

Ústav fyziologie  
Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze

MUDr. Jitka Švíglerová

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

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

Obor: fyziologie a patologická fyziologie

Autoreferát disertační práce

Plzeň 2005

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy postgraduálního doktorandského studia na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Plzni.

Doktorand: MUDr. Jitka Švíglerová, Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Pučelík, CSc., Ústav fyziologie Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.

Oponenti:

Autoreferát rozeslán dne:

Obhajoba disertační práce se koná dne:

Místo konání obhajoby:

..

Doc. MUDr. Jana Slavíková, CSc.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v oboru fyziologie a patologická fyziologie

<b>OBSAH</b>	
<b>1. ÚVOD</b>	<b>4</b>
<b>2. CÍL DISERTACE</b>	<b>6</b>
<b>3. METODY</b>	<b>7</b>
3.1. Zvířata	7
3.2. Experimentální model diabetu	7
3.3. Měření na multiceulárních preparátech	8
3.4. Uvolňování noradrenalinu	9
3.5. Stanovení koncentrace noradrenalinu (NA)	9
3.6. Prezentace výsledků a statistika	9
<b>4. VÝSLEDKY</b>	<b>10</b>
4.1. Účinek inzulínu na kontrakci papilárního svalu kontrolních a diabetických potkanů	10
4.2. Uvolňování noradrenalinu v srdečních síních diabetického potkana	14
<b>5. HLAVNÍ ZÁVĚRY</b>	<b>16</b>
<b>6. PŘEHLED VYBRANÉ LITERATURY</b>	<b>18</b>
<b>7. SEZNAM PUBLIKACÍ</b>	<b>22</b>

## 1. ÚVOD

Diabetes mellitus (DM) v současné době postihuje asi 6,5% populace v ČR. K závažnosti DM přispívají velkou měrou komplikace doprovázející základní onemocnění. Kardiovaskulární komplikace se u diabetiků vyskytují až desetkrát častěji než v nediabetické populaci a jsou příčinou téměř 70% úmrtí diabetických pacientů. Zahrnují diabetickou kardiomyopatii, angiopatii a kardiovaskulární autonomní neuropatii. Tyto patologické procesy většinou probíhají současně a navzájem se ovlivňují. Přestože jsou tyto změny intenzivně studovány, mechanismus vzniku řady z nich není ještě zcela objasněn.

Diabetes 1. typu experimentálně navozený streptozotocinem (STZ) vede u potkana ke změnám funkčních parametrů kontrakce. Kromě toho, významným způsobem zasahuje do vápníkového metabolismu kardiomyocytů [klesá činnost  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázy sarkoplazmatického retikula (SERCA) (Ganguly a spol., 1983), zvyšuje se koncentrace fosfolambanu (Kim a spol., 2001), klesá afinita ryanodinových receptorů (RyR) sarkoplazmatického retikula (SR) k vápníku (Yu a spol., 1994), snižuje se aktivita sarkolemálního  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  výměníku (NCX) (Makino a spol., 1987) a sarkolemální  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ázy (Heyliger a spol., 1987)]. Kvantitativní údaje o vlivu STZ 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; Akyiama 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).

Vápníkové hospodářství v srdečních buňkách intaktních potkanů je ovlivňováno inzulinem, jehož nedostatek je charakteristický pro DM 1. typu. Inzulin stimuluje vápníkový proud L-typu ( $I_{CaL}$ ) (Aulbach a spol., 1999), činnost NCX (Gupta a spol., 1986) a SERCA (Algenstaedt a spol., 1997). Inzulin ovlivňuje rovněž sílu kontrakce, má pozitivně inotropní účinek v srdci morčete (von Arnim a Bolte, 1980), králíka (Snow, 1976), kočky a kotěte (Lee a Downing, 1976). Informace o účinku inzulinu na sílu kontrakce u laboratorního potkana jsou poněkud protichůdné. Literární zdroje informují o pozitivně inotropním (Sethi a spol., 1991), negativně inotropním (Farah a Alousi, 1981), popřípadě žádném účinku inzulinu na sílu srdeční kontrakce (Ren a spol., 1999). Chronické podávání inzulinu diabetickým potkanům zabránilo změnám síly kontrakce papilárního svalu, poklesu aktivity myozinové ATPáza a náhradě  $V_1$  izoformy myozinu za izoformu  $V_3$  v srdečním svaly (Fein et al., 1984) a vedlo normalizaci hodnot srdeční frekvence a

krevního tlaku (Pfaffman, 1980).

## **2. Cíl disertace**

Z dosud známých informací vyplývá, 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 nekoresponduje 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. 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 nitrobuněčných signálních kaskád). V rámci disertační práce jsme se zaměřili na první možnost, tedy jakým způsobem nekompensovaný diabetes ovlivňuje srdeční metabolismus jednoho z hlavních autonomních mediátorů – noradrenalinu, včetně sledování jeho tkáňové koncentrace, uvolňování a zpětného vychytávání.

### **3. METODY**

#### **3.1. Zvířata**

K pokusům jsme použili dospělé laboratorní potkany kmene Wistar (VELAZ, Praha, ČR). Všechny experimenty na zvířatech byly prováděny v souladu s Evropskou směrnicí pro ochranu obratlovců pro experimentální a další vědecké účely (86/609/EU) a byly schváleny Odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy v Praze.

#### **3.2. Experimentální model diabetu**

K indukci DM 1. typu jsme použili STZ rozpuštěný v citrátovém pufru (pH 4.5). STZ byl podán jednorázově do ocasní žíly v dávce 65 mg/kg (Junod et al., 1967). Kontrolním zvířatům byl aplikován pouze citrátový pufr v adekvátním objemu.

U experimentálních zvířat jsme pravidelně sledovali glykémii (enzymaticky nebo glukometrem), hladinu glukózy v moči (enzymaticky), tělesnou hmotnost, koncentraci inzulínu v plazmě a pankreatické tkáni (radioimmunoassay, RIA), dále jsme prováděli glukózový toleranční test a histologické vyšetření pankreatu.

### **3.3. Měření na multiceulárních preparátech**

Tenké papilární svaly byly vystřiženy z pravé srdeční komory laboratorního potkana a umístěny do experimentální lázně, kde byly připevněny k mechanoelektrickému převaděči izometrické kontrakce. Lázeň byla neustále perfundována oxygenovaným Tyrodeovým roztokem (složení v mmol/l: NaCl 137, KCl 4,5, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 2, glukóza 10, Hepes 5, pH upraveno na 7,4 pomocí NaOH) o teplotě 36°C při konstantním průtoku (6-10 ml/min). Po úvodní stabilizaci (frekvence stimulace 1 Hz) byl preparát stimulován různými frekvencemi (od 0,1 do 3 Hz) nebo byl vystaven vlivu periody nečinnosti (RP; od 10 do 300 s).

Sledovali jsme mechanické (síla kontrakce, poměr síly stahu 1. stahu po RP a síly stahu před RP) a časové (čas do vrcholu kontrakce, poločas relaxace) parametry srdeční kontrakce. Mechanické parametry jsou udávány v arbitrárních (a.u.) či relativních (r.u.) jednotkách, časové parametry v ms.



### **3.4. Uvolňování noradrenalinu**

Množství uvolněného NA ze srdečních síní bylo sledováno za bazálních podmínek při perfuzi oxygenovaným Krebsovým Henseleitovým roztokem (složení v mmol/l: NaCl 113, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4,75, CaCl<sub>2</sub> 2,5, MgSO<sub>4</sub> 1,19, glukóza 11,1, Na<sub>2</sub>EDTA 0,029, kyselina askorbová 0,289) při teplotě 37°C a dále po stimulaci depolarizací 50 mmol/l KCl v perfuzním roztoku, ve kterém jsme úměrně snížili koncentraci NaCl. Bazální i stimulované (kalium evoked release; KER) uvolňování NA bylo stanoveno před i po experimentální intervenci - aplikaci blokátoru zpětného vychytávání NA desipraminu či bezvápníkového roztoku. Bazální výdej byl označen B1 (před intervencí) a B2 (po intervenci), stimulovaný výdej S1, resp. S2.

### **3.5. Stanovení koncentrace noradrenalinu (NA)**

Koncentrace NA v tkáňových extraktech a v perfuzátu síní byla stanovena RIA metodou pomocí diagnostického setu firmy IBL Hamburg (Německo). Vzorky tkáně levé a pravé srdeční síně byly extrahovány 0,4 mol/l HClO<sub>4</sub> a centrifugovány. Koncentrace NA byla stanovena ve vzniklém supernatantu.

### **3.6. Prezentace výsledků a statistika**

Jednotlivé výsledky jsou v práci uvedeny jako průměr ± střední chyba průměru (SEM). Při testování statistické významnosti rozdílnosti 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.

#### **4. VÝSLEDKY**

Předložená disertační práce přináší některé nové poznatky o vlivu inzulínu na kontraktilní funkce papilárního svalu a o sympatické inervaci zdravých a diabetických laboratorních potkanů.

##### **4.1. Účinek inzulínu na kontrakci papilárního svalu kontrolních a diabetických potkanů**

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

Čtyři měsíce trvající diabetes 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 SERCA, 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 koncentraci vápníku v pracovním roztoku

( $[Ca^{2+}]_e$ ) v izolovaném srdci intaktního potkana a morčete. Ovlivnění účinku inzulínu změnou  $[Ca^{2+}]_e$  jsme prokázali i v pokusech prováděných na papilárních svaích 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 inzulínu neprojevil.

Abychom objasnili podstatu negativně inotropního účinku inzulínu, rozhodli jsme se sledovat jeho vliv na kontraktilitu v přítomnosti cyklopiazonová kyseliny (CPA), která blokuje SERCA, a nifedipinu - blokátoru  $I_{CaL}$ . Podání CPA nezabránilo negativně inotropnímu účinku inzulínu. Z toho tedy vyplývá, že proces plnění SR vápníkem prostřednictvím SERCA není pravděpodobně zodpovědný za výše zmíněný inotropní efekt inzulínu. Oslabení síly srdeční kontrakce v přítomnosti nifedipinu bylo popsáno již dříve (Schoulen a ter Kurs, 1991). V našich experimentech aplikace inzulínu 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 inzulínu by mohl být  $I_{CaL}$ . V experimentech prováděných na izolovaných kardiomyocytech však bylo zjištěno, že inzulín stimuluje  $I_{CaL}$  (Aulbach et al., 1999; Maier et al., 1999). Podobný stimulační účinek inzulínu bychom mohli předpokládat i u multiceulárního preparátu. Lze tedy spekulovat, že za negativně inotropním účinkem inzulínu 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 inzulinu (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 inzulinu projevuje i v lidském myokardu. Kromě toho je třeba vzít v úvahu, že inzulin byl v našich experimentech podán jednorázově. Nabízí se zde tedy otázka, zda chronické podávání inzulinu (jako je tomu v případě diabetických pacientů) bude mít podobné nebo rozdílné účinky. V každém případě by bylo vhodné při inzulinové léčbě diabetu brát v úvahu možnost přímých účinků inzulinu na srdeční inotropii.

#### **4.2. Uvolňování noradrenalinu v srdečních síních diabetického potkana**

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. 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, byli rovněž rozděleni do tří skupin označených Cont1, Cont4 a Cont7.

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 tohoto 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. Je známo, že 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 provést 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. HLAVNÍ ZÁVĚRY**

### **Účinek inzulinu na kontrakci papilárního svalu kontrolních a diabetických potkanů**

- Chronický diabetes snižoval sílu kontrakce, prodlužoval průběh kontrakce i relaxace.



- Inzulin vykazoval negativně inotropní účinek u papilárních svalů kontrolních i diabetických potkanů.
- Inzulin u kontrolních zvířat zkracoval trvání kontrakce i relaxace.
- Časový průběh kontrakce a relaxace u STZ zvířat nebyl inzulinem ovlivněn.
- U kontrolních potkanů v prostředí se sníženou  $[Ca^{2+}]_e$  vyvolal inzulin pozitivně inotropní účinek, při zvýšené  $[Ca^{2+}]_e$  inzulin neovlivnil CF.
- Změna  $[Ca^{2+}]_e$  v roztoku u diabetických zvířat potlačila inotropní účinek inzulinu.
- Cyklopiazonová kyselina (blokátor SERCA), narozdíl od nifedipinu (blokátor  $I_{CaL}$ ), nezabránila negativně inotropnímu účinku inzulinu.
- Příčinou negativně inotropního účinku inzulinu je pravděpodobně zhoršená efektivita procesu uvolňování vápníku ze SR.

#### **Uvolňování noradrenalinu v srdečních síních diabetického potkana**

- Koncentrace NA v srdečních síních laboratorního potkana klesala s věkem, diabetes ve srovnání s kontrolami nejprve zvýšil (STZ1) a poté snížil (STZ7) koncentraci NA.
- Spontánní výdej NA byl výrazně vyšší u STZ4 než u odpovídajících kontrolních zvířat.

- KER výdej NA byl ve srovnání s kontrolními potkany zvýšen u STZ1 a 4, snížen u STZ7.
- Desipramin zvyšoval stimulovaný výdej NA u všech kontrolních a STZ1 potkanů.
- Desipramin inhiboval stimulovaný výdej NA u STZ4.
- Stimulovaný výdej NA v bezvápníkovém prostředí byl u diabetických zvířat vyšší než u kontrol, maxima dosahoval u STZ4.
- U skupiny STZ4 pravděpodobně hraje rozhodující roli v uvolňování NA neuronální transportér nezávislý na vápníku.
- Mechanismus uvolňování NA z nervových vláken inervujících srdce je vlivem chronického diabetu změněn a pravděpodobně přispívá k poklesu koncentrace NA v srdečních síních STZ zvířat.

## 6. PŘEHLED VYBRANÉ LITERATURY

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 Ca<sup>2+</sup>-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  $Ca^{2+}$  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.

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.

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

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.

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.

- 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., PIERCE, G.N., DHALLA, K.S., DHALLA, N.S.: Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.*, 1983, 244, E528-E535.
- GUPTA, M.P., MAKINO, N., KHATTER, K., DHALLA, N.S.: Stimulation of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in heart sarcolemma by insulin. *Life Sci.*, 1986, 39, 1077-1083.
- HEYLIGER, C.E., PRAKASH, A., MCNEILL, J.H.: Alteration in cardiac sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  pump activity during diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.*, 1987, 252, H540-H544.
- 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.
- KIM, H.W., CHO, Y.S., LEE, R.H., PARK, S.Y., KIM, Y.H.: Diabetic alteration in cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and phospholamban protein expression. *Life Sci.*, 2001, 70, 367-379.
- LEE, J.C., DOWNING, S.E.: Effects of insulin on cardiac muscle contraction and responsiveness to norepinephrine. *Am. J. Physiol.*, 1976, 230, 1360-1365.
- MAIER, S., AULBACH, F., SIMM, A., LANGE, V., LANGENFELD, H., BEHRE, H., KERSTING, U., WALTER, U., KIRSTEIN, M.: Stimulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovasc. Res.*, 1999, 44, 390-397.

MAKINO, N., DHALLA, K.S., ELIMBAN, V., DHALLA, N.S.: Sarcolemmal  $Ca^{2+}$  transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Am. J. Physiol.*, 1987, 253, E202-E207.

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

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.

PAFFMAN, 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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

#### **7. 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.

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.

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*, 134, 51-58.

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 P.

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 P.

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 inzulínu. *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, Smolenice, Slovenská republika, 2002, s. 37, 26.*
- 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 right ventricle papillary muscles in health and diabetic albino rats. *THE 4<sup>th</sup> 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. *Abstrakta 76. FD Hradec Králové*, 2000.

PUČELÍK, P., ŠVÍGLEROVÁ, J.: Myocardial diastolic behavior and sarcoplasmic reticulum function. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1999, 31(6), A112, (Sa29).