulinu na kontrakci pravokomorového papilárního svalu podle našich znalostí dosud popsán nebyl.

V této části práci jsme se pokusili popsat akutní účinek inzulinu na sílu a časový průběh kontrakce papilárního svalu pravé komory kontrolních a diabetických zvířat. Vzhledem k tomu, že inzulin ovlivňuje některé články vápníkového metabolismu srdečních buněk, provedli jsme měření rovněž po intervenci do kalciového metabolismu (zablokování SERCA a I_{CaL}). Dále nás zajímalo, zda naopak změna extracelulární koncentrace vápníku ovlivní inotropní účinek inzulinu, a proto jsme sledovali účinek inzulinu při snížené a zvýšené koncentraci Ca^{2+} v pracovním roztoku.

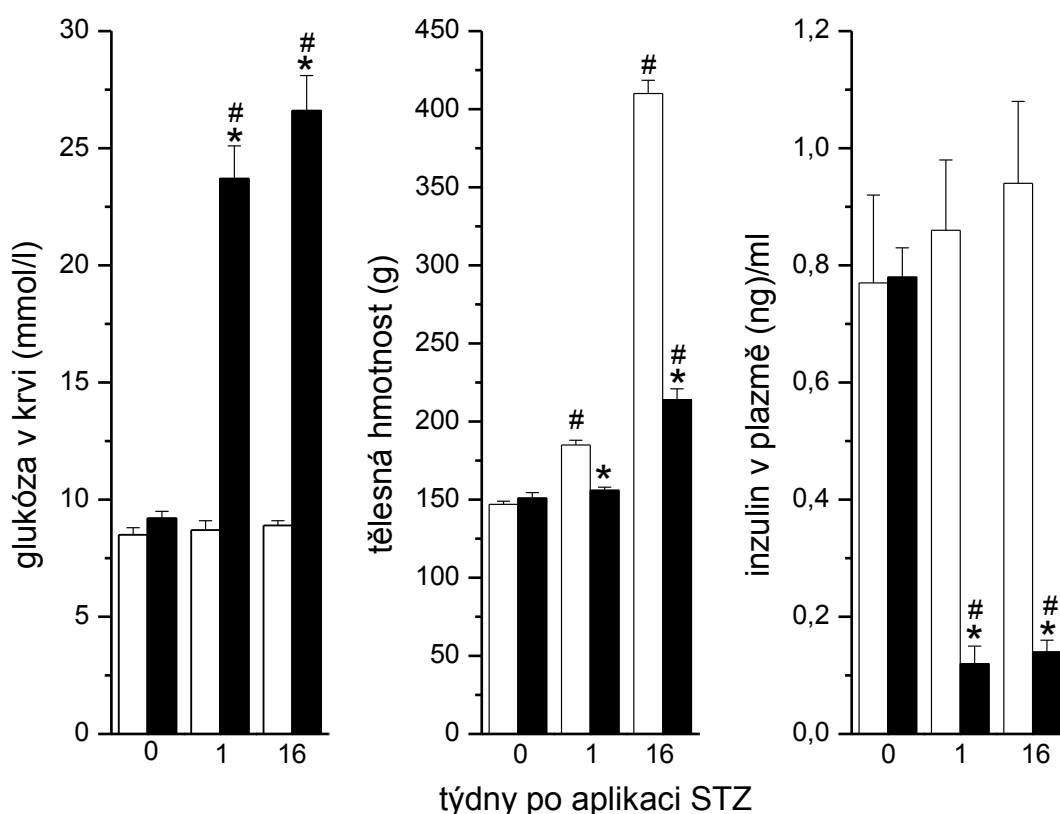
Do pokusu bylo zařazeno 45 dospělých samců laboratorního potkana. Diabetes byl indukován STZ (n=25), kontrolním zvířatům (n=20) byl aplikován pouze citrátový pufr. Podrobný postup indukce DM 1. typu byl popsán v kapitole "Metody". Za diabetická byla považována zvířata, jejichž glykémie nalačno po aplikaci STZ byla vyšší než 18 mmol/l (n=22).

Detailní popis měření na papilárních svalech, včetně sledovaných parametrů a složení roztoků je uveden v kapitole "Metody".

3.1.2. Výsledky

Základní parametry diabetických potkanů

U kontrolních i diabetických zvířat jsme pravidelně sledovali tělesnou hmotnost, koncentraci glukózy v krvi a inzulinu v plazmě. Před aplikací STZ nebyla hmotnost potkanů v obou experimentální skupinách významně odlišná (obr. 3.1.1). Glykémie u kontrolních potkanů nepřesáhla hodnotu 9 mmol/l po celou dobu experimentu (16 týdnů), zatímco glykémie u diabetické skupiny zvířat výrazně stoupla už v prvním týdnu po aplikaci STZ a na zvýšených hodnotách se udržela až do ukončení experimentu (obr. 3.1.1). Tělesná hmotnost kontrolních zvířat postupně narůstala, přírůstek tělesné hmotnosti diabetických zvířat byl signifikantně nižší než u zvířat kontrolních (obr. 3.1.1). Koncentrace inzulinu v plazmě u kontrolních potkanů byla téměř konstantní v celém průběhu pokusu, kdežto u diabetických zvířat signifikantně poklesla (obr. 3.1.1)



Obr. 3.1.1. Glykémie, tělesná hmotnost a koncentrace inzulinu v plazmě u kontrolních a diabetických potkanů.

Prázdné sloupce: kontrolní zvířata (n=20), plné sloupce: STZ zvířata (n=22).

* statisticky významný rozdíl od hodnot naměřených u kontrolních zvířat ($p < 0,05$),

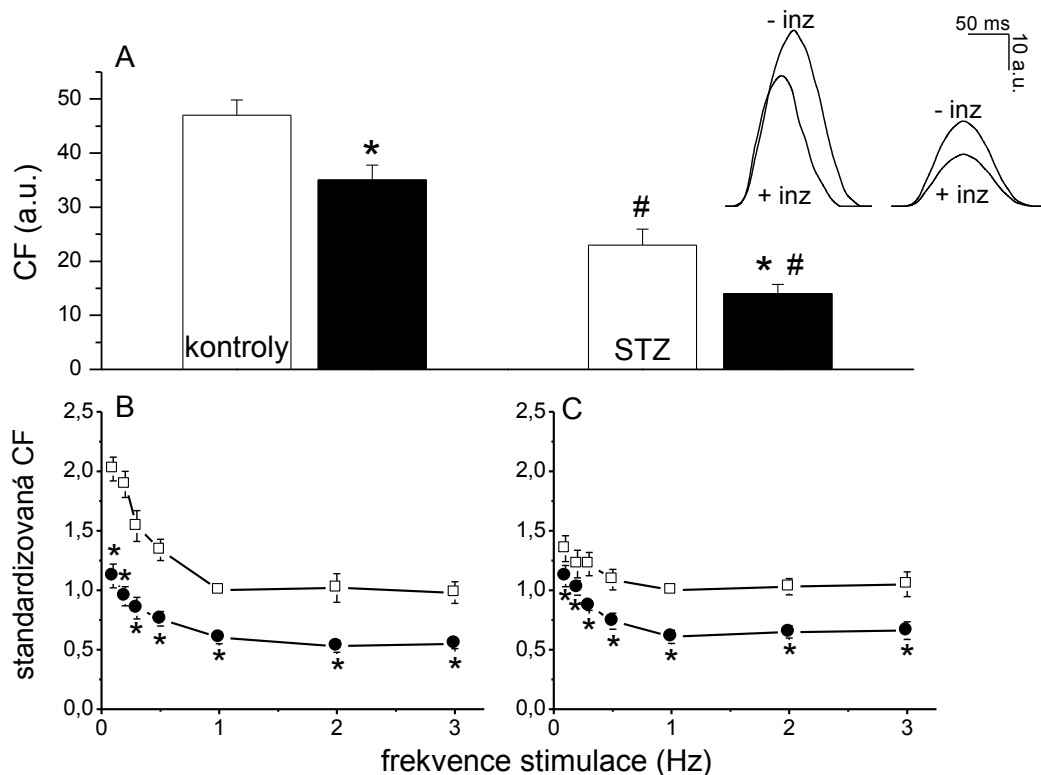
statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými před aplikací STZ nebo citrátového pufru ($p < 0,05$).

Účinek diabetu a inzulinu na kontrakci papilárního svalu

Dlouhodobé trvání diabetu způsobilo významný pokles síly srdeční kontrakce (CF) papilárního svalu (obr. 3.1.2.A). Závislost síly kontrakce na stimulační frekvenci byla u diabetických zvířat méně vyjádřena, zejména při nižších frekvencích stimulace (< 1 Hz) (obr. 3.1.2.B, 3.1.2.C). Akutní podání inzulinu (80 i.u./l) překvapivě způsobilo oslabení srdeční kontrakce u obou

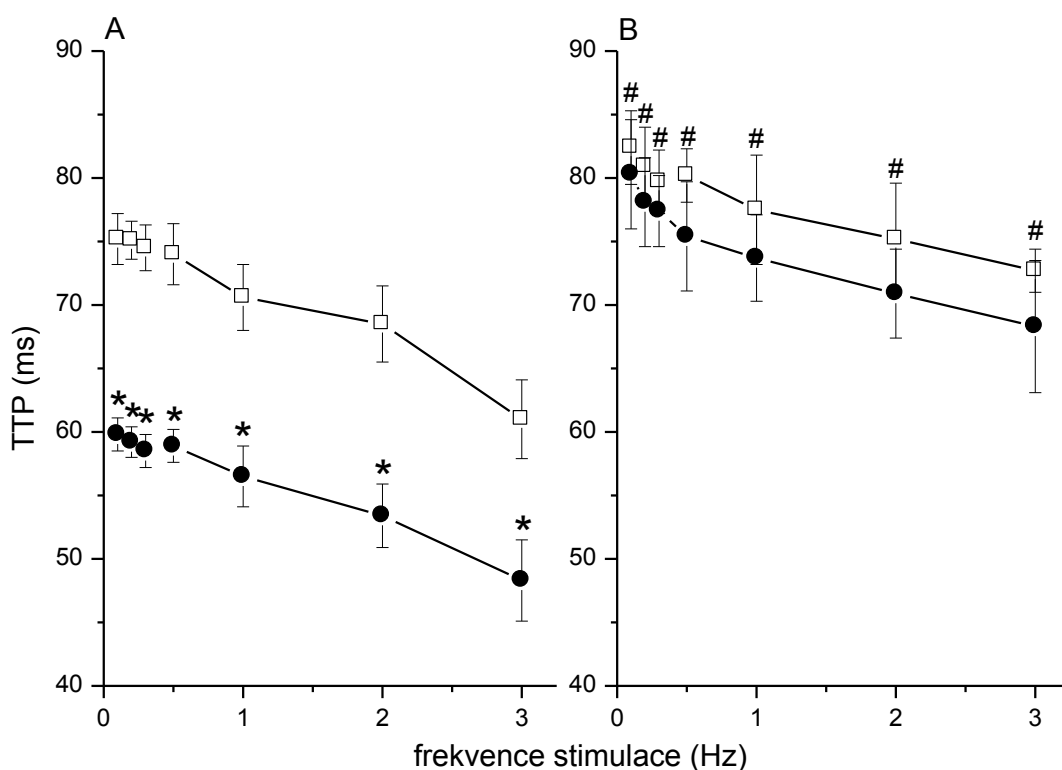
experimentálních skupin. Při stimulační frekvenci 1 Hz poklesla hodnota CF z $47 \pm 2,8$ a.u. na $35 \pm 2,8$ a.u. ($n=5$, $p<0,05$) u kontrolních potkanů a z $23 \pm 2,9$ a.u. na $14 \pm 1,7$ a.u. ($n=6$, $p<0,05$) u diabetických potkanů (obr. 3.1.2.A). Negativně inotropní účinek inzulínu jsme našli při všech sledovaných frekvencích. U kontrol byl inotropní efekt inzulínu více vyjádřen při nižších frekvencích stimulace, zatímco u diabetických zvířat při vyšší frekvenci stimulace (obr. 3.1.2.B, 3.1.2.C).

U obou experimentálních skupin se čas od začátku do vrcholu kontrakce (TTP) zkracoval s rostoucí stimulační frekvencí. TTP byl u diabetických potkanů signifikantně delší než u kontrol při všech frekvencích stimulace (obr. 3.1.3). Akutní podání inzulínu kontrolním potkanům vedlo ke zkrácení TTP při všech stimulačních frekvencích (obr. 3.1.3.A), zatímco časový průběh kontrakce diabetických zvířat podáním inzulínu ovlivněn nebyl (obr. 3.1.3.B). Při stimulační frekvenci 1 Hz byl TTP u kontrolní skupiny $70,6 \pm 2,6$ ms v kontrolním roztoku a $56,5 \pm 2,4$ ms v roztoku s inzulínem, zatímco u STZ zvířat byl TTP při stejné stimulační frekvenci $77,5 \pm 2,3$, resp. $73,7 \pm 3,4$ ms.



Obr. 3.1.2. Účinek inzulinu na sílu srdeční kontrakce kontrolních a diabetických potkanů.

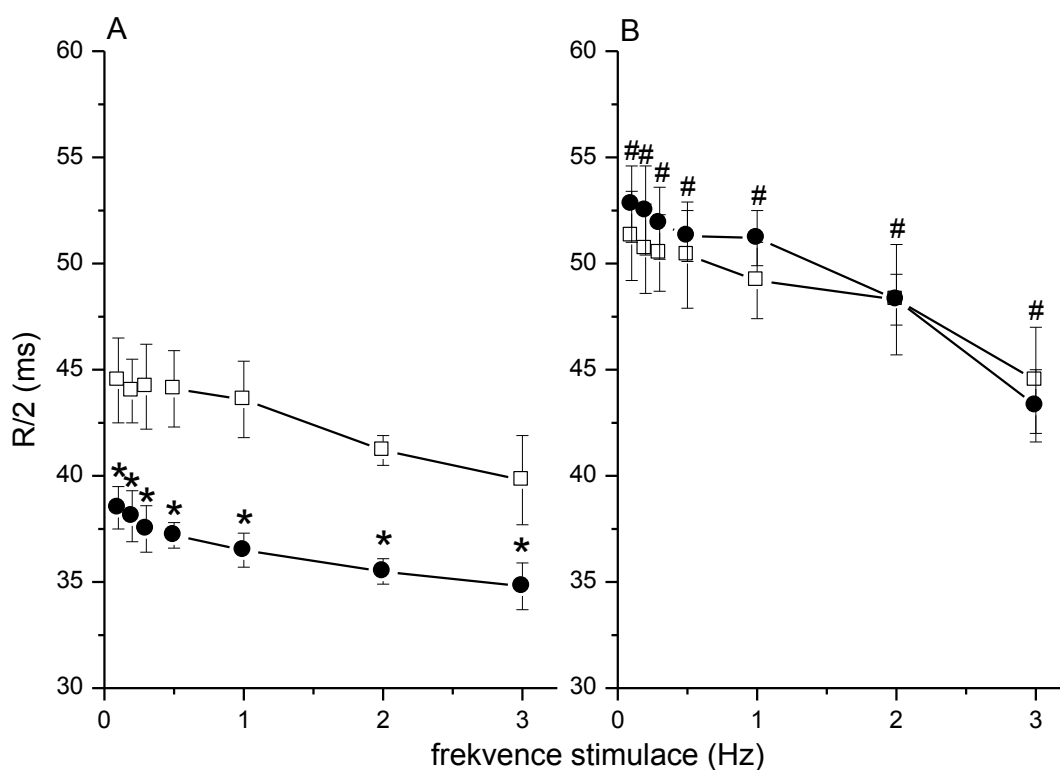
A. Síla kontrakce (CF) při frekvenci stimulace 1 Hz. Levá část: kontrolní potkani (n=5), pravá část: STZ potkani (n=6). Prázdné sloupce: kontrolní roztok, plné sloupce: roztok s inzulinem (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat ($p < 0,05$). **B.** Závislost CF na frekvenci stimulace u kontrolních zvířat (n=5). **C.** Závislost CF na frekvenci stimulace u diabetických zvířat (n=6). Hodnoty byly standardizovány na hodnotu CF v kontrolním roztoku při stimulační frekvenci 1 Hz. Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: inzulin (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$). Levý inset: vliv inzulinu na CF při stimulační frekvenci 1 Hz u kontrolních potkanů. Pravý inset: Vliv inzulinu na CF při stimulační frekvenci 1 Hz u diabetických potkanů. – inz: roztok bez inzulinu, + inz: roztok s inzulinem (80 m.j./l).



Obr 3.1.3. Účinek inzulinu na trvání kontrakce kontrolních a diabetických potkanů.

A. Závislost trvání kontrakce (TTP) na stimulační frekvenci u kontrolních potkanů ($n=5$). **B.** Závislost TTP na stimulační frekvenci u diabetických potkanů ($n=6$). Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: inzulin (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p<0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat ($p<0,05$).

Poločas relaxace ($R/2$) se jak u kontrolních tak u diabetických potkanů zkracoval s rostoucí stimulační frekvencí. $R/2$ byl podobně jako TTP signifikantně prodloužen u STZ potkanů (ve srovnání s kontrolními zvířaty) při všech stimulačních frekvencích (obr 3.1.4). U kontrolních zvířat inzulin zkrátil $R/2$ (obr. 3.1.4.A), zatímco u STZ potkanů neměl žádný vliv na časový průběh relaxace (obr. 3.1.4.B).



Obr 3.1.4. Účinek inzulínu na trvání relaxace kontrolních a diabetických potkanů.

A. Závislost trvání relaxace ($R/2$) na stimulační frekvenci u kontrolních potkanů ($n=5$).

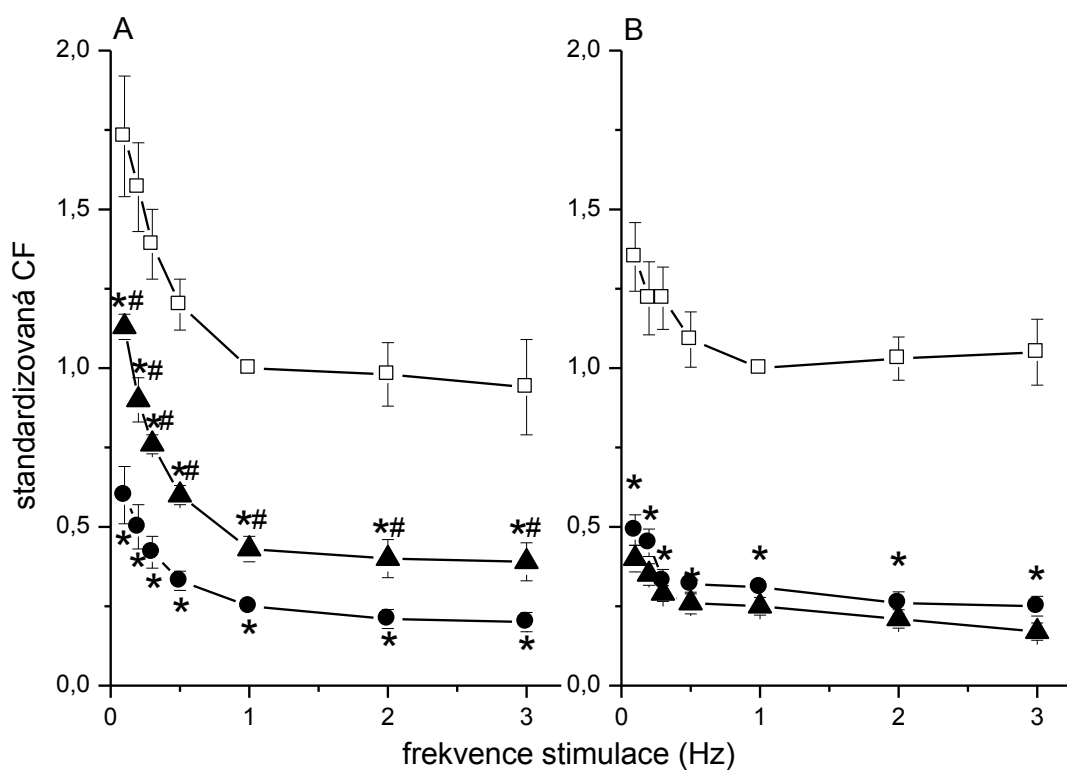
B. Závislost $R/2$ na stimulační frekvenci u diabetických potkanů ($n=6$). Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: inzulin (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p<0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat ($p<0,05$).

Účinek inzulínu při různých koncentracích vápníku v extracelulární roztoku

V této části experimentů jsme se pokusili ověřit, zda změna koncentrace vápníku v extracelulárním prostředí může ovlivnit účinek inzulínu na sílu kontrakce a trvání kontrakce a relaxace papilárního svalu. Nejprve jsme měřili parametry kontrakce v základním roztoku s normální koncentrací kalcia (2 mmol/l). Poté jsme prováděli měření v roztoku buď se sníženou (0,67

mmol/l), nebo zvýšenou koncentrací vápníku (6 mmol/l) koncentrací vápníku. Na závěr jsme do roztoku modifikovaného změnou koncentrace vápníku přidali inzulin (80 i.u./l) a opět jsme zaznamenali základní parametry srdeční kontrakce.

Snížení koncentrace vápníku v pracovním roztoku vedlo k výraznému poklesu CF jak u kontrolních, tak u diabetických zvířat. Při frekvenci stimulace 1 Hz se snížila CF u kontrolních zvířat až na 25%, u diabetických zvířat na 30% hodnoty v kontrolním roztoku (obr. 3.1.5). Po přidání inzulinu do roztoku s třetinovou koncentrací vápníku se hodnota CF u kontrolních zvířat signifikantně zvýšila při všech použitých stimulačních frekvencích, ale nedosáhla hodnoty naměřené v kontrolním roztoku (obr. 3.1.5.A). Odlišný nález jsme zaznamenali u STZ potkanů, u kterých inzulin téměř neovlivnil CF v roztoku se sníženou koncentrací kalcia (obr. 3.1.5.B). Ve všech typech roztoku u obou experimentálních skupin jsme zaznamenali závislost síly kontrakce na frekvenci stimulace; CF se snižovala s rostoucí frekvencí stimulace. Inzulin v roztoku se sníženou koncentrací vápníku u kontrolních zvířat zesiloval CF a působil tedy pozitivně inotropně, na rozdíl od účinku v roztoku s normální koncentrací kalcia, kde byl jeho účinek negativně inotropní.

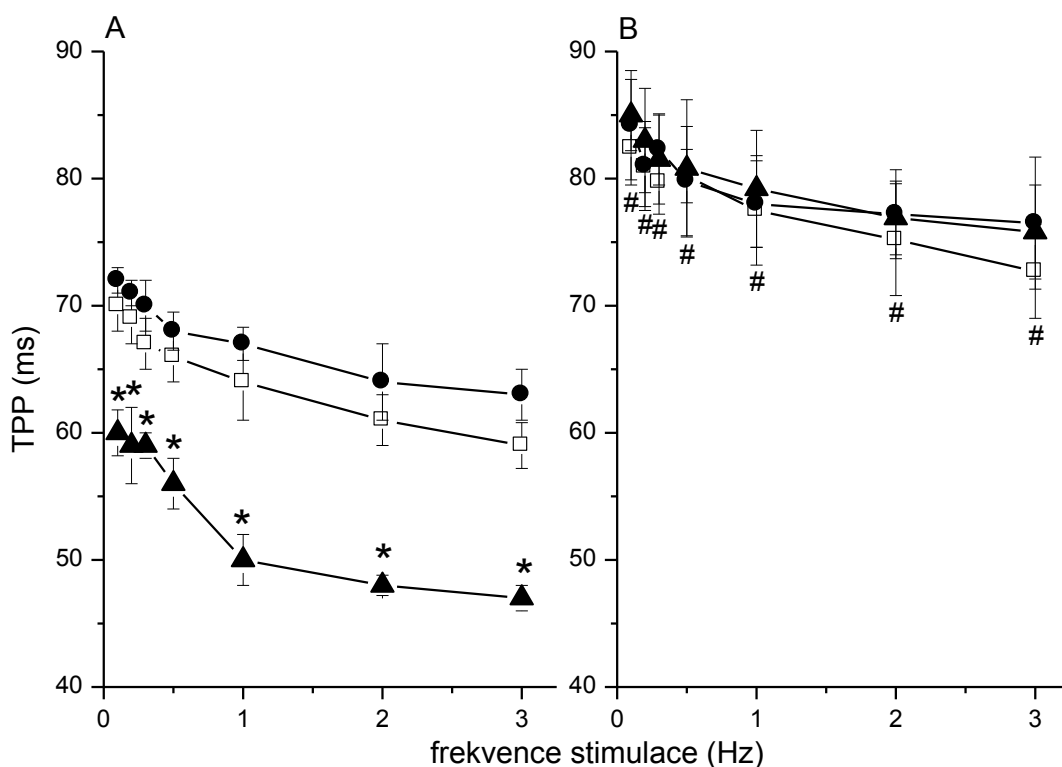


Obr. 3.1.5. Účinek inzulínu na sílu srdeční kontrakce kontrolních a diabetických potkanů v roztoku se sníženou koncentrací vápníku.

A. Závislost CF na frekvenci stimulace u kontrolních zvířat (n=5). **B.** Závislost CF na frekvenci stimulace u diabetických zvířat (n=6). Hodnoty byly standardizovány na hodnotu CF v kontrolním roztoku při stimulační frekvenci 1 Hz. Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: snížená koncentrace vápníku (0,67 mmol/l), plné trojúhelníky: snížená koncentrace vápníku (0,67 mmol/l) + inzulín (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v roztoku se sníženou koncentrací vápníku.

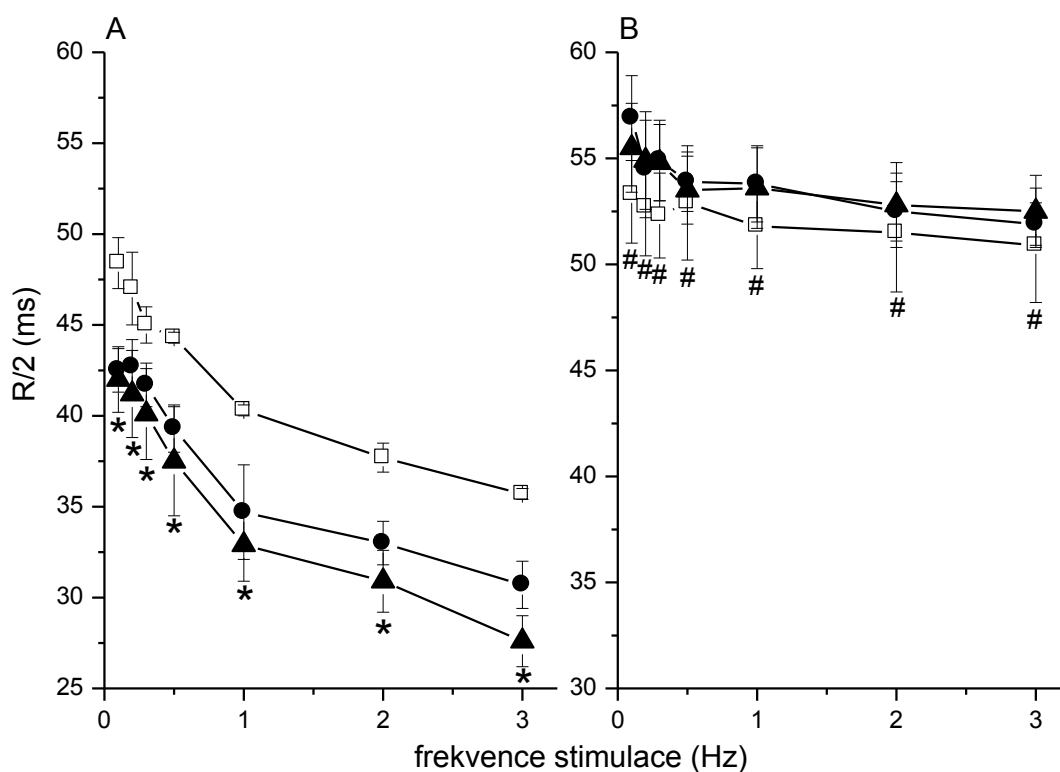
TTP, který byl v kontrolním roztoku signifikantně delší u STZ potkanů, nebyl snížením koncentrace Ca^{2+} v pracovním roztoku ovlivněn u žádné ze sledovaných skupin (obr. 3.1.6). Podání inzulínu zkrátilo TTP u kontrolních

zvířat, při frekvenci stimulace 1 Hz byl TTP v kontrolním roztoku 64 ± 3 ms, v roztoku s třetinovým Ca^{2+} 67 ± 1.3 ms a po přidání inzulínu 50 ± 2 ms (obr. 3.1.6.A). U STZ zvířat nebyl časový průběh kontrakce inzulínem ovlivněn ani v roztoku se sníženou koncentrací vápníku (obr. 3.1.6.B).



Obr. 3.1.6. Účinek inzulínu na trvání srdeční kontrakce kontrolních a diabetických potkanů v roztoku se sníženou koncentrací vápníku.

A. Závislost trvání kontrakce (TTP) na stimulační frekvenci u kontrolních potkanů ($n=5$). **B.** Závislost TTP na stimulační frekvenci u diabetických potkanů ($n=6$). Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: snížená koncentrace vápníku ($0,67 \text{ mmol/l}$), plné trojúhelníky: snížená koncentrace vápníku ($0,67 \text{ mmol/l}$) + inzulín (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat ($p < 0,05$).



Obr. 3.1.7. Účinek inzulínu na poločas relaxace kontrolních a diabetických potkanů v roztoku se sníženou koncentrací vápníku.

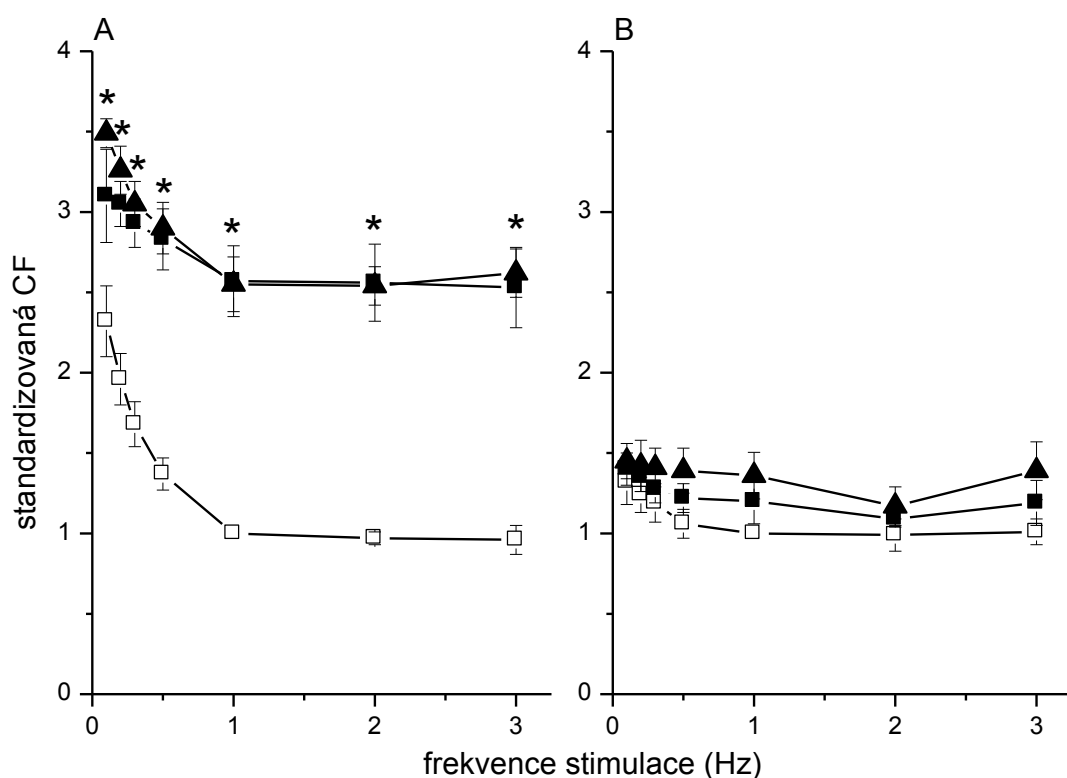
A. Závislost poločasu relaxace ($R/2$) na stimulační frekvenci u kontrolních potkanů ($n=5$). **B.** Závislost $R/2$ na stimulační frekvenci u diabetických potkanů ($n=6$). Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: snížená koncentrace vápníku (0,67 mmol/l), plné trojúhelníky: snížená koncentrace vápníku (0,67 mmol/l) + inzulín (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p<0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat ($p<0,05$).

Snížení koncentrace vápníku v pracovním roztoku vedlo u kontrolních zvířat ke zkrácení $R/2$, při frekvenci stimulace 1 Hz se $R/2$ zkrátil z $40,3 \pm 0,3$ ms na $34,7 \pm 2,6$ ms. Následná aplikace inzulínu téměř nezměnila hodnotu $R/2$ (při

stimulační frekvenci 1 Hz $32,9 \pm 2$ ms; obr. 3.1.7.A). U diabetických potkanů, jejichž R/2 v kontrolním roztoku bylo ve srovnání s intaktními zvířaty signifikantně delší, nebylo trvání relaxace ovlivněno ani změnou extracelulární koncentrace vápníku ani inzulinem (obr. 3.1.7.B)

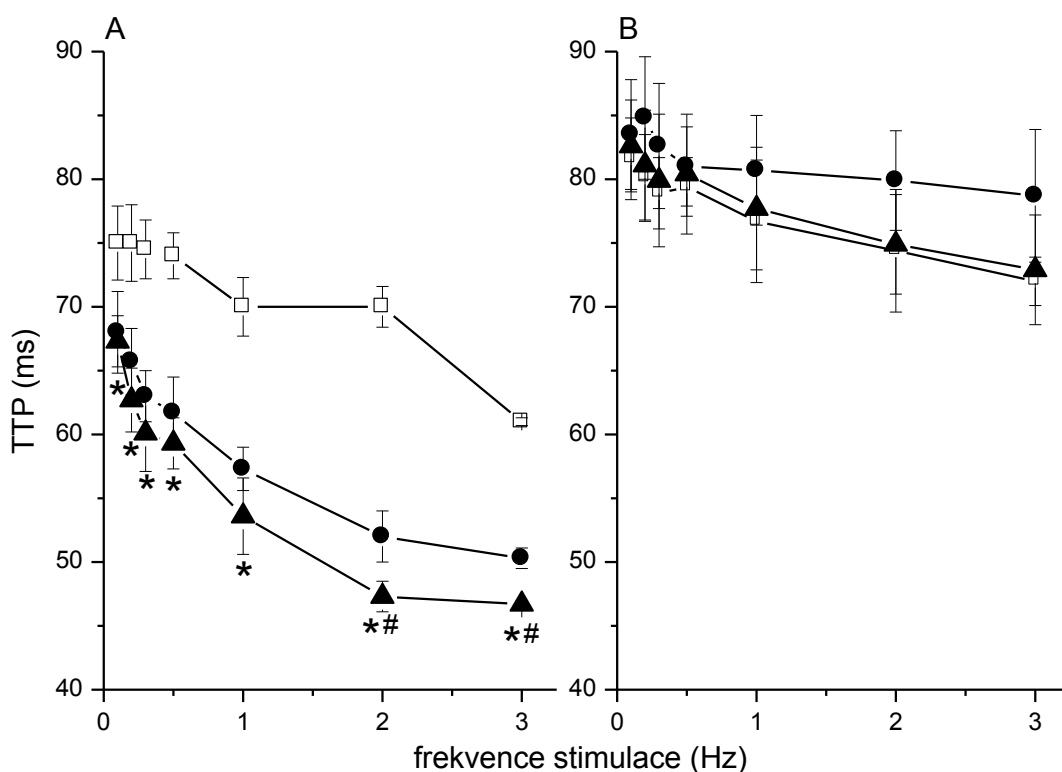
Zvýšení extracelulární koncentrace vápníku v pracovním roztoku výrazně zesílilo CF u kontrolních zvířat při všech sledovaných frekvencích stimulace. Při nižších frekvencích stimulace (< 1 Hz) hodnota CF vzrostla na 200%, při vyšších frekvencích stimulace (≥ 1 Hz) až na 250% kontrolních hodnot. Inzulin v tomto případě nevykazoval inotropní účinek (obr. 3.1.8.A). U diabetických zvířat nebylo CF ovlivněno zvýšením koncentrace vápníku ani následným podáním inzulinu (obr. 3.1.8.B).

TTP u kontrolních potkanů se vlivem zvýšení koncentrace vápníku v pracovním roztoku významně zkrátil, při stimulační frekvenci 1 Hz ze $70 \pm 2,3$ ms na $57,3 \pm 1,7$ ms. Inzulin při trojnásobně zvýšené koncentraci kalcia zkrátil TTP pouze při vyšších stimulačních frekvencích (> 1 Hz), časové trvání kontrakce při nižších frekvencích stimulace nebylo inzulinem ovlivněno – při stimulační frekvenci 1 Hz byla hodnota TTP $53,6 \pm 3$ ms (obr. 3.1.9.A). TTP diabetických potkanů nebyl v důsledku výše zmíněných intervencí signifikantně ovlivněno (obr. 3.1.9.B).



Obr. 3.1.8. Účinek inzulínu na sílu srdeční kontrakce kontrolních a diabetických potkanů v roztoku se zvýšenou koncentrací vápníku.

A. Závislost CF na frekvenci stimulace u kontrolních zvířat (n=5). **B.** Závislost CF na frekvenci stimulace u diabetických zvířat (n=6). Hodnoty byly standardizovány na hodnotu CF v kontrolním roztoku při stimulační frekvenci 1 Hz. Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: zvýšená koncentrace vápníku (6 mmol/l), plné trojúhelníky: zvýšená koncentrace vápníku (6 mmol/l) + inzulín (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$).

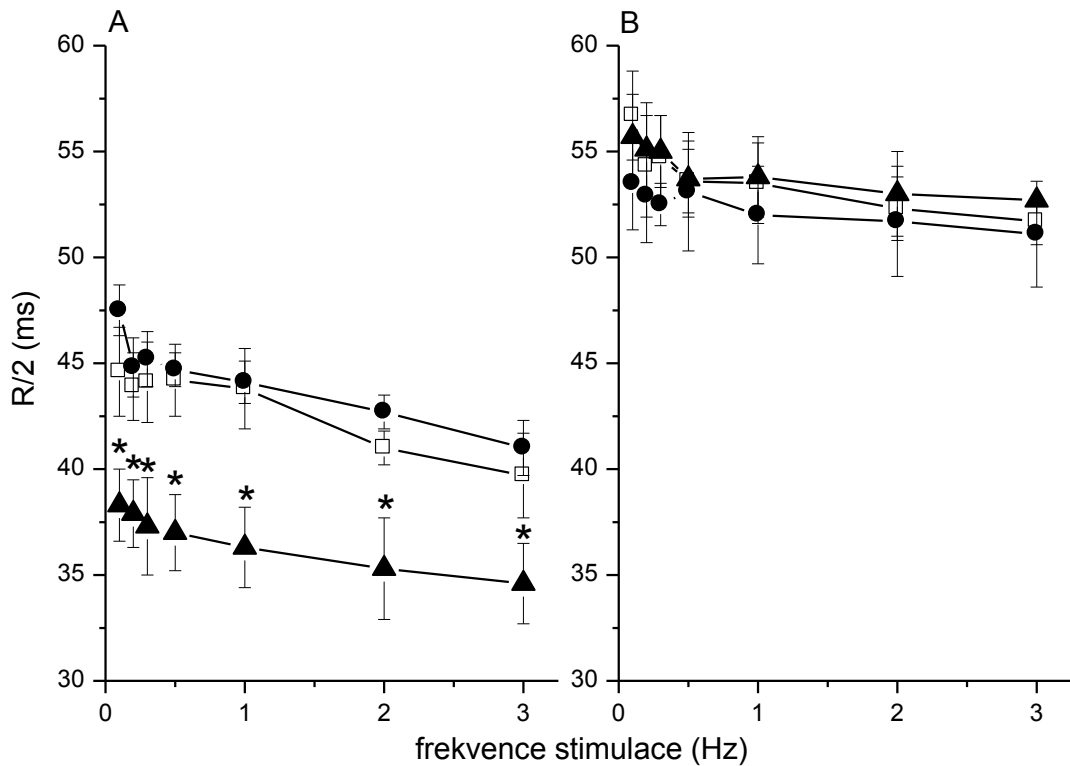


Obr. 3.1.9. Účinek inzulínu na trvání srdeční kontrakce kontrolních a diabetických potkanů v roztoku se zvýšenou koncentrací vápníku.

A. Závislost trvání kontrakce (TTP) na stimulační frekvenci u kontrolních potkanů (n=5). **B.** Závislost TTP na stimulační frekvenci u diabetických potkanů (n=6). Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: zvýšená koncentrace vápníku (6 mmol/l), plné trojúhelníky: zvýšená koncentrace vápníku (6 mmol/l) + inzulín (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v roztoku se sníženou koncentrací vápníku.

R/2 nebyl vlivem zvýšené koncentrace Ca^{2+} v pracovním roztoku ovlivněn ani u jedné ze sledovaných skupin (obr. 3.1.10). Podání inzulínu zkrátilo R/2 u kontrolních zvířat, při frekvenci stimulace 1 Hz byla hodnota R/2

v kontrolním roztoku $43,8 \pm 1,9$ ms, v roztoku s trojnásobným Ca^{2+} $44,1 \pm 1$ ms a po přidání inzulínu $36,3 \pm 1,9$ ms (obr. 3.1.10.A). U STZ zvířat nebyl časový průběh kontrakce v roztoku se zvýšenou koncentrací vápníku inzulinem ovlivněn (obr. 3.1.10.B).



Obr. 3.1.10. Účinek inzulínu na poločas relaxace kontrolních a diabetických potkanů v roztoku se zvýšenou koncentrací vápníku.

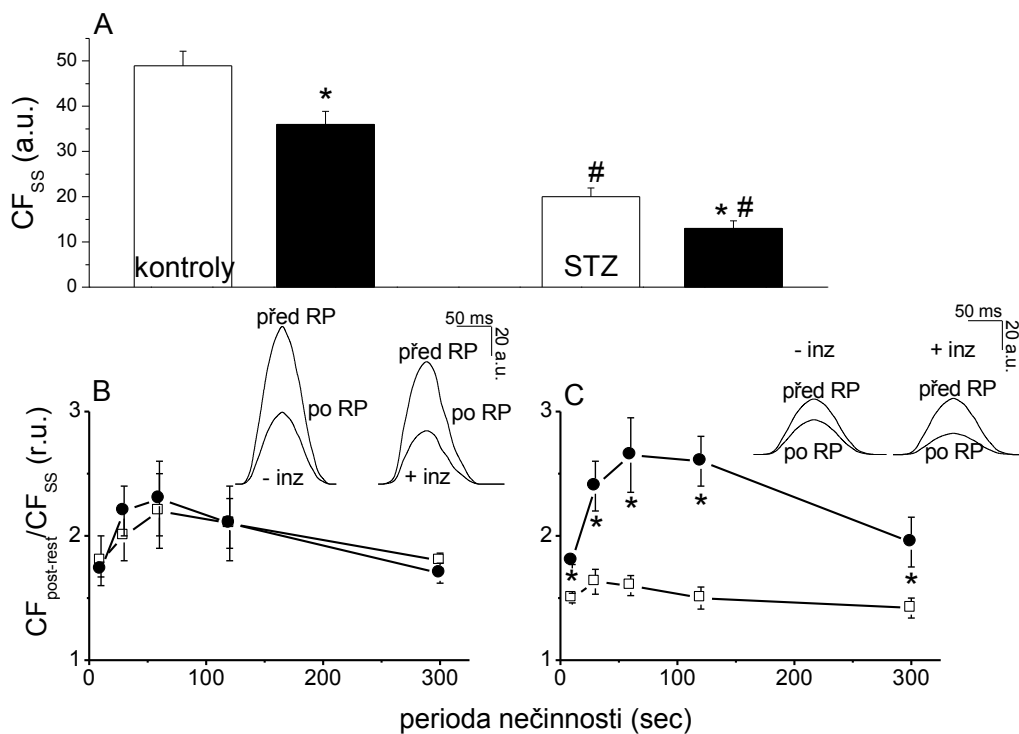
A. Závislost poločasu relaxace ($R/2$) na stimulační frekvenci u kontrolních potkanů ($n=5$). **B.** Závislost $R/2$ na stimulační frekvenci u diabetických potkanů ($n=6$). Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: zvýšená koncentrace vápníku (6 mmol/l), plné trojúhelníky: zvýšená koncentrace vápníku (6 mmol/l) + inzulín (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$).

Negativně inotropní účinek inzulinu a sarkoplazmatické retikulum

Síla kontrakce po periodě nečinnosti (RP) je u potkanů větší ve srovnání se silou kontrakce před RP. Tento jev se nazývá post-rest zesílení kontrakce a je spojen zejména s činnostmi NCX a SERCA (Shattock a Bers 1989, Bers a Christensen 1990). Abychom získali více informací o účinku diabetu a inzulinu na kontraktilitu, sledovali jsme post-rest zesílení v kontrolním roztoku a v roztoku s inzulinem u obou experimentálních skupin. Stimulace v ustáleném stavu (1 Hz) byla přerušena periodou nečinnosti různého trvání (od 10 do 300 s). Síla první kontrakce po RP u kontrolní skupiny byla vždy zesílená ve srovnání se silou kontrakce v ustáleném stavu s tím, že maximální nárůst síly jsme pozorovali po RP trvající 60 s. Inzulin u kontrol neovlivnil post-rest zesílení (obr. 3.1.11.B).

V srdci diabetických potkanů byla post-rest potenciace rovněž přítomna. Ve srovnání s kontrolními zvířaty byla však méně vyjádřena, rovněž její závislost na délce trvání RP byla méně výrazná (obr. 3.1.11.C). Inzulin, na rozdíl od kontrolních zvířat, významně zvýšil post-rest potenciaci u diabetických potkanů (obr. 3. 1.11.C).

Abychom lépe objasnili roli SR v účinku inzulinu a dlouhotrvajícího diabetu, použili jsme cyklopiazonovou kyselinu (CPA), což je selektivní blokátor SERCA. Cyklopiazonová kyselina (3 $\mu\text{mol/l}$) způsobila negativně inotropní účinek u kontrolních i diabetických zvířat, při stimulační frekvenci 1 Hz poklesla CF z $47 \pm 2,8$ a.u. na $26 \pm 2,7$ a.u. ($n=5$, $p<0,05$) u kontrolních potkanů a z $23 \pm 2,9$ a.u. na $14 \pm 1,5$ a.u. ($n=6$, $p<0,05$) u diabetických potkanů (obr. 3.1.12.A).

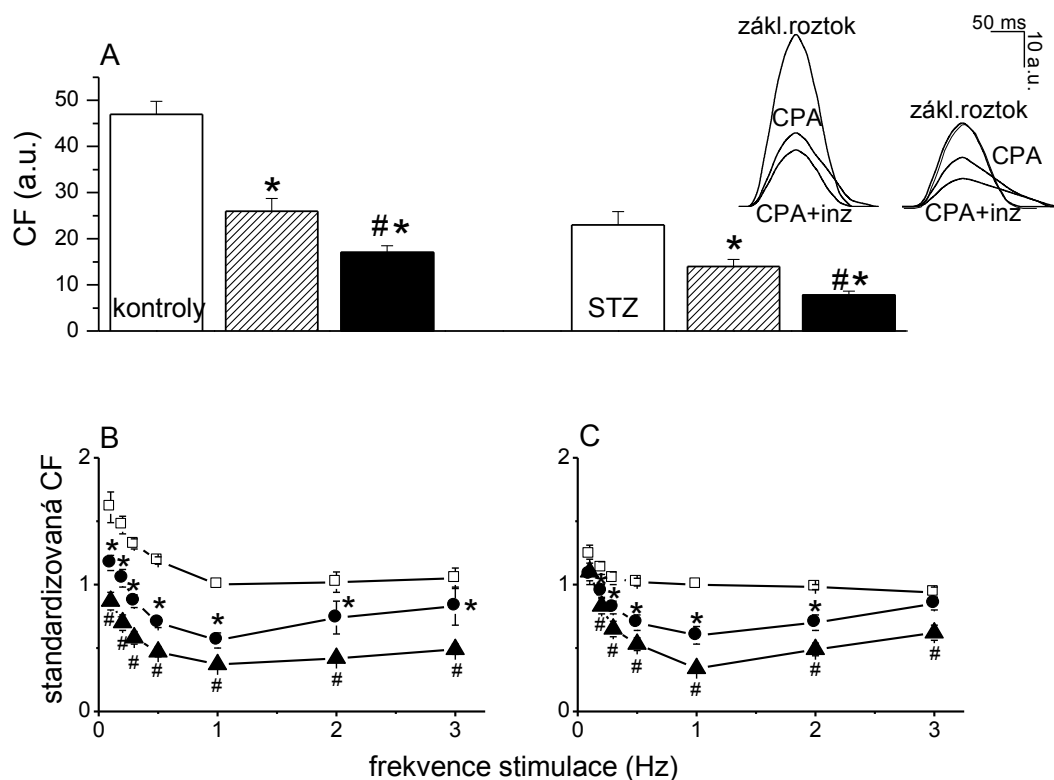


Obr. 3.1.11. Účinek inzulinu na post-rest zesílení kontrakce u kontrolních a diabetických zvířat.

A. Síla kontrakce (CF) před periodou nečinnosti (RP) při frekvenci stimulace 1 Hz. Levá část: kontrolní potkani (n=5), pravá část: STZ potkani (n=6). Prázdné sloupce: kontrolní roztok, plné sloupce: roztok s inzulinem (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat ($p < 0,05$).

B. Efekt inzulinu na post-rest zesílení u kontrol (n=5). Levý inset: CF před a po RP v kontrolním roztoku. Pravý inset: CF před a po RP v roztoku obsahujícím inzulin.

C. Efekt inzulinu na post-rest zesílení u diabetických zvířat. Levý inset: CF před a po RP v kontrolním roztoku. Pravý inset: CF před a po RP v roztoku obsahujícím inzulin. Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: inzulin (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$). – inz: roztok bez inzulinu, + inz: roztok s inzulinem (80 m.j./l).



Obr. 3.1.12. Negativně inotropní účinek inzulinu v přítomnosti CPA

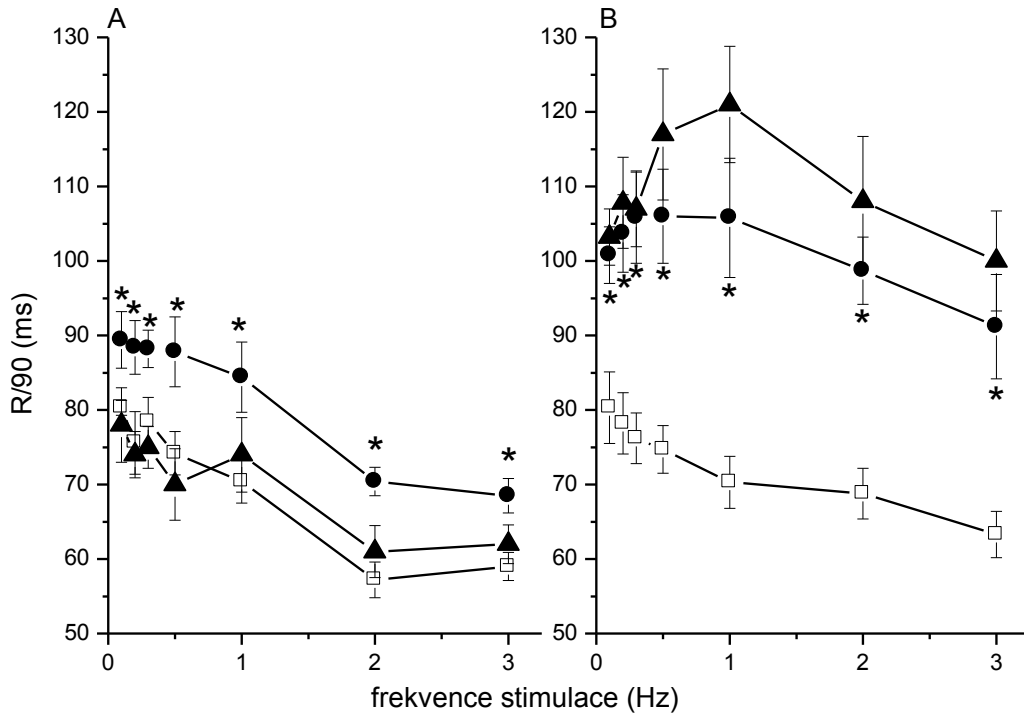
A. Síla kontrakce (CF) při frekvenci stimulace 1 Hz. Levá část: kontrolní potkani ($n=5$), pravá část: STZ potkani ($n=6$). Prázdné sloupce: kontrolní roztok, šrafované sloupce: CPA ($3 \mu\text{mol/l}$), plné sloupce: CPA ($3 \mu\text{mol/l}$) + inzulin (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p<0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v roztoku s CPA ($p<0,05$).

B. CF při různých frekvencích stimulace ($0,1 - 3 \text{ Hz}$) u kontrolních zvířat ($n=5$).

C. CF při různých frekvencích stimulace ($0,1 - 3 \text{ Hz}$) u diabetických zvířat ($n=6$). Hodnoty byly standardizovány na hodnotu CF v kontrolním roztoku při stimulační frekvenci 1 Hz. Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: CPA ($3 \mu\text{mol/l}$), plné trojúhelníky CPA ($3 \mu\text{mol/l}$) + inzulin (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p<0,05$), # statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v roztoku s CPA ($p<0,05$).

Levý inset: vliv CPA a CPA + inzulinu (inz) na CF při stimulační frekvenci 1 Hz u

kontrolních potkanů. Pravý inset: Vliv CPA a CPA + inzulinu na CF při stimulační frekvenci 1 Hz u diabetických potkanů.



Obr. 3.1.13. Vliv CPA a CPA+ inzulinu na průběh relaxace

A. Trvání relaxace u kontrolních potkanů (n=5). **B.** Trvání relaxace u STZ potkanů (n=6). Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: CPA (3 μmol/l), plné trojúhelníky: CPA (3 μmol/l) + inzulin (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$).

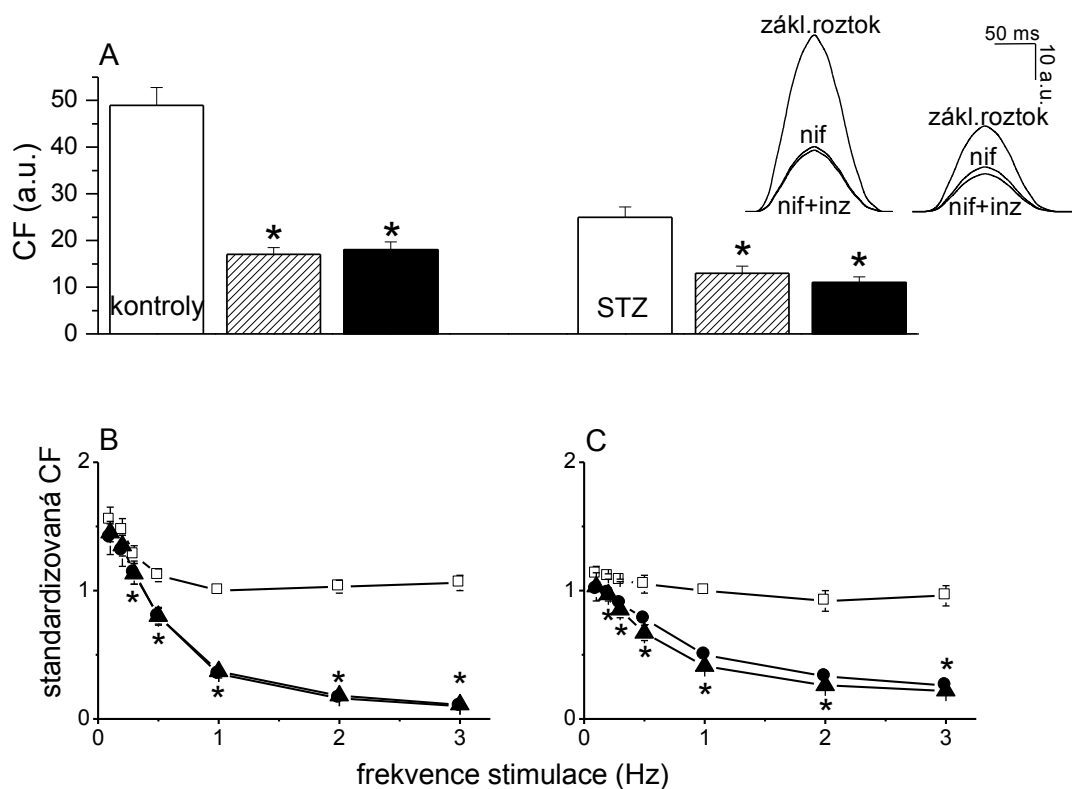
Aplikace inzulinu do roztoku s CPA dále prohloubila pokles CF způsobený cyklopiazonovou kyselinou opět u obou experimentálních skupin (obr. 3. 1.12). Negativně inotropní účinek inzulinu byl v přítomnosti CPA (obr. 3. 1.12) podobný jako v roztoku bez CPA (obr. 3. 1.12).

CPA neovlivnila trvání kontrakce, ale významně prodloužila trvání relaxace, a to zejména její druhé poloviny jak u kontrolních tak u diabetických

potkanů (obr. 3.1.13). Při stimulační frekvenci 2 Hz se časový parametr R_{90} prodloužil z $57,2 \pm 2,4$ ms (kontrolní roztok) na $70,4 \pm 1,9$ ms (CPA) u kontrol a z $68,8 \pm 3,4$ ms (kontrolní roztok) na $98,7 \pm 4,5$ ms (CPA) u STZ zvířat. Inzulin normalizoval trvání relaxace, ovšem pouze u kontrolních a nikoliv u diabetických potkanů (obr. 3.1.13).

Negativně inotropní účinek inzulinu a I_{CaL}

Dalším pravděpodobným místem inotropního účinku inzulinu by mohl být L- Ca^{2+} kanálu, který slouží transsarkolemálnímu transportu vápníku. Z tohoto důvodu jsme v další sérii pokusů studovali účinek inzulinu v přítomnosti nifedipinu – blokátoru I_{CaL} . Nifedipin ($3 \mu\text{mol/l}$) oslabil CF v obou experimentálních skupinách (obr. 3.1.14). Tento efekt nifedipinu byl závislý na stimulační frekvenci, jak již bylo popsáno dříve (Schouten a ter Keurs, 1991). Negativně inotropní účinek nifedipinu byl více vyjádřen při vyšších frekvencích stimulace (obr. 3.1.14.B, 3.1.14.C), například CF u kontrolních potkanů v přítomnosti nifedipinu byla redukována při stimulační frekvenci 0,1 Hz pouze na $91 \pm 0,7\%$ kontrolní kontrakce, kdežto při stimulační frekvenci 3 Hz až na $9,4 \pm 4,9\%$ ($n=5$, $p<0,05$); u diabetických potkanů za stejných podmínek poklesla CF na $89,3 \pm 5,2\%$, resp. $27,1 \pm 1,8\%$ ($n=6$, $p<0,05$). Aplikace inzulinu do roztoku s nifedipinem sílu kontrakce dále neovlivnila. Změny po přidání inzulinu jsme nepozorovali ani při nižších stimulačních frekvencích, při kterých byl efekt nifedipinu minimální (obr. 3.1.14.B, 3.1.14.C).



Obr. 3.1.14. Účinek inzulinu na sílu kontrakce v přítomnosti nifedipinu

A. Síla kontrakce (CF) při frekvenci stimulace 1 Hz. Levá část: kontrolní potkani (n=5), pravá část: STZ potkani (n=6). Prázdné sloupce: kontrolní roztok, šrafované sloupce: nifedipin (3 $\mu\text{mol/l}$), plné sloupce: CPA (3 $\mu\text{mol/l}$) + inzulin (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$).

B. CF při různých frekvencích stimulace (0,1 – 3 Hz) u kontrolních zvířat (n=5). **C.** CF při různých frekvencích stimulace (0,1 – 3 Hz) u diabetických zvířat (n=6). Hodnoty byly standardizovány na hodnotu CF v kontrolním roztoku při stimulační frekvenci 1 Hz. Prázdné čtverce: kontrolní roztok, plné kroužky: nifedipin (3 $\mu\text{mol/l}$), plné trojúhelníky nifedipin (3 $\mu\text{mol/l}$) + inzulin (80 i.u./l), * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku ($p < 0,05$). Levý inset: vliv nifedipinu (nif) a nifedipinu + inzulinu (inz) na CF při stimulační frekvenci 1 Hz u kontrolních potkanů. Pravý inset: Vliv nifedipinu a nifedipinu + inzulinu na CF při stimulační frekvenci 1 Hz u diabetických potkanů.

3.1.3. Diskuse

Prioritním nálezem uvedených měření je skutečnost, že inzulin vykazoval negativně inotropní účinek u papilárních svalů kontrolních i diabetických potkanů. Inotropní účinek inzulinu byl závislý na koncentraci vápníku v extracelulárním prostředí. U kontrolních zvířat měl inzulin při snížené koncentraci vápníku pozitivně inotropní účinek a při zvýšené koncentraci sílu kontrakce neovlivnil. Změna koncentrace vápníku v roztoku u diabetických zvířat potlačila inotropní účinek inzulinu. Naše výsledky naznačují, že negativně inotropní účinek inzulinu by mohl souviset s činností kanálu I_{CaL} a s procesem uvolňování vápníku ze SR. Naopak, proces plnění SR vápníkem, zejména aktivita SERCA, k tomuto inzulinovému efektu pravděpodobně nepřispívá. Našimi experimenty jsme dále potvrdili negativně inotropní vliv chronického diabetu, popsany již dříve (Penpargkul et al., 1980; Brown et al., 2001).

Inotropní účinek inzulinu v srdci intaktního potkana

Účinek inzulinu na srdeční kontraktilitu u laboratorního potkana je jev poměrně málo studovaný a dosud prezentované výsledky nejsou jednotné. Byl popsán pozitivně inotropní účinek (Sethi et al., 1991), negativně inotropní účinek (Farah a Alousi, 1981) a dokonce nulový účinek (Schmidt a Koch, 2002; Ren et al., 1999) inzulinu na sílu srdeční kontrakce. V našich experimentech inzulin (80 i.u./l) snižoval sílu kontrakce papilárního svalu v průměru o 25 % hodnoty u kontrolních zvířat.

Důvody rozdílných výsledků výše uvedených prací jsou zatím nejasné, jednou z příčin by mohly být rozdílné experimentální podmínky. Extracelulární

koncentrace vápníku ($[Ca^{2+}]_e$) v pracovním roztoku je jedním z určujících faktorů síly srdečního stahu. Ve výše uvedených studiích byly použity různé koncentrace $[Ca^{2+}]_e$, což mohlo přispět k různorodosti dosažených výsledků. Závislost inotropního účinku inzulinu na extracelulární koncentraci vápníku již byla prokázána na izolovaném srdci laboratorního potkana a morčete, kdy byla měřena síla kontrakce levé komory. Při $[Ca^{2+}]_e$ 1,25 mmol/l a nižší vyvolal inzulin (64 i.u./l) pozitivně inotropní účinek, při $[Ca^{2+}]_e$ 5 mmol/l byl zaznamenán negativně inotropní účinek a při $[Ca^{2+}]_e$ 2,5 mmol/l neměl inzulin žádný účinek (Schmidt a Koch, 2002). V našich experimentech prováděných na papilárních svalech jsme rovněž prokázali, že $[Ca^{2+}]_e$ ovlivňuje charakter inotropního účinku inzulinu u intaktních zvířat. Při $[Ca^{2+}]_e$ 2 mmol/l inzulin zeslaboval CF papilárního svalu, pokles $[Ca^{2+}]_e$ na třetinu (0,67 mmol/l) změnil negativně inotropní účinek na pozitivní a vzestup $[Ca^{2+}]_e$ na trojnásobek (6 mmol/l) inotropní účinek inzulinu potlačil. Zodpovědět otázku, co je příčinou rozdílných kontraktálních účinků inzulinu při různých $[Ca^{2+}]_e$, je vzhledem ke složitosti vápníkového metabolismu velmi těžké. Lze však spekulovat, že při různých $[Ca^{2+}]_e$ se mění význam jednotlivých transportních systémů Ca^{2+} a jejich ovlivnění inzulinem pro výslednou kontrakční odpověď.

Dalším důležitým faktorem rozdílných výsledků může být místo původu papilárního svalu. V experimentech Rena et al. (1999) inzulin neovlivnil sílu kontrakce levokomorových papilárních svalů, zatímco v našem případě měl inzulin negativně inotropní efekt na pravokomorové papilární svaly. Rozdíly elektrofyzilogických a mechanických vlastností mezi pravou a levou komorou byly popsány již dříve (Nand et al., 1997; Casis et al., 1998).

Z informací dostupných v literatuře lze usuzovat, že inotropní účinek inzulínu závisí rovněž na velikosti použité dávky. Ren et al. (1999) dosahoval pozitivně inotropního účinku s dávkou od 1 do 15 m.j./l, vyšší dávky (70 m.j./l) kontrakci zeslabovaly. V pokusech Schmidta a Kocha (2002) v roztocích s extracelulární koncentrací kalcia (2,5 mmol/l) bylo zaznamenáno největší zesílení kontrakce v rozmezí koncentrace inzulínu 8-16 m.j./l, při použití vyšší koncentrace inzulínu (30 m.j./l) měl inzulín negativně inotropní efekt. Naše výsledky tedy korespondují s výše uvedenými údaji, kdy námi použitá dávka inzulínu (80 m.j./l) je vyšší a vyvolala negativně inotropní účinek.

Aplikace inzulínu ovlivnila rovněž trvání kontrakce a relaxace, kdy v srdci kontrolních potkanů došlo ke zkrácení jak TTP, tak i R/2. Toto zkrácení odpovídá údajům o účincích inzulínu na úrovni buňky – inzulín stimuluje L-typ vápníkového kanálu (Aulbach et al., 1999), NCX (Ballard et al., 1994) a interakci mezi substrátem inzulínového receptoru a SERCA2 (Algenstaedt et al., 1997).

Mechanismus negativně inotropního účinku inzulínu

O myokardu potkana je známo, že na periodu nečinnosti reaguje zesílením kontrakce po této periodě (post-rest potenciace). Na tomto jevu se podílí zejména NCX, který u potkana během pauzy čerpá Ca^{2+} do buňky, a následně SERCA (Shattock a Bers, 1989; Bers a Christensen, 1990). V našich experimentech inzulín neovlivnil post-rest zesílení u zdravých zvířat, u diabetických potkanů inzulín post-rest zesílení kontrakce dokonce zvyšoval. Tyto výsledky naznačují, že negativně inotropní účinek inzulínu pravděpodobně nesouvisí s procesem plnění SR vápníkem. Abychom ověřili

tuto domněnku, provedli jsme měření v přítomnosti CPA, blokátoru SERCA. Přidání inzulínu do roztoku s CPA oslabilo sílu stahu podobným způsobem jako v nepřítomnosti CPA, a to jak u kontrolních, tak i u diabetických potkanů. Tato nezávislost účinku inzulínu a CPA jasně naznačuje, že proces plnění SR vápníkem pomocí SERCA2 není rozhodujícím činitelem negativně inotropního účinku inzulínu a že je třeba hledat jiný mechanismus inzulínového efektu.

Dalším pravděpodobným místem inotropního účinku inzulínu by mohl být sarkolemální vápníkový proud nesený vápníkovým kanálem L-typu (I_{CaL}). Nifedipin, blokátor I_{CaL} , zeslaboval CF a to v závislosti na stimulační frekvenci, což bylo popsáno již dříve (Schouten a ter Keurs, 1991). Inzulín přidaný do roztoku s nifedipinem již dále neovlivňoval sílu stahu. Negativně inotropní účinek inzulínu se neprojevil ani při nižších stimulačních frekvencích, kde nifedipin oslaboval CF pouze minimálně. Na základě těchto experimentů by bylo možné vyslovit hypotézu, že inzulín inhibuje I_{CaL} a že redukce tohoto proudu způsobuje negativně inotropní účinek inzulínu. Vliv inzulínu na I_{CaL} byl v kardiomyocytech potkana již studován přímo pomocí techniky patch-clamp a bylo nalezeno, že I_{CaL} je inzulínem naopak stimulován (Aulbach et al., 1999). Pokud lze předpokládat, že podobný stimulační účinek inzulínu na I_{CaL} nastává i u multicelulárního preparátu, nejpravděpodobnějším mechanismem negativně inotropního účinku inzulínu by mohlo být narušení procesu spouštění a uvolňování vápníku ze sarkoplazmatického retikula (zhoršení efektivity tohoto procesu).

Negativně inotropní účinek diabetu

Potkani se STZ diabetem vykazovali všechny charakteristické známky diabetu: zvýšení hladiny glukózy v krvi, pokles plazmatické koncentrace inzulinu, stagnace tělesné hmotnosti. Šestnáct týdnů trvajících diabetes vedl v našich podmínkách k poklesu síly srdeční kontrakce. Kromě toho došlo k prodloužení průběhu jak kontrakce tak i relaxace. Naše výsledky se shodují se závěry prací publikovaných dříve (Ren et al., 1999; Brown et al., 1996). Při zkoumání mechanismu negativně inotropního působení diabetu bylo provedeno mnoho experimentů na diabetických zvířatech, a to na buněčné i molekulární úrovni. Byla popsána řada změn ve vápníkovém hospodářství srdeční buňky, které vznikly v souvislosti s rozvojem diabetu: redukce I_{CaL} (Lee et al., 1992), snížený počet ryanodinových receptorů SR (Yu et al., 1994; Teshima et al., 2000), pokles koncentrace mRNA i proteinu SERCA2 (Kim et al., 2001), inhibice SERCA2 zvýšenou hladinou nefosforylovaného fosfolambanu (Kim et al., 2001), pokles koncentrace mRNA a proteinu NCX (Hattori et al., 2000), alterace činnosti sarkolemální Ca^{2+} -ATPázy (Heyliger et al., 1987). Byly prokázány také významné změny na úrovni kontraktálních proteinů: pokles senzitivity k vápníku, přeměna V_1 izoformy myozinu na izoformu V_3 , která má nižší ATPázovou aktivitu (Malhotra a Sanghi, 1997) a zpomalení rychlosti tvorby příčných můstku mezi aktinem a myozinem (Ishikawa et al., 1999).

Inotropní účinek inzulinu v srdci diabetického potkana

Negativně inotropní efekt inzulinu byl u STZ zvířat ve srovnání s kontrolami více vyjádřen – pokles CF v přítomnosti inzulinu byl u STZ

potkanů téměř 40%, u intaktních zvířat 25 %. Nárůst síly kontrakce po RP byl u diabetických zvířat stimulován inzulinem. Inzulin u diabetických zvířat neovlivnil trvání kontrakce ani relaxace. Na rozdíl od kontrolních potkanů neměl inzulin u STZ skupiny žádný vliv na CF či časový průběh kontrakce a relaxace v roztocích se změněnou koncentrací vápníku.

Kontraktilní účinky inzulinu v diabetickém srdci tedy vykazují celou řadu rozdílů ve srovnání s normálním srdcem. Příčinou jsou patrně mnohočetné účinky diabetu na vápníkové hospodářství (viz výše), které nastavují novou základní situaci s odlišnými relativními příspěvky jednotlivých komponent Ca^{2+} metabolismu.

V inotropním účinku inzulinu u diabetických potkanů pravděpodobně hraje svoji roli i trvání diabetu. Papilární svaly potkanů s krátkodobým diabetem trvajícím 5-7 dnů reagovaly na podání inzulinu zesílením kontrakce (Ren et al., 1999). Naproti tomu naše měření byla prováděna u potkanů s dlouhodobým diabetem (16 týdnů) a inzulin měl v tomto případě negativně inotropní účinek. Je tedy možné, že po určité době trvání onemocnění, dochází v srdci STZ zvířat k takovým změnám, které vedou ke změně účinku inzulinu na sílu srdeční kontrakce.

3.2. Uvolňování noradrenalinu v srdečních síních laboratorního potkana

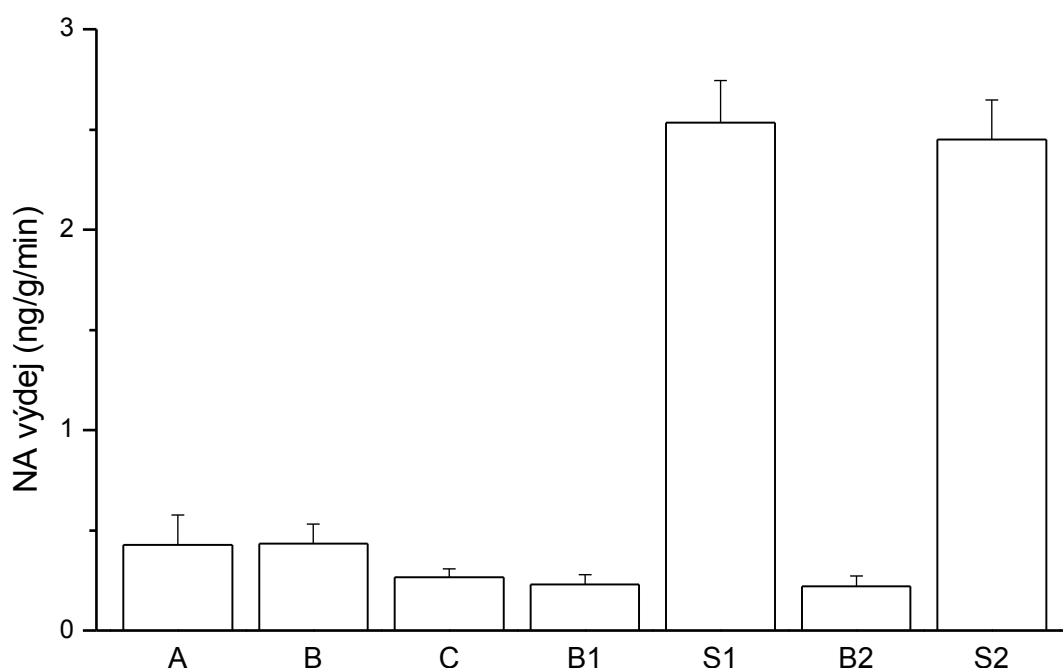
3.2.1. Úvod

Diabetická autonomní neuropatie doprovází pozdější stádia diabetu a přispívá k nárůstu morbidity a mortality diabetických pacientů (Burger et al., 1999). Na základě četných pozorování diabetických pacientů lze říci, že DM 1. typu poškozuje jak sympatickou, tak i parasympatickou část autonomního nervového systému (Hilsted 1982, Eckberg et al., 1986; Lishner et al., 1987). Kvantitativní údaje o vlivu diabetu na sympatickou inervaci srdečního svalu nejsou jednotné. V časných stádiích onemocnění bylo popsáno, že se koncentrace noradrenalinu (NA) v srdci zvyšuje (Paulson a Light, 1981; Akiyama et al., 1989; Ganguly et al., 1987), nebo nemění (Gando et al., 1993; Patel et al., 1997), v pozdějších stádiích diabetu byl pozorován její pokles (Wisniewska a Wisniewski, 1996; Schmidt et al., 1999), nebo žádná změna (Felten et al., 1982, Vadlamudi a McNeill, 1984; Zola et al., 1988). Rovněž obrát nebo uvolňování NA v srdci diabetického potkana byl zvýšen (Ganguly et al., 1987), nezměněn (Patel et al., 1997) nebo redukován (Gando et al., 1993). Plazmatická koncentrace katecholaminů byla buď zvýšena (Paulson a Light, 1981; Wisniewska a Wisniewski, 1996), nebo nezměněna (Christensen, 1979). Výše zmíněné rozdílné výsledky mohou souviset s odlišnostmi experimentálního modelu, např. s trváním a závažností diabetu, pohlavím, druhem a věkem zvířete či s rozdíly v použitých metodách.

Cílem této části práce bylo posoudit, jak diabetes ovlivní koncentraci, uvolňování a zpětné vychytávání NA v sympatických vláknech inervujících srdce samic laboratorního potkana v časném a pozdějším stádiu onemocnění, tj. 1, 4 a 7 měsíců po indukci diabetu. Uvolňování NA ze srdečních síní bylo studováno *in vitro* za bazálních podmínek a po stimulaci depolarizací, která

byla navozena zvýšením extracelulární koncentrace draslíku (K^+ evoked release, KER). Obrázek 3.2.1 ukazuje uvolňování NA v síních kontrolních zvířat při přípravných pokusech. Během 30-minutové stabilizace byla stanovena koncentrace NA ve třech desetiminutových vzorcích označených A, B a C. Bazální výdej NA (B1 a B2) byl asi desetkrát nižší než výdej stimulovaný vysokou koncentrací draslíku (S1 a S2).

Diabetes byl u samic laboratorního potkana (stáří 50 dnů) indukován aplikací STZ způsobem podrobně popsáným v kapitole "Metody". Diabetická zvířata byla sledována 1, 4 a 7 měsíců po indukci diabetu, rozdělena do tří skupin a označena jako STZ1, STZ4 a STZ7. Kontrolní potkani, kterým byl podán citrátový pufr bez STZ, byli také rozděleni do tří skupin označených Cont1, Cont4 a Cont7. Koncentrace NA byla rovněž stanovena u dvouměsíčních kontrolních zvířat (Contr0). Za diabetická byla považována zvířata, jejichž glykémie nalačno po aplikaci STZ byla vyšší než 18 mmol/l (n=22). Experimentální protokol popisující uvolňování NA z izolovaných perfundovaných síní a stanovení koncentrace NA jsou uvedeny v kapitole "Metody".



Obr. 3.2.1. Výdej NA ze srdečních síní kontrolních potkanů Cont0 v přípravných pokusech.

Písmena A, B a C označují 10minutové intervaly stabilizace preparátu. B1, B2 – bazální výdej NA. S1, S2 – stimulovaný výdej NA.

3.2.2. Výsledky

Obecné

Před podáním STZ či citrátového pufru nebyly mezi zvířaty významné rozdíly v tělesné hmotnosti a hladině glukózy v krvi. Tělesná hmotnost kontrolních zvířat se postupně zvyšovala z 205 ± 4 g ve věku 2 měsíců až na 355 ± 10 g ve věku 9 měsíců. Tělesná hmotnost STZ potkanů se výrazně neměnila v průběhu celého experimentu, ve věku 2 měsíců (tj. před aplikací STZ) byla 195 ± 5 g a v devíti měsících 198 ± 11 g (skupina STZ7). Glykémie nalačno u kontrolních zvířat nepřesahovala hodnotu 7 mmol/l. Část

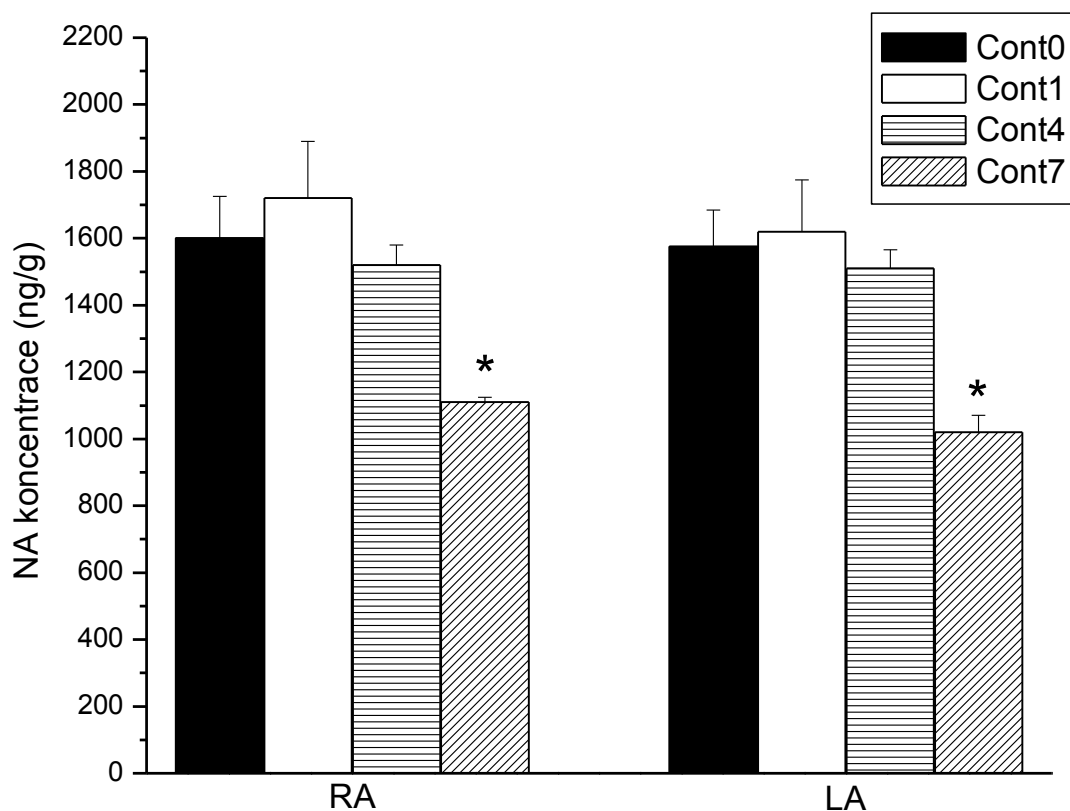
diabetických potkanů během pokusu uhynula (25%) nebo u nich došlo ke spontánní regeneraci β -buněk Langerhansových ostrůvků (35%), což snížilo počet zvířat v experimentální skupině STZ4 a STZ7 ve srovnání s kontrolními skupinami.

Koncentrace NA v srdečních síních kontrolních potkanů

Vliv věku na koncentraci NA v srdečních síních zdravých potkanů zobrazuje obrázek 3.2.2. Hodnoty koncentrace NA z levé i pravé síně byly srovnatelné ve všech věkových skupinách. Ve věku 2 měsíců (Cont0) byla koncentrace NA 1594 ± 137 ng/g a 1552 ± 93 ng/kg v pravé, resp. levé síni. U potkanů stáří 3 a 6 měsíců (Cont1, resp. Cont4) byly hodnoty koncentrace NA v obou síních srovnatelné s hodnotami naměřenými u dvouměsíčních zvířat. Hodnota koncentrace NA u devítiměsíčních potkanů (Cont7) byla v obou síních významně nižší ($p < 0,05$, vzhledem ke Cont0).

Koncentrace NA v srdečních síních diabetických potkanů

Diabetes výrazně ovlivnil koncentraci NA v srdečních síních (obr. 3.2.3). Po počátečním signifikantním vzestupu koncentrace NA v síních potkanů skupiny STZ1 ($p < 0,05$, vzhledem k odpovídajícím kontrolám) docházelo k postupnému poklesu koncentrace, který byl, ve srovnání s příslušnými kontrolami, statisticky významný u skupiny STZ7 ($p < 0,05$).



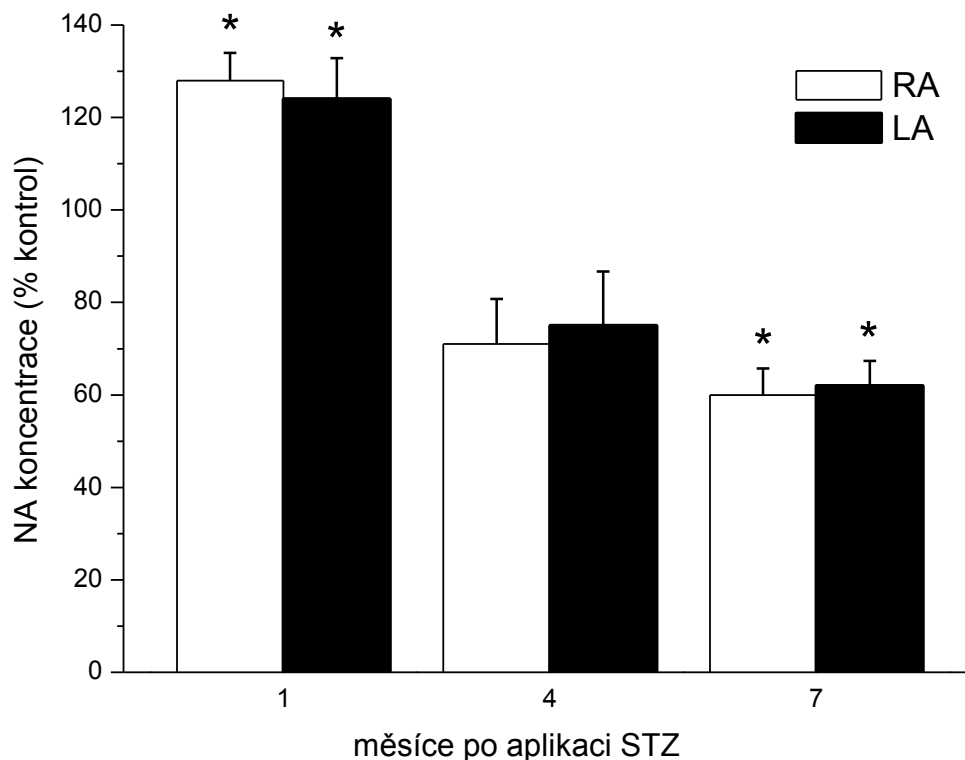
Obr. 3.2.2. Koncentrace noradrenalinu (NA) v srdečních síních kontrolních potkanů.

RA – pravá síň, LA – levá síň; Cont0, Cont1, Cont4 a Cont7 kontrolní dvou, tří, šesti a devítiměsíční potkani. * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami skupiny Cont0 ($p < 0,05$), $n=6$ pro každý oddíl i skupinu.

Bazální a stimulované uvolňování NA za kontrolních podmínek

U kontrolních zvířat se hodnota spontánně uvolněného NA (B1 a B2) nelišila v jednotlivých věkových kategoriích a pohybovala se mezi $0,199 \pm 0,01$ ng/g/min v Cont7 a $0,224 \pm 0,01$ v Cont1 síních. Bazální uvolňování NA se významně nelišilo v síních STZ1 a STZ7 ($0,239 \pm 0,02$ a $0,185 \pm 0,03$ ng/g/min) a zároveň bylo srovnatelné s věkově odpovídajícími kontrolami.

Rozdíl byl u STZ4, kde bylo bazální uvolňování NA významně vyšší ($0,371 \pm 0,03$ ng/g/min).

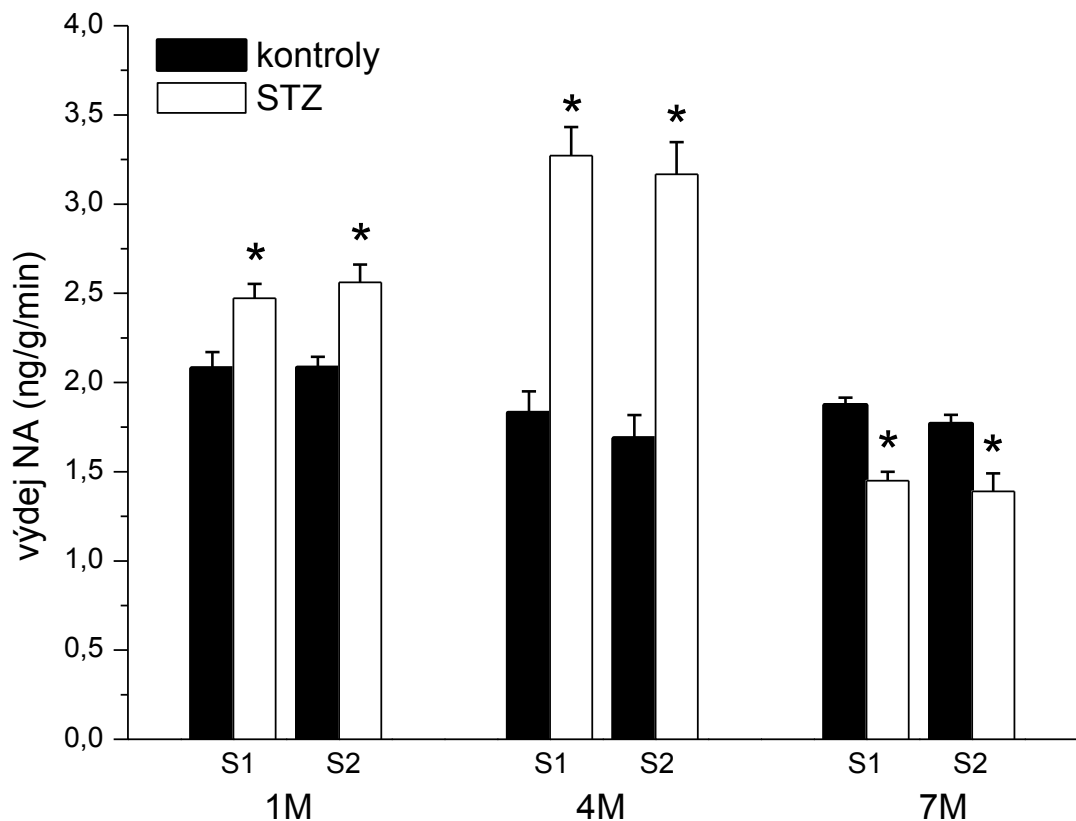


Obr. 3.2.3. Koncentrace noradrenalinu (NA) v srdečních síních diabetických potkanů.

Koncentrace NA je vyjádřena v % hodnot odpovídajících kontrolních zvířat. RA – pravá síň, LA – levá síň; * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami odpovídajících kontrolních zvířat ($p < 0,05$), $n=6$ pro všechny kontrolní skupiny, STZ1 a STZ4, $n=4$ pro skupinu STZ7.

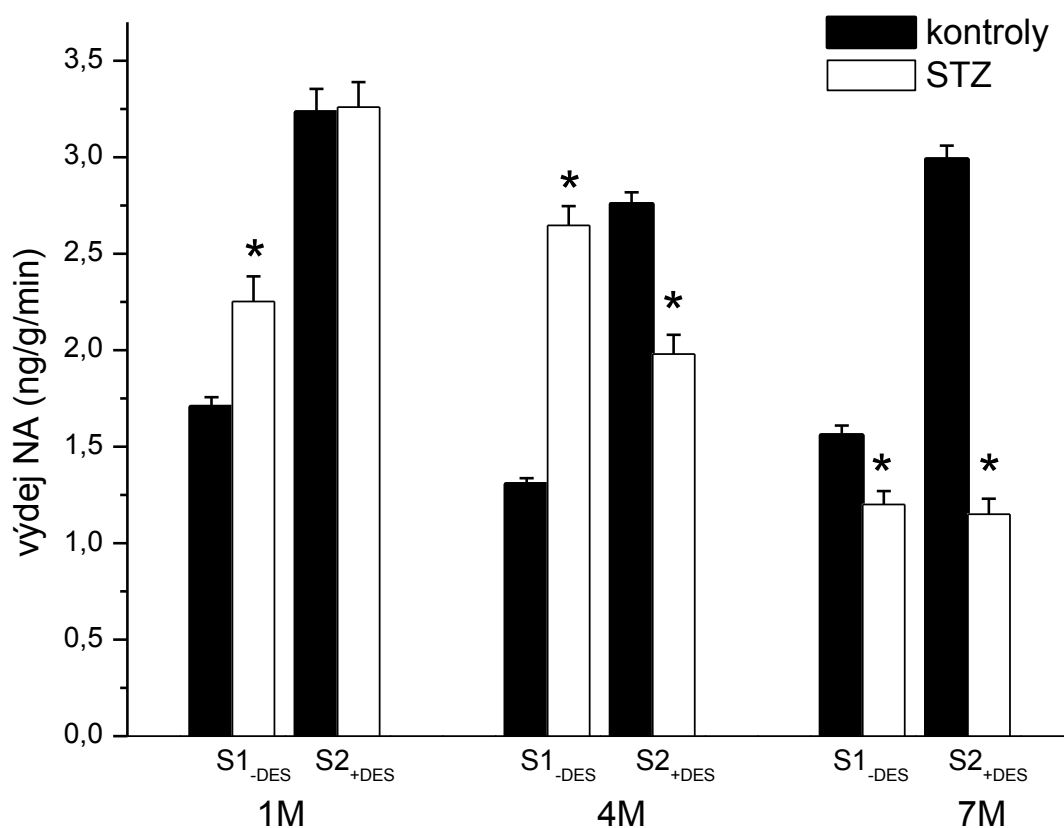
Ve srovnání s bazálním uvolňováním bylo stimulované uvolňování NA (S1 a S2) u všech věkových skupin výrazně vyšší, a to jak u kontrol, tak u STZ zvířat (obr. 3.2.4). Poměr hodnot stimulovaného uvolňování S2/S1 byl u kontrolních a diabetických zvířat srovnatelný a činil $1,07 \pm 0,1$ v síních

kontrolních zvířat a $0,99 \pm 0,2$ v síních STZ zvířat. Naproti tomu absolutní hodnoty stimulovaného uvolňování NA u diabetických zvířat byly vyšší v 1. a 4. měsíci po indukci diabetu, později docházelo k jejich poklesu (ve srovnání s intaktními zvířaty).



Obr. 3.2.4. Uvolňování noradrenalinu (NA) ze srdečních síní kontrolních a diabetických (STZ) potkanů.

Výdej NA stimulovaný vysokou koncentrací K^+ v perfuzním roztoku během první a druhé stimulace (S1, resp. S2) ze síní diabetických potkanů 1, 4 a 7 měsíců po indukci diabetu (1M, 4M, 7M). * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami odpovídajících kontrolních zvířat ($p < 0,05$), $n=5$ pro všechny kontrolní skupiny, STZ1 a STZ4, $n=4$ pro skupinu STZ7.



Obr. 3.2.5. Uvolňování noradrenalinu (NA) ze srdečních síní kontrolních a diabetických (STZ) potkanů bez a s desipraminem (DES).

Výdej NA stimulovaný vysokou koncentrací K^+ v perfuzním roztoku během první a druhé stimulace (S1_{-DES}, resp. S2_{+DES}) ze síní diabetických potkanů 1, 4 a 7 měsíců po indukci diabetu (1M, 4M, 7M). Inhibitor zpětného vychytávání NA desipramin byl přidán do perfuzního roztoku při sběru frakce S2. * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami odpovídajících kontrolních zvířat ($p < 0,05$), $n=5$ pro všechny kontrolní skupiny, STZ1 a STZ4, $n=4$ pro skupinu STZ7. -DES: perfuzní roztok bez desipraminu, +DES: pracovní roztok s desipraminem.

Účinek desipraminu na uvolňování NA

U skupin Cont1 a STZ1 jsme do perfuzního roztoku při sběru frakcí B2_{+DES} a S2_{+DES} přidali desipramin (DES) ve dvou koncentracích (10^{-7} a 10^{-6}

mol/l). DES neovlivnil množství NA uvolněné za bazálních podmínek, ale zvyšoval stimulované uvolňování NA (S_{2+DES}) ze síní kontrolních (Cont1) a diabetických (STZ1) zvířat a jeho efekt byl přímo úměrný použité koncentraci. Tento účinek DES byl výrazně nižší u vzorků STZ1 než u Cont1. Poměr S_{2+DES}/S_{1-DES} byl v síních Cont1 $1,35 \pm 0,09$ při koncentraci DES 10^{-7} mol/l a $1,89 \pm 0,09$ při koncentraci DES 10^{-6} mol/l. V síních STZ1 neměl DES v koncentraci 10^{-7} mol/l žádný účinek ($S_{2+DES}/S_{1-DES} = 0,96 \pm 0,16$) a v koncentraci 10^{-6} byl jeho efekt zřejmý, avšak ve srovnání s kontrolami nižší ($S_{2+DES}/S_{1-DES} = 1,55 \pm 0,12$). Nicméně vyšší koncentrace DES signifikantně zvyšovala stimulovaný výdej NA v síních STZ1.

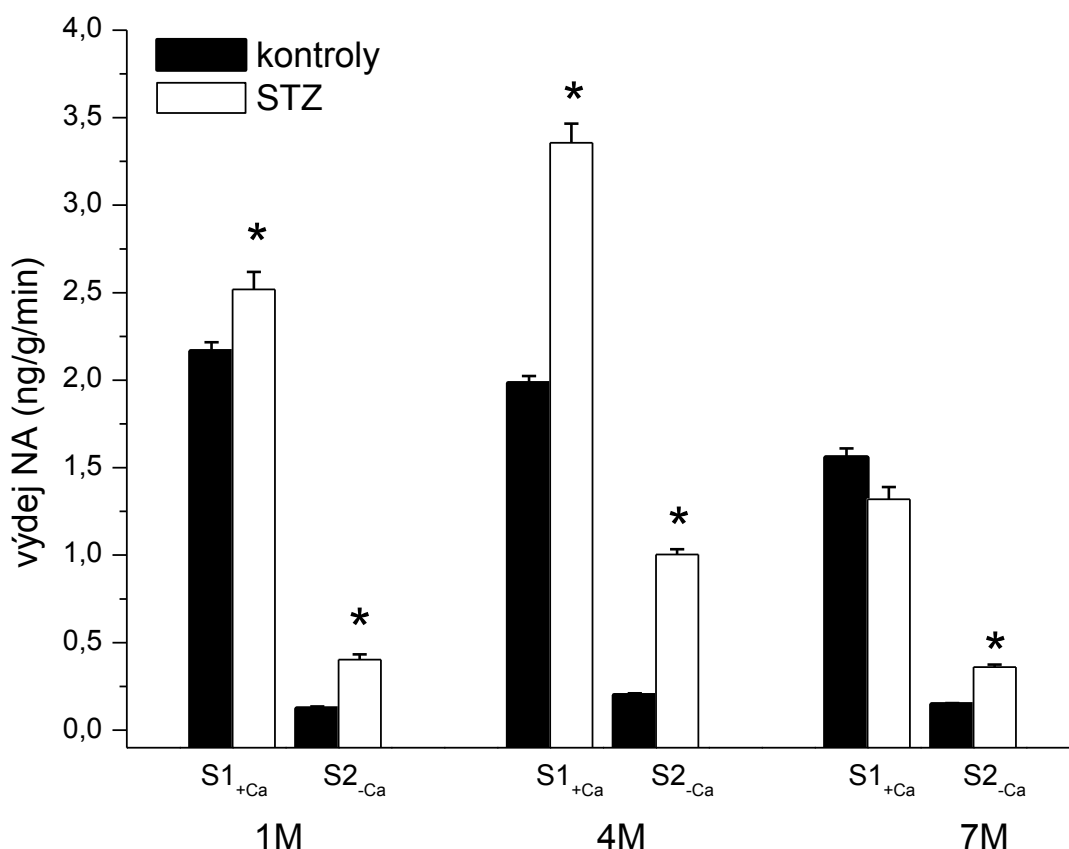
Naprosto odlišná situace byla u skupiny STZ4, kde DES (10^{-6} mol/l) významně inhiboval stimulované uvolňování NA. Je také zajímavé, že bazální výdej NA u STZ4, který byl výrazně vyšší než u kontrol (viz výše), byl v přítomnosti DES inhibován.

Bazální a stimulované uvolňování NA bez DES (B_{1-DES} a S_{1-DES}) i v přítomnosti DES (B_{2+DES} a S_{2+DES}) se u Cont4 a Cont7 nelišilo od Cont1. Poměr S_{2+DES}/S_{1-DES} byl $2,11 \pm 0,15$ u Cont4 a $0,74 \pm 0,07$ u STZ4. U skupiny STZ7 DES neovlivnil stimulovaný výdej NA (obr. 3.2.5).

Uvolňování NA v bezvápníkovém prostředí

Stimulované uvolňování NA v bezvápníkovém prostředí u kontrolních zvířat dosahovalo srovnatelných hodnot s bazálním výdejem v kontrolním roztoku a v celém průběhu pokusu nepřesáhlo 11% hodnot KER při normální koncentraci Ca^{2+} (poměr S_{2-Ca}/S_{1+Ca} se pohyboval od $0,06 \pm 0,01$ do $0,1 \pm 0,01$ ve všech kontrolních skupinách). Stimulovaný výdej NA

v bezvápníkovém prostředí byl u diabetických potkanů za 1 měsíc po indukci diabetu poněkud vyšší než u kontrolních zvířat (poměr $S2_{-Ca}/S1_{+Ca} = 0,17 \pm 0,01$), maxima dosáhl u STZ4 (poměr $S2_{-Ca}/S1_{+Ca} = 0,29 \pm 0,02$) a u potkanů STZ7 dosahoval rovněž vyšších hodnot (poměr $S2_{-Ca}/S1_{+Ca} = 0,27 \pm 0,02$) ve srovnání s intaktními zvířaty (obr. 3.2.6).



Obr. 3.2.6. Uvolňování noradrenalinu (NA) ze srdečních síní diabetických (STZ) potkanů s vápníkem a v bezvápníkovém prostředí.

Výdej NA stimulovaný vysokou koncentrací K^+ v perfuzním roztoku během první a druhé stimulace ($S1_{+Ca}$, resp. $S2_{-Ca}$) ze síní diabetických potkanů 1, 4 a 7 měsíců po indukci diabetu (1M, 4M, 7M). Síně byly promývány roztokem s vápníkem (+Ca) nebo bez vápníku (-Ca). * statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami odpovídajících kontrolních zvířat ($p < 0,05$), $n=5$ pro všechny kontrolní skupiny, STZ1 a STZ4, $n=4$ pro skupinu STZ7.

3.2.3. Diskuse

V této části práce jsme shromáždili některá nová data týkající se sympatické inervace srdce u diabetických samic laboratorního potkana. Koncentrace NA se v obou srdečních síních významně snižovala s věkem zvířat, největší pokles jsme zaznamenali mezi jedinci stáří 6 – 9 měsíců (40%). Naše výsledky jsou v souladu s výsledky longitudinální studie zaměřené na měření koncentrace NA v srdci samce laboratorního potkana (McLean et al., 1983).

Bylo zjištěno, že uvolňování a zpětné vychytávání NA v různých částech srdce laboratorního potkana klesá s věkem (Docherty, 1996; Snyder et al., 1998a; Snyder et al., 1998b). Snyder et al. (1998c) zaznamenali, že pokles schopnosti adrenergických zakončení uvolňovat NA je signifikantně nižší u samic ve srovnání se samci. Naše výsledky naopak neprokázaly, že by stáří zvířat ovlivňovalo uvolňování či vychytávání NA v izolovaných srdečních síních samic laboratorního potkana. Z toho vyplývá, že námi pozorovaný pokles koncentrace NA v srdeční tkáni nemůže být pravděpodobně způsoben zhoršenou funkcí transportního mechanismu nervových zakončení.

Koncentraci NA v srdečních síních diabetických zvířat jsme sledovali po dobu 7 měsíců. Počáteční mírný vzestup hodnoty NA (28%) v síních byl následován trvalým poklesem, kdy za 7 měsíců po indukci diabetu dosahovala koncentrace NA u STZ zvířat 60% hodnoty kontrolních zvířat. Také koncentrace NA v myokardu stanovovaná post mortem u lidí s dlouhodobým diabetem byla výrazně snížena (Neubauer a Christensen, 1976). S přihlédnutím k těmto skutečnostem lze konstatovat, že experimentální STZ

diabetes trvající méně než 4 měsíce nemůže věrně simulovat situaci, která by byla srovnatelná s obrazem chronického diabetu u lidí.

Mechanismus uvolňování NA ze zakončení postgangliových sympatických vláken je poměrně podrobně prostudován. Uvolnění mediátoru je iniciováno depolarizací, která způsobí vtok vápníku do terminály nervového vlákna, což vede k migraci synaptických měchýřků s mediátorem směrem k nervové membráně a k exocytóze. Uvolněný NA je odstraňován ze synaptické štěrbině zejména zpětným vychytáváním do nervového vlákna pomocí neuronálního přenašeče (Nedergaard, 1988). NA je transportován symportem s Na^+ a Cl^- , hnací silou přenašeče je koncentrační gradient sodíku zajišťovaný činností $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázy}$ (Rudnick a Clark, 1993). Za určitých podmínek, např. při poklesu koncentračního gradientu pro Na^+ nebo při vzestupu koncentrace NA uvnitř nervového vlákna může dojít k obrácení směru neuronálního přenašeče a NA je vypuzován z buňky ven (Langeloh et al., 1987; Trendelenburg, 1990; Levi a Raiteri, 1993). Blokátor neuronálního přenašeče desipramin inhibuje transport NA v obou směrech (Levi a Raiteri, 1993).

Depolarizace vyvolaná zvýšením $[\text{K}^+]_e$ ovlivňuje činnost různých přenašečů různě. Okuma a Osumi (1986) na řezech mozku potkana popsali, že uvolňování dopaminu (DA) indukované pomocí KCl je na vápníku nezávislé, na rozdíl od elektricky stimulovaného uvolňování DA. Avšak oba způsoby uvolňování NA (KER a elektrická stimulace) jsou na vápníku závislé. Rovněž v potkaním srdci je draslíkem indukované uvolňování NA závislé na vápníku (Dumont et al., 1997). Dosavadní výsledky však naznačují, že NA je vlivem KER uvolňován jak exocytózou, tak pomocí neuronálního přenašeče

(Yamazaki et al., 1998). Vzhledem k tomu, že draslíkem indukovaný výdej NA byl v přítomnosti DES zvýšen u všech kontrolních skupin, lze z výsledků našich experimentů *in vitro* usoudit, že draslíkem indukovaný výdej NA byl zprostředkován kalcium-dependentní exocytózou.

Obrat a výdej NA v srdci diabetických potkanů byl studován za různých experimentálních podmínek jak *in vivo*, tak *in vitro*. Ganguly et al. (1986) zaznamenali vzestup koncentrace a obratu NA v srdci samců potkana Sprague-Dawley 8 týdnů po indukci diabetu. Kromě toho zjistili, že intraneuronální měchýřky s NA mohou být v důsledku diabetu defektní, což přispívá ke zvýšení výdeje NA z cytoplazmy (Ganguly et al., 1987). Porucha výdeje NA exocytózou v levé srdeční síni byla rovněž popsána u diabetických samců kmene Wistar 8-12 týdnů po aplikaci STZ (Gando et al., 1993).

V našich experimentech nebyl bazální výdej NA v srdečních síních kontrolních ani diabetických potkanů ovlivněn s výjimkou skupiny zvířat STZ4, u nichž byl výdej NA výrazně vyšší než u kontrol a zároveň byl inhibován v přítomnosti DES, což svědčí spíše pro výdej NA cestou neuronálního přenašeče. Tento nárůst bazálního ne-exocytózového uvolňování NA může přispívat k poklesu koncentrace NA v síních STZ potkanů.

Absolutní hodnoty NA uvolněného vlivem KCl byly zvýšeny u vzorků STZ1 a STZ4. Pokud by však hodnota tkáňové koncentrace NA (zvýšená u STZ1 a snižená u STZ4) byla vztažena k hodnotě výdeje NA, větší podíl NA by se uvolňoval pouze ze síní potkanů STZ4. V tomto stádiu diabetu je výdej NA signifikantně inhibován v přítomnosti DES a relativně velká část výdeje NA (30%) je na vápníku nezávislá. Zdá se tedy, že neuronální transportér hraje významnou roli v kalcium-independtním uvolňování NA v této fázi diabetu.

Existují důkazy, že $[Na^+]_i$ je u diabetu významně zvýšena (Schaffer, 1991; Doliba et al., 2000). Koncentrační gradient pro sodík je tedy podstatně snížen, což může vést k ovlivnění činnosti neuronálního přenašeče. Navíc zvýšená koncentrace NA uvnitř buňky může zvyšovat afinitu intracelulární části přenašeče k NA (Langeloh et al., 1987). Kromě toho bylo zjištěno, že inzulin moduluje činnost NA přenašeče v SK-N-SH buňkách (buňky izolované z lidského neuroblastomu) (Apparsundaram et al., 2001). Proto by vliv dlouhodobé inzulinopenie na aktivitu NA transportéru zasluhoval další studium.

Na základě uvedených dat je obtížné vysvětlit, proč DES neovlivnil výdej NA v srdečních síních STZ7 zvířat. Údaje o dlouhodobém STZ diabetu potkanů jsou poměrně sporé, protože jen poměrně malá část zvířat přežívá bez částečné kompenzace diabetu. Existují práce, ve kterých je využíván ^{11}C -hydroxyfedrin - radioaktivní analog NA, který je aktivně vychytáván terminály srdečních sympatických nervů. U zvířat s diabetem trvajícím 6 a 9 měsíců je izotop méně zadržován, pravděpodobně v důsledku poruchy neuronálního vychytávání (Schmidt et al., 1999). Dlouhodobý diabetes navíc způsobuje závažné morfologické změny sympatických nervů inervujících srdce, včetně poškození varikosit, úbytku Schwannových buněk a degenerace nervových terminál (Felten et al., 1982; Tomlinson a Yusof, 1983; Addicks et al., 1993).

Závěrem lze tedy konstatovat, že zvýšený, draslíkem stimulovaný výdej v srdečních síních diabetických potkanů může mít příčinu v dysfunkci neuronálního přenašeče.

4. ZÁVĚR

Závěrem se pokusím shrnout nejdůležitější poznatky vyplývající z výsledků našich pozorování a nastínit směr dalšího výzkumu. Předložená disertační práce přináší některé nové poznatky o vlivu inzulínu na kontraktilní funkce papilárního svalu a o sympatické inervaci zdravých a diabetických laboratorních potkanů.

Diabetes jsme u potkanů indukovali farmakologicky pomocí STZ. Tento experimentální model diabetu 1. typu u laboratorního potkana je stabilní a mnoha badateli ověřený. Podobně jako u neléčeného diabetika je STZ diabetes charakterizován hyperglykemií, polydipsií, polyurií a poklesem tělesné hmotnosti (Hebden et al., 1986; Tomlinson et al., 1992). V průběhu několika týdnů po aplikaci STZ dochází k narušení systolických i diastolických funkcí, které je pozorováno i u člověka v rámci rozvoje diabetické kardiomyopatie. Stejně jako u STZ potkanů jsou známky poškození myokardu diabetických pacientů více vyjádřeny při zvýšení srdeční zátěže, např. při cvičení (Vered et al., 1984; Zola et al., 1986). Přestože srdeční funkce jsou u diabetiků ovlivněny i dalšími faktory (hypertenze, ateroskleróza, mikroangiopatie, neuropatie), existují četné důkazy pro přímé poškození kardiomyocytů, které je také podrobně popsáno u experimentálního modelu (Gotzsche, 1986). Vzhledem k tomu, že laboratorní potkan je poměrně rezistentní k ateroskleróze, poskytuje STZ model relativně neovlivněný obraz o působení hyperglykémie a inzulínopie na srdeční sval (Tomlinson et al., 1992). Na druhou stranu odolnost potkanů k ateroskleróze omezuje využití tohoto modelu pro studium makrovaskulárních komplikací diabetu, které jsou častým chronickým doprovodným jevem cukrovky u člověka.

U zvířat s experimentálním STZ diabetem dochází, kromě alterace kardiovaskulárního aparátu, rovněž k narušení funkce řady dalších systémů (endokrinní, renální, nervový), které zpětně ovlivňují činnost srdce a cév. Dysfunkce některých orgánů, např. ledvin, je důsledkem přímého vlivu STZ, inzulinopenie a hyperglykémie pouze potencují nefrotoxický efekt STZ (Tomlinson et al., 1992).

Je třeba mít na zřeteli, že STZ model reflektuje obraz humánního diabetu před určením správné diagnózy a zahájením odpovídající léčby. Vzhledem k tomu, že je téměř nemožné provést diagnózu DM u člověka bezprostředně po vzniku onemocnění, dává STZ model neocenitelnou možnost získat informace o časných změnách srdeční tkáně, které mohou později vést k narušení srdečních funkcí až k srdečnímu selhání. Lze tedy říci, že i přes jisté odlišnosti od průběhu DM 1. typu u lidí je STZ model diabetu u laboratorního potkana často používán, zejména pro svou spolehlivost a jednoduchost indukce.

V první části studie jsme se zabývali studiem vlivu inzulinu na kontraktilitu pravokomorových papilárních svalů intaktních a diabetických zvířat a pokusili jsme se o vysvětlení možného mechanismu inotropního účinku inzulinu. Dále jsme se pokusili charakterizovat změny mechanických vlastností srdečního svalu, ke kterým dochází v důsledku chronického diabetu.

Čtyři měsíce trvajícím diabetem vedl u potkanů k významnému snížení síly kontrakce, což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky (Ren et al., 1999; Brown et al., 1996). Příčinou je pravděpodobně porucha kalciového metabolismu kardiomyocytů (redukce I_{CaL} , pokles počtu RyR, snížená funkce

SERCA2, NCX aj.). Pro výrazné poškození vápníkového metabolismu srdečních buněk v důsledku dlouhodobého diabetu svědčí rovněž prodloužení kontrakce a relaxace ve srovnání s hodnotami získanými od kontrolních zvířat.

DM 1. typu je mimo jiné charakterizován hypoinzulinémií. U potkanů s krátkodobým diabetem bylo zjištěno, že aplikace inzulínu vyvolala pozitivně inotropní účinek (Ren et al., 1999). V našich pokusech jsme sledovali, zda akutní účinek inzulínu dokáže zabránit poklesu síly kontrakce u zvířat s chronickým diabetem. Literární údaje o vlivu inzulínu na kontraktilitu intaktního myokardu nejsou jednotné. Dosud byl popsán negativně inotropní (Farah a Alousi, 1981), pozitivně inotropní (Sethi et al., 1991) a nulový účinek (Schmidt a Koch, 2002) inzulínu na myokard potkana. Po počátečních pokusech s dávkou 8 m.j./l, kdy inzulín v našich podmínkách nevykazoval žádný účinek, jsme přistoupili k použití desetinásobně vyšší dávky. Z výsledků našich experimentů vyplývá, že inzulín v dávce 80 m.j./l má negativně inotropní účinek jak u kontrolních, tak u diabetických zvířat. U kontrolních zvířat inzulín zkrátí trvání kontrakce a relaxace. U diabetických zvířat nebyly tyto časové parametry inzulínem ovlivněny. Je tedy zřejmé, že poškození srdce u STZ potkanů je natolik závažné, že jednorázové podání inzulínu nemůže normalizovat změny trvání srdeční kontrakce a relaxace vzniklé v důsledku dlouhodobého diabetu.

Schmidt a Koch (2002) popsali závislost inotropního účinku inzulínu na $[Ca^{2+}]_e$ v pracovním roztoku v izolovaném srdci intaktního potkana a morčete. Ovlivnění účinku inzulínu změnou $[Ca^{2+}]_e$ jsme prokázali i v pokusech prováděných na papilárních svalech intaktních jedinců. Při sníženém $[Ca^{2+}]_e$ v pracovním roztoku vyvolal inzulín pozitivně inotropní účinek, při zvýšeném

$[Ca^{2+}]_e$ sílu kontrakce neovlivnil. U STZ potkanů v roztocích se změněnou $[Ca^{2+}]_e$ se inotropní účinek inzulinu neprojevil.

Abychom objasnili podstatu negativně inotropního účinku inzulinu, rozhodli jsme se sledovat jeho vliv na kontraktilitu v přítomnosti CPA, která blokuje SERCA, a nifedipinu - blokátoru I_{CaL} . Podání CPA nezabránilo negativně inotropnímu účinku inzulinu. Z toho tedy vyplývá, že proces plnění SR vápníkem prostřednictvím SERCA není pravděpodobně zodpovědný za výše zmíněný inotropní efekt inzulinu. Oslabení síly srdeční kontrakce v přítomnosti nifedipinu bylo popsáno již dříve (Schoulen a ter Kurs, 1991). V našich experimentech aplikace inzulinu na papilární sval ovlivněný nifedipinem významně nezměnila sílu stahu při žádné z použitých stimulačních frekvencí. Na základě těchto výsledků můžeme říci, že pravděpodobným místem inotropního účinku inzulinu by mohl být I_{CaL} . V experimentech prováděných na izolovaných kardiomyocytech však bylo zjištěno, že inzulin stimuluje I_{CaL} (Aulbach et al., 1999; Maier et al., 1999). Podobný stimulační účinek inzulinu bychom mohli předpokládat i u multicelulárního preparátu. Lze tedy spekulovat, že za negativně inotropním účinkem inzulinu stojí zhoršení procesu spouštění a uvolnění vápníku ze SR, které je indukováno právě zejm. vápníkovým proudem L-typu.

Naše dosavadní výsledky však mohou sloužit pouze jako nepřímý důkaz výše popsané hypotézy. K objasnění mechanismu inotropního účinku inzulinu plánujeme provést měření iontových proudů (I_{CaL}) a nitrobuněčných vápníkových přechodů u izolovaných kardiomyocytů intaktních a STZ potkanů.

K využití poznatků o inotropním účinku inzulinu v klinické praxi se na základě dosavadních znalostí nelze vyjádřit. Byly popsány významné

mezidruhové rozdíly v účinky inzulínu (Snow 1976; Lee a Downing, 1976; von Arnim a Bolte, 1980; Sethi et al., 1991; Farah a Alousi 1981; Ren et al., 1999; Schmidt a Koch, 2002). Proto by bylo vhodné si nejprve ověřit, zda se negativně inotropní účinek inzulínu projevuje i v lidském myokardu. Kromě toho je třeba vzít v úvahu, že inzulín byl v našich experimentech podán jednorázově. Nabízí se zde tedy otázka, zda chronické podávání inzulínu (jako je tomu v případě diabetických pacientů) bude mít podobné nebo rozdílné účinky. V každém případě by bylo vhodné při inzulínové léčbě diabetu brát v úvahu možnost přímých účinků inzulínu na srdeční inotropii.

Druhá část práce byla zaměřena na studium změn koncentrace, uvolňování a zpětného vychytávání noradrenalinu v srdečních síních laboratorního potkana s vyvíjejícím se dlouhodobým diabetem (7 měsíců) ve srovnání s kontrolními zvířaty.

Koncentrace NA v srdečních síních se u kontrolních i diabetických zvířat snižovala s věkem. Hodnota NA v srdci diabetických zvířat ve srovnání s intaktními zvířaty byla za 1. měsíc po indukci diabetu lehce zvýšena, v dalších měsících trvání onemocnění naopak klesala. Za 7 měsíců po aplikaci STZ dosahovala koncentrace NA pouze 60% hodnoty naměřené u kontrolních zvířat. Podobné změny v koncentraci NA byly popsány rovněž v srdci pacientů s dlouhodobým diabetem (Neubauer a Christensen, 1976).

Výdej NA jsme zkoumali za klidových podmínek a při stimulaci vysokou koncentrací K^+ v perfuzním roztoku (KER). Spontánní ani stimulovaný výdej NA u kontrolních zvířat se v průběhu experimentu neměnil. U skupin STZ1 a STZ7 se spontánní uvolňování NA nelišilo od kontrolních jedinců, pouze u

skupiny STZ4 jsme zaznamenali signifikantní zvýšení spontánního výdeje NA. Stimulovaný výdej NA u diabetických potkanů byl u skupin STZ1 a STZ4 zvýšen ve srovnání s kontrolami, u skupiny STZ7 naopak snížen. Podle dostupných údajů uvolňování NA vlivem KER u diabetických potkanů dosud nebylo popsáno.

NA může být z nervových zakončení uvolňován buď ze synaptických měchýřků terminál nervového vlákna exocytózou nebo obousměrným neuronálním přenašečem. Nejprve jsme se pokusili zdokumentovat, jakou měrou se na uvolňování NA podílí neuronální transportér. K tomuto účelu jsme použili desipramin, který blokuje činnost transportéru v obou směrech. Desipramin zvyšoval stimulovaný výdej NA u všech kontrolních zvířat a také u STZ1 skupiny, skupinu STZ7 významně neovlivnil. U skupiny STZ4 byl výdej NA desipraminem inhibován. To svědčí pro domněnku, že NA byl u zvířat STZ4 uvolňován zejména cestou neuronálního přenašeče a nikoliv exocytózou. Uvolňování NA exocytózou je závislé na přísunu vápníku z extracelulárního prostředí. Abychom popsali podíl exocytózy na uvolňování NA, provedli jsme pokusy v bezvápníkovém prostředí. U skupiny STZ4 byl stimulovaný výdej NA v bezvápníkovém prostředí ve srovnání s kontrolami významně zvýšen. Tato skutečnost je dalším nepřímým důkazem pro hypotézu, že v tomto stádiu diabetu hraje neuronální transportér nezávislý na vápníku rozhodující roli v uvolňování NA.

Z našich výsledků tedy vyplývá, že mechanismus uvolňování NA u potkanů s chronickým diabetem je pravděpodobně odlišný od mechanismu u kontrolních zvířat a může přispívat k poklesu koncentrace NA v srdečních síních STZ zvířat.

Je známo, že změny v činnosti neuronálního přenašeče pro NA mohou přispívat ke vzniku závažných srdečních onemocnění. Bylo například zjištěno, že zhoršení funkce tohoto transportéru má podíl na rozvoji srdečního selhání (Bucks et al., 2001). Analogicky lze uvažovat, že změna funkce přenašeče v srdci STZ potkanů by mohla přispívat ke vzniku diabetického poškození srdce. Jak již bylo dříve zmíněno, inzulin stimuluje činnost neuronálního přenašeče pro NA v SK-N-SH buňkách (Apparsundaram et al., 2001). Dále bylo popsáno, že v neuronech laboratorního potkana vedlo chronické podávání inzulinu k poklesu exprese mRNA pro tento transportní systém (Figlewicz et al., 1993). Vliv inzulinu na neuronální přenašeč pro NA v myokardu podle našich znalostí dosud popsán nebyl. V budoucnu plánujeme studium akutního účinku inzulinu na transportér kontrolních a diabetických potkanů a sledování činnosti neuronálního přenašeče v srdci nekompensovaných STZ potkanů a STZ potkanů léčených inzulinem.

5. LITERATURA

ADDICKS, K., BOY, C., ROSEN, P.: Sympathetic autonomic neuropathy in the heart of the spontaneous diabetic BB rat. *Anat. Anz.*, 1993, 175, 253-257.

AFZAL, N., PIERCE, GN., ELIMBAN, V., BEAMISH, RE., DHALLA, N.S.: Influence of verapamil on some subcellular defects in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.*, 1989, 256, E453-8.

AKIYAMA, A., OKAMURA, K., WATANABE, Z., HASHIMOTO, H., ITO, T., OGAWA, K., SATAKE, T.: Altered acetylcholine and norepinephrine concentrations in diabetic rat hearts. Role of parasympathetic nervous system in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, 1989, 38, 231-236.

ALGENSTAEDT, P.M., ANTONETTI, D.A., YAFFE, M.B., KAHN, C.R.: Insulin receptor substrate creates a potential link between tyrosine phosphorylation cascade and the Ca²⁺-ATPases in muscle and heart. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 23696-23702.

APPARSUNDARAMM, S., SUNG, U., PRICE, R.D., BLAKELY, R.D.: Trafficking-dependent and -independent pathways of neurotransmitter transporter regulation differentially involving p38 mitogen-activated protein kinase revealed in studies of insulin modulation of norepinephrine transport in SK-N-SH cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, 299, 666-677.

AULBACH, F., SIMM, A., MAIER, S., LANGENFELD, H., WALTER, U., KERSTING, U., KIRSTEIN, M.: Insulin stimulates L-type Ca²⁺ current in rat cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.*, 1999, 42, 113-120.

BACKS, J., HAUNSTETTER, A., GERBER, S.H., METZ, J., BORST, M.M., STRASSER, R.H., KUBLER, W., HAASS, M.: The neuronal norepinephrine transporter in experimental heart failure: evidence for a posttranscriptional downregulation. *J. Moll. Cell Cardiol.*, 2001, 33, 461-472.

BALDI, S., NATALI, A., BUZZIGOLI, G., QUINONES GALVAN, A., SIRONI, A.M., FERRANNINI, E.: in vivo effect of insulin on intracellular calcium concentrations: relation to insulin resistance. *Metabolism.*, 1996, 45, 1402-1407.

BALLARD, C., MOZAFFARI, S., SCHAFFER, S.: Signal-transduction for the stimulation of the sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger by insulin. *Mol. Cell. Biochem.*, 1994, 135, 113-119.

BARR, M.L., KIERNAN, J.A.: Visceral innervation. In: BARR, M.L., KIERNAN J.A.: The Human Nervous System. Philadelphia, *J.B.Lippincot Company*, 1988, 348-360.

BAUTERS, C., LAMBLIN, N., MCFADDEN, E.P., VAN BELL, E., MILLAIRE, A., DEGROOTE, P.: Influence of diabetes mellitus on heart failure risk and outcome. *Cardiovasc. Diabetol*, 2003, 2, 1-16.

BERS, D.M.: Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002, 415, 198-205.

BERS, D.M.: Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Basic Res. Cardiol.*, 1997, 92, 1-10.

BERS, D.M., CHRISTENSEN, D.M.: Functional interconversion of rest decay and ryanodine effects in rabbit and rat ventricle depends on Na/Ca exchange. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1990, 22, 715-723.

BIDASEE, K.R., DINCER, U.D., BESCH, H.R. Jr.: Ryanodine receptor dysfunction in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol. Pharmacol.*, 2001, 60, 1356-1364.

BOGDANSKI, D.F.: Monovalent cation dependency for the inhibition of outward transport of [³H] norepinephrine. *Neuropharmacology*, 1985, 24, 13-18.

BRADY, A.J.: Mechanical properties of isolated cardiac myocytes. *Physiol. Rev.*, 1991, 71, 413-438.

BROWN, R.A., ANTHONY, M.J., PETROVSKI, P., REN, J.: The influence of gender, diabetes, and acetaldehyde on the intrinsic contractile properties of isolated rat myocardium. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2001, 1, 35-42.

BROWN, R.A., LEE, M.M., SUNDARESON, A.M., WOODBURY, D.J., SAVAGE, A.O.: Influence of calcium channel blocker treatment on the mechanical properties of diabetic rat myocardium. *Acta Diabetologica*, 1996, 33, 7-14.

BURGER, A.J., CHARLAMB, M., SHERMAN, H.B.: Circadian patterns of heart rate variability in normals, chronic stable angina and diabetes mellitus. *Int. J. Cardiol.*, 1999, 71, 41-48.

BURNSTOCK, G.: The changing face of autonomic neurotransmission. *Acta Physiol. Scand.*, 1986, 126, 67-91.

CALLES-ESCANDON, J., MIRZA, S.A., SOBEL, B.E., SCHNEIDER, D.J.: Induction of hyperinsulinemia combined with hyperglycemia and hypertriglyceridemia increases plasminogen activator inhibitor 1 in blood of normal human subjects. *Diabetes*, 1998, 47, 290-293.

CAMERON, N.E., COTTER, M.A., ROBERTSON, S.: Contractile properties of cardiac papillary muscle in streptozotocin-diabetic rats and the effects of aldose reductase inhibition. *Diabetologia*, 1989, 32, 365-370.

CASIS, O., IRIARTE, M., GALLEGO, M., SANCHEZ-CHAPULA, J.A.: Differences in regional distribution of K⁺ current densities in rat ventricle. *Life Sci.*, 1998, 63, 391-400.

CATTERALL, W.A.: Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2000, 16, 521-555.

CHATTOU, S., DIACONO, J., FEUVRAY, D.: Decrease in sodium-calcium exchange and calcium currents in diabetic rat ventricular myocytes. *Acta Physiol. Scand.*, 1999, 166, 137-144.

CHEN-IZU, Y., SHA, Q., SHOROFKY, S.R., ROBINSON, S.W., WIER, W.G., GOLDMAN, L., BALKE, C.W.: I_{Ca(TTX)} channels are distinct from those generating the classical cardiac Na⁺ current. *Biophys. J.*, 2001, 81, 2647-2659.

CHRISTENSEN, N.J.: Catecholamines and diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1979, 16, 211-224.

DART, A.M., SCHÖMIG, A., DIETZ, R., MAYER, E., KÜBLER, W.: Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part B: Effect of sympathetic nerve stimulation. *Circ. Res.*, 1984, 55, 702-706.

DHALLA, N.S., PIERCE, G.N., INNES, I.R., BEAMISH, R.E.: Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can. J. Cardiol.*, 1985, 1, 263-281.

DILLMANN, W.H.: Influence of thyroid hormone administration on myosin ATPase activity and myosin isoenzyme distribution in the heart of diabetic rats. *Metabolism.*, 1982, 31, 199-204.

DOBRZYNSKI, E., MONTANARI, D., AGATA, J., ZHU, J., CHAO, J., CHAO, L.: Adrenomedullin improves cardiac function and prevents renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2002, 283, E1291-E1298.

DOCHERTY, J.R.: Effects of aging on prejunctional control of neurotransmission in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1996, 786, 264-273.

DOLIBA, N.M., BABSKY, A.M., WEHRLI, S.L., IVANICS, T.M., FRIEDMAN, M.F., OSBAKKEN, M.D.: Metabolic control of sodium transport in streptozotocin-induced diabetic rat hearts. *Biochemistry (Mosc.)*, 2000, 64, 502-508.

DOWELL, R.T., ATKINS, F.L., LOVE, S.: Integrative nature and time course of cardiovascular alterations in the diabetic rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 1986, 8, 406-413.

DUMONT, M., ROY, D., LEMAIRE, S.: Nonexocytotic noradrenaline release from rat cardiac synaptosomal-mitochondrial fractions. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 1997, 30, 302-308.

ECKBERG, D.L., HARKINS, S.W., FRITSCH, J.M., MUSGRAVE, G.E., GARDNER, D.F.: Baroreflex control of plasma norepinephrine and heart period in healthy subjects and diabetic patients. *J. Clin. Invest*, 1986, 78, 366-374.

EISNER, D.A., TRAFFORD, A.W., DIAZ, M.E., OVEREND, C.L., O'NEILL, S.C.: The control of calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation versus autoregulation. *Cardiovasc. Res.*, 1998, 38, 1068/1071.

FABIATO, A., FABIATO, F.: Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J. Physiol.*, 1975, 249, 469-495.

FANG, Z.Y., PRINS, J.B., MARWICK, T.H.: Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr. Rev.*, 2004, 25, 543-67.

FARAH, A.E., ALOUSI, A.A.: The actions of insulin on cardiac contractility. *Life Sci.*, 1981, 29, 975-1000.

FEIN, F.S., KORNSTEIN, L.B., STROBECK, J.E., CAPASSO, J.M., SONNENBLICK, E.H.: Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ. Res.*, 1980, 47, 922-933.

FEIN, F.S., STROBECK, J.E., MALHOTRA, A., SCHEUER, J., SONNENBLICK, E.H.: Reversibility of diabetic cardiomyopathy with insulin in rats. *Circ. Res.* 1981, 49, 1251-1261.

FEIN, F.S., MALHOTRA, A., MILLER-GREEN, B., SCHEUER, J., SONNENBLICK, E.H.: Diabetic cardiomyopathy in rats: mechanical and biochemical response to different insulin doses. *Am. J. Physiol.*, 1984, 247, H817-H823.

FELTEN, S.Y., PETERSON, R.G., SHEA, P.A., BESCH, H.R.J.R., FELTEN, D.L.: Effects of streptozotocin diabetes on the noradrenergic innervation of the rat heart: a longitudinal histofluorescence and neurochemical study. *Brain Res. Bull.*, 1982, 8, 593-607.

FERRIER, G.R., HOWLETT, S.E.: Cardiac excitation-contraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction. *Am. J. Physiol.*, 2001, 280, H1928-H1944.

FIGLEWICZ, D.P., SZOT, P., ISRAEL, P.A., PAYNE, C., DORSA, D.M.: Insulin reduces norepinephrine transporter mRNA in vivo in rat locus coeruleus. *Brain Res.*, 1993, 602, 161-164.

GABBAY, K.: The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 1973, 288, 831-836.

- GANDA, O.P., ROSSI, A.A., LIKE, A.A.: Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*, 1976, 25, 595-603.
- GANDO, S., HATTORI, Y., KANNO, M.: Altered cardiac adrenergic neurotransmission in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, 1993, 109, 1276-1281.
- GANGULY, P.K., BEAMISH, R.E., DHALLA, K.S., INNES, I.R., DHALLA, N.S.: Norepinephrine storage, distribution, and release in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.*, 1987, 252, E734-E739.
- GANGULY, P.K., DHALLA, K.S., INNES, I.R., BEAMISH, R.E., DHALLA, N.S.: Altered norepinephrine turnover and metabolism in diabetic cardiomyopathy. *Circ. Res.*, 1986, 59, 684-693.
- GANGULY, P.K., PIERCE, G.N., DHALLA, K.S., DHALLA, N.S.: Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.*, 1983, 244, E528-E535.
- GARGIULO, P., JACOBELLIS, G., VACCARI, V., ANDREANI, D.: Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiological and clinical aspects. *Diabetes Nutr. Metab.*, 1998, 11, 336-346.
- GERRITSEN, J., DEKKER, J.M., TENVOORDE B.J., KOSTENSE, P.J., HEINE, R.J., BOUTER, L.M., HEETHAAR, R.M., STEHOUWER, C.D.: Impaired autonomic function is associated with increased mortality, especially in subjects with diabetes, hypertension, or a history of cardiovascular disease: the Hoorn Study. *Diabetes Care*, 2001, 24, 1793-1798.
- GOTZSCHE, O.: Myocardial cell dysfunction in diabetes mellitus: a review of clinical and experimental studies. *Diabetes*, 1986, 35, 1158-1162.

GREENE, D.A., SIMA, A.A.F., STEVES, M.J., FELDMAN, E.L., LATTIMER, S.A.: Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care*, 1992, 15, 1902-1925.

GREENE, D., LATTIMER, S., SIMA, A.: Are disturbance of sorbitol, phosphoinositide, and Na-K-ATPase regulation involved in pathogenesis of diabetic neuropathy? *Diabetes*, 1988, 37, 688-693.

GUGLIUCCI, A.: Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J. Am. Osteopath. Assoc.*, 2000, 100, 621-634.

GUPTA, M.P., LEE, S.L., DHALLA, N.S.: Activation of heart sarcoplasmic reticulum Ca⁺-stimulated adenosine triphosphatase by insulin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1989, 249, 623-30.

GUPTA, M.P., MAKINO, N., KHATTER, K., DHALLA, N.S.: Stimulation of Na⁺-Ca²⁺ exchange in heart sarcolemma by insulin. *Life Sci.*, 1986, 39, 1077-1083.

HATTORI, Y., MATSUDA, N., KIMURA, J., ISHITANI, T., TAMADA, A., GANDO, S., KEMMOTSU, O., KANNO, M.: Diminished function and expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. *J. Physiol.*, 2000, 527, 85-94.

HEBDEN, R.A., GARDINER, S.M., BENNETT, T., MACDONALD, I.A.: The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. *Clin. Sci.*, 1986, 70, 111-117.

HEYLIGER, C.E., PRAKASH, A., MCNEILL, J.H.: Alteration in cardiac sarcolemmal Ca²⁺ pump activity during diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.*, 1987, 252, H540-H544.

HEYLIGER, C.E., RODRIGUES, B., MCNEILL, J.H.: Effect of choline and methionine treatment on cardiac dysfunction of diabetic rats. *Diabetes*, 1986, 35, 1152-1157.

HICKS, K.K., SEIFEN, E., STIMERS, J.R., KENNEDY, R.H.: Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure and cardiac autonomic nervous control. *J. Auton. Nerv. Sys.*, 1998, 69, 21-30.

HILSTED, J.: Pathophysiology in diabetic autonomic neuropathy: Cardiovascular, hormonal, and metabolic studies. *Diabetes*, 1982, 31, 730-737.

HINATA, M., YAMAMURA, H., LI, L., WATANABE, Y., WATANO, T., IMAIZUMI, Y., KIMURA, J.: Stoichiometry of Na⁺-Ca²⁺ exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 2002, 545, 453-61.

HIRANO, Y., FOZZARD, H.A., JANUARY, C.T.: Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ currents in canine cardiac Purkinje cells. *Am. J. Physiol.*, 1989, 256, H1478-H1492.

ISHIKAWA, T., KAJIWARA, H., KURIHARA, S.: Alterations in contractile properties and Ca²⁺ handling in streptozotocin-induced diabetic rat myocardium. *Am. J. Physiol.*, 1999, 277, H2185-2194.

JARRET, R.J.: Cardiovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. *Diabet. Metab. Rev.*, 1989, 5, 547-558.

JOURDON, P., FEUVRAY, D.: Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J. Physiol.*, 1993, 470, 411-429.

JUNOD, A., LAMBERT, A.E., ORCI, L., PICTET, R., GONET, A.E., RENOLD, A.E.: Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, 126, 201-205.

KATO, M., KAKO, K.L.: Na⁺/Ca²⁺ exchange of isolated sarcolemmal membrane: effects of insulin, oxidants and insulin deficiency. *Mol. Cell. Biochem.*, 1988, 83, 12-25.

KIMBALL, K.A., KENNEDY, R.H., SEIFEN, E., STIMERS, J.R.: Effects of diabetes on the control of heart rate. *FASEB J.*, 1992, 6, A1629.

KIM, H.W., CHO, Y.S., LEE, R.H., PARK, S.Y., KIM, Y.H.: Diabetic alteration in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban protein expression. *Life Sci.*, 2001, 70, 367-379.

KISS, E., JAKAB, G., KRANIAS, E.G., EDES, I.: Thyroid hormone-induced alteration in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport and myocardial relaxation. *Circ. Res.*, 1994, 75, 245-251.

KOSS, K.L., KRANIAS, E.G.: Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ. Res.*, 1996, 79, 1059-1063.

KOYA, D., KING, G.L.: Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 1998, 47, 859-866.

LAGADIC-GROSSMANN, D., CHESNAIS, J.M., FEUVRAY, D.: Intracellular pH regulation in papillary muscle cells from streptozotocin diabetic rats: an ion-sensitive microelectrode study. *Pflügers Archiv*, 1988, 412, 613-617.

LAI, F.A., MEISSNER, G.: The muscle ryanodine receptor and its intrinsic Ca²⁺ channel activity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1989, 21, 227-246.

- LAMANNA, V.R., FERRIER, G.R.: Electrophysiological effects of insulin on normal and depressed cardiac tissues. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 1981, 240, H636-H644.
- LANGELOH, A., BÖNISCH, H., TRENDELENBURG, U.: The mechanism of the ³H-noradrenaline releasing effect of various substrates of uptake₁: multifactorial induction of outward transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1987, 336, 602-610.
- LEBLANC, N., HUME, J.R.: Podium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science*, 1990, 248, 372-376.
- LEE, J.C., DOWNING, S.E.: Effects of insulin on cardiac muscle contraction and responsiveness to norepinephrine. *Am. J. Physiol.*, 1976, 230, 1360-1365.
- LEE, K.S., MARBAN, E., TSIEN, R.W.: Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: point dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol.*, 1985, 364, 395-411.
- LEE, S.L., OSTADALOVA, I., KOLAR, F., DHALLA, N.S.: Alteration in Ca²⁺-channels during the development of diabetic cardiomyopathy. *Mol. Cell. Biochem.*, 1992, 109, 173-179.
- LEVI, A.J., SPITZER, K.W., KOHMOTO, O., BRIDGE, J.H.: Depolarization-induced Ca²⁺ entry via Na/Ca exchange triggers SR release in guinea pig cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*, 1994, 266, H769-H779.
- LEVI, G., RAITERI, M.: Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci.*, 1993, 16, 415-419.
- LEVY, M.N.: Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. *Circ. Res.*, 1971, 29, 437-445.

LEVY, M.N., MARTIN, P.J.: Autonomic neural control of cardiac function. In: SPERELAKIS, N. (ed.): *Physiology and Pathophysiology of the Heart*. Kluwer Academic Publishers, 1995, 413-430.

LI, L., DESANTIAGO, J., CHU, G., KRANIAS, E.G., BERS, D.M.: Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol.*, 2000, 278, H769-H779.

LISHNER, M., AKSERROD, S., AVI, V.M., OZ, O., DIVON, M., RAVID, M.: Spectral analysis of heart rate fluctuation. A non-invasive, sensitive method for the early diagnosis of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *J. Auton. Nerv. Sys.*, 1987, 19, 119-125.

LÖFFELHOLZ, K., PAPPANO, A.J.: The parasympathetic neuroeffector junction of the heart. *Pharmacol. Rev.*, 1985, 37, 1-24.

LOPASCHUK, G.: Metabolic abnormalities in the diabetic heart. *Heart Fail Rev.*, 2002, 7, 149-159.

LORENZI, M.: Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes: the cellular perspective. *Diabetes Metab. Rev.*, 1992, 8, 85-103.

LOW, P.A., WALSH, J.C., HUANG, C.Y., MCLEOD, L.G.: The sympathetic nervous system in diabetic neuropathy: a clinical and pathological study. *Brain*, 1975, 98, 341-356.

LUKYANENKO, V., GYÖRKE, I., GYÖRKE, S.: Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes. *Pflügers Arch.*, 1996, 432, 1047-1054.

LUNDBERG, J.M.: Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: Integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine

triphosphatase, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.*, 1996, 48, 113-178.

MACLENNAN, D.H., ABU-ABED, M., CHULHEE, K.: Structure-function relationship in Ca²⁺ cycling proteins. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2002, 34, 897-918.

MACLENNAN, D.H., WONG, P.T.: Isolation of calcium-sequestrin protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 1231-1235.

MAGHOUB, M.A., ABD-ELFATTAH, A.S.: Diabetes mellitus and cardiac function. *Moll. Cel. Biochem.*, 1998, 180, 59-64.

MAIER, S., LANGE, V., SIMM, A., WALTER, U., KIRSTEIN, M.: Insulin fails to modulate the cardiac L-type Ca²⁺ current in Type II diabetes patients-a possible link to cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2001, 44, 269.

MAIER, S., AULBACH, F., SIMM, A., LANGE, V., LANGENFELD, H., BEHRE, H., KERSTING, U., WALTER, U., KIRSTEIN, M.: Stimulation of L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovasc. Res.*, 1999, 44, 390-397.

MAKINO, N., DHALLA, K.S., ELIMBAN, V., DHALLA, N.S.: Sarcolemmal Ca²⁺ transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Am. J. Physiol.*, 1987, 253, E202-E207.

MALHOTRA, A., SANGHI, V.: Regulation of contractile proteins in diabetic heart. *Cardiovasc. Res.*, 1997, 34, 34-40.

MARCHANT, B., UMACHANDRAN, V., STEVENSON, R., KOPELMAN, P.G., TIMMNIS, A.D.: Silent Myocardial ischemia: role of subclinical neuropathy in patients with and without diabetes. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1993, 22, 1433-1437.

MCDONALD, T.F., PELZER, S., TRAUTWEIN, W., PELZER, D.J.: Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev.*, 1994, 74, 365-507.

MCLEAN, M.R., GOLDBERG, P.B., ROBERTS, J.: An ultrastructural study of the effects of age on sympathetic innervation and atrial tissue in the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1983, 15, 75-92.

MEISSNER, G., HENDERSON, J.S.: Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotide, and calmoduline. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 3065-3073.

MITRA, R., MORAD, M.: Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 5340-5344.

MONCKTON, G., PEHOWICH, E.: Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Can. J. Neurol. Sci.*, 1980, 7, 135-42.

NAKIPOVA, O.V., GAINULLIN, R.Z., ANDREEVA, L.A., SAFRONOVA, V.G., KOPSARSKI, L.S., KOLAEVA, S.G., SALOMONOV, N.G., KUKUSHKIN, N.I.: The action of insulin on myocardium in active, hibernating and arousing ground squirrels. *Биофизика*, 2000, 45, 344-351.

NAND, V., DOGGRELL, S.A., BARNETT, C.W.: Effects of veratridine on the action potentials and contractility of right and left ventricles from normo- and hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1997, 24, 570-576.

NARAYANAN, N., XU, A.: Phosphorylation and regulation of the Ca^{2+} -pumping ATPase in cardiac sarcoplasmic reticulum by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Basic Res. Cardiol.*, 1997, 92 Suppl 1:25-35.

NEDERGAARD, O.A.: Catecholamines: Regulation, release and inactivation. *Pharm. Tox. Suppl.*, 1988, 63, 5-8.

NETTICADAN, T., TEMSAH, R.M., KENT, A., ELIMBAN, V., DHALLA, N.S.: Depressed levels of Ca^{2+} -cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic rat heart. *Diabetes*, 2001, 50, 2133-2138.

NEUBAUER, B., CHRISTENSEN, N.J.: Norepinephrine, epinephrine, and dopamine contents of the cardiovascular system in long-term diabetics. *Diabetes*, 1976, 25, 6-10.

NEW, W., TRAUTWEIN, W.: Inward membrane currents in mammalian myocardium. *Pflügers Arch.*, 1972, 334, 1-23.

NJOROGE, F.G., MONNIER, V.M.: The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1989, 304, 85-91.

NOBE, S., AOMINE, M., ARITA, M., ITO, S., TAKAKI, R.: Chronic diabetes mellitus prolongs action potential duration of rat ventricular muscles: circumstantial evidence for impaired Ca^{2+} channel. *Cardiovasc. Res.*, 1990, 24, 381-389.

OKOYAMA, H., HAMADA, M., HIWADA, K.: Contractile dysfunction in the diabetic-rat heart is an intrinsic abnormality of the cardiac myocytes. *Clin. Sci. (London)*, 1994, 86, 257-262.

OKUMA, Y., OSUMI, Y.: KCl-induced calcium-independent release of endogenous dopamine from rat brain slices. *Brain. Res.*, 1986, 363, 47-52.

O'NEILL, S.C., EISNER, D.A.: A mechanism for the effects of caffeine on Ca^{2+} release during diastole and systole in isolated rat ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 1990, 430, 519-536.

PAILLOLE, C., DAHAN, M., PAYCHA, F., SOLAL, A.C., PASSA, P., GOURGON, R.: Prevalence and significance of left ventricular filling abnormalities determined by Doppler echocardiography in young type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Am. J. Cardiol.*, 1989, 64, 1010-1016.

PATEL, K.P., ZHANG, K., HEIN, M., MAYHAN, W.G.: Peripheral noradrenergic turnover in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes. Res. Clin. Pract.*, 1997, 35, 1-9.

PAULSON, D.J., LIGHT, K.E.: Elevation of serum and ventricular norepinephrine content in the diabetic rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1981, 33, 559-562.

PENPARGKUL, S., SCHAIBLE, T., YIPINTSOI, T., SCHEUER, J.: The effect of diabetes on performance and metabolism of rat hearts. *Circ. Res.*, 1980, 47, 911-921.

PEREZ, P.J., RAMOS-FRANCO, J., FILL, M., MIGNERY, G.A.: Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 23961-23969.

PETERSON, B.Z., DE MARIA, C.D., YUE, D.T.: Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channel. *Neuron*, 1999, 22, 549-558.

PFAFFMAN, M.A.: the effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the cardiovascular system of the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1980, 28, 27-41.

POHL, M., LOMBARD, M.C., BOURGOIN, S., CARAYON, A., BENOLIEL, J.J., MAURBORGNE, A., BESSON, J.M., HAMON, M., CESSÉLIN, F.: Opioid control of the in vitro release of calcitonin gene-related peptide from primary

afferent fibres projecting in the rat cervical cord. *Neuropeptides*, 1989, 14, 151-159.

QUEDNAU, B.D., NICOLL, D.A., PHILIPSON, K.D.: Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am. J. Physiol.*, 1997, 272, C1250-61.

REN, J., WALSH, M.F., SOWERS, J.R., BROWN, R.A.: Augmentation of the inotropic response to insulin in diabetic rat hearts. *Life Sci.*, 1999, 65, 369-380.

RODRIGUES, B., ROSS, J.R., FARAHBAKSHIAN, S., MCNEILL, J.H.: Effects of *in vivo* and *in vitro* treatment with L-carnitine on isolated hearts from chronically diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1990, 68, 1085-1092.

ROWE, J.R., YOUNG, J.B., MINAKER, K.L., STEVENS, A.L., PALLOTTA, J., LANDSBERG, L.: Effect of insulin and glucose infusion on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes*, 1981, 30, 219-225.

ROY, T.M., PETERSON, H.R., SNIDER, H.L., CYRUS, J., et al: Autonomic influence on cardiovascular performance in diabetic subjects. *Am. J. Med.*, 1989, 87, 382-388.

RUDNICK, G., CLARK, J.: From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1144, 249-263.

SAMSO, M., WAGENKNECHT, T.: Contribution of electron microscopy and single-particle techniques to the determination of the ryanodine receptor three-dimensional structure. *J. Struct. Biol.* 1998, 121, 172-180.

SANTANA, L.F., GÓMEZ, A.M., LEDERER, W.J.: Ca²⁺ flux through promiscuous cardiac Na⁺ channels: slip-mode conductance. *Science*, 1998, 279, 1027-1033.

SCHAFFER, S.W.: Cardiomyopathy associated with noninsulin-dependent diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 1991, 107, 1-20.

SCHAIBLE, T.F., MALHOTRA, A., BAUMAN, W.A., SCHEUER, J.: Left ventricular function after chronic insulin treatment in diabetic and normal rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1983, 15, 445-58.

SCHANNWELL, C.M., SCHNEPPENHEIM, M., PERINGS, S., PLEHN, G., STRAUER, B.E.: Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. *Cardiology*, 2002, 98, 33-39.

SCHMID, H., FORMAN, L.A., CAO, X., SHERMAN, P.S., STEVENS, M.J.: Heterogeneous cardiac sympathetic denervation and decreased myocardial nerve growth factor in streptozotocin- induced diabetic rats. Implications for cardiac sympathetic dysinnervation complicating diabetes. *Diabetes*, 1999, 48, 603-608.

SCHMIDT, H.D., KOCH, M.: Influence of perfusate calcium concentration on the inotropic insulin effect in isolated guinea pig and rat hearts. *Basic Res. Cardiol.*, 2002, 97, 305-311.

SCHOUTEN, V.J., TER KEURS, H.E.: Role of I_{Ca} and Na^+/Ca^{2+} exchange in the force-frequency relationship of rat heart muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1991, 23, 1039-1050.

SCRIVEN, D.R., DAN, P., MOORE, E.D.: Distribution of Proteins Implicated in Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes. *Biophys. J.*, 2000, 79, 2682-2691.

SETHI, R., BARWINSKY, J., BEAMISH, R.E., DHALLA, N.S.: Mechanism of the positive inotropic action of insulin. *J. App. Cardiol.*, 1991, 6, 199-208.

SHAH, T.S., SATIA, M.C., GANDHI, T.P., BANGARU, R.A., GOYAL, R.K.: effects of chronic nifedipine treatment on streptozotocin-induced diabetes rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1995, 26, 6-12.

SHANNON, T.R., GINSBURG, K.S., BERS, D.M.: Potentiation of fractional SR Ca release by total and free intra-SR Ca concentration. *Biophys. J.*, 2000, 78, 334-343.

SHATTOCK, M.J., BERS, D.M.: Rat vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am. J. Physiol.*, 1989, 256, C813-C822.

SIMMERMAN, H.K., JONES, L.R.: Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol. Rev.*, 1998, 78, 921-947.

SIPIDO, K.R., CARMELIET, E., VAN DE, W.F.: T-type Ca^{2+} current as a trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 1998, 508, 439-451.

SIPIDO, K.R., CALLEWAERT, G., CARMELIET, E.: Inhibition and rapid recovery of Ca^{2+} current during Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 1995, 76, 102-109.

SIPIDO, M.S., MAES, M., VAN SE, W.F.: Low efficiency of Ca^{2+} entry through the Na/Ca exchanger as trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca^{2+} current and reverse mode Na/Ca exchange. *Circ. Res.*, 1997, 81, 1034-1044.

SMITH, J.M., PAULSON, D.J., ROMANO, F.D.: Inhibition of nitric oxide synthase by L-NAME improves ventricular performance in streptozotocin-diabetic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1997, 29, 2393-402.

SNOW, T.R.: Study of the characteristics of the inotropic effect of insulin in rabbit papillary muscle. *Experientia*, 1976, 32, 1550-1551.

SNYDER, D.L., WANG, W., PELLEG, A., FRIEDMAN, E., HORWITZ, J., ROBERTS, J.: Effect of aging on A1-adenosine receptor-mediated inhibition of norepinephrine release in the rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1998a, 31, 352-358.

SNYDER, D.L., ALOYO, V.J., WANG, W., ROBERTS, J.: Influence of age and dietary restriction on norepinephrine uptake into cardiac synaptosomes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1998b, 32, 896-901.

SNYDER, D.L., GAYHEART-WALSTEN, P.A., RHIE, S., WANG, W., ROBERTS, J.: Effect of age, gender, rat strain, and dietary restriction, on norepinephrine release from cardiac synaptosomes. *J. Gerontol. A - Biol. Sci. Med.*, 1998c, 53, B33-B41.

SRIKANTHAN, P., HSUEH, W.: Preventing heart failure in patients with diabetes. *Med. Clin. North. Am.*, 2004, 88, 1237-1256.

STAUFFACHER, W., BURR, I., GUTZEIT, A., BEAVEN, D., VELEMINSKY, J., RENOLD, A.E.: Streptozotocin diabetes: time course of irreversible B-cell damage; further observations on prevention by nicotinamide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1970, 133, 194-200.

STEVENS, V.J., VLASSARA, H., ABATI, A., CERAMI, A.: Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 2988-3002.

TADA, H., OIDA, K., KUTSUMI, Y., SHIMADA, Y., NAKAI, T., MIYABO, S.: Effects of probucol on impaired cardiac performance and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1992, 20, 179-186.

TADA, M., TOYOFUKU, T.: SR Ca²⁺-ATPase/phospholamban in cardiomyocyte function. *J. Card. Fail.*, 1996, 2, S77-85.

TAKEDA, N., NAKAMURA, I., HATANAKA, T., OHKUBO, T., NAGANO, M.: Myocardial mechanical and myosine isoenzyme alterations in streptozotocin-diabetic rats. *Jpn. Heart J.*, 1988, 29, 455-463.

TESHIMA, Y., TAKAHASHI, N., SAIKAWA, T., HARA, M., YASUNAGA, S., HIDAKA, S., SAKATA, T.: Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine sensitive Ca²⁺ channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2000, 32, 655-664.

TOMLINSON, D.R., YUSOF, A.P.: Autonomic neuropathy in the alloxan-diabetic rat. *J. Auton. Pharmacol.*, 1983, 3, 257-263.

TOMLINSON, K.C., GARDINER, S.M., GARDINER, R., HEBDEN, A., BENNETT, T.: Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev.*, 1992, 44, 103-150.

TRENDELENBURG, U.: Carrier-mediated outward transport of noradrenaline from adrenergic varicosities. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1990, 42, 515-520.

UDAYACHALERM, W., VECHAKARN, O., PETUMRAJ, S.: Effect of ACE-I on diabetic cardiovascular complications: antihypertensive and non-antihypertensive doses. *J. Med. Assoc. Thai.*, 2001, 84, S306-S313.

VADLAMUDI, R.V., MCNEILL, J.H.: Effect of experimental diabetes on isolated rat heart responsiveness to isoproterenol. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1984, 62, 124-131.

VADLAMUDI, R.V., RODGERS, R.L., MCNEILL, J.H.: The effect of chronic alloxan- and streptozotocin-induced diabetes on isolated rat heart performance. *Can. J. Pharmacol.*, 1982, 60, 902-911.

VERED, Z., BATTLER, A., SEGAL, P., LIBERMAN, D., YERUSHALMI, Y., BEREZIN, M., NEUFELD, H.N.: Exercise-induced left ventricular dysfunction in young men with asymptomatic diabetes mellitus (diabetic cardiomyopathy). *Am. J. Cardiol.*, 1984, 54, 633-637.

VERMA, S., ARIKAWA, E., MCNEILL, J.H.: Long-term endothelin receptor blockade improves cardiovascular function in diabetes. *Am. J. Hypertens.*, 2001, 14, 679-687.

VEVES, A., KING, G.L.: Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects? *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, 1215-1218.

VINIK, A.L.: Diagnosis and management of diabetic neuropathy. *Clin. Geriatr. Med.*, 1999, 15, 293-320.

VON ARNIM, T., BOLTE, H.D.: Dose-response relationship for a positive inotropic effect of insulin on isolated papillary muscle. *Klin-Wocheenschr*, 1980, 58, 537-539.

WAKASAKI, H., KOYA, D., SCHOEN, F.J., JIROUSEK, M.R., WAYS, D.K., HOIT, B.D., WALSH, R.A., KING, G.L.: Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 9320-9325.

WIER, W.G., BALKE, C.W.: Ca^{2+} release mechanism, Ca^{2+} sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ. Res.*, 1999, 85, 770-776.

WISNIEWSKA, R.J., WISNIEWSKI, K.: Cholecystokinin (CCK) and C-terminal fragments of CCK: Effects of CCK-33, CCK-8 and CCK-4 in the cardiovascular system of diabetic rat. *Gen. Pharmac.*, 1996, 27, 399-405.

YAMAZAKI, T., AKIYAMA, T., KAWADA, T., KITAGAWA, H., TAKAUCHI, Y., YAHAGI, N., SUNAGAWA, K.: Norepinephrine efflux evoked by potassium chloride in cat sympathetic nerves: dual mechanism of action. *Brain. Res.*, 1998, 794, 146-150.

YKI-JÄRVINEN, H., UTRIAINEN, T.: Insulin-induced vasodilatation: physiology or pharmacology? *Diabetologia*, 1998, 41, 369-379.

YOUNG, M.E., MCNULTY, P., TAEGTMEYER, H.: Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes. Part II. Potential mechanisms. *Circulation*, 2002, 105, 1861-1870.

YU, Z., TIBBITS, G.F., MCNEILL, J.H.: Cellular functions of diabetic cardiomyocytes – contractility, rapid cooling contracture and ryanodine binding. *Am. J. Physiol.*, 1994, 266, H2082-H2089.

ZARAIN-HERZBERG, A., YANO, K., ELIMBAN, V., DHALLA, N.S.: Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expression in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 203, 113-20.

ZHAO, F., LI, P., CHEN, S.R., LOUIS, C.F., FRUEN, B.R.: Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 13810-13816.

ZIEGELHÖFFER, A., BUNDGAARD, H., Ravingerova, T., Tribulova, N., Enevoldsen, M.T., Kjeldsen, K.: Diabetes- and semi-starvation-induced changes in metabolism and regulation of Na,K-ATPase in rat heart. *Diabetes. Nutr. Metab.*, 2003, 16, 222-231.

ZIEGELHÖFFER, A., RAVINGEROVA, T., STYK, J., SEBOKOVA, J., WACZULIKOVA, I., BREIER, A., DZURBA, A., VOLKOVOVA, K., CARSKY, J., TURECKY, L.: Mechanisms that may be involved in calcium tolerance of the diabetic heart. *Mol. Cell. Biochem.*, 1997, 176, 191-198.

ZIEGLER, D.: Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: prognosis, diagnosis and treatment. *Diabetes. Metab. Rev.*, 1994, 10, 339-383.

ZOLA, B., KAHN, J.K., JUNI, J.E., VINIK, A.I.: Abnormal cardiac function in diabetic patients with autonomic neuropathy in the absence of ischemic heart disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1986, 63, 208-214.

ZIERLER, K., WU, F.S.: Insulin acts on Na, K and Ca currents. *Trans. Assoc. Am. Physicians.*, 1988, 101, 320-325.

ZOLA, B.E., MILLER, B., STILES, G.L., RAO, P.S., SONNENBLICK, E.H., FEIN, F.S.: Heart rate control in diabetic rabbits: blunted response to isoproterenol. *Am. J. Physiol.*, 1988, 255, E636-E641.

Seznam publikací autorky:

ŠVÍGLEROVÁ, J., KUNCOVÁ, J., ŠTENGL, M.: Negative inotropic effect of insulin in papillary muscles from control and diabetic rats. *Physiol. Res.*, 2005, 54 - přijato k otištění.

CHOTTOVÁ-DVOŘÁKOVÁ, M., KUNCOVÁ, J., PFEIL, U., MCGREGOR, G.P., ŠVÍGLEROVÁ, J., SLAVÍKOVÁ, J., KUMMER, W.: Cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetes involves intra-axonal accumulation of calcitonin gene-related peptide and altered expression of its receptor in rats. *Neuroscience*, 2005, 134, 51-58.

KUNCOVÁ, J., ŠVÍGLEROVÁ, J., TONAR, Z., SLAVÍKOVÁ, J.: Heterogenous changes in neuropeptide Y, norepinephrine and epinephrine concentrations in the hearts of diabetic rats. *Auton. Neurosci.*, 2005, 121, 7-15.

ŠVÍGLEROVÁ, J., SLAVÍKOVÁ, J.: Modernizace praktické výuky fyziologie. *Sborník příspěvků ze 3. ročníku konference "Alternativní metody výuky*, 2005, 165 - 167.

ŠVÍGLEROVÁ, J., NALOS, L.: Vliv diabetu a inzulínu na průběh kontrakčně relaxačního cyklu. *Sborník prací z vědecké konference při příležitosti 80. výročí založení FÚ LFUK v Bratislavě*. 2004, 203 - 206.

PUČELÍK, P., ŠVÍGLEROVÁ, J., NALOS, L.: The lusitropic properties in the newborn and adult rabbit ventricular myocardium. *Physiol. Res.*, 2004, 53, 20.

ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P., NALOS, L.: Blockage of SERCA 2 in normal and diabetic albino rat heart, the effect of insulin. *Physiol. Res.*, 2004, 53, 39.

ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P.: Blokáda SERCA 2 v srdci normálních a diabetických potkanů, účinek inzulínu. *Sdělení a poster na 80. FD Praha*, 2004.

DVOŘÁKOVÁ, M., PFEIL, U., ŠVÍGLEROVÁ, J., SLAVÍKOVÁ J., KUMMER, W.: VIP and its receptors in diabetic heart. *Abstracts from the XVIII World Congress of the International Soc. for Heart Research Brisbane, Australia 7 – 11 August, 2004. J. Mol. Cell Cardiol.*, 2004, 37, 205 – A 128.

ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P.: Vliv různých koncentrací extracelulárního vápníku na kontraktilitu zdravého myokardu dospělého potkana při akutním účinku insulinu. *Plzeň. Lék. Sborn.*, 2003, 70, 5 - 14.

KUNCOVÁ, J., SLAVÍKOVÁ, J., ŠVÍGLEROVÁ J.: Norepinephrine release in the heart atria of diabetic rats. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2003, 22, 397 - 410.

NALOS, L., PUČELÍK, P., ŠVÍGLEROVÁ, J.: Effect of strontium on Ca-dependent chloride channel. *Physiol. Res.*, 2003, 52, 34 P.

PUČELÍK, P., ŠVÍGLEROVÁ, J., NALOS, L.: Pharmacological removal of sarcoplasmic reticulum (SR) in adult rabbit induces neonatal-like mechanical response of ventricular myocardium. *Physiol. Res.*, 2003, 52, 38 P.

ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P., NALOS, L.: Effect of various insulin concentrations on mechanical response of myocardium in normal and diabetic albino rats. *Physiol. Res.*, 2003, 52, 41 P.

ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P., NALOS, L.: Effect of various insulin concentrations on mechanical response of myocardium in normal and diabetic albino rats. *Program a sborník abstraktů 79. FD Plzeň*, 2003, 50, 108.

PUČELÍK, P., ŠVÍGLEROVÁ, J., NALOS, L.: Pharmacological removal of sarcoplasmic reticulum (SR) in adult rabbit induces neonatal-like mechanical response of ventricular myocardium. *Program a sborník abstraktů 79. FD Plzeň*, 2003, 44, 85.

- NALOS, L., PUČELÍK, P., ŠVÍGLEROVÁ, J.: Effect of strontium on Ca-dependent chloride channel. *Program a sborník abstraktů 79. FD Plzeň*, 2003, 41, 71.
- SLAVÍKOVÁ, J., KUNCOVÁ, J., ŠVÍGLEROVÁ, J.: Characterization of the sympathetic innervation of the diabetic rat heart. *Clin. Auton. Res.*, 2003, 13, 132 P 26.
- KUNCOVÁ, J., SLAVÍKOVÁ, J., ŠVÍGLEROVÁ, J., TONAR, Z.: Cardiovascular parameters in type I and type II diabetic rats. *Clin. Auton. Res.*, 2003, 13, 132 P 27.
- NALOS, L., PUČELÍK, P., ŠVÍGLEROVÁ, J.: Effect of strontium on Ca-dependent chloride channel. *Physiol. Res.*, 2003, 52, 34 P.
- KUNCOVÁ, J., ŠVÍGLEROVÁ, J., SLAVÍKOVÁ, J.: Norepinephrine release in the heart atria of diabetic rats. *Sborník abstrakt: 5. česko-francouzsko-slovenské symposium, říjen 4. – 7. 2002, Smolenice, Slovenská republika*, 2002, 26, 37.
- SLAVÍKOVÁ, J., KUNCOVÁ, J., ŠVÍGLEROVÁ, J.: Changes in catecholamines and CGRP levels in heart of streptozotocin-diabetic rats. *Abstracts, 22nd European Section Meeting ISHR. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2002, 34, A 58.
- ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P.: Model of streptozotocin in various types of laboratory mammals. *Physiol. Res.*, 2001, 50, P 29.
- SLAVÍKOVÁ, J., KUNCOVÁ, J., ŠVÍGLEROVÁ, J.: Klidová srdeční frekvence u potkana se streptozotocinovým diabetem: Vliv atropinu a metipranolu. *Sborník abstraktů, 77. FD České Budějovice*, 2001, 62.

ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P.: Model streptozotocinového diabetu u různých typů laboratorních savců. *Sborník abstraktů, 77. FD České Budějovice, 2001*, 71.

SLAVÍKOVÁ, J., KUNCOVÁ, J., ŠVÍGLEROVÁ, J.: Resting heart rate in streptozotocin-diabetic rats: effect of atropine and metipranolol. *Physiol. Res.*, 2001, 50, P 26.

ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P.: The effect of insulin on contraction of the right ventricle papillary muscles in health and diabetic albino rats. *The 4th Czech-French-Slovak Symposium. New Frontiers in Basic Cardiovascular Research. Mariánské Lázně, October 5. – 8. 2000, Book of Abstracts, 2000*, 80.

ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P.: The effect of insulin on mechanical and electrical properties of adult health ventricular myocardium of rabbit and albino rat. *Physiol. Res.*, 2000, 49, P 35.

ŠVÍGLEROVÁ, J., PUČELÍK, P.: The effect of insulin on mechanical and electrical properties of adult health ventricular myocardium of rabbit and albino rat. *Sborník abstrakt 76. FD Hradec Králové, 2000*.

PUČELÍK, P., ŠVÍGLEROVÁ, J.: Myocardial diastolic behavior and sarcoplasmic reticulum function. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1999, 31, A112, (Sa29).

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení pro vědu a vzdělání děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni.