

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

DIZERTAČNÍ PRÁCE

2010

MUDr. Petr Wohl

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině
Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Petr Wohl

Název závěrečné práce

*Inzulinová rezistence a metabolická inflexibilita-
ovlivnění blokadou renin-angiotenzinového systému*

Title

*Insulin resistance and metabolic inflexibility-
the influence of renin angiotensin system inhibition*

Typ závěrečné práce

Dizertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
Prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

Centrum diabetologie IKEM, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4 - Krč

Praha, 2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 11.11. 2010

MUDr. Petr Wohl

Podpis

Identifikační záznam:

WOHL, Petr. *Inzulinová rezistence a metabolická inflexibilita-ovlivnění blokádou renin angiotenzinového systému [Insulin resistance and metabolic inflexibility-the influence of renin angiotensin system inhibition]*. Praha, 2010. **Počet stran: 61 počet příloh: 9**

Typ závěrečné práce: dizertační. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika / Ústav 1. LF UK 2010. Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc. Centrum diabetologie IKEM.

Poděkování

Moje vřelé poděkování patří rodičům za jejich dlouholetou nezištnou podporu a pomoc. Jednotlivé studie byly realizovány za přispění a pomoci MUDr. Evy Krušinové-Švehlíkové, MUDr. Marty Klementové, MUDr. Simony Kratochvílové, MUDr. Janě Vrbíkové PhD., ing. Martina Hilla, našich sester Laboratoře klinické patofyziologie Danuše Lapešové a Dáši Šišákové. Všem patří mé poděkování.

Poděkování zvláště patří mé školitelce paní prof. MUDr. Terezii Pelikánové, DrSc., která mě vedla cennými radami i kritickými připomínkami. Její pozitivní lidský přístup a vynikající odbornost pro mne byly velkou motivací nejen při doktorandském studiu, ale i v počtu atestací a programů, na kterých jsem se aktivně podílel.

Abstrakt

Inzulinová rezistence (IR) hraje zásadní roli v progresi aterosklerózy a je spojena s vyšší kardiovaskulární mortalitou a morbiditou. IR v metabolismu glukózy je běžným nálezem u diabetiků 2. typu a u obézních jedinců. Porucha účinku inzulínu a IR je přítomna i u diabetiků 1. typu a její význam není dostatečně zhodnocen. Disertační práce je zaměřena na problematiku IR u nemocných s diabetem mellitem 1. typu a dále problematiku blokády renin angiotenzinového systému (RAS) v kontextu IR u nemocných s metabolickým syndromem a poruchou glukózové homeostázy (porucha glukózové tolerance či zvýšená glykémie na lačno). K hodnocení IR je použita metodika hyperinzulinového-euglykemického clampu a nepřímé kalorimetrie, které umožňují testování in vivo u člověka. V našem projektu jsme se zaměřili na 1) posouzení významu metabolické inflexibility u diabetiků 1. typu, 2) hodnocení metodiky hyperinzulinového euglykemického clampu u nemocných s diabetes mellitus 1. typu a přítomnou IR, 3) testování vlivu inhibice RAS s použitím blokátoru angiotenzin II. typ 1 receptoru (ARB) telmisartanu u nemocných s porušenou glukózovou homeostázou při metabolickém syndromu. Výsledky disertační práce přispěly k průkazu poruchy substrátové utilizace u diabetiků 1. typu - metabolické inflexibility. Význam tohoto fenoménu nebyl a není dosud zhodnocen, není zatím provedena žádná jiná studie, která by testovala i možné terapeutické ovlivnění. Tento jev u uvedené skupiny doložila naše studie jako první. Dalším výsledkem naší práce je zpřesnění metodiky hyperinzulinového euglykemického clampu v kombinaci s měřením substrátové utilizace nepřímou kalorimetrií u diabetiků 1. typu spolu s hodnocením vylučování urey močí. Při hodnocení substrátové utilizace pomocí nepřímé kalorimetrie prováděné při euglykemickém hyperinzulinovém clampu nelze nahradit sběr moči během clampu sběrem během předchozích 24 hodin ani sběrem bazálním (6:00-9:00). Ke správnému hodnocení vylučování urey je nutné provádět sběry moče ve všech periodách clampu i přes technickou náročnost a možnou chybu sběru. Cirkadiální rytmus vylučování urey nebyl u našeho souboru diabetiků zjištěn. Prokázali jsme, že nemocní s diabetem 1. typu mají poruchu proteolýzy při normální oxidaci proteinů, což by mohlo poukazovat na přítomnost inzulinové rezistence v metabolismu proteinů. Poslední část disertační práce byla věnována problematice „metabolické léčby“ inhibicí renin angiotenzinového systému, kdy jsme prokázali pozitivní vliv telmisartanu na vybrané adipokiny u nemocných s metabolickým syndromem a porušenou lačnou glykemií, a tím podpořili teorii o možném metabolickém účinku telmisartanu v léčbě metabolického syndromu. Podávání telmisartanu v dávce 160 mg/den po dobu tří týdnů sice neovlivnilo signifikantně míru inzulinové rezistence, ale vedlo k významnému poklesu glykémie a změnám ve vybraných adipokinech. Vzestup bazální (lačné) koncentrace leptinu spolu s inzulin-stimulovaným vzestupem adiponektinu, leptinu a rezistinu při současném poklesu $TNF\alpha$ při hyperinzulinémii při clampu podporuje možnou metabolickou aktivitu telmisartanu u nemocných s metabolickým syndromem a poruchou glukózové homeostázy.

Klíčová slova: inzulinová rezistence, metabolická inflexibilita, renin angiotenzinový systém

Abstract

Insulin resistance (IR) is considered to be an important factor influencing the progression of atherosclerosis and is associated with higher morbidity and mortality. IR is a common feature of diabetes mellitus Type 2 and obesity. Impaired insulin action (IR) is also described in diabetes mellitus Type 1, however this phenomenon has not been fully explained. The subjects of dissertation thesis was directed on the IR importance in diabetic Type 1 patients as well as on the renin angiotensin system inhibition in patients with IR and metabolic syndrome with impaired glucose homeostasis. Hyperinsulinemic euglycemic clamp is used in combination with indirect calorimetry to estimate the IR in vivo in humans. In our project we focused on a) the existence of the metabolic inflexibility phenomenon in type 1 diabetic patients b) the methodological evaluation of the hyperinsulinemic euglycemic clamp procedure in the same group c) the influence of renin angiotensin system inhibition with angiotensin II type 1 receptor inhibitor telmisartan in patients with metabolic syndrome and impaired glucose homeostasis. The dissertation thesis results indicate an altered substrate utilization in type 1 diabetic patients - metabolic inflexibility. To the best of our knowledge, this is the first report showing this phenomenon in diabetic Type 1 subjects. Until now the importance of the metabolic inflexibility is still unknown as well as its therapeutical consequences. The methodological aspects of the substrate utilization measurement using hyperinsulinemic euglycemic clamp with indirect calorimetry was evaluated in the next study. This study has proved that urine collection performed during the clamp with urea excretion adjusted for changes in urea pool size is the most suitable technique for measuring substrate utilization both in diabetic Type 1 patients and healthy subjects. Urine collection during the clamp cannot be replaced either by the 24-hours sampling or by the single 24-hours urine collection. Attenuated insulin-stimulated decrease in urea excretion corrected for the changes in urea pool size implicates the impaired insulin effect on proteolysis. The last part of the dissertation thesis in the study 3 dealing with the "metabolic treatment" using renin angiotensin system inhibition. We found as the first the positive effect of telmisartan on selected adipokines in patients with metabolic syndrome and impaired fasting glucose. Telmisartan administration within 3-weeks did not influence insulin resistance and substrate utilization, however statistically significant plasma glucose decrease was found as well as the changes in selected adipokine levels. We can conclude that in patients with metabolic syndrome with impaired fasting glucose the short-term treatment with telmisartan surprisingly increases plasma adiponectin, leptin and resistin concentrations and decreases plasma $\text{TNF}\alpha$ levels. These results also implicate that the effect of telmisartan could be important during hyperinsulinaemia and this is the first study presenting the positive effect of telmisartan on plasma adipokines during hyperinsulinaemia in patients with impaired fasting glucose. The changes in plasma concentrations of adipokines cannot be explained by their expressions in subcutaneous adipose tissue. The results support the hypothesis that the changes in selected plasma adipokines might be involved in the beneficial metabolic effects of telmisartan in patients with metabolic syndrome.

Key words: insulin resistance, metabolic inflexibility, renin angiotensin system

Obsah

1 Úvod do disertační práce a přehled literatury k její problematice	2
1.1 Úvod do problematiky inzulinové rezistence	2
1.2 Projevy inzulinové rezistence	5
1.3 Metodické aspekty hodnocení inzulinové rezistence	5
1.4 Problematika utilizace substrátů při inzulinové rezistenci a její význam (metabolická inflexibilita)	7
1.5 Problematika hodnocení hyperinzulinového euglykemického clampu a hodnocení odpadů urey	9
1.6 Inhibice renin angiotenzinového systému a její inzulin-senzitizující účinky	10
1.6.1 Inhibice RAS v kontextu vybraných hormonů tukové tkáně (adipokiny)	12
2 Cíle disertační práce	15
3 Metodika, výsledky a diskuse k jednotlivým studiím	16
3.1 Studie č. 1 Význam metabolické inflexibility u diabetiků 1. typu (příloha č. 1)	16
3.2 Studie č. 2: Hodnocení metodiky hyperinzulinového euglykemického clampu u nemocných s diabetem mellitem 1. typu a přítomnou inzulinovou rezistencí (příloha č. 2)	19
3.3 Studie č. 3: Vliv RAS inhibice použitím blokády angiotenzin II typ 1 receptoru telmisartanem u nemocných s porušenou lačnou glykemií při metabolickém syndromu (příloha č. 3)	22
4 Závěry disertační práce	29
5 Souhrn	30
6 Seznam použitých zkratk	32
7 Použitá literatura	33
8 Přehled vlastních publikací	43
9 Seznam příloh disertační práce	60

Kapitola 1

Úvod do disertační práce a přehled literatury k její problematice

Inzulinová rezistence (IR) hraje zásadní roli v progresi aterosklerózy a je spojena s vyšší kardiovaskulární mortalitou a morbiditou¹. IR v metabolismu glukózy je běžným nálezem u diabetiků 2. typu a u obézních jedinců. Řadou autorů je IR stále považována za základní z řady klinických, biochemických a humorálních odchylek, které souhrnně označujeme jako metabolický syndrom, do kterého zahrnujeme dále esenciální hypertenzi, dyslipoproteinémií, viscerální obezitu, endotelovou dysfunkci a další odchylky². Frekvence syndromu IR u nediabetické populace v rozvinutých zemích dosahuje 25-30%, což představuje obrovský potenciál pro možnou intervenci s cílem snížit kardiovaskulární morbiditu a mortalitu v populaci. Porucha účinku inzulínu a IR je přítomna i u diabetiků 1. typu a její význam není dostatečně zhodnocen³. Dizertační práce je zaměřena na problematiku IR u nemocných s diabetem mellitem 1. typu a problematiku renin angiotenzinového systému (RAS) v kontextu IR u nemocných s metabolickým syndromem a poruchou glukózové homeostázy (porucha glukózové tolerance či zvýšená glykémie na lačno). Motivem práce je přispět k objasnění mechanismů rozvoje inzulinové rezistence a naznačit možnosti jejího ovlivnění. K hodnocení IR je použita metodika hyperinzulinového- euglykemického clampu a nepřímé kalorimetrie, které umožňují testování *in vivo* u člověka. V našem projektu jsme se zaměřili na 1) posouzení významu metabolické inflexibility u diabetiků 1. typu, 2) hodnocení metodiky hyperinzulinového euglykemického clampu u nemocných s diabetes mellitus 1. typu a přítomnou IR a 3) testování vlivu RAS inhibice použitím blokátoru angiotenzin II. typ 1 receptoru (ARB) telmisartanu u nemocných s porušenou glukózovou homeostázou při metabolickém syndromu.

1.1 Úvod do problematiky inzulinové rezistence

U obézních a diabetiků 2. typu je příčina IR multifaktoriální. Předpokládá se účast genetické predispozice a vliv zevního prostředí, které k indukci IR mohou vést přímo nebo nepřímo cestou změn hormonálních a enzymatických reakcí, změnou transportních mechanismů, dostupností substrátů i vlivem na krevní průtok tkáněmi. Mezi klinicky nejdůležitější faktory patří nízká fyzická aktivita, nadváha a obezita, nevhodné složení stravy⁴. Na rozvoji IR se může podílet defekt na kterékoli úrovni inzulinové signalizace od změny struktury a funkce

inzulinového receptoru, až po defekt postreceptorových dějů. Významného pokroku bylo v posledních letech dosaženo v poznání molekulárních mechanismů procesů, které zajišťují přenos signálu vzniklého po vazbě inzulínu na inzulínový receptor na nitrobuňkové efektorové systémy (inzulinová signální kaskáda) a zahrnují kaskádu fosforylačně-defosforylačních reakcí řady signálních molekul. Po fosforylaci inzulín receptor substance 1-4 (IRS 1-4) se signalizace ubírá dvěma základními směry, jejichž pojiťkem je fosfatidylinositol 3-kináza (PI3-kináza) a Ras komplex. A) PI3-kináza se cestou aktivace dalších kináz jako je proteinkináza B (PKB/Akt) a atypické proteinkinázy C (PKC) podílí na aktivaci enzymů proteosyntézy a aktivaci glukózových transportérů. B) Ras je skupina GTP vázajících proteinů, které odpovídají za aktivaci řady serin/treonin kináz, jako je cytoplazmatická serin kináza (Raf), mitogén aktivující protein kináza (MAP), MEK a serin kináza p90 S6. Cestou Ras komplexu jsou zajištěny mitogenní účinky inzulínu, syntéza glykogénu a lipidů⁵. Signalizace je modulována řadou humorálních a metabolických faktorů, které mohou stát v pozadí IR. Jedním z mnoha mohou být znovu neesterifikované mastné kyseliny (NEMK), které by mohly přímo ovlivňovat aktivitu PKC, která je aktivována diacylglyceroly (DAG) a účastní se řady procesů spojených s IR a diabetem 2. typu⁶. Tato inzulínová signalizační kaskáda je přítomna nejen v inzulín-dependentních tkáních, ale i v buňkách, které jsou považovány za nezávislé na inzulínu. Dosud však nejsou molekulární mechanismy IR plně objasněny, ale pravděpodobně je přítomna dysregulace účinků inzulínu a genetická determinace s různými fenotypickými projevy. Řadou autorů je IR stále považována za základní z řady klinických, biochemických a humorálních odchylek, které souhrnně označujeme jako metabolický syndrom, do kterého zahrnujeme dále esenciální hypertenzi, dyslipoproteinemii, viscerální obezitu, endotelovou dysfunkci a další odchylky. Podle příčiny vzniku dělíme IR na primární, která je charakterizována genetickou dispozicí, a sekundární, která je důsledkem hormonálních či metabolických změn. Diabetes mellitus 2. typu je onemocnění s polygenní dědičností a předpokládá se, že IR je až v 50 % podmíněna genetickými faktory. Vždy je však přítomna i sekundární inzulínová rezistence, která komplikuje metabolickou situaci⁷ a vzniká nejčastěji vlivem hormonálních a metabolických změn (např. hyperinzulinémie, hyperglykémie, zvýšení volných mastných kyselin a kontraregulačních hormonů, protilátek proti receptorům a inzulínu, amylinu a dalších vlivů)^{2,5}. Sekundární IR může navodit všechny popsané receptorové i postreceptorové abnormality, které však mohou být plně reverzibilní. IR není typickým znakem diabetu 1. typu. Porucha účinku inzulínu a IR je však u těchto nemocných také opakovaně popsána, a to i u nemocných bez orgánových komplikací s uspokojivou metabolickou kompenzací^{3,8}. U diabetiků 1. typu je přítomna porucha účinku inzulínu (i při dávkách inzulínu okolo 35 ± 2 UI/den), které v klinickém kontextu pro IR nesvědčí³. Na vzniku IR u diabetiků 1. typu se pravděpodobně podílí cesta aplikace inzulínu do periferních tkání, kdy se aplikovaný inzulín v první fázi nedostává do portální krve a do jater³. Na vzniku IR u diabetiků 1. typu se mohou podílet další faktory, jako je redukce transportu glukózy v kosterním svaly, redukce krevního průtoku svalem a zejména neuspokojivá metabolická kompenzace diabetu. Stejně jako u diabetiků 2. typu je u diabetiků 1. typu postižena jak oxidace glukózy, tak i její neoxidativní metabolismus. Jsou publikované studie, které prokazují, že vyšší denní dávka inzulínu (více než $25-55 \mu\text{U/ml}$) je spojena s vyššími titry protilátek proti inzulínu, které mohou být další příčinou IR u diabetiků 1. typu³. Navzdory skutečnosti, že soubor klinických, biochemických a humorálních odchylek asociovaných s IR, označovaný jako syndrom IR, postihuje v rozvinutých zemích až

čtvrtinu populace, nejsou dosud objasněny patofyziologické mechanismy tohoto syndromu^{2,5}. Příčiny vzniku a rozvoje IR v různých klinických situacích (diabetes mellitus 1. typu a 2. typu, obezita, endokrinopatie atd.) jsou podle současných představ multifaktoriální a podílí se na nich vlivy genetické a faktory zevní.

Primární (genetické) příčiny inzulinové rezistence

Metabolický syndrom je onemocnění s častým familiárním výskytem a předpokládá se tedy přítomnost genových mutací odpovědných za vznik IR. Pouze malá část případů (1-2 %) však byla spolehlivě objasněna průkazem genové mutace (mutace tyrozinkinázy, glukózových transportérů, polymorfismy genů pro IRS, mutace mitochondriální DNA, genových polymorfismů PPAR γ , FTO a dalších genů). Mutace, které by hrály roli u většiny nemocných, nebyly dosud identifikovány.

Sekundární příčiny inzulinové rezistence

Schematicky můžeme sekundární poruchy rozdělit na příčiny metabolické, humorální a nervové. Jednou z důležitých metabolických příčin jsou poruchy lipidového metabolismu, které konstantně provázejí syndrom IR. Zvýšené hladiny NEMK snižují inzulinem stimulovanou utilizaci glukózy (zpětnovazebnou inhibicí enzymů glykolýzy, oxidace glukózy a syntézy glykogenu - tzv. Randlův cyklus) a aktivitu PI3-kinázy^{7,9,10}. Byla doložena i dysregulace lipoproteinových lipáz při IR¹¹. Zvýšené sérové koncentrace NEMK při IR mohou být důsledkem zvýšené mobilizace mastných kyselin z triglyceridů tukové tkáně, snížené utilizace ve tkáních nebo kombinací obou procesů. Se zvýšenými hladinami NEMK souvisí také ektopické ukládání tuku mimo tukovou tkáň - do kosterního i srdečního svalu, jater, Langerhansových ostrůvků pankreatu - kde přispívají k rozvoji IR¹². Z dalších metabolických příčin se uplatňují např. hyperglykémie (toxický efekt glukózy), hyperosmolarita, poruchy acidobazické rovnováhy. Mezi humorální příčiny patří hyperinzulinémie (vedoucí k down-regulaci receptorů), zvýšení kontraregulačních hormonů, protilátky proti inzulinu a inzulinovému receptoru, a také řada dalších metabolicky aktivních látek, které mohou být produkovány adipocyty, endotelem nebo imunokompetentními buňkami a jsou v poslední době předmětem intenzivního výzkumu. Z nervových poruch je třeba zmínit aktivaci sympatiku inzulinem, úloha CNS v patogenezi IR je předmětem výzkumu. Kosterní sval se kvantitativně nejvýznamněji podílí na inzulinem stimulovaném odsunu glukózy z plazmy za podmínek postprandiálně. Proto se také pozornost výzkumu IR tradičně zaměřovala zejména na tuto tkáň. Z řady experimentálních studií však přibývají důkazy o tom, že primárním místem IR mohou být jiné tkáně, které svými metabolickými či humorálními působky mohou navodit sekundární IR v ostatních tkáních včetně kosterního svalu. Mnoho informací je o tukové tkáni, která je kromě produkce NEMK zdrojem dalších hormonů a cytokinů, o jejichž úloze v patogenezi IR existuje řada důkazů, které však nejsou zatím podpořeny terapeutickými postupy. Nejdůležitější úloha se připisuje viscerálnímu tuku (jakožto ekvivalentu rizikového typu abdominální obezity), z hlediska kvantitativního může být podkožní tuková tkáň dokonce významnější. Jako zdroj IR připadají z dalších tkání v úvahu CNS, játra či endotel.

1.2 Projevy inzulinové rezistence

Vzhledem k množství různých účinků inzulinu, který se uplatňuje nejen v metabolismu cukrů, tuků a bílkovin, ale ovlivňuje i řadu buněčných pochodů, včetně buněčného dělení a apoptózy, jsou projevy IR velmi pestré. V dalším textu se zaměřím pouze na inzulinovou rezistenci a energetický metabolismus. Z hlediska intracelulárního metabolismu glukózy je při IR u diabetu mellitu 2. typu snížena jak inzulinem stimulovaná oxidativní, tak neoxidativní utilizace glukózy. Kvantitativně je podstatně významnější pokles neoxidativního metabolismu, jak bylo prokázáno v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu, který byl doplněn měřením substrátové utilizace metodou nepřímé kalorimetrie¹³. Diabetes mellitus 2. typu je spojen s některými abnormalitami v metabolismu lipidů, mezi které řadíme: a) zvýšení NEMK, b) inzulinovou rezistencí navozenou poruchu suprese lipolýzy c) sníženou clearance NEMK během hyperglykémie¹⁴. Navíc tuková tkáň produkuje řadu hormonů (adipokiny, cytokiny atp.), jejichž vzájemná interakce je v současné době velmi zkoumána ve vztahu k patogenezi metabolického syndromu, diabetu a aterosklerózy. V metabolismu glukózy je postižena jaterní produkce glukózy, která není dostatečně inhibována inzulinem. Kromě IR v hepatocytu se na zvýšené glukoneogenezi může podílet právě zvýšená nabídka substrátů a zvýšené hladiny NEMK (Randlův cyklus), které brzdí glykolýzu a oxidaci glukózy. Rezistenci k účinku inzulinu a porucha inzulin-dependentního odsunu glukózy do tkání se projevuje zejména v kosterním svalu, kde je snížena oxidativní i neoxidativní utilizace glukózy (nižší aktivita glykogensyntézy), ale také v tukové tkáni a řadě dalších cílových buněk. IR se projevuje redukcí účinku inzulinu v metabolismu glukózy, ale současně je snížena suprese lipolýzy (nedostatečná inhibice hormon-senzitivní lipázy) a zvýšena oxidace lipidů. Neesterifikované mastné kyseliny jsou vychytávány svaelem a inkorporovány do tukových částic ve svalu (asi 70-90 %) a dochází k jejich rychlé esterifikaci do triacylglycerolů^{15,16}. Porucha účinku inzulinu nemusí být stejně vyjádřena ve všech metabolických drahách. Naopak vlivem průvodní hyperinzulinémie se zvyšují některé účinky inzulinu v metabolismu lipidů, bílkovin, nukleových kyselin a minerálů, jejichž klinické projevy mohou být pro prognózu pacienta závažnější než samotná hyperglykémie. Stručně jsou tyto klinické projevy shrnuty v tabulce 1.1. Tab. 1 Metabolické odchylky provázející IR a jejich možné příčinné souvislosti.

1.3 Metodické aspekty hodnocení inzulinové rezistence

V klinické praxi je možno hodnotit účinek inzulinu podle jeho potřeby. Jako orientační ukazatel IR lze proto použít hladinu imunoreaktivního inzulinu v plazmě nalačno. U pacientů léčených inzulinem svědčí pro poruchu v účinku inzulinu celková denní dávka větší než 40 IU inzulinu. Zlatým standardem k testování účinku inzulinu *in vivo* je hyperinzulinový euglykemický clamp¹⁷. Pro hodnocení účinku inzulinu (inzulinová senzitivita, inzulinová rezistence) se užívá řady ukazatelů, jejichž základem je vždy spotřeba glukózy (M), které mohou být přepočítány na kg hmotnosti, kg hmotnosti bez tuku či na klidový energetický výdej^{17,18}. Míra účinku inzulinu se hodnotí podle množství glukózy, kterou je třeba dodávat, abychom při standardně zvolené hyperinzulinémii (konstantní infuzi inzulinu) udrželi glykémii na požadované hodnotě. Rychlost infuze glukózy se mění podle glykemií měřených v pěti-/desetiminutových intervalech. Po počáteční nerovnováze dochází cca. za 90 minut k ustálenému stavu, kdy platí,

Metabolická odchylka	Mechanismus vzniku
Dyslipoproteinémie (↑ triglyceridy, ↑ VLDL, ↓ HDL, ↑ NEMK)	↑ clearance NEMK z plazmy, ↑ produkce VLDL játry, ↑ lipolýza v tukové tkáni
Hypertenze	retence vody, sodíku v ledvinách <ul style="list-style-type: none"> • ↓ aktivita Na/K ATPázy, ↑ intracelulárního • endoteliální dysfunkce (↓ schopnost vazodilatace při ↓ syntéze NO) • ↑ tonus sympatiku • aktivace RAS
Hyperurikémie	↓ clearance kyseliny močové v ledvině
Prokoagulační stav	defekt fibrinolýzy, ↑ PAI-1
Prozánětlivý stav	Produkce adipokinů, prozánětlivých faktorů tukovou tkání při obezitě (viz kap. 2)

Zkratky: VLDL - very-low-density lipoprotein; HDL - high-density lipoprotein;

Na/K ATPáza - aktivní transportér iontů sodíku a draslíku přes buněčnou membránu; NO - oxid dusnatý;

RAS - renin angiotenzinový systém; PAI-1 - inhibitor tkáňového aktivátoru plazminogenu.

Tabulka 1.1: Metabolické odchylky provázející IR a jejich možné příčinné souvislosti.

že glukóza do těla podávaná, se rovná glukóze, která z oběhu zmizí (glucose uptake), tento parametr - tzv. spotřeba glukózy - glucose disposal [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$] je měřítkem citlivosti na inzulin při určité inzulinémii. Opakovaným provedením clampu při různých koncentracích inzulinu je možné provést vyšetření i tzv. dose response křivky (dávkové závislosti účinku inzulinu na jeho koncentraci v plazmě). Křivka má tvar "S", tj. při stoupající koncentraci inzulinu stoupá spotřeba glukózy až k maximální hodnotě, kterou dalším zvyšováním dávky inzulinu nelze překročit. Spotřeba glukózy odpovídá účinku inzulinu za předpokladu, že je během clampu zablokována produkce glukózy v játrech a ledvinách. V podmínkách nalačno (tj. při inzulinémii 5-15 $\mu\text{U}/\text{ml}$) činí produkce glukózy asi $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Při infuzi inzulinu dochází k supresi endogenní produkce glukózy v závislosti na dávce inzulinu a výši hyperinzulinémie. U zdravých jedinců je endogenní produkce glukózy úplně zablokována při rychlostech inzulinu vyšších než $0,42\text{ mU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, což znamená, že úplnou blokádu můžeme předpokládat i při běžně používaných rychlostech inzulinu ($1\text{ mU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)¹⁸. Pokud použijeme rychlosti nižší nebo vyšetření provádíme u inzulinorezistentních osob, je třeba odlišit endogenní produkci glukózy, nejlépe některou z izotopových metod. Jinou možnou metodou, pomocí níž lze kvantifikovat inzulinovou senzitivitu, je intravenózní glukózový toleranční test s častým odběrem krevních vzorků hodnocený Bergmanovým minimálním modelem. Uvedené testy jsou technicky i časově náročné, proto se zejména ve studiích s větším počtem probandů používají zjednodušené testy, které vycházejí z jediného odběru a vypočítávají různé indexy inzulinové senzitivity (tab 1.2). Tyto indexy jsou spolehlivé u nediabetiků, a to do lačné glykémie $7\text{ mmol}/\text{l}$ ^{19,20}. Při kombinaci dalších vyšetření s clampovými metodami je třeba brát v úvahu možnost ovlivnění výsledků inzulinem či vodní náloží a zahrnout tyto faktory do korekčních výpočtů. Například, pokud provádíme během clampu nepřímou kalorimetrii, pak je pro kalkulaci oxidace proteinů třeba měřit odpady urey v moči, která byla sbírána během clampového vyšetření, a není možné použít sběr moče za 24 hodin²¹. Dále je třeba zohlednit

Index	Vzorec
HOMA (Homeostasis Model Assessment)	$\text{INS} * \text{GLU} / 22,5$
QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check)	$1 / (\log \text{INS} + \log \text{GLU})$

Zkratky: INS - lačná inzulinémie; GLU - lačná glykémie.

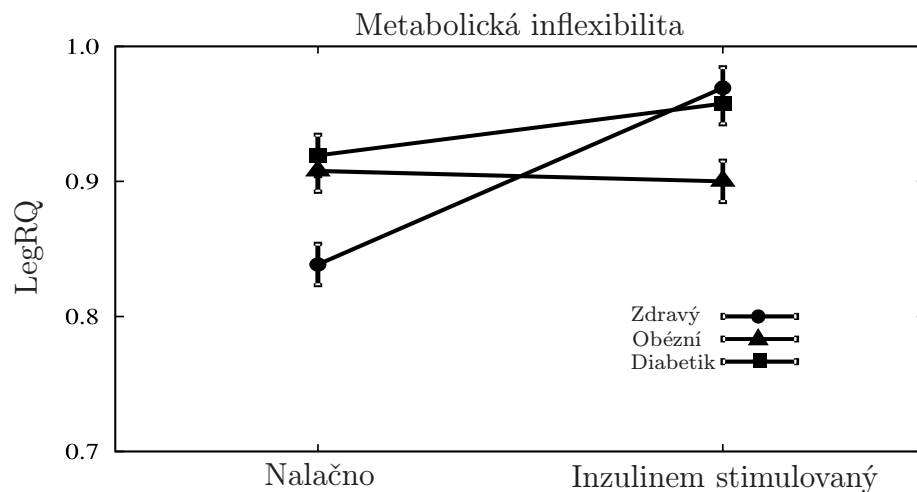
Tabulka 1.2: Indexy inzulinové rezistence.

změny v distribučním prostoru urey vyvolané inzulinem a volumovou expanzí a korigovat odpady dusíku do moče^{22,23}.

1.4 Problematika utilizace substrátů při inzulinové rezistenci a její význam (metabolická inflexibilita)

Z hlediska intracelulárního metabolismu glukózy je při IR u diabetu mellitu 2. typu snížena jak inzulinem stimulovaná oxidativní, tak neoxidativní utilizace glukózy. Kvantitativně je podstatně významnější pokles neoxidativního metabolismu, jak bylo prokázáno v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu, který byl doplněn měřením substrátové utilizace metodou nepřímé kalorimetrie^{17,21}. Diabetes mellitus 2. typu je spojen s některými abnormalitami v metabolismu lipidů, mezi které řadíme: a) zvýšení NEMK, b) inzulinovou rezistencí navozenou poruchu suprese lipolýzy c) sníženou clearance NEMK během hyperglykémie¹⁴. V podmínkách nalačno je oxidace mastných kyselin hlavním zdrojem energie pro kosterní sval u zdravých štíhlých jedinců. Zatímco postprandiálně (inzulin-stimulovaných podmínkách) dochází k supresi oxidace lipidů a zvyšuje se vychytávání (uptake), oxidace a ukládání glukózy^{14,24,25}. Tato tzv. metabolická flexibilita, nebo-li schopnost přesmyku mezi utilizací substrátů nalačno a postprandiálně, je významná ke krytí energetických potřeb i k efektivní tvorbě zásob a využití energie¹⁴. Obecně, za podmínek nalačno přechází sval na dominantní zdroj energie ve formě mastných kyselin. Při jejich nadbytku dochází ke snížení glykolýzy cestou akumulace acetyl CoA a citrátu, což vede k inhibici pyruvát-dehydrogenázy a fosfo-fruktokinázy, tím dochází ke zvýšení glukóza 6-fosfátu, který blokuje hexokinázu, a snižuje se oxidace a vstup glukózy do buněk¹⁰. Většina studií, která prezentovala vzájemnou kompetici substrátů, byla založena na pokusech na zdravých jedincích. V současné době je význam tohoto cyklu zpochybněn za podmínek IR. Experimentální studie na zvířecích modelech neprokázaly snížený inzulinem stimulovaný odsun glukózy po přidání mastných kyselin¹². IR se projevuje redukcí účinku inzulinu v metabolismu glukózy, ale současně je snížena suprese lipolýzy a zvýšena oxidace lipidů. NEMK jsou vychytávány svaem a inkorporovány do tukových částic ve svalu (asi 70-90 %) a dochází k jejich rychlé esterifikaci do triacylglycerolů²⁶. Bylo prokázáno, že chronické i akutní zvýšení NEMK snižuje inzulinem stimulovanou utilizaci glukózy, syntézu glykogenu a aktivitu PI3 kinázy^{27,28}. Zvýšené koncentrace NEMK při IR v cirkulaci mohou být důsledkem zvýšené mobilizace MK z triglyceridů tukové tkáně, snížené utilizace ve tkáních nebo kombinací těchto procesů. Při IR byla doložena dysregulace lipoproteinových lipáz^{26,29}. Významnou roli by mohla hrát i porucha vazebného proteinu pro mastné kyseliny (MK) (fatty acid binding protein - FABP), který je zodpovědný za transport MK ve tkáních k mitochondriím (pro oxidaci mastných kyselin), k tukovým kapénkám (pro ukládání), do já-

dra (regulace transkripce enzymů lipidového metabolismu) a má pravděpodobně i vlastnosti "scavengera" volných radikálů^{30,31}. Ukládání tuku mimo tukovou tkáň (v kosterním svalu, v játrech, srdci, buňkách Langerhansových ostrůvků) je jednou z diskutovaných teorií vzniku IR a jejích projevů. Kromě kvantitativních změn mastných kyselin je řada experimentálních i *in vivo* dokladů o tom, že v patofyziologii IR se uplatňují i změny složení MK v sérových a tkáňových lipidech. IR se projevuje rovněž nižší aktivitou glykogensyntetázy a sníženou tvorbou glykogenu^{13,32}. U zdravých jedinců bez přítomnosti IR jsou hlavním substrátem volné mastné kyseliny. Odsun volných mastných kyselin do svalu za těchto podmínek je značný, jak dokazují studie na předloktí u člověka, při kterých byl nalezen respirační koeficient (RQ) 0.76 ± 0.02 svědčící o tom, že oxidace lipidů představuje až 80% spotřebu O_2 ¹². Navíc dosud není plně objasněn vztah metabolických pochodů a adipokininů (adiponektin, rezistin, $TNF\alpha$ a další) k IR a jejím projevům³³. U diabetiků 2. typu a obézních jedinců je v podmínkách nalačno oxidace glukózy zvýšená oproti hubeným zdravým jedincům, zatímco je snížena oxidace lipidů při zachování vychytávání mastných kyselin. Obrázek 1.1 popisuje změny za podmínek hyperinzulinového euglykemického clampu u zdravých jedinců, kdy dochází k až 10-ti násobnému zvýšení oxidace glukózy (RQ=1.00), ale u obézních a diabetiků je oxidace glukózy i její vychytávání významně redukováno a prakticky se nemění s podmínkami nalačno (RQ=0.9)¹². Tento jev metabolické inflexibility by mohl být pravděpodobně dalším klíčovým mechanismem, vedoucím ke zvýšené akumulaci lipidů ve svalové tkáni a mohl by se podílet na poruše metabolismu glukózy při IR¹⁵. Zvýšená oxidace glukózy nalačno negativně koreluje s inzulínovou sensitivitou, stejně jako vyšší oxidace lipidů během inzulín-stimulovaných podmínek. U diabetiků a obézních jsou diskutovány mechanismy, kterými je metabolická inflexibilita manifestována: 1) porucha cefalické fáze inzulínové sekrece, 2) porucha na úrovni kosterního svalu v podmínkách nalačno a postprandiálně, 3) porucha postprandiálního odsunu mastných kyselin k ukládání, 4) mitochondriální porucha metabolismu mastných kyselin¹⁶. V současné



Obrázek 1.1: Metabolická inflexibilita energetických substrátů nalačno a za podmínek inzulínem stimulovaných u obézních (▲), diabetiků 2. typu (■) a zdravých jedinců (●) upraveno podle Kelley et al.¹⁴. Vysvětlivky: LegRQ -respirační koeficient měřen na předloktí.

době se však poukazuje na možnost zvýšené akumulace lipidů ve svalové tkáni, která se může podílet na rozvoji IR. Akumulace lipidů ve svalové tkáni je podle výsledků mnoha studií způ-

sobena snížením oxidace a zvýšením esterifikace mastných kyselin³⁴. U obézních a diabetiků 2. typu je pravděpodobnou příčinou snížené oxidace mastných kyselin porucha vstupu acylCoA do mitochondrie v důsledku inhibice karnitin-palmitoyl-transferázy (CPT) malonylem CoA a tato inhibice vede ke snížení oxidativních pochodů v mitochondrii^{12,24}. Právě aktivita CPT je při IR snížena, což má vztah v metabolismu mastných kyselin, ale ovlivňuje i metabolismus glukózy^{12,34}. Akumulace dlouhých řetězců acyl CoA může negativně působit na transfer signálu přes inzulinové receptory cestou aktivace proteinkinázy C. Význam této kinázy spočívá ve schopnosti inaktivovat inzulinový receptor a jeho podjednotky fosforylací některých z jeho serinových podsoučástí. Z uvedeného vyplývá, že akumulace lipidů ve svalové tkáni je zodpovědná za snížení účinku inzulinu v řadě jeho metabolických drah¹⁴. Jak bylo popsáno v předešlém textu většina prací hodnotících problematiku metabolické flexibility, resp. inflexibility, byla hodnocena u diabetiků 2. typu. V případě diabetu mellitu 1. typu však dosud tento fenomén nebyl doložen.

1.5 Problematika hodnocení hyperinzulinového euglykemického clampu a hodnocení odpadů urey

Hyperinzulinový euglykemický clamp v kombinaci s nepřímou kalorimetrií se používá k měření substrátové utilizace a k odlišení metabolismu glukózy na oxidativní a neoxidativní cestu^{17,21,23}. Běžně se nepřímá kalorimetrie při hyperinzulinovém euglykemickém clampu provádí před zahájením clampu (bazálně), v průběhu a na konci clampu. Sběr moči a jeho přesnost je i významným parametrem přesného měření utilizace živin, protože oxidace jednotlivých substrátů se nejčastěji odvozuje z měření odpadů dusíku urey do moči. Variabilita vylučování dusíku urey je významně ovlivněna denním příjmem živin, energetickou situací organismu, funkcí ledvin a stavem hydratace^{23,35}. Vylučování dusíku urey se rovněž liší při srovnání sběrů moči v rozmezí několika dnů a tato variabilita je významná při měření oxidace substrátů. Metabolické studie u člověka jsou zatíženy řadou chyb a měření odpadu dusíku je velkým problémem při výpočtu oxidace substrátů. Přesnější metodou je hodnocení odpadu celkového dusíku tzv. Khjeldalizací, která však není rutinní a není běžně dostupná, proto je tedy v praxi používáno hodnocení vylučování dusíku urey (U-urea v mmol/24 hodin). Měření odpadů dusíku je sice zatíženo interindividuální a intraindividuální chybou, se kterou se kalkuluje v naprosté většině prací hodnotících substrátové oxidace. Použití močového katetru pro sběr moči by zpřesnilo celkový výsledek, ale pro rizika invazivního výkonu se zavedení močového katetru běžně nepoužívá. Extrarenální ztráty urey a celkového dusíku pravděpodobně nehrají významnou roli u zdravých jedinců, ale tato problematika nebyla hodnocena u diabetiků, u kterých je často přítomna např. sekundární inzulinová rezistence³⁶. Změny sérové a močové koncentrace urey v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu jsou v literatuře již popsány, dochází k poklesu sérové koncentrace urey a ke zvýšení vylučování močové urey a z těchto důvodů se provádí korekce na distribuční prostor (urea pool size)²². Není-li provedena tato korekce, je výsledná oxidace proteinů nadhodnocena a vypočtená oxidace sacharidů a lipidů nižší. Příčina těchto změn není plně objasněna, a tudíž je možné, že hyperinzulinémie není jediným faktorem, který ovlivňuje vylučování urey clampu (objemová infuzní zátěž, endogenní vlivy, změny hormonální během clampu, inzulinová rezistence). Tyto

změny ovlivňují měření substrátové utilizace. U diabetiků není dosud zhodnocen vliv IR na vylučování urey v průběhu clampu³⁷. V tomto kontextu se nabízí otázka, zda může IR mít vliv na vylučování urey u diabetiků 1. typu. Jak již bylo zmíněno, hodnota vylučované urey je důležitá pro zhodnocení oxidace proteinů. Z hlediska účinku inzulínu v oblasti proteinů nejsou literární data jednotná, ale podle dosud publikovaných dat lze hodnotit antikatabolický účinek inzulínu u diabetiků 1. typu jako inzulínem navozenou inhibici proteolýzy v kosterním svalu³⁸. Dle některých autorů je větší míra proteolýzy přítomna u diabetiků 1. typu a oxidace proteinů je bez výraznějších změn při normální míře proteosyntézy³⁹. Jiné názory soudí, že inzulín nestimuluje proteosyntézu za lačných podmínek v kosterním svalu⁴⁰. Relativně jednotné názory jsou v problematice léčby inzulínem u diabetiků 1. typu, který upravuje míru katabolismu při inzulín-deficienci⁴¹. Intenzivní léčba inzulínem, však nenormalizuje endogenní reutilizaci aminokyselin při restrikci dietního přísunu proteinů a nedochází k efektivnímu využití přijatých aminokyselin⁴¹. Denní variabilita vylučování urey je dalším jevem, který by mohl mít vliv na hodnocení substrátové utilizace nalačno a v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu a/nebo postprandiálně. Práce autorů Steffe a spol. prokázala přítomnost cirkadiálního rytmu u zdravých jedinců, ale nebyl zhodnocen fyziologický význam této denní variability⁴². Z hlediska hodnocení substrátové utilizace nepřímou kalorimetrií by přítomnost rytmu mohla mít vliv na výsledky oxidace proteinů nejen v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu, ale zejména na lačnou hodnotu oxidace proteinů. Tato problematika dosud rovněž nebyla hodnocena u diabetiků 1. typu se sekundární inzulínovou rezistencí.

1.6 Inhibice renin angiotenzinového systému a její inzulín-senzitizující účinky

Studie s inhibitory renin angiotenzinového systému, mezi něž řadíme inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEI) a blokátory angiotenzin II typ 1 receptoru (ARB), z posledního období, prokázaly snížení incidence diabetes mellitus 2. typu, ale některé recentní studie tento trend naopak neprokázaly^{43–47}. Mechanismus, který vede ke snížení výskytu incidence diabetes mellitus 2. typu v některých studiích, není v současné době znám. V posledních letech bylo publikováno, že některé ARB blokátory (telmisartan, irbesartan, losartan) mohou mít podobnou strukturální homologii s PPAR γ ligandem pioglitazonem, a tím mohou aktivovat tyto nukleární receptory⁴⁸. ARB v experimentu cestou PPAR γ ovlivňují genovou expresi tzv. adipose protein (aP2) a PPAR γ 2-ligand vázající doménu (ligand binding protein-LBD) v buněčných modelech u irbesartanu a telmisartanu, ale v závislosti na koncentraci ARB. U telmisartanu k ovlivnění aP2 a LBD dochází již při běžném dávkování pro léčbu esenciální hypertenze⁴⁸. Afinita jednotlivých ARB k PPAR γ je dána jejich lipofilitou, a ta je největší u telmisartanu a méně u losartanu a irbesartanu⁴⁹. V experimentálních studiích s ARB blokátory bylo prokázáno, že parciální aktivace PPAR γ , je nezávislá na jejich blokující aktivitě k angiotenzin II typ 1 receptoru⁵⁰. PPAR γ funguje jako transkripční regulátor v tukové tkáni, kde reguluje četné geny zahrnuté do metabolismu lipidů a glukózy, a tím je dán předpoklad k jejich využití v léčbě metabolického syndromu, diabetu mellitu a stavů, kdy je přítomna IR⁴⁹. V tomto kontextu se nabízí otázka, zdali je efekt ARB (lipofilní) kvantitativně, ev. i kvalitativně, asociován v závislosti na množství tukové tkáně (viscerální, podkožní atp.).

Studie tuto problematiku dosud nehodnotily. Experimentální studie s inzulin-rezistentními jedinci, obezitou a diabetem mellitem 2. typu identifikovaly defekt mitochondriální oxidativní fosforylace, která je asociována se zvýšenou akumulací lipidů a triacylglycerolů ve svalové tkáni¹². Ze skupiny ARB je telmisartan schopen zvýšit expresi PKC 1 genu, který kóduje fosfoenolpyruvát-karboxykinázu (PEPCK-C). PEPCK-C je zodpovědná za snížení hladiny mastných kyselin mechanismem zvýšení syntézy glycerolu a reesterifikace mastných kyselin cestou aktivace PPAR γ ⁵¹. Navíc je popsáno, že telmisartan snižuje o 60-70 % expresi acetyl-CoA-karboxylázy 2 (ACC2). Tato inhibice vede k současnému snížení syntézy mastných kyselin a ke zvýšení jejich oxidace¹². Právě ACC2 je jedním z hlavních regulátorů metabolismu mastných kyselin ve svalu. Tento enzym zvyšuje koncentraci malonyl-CoA, který je inhibíto-rem karnitin-palmitoyl-transferázy, klíčového enzymu regulujícího vstup mastných kyselin do mitochondrie a jejich využití. Zajímavým nálezem je, že pioglitazon ani irbesartan neměly vliv na ACC2 ve srovnání s telmisartanem⁴⁸. Efekt telmisartanu byl prokázán ve skupině potkanů dietně intervenovaných dietou s vysokým obsahem tuku a sacharidů, ale nikoliv ve skupině myši typu Zucker, tedy u geneticky determinovaného modelu mutace leptinového receptoru. Zde se nabízí hypotéza, že benefit léčby telmisartanem by mohl být závislý na intaktním leptinovém signalizačním systému⁴⁸. Další experimentální práce prokázaly, že telmisartan ve srovnání s valsartanem zvyšuje vychytávání glukózy a expresi GLU-4 transportéru⁵². ACEI a ARB jsou schopny blokovat nežádoucí metabolické účinky angiotenzinu II (AII), a to jak na úrovni zlepšení inzulinové senzitivity, tak na úrovni sekrece inzulinu^{53,54}. Existuje ale i řada experimentálních dokladů o inzulin-senzitizujících mechanismech, které jsou na blokádě účinku AII nezávislé⁵³. Zlepšená mikrocirkulace v Langerhansových ostrůvcích účinkem ACEI i ARB zlepšuje uvolňování inzulinu jako odpověď na stimulaci glukózou (první fáze sekrece inzulinu). Obdobně má pozitivní vliv na sekreci inzulinu iontová rovnováha kalia a magnesia, do níž RAS blokáda účinně zasahuje. Pokud by inzulin-senzitizující působení ACEI a ARB spočívalo především v blokádě AII, měly by být obě lékové skupiny stejně účinné. To však dosavadní výzkum nepotvrdil a zdá se, že i jednotlivé ACEI a ARB mají odlišný metabolický potenciál⁵³. Slibné experimentální závěry se ale nedaří vždy doložit i při studiích s lidskými buňkami a tkáněmi *in vitro*, v klinických studiích *in vivo* a při intervenčních studiích. To jen dokládá složitost regulací metabolismu na úrovni celého organismu. Závěry *in vivo* studií jsou bohužel obtížně porovnatelné vzhledem k rozdílným podmínkám a designu studií. Zavádějícími faktory může být dávka a doba podávání i druh ARB, studovaná populace (etnikum, zdravé versus inzulin-rezistentní osoby, diabetici, věková skupina), metoda testování IR (řada studií hodnotí pouze inzulinémii, glykémii nalačno, případně HOMA-IR nebo QUICKI-IR, minimum výsledků pochází z clampových studií)²⁰. První hypotézy o zvýšené utilizaci glukózy, zprostředkované zlepšením průtoku krve kosterním svalem po podání ACEI nebo ARB, se v dalších studiích nepotvrdily. Někteří autoři popisují dokonce disociaci hemodynamických a metabolických účinků AII, kdy presorické dávky AII zvyšují uptake glukózy⁵⁵. Důležitým mechanismem metabolických účinků ACEI a ARB je interakce s inzulinovou signální kaskádou. AII využívá ve své signální transdukcii signální proteiny inzulinové kaskády (PI3 kináza), a snižuje tak její aktivaci^{56,57}. Blokáda RAS usnadňuje fosforylaci tyrosinu a IRS-1 a zvyšuje aktivaci PI-3 kinázy. Při léčbě ACEI nebo ARB není vazodilatace doprovázena zvýšenou aktivací sympatického nervového systému, naopak bylo zjištěno, že hladiny cirkulujících katecholaminů jsou sníženy⁵⁸. Blokáda RAS dále stimuluje diferenciaci adipocytů⁵⁹, která brání

ektopickému ukládání lipidů mimo tukovou tkáň, čímž zlepšuje citlivost na inzulin. Pozitivní účinky ACEI jsou podle některých autorů připisovány spíše zvýšení hladiny bradykininu, a tím i tvorby oxidu dusnatého (NO), který zvyšuje perfuzi a moduluje transport glukózy ve svalu^{45,60}. Bradykinin rovněž podporuje fosforylaci IRS 1-4 a následně translokaci receptoru GLUT4 z cytosolu do buněčné membrány, což umožňuje zlepšení inzulin-dependentního od-sunu glukózy do tkání. Vliv ARB na IR a metabolismus glukózy je stále předmětem diskusí⁵⁴. Některé z ARB skupiny mají schopnost přímo aktivovat nukleární receptory PPAR γ , zcela nezávisle na signalizační kaskádě AII. Bylo zjištěno, že telmisartan vzhledem ke své struktu-rální podobnosti s pioglitazonem účinkuje jako parciální agonista PPAR γ , ale některé recentní práce poukazují na PPAR γ nezávislý vliv telmisartanu na hladinu adiponektinu⁶¹.

1.6.1 Inhibice RAS v kontextu vybraných hormonů tukové tkáně (adipokiny)

Tuková tkáň je metabolicky a hormonálně velmi aktivní tkáň a současně je hlavní zásobárnou energeticky bohatých triglyceridů za lačných podmínek. Funkce tukové tkáně je i regulační a endokrinní a je zdrojem celé řady bioaktivních peptidů, tzv. adipocytárních hormonů nebo adipokinů, růstových faktorů a cytokinů, jejichž účinek je lokální v rámci tukové tkáně (au-tokrinní/parakrinní) nebo systémový (endokrinní). Současně produkuje prozánětlivé faktory (cytokiny, reaktanty akutní fáze, eicosanoidy, prostaglandiny atp.) a protizánětlivé faktory (adiponektin, interleukin-6 (IL-6) a interleukin-10 (IL-10)⁶². V současné době je známo více než 50 adipokinů, ale u většiny z nich dosud nebyla definována fyziologická a patofyziologická funkce. Dále je tuková tkáň prostřednictvím exprimovaných receptorů zapojena v komunikaci s již popsanými hormonálními systémy i CNS a podílí se tedy na koordinaci nejen ener-getického metabolismu, ale i neuroendokrinních a imunitních funkcí⁶³. Terapeutické ovlivnění metabolismu tukové tkáně není dosud možné, protože mnoho adipokinů může být současně příčinnou i důsledkem metabolických procesů při metabolickém syndromu, obezitě a diabetu mellitu⁶⁴. Rovněž není zřejmé, zdali jsou některé adipokiny (např. adiponektin, leptin, rezistin atp.) patofyziologickým faktorem nebo markerem těchto metabolických onemocnění^{65,66}.

Renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAS). V tukové tkáni byly identifikovány všechny složky renin-angiotenzinového systému, který by mohl spojovat patogenezu obezity a kardiovaskulárních chorob⁶². Produkce angiotenzinogenu, reninu (i renin-like aktivity), an-giotenzin konvertujícího enzymu a AT 1 a AT 2 receptorů byly zjištěny v tukové tkáni, resp. diferencujících se adipocytech^{62,67}. Tuková tkáň je hlavním extrahepatálním zdrojem angio-tenzinogenu a významně přispívá ke zvýšení jeho celkové hladiny, a tím i k rozvoji hypertenze u obézních osob⁶⁸. Adipocyty rovněž exprimují oba typy receptorů pro AII. (AT1R a AT2R). AII inhibuje parakrinně diferenciaci adipocytů u člověka⁶⁹ a podle některých autorů koreluje aktivita ACEI v tukové tkáni negativně s inzulinovou senzitivitou⁷⁰. Signální transdukce AII je zprostředkována signálními proteiny, které jsou sdíleny se signalizací inzulinu (PI3-kináza, Akt kináza)⁵⁷. Podle některých názorů, by právě tuková tkáň mohla být primárním zdrojem látek, které by se systémově mohly podílet na rozvoji hypertenze u obézních jedinců.

Leptin je produktem *ob* genu, jehož zdrojem jsou výhradně adipocyty. Uplatňuje se v regulaci množství zásobního tuku, snižuje příjem potravy, zvyšuje výdej energie a má pozitivní efekt na účinek inzulinu⁶⁸. Regulace příjmu potravy probíhá v hypothalamu, kde leptin stimuluje

anorexigenní peptidy (např. proopiomelanokortin) a inhibuje orexigenní peptidy (neuropeptid Y nebo agouti protein). Dále prostřednictvím zvýšené oxidace mastných kyselin brání ekto-pické akumulaci tuku v játrech a svalech⁷¹ a ovlivňuje proteiny inzulinové signální kaskády⁷². Produkce leptinu klesá během hladovění, účinkem katecholaminů nebo TNF α a naopak je stimulována při sytosti a účinkem inzulinu⁷³. Počáteční slibné výsledky z experimentálních studií, kdy substituce leptinu u *ob/ob* (leptin-deficitních) myši vede ke snížení IR a tělesné hmotnosti, nebyly zopakovány u jedinců bez deficitu leptinu. Je popsán však fenomén leptinové rezistence⁷⁴, jehož podklady nejsou objasněny (s výjimkou vzácné mutace leptinového receptoru). Význam leptinu v patogenezi metabolického syndromu není stále i přes mnoho experimentálních prací dořešen.

Adiponektin je pravděpodobně multifunkční inzulin-senzitizující glykoprotein, který je exprimován specificky v tukové tkáni a uvolňován do cirkulace ve vysokých koncentracích (5–10 $\mu\text{g/ml}$)^{75,76}. Je popsáno, že účinek adiponektinu je antiaterogenní i protizánětlivý, kdy snižuje expresi adhezivních molekul a proliferaci buněk hladké svaloviny za současné suprese konverze makrofágů do pěnových buněk⁷⁷. Adiponektin přímo stimuluje účinky inzulinu v játrech, snižuje jaterní glukoneogenezi, snižuje aktivitu enzymů lipogeneze ve prospěch oxidace mastných kyselin, má antiaterogenní účinky a zlepšuje uptake glukózy do kosterního svalu³³. Molekuly adiponektinu vytvářejí homotrimery, které dále asociují ve větší multimerické komplexy. V séru můžeme detekovat nízkomolekulární (LMW) oligomery (trimery a hexamery) a vysokomolekulární (HMW) multimery, mezi nimiž je nejaktivnější HMW forma. Jsou známy 2 typy receptorů pro adiponektin, které aktivují AMP-kinázu (adenosin monofosfát-aktivovaná proteinkináza): AdipoR1 je exprimován zejména v kosterním svalu a AdipoR2 zprostředkuje účinky adiponektinu v játrech. Snížené hladiny adiponektinu jsou popsány v souvislosti s inzulinovou rezistencí, obezitou, diabetem 2. typu, aterosklerózou, hypertenzí a ischemickou chorobou srdeční³³. Recentní klinické studie poukazují na pozitivní vliv inhibice RAS na hladiny plazmatického adiponektinu při použití blokády ABR telmisartanem^{78–81}. U nemocných s diabetem 2. typu je podávání PPAR γ agonistů (TZD) spojeno se zlepšením inzulinové senzitivity a zvýšením sérových hladin adiponektinu⁸². Dosud však není objasněno, zda je adiponektin hlavním mediátorem senzitivizujících účinků TZD, stejně jako není jasné, zdali je adiponektin markerem či látkou, která se podílí v patogenezi.

Rezistin je peptid produkovaný diferencujícími se adipocyty, který byl dalším kandidátem na spojující faktor mezi IR a obezitou. Vyšší plazmatická hladina je spojena s vyšším rizikem diabetu 2. typu⁸³. Rezistin zhoršuje glukózovou homeostázu a indukuje IR zejména v játrech⁸⁴. Další studie u experimentálních modelů a u lidí však původní hypotézu nepotvrdily, závěry nejsou jednoznačné^{85–87}. Myši rezistin je exprimován zejména v tukové tkáni, zatímco u lidí je exprese v adipocytech signifikantně nižší a významnějšími zdroji jsou zejména mononukleární buňky nebo endotel⁸⁶. Receptor pro rezistin, jeho signální kaskáda a biologické účinky nebyly dosud spolehlivě objasněny. Klinické studie u lidí na rozdíl od experimentálních modelů neprokazují jasnou spojitost mezi rezistinem, IR nebo obezitou. Příčinná spojitost mezi rezistinem a patogenezi metabolického syndromu nebyla dosud potvrzena, stejně jako nebyl prokázán efekt léčby ABR na hladinu rezistinu.

Tumor necrosis factor α (TNF α) je znám jako multifunkční regulační cytokin, který hraje roli v zánětu, apoptóze, cytotoxicitě, produkci dalších cytokinů (interleukin 1 a 6) a také indukuje inzulinovou rezistenci⁸⁸. Jeho zdrojem jsou adipocyty i buňky stromo-vaskulární frakce⁸⁹.

V tukové tkáni jsou exprimovány oba typy receptorů pro TNF α : typ I a typ II, jejichž solubilní formy jsou uvolňovány do cirkulace a jsou odrazem aktivace TNF α . TNF α je zvýšeně exprimován v tukové tkáni obézních pacientů⁹⁰, redukce hmotnosti snižuje jeho hladiny⁹¹. Experimentální data opět slibně dokládala úlohu TNF α při rozvoji IR: neutralizace TNF α protilátkami zvyšuje inzulínovou senzitivitu, geneticky modifikované myši s chybějícími geny pro TNF α nebo jeho receptory nejsou inzulino-rezistentní⁹². U lidí však výsledky studií nejsou jednoznačné. Sérové koncentrace TNF α jsou ve srovnání s tkáňovými koncentracemi velmi nízké, donedávna na hranici rozlišovací schopnosti dostupných metod (RIA, ELISA). Jednoznačný vztah mezi hladinami cirkulujícího TNF α a IR nebyl prokázán⁶³, podávání protilátek neutralizujících TNF α nezměnilo citlivost k účinku inzulínu⁹³. Soudí se tedy, že TNF α ovlivňuje IR lokálně (parakrinně) v dané tkáni, a to několika možnými mechanismy. Vstupuje do interakce s inzulínovou signální kaskádou, kde snižuje tyrosin-kinázovou aktivitu a fosforylaci IRS. Dále TNF α stimuluje lipolýzu a uvolňování NEMK z adipocytů a snižuje expresi adiponektinu, genů nutných pro vychytávání a ukládání NEMK, suprimuje transkripční faktory adipogeneze a lipogeneze^{63,68}. Bylo zjištěno, že inhibiční účinek TNF α na inzulínovou signalizaci je do určité míry antagonizován TZD⁹⁴. TNF α sice ovlivňuje řadu metabolických pochodů, jeho přímý endokrinní efekt je však zřejmě méně významný než nepřímý účinek, vycházející z parakrinní modulační NEMK a adipokinů⁶³. Blokáda RAS a pokles plazmatické hladiny TNF α nebyla zatím v humánních studiích jednoznačně potvrzena, zatímco v experimentálních datech je popsán například vliv telmisartanu na snížení tvorby TNF α ⁹⁵. Dosavadní klinické výsledky testujících ARB jsou spíše charakteru mírného zlepšení metabolického profilu, inzulín-senzitizující účinek telmisartanu a losartanu by jistě měl být ověřen dalšími klinickými studii, nejlépe s použitím clampové techniky, která je zlatým standardem pro testování IR *in vivo*. Dosud tedy není jednotnost v názorech na terapeutické použití ARB a ACE v ovlivnění inzulínové senzitivity a dalších parametrů metabolického syndromu a diabetes mellitus^{96,97}. Studie jsou provedeny na různých souborech nemocných a nelze v současné době konstatovat, že inhibice RAS systému vede k jednoznačnému zlepšení inzulínové senzitivity⁹⁸. Vliv ARB na poruchy substrátové utilizace při IR nebyl jednoznačně klinicky ani experimentálně dosud zhodnocen. Zatím není možné podpořit doporučení pro „metabolickou léčbu“ ARB. Potenciální mechanismy, kterými by mohly ARB a ACEI být zodpovědné za antiaterogenní účinek, jsou:

1. vliv na inzulínovou signalizační kaskádu, zlepšení inzulínové senzitivity,
2. vliv na zlepšení průtoku krve tkáněmi,
3. snížení oxidačního stresu a protizánětlivé účinky,
4. snížení sympatické aktivity,
5. vliv na adipogenezu, snížení hladiny mastných kyselin a triacylglycerolů, zvýšení, inverzního transportu cholesterolu, zvýšení HDL cholesterolu,
6. snížení krevního tlaku.

Kapitola 2

Cíle disertační práce

V posledních letech došlo k velkému rozvoji poznatků o IR a průvodních poruchách metabolismu sacharidů a lipidů. Je třeba dalších studií s cílem objasnit, zdali intervence vedoucí ke snížení inzulínové rezistence vedou ke zlepšení abnormálních metabolických cest při inzulínové rezistenci. Rozpoznání patofyziologických mechanismů je základem pro možnou racionální intervenci. Jedním z možných projevů IR by mohl být již zmíněný fenomén tzv. metabolické flexibility, resp. inflexibility, který by mohl být významný v patogenezi metabolického syndromu a diabetu mellitu. Jak bylo popsáno v úvodní části disertační práce, většina studií byla provedena u obézních a diabetiků 2. typu. Klíčovou otázkou však zůstává, jak obézní a diabetici ztrácejí tuto schopnost a jak ji lze ovlivnit terapeuticky. V této souvislosti se nabízí slibná léčba ACEI a ARB, která by mohla prostřednictvím PPAR γ zlepšit zmíněné metabolické odchylky. Vzhledem ke složitosti celého systému není dosud plně objasněna příčinná souvislost mezi jednotlivými poruchami. Konkrétní cíle disertační práce

1. Testovat význam metabolické inflexibility u diabetiků 1. typu, (Studie č.1)
Hypotéza. Předpokládáme, že u skupiny diabetiků 1. typu nalezneme poruchu metabolické flexibility, která bude ve vazbě s mírou inzulínové rezistence.
2. Zhodnotit metodiku provádění hyperinzulinového euglykemického clampu v kombinaci s nepřímou kalorimetrií u nemocných s diabetes mellitus 1. typu a přítomnou IR a nalézt optimální časování sběrů moče. (Studie č. 2)
Hypotéza. Předpokládáme, že nalezneme významné cirkadiální kolísání v odpadech urey a k hodnocení odpadu proteinů během clampu bude využitelný noční sběr moče.
3. Sledovat vliv inhibice RAS s použitím ARB telmisartanu na inzulínovou rezistenci a hladiny vybraných adipokinů v plazmě a jejich exprese podkožní tukové tkáni u nemocných s poruchou glukózové homeostázy při metabolickém syndromu v 3 týdny trvající randomizované, placebem kontrolované a zkřížené studii (Studie č. 3).
Hypotéza. Podávání telmisartan povede ve srovnání s placebem k poklesu IR a významným změnám ve vybraných adipokinech. Tyto změny budou korelovat se změnami v účinku inzulínu.

Kapitola 3

Metodika, výsledky a diskuse k jednotlivým studiím

3.1 Studie č. 1 Význam metabolické inflexibility u diabetiků 1. typu (příloha č. 1)

Problematika metabolické flexibility, přesmyku mezi zvýšenou oxidací lipidů a jejich zvýšenou utilizací za podmínek nalačno a jejich následnou supresí za podmínek inzulín-stimulovaných a současným vzestupem metabolických cest glukózy byla řešena u diabetiků 1. typu s použitím kombinované metodiky hyperinzulinového euglykemického clampu a nepřímé kalorimetrie. Studie je zaměřena na testování možné přítomnosti metabolické inflexibility u diabetiků 1. typu během clampem navozené hyperinzulinémie. Do studie bylo zařazeno 11 diabetiků 1. typu bez orgánových komplikací (tab. 3.1). Byl proveden 4-hodinový 2-stupňový hyperinzulinový euglykemický clamp (1 a 10 mU. kg⁻¹.min⁻¹) a provedena nepřímá kalorimetrie před clampem (-45 min-0 min) a v průběhu clampu 45 min na konci každé periody clampu. Podrobněji viz příloha č. 1. V tabulce 3.1 je uvedena charakteristika souboru.

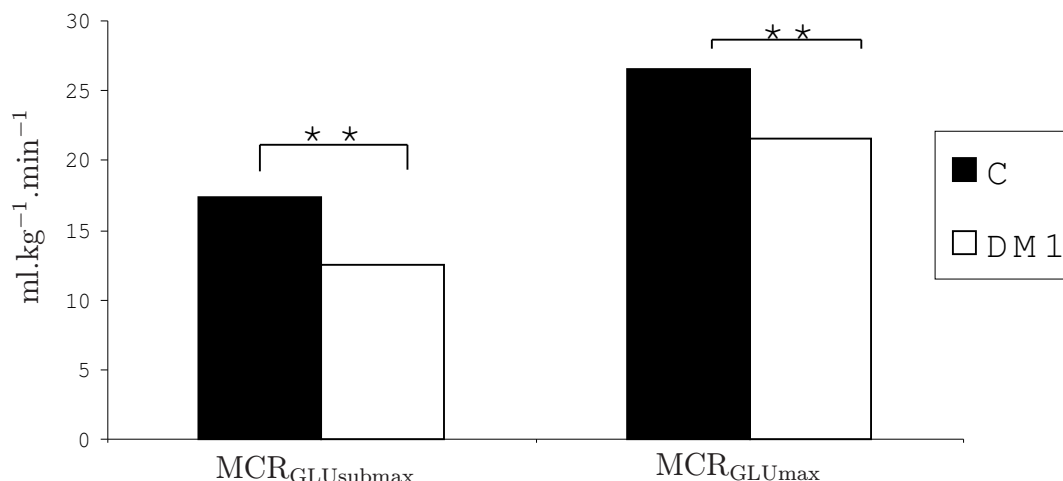
	C (n = 11)	DM (n = 11)
věk (roky)	28,72 ± 2,10	32,18 ± 5,72
BMI (kg/m ²)	28,72 ± 2,10	24,36 ± 2,15
Triacylglyceroly (mmol.L ⁻¹)	1,11 ± 0,76	0,77 ± 0,40
Celkový cholesterol (mmol.L ⁻¹)	4,11 ± 0,88	4,23 ± 0,59
HDL-cholesterol (mmol.L ⁻¹)	1,12 ± 0,42	1,67 ± 0,29
HbA1c (%) (DCCT)	4,82 ± 0,27	7,97 ± 1,34***
Dávka inzulínu (IU/den)	0	36 ± 9,8

Statistická významnost: *** $p < 0,001$

Tabulka 3.1: Charakteristika souboru.

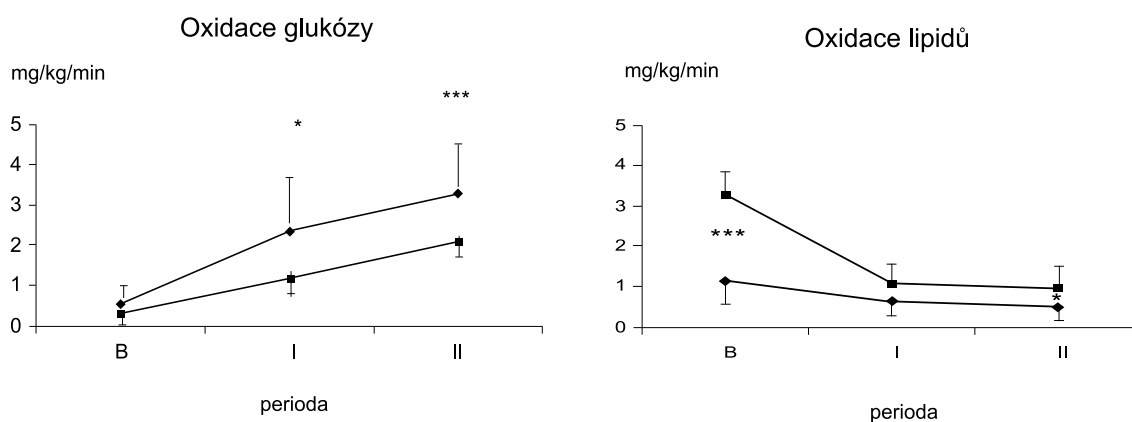
Výsledky a diskuze

V naší studii jsme ve shodě s dalšími autory potvrdili přítomnost inzulínové rezistence u diabetiků 1. typu (obrázek 3.1)^{3,8}. Metabolická clearance glukózy byla u diabetiků signifikantně



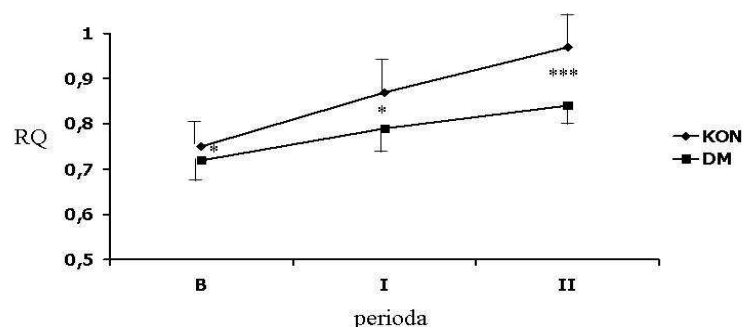
Obrázek 3.1: Metabolická clearance glukózy ($MCR_{GLUsubmax}$ a MCR_{GLUmax}) během dvou-
stupňového euglykemického clampu u diabetiků 1. typu (DM1) oproti zdravým jedincům (C).
Statistická významnost: $**p < 0.01$.

nižší ve srovnání se zdravými jedinci. Lačná (bazální) oxidace lipidů byla vyšší u diabetiků proti zdravým kontrolám a přetrvávala vyšší i za podmínek hyperinzulinového euglykemického clampu. Během inzulín-stimulovaných podmínek nedochází k současnému vzestupu oxidace glukózy a snížení oxidace lipidů u inzulín-rezistentních jedinců (obrázek 3.2). Respirační ko-



Obrázek 3.2: Změny oxidace glukózy a lipidů u diabetiků 1. typu (■) a zdravých jedinců (◆) za bazálních podmínek (B) a během dvou-
stupňového euglykemického hyperinzulinového clampu při rychlosti podávání inzulínu 1 (I) a 10 mU/kg.min (II). Statistická významnost:
 $*p < 0,05$, $***p < 0,001$.

eficient (RQ) jako ukazatel substrátové utilizace byl u diabetiků 1. typu rovněž nižší než u zdravých osob, a to jak za podmínek bazálních tak lačných (obrázek 3.3). Suprese lipidové



Obrázek 3.3: Změny RQ v průběhu clampu u diabetiků 1. typu (■) a zdravých jedinců (◆) za bazálních podmínek (B) a během dvoustupňového euglykemického hyperinzulinového clampu při rychlosti podávání inzulínu 1 (I) a 10 mU/kg.min (II). Statistická významnost: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

oxidace byla vyšší v periodě 1 clampu a persistovala i v druhé periodě clampu při vyšší inzulínemii, rovněž i absolutní hodnota oxidace lipidů byla vyšší u diabetiků. Naše výsledky poukázaly na skutečnost, že lipidy jsou predominantním zdrojem energie u obou skupin, ale za podmínek hyperinzulinemie (postprandiální) oxidace lipidů zůstávala vyšší v souboru diabetiků 1. typu. Podle některých autorů je metabolická inflexibilita možnou další součástí fenotypu inzulínové rezistence^{12,15}.

Závěr

Naše prezentovaná a publikovaná studie prokázala jako první přítomnost metabolické inflexibility u diabetiků 1. typu, která zatím byla popsána pouze u obezných jedinců a diabetiků 2. typu¹⁴. V průběhu clampového vyšetření byl nalezen u diabetiků 1. typu se sekundární inzulínovou rezistencí menší vzestup RQ a nedostatečný vzestup oxidace glukózy ve srovnání se zdravými jedinci. Dále byla nalezena vyšší jak lačná, tak inzulínem-stimulovaná oxidace lipidů. Právě porucha suprese oxidace lipidů je považována za jeden z možných faktorů vedoucích ke zvýšené akumulaci triacylglycerolů a mastných kyselin do jiných tkání, zejména do kosterního svalstva. Původní Randleova teorie byla zaměřena na význam mastných kyselin v patogenezi IR a spočívala na kompetici energetických substrátů, která ve svém důsledku vedla k IR¹⁰. V současné době je Randleův cyklus zpochybněn za podmínek IR a pozornost je věnována roli tukové tkáně, zejména ektopické akumulaci lipidů. V tomto mechanismu může být důležitá nerovnováha mezi oxidací lipidů a glukózy, tedy metabolická inflexibilita. Tato souvislost může hrát významnou úlohu a ve svém důsledku by se mohla podílet i na zhoršení účinku inzulínu.⁹⁹ U obezity spojené s IR se projevy metabolické kapacity projevují spíše směrem k reesterifikaci než k oxidaci mastných kyselin, tedy problematika metabolické inflexibility by mohla u diabetiků 1. typu být odlišná¹⁰⁰. Dosud není úplně potvrzeno, že porucha v metabolismu

mastných kyselin u obézních je jednou z primárních změn, nebo je důsledkem. Významným závěrem je nutnost dále testovat tuto problematiku na větších souborech, zejména v kontextu léčby diabetu, např. parciálními nebo totálními agonisty PPAR γ receptorů - thiazolidindiony (TZD)^{101,102}. Dojde-li ke zlepšení substrátové utilizace při léčbě TZD, pak by mohla být zlepšena metabolická situace diabetiků, a tím zabránit některým patofyziologickým jevům (např. akumulaci lipidů v kosterním svalstvu, vyšším hladinám triacylglycerolů, zlepšení citlivosti na inzulin atp.), které se mohou podílet na chronických komplikacích při diabetu mellitu. Rovněž je nutné spojit hodnocení této problematiky ve vztahu genotyp/fenotyp, neboť nehomogenita jedinců ve fenotypických projevech může být při interpretaci výsledků zavádějící.

3.2 Studie č. 2: Hodnocení metodiky hyperinzulinového euglykemického clampu u nemocných s diabetem mellitem 1. typu a přítomnou inzulinovou rezistencí (příloha č. 2)

Hyperinzulinový euglykemický clamp v kombinaci s nepřímou kalorimetrií se používá k měření substrátové utilizace a k odlišení metabolismu glukózy na oxidativní a neoxidativní cestu^{17,23}. Běžně se nepřímá kalorimetrie při hyperinzulinovém euglykemickém clampu provádí před zahájením clampu (bazálně), v průběhu a na konci clampu. Sběr moči a jeho přesnost je i významným parametrem přesného měření utilizace živin, protože oxidace jednotlivých substrátů se nejčastěji odvozuje z měření odpadů dusíku urey do moči²¹. Variabilita vylučování urey je ovlivněna denním příjmem, především pak energetickou situací organismu, funkcí ledvin a stavem hydratace. Během hyperinzulinového euglykemického clampu je navozením hyperinzulinémie ovlivněno nejen vylučování urey, ale také diuréza, distribuční prostor urey (pokles sérové koncentrace urey) a clearance urey. Změny vylučování urey je nutno korigovat na změny sérové koncentrace urey. Tato vypočítaná hodnota se používá k měření substrátové oxidace nepřímou kalorimetrií²². Není-li provedena korekce, je výsledná oxidace proteinů nadhodnocena a vypočtená oxidace sacharidů a lipidů nižší²². Studie je zaměřena na hodnocení metodiky hyperinzulinového euglykemického clampu u diabetiků 1. typu s ohledem na měření odpadů dusíku urey do moči za podmínek inzulinové rezistence k hodnocení substrátové utilizace, konkrétně evaluace oxidace proteinů. Hyperinzulinový euglykemický clamp a nepřímá kalorimetrie se používá k hodnocení metabolismu energetických substrátů. Přesně definovaná metoda je podmínkou správné interpretace za různých patologických stavů. Cílem naší studie bylo zhodnocení vlivu a) akutní hyperinzulinémie na vylučování urey a oxidaci proteinů u diabetiků 1. typu, b) zdali je u diabetiků 1. typu přítomen cirkadiální rytmus vylučování urey a c) je-li možné nahradit komplikovaný sběr moči během clampu jiným možným sběrem ze sběrů v průběhu 24 hodin k hodnocení substrátové utilizace

Výsledky a diskuze

V naší studii a) jsme prokázali inzulinem-indukovanou změnu distribučního prostoru urey u diabetiků 1. typu, kdy lze použít jen hodnotu urey, která je korigována na distribuční prostor. Tento náález je v souladu s předchozím testováním na zdravých jedincích²². Hyperinzulinémie

signifikatně snižuje korigované hodnoty urey v obou skupinách, ale ve skupině diabetiků je pokles menší, a navíc při shodné míře proteinové oxidace (tab. 3.2). Tyto nálezy svědčí pro nedostatečnou supresi proteolýzy u diabetiků 1. typu a mohou implikovat hypotézu, že je u diabetiků 1. typu přítomna porucha účinku inzulínu v proteinovém metabolismu, vzestup sérové koncentrace urey, lze je parciálně vysvětlit inzulínovou rezistencí nebo objemovou zátěží, která byla u obou skupin však stejná. Vzhledem k poruše v metabolismu glukózy může být tedy přítomna dále abnormální odpověď na přísun proteinů, jak ukázala práce⁴¹ dokládající vysokou míru postprandiální produkce urey. V našem testování jsme nehodnotili jaterní produkci glukózy, ale je známo, že klesá o více než 90 % při inzulínemii větší než 50 $\mu\text{U/ml}$ u zdravých jedinců, ale i diabetiků 1. typu¹⁰³. Limitací naší studie je skutečnost, že nebyly použity izotopové techniky, které jsou považovány za přesnější v hodnocení proteinového metabolismu^{41,104}.

b) Dalším cílem našeho testování bylo hodnocení přítomnosti cirkadiálního rytmu u diabe-

Perioda	C (mmol/24 hod)	DM1 (mmol/24 hod)
UE Bazální	412 \pm 125	412 \pm 216
UE Perioda 1	462 \pm 157	686 \pm 228 ^b
UE Perioda 2	436 \pm 138	522 \pm 162 ^b
UEc Perioda 1	240 \pm 170 ^d	374 \pm 187 ^{a,d}
UEc Perioda 2	219 \pm 122 ^{c,d}	274 \pm 165 ^{a,c,d}

Statistická významnost: a, $p < 0,05$; DM1 vs C, b, $p < 0,01$;

UEc perioda 2 vs UE bazální, d, $p < 0,001$; UEc perioda 1 vs UE Perioda 1, UEc Perioda 2 vs UE Perioda 2.

Tabulka 3.2: Vylučování urey před (bazální) a v průběhu dvoustupňového hyperinzulinového euglykemického clampu v čase 0 a 120 minut (Perioda 1) a v čase 120 do 240 minut (Perioda 2) před (UE) a po korekci na distribuční prostor urey (UEc) u zdravých jedinců (C) ($n=11$) a diabetiků 1. typu (DM1) ($n=11$).

tiků 1. typu (tab 3.3) Nebyl nalezen signifikantní rozdíl v cirkadiálním rytmu mezi zdravými jedinci a diabetiky 1. typu. Dosud publikované studie jsou však kontroverzní. Steffe a spol. ve své práci prokázali přítomnost cirkadiálních rytmů u zdravých jedinců, vysvětlení popsaného jevu dosud nemá patofyziologicky definovaný podklad. Vylučování urey je velmi významně ovlivněno příjmem proteinů, který byl v naší studii shodný v obou skupinách⁴².

Závěr

Z naší práce vyplývá, že k hodnocení substrátové utilizace u diabetiků 1. typu nelze nahradit sběr moči během hyperinzulinového euglykemického clampu sběrem za 24 hodin, stejně jako nelze sběr bazální (6:00-9:00) použít během clampu a je tedy nutné provádět sběry moče k hodnocení vylučování urey ve všech periodách clampu. Komplikovaný sběr v průběhu clampu, který je zatížen chybou sběru, nelze nahradit sběrem jiným, a proto je nadále nutné během clampu provádět tento sběr. Pokud u diabetiků 1. typu, ale i u zdravých jedinců, provádíme v průběhu clampu nepřímou kalorimetrii, pak je pro kalkulaci oxidace proteinů třeba měřit odpady urey v moči, která byla sbírána během clampového vyšetření, a není možné použít sběr moče za 24 hodin. Problematika hodnocení vylučování urey je velmi složitá, neboť re-

Hodiny (perioda)	C (mmol/24 hod)	DM1 (mmol/24 hod)
24 hod.	470 ± 140	452 ± 64
06 - 09 (I)	479 ± 134	431 ± 180
09 - 12 (II)	510 ± 213	423 ± 172
12 - 15 (III)	477 ± 229	428 ± 121
15 - 18 (IV)	474 ± 274	525 ± 102
18 - 21 (V)	576 ± 273	464 ± 135
21 - 24 (VI)	499 ± 103	503 ± 100
24 - 06 (VII)	436 ± 125	369 ± 108

Rozdíly mezi DM1 a C nejsou statisticky významné.

Tabulka 3.3: Cirkadiální hodnocení vylučování urey (UE) u kontrolního souboru C (n=11) a diabetiků 1. typu.

absorpce urey je pasivním procesem závislým na resorpci vody, která je dále v závislosti na gradientu v renálních tubululech. Během hyperinzulinového euglykemického clampu mohou nastávat změny v diuréze, distribučním prostoru urey a její clearance, které mohou mít vliv na hodnocení substrátové utilizace. Za těchto podmínek dochází k navýšení celkového vylučování dusíku o 47 % převážně mechanismem zvýšené clearance urey²³. Popsané jevy mohou nabývat na významu, zejména při krátkodobých clampových vyšetřeních³⁵. Navíc zvýšené koncentrace inzulínu mohou mít natrium-retenční efekt, a tím mohou ovlivňovat objem moči, ale i clearance urey¹⁰⁵. Dalším výsledkem naší studie bylo neprokázání denního (diurnálního) rytmu vylučování urey u diabetiků 1. typu ani u zdravých jedinců. Tento nálezn je odlišný proti některých publikovaných studiím^{36,42}. Význam popsáného diurnálního rytmu u zdravých jedinců nebyl dosud definován. Je doloženo, že příjem proteinů je faktorem, který významně modifikuje vylučování urey. V naší studii byl přísun proteinů v obou skupinách shodný⁴². Hyperinzulinémie signifikantně snižuje korigované hodnoty urey v obou skupinách, ale ve skupině diabetiků je pokles menší, a navíc při shodné míře proteinové oxidace. Nález poukazuje na poruchu účinku inzulínu v proteolýze u diabetiků 1. typu. Výsledky implikují hypotézu, že za podmínek inzulínové rezistence je současně přítomna porucha v proteinovém metabolismu. Vliv inzulínu na oxidaci proteinů je stále kontroverzní, někteří autoři popisují, že inzulín redukuje oxidaci proteinů i produkci urey u zdravých jedinců^{37,106,107}. Naše výsledky vliv hyperinzulinémie na oxidaci proteinů neprokázaly. Zda je příčinou IR, nelze z naší studie jednoznačně konstatovat. Z práce vyplývá potřeba dalších studií, které by dále danou problematiku pro hodnocení substrátové utilizace v průběhu clampových testování umožnily zpřesnit.

3.3 Studie č. 3: Vliv RAS inhibice použitím blokády angiotenzin II typ 1 receptoru telmisartanem u nemocných s porušenou lačnou glykemií při metabolickém syndromu (příloha č. 3)

Dosud chybí jasné důkazy o účinku telmisartanu na inzulinovou senzitivitu, metabolismus glukózy a lipidů v humánních studiích ve srovnání s experimentálními daty. Telmisartan se jeví jako nejúčinnější agonista PPAR γ ze skupiny ARB^{45,48}. Výhodou je, že tento účinek je zprostředkován již běžnými terapeutickými dávkami oproti losartanu^{108,109}. *In vivo* ale chybí dosud jasné a přesvědčivé důkazy o účinku telmisartanu na inzulinovou senzitivitu, metabolismus glukózy a lipidů. Zatím bylo publikováno několik málo studií, ve kterých se zlepšily parametry lipidového metabolismu, kdy došlo k poklesu sérových hladin lipidů^{110,111}. V publikované studii¹¹² došlo k signifikantnímu poklesu glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) při použití relativně nízké dávky telmisartanu (20 nebo 40 mg 1x denně) ve srovnání s candesartanem (8 mg/den) a rovněž byl dále shledán signifikantní pokles lačné inzulinémie u diabetiků 2. typu¹¹². Studie na 18 nemocných s diabetem mellitem 2. typu léčených deriváty sulfonylurey a hypertenzí prokázala vzestup hladiny adiponektinu, pokles hs-CRP, lačné inzulinémie a lipidů ve skupině telmisartanu (40 mg/den) oproti skupině léčených valsartanem (80 mg/den) a candesartanem (8 mg/den)¹¹³. Problematika vlivu telmisartanu na změny tkáňových plazmatických adipokinů je v posledních letech intenzivně studována. Recentní studie hodnotila vliv telmisartanu (40 mg/den) proti olmesartanu hypertenzních obézních jedinců. Vliv obou léků byl stejný na snížení krevního tlaku, lipidový profil, ale telmisartan navíc zlepšil HOMA, snížil glykémii i inzulinémii a došlo k poklesu hladiny leptinu¹¹⁴. V případě leptinu jsou data literárně kontroverzní obdobně jako v případě rezistinu. Telmisartan proti ostatním ARB i ACEI ve většině studií zvyšuje plazmatickou hladinu adiponektinu a zlepšuje inzulinovou rezistenci^{78,81,115–117}. Jedenáct osob s metabolickým syndromem a porušenou lačnou glykemií dle (ATP III, IDF) bylo zařazeno do dvojité slepé, placebem kontrolované, randomizované, cross-over studie, kdy byl po dobu tří týdnů podáván telmisartan (160 mg/den) nebo placebo. Na konci každé testované periody byl proveden hyperinzulinový euglykemický clamp (HEC) v trvání 120 minut (5 mmol/l, 1 mU. kg⁻¹.min⁻¹) a měření substrátové utilizace nepřímou kalorimetrií (bazálně : -45-0 min a během clampu: 75-120 min.). Inzulinová senzitivita byla hodnocena jako metabolická clearance glukózy (MCR) a spotřeba glukózy (M). Hladina plazmatických adipokinů byla stanovována před a v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu v časech (0, 30, 120 minut). Biopsie podkožní tukové tkáně byla prováděna pro hodnocení exprese subkutánních abdominálních adipokinů v časech (0 a 30 minut) clampu. V tabulce 3.4 je uvedena charakteristika souboru.

Výsledky a diskuze

Nalezli jsme pokles lačné glykémie a vzestup inzulinémie ($p < 0.05$) u skupiny s telmisartanem oproti placebo (obrázek 3.4).

V našem testování nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v míře inzulinové rezistence a substrátové oxidace. Nebyl dále nalezen rozdíl v lačných koncentracích adiponektinu, re-

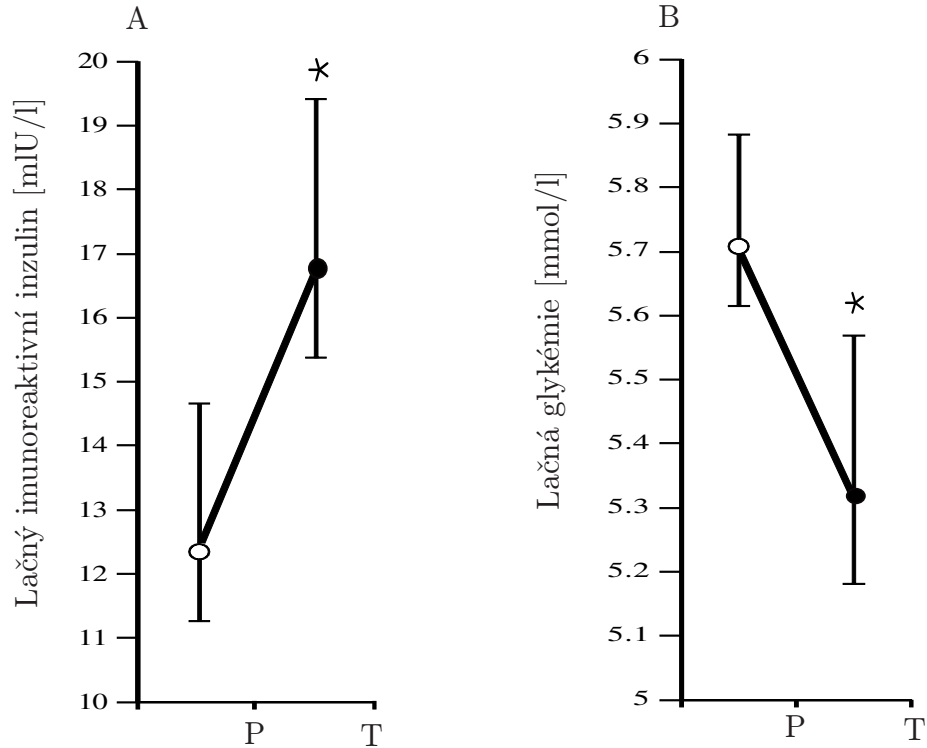
věk (roky)	50,0 ± 6,02
BMI (kg/m ²)	29,0 ± 4,37
Obvod pasu (cm)	104,6 ± 7,8
Systolický krevní tlak (mmHg)	133,0 ± 12,0
Diastolický krevní tlak (mmHg)	91,3 ± 10,0
HbA1c (IFCC, %)	3,86 ± 0,44
Celkový cholesterol (mmol/l)	5,51 ± 1,1
HDL cholesterol (mmol/l)	0,99 ± 0,12
LDL cholesterol (mmol/l)	3,2 ± 1,22
Sérové triacylglyceroly (mmol/l)	2,71 ± 1,4
Glykémie 120 min, oGTT (mmol/l)	7,6 ± 1,8
Lačná glykémie (mmol/l)	6,1 ± 0,43

Tabulka 3.4: Charakteristika souboru (n=12).

zistinu, tumor necrosis faktoru α (TNF α) (obrázek 3.5), ale překvapivě byla nalezena vyšší koncentrace leptinu u skupiny s telmisartanem (obrázek 3.6). Inzulinem stimulované plazmatické koncentrace adiponektinu ($p < 0.05$) (obrázek 3.7), leptinu a rezistinu (obrázek 3.8) ($p < 0.001$) byly zvýšeny, zatímco došlo k poklesu TNF α ($p < 0.05$) u skupiny telmisartanu. Podkožní exprese rezistinu byla snížena, ale byl nalezen vzestup leptinu po podávání telmisartanu.

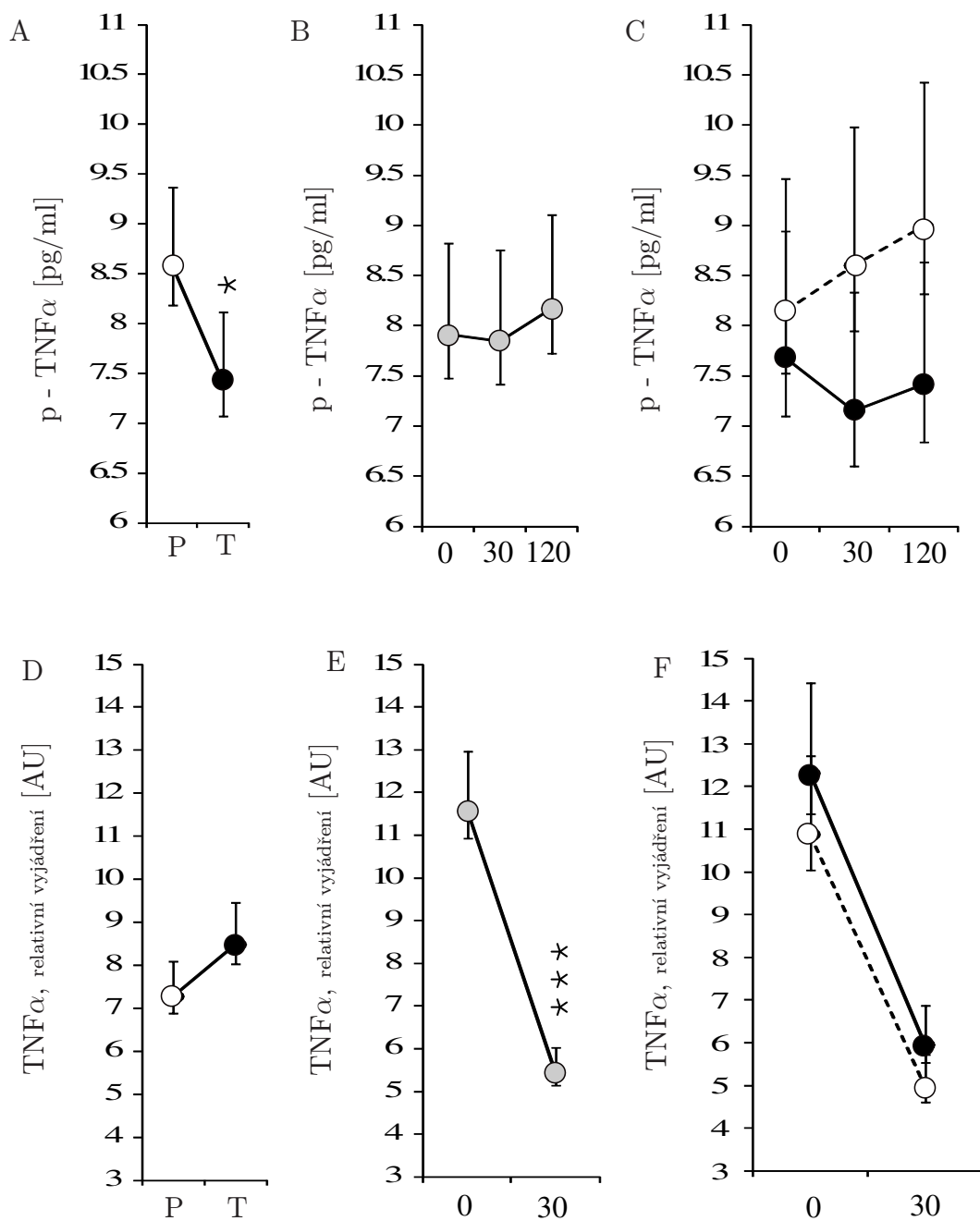
Závěr

Placebem kontrolovaná cross-over randomizovaná studie prokázala pokles lačné glykémie, pokles krevního tlaku, zatímco inzulinová senzitivita nebyla ovlivněna, stejně jako substrátová utilizace. Pokles lačné glykémie nelze vysvětlit zlepšením inzulinové senzitivity. Hlavním nálezem naší studie je, že krátkodobé podání vyšší dávky telmisartanu 160 mg/denně vede ke změnám plazmatických a podkožních adipokinů. Naše výsledky jako první poukázaly na možnost, že telmisartan by mohl být efektivní v průběhu hyperinzulinémie, která byla v našem testování zvolena, tedy hladina inzulinu se podobá postprandiální sekreci¹⁸. Změny adipokinů, které jsme našli, nelze vysvětlit změnami adipokinů v podkožní tukové tkáni. Zajímavým nálezem bylo, že krátká doba (3 týdny) podávání vyšší než běžné dávky telmisartanu (160 mg denně) již vede ke změnám v plazmatických a podkožních adipokinech bez ovlivnění inzulinové sensitivity či substrátové utilizace. Navíc inzulinová senzitivita byla hodnocena žlatým standardem hyperinzulinovým euglykemickým clampem, zatímco ve většině studií byla použita technika HOMA¹¹⁰. Vzestup bazální (lačné) koncentrace leptinu spolu s inzulin stimulovaným vzestupem adiponektinu, leptinu a rezistinu při současném poklesem TNF α podporuje tedy eventuální možnou metabolickou aktivitu telmisartanu u nemocných s metabolickým syndromem a porušenou lačnou glykemií. Z naší studie nelze vyloučit vliv telmisartanu na krevní průtok, a tím zlepšení metabolických parametrů. Krevní průtok nebyl v naší studii hodnocen. Studie nebyla určena k hodnocení vlivu hyperinzulinémie na hodnoty plazmatických hladin a podkožní exprese adipokinů. Podle některých studií je prokázáno, že inzulin *per se* může zvyšovat expresi některých adipokinů zahrnutých do mechanismů inzu-

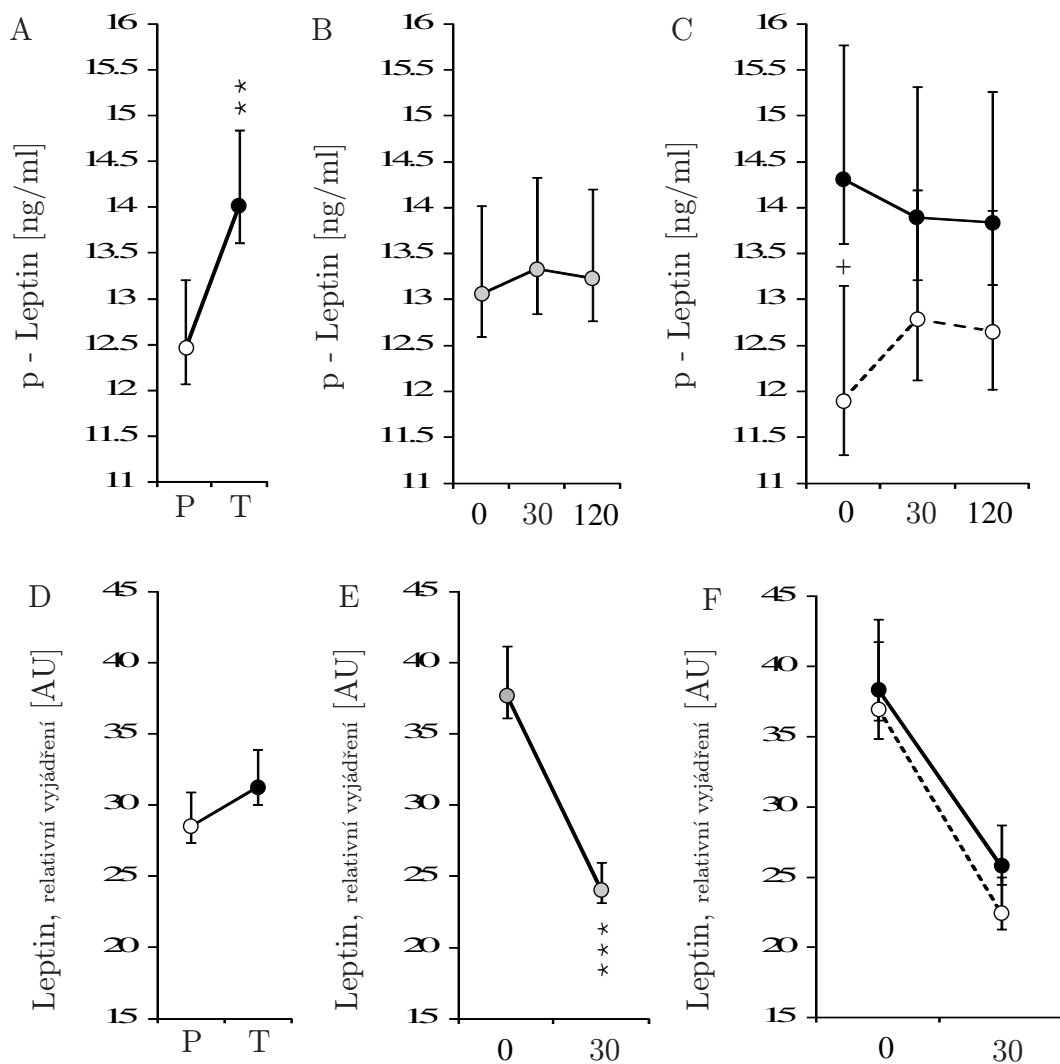


Obrázek 3.4: Vliv telmisartanu na hladiny lačného imunoreaktivního inzulínu a plazmatické hodnoty glykémie. Pro hodnotu lačného inzulínu (část A) byla statistická významnost následující: Telmisartan: $F=7.6$: $p=0.0224$; Subject (inter-individual variability): $F=7.6$: $p=0.0029$. Pro lačnou hodnotu glykémie (část B), byla statistická významnost následující: Telmisartan: $F=8.8$: $p=0.0129$; Subject (inter-individual variability): $F=3$: $p=0.0392$.

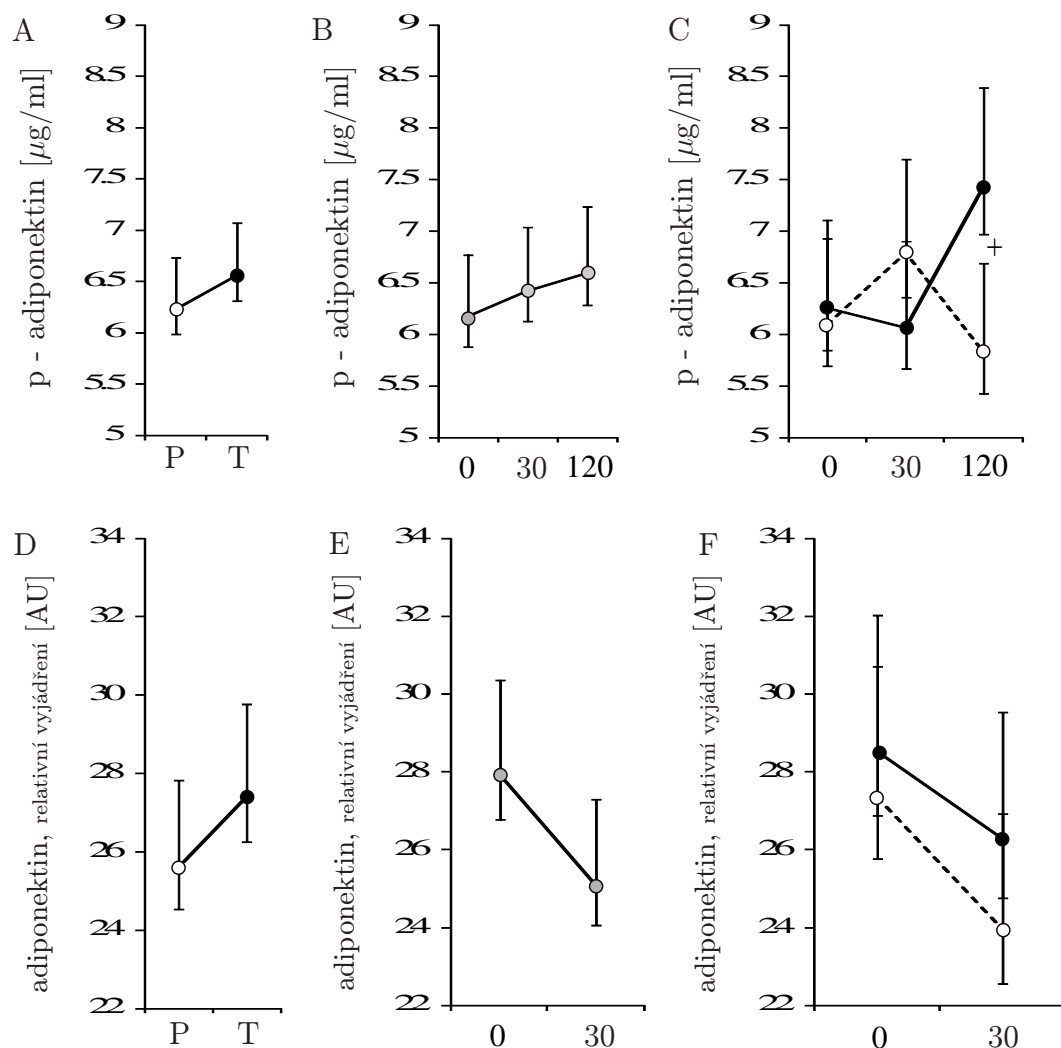
linové senzitivity v tukové tkáni¹¹⁸. Vliv hyperinzulinémie v naší studii nebyl prokázán na plazmatické koncentrace adiponektinu, leptinu a $TNF\alpha$, ale byl nalezen vzestup plazmatické koncentrace rezistinu. Tento nálezn byl potvrzen i v další naší studii u zdravých jedinců stejně jako v práci Heilbronna u obézních jedinců bez diabetu mellitu^{119,120} V našem testování jsme našli vzestup inzulínem stimulovaný adiponektinu, zatímco v jiných studiích tento nálezn nebyl potvrzen¹¹⁸. Naše výsledky však podporují teorii o potenciálním metabolickém efektu telmisartanu jako léčby hypertenze a metabolického syndromu. Vzhledem k menšímu počtu jedinců je nutné uskutečnit větší počet studií, které by naše závěry podpořily.



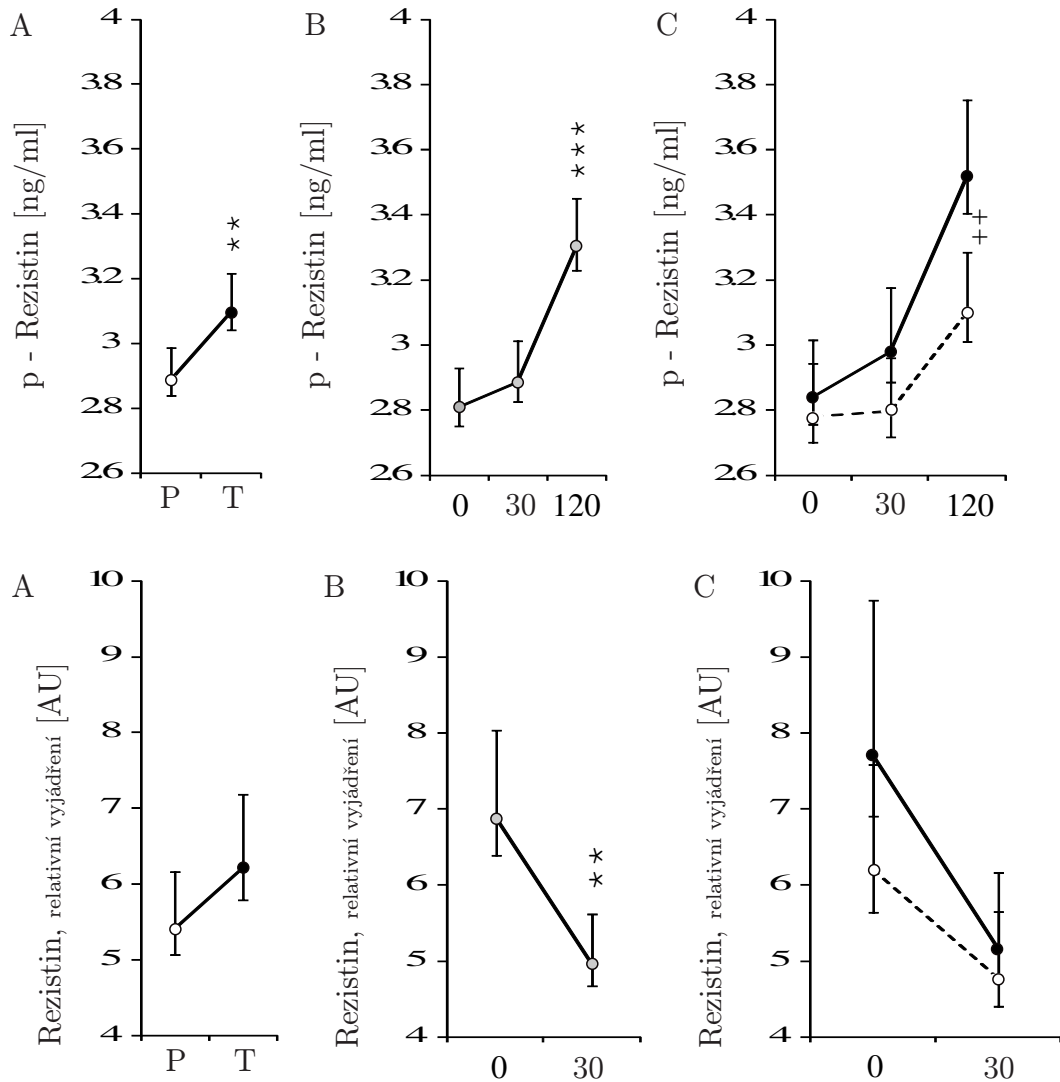
Obrázek 3.5: Vliv telmisartanu a clampem-indukované hyperinzulinémie na plazmatické hladiny TNF α . Sekce A a D ilustruje vliv telmisartanu, sekce B a E demonstruje efekt clampem-indukované hyperinzulinémie, zatímco sekce C a F ukazují na interakci mezi telmisartanem a hyperinzulinémií. Pro plazmatický TNF α (sekce A - C) statistická významnost byla následující : Telmisartan: $F = 4.8$; $p = 0.0328$; Subject (inter-individual variability): $F = 2.7$; $p = 0.0085$; Hyperinzulinémie: $F = 0.1$; $p = 0.8698$; Telmisartan \times Hyperinzulinémie: $F = 0.4$; $p = 0.6489$. Pro expresi TNF α (sekce D - F), byla statistická významnost následující: Telmisartan : $F = 3.9$; $p = 0.0591$; Subject (inter-individual variability): $F = 1.8$; $p = 0.1122$; Hyperinzulinémie: $F = 92$; $p < 0.0001$; Telmisartan \times Hyperinzulinémie: $F = 0.2$; $p = 0.6406$.



Obrázek 3.6: Vliv telmisartanu a clampem indukované hyperinzulinémie na plazmatické hladiny leptinu. Sekce A a D ilustruje vliv telmisartanu, sekce B a E demonstruje efekt clampem indukované hyperinzulinémie, zatímco sekce C a F ukazuje na interakci mezi telmisartanem a hyperinzulinémií. Pro plazmatickou koncentraci leptinu (sekce A - C) byla statistická významnost následující: Telmisartan: $F = 7.6$; $p = 0.0079$; Subject (inter-individualní variabilita): $F = 35.4$; $p < 0.0001$; Hyperinzulinémie: $F = 0.1$; $p = 0.9256$; Telmisartan \times Hyperinzulinémie: $F = 0.6$; $p = 0.5664$. Pro expresi leptinu (sekce D - F), byla statistická významnost následující: Telmisartan: $F = 2.4$; $p = 0.133$; Subject (inter-individualní variabilita): $F = 4.2$; $p = 0.0012$; Hyperinzulinémie: $F = 56.8$; $p < 0.0001$; Telmisartan \times Hyperinzulinémie: $F = 1$; $p = 0.3357$. ** $p < 0.01$, + $p < 0.05$.



Obrázek 3.7: Vliv telmisartanu a clampem indukované hyperinzulinémie na plazmatické hladiny adiponektinu. Sekce A a D ilustruje vliv telmisartanu, sekce B a E demonstruje efekt clampem- indukované hyperinzulinémie, zatímco sekce C a F ukazuje na interakci mezi telmisartanem a hyperinzulinémií. Pro plazmatickou koncentraci adiponektinu (sekce A - C), byla statistická významnost následující: Telmisartan: $F = 0.9$: $p = 0.3618$; Subject (inter-individualní variabilita): $F = 14.9$: $p < 0.0001$; Hyperinzulinémie: $F = 0.5$: $p = 0.6317$; Telmisartan \times Hyperinzulinémie: $F = 3.3$: $p = 0.0429$. Pro expresi adiponektinu (sekce D - F), byla statistická významnost následující: Telmisartan: $F = 1.3$: $p = 0.2709$; Subject (inter-individualní variabilita): $F = 6.4$: $p < 0.0001$; Hyperinzulinémie: $F = 3.2$: $p = 0.0846$; Telmisartan \times Hyperinzulinémie: $F = 0.2$: $p = 0.6756$. $^+p < 0.05$.



Obrázek 3.8: Vliv telmisartanu a clampem indukované hyperinzulinémie na plazmatické hladiny rezistinu. Sekce A a D ilustruje vliv telmisartanu, sekce B a E demonstruje efekt clampem indukované hyperinzulinémie, zatímco sekce C a F ukazuje na interakci mezi telmisartanem a hyperinzulinémií. Pro plazmatickou koncentraci rezistinu (sekce A - C) byla statistická významnost následující: Telmisartan: $F = 9$; $p = 0.0043$; Subject (inter-individualní variabilita): $F = 40.9$; $p < 0.0001$; Hyperinzulinémie: $F = 18.1$; $p < 0.0001$; Telmisartan \times Hyperinzulinémie: $F = 1.6$; $p = 0.2033$. Pro expresi rezistinu (sekce D - F) byla statistická významnost následující: Telmisartan: $F = 1.9$; $p = 0.1753$; Subject (inter-individualní variabilita): $F = 2.3$; $p = 0.0382$; Hyperinzulinémie: $F = 10.5$; $p = 0.0029$; Telmisartan \times Hyperinzulinémie: $F = 0.3$; $p = 0.6116$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ++ $p < 0.01$.

Kapitola 4

Závěry disertační práce

- Prokázali jsme, že diabetici 1. typu mají přítomnou poruchu v substrátové utilizaci ve smyslu metabolické inflexibility. Naše studie jako první doložila tento jev u uvedené skupiny nemocných.
- Prokázali jsme, že nemocní s diabetem 1. typu mají poruchu proteolýzy při normální oxidaci proteinů, což by mohlo poukazovat na přítomnost inzulínové rezistence v metabolismu proteinů.
- Z naší práce vyplývá, že pro hodnocení substrátové utilizace pomocí nepřímé kalorimetrie, kterou provádíme v průběhu euglykemického hyperinzulinového clampu, nelze nahradit sběr moči během clampu sběrem za 24 hodin, stejně jako nelze sběr bazální (6:00–9:00) použít během clampu. Je tedy nutné provádět sběry moče k hodnocení vylučování urey ve všech periodách clampu. Komplikovaný sběr během clampu, který je zatížen chybou sběru, nelze nahradit sběrem jiným a je nadále nutné proto během clampu provádět tento sběr. Cirkadiální rytmus vylučování urey nebyl u našeho souboru diabetiků nalezen.
- Podávání telmisartanu v dávce 160 mg/den po dobu tří týdnů sice neovlivnilo významně míru inzulínové rezistence, ale vedlo k významnému poklesu glykémie a změnám ve vybraných adipokinech. Vzestup bazální (lačné) koncentrace leptinu spolu s inzulínstimulovaným vzestupem adiponektinu, leptinu a rezistinu při současném poklesu $\text{TNF}\alpha$, který byl patrný za podmínek stimulace inzulínem při clampu, podporuje možnou metabolickou aktivitu telmisartanu u nemocných s metabolickým syndromem a poruchou lačné glykémie.

Kapitola 5

Souhrn

Inzulinová rezistence (IR) hraje zásadní roli v progresi aterosklerózy a je spojena s vyšší kardiovaskulární mortalitou a morbiditou. IR v metabolismu glukózy je běžným nálezem u diabetiků 2. typu a u obézních jedinců. Řadou autorů je IR stále považována za základní z řady klinických, biochemických a humorálních odchylek, které souhrnně označujeme jako metabolický syndrom a do kterého dále zahrnujeme esenciální hypertenzi, dyslipoproteinémii, viscerální obezitu, endotelovou dysfunkci a další abnormality. Frekvence syndromu IR u nediabetické populace v rozvinutých zemích dosahuje 25-30 %, což představuje obrovský potenciál pro možnou intervenci s cílem snížit kardiovaskulární morbiditu a mortalitu v populaci. Porucha účinku inzulínu a IR je přítomna i u diabetiků 1. typu a její význam není dostatečně zhodnocen. Dizertační práce je zaměřena na problematiku IR u nemocných s diabetem mellitem 1. typu a dále problematiku blokády renin angiotenzinového systému (RAS) v kontextu IR u nemocných s metabolickým syndromem a poruchou glukózové homeostázy (porucha glukózové tolerance či zvýšená glykémie na lačno). K hodnocení IR je použita metodika hyperinzulinového-euglykemického clampu a nepřímé kalorimetrie, které umožňují testování *in vivo* u člověka. V našem projektu jsme se zaměřili na 1) posouzení významu metabolické inflexibility u diabetiků 1. typu, 2) hodnocení metodiky hyperinzulinového euglykemického clampu u nemocných s diabetes mellitus 1. typu a přítomnou IR a 3) testování vlivu inhibice RAS s použitím blokátoru angiotenzin II. typ 1 receptoru (ARB) telmisartanu u nemocných s porušenou glukózovou homeostázou při metabolickém syndromu. Výsledky disertační práce (studie č.1) přispěly k průkazu poruchy substrátové utilizace u diabetiků 1. typu - metabolické inflexibility. Význam tohoto fenoménu nebyl a není dosud zhodnocen, není zatím provedena žádná jiná studie, která by testovala i možné terapeutické ovlivnění. Tento jev u uvedené skupiny doložila naše studie jako první. Dalším výsledkem (studie č. 2) naší práce je zpřesnění metodiky hyperinzulinového euglykemického clampu v kombinaci s měřením substrátové utilizace nepřímou kalorimetrií u diabetiků 1. typu spolu s hodnocením vylučování urey močí. Při hodnocení substrátové utilizace pomocí nepřímé kalorimetrie prováděné při euglykemickém hyperinzulinovém clampu nelze nahradit sběr moči během clampu sběrem během předchozích 24 hodin ani sběrem bazálním (6:00-9:00). Ke správnému hodnocení vylučování urey je nutné provádět sběry moče ve všech periodách clampu i přes technickou náročnost a možnou chybu sběru. Cirkadiální rytmus vylučování urey nebyl u našeho souboru diabetiků zjištěn. Prokázali jsme, že nemocní s diabetem 1. typu mají poruchu proteolýzy při normální oxidaci proteinů, což by mohlo poukazovat na přítomnost inzulinové rezistence v metabolismu pro-

teinů. Poslední část disertační práce (studie č.3) byla věnována problematice „metabolické léčby“ inhibicí RAS, kdy jsme prokázali pozitivní vliv telmisartanu na vybrané adipokiny u nemocných s metabolickým syndromem a porušenou lačnou glykémii, a tím podpořili teorii o možném metabolickém účinku telmisartanu v léčbě metabolického syndromu. Podávání telmisartanu v dávce 160 mg/den po dobu tří týdnů sice neovlivnilo signifikantně míru inzulínové rezistence, ale vedlo k významnému poklesu glykémie a změnám ve vybraných adipokinech. Vzestup bazální (lačné) koncentrace leptinu spolu s inzulín-stimulovaným vzestupem adiponektinu, leptinu a rezistinu při současném poklesu $TNF\alpha$ při hyperinzulinémii při clampu podporuje možnou metabolickou aktivitu telmisartanu u nemocných s metabolickým syndromem a poruchou lačné glykémie.

Kapitola 6

Seznam použitých zkratek

IR	= inzulinová rezistence
IRS 1-4	= inzulin receptor substance 1-4
PI3-kináza	= fosfatidylinositol 3-kináza
PKB/Akt	= proteinkináza B
PKC	= proteinkináza C
GTP	= guanozintrifosfát
Raf	= cytoplazmatická serin kináza
MAP	= mitogén aktivující proteinkináza
NEMK	= neesterifikované mastné kyseliny
DAG	= diacylglycerol
CPT	= karnitin-palmitoyl-transferáza
HOMA	= Homeostasis Model Assessment
RAS	= renin-angiotenzinový systém
ACEI	= inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
ARB	= blokátory angiotenzin II typ 1 receptoru

Kapitola 7

Použitá literatura

1. Haffner SM. Risk constellations in patients with the metabolic syndrome: epidemiology, diagnosis, and treatment patterns. *Am J Med* 2006 **119** S3-9.
2. Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of inzulin resistance in human disease. 1988. *Nutrition* 1997 **13** 65; discussion 64, 66.
3. DeFronzo RA, Hendler R & Simonson D. Inzulin resistance is a prominent feature of inzulin- dependent diabetes. *Diabetes* 1982 **31** 795-801.
4. Kahn R, Buse J, Ferrannini E & Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* 2005 *48* 1684-1699.
5. Kahn R, Buse J, Ferrannini E & Stern M. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005 **366** 1921- 1922; author reply 1923-1924.
6. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F & Boden G. Lipid-induced inzulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes* 2002 **51** 2005-2011.
7. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of inzulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988 **37** 1595-1607.
8. Yki-Jarvinen H, Sahlin K, Ren JM & Koivisto VA. Localization of rate-limiting defect for glucose disposal in skeletal muscle of inzulin-resistant type I diabetic patients. *Diabetes* 1990 **39** 157-167.
9. Kahn BB & Flier JS. Obesity and inzulin resistance. *J Clin Invest* 2000 **106** 473-481.
10. Randle PJ. Fuel selection in animals. *Biochem Soc Trans* 1986 **14** 799-806.
11. Stumvoll M, Jacob S, Wahl HG, Hauer B, Loblein K, Grauer P, Becker R, Nielsen M, Renn W & Haring H. Suppression of systemic, intramuscular, and subcutaneous adipose tissue lipolysis by inzulin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85** 3740-3745.

12. Kelley DE, He J, Menshikova EV & Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002 **51** 2944-2950.
13. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J & Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 1981 **30** 1000-1007.
14. Kelley DE & Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* 2000 **49** 677-683.
15. Kelley DE. Skeletal muscle triglycerides: an aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2002 **967** 135-145.
16. Storlien L, Oakes ND & Kelley DE. Metabolic flexibility. *Proc Nutr Soc* 2004 **63** 363-368.
17. DeFronzo RA, Tobin JD & Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979 **237** E214-223.
18. Ferrannini E & Mari A. Beta cell function and its relation to insulin action in humans: a critical appraisal. *Diabetologia* 2004 **47** 943-956.
19. Wallace TM & Matthews DR. The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 2002 **19** 527-534.
20. Wallace TM, Levy JC & Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004 **27** 1487-1495.
21. Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 1988 **37** 287-301.
22. Tappy L, Owen OE & Boden G. Effect of hyperinsulinemia on urea pool size and substrate oxidation rates. *Diabetes* 1988 **37** 1212-1216.
23. Thorburn AW, Gumbiner B, Flynn T & Henry RR. Substrate oxidation errors during combined indirect calorimetry-hyperinsulinemic glucose clamp studies. *Metabolism* 1991 **40** 391-398.
24. Kelley DE, Goodpaster BH & Storlien L. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 2002 **22** 325-346.
25. McGarry JD & Dobbins RL. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 1999 **42** 128-138.
26. Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, Haap M, Maier T, Loviscach M, Stumvoll M, Claussen CD, Schick F, Haring HU & Jacob S. Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 2001 **50** 2579-2584.

27. Mensink M, Blaak EE, van Baak MA, Wagenmakers AJ & Saris WH. Plasma free Fatty Acid uptake and oxidation are already diminished in subjects at high risk for developing type 2 diabetes. *Diabetes* 2001 **50** 2548-2554.
28. Goodpaster BH & Kelley DE. Role of muscle in triglyceride metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1998 **9** 231-236.
29. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW & Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996 **97** 2859-2865.
30. Krusinova E & Pelikanova T. Fatty acid binding proteins in adipose tissue: a promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis? *Diabetes Res Clin Pract* 2008 **82** Suppl 2 S127-134.
31. Storch J & Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000 **1486** 28-44.
32. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004 **351** 1106-1118.
33. Inadera H. The usefulness of circulating adipokine levels for the assessment of obesity-related health problems. *Int J Med Sci* 2008 **5** 248-262.
34. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D & Witters LA. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 1999 **276** E1-E18.
35. Mathews DR. Measurement of urea kinetics in humans: a validation of stable isotope tracer methods. *Am J Physiol* 1984 **246** E519-527.
36. El Khoury A, Fugawara NK, Chapman TE, Young VR. Diurnal pattern of interrelationships among leucine oxidation, urea production, and hydrolysis in humans. *Am J Physiol* 1996 **271** E 563-573.
37. Tessari P, Nosadini R, Trevisan R, De Kreutzenberg SV, Inchiostro S, Duner E, Biolo G, Marescotti MC, Tiengo A & Crepaldi G. Defective suppression by insulin of leucine-carbon appearance and oxidation in type 1, insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for insulin resistance involving glucose and amino acid metabolism. *J Clin Invest* 1986 **77** 1797-1804.
38. Charlton M & Nair KS. Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr* 1998 **128** 323S-327S.
39. Inchiostro S, Biolo G, Bruttomesso D, Fongher C, Sabadin L, Carlini M, Duner E, Tiengo A & Tessari P. Effects of insulin and amino acid infusion on leucine and phenylalanine kinetics in type 1 diabetes. *Am J Physiol* 1992 **262** E203-210.
40. Nair KS, Ford GC, Ekberg K, Fernqvist-Forbes E & Wahren J. Protein dynamics in whole body and in splanchnic and leg tissues in type I diabetic patients. *J Clin Invest* 1995 **95** 2926-2937.

41. Hoffer LJ. Adaptation to protein restriction is impaired in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr* 1998 **128** 333S-336S.
42. Steffee WP, Anderson CF & Young VR. An evaluation of the diurnal rhythm of urea excretion in healthy young adults. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1981 **5** 378-384.
43. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlöf B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J & Snapinn S. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002 **359** 1004-1010.
44. Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI & Cooper ME. Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *J Hypertens* 2005 **23** 463-473.
45. Kurtz TW. New treatment strategies for patients with hypertension and insulin resistance. *Am J Med* 2006 **119** S24-30.
46. Williams B. The year in hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009 **55** 65-73.
47. Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S & Pocock S. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 2003 **362** 759- 766.
48. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA & Kurtz TW. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR γ -modulating activity. *Hypertension* 2004 **43** 993-1002.
49. Schupp M, Lee LD, Frost N, Umbreen S, Schmidt B, Unger T & Kintscher U. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by losartan metabolites. *Hypertension* 2006 **47** 586-589.
50. Horiuchi M, Mogi M & Iwai M. Signaling crosstalk angiotensin II receptor subtypes and insulin. *Endocr J* 2006 **53** 1-5.
51. Tordjman J, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Forest C & Antoine B. Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. *J Biol Chem* 2003 **278** 18785- 18790.
52. Fujimoto M, Masuzaki H, Tanaka T, Yasue S, Tomita T, Okazawa K, Fujikura J, Chusho H, Ebihara K, Hayashi T, Hosoda K & Nakao K. An angiotensin II AT1 receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2004 **576** 492-497.

53. Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs* 2004 **64** 2537-2565.
54. Kurtz TW & Pravenec M. Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists: beyond the renin-angiotensin system. *J Hypertens* 2004 **22** 2253-2261.
55. Morris AD & Donnely R. Clinical review 79: Angiotensin II: an insulin-sensitizing vasoactive hormone? *J Clin Endocrinol Metab* 1996 **81** 1303-1306.
56. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ & Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 **93** 12490-12495.
57. Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Katagiri H, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Komuro I & Fujita T. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension* 2002 **40** 872-879.
58. Moan A, Risanger T, Eide I & Kjeldsen SE. The effect of angiotensin II receptor blockade on insulin sensitivity and sympathetic nervous system activity in primary hypertension. *Blood Press* 1994 **3** 185-188.
59. Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S & Luft FC. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* 2002 **40** 609-611.
60. Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Youngblood EB, Schmit MB & Dietze GJ. ACE inhibition and glucose transport in insulin-resistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide. *Am J Physiol* 1999 **277** R332-336.
61. Moriuchi A, Yamasaki H, Shimamura M, Kita A, Kuwahara H, Fujishima K, Satoh T, Fukushima K, Fukushima T, Hayakawa T, Mizuguchi H, Nagayama Y, Abiru N, Kawasaki E & Eguchi K. Induction of human adiponectin gene transcription by telmisartan, angiotensin receptor blocker, independently on PPAR-gamma activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 **356** 1024-1030.
62. Cassis LA, Police SB, Yiannikouris F & Thatcher SE. Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 2008 **10** 93-98.
63. Kershaw EE & Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 2548-2556.
64. Cook JR & Semple RK. Hypoadiponectinemia—cause or consequence of human “insulin resistance”? *J Clin Endocrinol Metab* **95** 1544-1554.
65. Ikeoka D & Krusinova E. Insulin resistance and lipid metabolism. *Rev Assoc Med Bras* 2009 **55** 234.

66. Dekker JM, Funahashi T, Nijpels G, Pilz S, Stehouwer CD, Snijder MB, Bouter LM, Matsuzawa Y, Shimomura I & Heine RJ. Prognostic value of adiponectin for cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 **93** 1489-1496.
67. Engeli S, Negrel R & Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000 **35** 1270-1277.
68. Ronti T, Lupattelli G & Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006 **64** 355-365.
69. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC & Sharma AM. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* 2002 **51** 1699-1707.
70. Gorzelniak K, Engeli S, Janke J, Luft FC & Sharma AM. Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens* 2002 **20** 965-973.
71. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D & Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002 **415** 339-343.
72. Kim YB, Uotani S, Pierroz DD, Flier JS & Kahn BB. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology* 2000 **141** 2328-2339.
73. Fasshauer M & Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 2003 **46** 1594-1603.
74. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K & Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002 **76** 911-922.
75. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K & Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006 **116** 1784-1792.
76. Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA & Prins JB. Adiponectin—a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2006 **8** 264-280.
77. Szmitko PE, Teoh H, Stewart DJ & Verma S. Adiponectin and cardiovascular disease: state of the art? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 **292** H1655-1663.
78. Satoh M, Tabuchi T, Minami Y, Takahashi Y, Itoh T & Nakamura M. Prospective, randomized, single-blind comparison of effects of 6 months of treatment with telmisartan versus enalapril on high-molecular-weight adiponectin concentrations in patients with coronary artery disease. *Clin Ther* 2009 **31** 2113-2125.
79. Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 2006 **580** 2917-2921.

80. Berg AH & Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005 **96** 939-949.
81. Makita S, Abiko A, Naganuma Y, Moriai Y & Nakamura M. Effects of telmisartan on adiponectin levels and body weight in hypertensive patients with glucose intolerance. *Metabolism* 2008 **57** 1473-1478.
82. Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Wang JP, Chen CL, Tai TY & Chuang LM. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2002 **25** 376-380.
83. Takata Y, Osawa H, Kurata M, Kurokawa M, Yamauchi J, Ochi M, Nishida W, Okura T, Higaki J & Makino H. Hyperresistinemia is associated with coexistence of hypertension and type 2 diabetes. *Hypertension* 2008 **51** 534-539.
84. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001 **409** 307-312.
85. Arner P. Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia* 2005 **48** 2203-2205.
86. Steppan CM & Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med* 2004 **255** 439-447.
87. Yu YH & Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res* 2005 **96** 1042-1052.
88. Ruan H & Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003 **14** 447-455.
89. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P & Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004 **145** 2273- 2282.
90. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL & Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995 **95** 2409-2415.
91. Jellema A, Plat J & Mensink RP. Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur J Clin Invest* 2004 **34** 766-773.
92. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW & Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997 **389** 610-614.

93. Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M & Taylor R. Effects of an engineered human anti-TNF- alpha antibody (CDP571) on inzulin sensitivity and glycemc control in patients with NIDDM. *Diabetes* 1996 **45** 881-885.
94. Boyle PJ. What are the effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on adiponectin, tumor necrosis factor-alpha, and other cytokines in inzulin resistance? *Clin Cardiol* 2004 **27** IV11-16.
95. Nakano A, Hattori Y, Aoki C, Jojima T & Kasai K. Telmisartan inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappaB activation independently of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Hypertens Res* 2009 **32** 765-769.
96. Fishman S, Rapoport MJ, Weissgarten J, Zaidenstein R, Dishy V, Hartzeanu I & Golik A. The effect of Losartan on inzulin resistance and beta cell function in chronic hemodialysis patients. *Ren Fail* 2001 **23** 685-692.
97. Gillespie EL, White CM, Kardas M, Lindberg M & Coleman CI. The impact of ACE inhibitors or angiotensin II type 1 receptor blockers on the development of new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005 **28** 2261-2266.
98. Pershadsingh HA. Treating the metabolic syndrome using angiotensin receptor antagonists that selectively modulate peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Int J Biochem Cell Biol* 2006 **38** 766-781.
99. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morroni M, Cinti S, Granzotto M, Vettor R, Camastra S & Ferrannini E. Inzulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 2002 **51** 144-151.
100. Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP & Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to inzulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* 1999 **13** 2051-2060.
101. Edgley AJ, Thalen PG, Dahllorf B, Lanne B, Ljung B & Oakes ND. PPARgamma agonist induced cardiac enlargement is associated with reduced fatty acid and increased glucose utilization in myocardium of Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 2006 **538** 195-206.
102. Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM & Ljung B. Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance inzulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes* 2001 **50** 1158-1165.
103. Rizza RA, Mandarino LJ & Gerich JE. Dose-response characteristics for effects of inzulin on production and utilization of glucose in man. *Am J Physiol* 1981 **240** E630-639.
104. Halvatsiotis P, Short KR, Bigelow M & Nair KS. Synthesis rate of muscle proteins, muscle functions, and amino acid kinetics in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002 **51** 2395-2404.

105. Pelikanova T, Smrckova I, Krizova J, Stribrna J & Lanska V. Effects of inzulin and lipid emulsion on renal haemodynamics and renal sodium handling in IDDM patients. *Diabetologia* 1996 **39** 1074-1082.
106. Fukagawa NK, Minaker KL, Rowe JW, Goodman MN, Matthews DE, Bier DM & Young VR. Inzulin-mediated reduction of whole body protein breakdown. Dose-response effects on leucine metabolism in postabsorptive men. *J Clin Invest* 1985 **76** 2306-2311.
107. Felig P & Wahren J. Influence of endogenous inzulin secretion on splanchnic glucose and amino acid metabolism in man. *J Clin Invest* 1971 **50** 1702-1711.
108. Kurtz TW. Treating the metabolic syndrome: telmisartan as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator. *Acta Diabetol* 2005 **42** Suppl 1 S9-16.
109. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B & Kintscher U. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator- activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes* 2005 **54** 3442-3452.
110. Derosa G, Cicero AF, Bertone G, Piccinni MN, Fogari E, Ciccarelli L & Fogari R. Comparison of the effects of telmisartan and nifedipine gastrointestinal therapeutic system on blood pressure control, glucose metabolism, and the lipid profile in patients with type 2 diabetes mellitus and mild hypertension: a 12-month, randomized, double-blind study. *Clin Ther* 2004 **26** 1228-1236.
111. Vitale C, Mercurio G, Castiglioni C, Cornoldi A, Tulli A, Fini M, Volterrani M & Rosano GM. Metabolic effect of telmisartan and losartan in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol* 2005 **4** 6.
112. Honjo S, Nichi Y, Wada Y, Hamamoto Y & Koshiyama H. Possible beneficial effect of telmisartan on glycemetic control in diabetic subjects. *Diabetes Care* 2005 **28** 498.
113. Miura Y, Yamamoto N, Tsunekawa S, Taguchi S, Eguchi Y, Ozaki N & Oiso Y. Replacement of valsartan and candesartan by telmisartan in hypertensive patients with type 2 diabetes: metabolic and antiatherogenic consequences. *Diabetes Care* 2005 **28** 757-758.
114. de Luis DA, Conde R, Gonzalez-Sagrado M, Aller R, Izaola O, Duenas A, Perez Castrillon JL & Romero E. Effects of telmisartan vs olmesartan on metabolic parameters, inzulin resistance and adipocytokines in hypertensive obese patients. *Nutr Hosp* **25** 275-279.
115. Delles C, Raff U, Mimran A, Fauvel JP, Ruilope LM & Schmieder RE. Effects of telmisartan and ramipril on adiponectin and blood pressure in patients with type 2 diabetes. *Am J Hypertens* 2008 **21** 1330-1336.
116. Fuke Y, Fujita T, Satomura A, Wada Y & Matsumoto K. Alterations of inzulin resistance and the serum adiponectin level in patients with type 2 diabetes mellitus under the usual antihypertensive dosage of telmisartan treatment. *Diabetes Technol Ther* **12** 393-398.

117. Mori Y, Itoh Y & Tajima N. Telmisartan improves lipid metabolism and adiponectin production but does not affect glycemic control in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Adv Ther* 2007 **24** 146-153.
118. Westerbacka J, Corner A, Kannisto K, Kolak M, Makkonen J, Korshennikova E, Nyman T, Hamsten A, Fisher RM & Yki-Jarvinen H. Acute in vivo effects of insulin on gene expression in adipose tissue in insulin-resistant and insulin-sensitive subjects. *Diabetologia* 2006 **49** 132- 140.
119. Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E & Smith SR. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 1844-1848.
120. Krusinova E, Klementova M, Kopecky J, Wohl P, Kazdova L, Mlejnek P, Pravenec M, Hill M & Pelikanova T. Effect of acute hyperinsulinaemia with and without angiotensin II type 1 receptor blockade on resistin and adiponectin concentrations and expressions in healthy subjects. *Eur J Endocrinol* 2007 **157** 443-449.

Kapitola 8

Přehled vlastních publikací

Články publikované v zahraničních časopisech (Hlavní autor)

1. Wohl, P., Wohl, P., Girman, P., Pelikánová, T. Inflexibility of energy substrate oxidation in type 1 diabetic patients. *Metabolism : clinical and experimental*, 2004, vol. **53**, no. 5, p. 655- 659. ISSN 0026-0495. (Původní sdělení). **IF 2,143**
2. Wohl, P., Krušinová, E., Klementová, M., Wohl, P., Kratochvílová, S., Pelikánová, T., Urinary urea nitrogen excretion during the hyperinzulinemic euglycemic clamp in Type 1 diabetes patients and healthy subjects. *Physiological Research*, 2008, roč. **57**, č. 2, s. 247-252. ISSN 0862-8408. (Původní sdělení). **IF 1,653**.
3. Wohl P., Krušinová E., Hill M., Kratochvílová S., Zídková K., Kopecký J., Neškudla T., Pravenec M., Klementová M., Vrbíková J., Wohl P., Mlejnek P., Pelikánová T. Effect of telmisartan on selected adipokines, inzulin sensitivity and substrate utilization during inzulin-stimulated conditions in patients with metabolic syndrome and impaired fasting glucose. *European Journal of Endocrinology* 2010, vol. **163** (4), p. 573-83 **IF 3,599**.

Spoluautor zahraničních článků

1. Krušinová, E., Klementová, M., Kopecký, J., Wohl, P., Kazdová, L., Mlejnek, P., Pravenec, M., Hill, M., Pelikánová, T. Effect of acute hyperinzulinaemia with and without angiotensin II type 1 receptor blockade on resistin and adiponectin concentrations and expressions in healthy subjects. *European journal of endocrinology*, 2007, vol. **157**, no. 4, p. 443-449. ISSN 0804- 4643. (Původní sdělení). **IF 3,239**.
2. Štich, V., Pelikánová, T., Wohl, P., Sengenés, C., Zakaroff-Girard, A., Lafontan, M., Berlan, M. Activation of alfa2-adrenergic receptors blunts epinephrine-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue during a hyperinzulinemic euglycemic clamp in men. *American journal of physiology - endocrinology and metabolism*, 2003, vol. **285**, no. 3, p. E599-E607. ISSN 0193-1849. (Původní sdělení). **IF 3,828**.

Články v tuzemských časopisech (hlavní autor)

1. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Klementová, M., Wohl, P., Pelikánová, T. Inzulínová rezistence u diabetiků - metabolická inflexibilita. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa*, 2005, roč. **8**, č. 4, s. 174-179. ISSN 1211-9326. (Původní sdělení).
2. Wohl, P., Inzulin zlepšuje koronární perfúzi u diabetiků s ischemickou chorobou srdeční - možné důsledky pro praxi. *New EU Magazine of Medicine*, 2006, roč. **1**, č. 1/2, s. 19. ISSN 1802-1298. (Původní sdělení - bez IF).
3. Wohl, P., Inzulínová rezistence a blokátory angiotensin II typ 1 receptoru (potenciální metabolické účinky). *New EU Magazine of Medicine*, 2006, roč. **1**, č. 1/2, s. 19-23. ISSN 1802-1298. (Původní sdělení - bez IF).
4. Wohl, P., Pelikánová, T. Metabolický syndrom. *Lege Artis*, 2001, roč. **1**, č. 6, s. 10-14. ISSN 1213-242X. (Přehled).
5. Wohl, P., Pelikánová, T., Skibová, J. Cirkadiánní variabilita vylučování urey do moči a hodnocení utilizace živin pomocí nepřímé kalorimetrie v kombinaci s hyperinzulinovým euglykemickým clampem u zdravých jedinců. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2001, roč. **9**(30), č. 3, s. 114-118. ISSN 1210-7921. (Původní sdělení).
6. Wohl, P., Wohl, P., Filip, K. Výživa pacientů před transplantací jater. *Bulletin HPB Chirurgie*, 2002, roč. 10, č. 2-3, s. 60-62. ISSN 1210-6755. (Přehled).
7. Wohl, P. Perioperační výživa. *Lékařské Listy*, 2003, roč. **52**, č. 22, s. 15-17. ISSN 0044-1996. Příloha Zdrav.Nov. ze dne 30.5.2003. (Přehled).
8. Wohl, P., Pelikánová, T., Bém, R., Wohl, P. Metabolický syndrom X - možnosti léčby v ordinaci praktického lékaře. *Practicus*, 2003, roč. **2**, č. 4, s. 42-45. ISSN 1213-8711. (Přehled) .
9. Wohl, P., Wohl, P., Trunečka, P., Špičák, J. Diagnostika abúzu alkoholu u nemocných s podezřením na alkoholovou závislost. *Bulletin HPB Chirurgie*, 2003, roč. **11**, č. 3, s. 112-115. ISSN 1210-6755. (Původní sdělení).
10. Wohl, P., Wohl, P., Wohl, R., Trunečka, P. Jaterní cirhóza: metabolismus a nutriční intervence. *Bulletin HPB Chirurgie*, 2003, roč. **11**, č. 3, s. 116-120. ISSN 1210-6755. (Původní sdělení).
11. Wohl P., Chadimová M., Engliš M., Táborský P., Rossman P., Matl I. Nemoc z ukládání lehkých řetězců jako příčina renálního selhání. *Čas. Lék. Čes.*, 1998 (**137**), č. 23, s. 721-724
12. Wohl P. Diabetická pneumopatie-další komplikace diabetu a její význam. *Kasuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*. 2009, **6**(4) :S12-13
13. Wohl P.: Diabetická pneumopatie-další komplikace diabetu a její význam. *Kasuistiky v diabetologii*. 2009 ;**7**(1):19-20

Kapitola ve sborníku (CZ)

1. Wohl, P., Pelikánová, T., Urbanová, R., Zazula, R., Wohl, P. Předoperační a pooperační péče u nemocných s diabetes mellitus. In: Zazula, R. 7. dny intenzivní medicíny Kroměříž 2000. Kroměříž, CZ. 14.-16.6.2000. Zorg. Česká lékařská společnost JEP. Intenzivní perioperační péče. Praha : Galén, 2000, s. 59-66. ISSN/ISBN 80-86257-17-7. (Kapitola ve sborníku domácí).
2. Wohl, P., Pelikánová, T., Zazula, R., Wohl, P., Hodnocení nutričního stavu pacienta. In: Zazula, R. 7. dny intenzivní medicíny Kroměříž 2000. Kroměříž, CZ. 14.-16.6.2000. Zorg. Česká lékařská společnost JEP. Intenzivní perioperační péče. Praha: Galén, 2000, s. 82-92. ISSN/ISBN 80-86257-17-7. (Kapitola ve sborníku domácí) .
3. Wohl, P., Pelikánová, T., Zazula, R., Wohl, P. Metabolická reakce ve stresu. In: 8. dny intenzivní medicíny v Kroměříži. Kroměříž, CZ. 20.-22.6.2001. Zorg. ČLS JEP. Intenzivní péče v traumatologii. Praha : Galén, 2001, s. 151-153. ISSN/ISBN 80-7262-114-9.
4. Wohl, P., Wohl, P., Zazula, R., Kieslichová, E., Pelikánová, T. Nutriční a metabolická diagnostika v kritických stavech. In: 10.dny intenzivní medicíny. Kroměříž. 18.-20.6.2003. Zorg. Česká lékařská společnost J.E. Purkyně. Ročenka intenzivní medicíny. Praha : Galén, 2003, s. 183-189. ISSN/ISBN 80-7262-227-7.
5. Wohl, P., Wohl, P., Zazula, R., Kieslichová, E., Pelikánová, T. Obecné principy perioperační nutriční intervence. In: 10.dny intenzivní medicíny. Kroměříž. 18.-20.6.2003. Zorg. Česká lékařská společnost J.E. Purkyně. Ročenka intenzivní medicíny. Praha : Galén, 2003, s. 190- 196. ISSN/ISBN 80-7262-227-7.
6. Wohl, P., Wohl, P., Zazula, R., Kieslichová, E., Pelikánová, T. Pankreatogenní diabetes. In: 10.dny intenzivní medicíny. Kroměříž. 18.-20.6.2003. Zorg. Česká lékařská společnost J.E. Purkyně. Ročenka intenzivní medicíny. Praha : Galén, 2003, s. 277-280. ISSN/ISBN 80-7262- 227-7.
7. Wohl, P., Wohl, P., Zazula, R., Kieslichová, E., Pelikánová, T. Současný pohled na hladiny glykémie v kritických stavech. In: 10.dny intenzivní medicíny. Kroměříž. 18.-20.6.2003. Zorg. Česká lékařská společnost J.E. Purkyně. Ročenka intenzivní medicíny. Praha : Galén, 2003, s. 177-182. ISSN/ISBN 80-7262-227-7.
8. Wohl, P., Wohl, P., Wohl, R., Frendlová, A., Zazula, R. Metabolické aspekty jaterní cirhózy a nutriční intervence. In: Zazula, R. 11.dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 9.-11.6.2004. Zorg. Česká společnost anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. Ročenka intenzivní medicíny 2004. Praha : Galén, 2004, s. 134-141. ISSN/ISBN 80-7262-274-9.
9. Wohl, P., Wohl, P., Wohl, R., Zazula, R., Pelikánová, T., Kieslichová, E. Obecné principy péče o diabetiky v intenzivní péči. In: Zazula, R. 11.dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 9.-11.6.2004. Zorg. Česká společnost anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. Ročenka intenzivní medicíny 2004. Praha : Galén, 2004, s. 163-171. ISSN/ISBN 80- 7262-274-9.

10. Wohl, P., Jirkovská, A., Wohl, P., Wohl, R., Zazula, R., Pelikánová, T., Kieslichová, E. Nutriční péče u diabetiků se syndromem diabetické nohy. In: Zazula, R. 12. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 8.-10.6.2005. Zorg. Anesteziologicko resuscitační klinika 1. LF UK. Ročenka intenzivní medicíny 2005. Praha : Galén, 2005, s. 91-104. ISSN/ISBN 80-7262- 344-3. (Kapitola v monografii - domácí).
11. Wohl, P., Krušinová, E., Wohl, P., Wohl, R., Zazula, R., Pelikánová, T. Inzulínová rezistence - metabolická inflexibilita energetických substrátů u diabetiků. In: Zazula, R. 12. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 8.-10.6.2005. Zorg. Anesteziologicko resuscitační klinika 1. LF UK. Ročenka intenzivní medicíny 2005. Praha : Galén, 2005, s. 78-84. ISSN/ISBN 80- 7262-344-3. (Kapitola v monografii - domácí).
12. Wohl, P., Wohl, R., Zazula, R., Wohl, P., Pelikánová, T., Kieslichová, E. Vaskulární komplikace pankreatitidy. In: Zazula, R. 12. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 8.- 10.6.2005. Zorg. Anesteziologicko resuscitační klinika 1. LF UK. Ročenka intenzivní medicíny 2005. Praha : Galén, 2005, s. 213-216. ISSN/ISBN 80-7262-344-3. (Kapitola v monografii - domácí).
13. Wohl, R., Wohl, P., Wohl, P., Zazula, R., Pelikánová, T. Komplikace parenterální výživy. In: Zazula, R. 12. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 8.-10.6.2005. Zorg. Anesteziologicko resuscitační klinika 1. LF UK. Ročenka intenzivní medicíny 2005. Praha : Galén, 2005, s. 116- 126. ISSN/ISBN 80-7262-344-3. (Kapitola v monografii - domácí).
14. Píza, P., Wohl, P., Wohl, P. Protokolární postupy v diagnostice malnutrice a jejich význam. In: Zazula, R. 13. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 14.-16.6.2006. Zorg. Anesteziologicko-resuscitační klinika 1. LF UK a FTN. Ročenka intenzivní medicíny 2006. Sborník přednášek. Praha : ARK 1.LF UK, 2006, s. 80-81. ISSN/ISBN 80-239-7259-6. (Kapitola ve sborníku).
15. Wohl, P., Kratochvílová, S., Wohl, R., Wohl, P., Pelikánová, T. Inzulínová rezistence a blokátory angiotensin II typ 1 receptoru (potenciální metabolické účinky). In: Zazula, R. 13. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 14.-16.6.2006. Zorg. Anesteziologicko-resuscitační klinika 1. LF UK a FTN. Ročenka intenzivní medicíny 2006. Sborník přednášek. Praha : ARK 1.LF UK, 2006, s. 118-124. ISSN/ISBN 80-239-7259-6. (Kapitola ve sborníku).
16. Wohl, P., Wohl, P., Wohl, R. Jaterní steatóza a nealkoholická steatohepatitida. In: Zazula, R. 13. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 14.-16.6.2006. Zorg. Anesteziologicko-resuscitační klinika 1. LF UK. Ročenka intenzivní medicíny 2006. Sborník přednášek. Praha : ARK 1.LF UK, 2006, s. 49-53. ISSN/ISBN 80-239-7259-6. (Kapitola ve sborníku).
17. Wohl, P., Wohl, R., Zazula, R., Wohl, P., Pelikánová, T. Hyperglykémie, inzulin a koronární syndrom. In: Zazula, R. 13. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 14.-16.6.2006. Zorg. Anesteziologicko-resuscitační klinika 1. LF UK a FTN. Ročenka intenzivní medicíny 2006. Sborník přednášek. Praha : ARK 1.LF UK, 2006, s. 17-22. ISSN/ISBN 80-239-7259-6. (Kapitola ve sborníku).

18. Wohl, P., Wohl, R., Zazula, R., Wohl, P., Pelikánová, T. , Karcinoid a karcinoidový syndrom - přehledné sdělení. In: Zazula, R. 13. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 14.-16.6.2006. Ročenka intenzivní medicíny 2006. Sborník přednášek. Praha : ARK 1.LF UK, 2006, s. 88-96. ISSN/ISBN 80-239-7259-6. (Kapitola ve sborníku).
19. Zazula, R., Wohl, P., Wohl, P. Klinický pohled na nutriční stav nemocných. In: Zazula, R. 13. dny intenzivní medicíny. Kroměříž, CZ. 14.-16.6.2006. Zorg. Anesteziologicko-resuscitační klinika 1. LF UK a FTN. Ročenka intenzivní medicíny 2006. Sborník přednášek. Praha : ARK 1.LF UK, 2006, s. 73-79. ISSN/ISBN 80-239-7259-6. (Kapitola ve sborníku).

Autor kapitoly v monografii

1. Wohl, P. Nutriční péče. In: Jirkovská, A. Syndrom diabetické nohy. Komplexní týmová péče. Praha : Maxdorf, 2006, s. 302-321. ISBN 80-7345-095-X. (Kapitola v monografii). Monografie CZ
2. Havlová, V., Wohl, P. Kuchařka při onemocnění žaludku a dvanáctníku. 1.vyd. . vyd. Praha : Vyšehrad. 2001. 85 s. s. ISBN 80-7021-481-3.
3. Havlová, V., Wohl, P., Kuchařka při onemocnění žlučníku. 1.vyd. . vyd. Praha : Vyšehrad. 2001. 78 s. s. ISBN 80-7021-499-6.
4. Havlová, V., Wohl, P. Dieta při chronické zácpě: 119 receptů. 1.vyd. . vyd. Praha : Vyšehrad. 2003. 71 s. s. ISBN 80-7021-632-8. (Monografie).

Články v tuzemských časopisech (spoluautor)

1. Urbanová, R., Jirkovská, A., Wosková, V., Wohl, P. Transkutánní oxymetrie v diagnostice ischemické choroby dolních končetin u diabetiků. Vnitřní lékařství, 2001, roč. **47**, č. 5, s. 330- 332. ISSN 0042-773X. (Přehled).
2. Trunečka, P., Ryska, M., Kieslichová, E., Wohl, P., Lánská, V., Wohl, P., Krasničanová, H., Böhmová, R., Stříž, I., Filip, K., Špičák, J. Význam vyšetření energetického metabolismu, tělesného složení a ukazatelů pokročilosti jaterního onemocnění pro predikci krátkodobé mortality po transplantaci jater a pro odhad míry využití nemocničních zdrojů. Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie, 2004, roč. **58**, č. 4, s. 128-135. ISSN 1213-323X. (Původní sdělení).
3. Wohl, P., Wohl, P., Trunečka, P., Honsová, E., Šperl, J., Drastich, P., Špičák, J., Kostolná, E., Ryska, M., Bělina, F., Filip, K., Vítko, Š., Rekurence abúzu alkoholu u pacientů s alkoholickou jaterní cirhózou po transplantaci jater v IKEM. Česká a slovenská gastroenterologie, 2004, roč. **58**, č. 1, s. 6-10. ISSN 1210-7824. (Původní sdělení).
4. Zazula, R., Wohl, P., Wohl, P. Hodnocení metabolického a nutričního stavu nemocných. Medicína pro praxi, 2006, č. 1, s. 12-14. ISSN 1214-8687. (Původní sdělení).

5. Wohl, P., Bednařík, M., Wohl, P., Halakucová, P., Červenka, M., Špičák, J. Srovnání různých screeningových programů kolorektálního karcinomu v české populaci Markovovým počítačovým modelem. Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie, 2006, roč. **60**, č. 2, s. 77-80. ISSN 1213-323X. (Původní sdělení).
6. Dubský, M., Jirkovská, A., Wohl, P., Bém, R. Vliv nutričních a sociálních faktorů a compliance pacienta na hojení syndromu diabetické nohy. Kazuistiky v diabetologii, 2009, roč. **7**, č. 1, s. 7-9. ISSN 1214-231X. (Kazuistika).
7. Zazula, R., Wohl, P., Wohl, P. Nutriční stav pacienta a možnosti jeho hodnocení. Interní medicína pro praxi, 2009, roč. **11**, č. 1, s. 45-47. ISSN 1212-7299. (Přehled).

Abstrakta a přednášky v zahraničí (hlavní autor)

1. Wohl, P., Pelikánová, T., Skibová, J. Effect of circadian variability in urinary nitrogen excretion on substrate utilization measured by indirect calorimetry combined with hyperinzulinemic euglycemic clamp in diabetic patient. Congress of the Czech Society of Parenteral and Enteral Nutrition and Intensive Metabolic Care. Hradec Králové, CZ, 25.3.1999 - 27.3.1999. Zorg. Czech Society of Parenteral and Enteral Nutrition and Inten. Metab. Care. In: Nutrition, Elsevier, 2000, vol. 16, no. 1, p.AR5. ISSN/ISBN 0899-9007. - (Přednáška s abstraktem).
2. Wohl, P., Pelikánová, T. Circadian variability in urinary urea excretion and substrate utilization measured by indirect calorimetry combined with hyperinzulinemic euglycemic clamp in healthy subjects. 23rd Congress of the ESPEN. München, DE, 8.9.2001 - 12.9.2001. Zorg. European Society of Parenteral and Enteral Nutrition. In: Clinical nutrition, Elsevier Science Saunders, 2001, vol. 20, no. suppl.3, p.37, č.abstr.18. ISSN/ISBN 0261-5614.
3. Wohl, P., Pelikánová, T., Saudek, F., Vlasáková, Z., Wohl, P. Renal transplantation in diabetic patients - when should they be included into a transplantation-dialysis program?. 28th Czech Congress of Nephrology. Plzeň, CZ, 3.9.2000 - 5.9.2000. Zorg. UK in the Prag - MF in the Plzeň. In: Kidney and Blood Pressure Research, Basel: Karger, 2001, vol. 24, no. 2, p.134-135, č.abstr.14. ISSN/ISBN 1420-4096.
4. Wohl, P., Pelikánová, T., Skibová, J., Lapešová, D. Metabolic inflexibility of energetic substrates oxidation in type 1 diabetic patients as compared with healthy controls. 62nd Annual Meeting and Scientific Sessions. San Francisco, US, 14.06.2002 - 18.06.2002. Zorg. American Diabetes Association. In: Diabetes, American Diabetes Association, 2002, vol. 51, no. suppl.2, p.A306, č.abstr.1247-P. ISSN/ISBN 0012-1797. - (Přednáška s abstraktem).
5. Wohl, P., Pelikánová, T., Wohl, P. Circadian variability in urinary urea nitrogen excretion and substrate utilization in healthy subjects and diabetic patients. 25th Congress of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition. Cannes, 21.-25.9.2003. Zorg. European Society of parenteral and Enteral Nutrition. In: Clinical nutrition, Elsevier Science Saunders, 2003, vol. 22, no. suppl.1, p.S28. ISSN/ISBN 0261-5614

6. Wohl, P., Wohl, P., Trunečka, P., Špičák, J., Pelikánová, T. Evaluation of nutritional and metabolic status of candidates for orthotopic liver transplantation. Poster. 12th Falk Symposium. Freiburg, 14.-21.10.2003. In: 12th Falk Symposium, B.m.: b.n., 2003, p.č.abstr. 209.
7. Wohl, P., Wohl, P., Trunečka, P., Špičák, J., Pelikánová, T. Metabolic and nutritional assesment of candidates for orthotopic liver transplantation. 25th Congress of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition. Cannes, 21.-25.9.2003. Zorg. European Society of parenteral and Enteral Nutrition. In: Clinical nutrition, Elsevier Science Saunders, 2003, vol. 22, no. suppl.1, p.S55. ISSN/ISBN 0261-5614.
8. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Klementová, M., Pelikánová, T. Effect of telmisartan on inzulin sensitivity and substrate utilization in patients with metabolic syndrome. Poster. American Diabetes Association. 66th Scientific Sessions. Washington, US, 9.- 13.6.2006. Zorg. American Diabetes Association. In: Diabetes, American Diabetes Association, 2006, vol. 55, no. suppl. 1, p.A568, č. abstr. 2453-PO. ISSN/ISBN 0012-1797. - Abstract Book. - (Poster s abstraktem).
9. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Klementová, M., Wohl, P., Komers, R. Pelikánová, T. Efekt telmisartanu na inzulinovou sensitivitu, substrátovou utilizaci a plasmatické hladiny adipocytokinů u osob s metabolickým syndromem. XVI. Diabetologické dni s mezinárodní účastí. Bratislava, SK, 1.-3.6.2006. Zorg. Slovenská diabetologická spoločnosť SLS. In: XVI. Diabetologické dni s mezinárodní účastí. Program a abstrakty, 2006, p.93. - (Přednáška s abstraktem).
10. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Kazdová, L., Hill, M., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. The effect of telmisartan on selected inzulin-stimulated plasma and subcutaneous adipocytokines in patients with metabolic syndrome. 29th ESPEN Congress. Prague, CZ, 08.09.2007 - 11.09.2007. Zorg. European Society of Clinical Nutrition and Metabolism. In: Clinical Nutrition Supplements, Elsevier [GB], 2007, vol. 2, no. 2, p.12. ISSN/ISBN 1744- 1161. - (Přednáška s abstraktem).
11. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Kazdová, L., Hill, M., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. The effect of telmisartan on selected inzulin-stimulated plasma and subcutaneous adipocytokines in patients with metabolic syndrome. 43rd EASD Annual Meeting. Amsterdam, NL, 18.09.2007 - 21.09.2007. Zorg. European Association for the Study of Diabetes. In: Diabetologia, Springer, 2007, vol. 50, no. suppl. 1, p.S259-S260, č. abstr. 0629. ISSN/ISBN 0012-186X. - Abstracts. - (Přednáška s abstraktem).
12. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Klementová, M., Komers, R., Wohl, P., Pelikánová, T. Effect of telmisartan on inzulin sensitivity, substrate utilization, plasma free fatty acids and plasma adipocytokine levels in patients with metabolic syndrome. Poster. 2nd International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome. Barcelona, ES, 25.04.2007 - 28.04.2007. Zorg. International Society on Diabetes and Vascular Disease. In: Diabetes and vascular disease research, 2007, vol. 4, no. Suppl. 1, p.S165. ISSN/ISBN 1479-1641. - (Poster s abstraktem).

13. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Kopecký, J., Komers, R., Pelikánová, T. The effect of telmisartan on selected plasma adipocytokines and their expressions in subcutaneous adipose tissue in patients with high risk of diabetes. 67th Scientific Sessions. Chicago, US, 22.6.2007 - 26.6.2007. Zorg. American Diabetes Association. In: Diabetes, American Diabetes Association, 2007, vol. 56, no. Suppl. 1, p.A580, č.abstr. 2284-PO. ISSN/ISBN 0012-1797. - (Přednáška s abstraktem).
14. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Hill, M., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. The effect of telmisartan on inzulin-stimulated selected plasma adipocytokine levels in patients with metabolic syndrome. 20th World Diabetes Congress - IDF. Montreal, Kanada, 18.10.2009 - 22.10.2009. Zorg. International Diabetes Federation. In: Abstract Book, 2009, vol. 2009, p.316-317.
15. Wohl, P., Krušinová, E., Zídková, K., Kazdová, L., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Adipocyte lipid-binding protein (ALBP) in subjects with different categories of glucose intolerance during acute hyperinzulinaemia. 31st ESPEN Congress. Vídeň, Rakousko, 29.8.2009 - 1.9.2009. In: Clinical Nutrition Supplements, London: Elsevier [GB], 2009, vol. 4, no. 2, p.15. ISSN/ISBN 1744-1161.
16. Wohl P, Krušinová E., Kratochvílová S., Wohl P., Klementová M, Pelikánová T. Effect of inzulin on urea excretion rate and protein oxidation in type 1 diabetes mellitus. Abstrakt No. LB021. Late breaking abstracts, poster 27th ESPEN congress, Brusel. 27.8-30.8,2005
17. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Kazdová L., Pelikánová, T. Selected selected plasma adipokines during hyperinzulinemia in subjects with diabetes mellitus, impaired glucose homeostasis and healthy controls. 30. Congress of ESPEN 2008, Florencie, Itálie, 13.9-15. 2008 : Clinical Nutrition 3, 2008 S. 183, (P364)
18. Wohl, P., Švehlíková, E., Kratochvílová S., Klementová, M., Kopecký, J., Pelikánová, T. Effect of hyperinzulinemia on selected plasma and subcutaneous adipokines during angiotensin II typ 2 receptor inhibition in patients with impaired fasting glucose. Kongres of Espen 2010, Nice, Francie 5-8.září 2010 abstrakt: Clinical Nutrition 5,2010 s.12 (OP027)

Abstrakta a přednášky v zahraničí (spoluautor)

1. Štich, V., Wohl, P., Berlan, M., Galitzky, J., Duška, F., Pelikánová, T. Hyperinzulinemia supresses adrenergic lipolysis in adipose tissue in humans: microdialysis study. 36th Annual Meeting of the EASD. Jerusalem, IL, 17.9.2000 - 21.9.2000. Zorg. European Association for the Study of Diabetes. In: Diabetologia, Springer, 2000, vol. 43, no. suppl.1, p.A164, č.abstr.632. ISSN/ISBN 0012- 186X. - (Přednáška s abstraktem).
2. Pelikánová, T., Wohl, P., Kratochvílová, S., Kazdová, L. Circadian variation in urinary excretion of sodium and its relation to nitric oxide metabolite and cGMP excretions in type 1 diabetes mellitus. 18th International Diabetes Federation Congress. Abstracts.

Paris, 24.- 29.8.2003. Zorg. International Diabetes Federation. In: Diabetologia (suppl.), 2003, vol. 46, no. suppl.2, p.A 411, č.abstr.1201. ISSN/ISBN 0941- 5602.

3. Klementová, M., Wohl, P., Krušinová, E., Kazdová, L., Lánská, V., Pelikánová, T. Circadian variation in urinary excretion of TNF α -soluble receptor 1 and TNF α -soluble receptor 2 in type 1 diabetes mellitus. 40th Annual Meeting of the EASD. Munich, DE, 5.-9.9.2004. Zorg. European Association for the Study of Diabetes. In: Diabetologia (suppl.), 2004, vol. 47, no. suppl.1, p.A461, č.abstr. 1297. ISSN/ISBN 0941- 5602.
4. Krušinová, E., Wohl, P., Fejfarová, V., Kazdová, L., Klementová, M., Skibová, J., Pelikánová, T. Effect of acute hyperinzulinaemia on plasma concentrations of selected cytokine antagonists in type 1 diabetes mellitus. 40th Annual Meeting of the EASD. Munich, DE, 5.- 9.9.2004. Zorg. European Association for the Study of Diabetes. In: Diabetologia (suppl.), 2004, vol. 47, no. suppl.1, p.A461, č.abstr. 1296. ISSN/ISBN 0941-5602.
5. Trunečka, P., Ryska, M., Wohl, P., Krasnicová, H., Lánská, V., Filip, K., Špičák, J. Impact of nutritional status, meld, child-pugh score, and ICG retention on early outcomes of liver transplantation. International Liver Transplantation Society. 10th Annual Congress. Kyoto, JP, 9.-12.6.2004. In: Liver transplantation, Wiley, 2004, vol. 10, no. 6, p.C-52, č.abstr. 207. ISSN/ISBN 1527- 6465.
6. Klementová, M., Wohl, P., Krušinová, E., Kazdová, L., Pelikánová, T. Circadian variation in urinary excretion of TNF α and its soluble receptors in type 1 diabetes mellitus. 75th Congress of the European Atherosclerosis Society. Prague, CZ, 23.-26.4.2005. Zorg. European Atherosclerosis society. In: Atherosclerosis supplements, Elsevier Science Ireland, 2005, vol. 6, no. 1, p.87, č. abstr. W13-P-009. ISSN/ISBN 1567-5688. - (Přednáška s abstraktem mezinárodní).
7. Kopecký, J., Krušinová, E., Zídková, K., Wohl, P., Kazdová, L., Pelikánová, T. Plasma concentrations of tumor necrosis factor alfa, resistin, leptin and adiponectin during 24hour hypertriglyceridaemia. Poster. American Diabetes Association. 66th Scientific Sessions. Washington, US, 9.-13.6. 2006. Zorg. American Diabetes Association. In: Diabetes, American Diabetes Association, 2006, vol. 55, no. suppl. 1, p.A349, č. abstr. 1501-P. ISSN/ISBN 0012-1797. - Abstract Book. - (Poster s abstraktem).
8. Kratochvílová, S., Škoch, A., Wohl, P., Krušinová, E., Dezortová, M., Hájek, M., Lánská, V., Pelikánová, T. Vliv telmisartanu na intramyocelulární obsah lipidů u osob s porušenou glukózovou tolerancí. XVI. Diabetologické dni s mezinárodní účastí. Bratislava, SK, 1.- 3.6.2006. Zorg. Slovenská diabetologická spoločnosť SLS. In: XVI. Diabetologické dni s mezinárodní účastí. Program a abstrakty, 2006, p.54. - (Přednáška s abstraktem).
9. Krušinová, E., Kopecký, J., Mlejnek, P., Wohl, P., Kazdová, L., Pravenec, M., Pelikánová, T., Effect of acute hyperinzulinaemia with and without AT-1 receptor blockade on plasma concentrations of leptin and adiponectin and their expressions in adipose tissue in diabetes mellitus. Poster. 42nd Annual Meeting of the European Association for

the Study Diabetes. Copenhagen - Malmö, DK - SE, 14.-17.9.2006. Zorg. EASD. In: Diabetologia, Springer, 2006, vol. 49, no. suppl. 1, p.419-420, č. abstr. 0691. ISSN/ISBN 0012-186X. - Abstracts. - (Poster s abstraktem).

10. Krušinová, E., Kopecký, J., Mlejnek, P., Wohl, P., Kazdová, L., Pravenec, M., Pelikánová, T., Effect of acute hyperinzulinaemia with and without AT-1 receptor blockade on plasma concentrations of TNF α and resistin and their expressions in adipose tissue in diabetes mellitus. Poster. Novel Aspects of Fatty Acids. Nutrition and Biological Functions. Ystads Saltsjöbaden, SE, 14.-16.6.2006. Zorg. Swedish Nutrition Foundation. In: Novel aspects of fatty acids. Abstracts book, B.m.: b.n., 2006, p.91. - (Poster s abstraktem).
11. Pelikánová, T., Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Kazdová, L. Effect of telmisartan on inzulin sensitivity, substrate utilization and plasma adipocytokine levels in patients with impaired regulation of glucose metabolism. Poster. 19th World Diabetes Congress. Cape Town, ZA, 3.-7.12. 2006. Zorg. International Diabetes Federation. In: Diabetic medicine, Blackwell Publishing, 2006, vol. 23, no. suppl.4, p.537, č. abstr. P1512. ISSN/ISBN 0742-3071. - (Poster s abstraktem).
12. Škoch, A., Kratochvílová, S., Wohl, P., Krušinová, E., Dezortová, M., Lánská, V., Pelikánová, T., Hájek, M. IMCL quantification by 1H MR spectroscopy in subjects with impaired glucose tolerance after telmisartan treatment. 23rd annual scientific meeting of ESMRMB. Warsaw, PL, 21.-23.9.2006. Zorg. European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology. In: ESMRMB 2006. 23rd annual scientific meeting [CD ROM], B.m.: 2006, vol. 23, no. 317, p.216. - (Přednáška s abstraktem).
13. Kratochvílová, S., Škoch, A., Wohl, P., Krušinová, E., Dezortová, M., Hájek, M., Pelikánová, T. Intramyocellular lipid content in subjects with impaired glucose tolerance after telmisartan treatment. 2nd International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome. Barcelona, ES, 25.04.2007 - 28.04.2007. Zorg. International Society of Diabetes and Vascular Disease. In: Diabetes and vascular disease research, 2007, vol. 4, no. Suppl. 1, p.S153-S154. ISSN/ISBN 1479-1641. - (Přednáška s abstraktem).
14. Krušinová, E., Kopecký, J., Mlejnek, P., Wohl, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Adipocyte lipid-binding protein in subcutaneous adipose tissue in subjects with different categories of glucose intolerance. Poster. 43rd EASD Annual Meeting. Amsterdam, NL, 18.09.2007 - 21.09.2007. In: Diabetologia, Heidelberg: Springer, 2007, vol. 50, no. suppl.1, p.S308, č. abstr. 0747. ISSN/ISBN 0012-186X. - (Poster s abstraktem).
15. Krušinová, E., Kopecký, J., Wohl, P., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Adipocyte lipid-binding protein during acute hyperinzulinemia with and without AT-1 receptor blockade in type 2 diabetes. Poster. 67th Scientific Sessions. Chicago, US, 22.6.2007 - 26.6.2007. Zorg. American Diabetes Association. In: Diabetes, American Diabetes Association, 2007, vol. 56, no. suppl. 1, p.A362, č. abstr. 1409-P. ISSN/ISBN 0012-1797. - (Poster s abstraktem).

16. Kopecký, J., Krušinová, E., Wohl, P., Kazdová, L., Hill, M., Pelikánová, T. Effect of 24-hour hypertriglyceridemia on tumor necrosis factor alpha, resistin, leptin and adiponectin in type 2 diabetes and healthy subjects. Central European Congress on Obesity, from Nutrition to Metabolic Syndrome. Karlovy Vary, CZ, 25.09.2008 - 27.09.2008. Zorg. Česká obezitologická společnost. In: Central European Congress on Obesity, from Nutrition to Metabolic Syndrome, Book of Abstracts [CD-ROM], Basel: Karger, 2008, no. 51, ISSN/ISBN 978-80-254-2733-0. - (Přednáška s abstraktem).
17. Kopecký, J., Krušinová, E., Wohl, P., Kazdová, L., Mlejnek, P., Hill, M., Pelikánová, T. Effect of 24-hour hypertriglyceridaemia on tumor necrosis factor alpha and resistin in type 2 diabetes and healthy subjects. 44th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Rome, IT, 08.09.2008 - 11.09.2008. In: Diabetologia, Springer, 2008, vol. 51, no. suppl. 1, p.S323, č. abstr. 812. ISSN/ISBN 0012-186X. - (Přednáška s abstraktem).
18. Krušinová, E., Kahleová, H., Wohl, P., Kazdová, L., Pelikánová, T. Plasma Concentrations of Tumor Necrosis Factor alfa during Hyperinzulinemia in Subjects with Different Categories of Glucose Intolerance. 68th Science Sessions. San Francisco, US, 06.06.2008 - 10.06.2008. Zorg. American Diabetes Association. In: Diabetes, American Diabetes Association, 2008, vol. 57, no. suppl. 1, p.A709, č.abstr. 2604-PO. ISSN/ISBN 0012-1797. - (Přednáška s abstraktem).
19. Krušinová, E., Kopecký, J., Mlejnek, P., Wohl, P., Kazdová, L., Pravenec, M., Pelikánová, T. Effect of acute hyperinzulinaemia and angiotensin receptor blockade on plasma concentrations and expressions of tumor necrosis factor alfa and resistin in diabetes mellitus. 44th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Rome, IT, 08.09.2008 - 11.09.2008. In: Diabetologia, Springer, 2008, vol. 51, no. suppl. 1, p.S324-S325, č. abstr. 815. ISSN/ISBN 0012-186X. - (Přednáška s abstraktem).
20. Krušinová, E., Kopecký, J., Wohl, P., Kazdová, L., Pelikánová, T. Effect of 24-hour hypertriglyceridemia on tumor necrosis factor alfa in type 2 diabetes and healthy subjects. 68th Science Sessions. San Francisco, US, 06.06.2008 - 10.06.2008. Zorg. American Diabetes Association. In: Diabetes, American Diabetes Association, 2008, vol. 57, no. suppl. 1, p.A704, č.abstr. 2582-PO. ISSN/ISBN 0012-1797. - (Přednáška s abstraktem).
21. Krušinová, E., Zídková, K., Kopecký, J., Mlejnek, P., Wohl, P., Kazdová, L., Pravenec, M., Pelikánová, T. Effect of acute hyperinzulinaemia and angiotensin receptor blockade on leptin and TNF alpha in diabetes. Central European Congress on Obesity, from Nutrition to Metabolic Syndrome. Karlovy Vary, CZ, 25.09.2008 - 27.09.2008. Zorg. Česká obezitologická společnost. In: Central European Congress on Obesity, from Nutrition to Metabolic Syndrome, Book of Abstracts [CD-ROM], Basel: Karger, 2008, no. 52, ISSN/ISBN 978-80-254-2733-0. - (Přednáška s abstraktem).
22. Krušinová, E., Zídková, K., Kopecký, J., Mlejnek, P., Wohl, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Adipocyte lipid-binding protein in subcutaneous adipose tissue in subjects with different categories of glucose intolerance. Central European Congress on Obesity, from Nutrition to Metabolic Syndrome. Karlovy Vary, CZ, 25.09.2008 - 27.09.2008.

Zorg. Česká obezitologická společnost. In: Central European Congress on Obesity, from Nutrition to Metabolic Syndrome, Book of Abstracts [CD-ROM], Basel: Karger, 2008, p.52. ISSN/ISBN 978-80-254-2733-0. - (Přednáška s abstraktem).

23. Kopecký, J., Krušinová, E., Wohl, P., Kazdová, L., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Effect of 24-hour lipid infusion on adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) in patients with type 2 diabetes and healthy subjects. 45th EASD Annual meeting. Vienna, AT, 29.09.2009 - 02.10.2009. In: Diabetologia (suppl.), 2009, vol. 52, no. suppl.1, p.278. ISSN/ISBN 0941-5602. - (Přednáška s abstraktem).
24. Krušinová, E., Wohl, P., Kratochvílová, S., Kopecký, J., Kahleová, H., Mlejnek, P., Pravenec, M., Kazdová, L., Pelikánová, T. Acute angiotensin II type 1 receptor blockade induces an increase in adiponectin in healthy subjects. 20th World Diabetes Congress. Montreal, Kanada, 18.10.2009 - 22.10.2009. In: Abstract book, International Diabetes Federation, 2009, p.317.
25. Krušinová, E., Wohl, P., Zídková, K., Kazdová, L., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Adipocyte lipid-binding protein (ALBP) in subjects with different categories of glucose intolerance during acute hyperinzulinaemia. 45th EASD Annual meeting. Vienna, AT, 29.09.2009 - 02.10.2009. In: Diabetologia (suppl.), 2009, vol. 52, no. suppl.1, p.250. ISSN/ISBN 0941-5602. - (Přednáška s abstraktem).
26. Kopecký J., Švehlíková, E., Wohl P., Kazdová L., Mlejnek P., Pravenec M., Pelikánová T. No effect of 24-hour lipid infusion on adiponectin in patients with type 2 diabetes and healthy subjects. Kongres of Espen 2010, Nice5-8.zář 2010 abstrakt: Clinical Nutrition 5,2010 s.12 (OP027)

Abstrakta a přednášky v tuzemsku (hlavní autor)

1. Wohl, P., Pelikánová, T. Vliv tukové emulze (LCT) na inzulinovou rezistenci u zdravých jedinců a diabetiků 2.typu. Tučky ve výživě. 3.metabolické dny. Třešť u Jihlavy, CZ, 11.5.2000 - 13.5.2000. Zorg. Sekce Klinické výživy a metabolismu SPEVIMP. In: 3.metabolické dny. Tučky ve výživě : Sborník prací, Plzeň: Sekce kl.výž.SPEVIMP, 2000, s.42. ISSN/ISBN 80-238-5453-4. - (Přednáška s abstraktem)..
2. Wohl, P., Pelikánová, T., Saudek, F., Vlasáková, Z., Wohl, P. Transplantace ledvin u diabetiků - kdy zařadit do transplantačně-dialyzačního programu?. 28.český nefrologický kongres s mezinárodní účastí. Plzeň, CZ, 3.9.2000 - 5.9.2000. Zorg. UK v Praze - LF v Plzni. In: Aktuality v nefrologii, Tigris, 2000, roč. 6, č. 1, s.25. ISSN/ISBN 1210-955X. - (Přednáška s abstraktem)..
3. Wohl, P., Pelikánová, T., Skibová, J., Lapešová, D. Hodnocení cirkadiánní variability vylučování urey a utilizace živin pomocí nepřímé kalorimetrie v kombinaci s hyperinzulinovým euglykemickým clampem u zdravých jedinců. 37. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 19.4.2001 - 21.4.2001. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, Praha: Tigris, 2001, roč. 4, č. suppl.1, s.58, č.abstr.91. ISSN/ISBN 1211-9326.

4. Wohl, P., Pelikánová, T., Skibová, J., Lapešová, D. Metabolická rigidita u diabetiků 1.typu v oxidaci energetických substrátů ve srovnání se zdravými kontrolami. 38. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 18.04.2002 - 20.04.2002. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2002, roč. 5, č. suppl.1, s.61,63, č.abstr.99. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Přednáška s abstraktem).
5. Wohl, P., Pelikánová, T., Skibová, J., Lapešová, D. Zhodnocení vlivu cirkadiální variability vylučování urey na hodnocení substrátové utilizace během hyperinzulinového euglykemického clampu u diabetiků 1.typu ve srovnání se zdravými kontrolami. 18. vědecký kongres Společnosti klinické výživy a intenzivní metabolické péče. Hradec Králové, CZ, 04.04.2002 - 06.04.2002. Zorg. Společnost klinické výživy při Čes. lék. spol. J. E. Purkyně. In: Intenzivní metabolická péče a klinická výživa, B.m.: Společnost klinické výživy ČLS JEP, 2002, s.142. - (Přednáška s abstraktem).
6. Trunečka, P., Wohl, P., Kieslichová, E., Lánská, V., Filip, K., Böhmová, R., Ryska, M., Adamec, M., Špičák, J., Vítko, Š. Je stav výživy kandidátů transplantace jater prediktivní pro výsledek transplantace léčby?. 6.kongres České transplantace společnosti. 1st Joint Meeting of the Czech and American Transplant Societies. Praha, CZ, 14.-16.10.2004. Zorg. Česká transplantace společnost. In: 6.kongres České transplantace společnosti. 1st Joint Meeting of the Czech and American Transplant Societies, Praha: Česká transplantace společnost, 2004, s.13-14, č.abstr. O 03. ISSN/ISBN 80-239-3771-5.
7. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Klementová, M., Pelikánová, T., Efekt telmisartanu na inzulinovou senzitivitu a substrátovou utilizaci u nemocných s metabolickým syndromem (cross-over randomizovaná studie). 42. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 20.-22.4.2006. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2006, roč. 9, č. suppl. 2, s.51, č. abstr. 78. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Přednáška s abstraktem).
8. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Klementová, M., Wohl, P., Komers, R., Pelikánová, T. Efekt telmisartanu na inzulinovou senzitivitu, substrátovou utilizaci, plazmatické hladiny adipocytokinů a neesterifikovaných mastných kyselin u osob s metabolickým syndromem. Obezitologie 2006. Celostátní konference se zahraniční účastí. Brno, CZ, 9.-11.11.2006. Zorg. Česká obezitologická společnost. In: Obezitologie 2006. Program a sborník abstrakt, 2006, s.26. - (Přednáška s abstraktem).
9. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Klementová, M., Wohl, P., Komers, R., Pelikánová, T. Hodnocení vlivu telmisartanu na inzulinovou senzitivitu, substrátovou utilizaci, plazmatické hladiny adipocytokinů a neesterifikovaných mastných kyselin u osob s metabolickým syndromem. 10. kongres o ateroskleróze. Špindlerův Mlýn, CZ, 7.-9.12.2006. Zorg. Česká společnost pro aterosklerózu, Česká angiologická společnost ČLS JEP. In: Vnitřní lékařství, Praha: Čes. lék. spol. J.E. Purkyně, 2006, roč. 52, č. 12, s.1235. ISSN/ISBN 0042-773X. - (Přednáška s abstraktem).
10. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Mlejnek, P., Pravenec, M., Hill, M., Pelikánová, T., Vliv telmisartanu na vybrané hladiny plazmatických adipocytokinů a jejich expresi v podkožní tukové tkáni u nemocných s metabolickým syndromem. XI. kongres

o ateroskleróze. Špindlerův Mlýn, CZ, 06.12.2007 - 08.12.2007. Zorg. Česká společnost pro aterosklerózu ve spolupráci s IAS. In: Vnitřní lékařství, Čes. lék. spol. J.E.Purkyně, 2007, roč. 53, č. 12, s.1358. ISSN/ISBN 0042-773X. - (Přednáška s abstraktem).

11. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Mlejnek, P., Pravenec, M., Komers, R., Pelikánová, T. Hodnocení vlivu telmisartanu na vybrané hladiny plazmatických adipocytokinů a jejich expresi v podkožní tukové tkáni u nemocných s porušenou regulací glukózy. XLIII. Diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 19.04.2007 - 21.04.2007. Zorg. ČLS JEP, Česká a Slovenská diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2007, roč. 10, č. suppl. 1, s.20, č.abstr. 12. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Přednáška s abstraktem).
12. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Kazdová, L., Pelikánová, T. Plazmatické koncentrace vybraných adipokinů u nemocných s diabetem mellitem, porušenou glukózovou homeostázou a zdravých jedinců v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu. 44. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 17.04.2008 - 19.04.2008. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2008, roč. 11, č. suppl. 1, s.22-23, č. abstr. 15. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Přednáška s abstraktem).
13. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Kazdová, L., Pelikánová, T. Plazmatické koncentrace vybraných adipokinů u nemocných s diabetem mellitem, porušenou glukózovou homeostázou a zdravých jedinců v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu. Poster. XII. kongres o ateroskleróze. Špindlerův Mlýn, CZ, 11.12.2008 - 13.12.2008. Zorg. ČLS JEP, Česká a Slovenská diabetologická společnost. In: Vnitřní lékařství, 2008, roč. 54, č. 12, s.1237. ISSN/ISBN 0042-773X. - (Poster s abstraktem).
14. Wohl, P., Kratochvílová, S., Pelikánová, T. Kazuistika hyperthyreózy imitující rejekci transplantované slinivky břišní. XXXII. Endokrinologické dny. Český Krumlov, 24.9.2009 - 26.9.2009. Zorg. Česká a Slovenská endokrinologická spol. . In: Sborník abstrakt, Praha: 2009, roč. neznámý, č. 1, s. 136. ISSN/ISBN 978-80-7262-632-8.
15. Wohl, P., Krušinová, E., Zídková, K., Kazdová, L., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Fatty acid binding protein (A-FABP) u nemocných s diabetem mellitem, porušenou glukózovou homeostázou a zdravých jedinců v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu. Poster. 45. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 23.04.2009 - 25.04.2009. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2009, roč. 12, č. suppl. 1, s.57-58, č.abstr. P44. ISSN/ISBN 1211-9326. - Abstrakta. - (Poster s abstraktem).
16. Wohl, P., Krušinová, E., Zídková, K., Kazdová, L., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Fatty acid binnding protein (A-FABP) u nemocných s diabetes mellitus, porušenou glukózovou homeostázou a zdravých jedinců v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu. XIII. Kongres o ateroskleróze. Špindlerův Mlýn, CZ, 10.12.2009 - 12.12.2009. In: Vnitřní lékařství, 2009, roč. 55, č. 12, s.P14. ISSN/ISBN 0042-773X. - (Přednáška s abstraktem).

17. Wohl, P., Kratochvílová, S., Zídková, K., Pelikánová, T. Kazuistika hypertyreózy imitující rejekci transplantované slinivky břišní. Poster. 46. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 22.04.2010 - 24.04.2010. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2010, roč. 13, č. suppl. 1, s.57, č. abstr. P38. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Poster s abstraktem).
18. Wohl, P., Wohl, P., Kopecký, J., Drastich, P., Gottfriedová, H., Oliverius, M., Trunečka, P., Pelikánová, T. Staging jaterní léze u domácí parenterální výživy - návrh algoritmu pro praxi. XXVI. mezinárodní kongres SKVIMP. Hradec Králové, CZ, 18.02.2010 - 20.02.2010. In: Sborník prezentací XXVI. mezinárodního kongresu SKVIMP, Plzeň: Eurovelag, 2010, s.47- 48. ISSN/ISBN 978-80-7177-022-0. - (Přednáška s abstraktem).
19. Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Klementová, M., Wohl, P., Komers, R., Pelikánová Terezie: Efekt telmisartanu na inzulinovou sensitivitu, substrátovou utilizaci, plazmatické hladiny adipocytokinů a neesterifikovaných mastných kyselin u osob s metabolickým syndromem : Brno, 9.-11.11.2006 [abstrakt] Obezitologie 2006, s. 26 abstrakta + přednáška
20. Wohl P., Krušinová E., Kratochvilová S., Klementová M., Wohl P., Pelikánová, T. Vliv inzulinu na odpady urey v moči a oxidaci proteinů u diabetiků 1. typu: XII, kongres SKVIMP s mezinárodní účastí, Hradec králové 2-4.6.2006, sborník str. 128, ISBN 80-86225-91-7
21. Wohl P., Kratochvílová S., Pelikánová T. /Praha/ Kazuistika hyperthyreózy imitující rejekci transplantované slinivky břišní. Sborník abstrakt + poster XXXII. endokrinologické dny, 24.- 26. září 2009, Český Krumlov

Abstrakta a přednášky v tuzemsku (spoluautor)

1. Urbanová, R., Jirkovská, A., Wohl, P., Veselá, P. Účinek PTA na transkutánní tensi O₂ u diabetické nohy The effect of percutaneous transluminal angioplasty on peripheral oxygenation as measured by transcutaneous oximetry for the diabetic foot. Tradiční angiologické dny 2001. Praha, CZ, 29.3.2001 - 31.3.2001. Zorg. Česká angiologická společnost. In: Traditional Angiological Days 2001 with International Participation : book of abstracts, Praha: Galén, 2001, s.97-98. ISSN/ISBN 80-86257-27-4
2. Urbanová, R., Jirkovská, A., Wohl, P., Veselá, P. Vliv perkutání transluminální angioplastiky na hodnoty periferní oxygenace měřené metodou transkutánní oxymetrie u syndromu diabetické nohy. 37. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 19.4.2001 - 21.4.2001. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, Praha: Tigis, 2001, roč. 4, č. suppl.1, s.53, č.abstr.83. ISSN/ISBN 1211-9326.
3. Štich, V., Pelikánová, T., Wohl, P., Hejnová, J., Berlan, M. Hyperinzulinemie potlačuje lipolytické působení katecholaminů v tukové tkáni: studie mikrodialýzou in situ. 38. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 18.04.2002 - 20.04.2002. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2002, roč. 5, č. suppl.1, s.51, č.abstr.79. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Přednáška s abstraktem).

4. Klementová, M., Wohl, P., Krušinová, E., Kazdová, L., Pelikánová, T., Cirkadiánní kolísání močové exkrece TNFalfa a jeho solubilních receptorů u diabetes mellitus 1.typu. 41.diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 21.-23.4.2005. Zorg. Česká diabetologická společnost ČLS JEP. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2005, roč. 8, č. suppl. 1, s.26-27, č.abstr. 37. ISSN/ISBN 1211-9326. - Abstrakta. - (Přednáška s abstraktem domácí).
5. Krušinová, E., Kopecký, J., Klementová, M., Wohl, P., Kazdová, L., Pelikánová, T. Vliv akutní hyperinzulinemie a blokády AT-1 receptoru na plazmatické hladiny TNF alfa a rezistinu u diabetes mellitus 2. typu. Poster. 42. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 20.- 22.4.2006. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2006, roč. 9, č. suppl. 2, s.33, č. abstr. 42. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Poster s abstraktem).
6. Řezaninová, L., Fexová, P., Wohl, P. Nová metoda zvlhčování xenotransplantátu s použitím spojovacího setu při lokální léčbě syndromu diabetické nohy. 42. diabetologické dny. Pracovní den Sekce sester ČDS. Luhačovice, 21.4.2006. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Sestra v diabetologii, 2006, roč. 2, č. suppl. 1, s.11. ISSN/ISBN 1801-2809. - Abstrakta. - (Přednáška s abstraktem).
7. Krušinová, E., Kopecký, J., Mlejnek, P., Wohl, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Adipocytární protein vázající lipidy (ALBP) během hyperinzulinemie s a bez blokády AT-1 receptoru u diabetu 2. typu. XLIII. Diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 19.04.2007 - 21.04.2007. Zorg. ČLS JEP, Česká a Slovenská diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2007, roč. 10, č. suppl. 1, s.19, č. abstr. 11. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Přednáška s abstraktem).
8. Škoch, A., Kratochvílová, S., Wohl, P., Krušinová, E., Dezortová, M., Lánská, V., Pelikánová, T., Hájek, M. Měření hladiny intramyocelulárních lipidů metodou 1H MR spektroskopie u subjektů s poruchou glukosové tolerance léčených telmisartanem. 11. Vědecké zasedání MR sekce ČRS. Harrachov, CZ, 19.03.2007 - 21.03.2007. Zorg. Radiologická klinika FN Brno- Bohunice. In: 11. vědecké zasedání MR sekce ČRS, Brno: Avtokrat, 2007, s.20. ISSN/ISBN 978-80-239- 8983-0. - (Přednáška s abstraktem).
9. Kopecký, J., Krušinová, E., Wohl, P., Kazdová, L., Pelikánová, T. Vliv 24hodinové hypertriglyceridemie na tumor necrosis faktor alfa u zdravých osob a pacientů s diabetem 2. typu. Poster. 44. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 17.04.2008 - 19.04.2008. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2008, roč. 11, č. suppl. 1, s.37-38, č. abstr. 4. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Poster s abstraktem).
10. Krušinová, E., Wohl, P., Kopecký, J., Klementová, M., Kazdová, L., Pelikánová, T. Vliv akutní hyperinzulinemie a blokády AT-1 receptoru na plazmatické hladiny vybraných adipokinů u diabetu 2. typu. Poster. 44. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 17.04.2008 - 19.04.2008. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2008, roč. 11, č. suppl. 1, s.36, č. abstr. 1. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Poster s abstraktem).

11. Krušinová, E., Zídková, K., Wohl, P., Mlejnek, P., Kazdová, L., Pravenec, M., Pelikánová, T. Genová exprese receptorů pro adiponektin u osob s poruchou glukózové homeostázy - vliv akutní hyperinzulinemie a dlouhodobého podávání telmisartanu. 44. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 17.04.2008 - 19.04.2008. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2008, roč. 11, č. suppl. 1, s.21-22, č. abstr. 13. ISSN/ISBN 1211-9326. - (Přednáška s abstraktem).
12. Kopecký, J., Krušinová, E., Wohl, P., Kazdová, L., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Vliv 24hodinové infuze tukové emulze na adipocytární fatty acid binding protein (A-FABP) u zdravých osob a pacientů s diabetem 2. typu. 45. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 23.04.2009 - 25.04.2009. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2009, roč. 12, č. suppl. 1, s.26-27, č. abstr. 20. ISSN/ISBN 1211-9326. - Abstrakta. - (Přednáška s abstraktem).
13. Kratochvílová, S., Wohl, P., Krušinová, E., Zídková, K., Klementová, M., Kazdová, L., Hill, M., Mlejnek, P., Pravenec, M., Pelikánová, T. Vliv podávání telmisartanu na plazmatické koncentrace a tkáňové exprese vybraných adipokinů u osob s metabolickým syndromem. XXXII. Endokrinologické dny. Český Krumlov, 24.9.2009 - Zorg. Česká a Slovenská endokrinologická spol. . In: Sborník abstrakt, Praha: 2009, roč. neznámý, č. 1, s.108-109. ISSN/ISBN 978-80-7262- 632-8.
14. Krušinová, E., Wohl, P., Kratochvílová, S., Kopecký, J., Mlejnek, P., Pravenec, M., Kazdová, L., Pelikánová, T. Adipocytární fatty acid binding protein (A-FABP) během hyperinzulinemie s a bez akutní blokády AT-1 receptoru u nemocných s diabetem 2. typu. 45. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 23.04.2009 - 25.04.2009. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2009, roč. 12, č. suppl. 1, s.27, č. abstr. 21. ISSN/ISBN 1211-9326. - Abstrakta. - (Přednáška s abstraktem).
15. Krušinová, E., Wohl, P., Kratochvílová, S., Kopecký, J., Mlejnek, P., Pravenec, M., Kazdová, L., Pelikánová, T. Akutní blokáda AT-1 receptoru indukuje zvýšení adiponektinu u zdravých osob. Poster. 45. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 23.04.2009 - 25.04.2009. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2009, roč. 12, č. suppl. 1, s.56-57, č. abstr. P42. ISSN/ISBN 1211-9326. - Abstrakta. - (Přednáška s abstraktem).
16. Zídková, K., Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Kazdová, L., Klementová, M., Pelikánová, T. Vliv telmisartanu na plazmatické koncentrace vybraných adipokinů u nemocných s metabolickým syndromem. 45. diabetologické dny. Luhačovice, CZ, 23.04.2009 - 25.04.2009. Zorg. Česká diabetologická společnost. In: Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2009, roč. 12, č. suppl. 1, s.31, č. abstr. 30. ISSN/ISBN 1211-9326. - Abstrakta. - (Přednáška s abstraktem).

Kapitola 9

Seznam příloh disertační práce

Příloha č. 1 Wohl, P., Wohl, P., Girman, P., Pelikánová, T. Inflexibility of energy substrate oxidation in type 1 diabetic patients. *Metabolism : clinical and experimental*, 2004, vol. 53, no. 5, p. 655-659. ISSN 0026-0495. (Původní sdělení). **IF 2,143**.

Příloha č. 2 Wohl, P., Krušinová, E., Klementová, M., Wohl, P., Kratochvílová, S., Pelikánová, T., Urinary urea nitrogen excretion during the hyperinzulinemic euglycemic clamp in Type 1 diabetes patients and healthy subjects. *Physiological Research*, 2008, roč. 57, č. 2, s. 247-252. ISSN 0862- 8408. (Původní sdělení). **IF 1,653**.

Příloha č. 3 Wohl P., Krušinová E., Hill M., Kratochvílová S., Zídková K., Kopecký J., Neškudla T., Pravenec M., Klementová M., Vrbíková J., Wohl P., Mlejnek P., Pelikánová T. Effect of telmisartan on selected adipokines, inzulin sensitivity and substrate utilization during inzulin-stimulated conditions in patients with metabolic syndrome and impaired fasting glucose. *European Journal of Endocrinology* 2010, vol. **163** (4), p. 573-83. **IF 3,59**

Příloha č. 4 Krušinová, E., Klementová, M., Kopecký, J., Wohl, P., Kazdová, L., Mlejnek, P., Pravenec, M., Hill, M., Pelikánová, T. Effect of acute hyperinzulinaemia with and without angiotensin II type 1 receptor blockade on resistin and adiponectin concentrations and expressions in healthy subjects. *European journal of endocrinology*, 2007, vol. 157, no. 4, p. 443-449. ISSN 0804-4643. (Původní sdělení). **IF 3,239**.

Příloha č. 5 Štich, V., Pelikánová, T., Wohl, P., Sengenés, C., Zakaroff-Girard, A., Lafontan, M., Berlan, M. Activation of alfa2-adrenergic receptors blunts epinephrine-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue during a hyperinzulinemic euglycemic clamp in men. *American journal of physiology - endocrinology and metabolism*, 2003, vol. 285, no. 3, p. E599-E607. ISSN 0193-1849. (Původní sdělení). **IF 3,828**.

Příloha č.6 Wohl, P., Pelikánová, T., Skibová, J. Cirkadiánní variabilita vylučování ury do moči a hodnocení utilizace živin pomocí nepřímé kalorimetrie v kombinaci s hyperinzulinovým euglykemickým clampem u zdravých jedinců. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2001, roč. 9(30), č. 3, s. 114-118. ISSN 1210-7921. (Původní sdělení).

Příloha č. 7 Wohl, P., Krušinová, E., Kratochvílová, S., Klementová, M., Wohl, P., Pelikánová, T. Inzulínová rezistence u diabetiků - metabolická inflexibilita. Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa, 2005, roč. 8, č. 4, s. 174-179. ISSN 1211-9326. (Původní sdělení).

Příloha č. 8 Wohl, P. Inzulínová rezistence a blokátory angiotensin II typ 1 receptoru (potenciální metabolické účinky). New EU Magazine of Medicine, 2006, roč. 1, č. 1/2, s. 19-23. ISSN 1802-1298. (Původní sdělení - bez IF).

Příloha č. 9 Wohl, P., Pelikánová, T., Bém, R., Wohl, P. Metabolický syndrom X - možnosti léčby v ordinaci praktického lékaře. Practicus, 2003, roč. 2, č. 4, s. 42-45. ISSN 1213-8711. (Přehled).

Inflexibility of Energy Substrate Oxidation in Type 1 Diabetic Patients

Petr Wohl, Pavel Wohl, Peter Girman, and Terezie Pelikánová

Obese, insulin-resistant patients have been shown to have metabolic inflexibility. The goal of this study was to examine the effect of insulin administration on energy metabolism in lean, type 1 diabetic (DM1) patients. Eleven DM1 patients without vascular complications and 11 healthy controls (C) were examined. We performed a 2-step hyperinsulinemic euglycemic clamp (240 minutes; period 1: $1 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and period 2: $10 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) combined with indirect calorimetry during basal period B (B, -45 to 0 minutes), period 1, and period 2 of the clamp. The metabolic clearance rates of glucose (MCR) were lower in DM1 compared with C in period 1 (12.54 ± 3.38 v $17.41 \pm 6.18 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $P < .02$), as well as in period 2 (21.63 ± 6.47 v $26.61 \pm 4.45 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $P < .05$). Basal respiratory quotient (RQ) was lower in DM1 compared with C (0.72 ± 0.04 v 0.75 ± 0.04 ; $P < .03$). Insulin administration was accompanied by an increase in RQ in both groups, which was lower in DM1 compared with C (period 1: $+0.09 \pm 0.04$ v $+0.11 \pm 0.07$; $P < .001$; period 2: $+0.13 \pm 0.04$ v $+0.16 \pm 0.04$; $P < .001$). Glucose oxidation did not differ between the groups in period B; however, it was lower in DM1 compared with C in periods 1 (1.17 ± 0.67 v $3.28 \pm 1.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $P < .003$); and 2 (2.10 ± 0.64 v $3.28 \pm 0.93 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $P < .009$). Lipid oxidation was higher in DM1 in all periods compared with C; period B (3.28 ± 0.77 v $1.16 \pm 0.55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $P < .001$), period 1 (1.10 ± 0.41 v $0.67 \pm 0.54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $P < .05$), and period 2 (0.99 ± 0.29 v $0.52 \pm 0.58 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $P < .01$). The groups did not differ in protein oxidation. In conclusion, DM1 patients with secondary insulin resistance (IR) are characterized by metabolic inflexibility manifesting itself by smaller increases in RQ and glucose oxidation after insulin administration during the euglycemic clamp.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

INSULIN RESISTANCE (IR) is considered to be a basic abnormality underlying type 2 diabetes mellitus.¹ Although IR is not a universal feature of type 1 diabetes mellitus (DM1), the secondary defect of insulin action has been described in both poorly and adequately controlled DM1 patients, as well as in DM1 patients with daily insulin requirements ($35 \pm 2 \text{ U/d}$), which would not clinically characterize them as being insulin resistant.²⁻⁵ IR is characterized as a limited response of muscle to stimulate glucose metabolism. Both glucose oxidation and nonoxidative pathways are impaired in type 2 diabetes and also in DM1.^{2,4,6}

In lean healthy individuals, skeletal muscle displays substantial metabolic flexibility, with an ability to switch from predominantly lipid oxidation and high rates of fatty acid uptake during fasting conditions to suppression of lipid oxidation and increased glucose uptake, oxidation, and storage under insulin-stimulated conditions.⁷⁻¹⁰ A striking physiologic characteristic of skeletal muscle is its metabolic flexibility expressed by a high capacity to modulate rates of energy production, blood flow, and substrate utilization.⁸⁻¹⁰

Obese subjects showed lower lipid oxidation under fasting conditions and greater lipid oxidation under insulin-stimulated conditions relative to the lean volunteers, but the absolute rates of lipid oxidation remained fixed in obese subjects and type 2 diabetes.⁸⁻¹⁰ The failure to augment lipid oxidation during

fasting conditions seems to be the key mechanism leading to lipid accumulation within skeletal muscle, whereas increased lipid stress that accumulates in muscle may, in turn, contribute to insulin-resistant glucose metabolism through substrate competition and other mechanisms.⁸ This metabolic inflexibility of skeletal muscle is a clinically important feature of IR. Insulin-deficient rat models of diabetes, as well as subjects with poorly controlled DM1 patients, exhibit elevated rates of lipolysis, increased plasma free fatty acids (FFAs) and triglyceride concentrations, elevated blood ketone bodies, and decreased respiratory quotients (RQ).⁸⁻¹⁰ While it is generally accepted that the rates of lipid oxidation are increased in obesity during insulin-stimulated conditions and, indeed, impaired suppression of lipid oxidation is a prominent manifestation of IR, much less is known about a potential link between fasting patterns of muscle FFA utilization and IR. Another important consideration is whether potential impairments within the pathways of fatty acid utilization in skeletal muscle in obesity are primary defects or arise after an individual has become obese.⁸⁻¹⁰ Randle et al^{11,12} originally proposed that the glucose/fatty acids fuel competition cycle might be responsible for IR in diabetes. Recent results suggest that the glucose/fatty acids cycle does not fully explain the interaction between glucose and fatty acids in insulin-resistant subjects.^{10,11,13} Recent data indicate that lipid accumulation in skeletal muscle or in various tissues is probably more responsible for inhibiting insulin action.^{14,15} Although DM1 patients express some degree of IR, there are no data dealing with metabolic flexibility in these patients. The aim of this study was to examine the effect of insulin administration on substrate metabolism in lean DM1 patients as compared with healthy subjects during a 2-step hyperinsulinemic euglycemic clamp combined with indirect calorimetry.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The study groups consisted of 11 men with DM1 without specific diabetic vascular complications and 11 male healthy control subjects (C) without a family history of diabetes mellitus, dyslipidemia, and

From the Diabetes Center and the Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

Submitted July 11, 2003; accepted December 6, 2003.

Supported by a grant from the Health Ministry of the Czech Republic (project CEZ:L 17/98:0023001).

Address reprint requests to Petr Wohl, MD, Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

0026-0495/04/5305-0020\$30.00/0

doi:10.1016/j.metabol.2003.12.013

Table 1. Characteristics of Study Groups

	C (n = 11)	DM (n = 11)
Age (yr)	28.72 ± 2.10	32.18 ± 5.72
BMI (kg/m ²)	24.09 ± 1.0	24.36 ± 2.15
Triglycerides (mmol · L ⁻¹)	1.11 ± 0.76	0.77 ± 0.40
Total cholesterol (mmol · L ⁻¹)	4.11 ± 0.88	4.23 ± 0.59
HDL-cholesterol (mmol · L ⁻¹)	1.12 ± 0.42	1.67 ± 0.29
HBA _{1c} (%)	4.82 ± 0.27	7.97 ± 1.34*
Daily insulin dose (IU/d)	—	36 ± 9.8

**P* < .001.

other metabolic diseases. All subjects gave their informed consent with the study protocol, which had been reviewed and approved by the local ethics committee. Patients were instructed to adhere to their ordinary lifestyle and avoid changes in food intake, alcohol consumption, and exercise. Characteristics of the study groups are shown in Table 1. All subjects were examined during a 3-day hospitalization while on a standard diet regimen. Dietary intakes in our study groups were: 150 to 170 mmol/24 hr of sodium, 50 to 80 mmol/24 hr of potassium, 80 g/24 hr of proteins, 275 to 325 g/24 hr of carbohydrates and daily energy intake 2,500 to 2,800 kcal/24 hr. A 2-step hyperinsulinemic euglycemic clamp combined with indirect calorimetry was performed on day 3 after hospital admission.

Procedures

Hyperinsulinemic euglycemic clamp. All studies were performed after an 8- to 10-hour overnight fast. The 2-step hyperinsulinemic euglycemic clamp, lasting 4 hours (period 1: 0 to 120 minutes and period 2: 120 to 240 minutes) was conducted as previously described.¹⁶ Briefly, a Teflon cannula (Venflon, Viggo Helsingborg, Sweden) was inserted into left antecubital vein for infusion of all test substances. A second cannula was inserted in the retrograde fashion into a wrist vein of the same hand for blood sampling, and a hand was placed in a heated (65°C) box to achieve venous blood arterialization. A stepwise primed-continuous infusion (1 and 10 mU · kg⁻¹ · min⁻¹ of Actrapid HM; Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark) was administered to acutely raise and maintain the plasma concentration of insulin at 75 and 1,400 μU/mL. Decreases in serum potassium concentrations during insulin infusion were prevented by coinfusion of potassium chloride with glucose (60 mmol/L KCl/L of 15% glucose). Plasma glucose concentrations during the clamp were maintained at 5 mmol · L⁻¹ by continuous infusion of 15% glucose. Arterialized blood plasma glucose concentration were determined every 5 to 10 minutes. Before the clamp, only diabetics with fasting plasma glucose levels below 6 mmol/L were included into the study, and no glucose was infused until plasma glucose had decreased to the desired level.

Indirect calorimetry. Substrate utilization and energy expenditure (EE) measurements were made in either group by indirect calorimetry.¹⁷ Gas exchange measurements were taken during a 45-minute basal period and during the final 45-minute periods of the 2 insulin-infusion steps. A transparent plastic ventilated hood was placed over the subject's head and made airtight around the neck. A slight negative pressure was maintained in the hood to avoid loss of expired air. A constant fraction of air flowing out of the hood was automatically collected for analysis. Air flow and O₂ and CO₂ concentrations in expired and inspired air were measured by a continuous open-circuit system (metabolic monitor VMAX; Sensor Medics, Anaheim, CA).

Urinary collections. Evaluation of urinary urea nitrogen excretion was made to calculate protein oxidation. Urinary collections during the clamp were divided into the basal period (−120 to 0 minute) and into

period 1 (0 to 120 minutes) and period 2 (20 to 240 minutes). At times 0 minute and 120 minutes and at 240 minutes, blood urea nitrogen was measured.

Analytical Methods

Plasma glucose concentrations were measured on a Beckman analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, CA) using the glucose oxidase method. Immunoreactive insulin (IRI) was determined by radioimmunoassay using an IMMUNOTECH Insulin IRMA kit (IMMUNOTECH, Prague, Czech Republic). Single measurement of glycosylated hemoglobin using the Bio-Rad hemoglobin A_{1c} column test (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) was performed before the testing.

Data Analysis

Hepatic glucose production (HGP) was not measured in this study, but it is known to decrease by more than 90% at insulin levels >50 μU/mL in healthy men.^{16,18} Thus, the total amount of glucose infused was a measure of the glucose metabolized by all cells of the body during clamp studies. Calculations of substrate oxidation were made using standard equations.¹⁷ Urinary urea excretion was assessed in urine samples before and after correction for changes in urea pool size.¹⁹ Insulin action was estimated as the metabolic clearance rate of glucose (MCR) and glucose disposal (M) calculated at minutes 80 to 120 minutes (MCR_{glu submax} and M_{glu submax}) and between 200 to 240 minutes (MCR_{glu max} and M_{glu max}). MCR was calculated by dividing the amount of glucose infused, after correction for changes in glucose pool size, by mean plasma glucose concentration.¹⁶ Nonoxidative glucose disposal (NEOX_{glu submax} and NEOX_{glu max}) was calculated by subtracting the rate of glucose oxidation from M. Data were statistically analyzed by Mann-Whitney rank test. All data are expressed as means ± SD.

RESULTS

MCR_{glu submax} in DM1 were lower than in C in period 1 (*P* < .02), as well as MCR_{glu max} in period 2 (*P* < .05) (Fig 1). M_{glu submax} during the first period of the clamp was not statistically different, but M_{glu max} was lower in DM1 compared with C in period 2 of the clamp (*P* < .01) (Fig 2). Nonoxidative glucose disposal during the period 1 was comparable in DM1 and C (DM1: 9.87 ± 2.76 v C: 11.06 ± 2.3 mg · kg⁻¹ · min⁻¹), while during the second period of the clamp, it was lower in DM1 (16.93 ± 5.29 v 19.87 ± 2.62 mg · kg⁻¹ · min⁻¹; *P* < .02) (Fig 2).

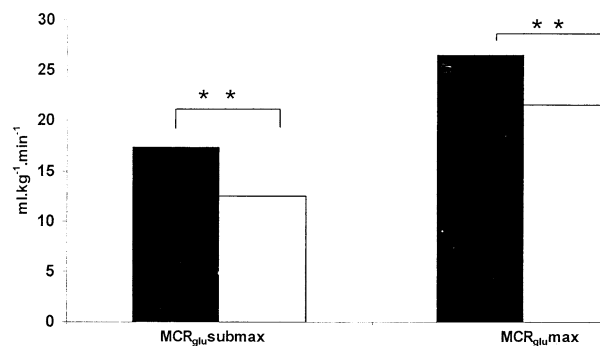


Fig 1. MCR_{glu submax} and MCR_{glu max} during the hyperinsulinemic euglycemic clamp in C (■, n = 11) and DM1 (□, n = 11). **P* < .01.

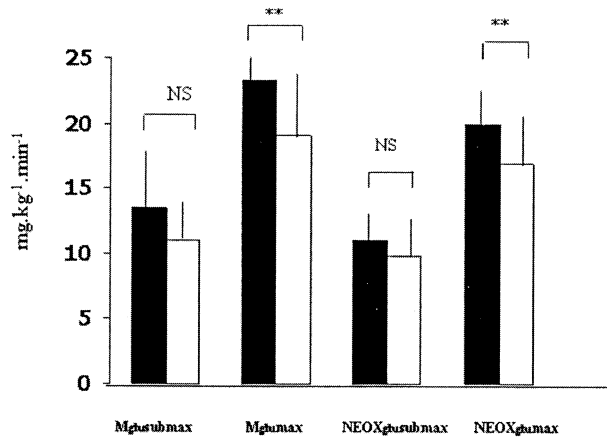


Fig 2. Glucose disposals (Mglusubmax and Mglumax) and non-oxidative glucose disposals (NEOXglusubmax and NEOXglumax) during the hyperinsulinemic euglycemic clamp in C (■, n = 11) and DM1 (□, n = 11). **P* < .01.

Basal RQ was lower in DM1 compared with C (0.72 ± 0.04 v 0.75 ± 0.04 ; *P* < .03) (Fig 3). Insulin administration was accompanied by RQ increase in both groups, which was lower in DM1 compared with C (period 1: $+0.09 \pm 0.04$ v $+0.11 \pm 0.07$; *P* < .001; period 2: $+0.13 \pm 0.04$ v $+0.16 \pm 0.04$; *P* < .001). Glucose oxidation (Fig 4A) did not differ between the groups in period B, however, it was lower in DM1 compared with C in period 1 (1.17 ± 0.67 v 3.28 ± 1.11 mg · kg⁻¹ · min⁻¹; *P* < .003); and period 2 (2.10 ± 0.64 v 3.28 ± 0.93 mg · kg⁻¹ · min⁻¹; *P* < .009). Overall, lipid oxidation (Fig 4B) in DM1 was significantly higher in period B (3.28 ± 0.77 v 1.16 ± 0.55 mg · kg⁻¹ · min⁻¹; *P* < .0001), period 1 (1.10 ± 0.41 v 0.67 ± 0.54 mg · kg⁻¹ · min⁻¹; *P* < .05) and period 2 (0.99 ± 0.29 v 0.52 ± 0.58 mg · kg⁻¹ · min⁻¹; *P* < .01) compared with C. C and DM1 did not differ in protein oxidation (basal: 0.70 ± 0.19 v 0.97 ± 0.68 , period 1: 0.42 ± 0.27 v 0.69 ± 0.39 and period 2: 0.37 ± 0.18 v 0.45 ± 0.32 mg · kg⁻¹ · min⁻¹).

DISCUSSION

The results of this study indicate altered substrate utilization in DM1. To the best of our knowledge, this is the first report showing metabolic inflexibility in DM1 patients.

In accordance with other investigators, we have confirmed the presence of IR in DM1 patients.²⁻⁴ The metabolic clearance rates of glucose (MCR) were significantly lower in DM1 in both periods of the clamp. Glucose disposal rates were also lower in period 2, but, in period 1, this difference was not statistically significant, as well as nonoxidative glucose disposal in period 1.

We did not measure HGP. The rate of insulin infusion (1 mU · kg⁻¹ · min⁻¹) used during period 1 of the clamp study has been shown to suppress, almost completely, HGP in healthy subjects, but insufficient suppression cannot be excluded in DM1 patients. Thus, the lack of significant differences in glucose disposal and nonoxidative glucose disposal in period 1 could be due to insufficient suppression of HGP

in DM1 patients.¹⁸ It has been known for years that patients with type 1 diabetes are insulin resistant, and this has been attributed to the phenomenon of glucotoxicity rather than a factor intrinsic to the muscle. Thus, part of the glucose or IR in these patients may be caused by hyperglycemia per se.²⁰ Furthermore, literary data have shown that higher daily insulin (more 25 to 55 μU/mL) requirements were associated with high circulating insulin antibody titers, which could be a cause of IR in DM1. Insulin antibody titers have not been measured in our study, because we assumed that the daily doses of insulin we used were not associated with increased antibody titers.^{2,20-23}

In our study, the rate of basal (fasting) lipid oxidation was higher in DM1 compared with C and even higher under hyperinsulinemic euglycemic clamp conditions, just as RQ, a marker of substrate utilization, was lower during basal and hyperinsulinemic euglycemic periods. The suppression of lipid oxidation by insulin was higher in period 1 and persisted over period 2 of the clamp in DM1, but the absolute rate of lipid oxidation was higher as compared with C. These data indicate lipids were the predominant fuel under basal (fasting) conditions in both groups; however, during period 2 of the clamp, the rate of lipid oxidation remained higher in DM1 as compared with the basal period in C.

The concept that perturbed skeletal muscle fatty acid metabolism may contribute to skeletal muscle IR is not new, although the hypothesis that IR is associated with decreased fasting fatty acid oxidation is a novel reformulation, but the classic Randle glucose-fatty acid cycle is only one of a number of mechanisms by which fatty acids might influence muscle glucose metabolism and insulin action.^{7,8,11-13,24}

In the presence of insulin stimulation, fatty acid utilization by skeletal muscle is normally suppressed.²⁵ Results obtained with rodents or humans, which more directly examined muscle fuel selection have shown that skeletal muscle in IR is accompanied by increased, rather than decreased, muscle glucose oxidation under basal conditions and decreased glucose oxidation under insulin-stimulated circumstances, producing a state of "metabolic inflexibility".^{9,10} The situation in DM1 appears to be different. However, this cannot be determined from the

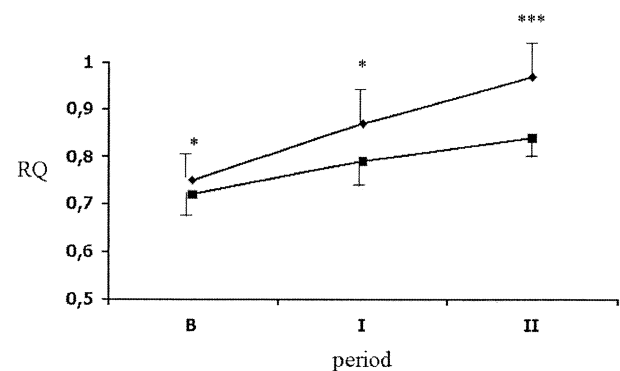


Fig 3. Changes in RQ during the hyperinsulinemic euglycemic clamp in C (◆, n = 11) and DM1 (■, n = 11). **P* < .05, **P* < .001.**

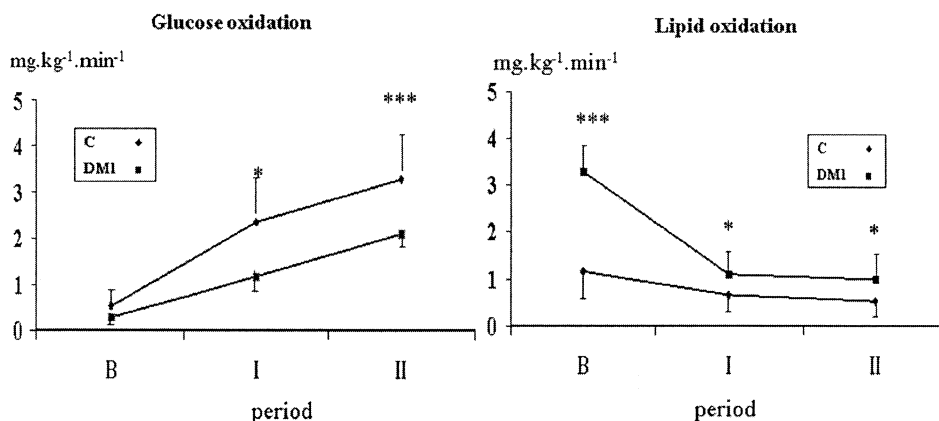


Fig 4. Changes in glucose and lipid oxidation during the hyperinsulinemic euglycemic clamp in DM1 (■, n = 11) and C (◆, n = 11). **P* < .05, ****P* < .001.

present study because systemic indirect calorimetry does not contain much information about fuel use in muscle, which only contributes about 15% to 20% of systemic gas exchange under the basal, resting condition.

Increased glucose oxidation negatively correlates with insulin sensitivity under fasting conditions.^{9,25} Under insulin-stimulated conditions in insulin-resistant subjects, this inflexibility is characterized by a lower rate of elevation of glucose oxidation and a higher rate of lipid oxidation.

These investigators also reported that the inflexibility, which includes impaired suppression of lipid oxidation under insulin-stimulated conditions, is a component of the IR phenotype of skeletal muscle.^{9,10}

This metabolic flexibility is the key to the major role that skeletal muscle may play in overall fuel balance. In obesity and type 2 diabetes, there is a loss of this plasticity and, instead, there is metabolic inflexibility. Rates of lipid oxidation are not suppressed effectively in response to insulin, but neither do rates of lipid oxidation effectively increase during transition to fasting conditions. An important morphologic characteristic of skeletal muscle in obesity and type 2 diabetes is an increased content of triglycerides, which can be associated with IR.^{9,10} DM1 compared with control subjects had lower insulin-stimulated whole body total, oxidative, and nonoxidative glucose disposal rates. They also exhibited higher levels of lipid oxidation both during basal and hyperinsulinemia conditions. Although DM1 was associated with muscle triglyceride content, muscle triglyceride was not associated with insulin sensitivity.²⁶

The higher levels of plasma triglycerides are associated with reduced insulin sensitivity, and such a situation could contribute to triglyceride accumulation within the myocyte, as has been observed in IR and type 2 diabetes.^{9,10,27} Recent knowledge of insulin receptor signaling indicates that the accumulation of lipid products in muscle may interfere with insulin signaling and produce IR.⁹ This observation was in contradiction with the Randle glucose fatty acids cycle, although this cycle is a valid physiologic principle, but it may not fully explain IR in skeletal muscle in type 2 diabetes. Furthermore, there are no studies in DM1.^{7,8,11,12} The data of Simonenau et al^{29,30} suggest that, in obesity-related IR, the metabolic capacity

of skeletal muscle appears to be organized towards fat esterification rather than oxidation.

Moreover, metabolic inflexibility is important in obese male subjects with impaired glucose tolerance (IGT). These patients have the same defect in fatty acid utilization as subjects with type 2 diabetes, suggesting that these disturbances may play an important role in the progression from IGT to type 2 diabetes.²⁹ The key aspect of metabolic fitness in skeletal muscle is its capacity to switch between fuels, and that this capacity may be lost in IR in obesity and type 2 diabetes; however, some studies have shown that weight loss does not correct this disposition.²⁶ Although there is now evidence that weight loss through reduction of caloric intake and increase in physical activity can prevent the development of diabetes, it remains an open question as to whether specific modulation of lipid metabolism will result in improvement in some, or all, of the above metabolic derangements or will prevent progression from IR to type 2 diabetes.³⁰

Unless there is a significant weight loss, short- or medium-term dietary manipulation does not alter insulin sensitivity as much in humans as in rodent models, and there is a considerable interest in pharmacologic intervention. Studies using thiazolidinediones, peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR γ) receptor agonists, have supported the concept that reduced muscle lipid accumulation is associated with an increased insulin sensitivity. Other potent systemic lipid-lowering agents, such as PPAR α receptor agonists (eg, fibrates) or antilipolytic agents (eg, nicotinic acid analogs) might improve insulin sensitivity, but further work is needed, particularly to clarify implications for muscle metabolism.^{24,31,32}

Recent experimental data has shown that treatment with novel PPAR α/γ agonists is highly effective in correcting the extreme metabolic inflexibility and impaired insulin action in the Zucker rat.³³ There are no data about the effect of PPAR α/γ in human studies, but a possible positive effect should be expected in DM1 with high doses of insulin and type 2 diabetics as well. These interactions are fundamental to understanding the metabolic effects of new insulin "sensitizers," eg, thiazolidinediones, which alter lipid metabolism and improve muscle insulin sensitivity in IR states in both types of diabetes.

In conclusion, DM1 with secondary IR are characterized by metabolic inflexibility manifested by (1) a lower increase of RQ during the hyperinsulinemic euglycemic clamp; (2) lower fasting and insulin-stimulated oxidation of glucose; (3) higher fasting and insulin-stimulated lipid oxidation. While obesity and type 2 diabetes were mostly studied, the importance of IR in DM1 is still unknown. More data and a comparison between diabetic patients and their phenotypes are needed just as we

need to elucidate IR in DM1 in connection with substrate utilization.

ACKNOWLEDGMENT

The skilful technical assistance of Dana Lapešová and the help of J. Skibová with statistical evaluation of data and Rene Prahil with translation revision are gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Reaven GM: Banting lecture: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607, 1998
2. DeFronzo RA, Hendler R, Simonson D: Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 31:795-801, 1982
3. Yki-Jarvinen H, Sahlin K, Ren JM, et al: Localization of rate-limiting defect for glucose disposal in skeletal muscle of insulin-resistant type I diabetic patients. *Diabetes* 39:157-167, 1990
4. Ekstrand AV, Groop PH, Grönhagen-Riska C: Insulin resistance precedes microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 13:3079-3083, 1998
5. Del Prato S, Matsuda M., Simonson DC, et al: Studies on the mass action effect of glucose in NIDDM and IDDM: Evidence for glucose resistance. *Diabetologia* 40:687-697, 1997
6. Williams KV, Erbey JR, Becker D, et al: Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes* 49:626-632, 2000
7. Saltin B, Gollnick PD: Skeletal muscle adaptability. Significance for metabolism and performance, in Peachy LD, Adrian RH, Geiger SR (eds): *Handbook of Physiology*. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1980, pp 555-631
8. Kelly DE, Reilly J, Veneman T, et al: Effect of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. *Am J Physiol* 258:E923-E929, 1990
9. Kelly DE, Mandarino LJ: Perspectives in diabetes. Fuel selections in human skeletal muscle in insulin resistance. A reexamination. *Diabetes* 49:677-683, 2000
10. Kelly DE: Skeletal muscle triglycerides: An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 967:135-145, 2002
11. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, et al: The glucose fatty acids: Its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789, 1963
12. Randle PJ: Fuel selection in animals. *Biochem Soc Trans* 14:799-806, 1986
13. Kelly DE, Goodpaster B, Wing RR, et al: Skeletal muscle fatty acids metabolism in association with insulin resistance, obesity and weight loss. *Am J Physiol* 277:E1141-1141, 1999
14. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, et al: Insulin resistance in morbid obesity: Reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 51:144-151, 2002
15. McGarry JD: Banting lecture 2001: Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:7-18, 2002
16. DeFronzo RA, Tobin DJ, Andres R: Glucose clamp technique: A methods for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214-E227, 1979
17. Ferranini E.: The theoretical bases of indirect calorimetry: A review. *Metabolism* 37:287-301, 1988
18. Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE: Dose-response characteristics for effect of insulin on production and utilization of glucose in man. *Am J Physiol* 240:E630-E638, 1981
19. Tappy L, Owen OE, Boden G: Effect of hyperinsulinemia on urea pool size and substrate oxidation rate. *Diabetes* 37:1212-1216, 1988
20. Yki-Jarvinen H, Helve E, Koivisto VA: Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. *Diabetes* 36:892-896, 1987
21. Berson SA, Yallow RS: Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody. *J Clin Invest* 38:1996-2000, 1959
22. Kumar D: Immunoreactivity of insulin antibodies in insulin-treated diabetics. *Diabetes* 28:994-1000, 1979
23. Mustaffa BE, Dagget PR, Nabarro JD: Insulin binding capacity in patients changed from conventional to highly purified insulins. *Diabetologia* 13:311-315, 1977
24. Kurtz AB, Nabarro JD: Circulating insulin-binding antibodies. *Diabetologia* 19:329-334, 1980
25. Kraegen EW, Cooney GJ, Ye JM, et al: The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:S189-201, 2001 (suppl 2)
26. Ebeling P, Gustavsson BE, Tuominen JA, et al: Intramuscular triglyceride content is increased in IDDM. *Diabetologia* 41:111-115, 1998
27. Kelly DE: Plasma fatty acids, adiposity, and variance of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5412-5419, 2001
28. Bachman OP, Dahl DB, Brechtel K, et al: Effect of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 50:2579-2584, 2001
29. Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, et al: Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: Relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* 13:2051-2060, 1999
30. Simoneau JA, Kelly DE: Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol* 83:166-171, 1997
31. Mensink M, Blaak EE, Baak MA, et al: Plasma free fatty acids uptake and oxidation are already diminished in subjects at high risk for developing type 2 diabetes. *Diabetes* 50:2548-2554, 2001
32. Kraegen EW, Cooney GJ, Ye J, et al: Triglycerides, fatty acids and insulin resistance—Hyperinsulinemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:S516-526, 2001
33. Oakes N, Kjellstadt A, Thalen P, et al: Novel PPAR α/γ agonist, enhances the severely impaired metabolic flexibility and insulin action in skeletal muscle of obese Zucker rat. *Diabetes* 51:A110, 2002 (abstr)

Urinary Urea Nitrogen Excretion during the Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp in Type 1 Diabetic Patients and Healthy Subjects

P. WOHL¹, E. KRUŠINOVÁ¹, M. KLEMENTOVÁ¹, P. WOHL², S. KRATOCHVÍLOVÁ¹,
T. PELIKÁNOVÁ¹

¹Diabetes Center and ²Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Received October 16, 2006

Accepted April 2, 2007

On-line available May 30, 2007

Summary

The hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC) combined with indirect calorimetry (IC) is used for estimation of insulin-stimulated substrate utilization. Calculations are based on urinary urea nitrogen excretion (UE), which is influenced by correct urine collection. The aims of our study were to improve the timing of urine collection during the clamp and to test the effect of insulin on UE in patients with type 1 diabetes (DM1; n=11) and healthy subjects (C; n=11). Urine samples were collected (a) over 24 h divided into 3-h periods and (b) before and during two-step clamp (1 and 10 mIU.kg⁻¹.min⁻¹; period 1 and period 2) combined with IC. The UE during the clamp was corrected for changes in urea pool size (UEc). There were no significant differences in 24-h UE between C and DM1 and no circadian variation in UE in either group. During the clamp, serum urea decreased significantly in both groups (p<0.01). Therefore, UEc was significantly lower as compared to UE not adjusted for changes in urea pool size both in C (p<0.001) and DM1 (p<0.001). While UE did not change during the clamp, UEc decreased significantly in both groups (p<0.01). UEc during the clamp was significantly higher in DM1 compared to C both in period 1 (p<0.05) and period 2 (p<0.01). The UE over 24 h and UEc during the clamp were statistically different in both C and DM1. We conclude that urine collection performed during the clamp with UE adjusted for changes in urea pool size is the most suitable technique for measuring substrate utilization during the clamp both in DM1 and C. Urine collections during the clamp cannot be replaced either by 24-h sampling (periods I-VII) or by a single 24-h urine collection. Attenuated insulin-induced decrease in UEc in DM1 implicates the impaired insulin effect on proteolysis.

Key words: Substrate utilization • Urinary urea nitrogen excretion • Insulin • Glycemic clamp • Indirect calorimetry

Corresponding author

T. Pelikánová, Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958/4, 140 21 Prague 4, Czech Republic. Fax: +420 26136 3183. E-mail: terezie.pelikanova@medicon.cz

Introduction

Indirect calorimetry (IC) has been used in combination with the glucose clamp technique to measure oxidative and non-oxidative components of glucose uptake, while simultaneously assessing fat oxidation and energy expenditure (DeFronzo *et al.* 1979, Jacot *et al.* 1982, Ferrannini 1988, Thorburn *et al.* 1991). IC is commonly performed before and during the clamp periods (Jacot *et al.* 1982, Ferrannini 1988, Thorburn *et al.* 1991).

Calculations of substrate oxidation are based on measurements of urinary urea nitrogen excretion (UE). UE is influenced by accuracy of urine collection. Furthermore, during a hyperinsulinemic euglycemic clamp insulin-induced changes in urea pool size have been reported in healthy subjects affecting the UE. Briefly, under clamp conditions, serum urea concentration will decrease, hence the UE adjustment for changes in (UEc) is an important factor in determining substrate utilization (Thorburn *et al.* 1991). In DM1, the effect of insulin on amino acid metabolism has been described (Tessari *et al.* 1986), but the effect of insulin on urea pool size and UE has not been evaluated. Thus, the aims of our study were a) to improve the timing of urine collection during the clamp in healthy and DM1 subjects and to test the hypothesis that urinary collections during the clamp could be replaced by samples from 24-h sampling of UE divided into 3-h periods; and b) to test the effect of insulin on UE in both groups.

Subjects and Methods

Subjects

The study groups consisted of 11 men with DM1 without specific diabetic vascular complications, and 11 male healthy control subjects (C) without a family history of diabetes mellitus, dyslipidemia, or other metabolic disease. All subjects gave their informed consent with the study protocol, which had been reviewed and approved by a local ethics committee. Patients were instructed to adhere to their ordinary lifestyle and avoid changes in food intake, alcohol consumption, and exercise one week before admission to the hospital. Characteristics of the study groups are shown in Table 1. All subjects were examined during 3-day hospitalization being on a standard dietary regimen. Dietary intakes in our study groups were: 150-170 mmol/24 h of sodium, 50-80 mmol/24 h of potassium, 80 g/24 h of proteins, 275-325 g/24 h of carbohydrates; total energy intake was 2500-2800 kcal/24 h.

Hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC)

A two-step HEC combined with IC was performed after an 8- to 10-h overnight fast on day 3 after hospital admission. The clamp lasting 4 h (period 1: 0-120 min and period 2: 120-240 min) was conducted as previously described (DeFronzo *et al.* 1979). Briefly, a Teflon cannula (Venflon; Viggo Helsingborg, Sweden) was inserted into the left antecubital vein for infusion of all test substances. A second cannula was inserted in the retrograde fashion into a wrist vein of the same hand for blood sampling, and the hand was placed into a heated (65 °C) box to achieve venous blood arterialization. A stepwise primed-continuous infusion (1 and 10 mU.kg⁻¹.min⁻¹ of Actrapid HM; Novonordisk, Copenhagen, Denmark) was administered to acutely rise and maintain the plasma concentration of insulin at 75 and 1400 µU/ml. Decreases in serum potassium concentrations during insulin infusion were prevented by co-infusion of potassium chloride with glucose (60 mmol/l KCl/l of 15 % glucose). Plasma glucose concentrations during the clamp were maintained at 5 mmol/l by continuous infusion of 15 % glucose. Arterialized blood plasma glucose concentrations were determined every 5-10 min. Before the clamp, only diabetics with fasting plasma glucose levels below 6 mmol/l were included in the study, and no glucose was infused until plasma glucose had declined to the desired level. Blood urea nitrogen was measured at times 0 min, 120 min and 240 min.

Table 1. Characteristics of study groups.

	C (n = 11)	DM1 (n = 11)
Age (years)	28.72 ± 2.10	32.18 ± 5.72
BMI (kg/m ²)	24.09 ± 1.6	24.36 ± 2.15
Triglycerides (mmol/l)	1.11 ± 0.76	0.77 ± 0.40
Total cholesterol (mmol/l)	4.11 ± 0.88	4.23 ± 0.59
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.27 ± 0.42	1.67 ± 0.29
HbA1c (DCCT) (%)	4.82 ± 0.27	7.97 ± 1.34***
Daily insulin dose (IU/day)	–	36 ± 9.8

Statistical significance: ***p<0.001

Indirect calorimetry (IC)

Substrate utilization and energy expenditure (EE) measurements were made in both groups by IC (Ferrannini 1988). Gas exchange measurements were taken during a 45-min basal period and during the final 45-min periods of the two insulin-infusion steps. A transparent plastic ventilated hood was placed over the subject's head and made airtight around the neck. A slight negative pressure was maintained in the hood to avoid loss of expired air. A constant fraction of air flowing out of the hood was automatically collected for analysis. Air flow as well as O₂ and CO₂ concentrations in expired and inspired air were measured by a continuous open-circuit system (metabolic monitor VMAX; Sensor Medics, Anaheim, CA, USA).

Urinary collections

Urine was collected on the second day after admission. UE during 24 h divided into 3-h periods (periods I-VI from 06:00 to 24:00 h and one-night period VII from 24:00 to 06:00 h) was measured. Urinary collection during the clamp was divided into the basal period (-120-0 min), period 1 (0-120 min), and period 2 (120-240 min).

Analytical methods

Plasma glucose concentrations were measured on a Beckman analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) using the glucose oxidase method. Immunoreactive insulin (IRI) was determined by radioimmunoassay using an IMMUNOTECH Insulin IRMA kit (IMMUNOTECH a.s., Prague, Czech

Republic). Single measurement of glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}) using the Bio-Rad hemoglobin A_{1c} column test (Bio-Rad laboratories, Munich, Germany) was performed before the testing. UE was measured by enzymatic urease reaction using a spectrophotometric UV method (Hitachi 912, Roche, Basel, Switzerland)

Data analysis

Calculations of substrate oxidation were made using standard equations (Ferrannini 1988). UE during the clamp was adjusted for changes in urea pool size (UEc) (Tappy *et al.* 1988). Insulin action was estimated as the metabolic clearance rate of glucose (MCR) and glucose disposal (M) calculated at 80 to 120 min (MCR_{glu} submax and M_{glu} submax) and between 200 and 240 min (MCR_{glu} max and M_{glu} max). MCR was calculated by dividing the amount of glucose infused, after adjustment for changes in glucose pool size, by means of plasma glucose concentration (DeFronzo *et al.* 1979, 1983). Data were statistically analyzed by ANOVA with repeated measures. All data are expressed as means ± S. D.

Results

Twenty-four-hour urinary urea excretion is shown in Table 2. We did not find a significant circadian variation in UE in C and DM1; likewise there were no significant differences in 24-h UE between C and DM1. Evaluation of variation over time in UE output was performed as a coefficient of variation for the individual subjects, however, without statistical significances. During the clamp, serum urea significantly decreased both in C (0 vs. 120 vs. 240 min: 4.67±0.73 vs. 4.29±0.61 vs. 3.8±0.68 mmol/l; p<0.01) and in DM1 (0 vs. 120 vs. 240 min: 6.34±1.73 vs. 5.22±1.7 vs. 4.73±1.21 mmol/l; p<0.01). Serum urea concentrations were significantly higher in DM1 compared to C during the basal (p<0.01) and clamp periods (p<0.05). Table 3 shows the UE and UEc during the clamp. The UE in the basal period was comparable in DM1 and C. During the clamp periods, UE was significantly higher as compared to UEc (p<0.001) in both groups. While UE did not change during the clamp, UEc decreased significantly in both groups (p<0.01). The insulin-induced decrease in UEc during HEC was attenuated in DM1 because UEc during the clamp was significantly higher in DM1 compared to C both in period I (p<0.05) and period II (p<0.01) indicating impaired insulin action on protein metabolism in DM1.

Table 2. Circadian urinary urea excretion (UE) in C (n=11) and DM1 (n=11).

Periods (hours)	C (mmol/24 h)	DM1 (mmol/24 h)
24 h	470 ± 140	452 ± 64
06 – 09 (I)	479 ± 134	431 ± 180
09 – 12 (II)	510 ± 213	423 ± 172
12 – 15 (III)	477 ± 229	428 ± 121
15 – 18 (IV)	474 ± 274	525 ± 102
18 – 21 (V)	576 ± 273	464 ± 135
21 – 24 (VI)	499 ± 103	503 ± 100
24 – 06 (VII)	436 ± 125	369 ± 108

Differences between DM1 and C are not statistically significant.

Table 3. Urinary urea excretion before (basal) and during the two-step hyperinsulinemic euglycemic clamp from 0 to 120 min (Period 1) and from 120 to 240 min (Period 2) before (UE) and after adjustment for changes in urea pool size (UEc) in C (n=11) and DM1 (n=11).

Period	C (mmol/24 h)	DM1 (mmol/24 h)
UE Basal	412 ± 125	412 ± 216
UE Period 1	462 ± 157	686 ± 228 ^b
UE Period 2	436 ± 138	522 ± 162 ^b
UEc Period 1	240 ± 170 ^d	374 ± 187 ^{a,d}
UEc Period 2	219 ± 122 ^{c,d}	274 ± 165 ^{a,c,d}

Statistical significance: a, p<0.05; DM1 vs. C, b, p<0.01; DM1 vs. C, c, p<0.01; UEc period 2 vs. UE basal, d, p<0.001; UEc Period 1 vs. UE Period 1, UEc Period 2 vs. UE Period 2.

C and DM1 did not differ in protein oxidation (basal: 0.70±0.19 vs. 0.97±0.68, period I: 0.42±0.27 vs. 0.69±0.39 and period II: 0.37±0.18 vs. 0.45±0.32 mg.kg⁻¹.min⁻¹). The protein oxidations dropped significantly during the clamp in both groups (basal period vs. period II; p<0.01).

Insulin action, as measured by MCR_{glu} submax (12.54±3.38 vs. 17.41±6.18 mg.kg⁻¹.min⁻¹; p<0.02), MCR_{glu} max (21.63±6.47 vs. 26.61±4.45 mg.kg⁻¹.min⁻¹; p<0.05) and M_{glu} max (19.0±5.6 vs. 23.3±3.0 mg.kg⁻¹.min⁻¹; p<0.01), was lower in DM1 compared with C, although the difference in M_{glu} submax did not reach significance (11.05±3.07 vs. 13.53±2.60 mg.kg⁻¹.min⁻¹). There were no significant relationships between UE and MCR_{glu}. UE over 24 h and UEc during

the clamp were statistically different both in C and DM1. Neither basal UE nor clamp UE could be replaced by UE from 24 h and from 24-h sampling.

Discussion

In this study, we have demonstrated significant insulin-induced changes in urea pool size in both DM1 and C subjects indicating that only UEc should be used for calculations of substrate utilization during the clamp studies. The results are in accordance with previous studies in healthy volunteers (Tappy *et al.* 1988, Thorburn *et al.* 1991). We have also found that hyperinsulinemia significantly decreases the UEc and protein oxidation in both groups.

The insulin-induced decrease in UEc was attenuated in DM1. Because there were no differences in protein oxidation during the clamp between DM1 and C, the insufficient suppression of proteolysis could be responsible for this. This finding could imply that, in addition to insulin resistance (IR) in glucose metabolism (DeFronzo *et al.* 1982, Yki-Järvinen *et al.* 1990, Wohl *et al.* 2004), DM1 patients are also characterized by impaired insulin action in protein metabolism. The increased plasma urea concentrations during clamp periods, as seen in DM1 subjects, could be explained partly by lower insulin sensitivity in DM1 and a lower volume load of glucose infusion during the clamp. Moreover, because an abnormal glucose tolerance test indicates impaired disposal of an oral glucose load, abnormal "protein tolerance" would be indicated by abnormal disposal of the protein load, resulting in an abnormally high postprandial urea production rate (Hoffer 1998). Although this is not a completely new finding, it is interesting in context of physiological and "mechanistic" studies. Thus, it seems that in our study hyperinsulinemia does not suppress proteolysis and urea production in subjects with DM1 as compared with non-diabetic subjects even though UE is equivalent under basal conditions. Our study supports the hypothesis that IR influences UE in DM1 without changes in protein oxidation. The importance of this phenomenon should be confirmed by studies using more precise methods such as tracer techniques which have not been used in our protocol.

Hepatic glucose production was not measured in this study, but it is known to fall by more than 90 % to insulin levels $> 50 \mu\text{U/ml}$ in healthy men (Rizza *et al.* 1991) and patients with DM1 (DeFronzo *et al.* 1982).

Thus, the total amount of glucose infused was assumed to be a measure of the glucose metabolized by all cells of the body during clamp studies. Nevertheless, we could not exclude the impaired suppression of hepatic glucose production by insulin and underestimation of MCR or M in DM1 patients.

However, tracer methods could also underestimate short-term variations in urea production in humans (Hamadeh and Hoffer 1998). Dissociation of insulin effect on glucose and protein metabolism has been reported by the tracer method in DM1 and type 2 diabetes. Insulin action seems to be more effective in reducing catabolic pathways than anabolic processes in protein metabolism (Hoffer 1998). In DM1, the increased leucine transamination associated with increased leucine oxidation has also been found, while in type 2 diabetic patients only changes in leucine transamination, but not in leucine oxidation or leucine kinetics have been shown (Halvatsiotsis *et al.* 2002). Moreover, there is evidence that insulin may contribute to the inhibition of protein oxidation and urea production by other mechanisms (Felig and Wahren 1971, Tessari *et al.* 1987, Gelfand and Barrett 1987). Fukagawa *et al.* (1987) reported a reduction of protein breakdown by insulin in healthy subjects. Whether this phenomenon occurs under the conditions of IR and DM1 still remains not clear.

During hyperinsulinemic euglycemic clamp, the alterations in urine flow, urea pool size, and clearance, urinary nitrogen excretion and substrate oxidation rates also occur. Under these conditions, total urinary nitrogen increases (rather than decreases) by 47 %, largely due to increased urea clearance (Thorburn *et al.* 1991). Increased urea clearance during the clamp is more likely due to an increase in urine output, since augmented urine flow is known to result in an increase of the fractional extraction rate of urea (Thorburn *et al.* 1991). This is due to the fact that urea reabsorption is a passive process completely dependent on the rate of water reabsorption, which establishes the diffusion gradient within the kidney tubules. Changes in the renal clearance of urea, the delay required for urea to pass through the kidney and to be collected in the bladder, and problems associated with subjects producing urine on demand. All this adds uncertainty to short-term measurements of urea production based on urinary urea nitrogen excretion (Thorburn *et al.* 1991, Mathews and Downey 1984). In addition, increased insulin concentrations may have a sodium retaining effect (Pelikánová *et al.* 1996) and, hence, changes in volume

and urea clearance. However, extrarenal metabolic pathways such as urea hydrolysis do not play an important role in whole-body urea homeostasis in healthy subjects, but there are no data about diabetes and obesity (El Khoury *et al.* 1996). In addition, daily obligatory urinary nitrogen excretion of diabetic patients was 18 % higher than in normal subjects and this is not influenced by strict normoglycemia and intensive insulin treatment. During this treatment there remain subtle changes in recycling of amino acids (Hoffer 1998). The mechanism of this phenomenon is still unknown. Relative insulin deficiency, different pathways of insulin application and insulin resistance dealing with disturbances of protein metabolism in patients with Type 1 (DM1) and Type 2 (DM2) diabetes mellitus should also be taken into account.

The circadian variations of UE were not significant in either group in our study. Such findings may be due to a small number of subjects as well as the fact that our measurements were not repeated over a period of several days. In contrast, Steffee *et al.* (1981) concluded that there is little doubt that a diurnal rhythm of urea excretion exists in healthy subjects, but the physiological basis is still not clear. In addition, Thorburn *et al.* (1991) reported large day-to-day variability in basal urinary nitrogen, which might lead to substantial error in the basal substrate oxidation rate. UE is strongly related to protein feeding (Steffee *et al.* 1981), differences in diet probably account for much variation in the reported urinary urea production rates, especially because several studies used collection periods that included both

postabsorptive and feeding periods; however, in our study, dietary intake was standardized for all subjects.

Based on our results, separate urine sampling seems to be the only option during a clamp for estimating substrate utilization both in DM1 and C. We conclude that UE collections performed during the clamp with UE adjusted for changes in urea pool size are the most suitable for measuring substrate utilization during the clamp both in DM1 and C. UEC in urine collection during the clamp cannot be replaced by UE with 24-h sampling (periods I-VII) or by a single 24-h urine collection sample. Furthermore, we have not found significant circadian variation in UE in both groups. Attenuated insulin-induced decrease in UE implicates an impaired insulin effect on proteolysis, despite not altered protein oxidation in DM1. Future studies are needed for UE determination in DM1 and IR which could also provide additional data to make measurement of substrate utilization more accurate.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

Supported by grants from the Health Ministry of the Czech Republic (grant IGA NR 8891-3 and MZO00023001). The skilful technical assistance of Mrs. Dana Lapešová, Dagmar Šišáková and the help of Ms. Věra Lánská and Jelena Skibová with statistical evaluation of the data are gratefully acknowledged.

References

- DEFRONZO RA, TOBIN DJ, ANDRES R: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* **237**: E214-E227, 1979.
- DEFRONZO RA, HENDLER R, SIMONSON D: Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes* **31**: 795-801, 1982.
- DEFRONZO R A, JACOT E, JEQUIER E, MAEDER E, WAHREN J, FELBER JP: The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetologia* **25**: 1000-1007, 1983.
- EL KHOURY A E, AJAMI A M, FUGAWA NK, CHAPMAN TE, YOUNG VR: Diurnal pattern of interrelationships among leucine oxidation, urea production, and hydrolysis in humans. *Am J Physiol* **271**: E563-E573, 1996.
- FELIG P, WAHREN J: Influence of endogenous insulin secretion on splanchnic glucose and amino acid metabolism in man. *J Clin Invest* **50**: 1702-1711, 1971.
- FERRANNINI E: The theoretical bases of indirect calorimetry: A review. *Metabolism* **37**: 287-301, 1988.
- FUKAGAWA NK, MINAKER KL, ROWE JW, GOODMAN MN, MATTHEWS DE, BIER DM, YOUNG VR: Insulin-mediated reduction of whole body protein breakdown dose response effects on leucine metabolism in postabsorptive men. *J Clin Invest* **76**: 2306-2311, 1987.

-
- GELFAND RA, BARRET EJ: Effect of physiological hyperinsulinemia on skeletal muscle synthesis and breakdown in man. *J Clin Invest* **80**: 1-6, 1987.
- HAMADEH MJ, HOFFER LJ: Tracer methods underestimate short-term variations in urea production in humans. *Am J Physiol* **274**: E547-553, 1998.
- HALVATSIOTIS P, SHORT KR, BIGELOW M, NAIR KS: Synthesis rate of muscle proteins functions and amino acid kinetics in Type 2 diabetes. *Diabetes* **51**:2395-2404, 2002.
- HOFFER LJ: Adaptation to protein restriction is impaired in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr* **128**: 333S-336S, 1998.
- JACOT E, DEFRONZO RA, JEQUIER E, MAEDER E, FELBER JP: The effect of hyperglycemia, hyperinsulinemia and route of glucose administration on glucose oxidation and glucose storage. *Metabolism* **31**: 922-930, 1982.
- MATHEWS DE, DOWNEY RS: Measurement of urea kinetics in humans: a validation of stable isotope tracer methods. *Am J Physiol* **246**: E519-E527, 1984.
- PELIKÁNOVÁ T, SMRČKOVÁ I, KŘÍŽOVÁ J, STRÍBRNÁ J, LÁNSKÁ V: Effect of insulin and lipid emulsion on renal haemodynamics and renal sodium handling in IDDM. *Diabetologia* **39**: 1074-1082, 1996.
- RIZZA RA, MANDARINO LJ, GERICH JE: Dose-response characteristics for effect of insulin on production and utilization of glucose in man. *Am J Physiol* **240**: E630-E638, 1991.
- STEFFEE WP, ANDERSON CF, YOUNG V R: An evaluation of the diurnal rhythm of urea excretion in healthy subjects. *J Parenter Enteral Nutr* **5**: 378-384, 1981.
- TAPPY L, OWEN OE, BODEN G: Effect of hyperinsulinemia on urea pool size and substrate oxidation rate. *Diabetes* **37**: 1212-1216, 1988.
- TESSARI P, NOSADINI R, TREVISAN R, KREUTZBERG SV, INCHIOSTRO S, DUNER E, BIOLO G, MARESCOTTI MC, TIENGO A, CREPADLI G: Defective suppression by insulin of leucine-carbon appearance and oxidation in type 1. insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for insulin resistance involving glucose and amino acid metabolism. *J Clin Invest* **77**: 1797-1804, 1986.
- TESSARI P, INCHIOSTRO S, BIOLO G, TREVISAN R, FANTIN G, MARESCOTTI MC, IORI E, TIENGO A, CREPALDI G: Differential effects of hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia on leucine-carbon metabolism in vivo: evidence for distinct mechanism in regulation of net amino acid deposition. *J Clin Invest* **79**: 1062-1069, 1987.
- THORBURN AW, GUMBINER B, FLYNN T, HENRY RR: Substrate oxidation errors during combined indirect calorimetry-hyperinsulinemic glucose clamp studies. *Metabolism* **40**: 391-398, 1991.
- WOHL P, WOHL P, GIRMAN P, PELIKANOVÁ T: Inflexibility of energy substrate oxidation in type 1 diabetic patients. *Metabolism* **53**: 655-659, 2004.
- YKI-JARVINEN H, SAHLIN K, REN JM, KOIVISTO VA: Localization of rate-limiting defect for glucose disposal in skeletal muscle of insulin-resistant type I diabetic patients. *Diabetes* **39**: 157-167, 1990.
-

CLINICAL STUDY

Effect of telmisartan on selected adipokines, insulin sensitivity, and substrate utilization during insulin-stimulated conditions in patients with metabolic syndrome and impaired fasting glucose

Petr Wohl, Eva Krušinová, Martin Hill¹, Simona Kratochvílová, Kateřina Zídková, Jan Kopecký, Tomáš Neškudla, Michal Pravenec², Marta Klementová, Jana Vrbíková¹, Pavel Wohl, Petr Mlejnek² and Terezie Pelikánová

Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958/4, Prague 140 21, Czech Republic, ¹Institute of Endocrinology, Narodni 8, Prague 116 94, Czech Republic and ²Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, Prague 142 20, Czech Republic

(Correspondence should be addressed to T Pelikánová; Email: terezie.pelikanova@ikem.cz)

Abstract

Objective: Telmisartan improves glucose and lipid metabolism in rodents. This study evaluated the effect of telmisartan on insulin sensitivity, substrate utilization, selected plasma adipokines and their expressions in subcutaneous adipose tissue (SAT) in metabolic syndrome.

Design and methods: Twelve patients with impaired fasting glucose completed the double-blind, randomized, crossover trial. Patients received telmisartan (160 mg/day) or placebo for 3 weeks and *vice versa* with a 2-week washout period. At the end of each period, a hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC) combined with indirect calorimetry was performed. During HEC (0, 30, and 120 min), plasma levels of adipokines were measured and a needle biopsy (0 and 30 min) of SAT was performed.

Results: Fasting plasma glucose was lower after telmisartan compared with placebo ($P < 0.05$). There were no differences in insulin sensitivity and substrate utilization. We found no differences in basal plasma adiponectin, resistin and tumour necrosis factor α (TNF α), but an increase was found in basal leptin, after telmisartan treatment. Insulin-stimulated plasma adiponectin ($P < 0.05$), leptin and resistin ($P < 0.001$) were increased, whereas TNF α was decreased ($P < 0.05$) after telmisartan treatment. Expression of resistin, but not adiponectin, TNF α and leptin was increased after telmisartan treatment.

Conclusions: Despite the decrease in fasting plasma glucose, telmisartan does not improve insulin sensitivity and substrate utilization. Telmisartan increases plasma leptin as well as insulin-stimulated plasma adiponectin, leptin and resistin, and decreases plasma TNF α during HEC. Changes in plasma adipokines cannot be explained by their expressions in SAT. The changes in plasma adipokines might be involved in the metabolic effects of telmisartan in metabolic syndrome.

European Journal of Endocrinology 163 573–583

Introduction

Several large intervention trials have demonstrated that angiotensin II type 1 receptor antagonists (ARBs) reduce the incidence of new-onset diabetes by 20–25% (1, 2). The protective effects of ARBs during the development of diabetes are probably independent of their antihypertensive properties (3, 4).

However, the mechanisms underlying the effect of ARBs on glucose metabolism are not fully understood. Experimental evidence has been accumulated that insulin resistance (IR) may be improved by interrupting renin–angiotensin system (5). All ARBs have been shown to improve insulin sensitivity in experimental and *in vitro* studies through multiple mechanisms, including increase in muscle blood flow, decreased sympathetic nervous activity, enhanced insulin

signalling and adipose-tissue remodelling (5, 6). Angiotensin II inhibits pre-adipocyte differentiation into mature adipocytes, which impairs the fat cells' ability to store fat (6). This in turn results in accumulation of fats in the liver, the skeletal muscle, and the pancreas, which worsens IR. Impaired fat cells produce excessive amounts of pro-inflammatory cytokines (tumour necrosis factor α (TNF α), interleukin (IL) 6, resistin, and others), whereas the insulin-sensitizing cytokines such as adiponectin are reduced (6). Blocking the angiotensin II receptor with ARBs decreases the adipocyte size (7), promotes differentiation of pre-adipocytes to mature adipocytes, and prevents the ectopic fat accumulation (8). In addition, ARBs may alter the adipokine profile.

It has been shown that ARBs increase the adiponectin protein content in isolated adipocytes (9). Increases in plasma adiponectin concentrations after

ARB treatment have been found also in human subjects by some (10–12), but not all, groups (13). The actual knowledge of the physiological roles of resistin and TNF α in altering muscle glucose and lipid metabolism is more controversial, but each has been shown to directly impair insulin signalling and consequently insulin-stimulated glucose uptake in muscles (14). The role of resistin is less understood. It is implicated in IR in rats but probably not in human subjects. Moreover, other adipokines (such as adiponectin and leptin) in physiological concentrations are insulin sparing as they stimulate β oxidation of fatty acids in skeletal muscle. The effect of ARBs on adipokines *in vivo* in human subjects has not been systematically evaluated until now.

Human studies investigating the effect of ARBs on insulin sensitivity are not conclusive. Most of the randomized, placebo-controlled or head-to-head studies using the hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC) technique for estimation of insulin sensitivity have found no significant effect of ARBs on insulin action in human subjects (5, 15, 16). However, there is evidence that certain ARBs have a further effect on insulin sensitivity, which is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARG). PPARG is a nuclear transcription factor which triggers the expression of multiple genes involved in glucose and lipid metabolism (17). Not all ARBs have been shown to bind to PPARG; the strongest activity has been seen with telmisartan (4, 17, 18). Based on rodent experiments, it can be hypothesized that the activation of PPARG may be involved in the ability of telmisartan to increase muscle fatty acid oxidation and energy expenditure (EE) (19). The *in vivo* effects of telmisartan on insulin sensitivity and substrate oxidation estimated by HEC combined with indirect calorimetry have not been studied in human subjects so far.

The aim of our study was to evaluate *in vivo* effects of telmisartan on insulin sensitivity, substrate utilization, basal and insulin-stimulated plasma concentrations of selected adipokines and their expressions in subcutaneous adipose tissue (SAT) in patients with impaired fasting glucose and metabolic syndrome.

Subjects and methods

Subjects

We enrolled 12 male patients with metabolic syndrome defined according to the NCEP-ATPIII criteria, revised in 2005 (20). Impaired fasting glucose was an obligate criterion for enrolment in the study. One patient had both impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance (confirmed by an oral glucose tolerance test). Only male subjects participated in the study in order to exclude variability in insulin sensitivity in women according to menstrual cycle and childbearing potential and with respect to sexual dimorphism of adipokines. Characteristics of study group are shown in Table 1.

Table 1 Characteristics of study group.

<i>n</i>	12
Age (years)	50.0 \pm 6.02
BMI (kg/m ²)	29.0 \pm 4.37
Waist (cm)	104.6 \pm 7.8
Systolic blood pressure (mmHg)	133.0 \pm 12.0
Diastolic blood pressure (mmHg)	91.3 \pm 10.0
HbA1c (%)	3.86 \pm 0.44
Total cholesterol (mmol/l)	5.51 \pm 1.1
HDL cholesterol (mmol/l)	0.99 \pm 0.12
LDL cholesterol (mmol/l)	3.2 \pm 1.22
Serum triglycerides (mmol/l)	2.71 \pm 1.4
Plasma glucose 120 min, OGTT (mmol/l)	7.6 \pm 1.8
Fasting plasma glucose (mmol/l)	6.1 \pm 0.43

OGTT, oral glucose tolerance test.

Patients enrolled in the study were treatment-naive with regard to oral antidiabetic medication. Antihypertensive treatment was adjusted during the 4-week run-in period as follows: angiotensin-converting enzyme and ARB treatment had been stopped and replaced by metabolic neutral calcium channel blockers. The dose of concomitant calcium channel blocker (if required) was stable during the whole study duration. None of the patients had their dietary intake of salt or protein restricted. Patients with overt diabetes (diagnosed by an oral glucose tolerance test), acute or chronic inflammatory, or other major organ diseases were excluded from the study.

All subjects gave their informed consent with the study protocol that had been reviewed and approved by the local ethics committee. The study was performed in accordance with the Helsinki Declaration and Title 45, Code of Federal Regulations, Part 46, Protection of Human Subjects. The EudraCT number 2006-000490-29 had been issued for our Sponsor's Protocol Code No. 1, 1.1.2006.

Study protocol

The study was a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover trial consisting of two treatment periods. After a 4-week run-in period, the subjects were randomly assigned to receive telmisartan 160 mg daily (Micardis 80 mg; Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) or placebo for 3 weeks. After a 2-week washout period, the medication was changed and continued for another 3 weeks. Randomization was performed by standard procedure. The code was not broken until all data were entered into a database, which was locked for editing. Drug compliance was assessed by the effect on blood pressure as well as by the study drug accountability. Patients were instructed to adhere to their ordinary lifestyle and avoid changes in food intake, alcohol consumption and exercise during the whole study duration.

At the end of both 3-week periods of treatment with telmisartan or placebo, all patients underwent a 2 h HEC combined with indirect calorimetry and adipose tissue biopsies.

Hyperinsulinemic euglycemic clamp The subjects were examined on an outpatient basis after an 8–10 h overnight fast with only tap water allowed *ad libitum*. The HEC, lasting 2 h, was conducted as described earlier (21). Briefly, a Teflon cannula (VenflonViggo, Helsingborg, Sweden) was inserted into left antecubital vein for infusion of all test substances. A second cannula was inserted in a retrograde manner into a wrist vein of the same hand for blood sampling, and a hand was placed in a heated (65 °C) box to achieve venous blood arterialization. A stepwise primed-continuous infusion (1 mU/kg per min of Actrapid HM; NovoNordisk, Copenhagen, Denmark) was administered to acutely raise and maintain the plasma concentration of insulin at 75 µU/ml. Plasma glucose concentrations during the clamp were maintained at 5.0 mmol/l by continuous infusion of 15% glucose. To prevent hypokalemia during insulin infusion, potassium chloride was added to 15% glucose infusion (30 mmol KCl/l of glucose). Arterialized blood plasma glucose concentration was determined every 5–10 min. Before the clamp, fasting plasma glucose levels had been checked, and at concentration lower than 6.0 mmol/l, the clamp procedure was started. No glucose was infused until plasma glucose had declined to the clamp-target level.

Needle biopsy of abdominal SAT Needle biopsy of abdominal SAT was performed before (0 min) and 30 min into the clamp. Under local anaesthesia (1% trimecain in a field block pattern), an incision (3–4 mm) was made through the skin at the lower abdomen, and a subcutaneous fat specimen (300 mg) was obtained by needle aspiration. The samples were washed in 0.9% sodium chloride solution, immediately frozen by liquid nitrogen, and stored at –80 °C until used for RNA extraction.

Indirect calorimetry Substrate utilization and EE were assessed by indirect calorimetry (22). Gas exchange measurements were performed during a 45 min basal period before starting the insulin infusion and during the last 45 min period of the clamp. A transparent

plastic ventilated hood was placed over the subject's head and made airtight around the neck. A slight negative pressure was maintained in the hood to avoid loss of expired air. A constant fraction of air flowing out of the hood was automatically collected for analysis. Airflow and O₂ and CO₂ concentrations in expired and inspired air were measured by a continuous open-circuit system (metabolic monitor VMAX; Sensor Medics, Anaheim, CA, USA). Blood samples were taken at 0 and 120 min of the clamp study to assess plasma levels of selected adipokines and blood urea nitrogen. Urine was collected i) during the night before the study (basal) and ii) during the clamp study (0–120 min) to measure the urinary nitrogen excretion to be able to calculate protein oxidation.

Measurements of blood pressure were performed as three time readings at the beginning of the clamp, after 30 min resting position and during the clamp.

Analytical methods

Plasma concentrations of glucose were measured using the Beckman analyzer (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) by glucose oxidase method. Immunoreactive insulin (IRI) was determined by RIA method using an IMMUNOTECH Insulin IRMA kit (IMMUNOTECH a.s, Prague, Czech Republic) with analytical sensitivity of 0.5 µIU/ml; intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were below or equal to 4.3 and 3.4% respectively. HbA_{1c} was measured by HPLC method (Tosoh HLC-723 G7; Tosoh Corporation, Tokyo, Japan). This analyzer uses a non-porous ion exchanger that separates HbA_{1c} from other fractions. The method was calibrated to IFCC reference procedure (23).

Plasma concentrations of TNF α were measured by immunoassay (Human TNF α UltraSensitive RIA kit; BioSource International, Camarillo, CA, USA; the detection limit was <0.09 pg/ml, and intra- and inter-assay CV were 5.3–6.7 and 8.2–9.7% respectively); plasma concentrations of resistin were measured by Human Resistin ELISA kit (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic; the detection limit

Table 2 Primers used for RT-PCR of the subcutaneous adipose tissue samples.

Gene	Accession number	Forward primer	Reverse primer
Adiponectin	XM_290602	HACRP30-F: 5'-GGT TCA ATG GCT TGT TTG C-3'	HACRP30-R: 5'-TCA TCC CAA GCT GAT TCT G-3'
Leptin	NM_000230	Hleptin-F: 5'-CCC TAA GCC TCC TTT TGC T-3'	Hleptin-R: 5'-GCT AAG AGG GGA CAA GAC A-3'
TNF α	X02910 X02159	HTNFa-F: 5'-CTA TCT GGG AGG GGT CTT C-3'	HTNFa-R: 5'-TTG GGA AGG TTG GAT GTT C-3'
Resistin	AY207314	HRETN-F: 5'-ATA AGC AGC ATT GGC CTG G-3'	HRETN-R: 5'-TGG CAG TGA CAT GTG GTC T-3'
Cyclophilin	XM_090070	HCLPNa-F: 5'-CAA ATG CTG GAC CCA ACA CA-3'	HCLPNa-R: 5'-TGC CAT CCA ACC ACT CAG TC-3'

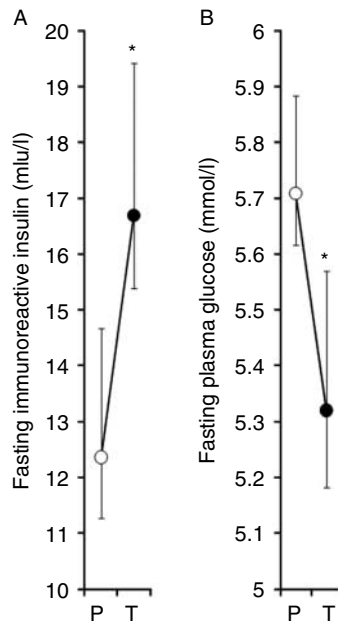


Figure 1 Effect of telmisartan treatment on fasting immunoreactive insulin and plasma glucose. The circles with error bars symbolize the group means with their 95% confidence intervals: telmisartan (T; full circles) and placebo (P; open circles). For the fasting immunoreactive insulin (A), the significance of the factors was as follows: telmisartan: $F=7.6$, $P=0.0224$; subject (inter-individual variability): $F=7.6$, $P=0.0029$. For the fasting plasma glucose (B), the significance of the factors was as follows: telmisartan: $F=8.8$, $P=0.0129$; subject (inter-individual variability): $F=3$, $P=0.0392$. Statistical significance: $*P<0.05$.

was 0.033 ng/ml, and intra- and inter-assay CV were 2.8–3.4 and 5.1–6.9% respectively); plasma concentrations of leptin were measured by Human Leptin ELISA kit (BioVendor Laboratory Medicine Inc.; the detection limit was 0.5 ng/ml, and intra- and inter-assay CV were 3–7.5 and 3.2–9.2% respectively); plasma concentrations of adiponectin were measured by Human Adiponectin ELISA kit (BioVendor Laboratory Medicine Inc.; the detection limit was 210 ng/ml, and intra- and inter-assay CV were 6.4–7 and 7.3–8.2% respectively), all according to the manufacturer's instructions.

Expression of adipokines was analysed by the real-time PCR method using the following protocol:

- i) The RNA was isolated from the liquid nitrogen frozen biopsy of the human fat tissue using the RNeasy Lipid Tissue Mini kit and QIAzolLysis Reagent (Qiagen). The starting amount of 100 mg tissue was excised from the biopsy and homogenized in 1 ml of QIAzolLysis Reagent (guanidine thiocyanate–phenol solution) for 2 min. From the homogenate, the RNA was isolated by extraction on silica gel-based column, according to the kit handbook. Possible contamination of RNA with genomic DNA remains was taken out by DNase digestion (RNase-free DNase Set; Qiagen). This step is supposed to prevent any significant DNA amplification, e.g. by gel electrophoresis.
- ii) The cDNA was synthesized using a recombinant Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen), ribonuclease inhibitor from human placenta (Sigma) and (dT)₁₆ oligonucleotides.
- iii) The real-time PCR procedure itself had been carried out on the DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Waltham, MA, USA). HotStarTaq DNA polymerase and SYBR Green fluorescent dye (QuantiTec SYBR Green PCR kit; Qiagen) were used for the RT-PCR. To eliminate the influence of primer dimers, negative controls were used. As the reference gene, human cyclophilin was used; there is no evidence of insulin or ARB influence on cyclophilin. Primers used for RT-PCR are given in Table 2.
- iv) The data were processed by Q-gene 96 software (Institute of Biochemistry and Genetics, University of Basel, Basel, Switzerland).

Calculations

Insulin action was estimated as the glucose disposal (M) and metabolic clearance rate (MCR) of glucose calculated during the last 20 min of the clamp after correction for changes in glucose pool size (21). Calculations of substrate oxidation were made using standard equations (22). Urinary urea excretion during the clamp was corrected for changes in urea pool size (24). Non-oxidative glucose disposal (NEOX) was calculated by subtracting the rate of glucose oxidation from M .

Table 3 Substrate utilization before (basal) and during hyperinsulinemic euglycemic clamp (insulin) after 3-week treatment with telmisartan or placebo.

	Placebo		Telmisartan	
	Basal	Insulin	Basal	Insulin
REE (kcal/24 h)	1729 ± 386	1823 ± 337	1706 ± 370	1728 ± 355
RQ	0.79 ± 0.03*	0.87 ± 0.05	0.77 ± 0.04*	0.86 ± 0.03
Chox (mg/kg per min)	0.69 ± 0.42*	1.36 ± 0.8	0.63 ± 0.42*	1.47 ± 0.39
Fox (mg/kg per min)	0.77 ± 0.2*	0.48 ± 0.2	0.71 ± 0.32*	0.58 ± 0.30
Prox (mg/kg per min)	0.87 ± 0.3*	0.40 ± 0.14	0.88 ± 0.39*	0.43 ± 0.15

REE, resting energy expenditure; RQ, respiratory quotient; Chox, glucose oxidation; Fox, lipid oxidation; Prox, protein oxidation. Differences between telmisartan and placebo were not statistically significant. $*P<0.02$ versus insulin.

Statistical analysis

The data are expressed as means \pm s.e.m. unless indicated otherwise. Steady-state periods of both clamps were compared using Wilcoxon's paired test. The differences between time courses of both clamps were evaluated by a repeated-measures ANOVA model, including the following factors and interactions: effect of telmisartan treatment (placebo versus telmisartan) and effect of hyperinsulinemia (clamp induced) as the within factors, subject factor (represents the inter-individual variability of subjects) and telmisartan \times hyperinsulinemia interaction. The last term indicated whether the shapes of the time profiles for telmisartan and placebo were different or not. The differences between subgroups were evaluated using least significant difference (LSD) multiple comparisons. The statistical significance $P < 0.05$ was chosen for both ANOVA testing and multiple comparisons. Owing to a non-Gaussian data distribution in all dependent variables, the data underwent power transformations (directly in the ANOVA model) to attain distributional symmetry and a constant variance in the data as well as in residuals. The non-homogeneities were detected using residual diagnostics. The experimental points with absolute values of studentized residual (after data transformation) > 3 were excluded from the analysis. The fraction of such points never exceeded 5% of the total number. Statgraphics Centurion v. XV statistical software (Statpoint Inc., Herndon, VA, USA) was used for the data analysis.

Results

Telmisartan compared to placebo treatment induced no differences in body weight (89.8 ± 19 vs 89.8 ± 18 kg) but resulted in lower blood pressure, both systolic (126 ± 10 vs 135 ± 12 mmHg; $P < 0.03$) and diastolic (81 ± 10 vs 90 ± 10 mmHg; $P < 0.01$), lower fasting plasma glucose ($P < 0.05$) and higher fasting IRI ($P < 0.05$). Fasting plasma glucose and IRI are shown in Fig. 1. Insulin action was estimated by HEC combined with indirect calorimetry. The clamps performed after treatment with telmisartan versus placebo were comparable in terms of the mean plasma glucose concentrations (5.29 ± 1.9 vs 5.34 ± 0.3 mmol/l), CV of glucose (2.89 ± 1.9 vs $2.56 \pm 1.2\%$) and mean IRI levels. Insulin action was comparable after telmisartan and placebo. MCR (4.15 ± 1.0 vs 4.08 ± 1.9 ml/kg per min), M (4.4 ± 1.8 vs 3.9 ± 1.7 mg/kg per min) and NEOX (4.1 ± 1.9 vs 3.0 ± 2.3 mg/kg per min) did not differ between telmisartan and placebo. Similarly, EE, glucose and fat oxidations have not been statistically different comparing telmisartan and placebo (Table 3).

No significant effect of telmisartan on basal plasma concentrations of selected adipokines has been detected, except of basal plasma leptin that has significantly increased after telmisartan treatment (Fig. 2C–5C).

Plasma concentrations of TNF α during HEC are shown in Fig. 2A–C. The ANOVA model indicated (Fig. 2A) a significant decrease in plasma TNF α in telmisartan as compared to placebo (telmisartan; $P < 0.05$), whereas no significant hyperinsulinemia effect (Fig. 2B) or interaction was detected (Fig. 2C). However, the plasma changes

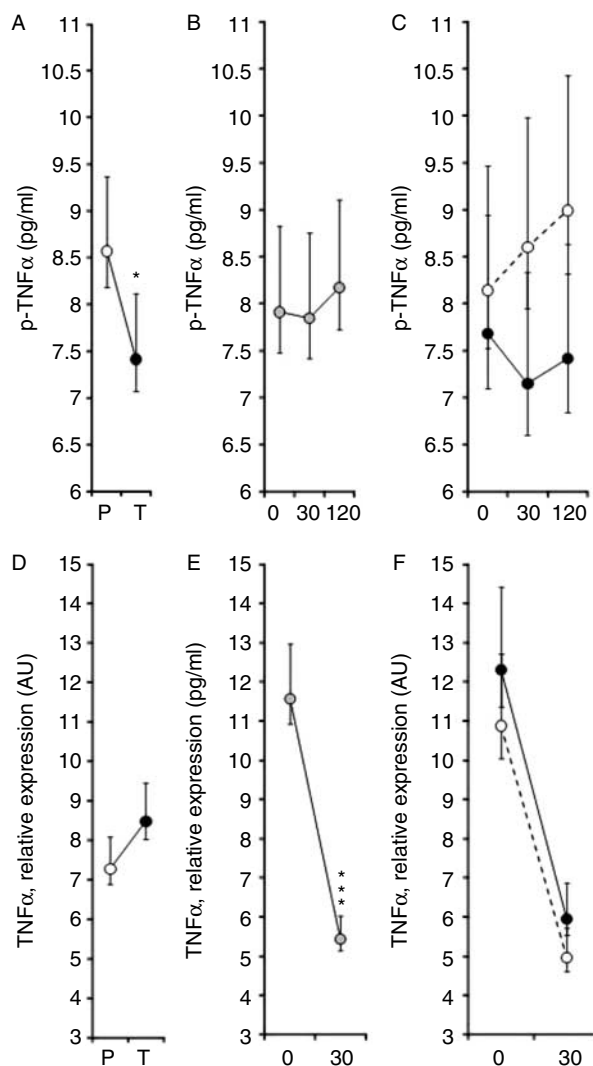


Figure 2 Effects of telmisartan treatment and the clamp-induced hyperinsulinemia on TNF α . The circles with error bars symbolize the group means with their 95% confidence intervals: telmisartan (T; full circles) and placebo (P; open circles). (A and D) The effect of telmisartan is illustrated; (B and E) the effect of clamp-induced hyperinsulinemia is demonstrated; (C and F) the interactions between telmisartan and hyperinsulinemia are shown. For the pTNF α (A–C), the significance of the factors and interactions was as follows: telmisartan: $F = 4.8$, $P = 0.0328$; subject (inter-individual variability): $F = 2.7$, $P = 0.0085$; hyperinsulinemia: $F = 0.1$, $P = 0.8698$; telmisartan \times hyperinsulinemia: $F = 0.4$, $P = 0.6489$. For the ExTNF α (D–F), the significance of the factors and interactions was as follows: telmisartan: $F = 3.9$, $P = 0.0591$; subject (inter-individual variability): $F = 1.8$, $P = 0.1122$; hyperinsulinemia: $F = 92$, $P < 0.0001$; telmisartan \times hyperinsulinemia: $F = 0.2$, $P = 0.6406$. Statistical significance: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

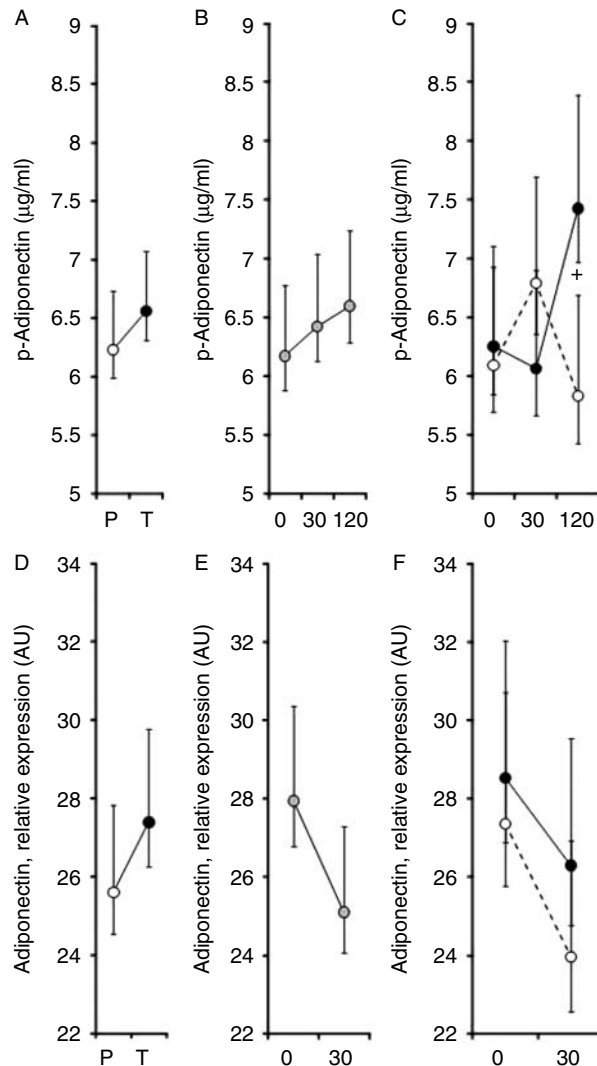


Figure 3 Effects of telmisartan treatment and the clamp-induced hyperinsulinemia on adiponectin. The circles with error bars symbolize the group means with their 95% confidence intervals: telmisartan (T; full circles) and placebo (P; open circles). (A and D) The effect of telmisartan is illustrated; (B and E) the effect of clamp-induced hyperinsulinemia is demonstrated; (C and F) the interactions between telmisartan and hyperinsulinemia are shown. For the plasma adiponectin (A–C), the significance of the factors and interactions was as follows: telmisartan: $F=0.9$, $P=0.3618$; subject (inter-individual variability): $F=14.9$, $P<0.0001$; hyperinsulinemia: $F=0.5$, $P=0.6317$; telmisartan \times hyperinsulinemia: $F=3.3$, $P=0.0429$. For the adiponectin expression (D–F), the significance of the factors and interactions was as follows: telmisartan: $F=1.3$, $P=0.2709$; subject (inter-individual variability): $F=6.4$, $P<0.0001$; hyperinsulinemia: $F=3.2$, $P=0.0846$; telmisartan \times hyperinsulinemia: $F=0.2$, $P=0.6756$. Statistical significance: + $P<0.05$ for differences between telmisartan and placebo in individual stages of HEC.

after telmisartan do not correspond with relative expression of $\text{TNF}\alpha$ in subcutaneous adipose abdominal tissue. In this study, the effect of clamp-induced hyperinsulinemia (Fig. 2E) has been found to be significant ($P<0.001$) and no telmisartan effect was detected

(Fig. 2D), implicating the suppression of $\text{TNF}\alpha$ expression by insulin, which is not influenced by telmisartan.

Plasma adiponectin concentrations are shown in Fig. 3A–C. Plasma adiponectin concentrations have shown a different time course during insulin-stimulated conditions in telmisartan and placebo (Fig. 3C), documented by the significant telmisartan \times hyperinsulinemia interaction ($P<0.05$). A significant increase in plasma adiponectin was detected by LSD multiple comparisons in 120 min of HEC (0 vs 120 min; $P<0.05$) after telmisartan treatment, whereas no changes were seen after placebo treatment. Relative expressions of adiponectin were comparable during both treatment periods and clamps, and both telmisartan and hyperinsulinemia factors were not significant (Fig. 3D–F).

Figure 4A–C shows plasma leptin concentrations. Both basal and insulin-stimulated plasma leptin concentrations were significantly increased after telmisartan treatment compared to placebo treatment (telmisartan effect; $P<0.001$), while telmisartan did not alter the relative expressions of leptin in SAT. There was a significant decrease in leptin expressions during insulin-stimulated conditions (HEC), as documented by the significant hyperinsulinemia factor ($P<0.001$; Fig. 4E).

Plasma concentrations and tissue expressions of resistin are shown in Fig. 5. The telmisartan treatment resulted in an increase in plasma resistin concentrations, as documented by a significant telmisartan factor ($P<0.01$; Fig. 5A). The multiple comparisons tests were in accordance with ANOVA testing. Figure 5B shows the increasing plasma concentrations of resistin during insulin-stimulated conditions (HEC), as indicated by significant hyperinsulinemia factor ($P<0.001$), whereas the effect of insulin on resistin expression was opposite (Fig. 5E). There is a significant decrease in resistin expressions during HEC in both telmisartan and placebo (hyperinsulinemia factor $P<0.01$; Fig. 5E and F) without differences between telmisartan and placebo.

Discussion

This short-term placebo-controlled crossover study demonstrate, in accordance with other studies (25), that telmisartan decreases the fasting plasma glucose and blood pressure, whereas the insulin sensitivity assessed by hyperinsulinemic clamp technique did not change after telmisartan treatment in our study population. Thus, the decrease in blood glucose cannot be explained by the improvement in insulin sensitivity. However, we have found an increase in basal plasma IRI and this finding could partly account for the decrease in plasma glucose concentrations. Additionally, we have not found any significant effect of telmisartan on the substrate utilization.

There are still controversial results dealing with the effect of telmisartan or other ARBs on insulin sensitivity

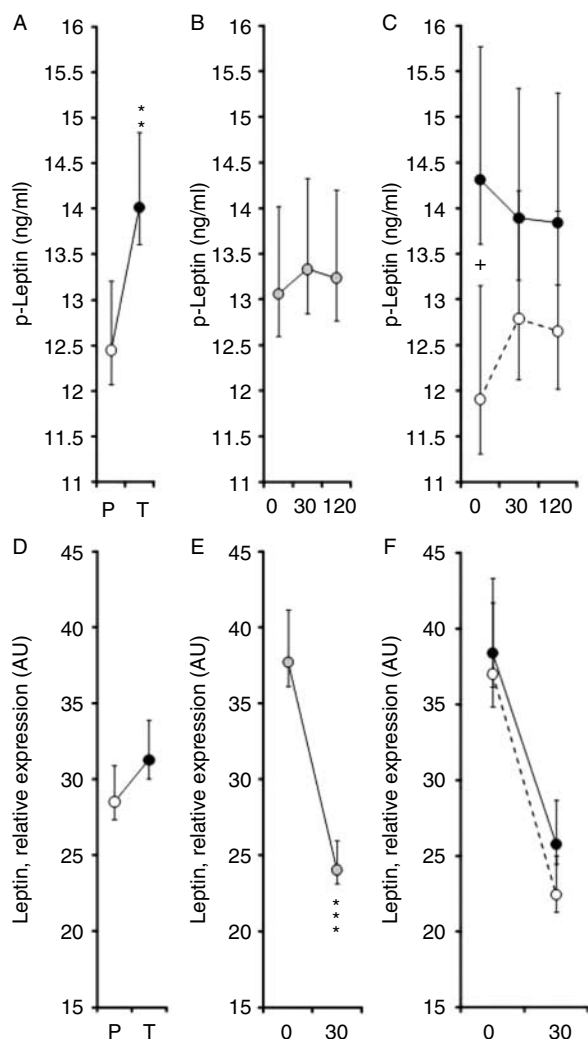


Figure 4 Effects of telmisartan treatment and the clamp-induced hyperinsulinemia on leptin. The circles with error bars symbolize the group means with their 95% confidence intervals: telmisartan (T; full circles) and placebo (P; open circles). (A and D) The effect of telmisartan is illustrated; (B and E) the effect of clamp-induced hyperinsulinemia is demonstrated; (C and F) the interactions between telmisartan and hyperinsulinemia are shown. For the plasma leptin (A–C), the significance of the factors and interactions was as follows: telmisartan: $F=7.6$, $P=0.0079$; subject (inter-individual variability): $F=35.4$, $P<0.0001$; hyperinsulinemia: $F=0.1$, $P=0.9256$; telmisartan \times hyperinsulinemia: $F=0.6$, $P=0.5664$. For the leptin expressions (D–F), the significance of the factors and interactions was as follows: telmisartan: $F=2.4$, $P=0.133$; subject (inter-individual variability): $F=4.2$, $P=0.0012$; hyperinsulinemia: $F=56.8$, $P<0.0001$; telmisartan \times hyperinsulinemia: $F=1$, $P=0.3357$. Statistical significance: ** $P<0.01$ for differences between initial and current state; *** $P<0.001$ for differences between 0 and 30 min. + $P<0.05$ for differences between telmisartan and placebo in individual stages of HEC.

in vivo in human subjects (13, 25–27). In our previous study, we did not find any significant changes in insulin sensitivity after acute administration of losartan in healthy subjects (28). Clinical trials with long-term administration of ARBs (other than telmisartan) using

the HEC technique for estimation of insulin sensitivity reported both an increase (29, 30) and no effect (5, 15, 16, 31, 32) of ARBs on glucose disposal in insulin-resistant subjects. Telmisartan is considered to be a partial PPAR γ agonist, and there is experimental evidence that it has specific metabolic advantages (18). Although telmisartan has gained much attention as one of the most metabolically potent ARB compounds, there are virtually no clinical studies evaluating the effect of telmisartan on insulin sensitivity and substrate utilization using the clamp technique combined with indirect calorimetry. However, a recent study evaluating the long-term effect of telmisartan on insulin sensitivity suggests that the magnitude of PPAR γ stimulation by telmisartan may be modest compared with thiazolidindiones (26). On the other hand, some metabolic effects of telmisartan could be mediated independently of PPAR γ (33). In addition, in a rat model of metabolic syndrome, it increases EE and protects against dietary-induced obesity (19).

In our study, we have failed to show a statistically significant effect of telmisartan on insulin sensitivity and substrate utilization, but our results might be influenced by the short period of the study and the small number of patients included. To the best of our knowledge, no previous study has carefully evaluated the effect of telmisartan on insulin sensitivity and substrate utilization using the clamp technique combined with indirect calorimetry in human subjects.

The homeostasis model assessment (HOMA) index has been used in most of them (25, 34) and, thus, our study may be the first of its kind.

Insulin secretion has not been carefully evaluated in our study, but the improvement in blood glucose level after telmisartan treatment could be related to the improvement of β -cell function. It has been shown in experimental animals that treatment with telmisartan reduces oxidative stress and protects against islet β -cell damage and dysfunction (35).

The main finding of the present study is the significant short-term effect of telmisartan on adipokine production during insulin-stimulated conditions. Adiponectin, leptin and resistin plasma concentrations increased, whereas a decrease in TNF α had been found after telmisartan treatment. We also found an increase in basal leptin concentrations. The changes in plasma adipokines could not be directly explained by changes in their expressions in SAT. The short-term effect of telmisartan on adipokines during clamp-induced hyperinsulinemia has not been investigated up to this time; only the fasting plasma concentrations or adipose tissue expressions have been reported in the literature so far.

Tumour necrosis factor α

In the present study, the telmisartan treatment was followed by a decrease in plasma TNF α concentrations during insulin-stimulated conditions.

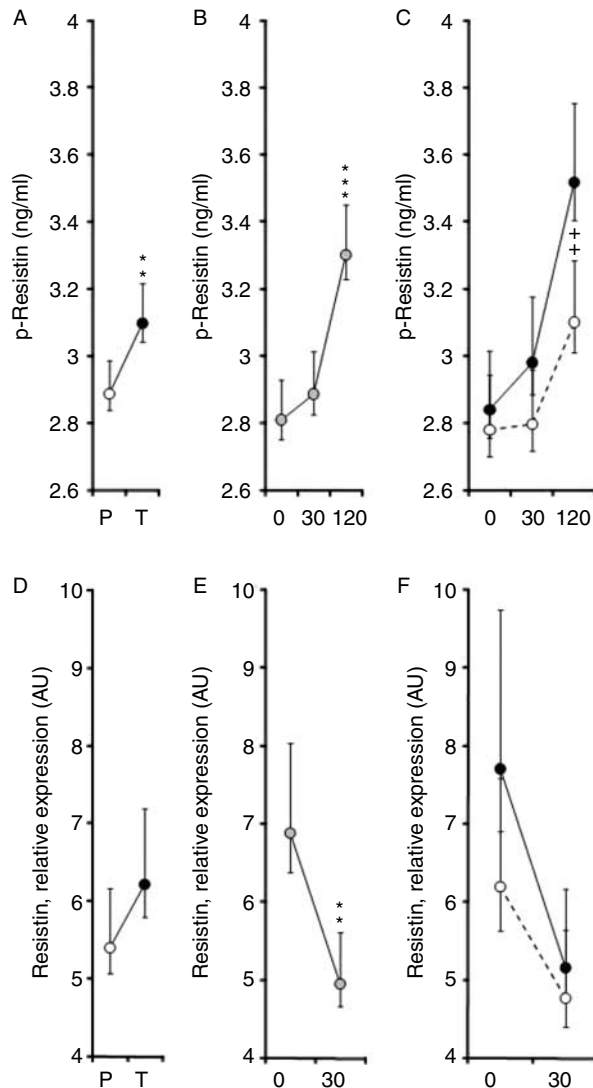


Figure 5 Effects of telmisartan treatment and the clamp-induced hyperinsulinemia on resistin. The circles with error bars symbolize the group means with their 95% confidence intervals: telmisartan (T; full circles) and placebo (P; open circles). (A and D) The effect of telmisartan is illustrated; (B and E) the effect of clamp-induced hyperinsulinemia is demonstrated; (C and F) the interactions between telmisartan and hyperinsulinemia are shown. For the p-resistin (A–C), the significance of the factors and interactions was as follows: telmisartan: $F=9$, $P=0.0043$; subject (inter-individual variability): $F=40.9$, $P<0.0001$; hyperinsulinemia: $F=18.1$, $P<0.0001$; telmisartan \times hyperinsulinemia: $F=1.6$, $P=0.2033$. For the Ex-resistin (D–F), the significance of the factors and interactions was as follows: telmisartan: $F=1.9$, $P=0.1753$; subject (inter-individual variability): $F=2.3$, $P=0.0382$; hyperinsulinemia: $F=10.5$, $P=0.0029$; telmisartan \times hyperinsulinemia: $F=0.3$, $P=0.6116$. Statistical significances: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ for differences between initial and current state; ++ $P<0.01$ for differences between telmisartan and placebo in individual stages of HEC.

The expressions of $\text{TNF}\alpha$ in subcutaneous fat declined during hyperinsulinemia but were not affected by telmisartan treatment. The results are in agreement with the decrease in fasting $\text{TNF}\alpha$ in plasma reported

after 8-month telmisartan treatment in hypertensive patients after stent implantation (36) and after 6- and 12-month administration of telmisartan in patients with metabolic syndrome (34). In addition, pro-inflammatory properties of $\text{TNF}\alpha$ could be attenuated by telmisartan. Inhibition of $\text{TNF}\alpha$ -induced IL6 expression in vascular smooth muscle cells has been reported after telmisartan treatment (37).

Adiponectin

In our study, telmisartan increased the plasma adiponectin concentrations during insulin-stimulated conditions, whereas the expressions of adiponectin in subcutaneous fat were not changed. In contrast to some (13, 27, 36, 38–40), but not all (25), previous studies, we failed to observe any stimulatory effect of telmisartan on basal plasma adiponectin concentrations. Only the trend of an increase has been found in our insulin-resistant subjects. The results could implicate the stronger metabolic effect of telmisartan during hyperinsulinemia compared to basal (pre-prandial) conditions. ARBs-induced activation of PPARG is advocated (9). However, recently, it has been showed in 3T3-L1 adipocytes that telmisartan may stimulate adiponectin gene transcription independent of PPARG (33).

Leptin

An overall increase in circulating leptin after the telmisartan treatment was documented in the present study. Telmisartan had no significant effect on leptin expressions in SAT, but the expression declined during hyperinsulinemia. The decline was independent of telmisartan treatment. In the literature, both increase (25) and decrease (34) in fasting leptin concentrations have been reported after long-term administration of telmisartan in hypertensive and type 2 diabetic patients. Moreover, the lack of effect of telmisartan on circulating leptin has been found as well (26). Telmisartan-induced increase in plasma concentrations of leptin might attenuate body weight gain by reduced food intake with HOMA-IR improvement (25). The effect of telmisartan on leptin increase could not be clarified within the context of metabolic processes in this short time study (25). However, in accordance with some authors, we have found a telmisartan-induced increase in leptin and this finding remains to be explained.

Resistin

To our surprise, in this study, an unexpected increase in plasma resistin concentration was found during hyperinsulinemia after telmisartan administration, which is a novel observation *in vivo*. In contrast, Derosa *et al.* (40) demonstrated a decrease in plasma resistin after the telmisartan treatment in type 2 diabetic patients.

However, only fasting concentrations were assessed, the treatment period was much longer (6 and 12 months), and the subjects were treated also by rosiglitazone (40). In our study, resistin expression decreased during the hyperinsulinemia independent of telmisartan treatment.

The changes in the plasma concentrations and tissue expressions of adiponectin, TNF α , leptin and resistin during hyperinsulinemia are discordant, and the expressions in SAT cannot explain the changes in circulating adipokines. This finding implicates the role of other sources of circulating adipokines – other fat depots or non-adipose sources (e.g. stromal vascular fraction of adipose tissue, macrophages or endothelium), which have not been addressed in the present study. However, the differences in the timing of blood sampling and biopsies should be considered as well.

In addition, the reduction in adipose tissue mass through weight loss in association with exercise can increase adiponectin concentrations and lower TNF α and IL6 levels in plasma, whereas drugs such as thiazolidinediones increase endogenous adiponectin production (34, 41). Body weight and exercise had been kept stable throughout our study, and the patients were not treated with oral hypoglycemic agents. Thus, we can exclude the interference of these confounding factors with effect of telmisartan.

The present study also allowed us to roughly examine the *in vivo* effect of insulin on adipokines and their expressions comparing the fasting values with insulin-stimulated conditions during clamp (hyperinsulinemia factor). Only a few studies have investigated the effect of insulin *in vivo* in human subjects. It has been shown by Westerbacka *et al.* (42) that insulin *per se* could increase the expression of a number of cytokines involved in insulin sensitivity in adipose tissue, including adiponectin and TNF α . We did not find any significant effect of acute *in vivo* hyperinsulinemia induced by clamp on plasma adiponectin, leptin or TNF α (the hyperinsulinemia factor was not significant). On the other hand, the increase in plasma resistin concentrations has been confirmed. An increase in plasma resistin during clamp-induced hyperinsulinemia was reported in our previous study in healthy subjects (28). Similarly, Heilbronn *et al.* (43) found an increase in serum resistin concentrations in response to supraphysiological doses of insulin (164 ± 5 mIU/l) in obese subjects with and without diabetes. Contrary to the result of Westerbacka *et al.* (42), the expressions of adiponectin did not change, and expressions of TNF α , leptin and resistin were even suppressed by acute hyperinsulinemia. However, the present crossover study was not designed to assess the acute effect of insulin on adipokines. The control infusion to match the volume expansion during clamp was not included. Furthermore, the biopsies were taken at 30 min of clamp – very early after starting the insulin infusion, which is also an important limitation factor of our study.

The major limitations of our study are small number of subjects and/or short study duration. We did not

measure peripheral blood flow. We could not exclude that the effect of telmisartan has been mediated through the blood flow improvement as well as blood pressure improvement both directly and indirectly. Moreover, we were not able to measure tissue protein levels of adipokines, and thus we could not exclude that telmisartan controls post-transcriptional rather than transcriptional regulation. However, we found the effect of telmisartan on the parameters mentioned earlier in spite of the short treatment period. The timing of biopsy at 30 min before equilibrium status had been achieved might have an impact on the results while assessing the acute effect of insulin when euglycemia had not been reached. The biopsy should have been more appropriately performed during the last part of the clamp after 90 min.

We can conclude that, in patients with metabolic syndrome with impaired fasting glucose, a short-term treatment with telmisartan surprisingly increases plasma adiponectin, leptin and resistin concentrations, and decreases plasma TNF α levels. These results also implicate that the effect of telmisartan could be important during hyperinsulinemia, and this is the first study dealing with positive effect of telmisartan on plasma adipokines during hyperinsulinemia in patients with impaired fasting glucose. The changes in plasma concentrations of adipokines cannot be explained by their expressions in SAT. The results support the hypothesis that the changes in selected plasma adipokines might be involved in the beneficial metabolic effects of telmisartan in patients with metabolic syndrome.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the Health Ministry of the Czech Republic (NR 9359-3, NS/10528-3 and MZO 00023001).

Acknowledgements

The authors acknowledge the skilful technical assistance of Ms Dana Lapesova and Ms Dagmar Sisakova.

References

- 1 Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S & Wedel H. Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002 **359** 995–1003. (doi:10.1016/S0140-6736(02)08089-3)
- 2 Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B & Zanchetti A. Outcomes in hypertensive patients at high

- cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* 2004 **363** 2022–2031. (doi:10.1016/S0140-6736(04)16451-9)
- 3 Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI & Cooper ME. Why blockade of the renin–angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *Journal of Hypertension* 2005 **23** 463–473. (doi:10.1097/01.hjh.0000160198.05416.72)
 - 4 Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T & Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation* 2004 **109** 2054–2057. (doi:10.1161/01.CIR.0000127955.36250.65)
 - 5 Scheen AJ. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the renin–angiotensin system. *Drugs* 2004 **64** 2537–2565. (doi:10.2165/00003495-200464220-00004)
 - 6 Staels B & Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 2005 **54** 2460–2470. (doi:10.2337/diabetes.54.8.2460)
 - 7 Furuhashi M, Ura N, Takizawa H, Yoshida D, Moniwa N, Murakami H, Higashiura K & Shimamoto K. Blockade of the renin–angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. *Journal of Hypertension* 2004 **22** 1977–1982. (doi:10.1097/00004872-200410000-00021)
 - 8 Sharma AM, Janke J, Gorzelnik K, Engeli S & Luft FC. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* 2002 **40** 609–611. (doi:10.1161/01.HYP.0000036448.44066.53)
 - 9 Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, Clemenz M, Krikov M, Thone-Reineke C, Unger T & Kintscher U. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension* 2005 **46** 137–143. (doi:10.1161/01.HYP.0000168046.19884.6a)
 - 10 Komiya N, Hirose H, Kawabe H, Itoh H & Saito I. Effects of telmisartan therapy on metabolic profiles and serum high molecular weight (HMW)-adiponectin level in Japanese male hypertensive subjects with abdominal obesity. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2009 **16** 137–142.
 - 11 Makita S, Abiko A, Naganuma Y, Moriai Y & Nakamura M. Effects of telmisartan on adiponectin levels and body weight in hypertensive patients with glucose intolerance. *Metabolism* 2008 **57** 1473–1478. (doi:10.1016/j.metabol.2008.05.019)
 - 12 Levy BI. How to explain the differences between renin–angiotensin system modulators. *American Journal of Hypertension* 2005 **9S** 134S–141S. (doi:10.1016/j.amjhyper.2005.05.005)
 - 13 Benndorf RA, Rudolph T, Appel D, Schwedhelm E, Maas R, Schulze F, Silberhorn E & Boger RH. Telmisartan improves insulin sensitivity in nondiabetic patients with essential hypertension. *Metabolism* 2006 **55** 1159–1164. (doi:10.1016/j.metabol.2006.04.013)
 - 14 Dyck DJ, Heigenhauser GJ & Bruce CR. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiologica* 2006 **186** 5–16. (doi:10.1111/j.1748-1716.2005.01502.x)
 - 15 Eriksson JW, Jansson PA, Carlberg B, Hagg A, Kurland L, Svensson MK, Ahlstrom H, Strom C, Lonn L, Ojbrandt K, Johansson L & Lind L. Hydrochlorothiazide, but not Candesartan, aggravates insulin resistance and causes visceral and hepatic fat accumulation: the mechanisms for the diabetes preventing effect of Candesartan (MEDICA) Study. *Hypertension* 2008 **52** 1030–1037. (doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119404)
 - 16 Fogari R, Derosa G, Zoppi A, Lazzari P, Corradi L, Preti P & Mugellini A. Effect of delapril/manidipine vs olmesartan/hydrochlorothiazide combination on insulin sensitivity and fibrinogen in obese hypertensive patients. *Internal Medicine* 2008 **47** 361–366. (doi:10.2169/internalmedicine.47.0449)
 - 17 Kurtz TW. New treatment strategies for patients with hypertension and insulin resistance. *American Journal of Medicine* 2006 **119** S24–S30. (doi:10.1016/j.amjmed.2006.01.011)
 - 18 Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA & Kurtz TW. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension* 2004 **43** 993–1002. (doi:10.1161/01.HYP.0000123072.34629.57)
 - 19 Sugimoto K, Kazdova L, Qi NR, Hyakukoku M, Kren V, Simakova M, Zidek V, Kurtz TW & Pravenec M. Telmisartan increases fatty acid oxidation in skeletal muscle through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma dependent pathway. *Journal of Hypertension* 2008 **26** 1209–1215. (doi:10.1097/HJH.0b013e3282f9b58a)
 - 20 Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA & Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005 **112** 2735–2752. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404)
 - 21 DeFronzo RA, Tobin JD & Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *American Journal of Physiology* 1979 **237** E214–E223.
 - 22 Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 1988 **37** 287–301. (doi:10.1016/0026-0495(88)90110-2)
 - 23 Mosca A, Goodall I, Hoshino T, Jeppsson JO, John WG, Little RR, Miedema K, Myers GL, Reinauer H, Sacks DB & Weykamp CW. Global standardization of glycated hemoglobin measurement: the position of the IFCC Working Group. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2007 **45** 1077–1080. (doi:10.1515/CCLM.2007.246)
 - 24 Tappy L, Owen OE & Boden G. Effect of hyperinsulinemia on urea pool size and substrate oxidation rates. *Diabetes* 1988 **37** 1212–1216. (doi:10.2337/diabetes.37.9.1212)
 - 25 Usui I, Fujisaka S, Yamazaki K, Takano A, Murakami S, Yamazaki Y, Urakaze M, Hachiya H, Takata M, Senda S, Iwata M, Satoh A, Sasaoka T, Ak ND, Temaru R & Kobayashi M. Telmisartan reduced blood pressure and HOMA-IR with increasing plasma leptin level in hypertensive and type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2007 **77** 210–214. (doi:10.1016/j.diabres.2006.11.014)
 - 26 Nakamura T, Kawachi K, Saito Y, Saito T, Morishita K, Hoshino J, Hosoi T, Iwasaki T, Ohyama Y & Kurabayashi M. Effects of ARB or ACE-inhibitor administration on plasma levels of aldosterone and adiponectin in hypertension. *International Heart Journal* 2009 **50** 501–512. (doi:10.1536/ihj.50.501)
 - 27 Negro R & Hassan H. The effects of telmisartan and amlodipine on metabolic parameters and blood pressure in type 2 diabetic, hypertensive patients. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2006 **7** 243–246. (doi:10.3317/jraas.2006.045)
 - 28 Krusinova E, Klementova M, Kopecky J, Wohl P, Kazdova L, Mlejnek P, Pravenec M, Hill M & Pelikanova T. Effect of acute hyperinsulinaemia with and without angiotensin II type 1 receptor blockade on resistin and adiponectin concentrations and expressions in healthy subjects. *European Journal of Endocrinology* 2007 **157** 443–449. (doi:10.1530/EJE-07-0034)
 - 29 Paolisso G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Manzella D, Gualdiro P, Varricchio G, Verza M & Varricchio M. Losartan mediated improvement in insulin action is mainly due to an increase in non-oxidative glucose metabolism and blood flow in insulin-resistant hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension* 1997 **11** 307–312. (doi:10.1038/sj.jhh.1000434)
 - 30 Furuhashi M, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida D & Shimamoto K. Blockade of the renin–angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension* 2003 **42** 76–81. (doi:10.1161/01.HYP.0000078490.59735.6E)
 - 31 Fogari R, Zoppi A, Preti P, Fogari E, Malamani G & Mugellini A. Differential effects of ACE-inhibition and angiotensin II antagonism on fibrinolysis and insulin sensitivity in hypertensive postmenopausal women. *American Journal of Hypertension* 2001 **14** 921–926. (doi:10.1016/S0895-7061(01)02140-9)
 - 32 Yavuz D, Koc M, Toprak A, Akpinar I, Velioglu A, Deyneli O, Haklar G & Akalin S. Effects of ACE inhibition and AT1-receptor antagonism on endothelial function and insulin sensitivity in essential hypertensive patients. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2003 **4** 197–203. (doi:10.3317/jraas.2003.032)

- 33 Moriuchi A, Yamasaki H, Shimamura M, Kita A, Kuwahara H, Fujishima K, Satoh T, Fukushima K, Fukushima T, Hayakawa T, Mizuguchi H, Nagayama Y, Abiru N, Kawasaki E & Eguchi K. Induction of human adiponectin gene transcription by telmisartan, angiotensin receptor blocker, independently on PPAR-gamma activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007 **356** 1024–1030. (doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.084)
- 34 Derosa G, Cicero AF, D'Angelo A, Ragonesi PD, Ciccarelli L, Piccinni MN, Pricolo F, Salvadeo SA, Ferrari I, Gravina A & Fogari R. Telmisartan and irbesartan therapy in type 2 diabetic patients treated with rosiglitazone: effects on insulin-resistance, leptin and tumor necrosis factor-alpha. *Hypertension Research* 2006 **29** 849–856. (doi:10.1291/hypres.29.849)
- 35 Hasegawa G, Fukui M, Hosoda H, Asano M, Harusato I, Tanaka M, Shiraiishi E, Senmaru T, Sakabe K, Yamasaki M, Kitawaki J, Fujinami A, Ohta M, Obayashi H & Nakamura N. Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, prevents the development of diabetes in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *European Journal of Pharmacology* 2009 **605** 164–169. (doi:10.1016/j.ejphar.2009.01.001)
- 36 Hong SJ, Shim WJ, Choi JI, Joo HJ, Shin SY, Park SM, Lim SY & Lim DS. Comparison of effects of telmisartan and valsartan on late lumen loss and inflammatory markers after sirolimus-eluting stent implantation in hypertensive patients. *American Journal of Cardiology* 2007 **100** 1625–1629. (doi:10.1016/j.amjcard.2007.06.068)
- 37 Tian Q, Miyazaki R, Ichiki T, Imayama I, Inanaga K, Ohtsubo H, Yano K, Takeda K & Sunagawa K. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 expression by telmisartan through cross-talk of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma with nuclear factor kappaB and CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Hypertension* 2009 **53** 798–804. (doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.126656)
- 38 Nagel JM, Tietz AB, Goke B & Parhofer KG. The effect of telmisartan on glucose and lipid metabolism in nondiabetic, insulin-resistant subjects. *Metabolism* 2006 **55** 1149–1154. (doi:10.1016/j.metabol.2006.04.011)
- 39 Mori Y, Itoh Y & Tajima N. Telmisartan improves lipid metabolism and adiponectin production but does not affect glycemic control in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Advances in Therapy* 2007 **24** 146–153. (doi:10.1007/BF02850002)
- 40 Derosa G, Fogari E, D'Angelo A, Cicero AF, Salvadeo SA, Ragonesi PD, Ferrari I, Gravina A, Fassi R & Fogari R. Metabolic effects of telmisartan and irbesartan in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome treated with rosiglitazone. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2007 **32** 261–268. (doi:10.1111/j.1365-2710.2007.00820.x)
- 41 Ronti T, Lupattelli G & Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology* 2006 **64** 355–365. (doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02474.x)
- 42 Westerbacka J, Corner A, Kannisto K, Kolak M, Makkonen J, Korshennikova E, Nyman T, Hamsten A, Fisher RM & Yki-Jarvinen H. Acute *in vivo* effects of insulin on gene expression in adipose tissue in insulin-resistant and insulin-sensitive subjects. *Diabetologia* 2006 **49** 132–140. (doi:10.1007/s00125-005-0075-5)
- 43 Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E & Smith SR. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 **89** 1844–1848. (doi:10.1210/jc.2003-031410)

Received 14 June 2010

Accepted 14 July 2010

CLINICAL STUDY

Effect of acute hyperinsulinaemia with and without angiotensin II type 1 receptor blockade on resistin and adiponectin concentrations and expressions in healthy subjects

E Krušinová, M Klementová, J Kopecký, P Wohl, L Kazdová, P Mlejnek¹, M Pravenec¹, M Hill² and T Pelikánová
Institute for Clinical and Experimental Medicine, Diabetes Centre, Vídeňská 1958/9, 140 21 Prague, Czech Republic, ¹Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 1 Videnska 1083, Prague 142 20, Czech Republic and ²Institute of Endocrinology, 2 Národní 8, Prague 1, CZ-116 94, Prague, Czech Republic

(Correspondence should be addressed to T Pelikánová; Email: terezie.pelikanova@medicon.cz)

Abstract

Objective: The potential insulin-sensitizing function of angiotensin II type 1 receptor blockade (ARB) with regard to selected adipokines is not fully explained so far. Our study aimed to explore the influence of acute hyperinsulinaemia and acutely induced ARB on resistin and adiponectin concentrations and expressions in healthy subjects.

Design and methods: Plasma adipokines were measured: 1) at 0, 30 and 240 min of hyperinsulinaemic (1 mU/kg per min) euglycaemic (5 mmol/l) clamp (HEC), and 2) during HEC after acute ARB (losartan 200 mg; AT-HEC) using the same protocol, in eight healthy subjects. Needle biopsy of abdominal s.c. fat was performed at 0, 30 and 240 min of both clamps to assess the adipokines' expressions.

Results: Comparing the glucose disposals of HEC and AT-HEC, no difference in insulin sensitivity was found. Plasma resistin increased equally during HEC and AT-HEC ($P < 0.05$). The expression of resistin in s.c. fat increased during HEC ($P < 0.05$), while no significant changes in expression were observed during AT-HEC. Plasma levels of adiponectin did not change during both clamps. Adiponectin expression increased during HEC ($P < 0.05$), while it did not change during AT-HEC.

Conclusions: In healthy subjects, acute hyperinsulinaemia is associated with an increase in plasma resistin independently of ARB, while plasma adiponectin is not influenced by insulin or ARB. The expressions of both resistin and adiponectin in s.c. adipose tissue are stimulated by acute hyperinsulinaemia, whereas losartan attenuates their insulin-stimulated expressions. This suggests a potential effect of losartan on adipokines' expression.

European Journal of Endocrinology 157 443–449

Introduction

Resistin is an adipocyte-secreted peptide hormone that has been proposed to link obesity with insulin resistance. It was identified as a factor impairing glucose homeostasis and inducing hepatic insulin resistance in mice (1). Recent studies in rodent models and humans show contradictory results (2–6). Mouse resistin is predominantly expressed in white adipose tissue, whereas human resistin expression in adipocytes is significantly lower and there are other important sources of resistin, e.g. mononuclear cells, endothelial, vascular smooth cells (2) or islets of Langerhans (7). The receptor for resistin, its signalling pathway, target tissues and its biological effect and regulation in human physiology have not been clearly identified up to now.

Adiponectin is an insulin-sensitizing adipokine specifically and abundantly expressed in adipose tissue (8, 9). It is present in the circulation at high concentrations in the form of different multimeric complexes, among

which the high-molecular weight (HMW) multimers exert the predominant action. Two adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, have been identified that up-regulate AMP-activated protein kinase activity. Adiponectin directly increases hepatic insulin sensitivity, promotes fuel oxidation in skeletal muscle and decreases vascular inflammation. Hypoadiponectinaemia is known to be consistently related to insulin resistance, obesity, type 2 diabetes, coronary heart disease, hypertension and atherosclerosis based on both experimental and clinical studies (10, 11). Up-regulation of adiponectin is a partial cause of the insulin-sensitizing action of thiazolidinediones.

Evidence has accumulated that insulin resistance may be improved by interrupting renin–angiotensin system (RAS). Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists are able to interfere with the adverse metabolic effects of angiotensin II on insulin signalling, tissue blood flow, oxidative stress, sympathetic activity or

adipogenesis (12, 13). The antidiabetic properties of ACE inhibitors may be largely mediated through increases in bradykinin levels, nitric oxide and the GLUT4 glucose transporter (13).

The effect of angiotensin II type 1 receptor blockade (ARB) on glucose metabolism and insulin resistance remains controversial, and the mechanisms are not fully understood. Experimental and *in vitro* studies showed that ARB may improve insulin sensitivity via decreasing adipocyte size (14), promotion of adipocyte differentiation and preventing ectopic lipid deposition (15). Several randomized, placebo-controlled studies using the HEC technique have found little positive or no effect of ARB on insulin action in rodents (16, 17) and humans (18, 19). Clinical trials using ARB have provided indirect support for the possibility that ARB *per se* might improve insulin sensitivity and decrease incidence of type 2 diabetes (LIFE, CHARM and VALUE) (20).

It has been shown that treatment with losartan does not influence plasma leptin levels (21) and that RAS blockade (22) or losartan (23) increases adiponectin levels, but the effect of losartan on expressions of adipokines in human adipose tissue under conditions of hyperinsulinaemia has not been studied yet.

The aims of our study were twofold: to determine resistin and adiponectin plasma concentrations together with their expressions in abdominal s.c. adipose tissue and also to test their responses to acutely induced hyperinsulinaemia with and without acute ARB in healthy subjects.

Subjects and methods

Subjects

We examined eight healthy men who had normal glucose tolerance (confirmed by an oral glucose tolerance test), blood pressure and serum lipids. Only male subjects participated because of the variable insulin sensitivity in women according to the menstrual cycle and with respect to sexual dimorphism of plasma adiponectin levels. Clinical and physiological characteristics of the study group are summarized in Table 1. The subjects were not taking any drugs and none had a family history of diabetes. They were euthyroid and none had a concomitant disease. Informed consent was obtained from all the individuals after the purpose, nature and potential risks of the study had been explained. The study was approved by the local ethics committee.

Study protocol

The subjects were examined on an outpatient basis, after overnight fasting with only tap water allowed *ad libitum*. They were instructed to adhere to their ordinary lifestyle, avoid any changes in food intake or alcohol

Table 1 Clinical and physiological characteristics of the study group.

<i>n</i> =8	Mean \pm s.e.m.
Age (years)	25.75 \pm 1.29
Body mass index (kg/m ²)	24.96 \pm 0.60
Waist circumference (cm)	88.50 \pm 1.78
Fasting blood glucose (mmol/l)	4.51 \pm 0.23
Blood glucose at 120 min of OGTT (mmol/l)	4.55 \pm 0.24
Fasting IRI (mIU/l)	4.15 \pm 0.91
HbA1c (%), according to IFCC	2.58 \pm 0.22
Albuminuria (μ g/min)	2.52 \pm 0.91
Creatinine (μ mol/l)	86.95 \pm 3.71
Total cholesterol (mmol/l)	4.24 \pm 0.26
Triglycerides (mmol/l)	0.87 \pm 0.11
HDL cholesterol (mmol/l)	1.45 \pm 0.12
LDL cholesterol (mmol/l)	2.48 \pm 0.20

consumption and to refrain from strenuous physical activity for a period of 24 h before the experiment. The subjects underwent two HECs at least 4 weeks apart, both taking 4 h to complete, in random order:

Study 1 The HEC was conducted as previously described (24). Briefly, a Teflon cannula (Venflon; Viggo, Helsingborg, Sweden) was inserted into an antecubital vein for the infusion of all test substances. A second cannula was inserted retrogradely into a wrist vein for blood sampling and the hand was placed in a heated (65 °C) box in order to achieve venous blood arterialization. A primed continuous insulin infusion (1 mU/kg per min of Actrapid HM (NovoNordisk, Copenhagen, Denmark) dissolved in 0.9% NaCl) was administered to acutely raise and maintain the plasma concentrations of insulin. Plasma glucose concentrations during the clamp were maintained at the 5 mmol/l level by continuous infusion of 15% glucose. To prevent hypokalaemia during insulin infusion, potassium chloride was added to the 15% glucose infusion (30 mmol/l KCl). To assess plasma levels of selected adipokines, blood samples were taken at 0, 30 and 240 min of the clamp study.

Needle biopsy of abdominal s.c. adipose tissue was performed at 0, 30 and 240 min of the clamp. Under local anaesthesia (1% trimecain in a field block pattern), an incision (3–4 mm) was made through the skin at the lower abdomen and an s.c. fat specimen (300 mg) was obtained by needle aspiration. The samples were washed in 0.9% sodium chloride solution, immediately frozen by liquid nitrogen and stored at -80 °C until used for RNA extraction.

Study 2 An identical clamp study was performed after acute ARB (AT-HEC). Losartan 2 \times 100 mg was given *per os* prior to the study (8 h and immediately prior to the clamp) and a hyperinsulinaemic (1 mU/kg per min) euglycaemic (5 mmol/l) clamp was conducted as described previously. Blood samples and adipose tissue biopsies were collected at 0, 30 and 240 min of the

clamp to determine plasma concentrations and expressions of selected adipokines.

Analytical methods

Plasma concentrations of glucose were measured using the Beckman analyzer (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) with the glucose oxidase method. Immunoreactive insulin (IRI) was determined by the RIA method using an IMMUNOTECH Insulin IRMA kit (IMMUNOTECH AS, Prague, Czech Republic) with an analytical sensitivity 0.5 μ IU/ml, and intra-assay and inter-assay coefficients of variation below or equal to 4.3 and 3.4% respectively. Glycosylated haemoglobin was measured by HPLC method using the Variant II HbA1c Program (Bio-Rad Laboratories GmbH), and for calibration, a method approved by International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine was used (25). Plasma concentrations of resistin were measured according to manufacturer's instructions by Human Resistin ELISA kit (BioVendor Lab. Med. Inc., Brno, Czech Republic; the detection limit was 0.033 ng/ml and intra-assay and inter-assay coefficients of variation are 2.8–3.4 and 5.1–6.9% respectively). For analysis of total adiponectin plasma levels, Human Adiponectin ELISA kit was used (BioVendor Lab. Med. Inc.; the detection limit was 210 ng/ml and intra-assay and inter-assay coefficients of variation are 6.4–7.0 and 7.3–8.2% respectively).

Expression of adipokines was analysed by the real-time PCR (RT-PCR) using the following protocol:

- (1) The RNA was isolated from the liquid nitrogen frozen biopsy of the human fat tissue using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit and QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). The starting amount of 100 mg tissue was excised from the biopsy, and homogenized in 1 ml QIAzol Lysis Reagent (guanidine thiocyanate–phenol solution) for 2 min. From the homogenate, the RNA was isolated by extraction on silica gel-based column, according to the kit handbook. Possible contamination of RNA with genomic DNA remains was taken off by DNase digestion (RNase-free DNase Set; Qiagen). This step is supposed to prevent any later DNA amplification. Beyond this, the denaturation curves were measured during each

reaction and there was just one product present in all the measurements.

- (2) The cDNA was synthesized using a recombinant Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen), RNase inhibitor from human placenta (Sigma) and (dT)₁₆ oligonucleotides.
- (3) RT-PCR procedure itself was carried out on the DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Waltham, MA, USA). HotStar Taq DNA polymerase and SYBR Green fluorescent dye (QuantiTect SYBR Green PCR Kit; Qiagen) were used for the RT-PCR procedure. To eliminate the influence of primer dimers, negative controls were used. To account for differences in cDNA loading, the results were expressed relative to the expression of human cyclophilin (used as a reference gene). There is no evidence of insulin or ARB influence on cyclophilin, which is a house-keeping gene encoding a cytoskeleton protein. Primers used for RT-PCR are given in Table 2.
- (4) The data were processed by Q-gene 96 software.

Calculations

Insulin action was estimated as the glucose disposal (M) calculated during the last 30 min of the clamp as the rate of glucose infusion after correction for changes in glucose pool size and urinary glucose loss. Insulin sensitivity index M/I (glucose disposal normalized by plasma insulin during steady-state period) was calculated to correct for any variations in plasma insulin.

Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm S.E.M., unless provided otherwise. Steady-state periods of both clamps were compared using Wilcoxon's paired test. The differences between time courses of both clamps were evaluated by repeated measures ANOVA model, including following factors and interactions: effects of treatment (HEC versus AT-HEC) and time (the effect of hyperinsulinaemia) as the within factors, subject factor (represents the interindividual variability of subjects) and treatment \times time interaction. The last term indicated if the shapes of the time profiles for HEC and AT-HEC were different or not. The differences between subgroups were evaluated

Table 2 Primers used for RT-PCR.

Gene	Accession number	Forward primer	Reverse primer
<i>Resistin</i>	AY207314	HRETN-F: 5'-ATA AGC AGC ATT GGC CTG G-3'	HRETN-R: 5'-TGG CAG TGA CAT GTG GTC T-3'
<i>Adiponectin</i>	XM_290602	HACRP30-F: 5'-GGT TCA ATG GCT TGT TTG C-3'	HACRP30-R: 5'-TCA TCC CAA GCT GAT TCT G-3'
<i>Cyclophilin</i>	XM_090070	HCLPNa-F: 5'-CAA ATG CTG GAC CCA ACA CA-3'	HCLPNa-R: 5'-TGC CAT CCA ACC ACT CAG TC-3'

using least significant difference multiple comparisons. A statistical significance of $P < 0.05$ was chosen for both ANOVA testing and multiple comparisons. Due to non-Gaussian data distribution in all dependent variables, the data underwent power transformations to attain distributional symmetry and a constant variance in the data as well as in residuals. The non-homogeneities were detected using residual diagnostics. The experimental points with absolute values of studentized residual (after data transformation) > 3 were excluded from the analysis. The fraction of such points never exceeded 5% of the total number. Statistical software Statgraphics Plus v. 5.1 (Manugistics; Rockville, MD, USA) was used for the data analysis.

Results

Acute ARB had no impact on diuresis, systolic and diastolic blood pressure in our study group (data not shown).

During the steady-state periods of HEC versus AT-HEC, the clamps were comparable in terms of the mean plasma glucose concentrations (4.68 ± 0.32 vs 4.75 ± 0.20 mmol/l) with coefficient of variation 3.37 ± 0.55 vs $3.42 \pm 1.87\%$. Although the mean IRI levels were different when comparing both the clamps (65.11 ± 7.53 vs 75.28 ± 6.95 $\mu\text{IU/ml}$; $P < 0.05$), the parameters of insulin sensitivity did not significantly differ between HEC and AT-HEC, being expressed as the glucose disposal (M ; 9.55 ± 0.56 vs 9.15 ± 1.68 mg/kg per min), as well as calculated as the insulin sensitivity index M/I (0.15 ± 0.01 vs 0.13 ± 0.01 mg/kg per min/ μIU per ml).

Plasma concentrations of resistin during HEC and AT-HEC are shown in Fig. 1a. The ANOVA model indicated a significant increase in plasma resistin during both clamps. The time factor was significant ($P < 0.05$), while the treatment factor as well as the interaction between the factors time and treatment were not. Despite the multiple comparisons reaching significance only for the difference between basal value and 240 min for AT-HEC ($P < 0.05$), the time trend did not significantly differ between the clamps.

Figure 1b shows relative expressions of resistin. Here, the time effect, as well as the treatment effect, was not significant. On the other hand, the shapes of the expressions' time profiles differed significantly between HEC and AT-HEC (treatment \times time interaction; $P < 0.05$): resistin expression increased during HEC, as also documented by multiple comparisons (0 vs 240 min; $P < 0.05$), while during AT-HEC the expression did not change. Moreover, at 240 min of AT-HEC, resistin expression was significantly lower when compared with HEC ($P < 0.05$ by multiple comparisons).

In plasma adiponectin, no factor or interaction reached significance (Fig. 2a). In addition, the multiple comparisons did not show any significant differences

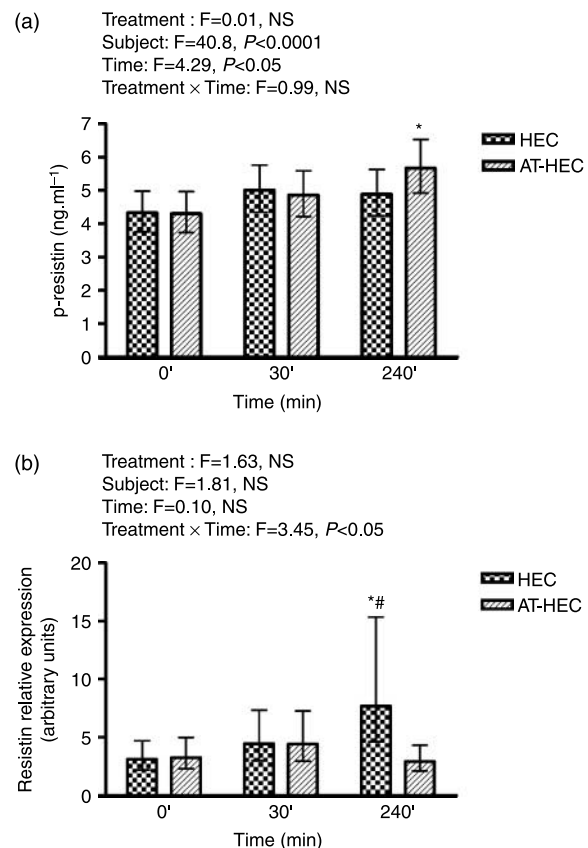


Figure 1 Resistin during HEC and AT-HEC as (a) plasma concentration and (b) relative expression levels. Data shown as retransformed means with 95% confidence intervals. F, Fisher's statistics for individual factors and interactions. * $P < 0.05$ between basal and stimulated values, # $P < 0.05$ between HEC and AT-HEC in individual stages.

between clamps for basal (0 min) or stimulated (240 min) values.

Figure 2b represents relative expressions of adiponectin. In this variable, both time and treatment effects were not significant. However, the shapes of the time profiles differed between HEC and AT-HEC (as documented by significant treatment \times time interaction; $P < 0.05$). Adiponectin expression increased during HEC, as also confirmed by multiple comparisons (0 vs 240 min; $P < 0.05$), while it did not change during AT-HEC. Multiple comparisons found no significant differences between clamps for basal (0 min), as well as stimulated (240 min) values.

Discussion

Our study shows that in healthy subjects, acute hyperinsulinaemia induces an increase in resistin plasma concentration and stimulates the expression of resistin in s.c. adipose tissue, which is a novel observation *in vivo*. Our finding is consistent with

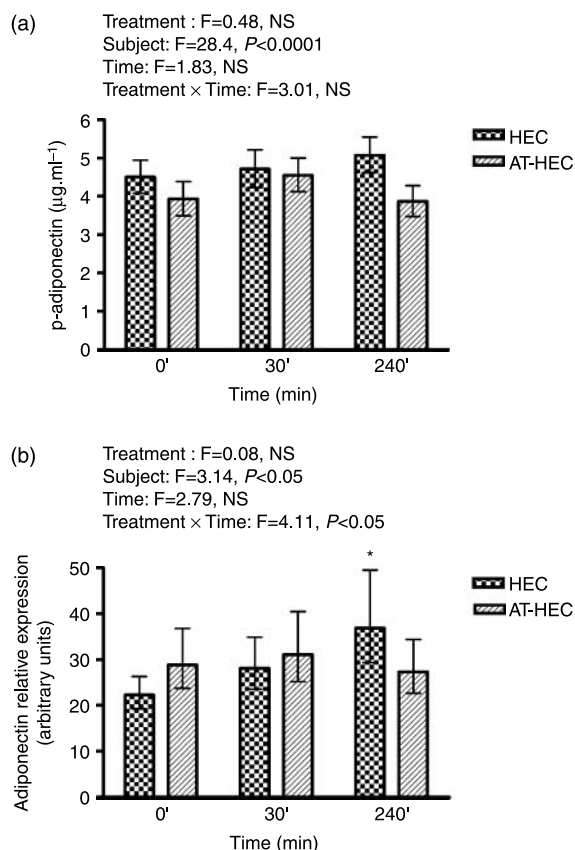


Figure 2 Adiponectin during HEC and AT-HEC as (a) plasma concentration and (b) relative expression levels. Data shown as retransformed means values with 95% confidence intervals. F, Fisher's statistics for individual factors and interactions. * $P < 0.05$ between the basal and stimulated values.

several studies in rodent models (2) or *in vitro* studies (26, 2). To the contrary, other groups showed the opposite in mice and 3T3-L1 adipocytes (2). Few studies have investigated the effect of insulin *in vivo* in humans; Heilbronn (27) observed an increase in serum resistin concentrations in response to supraphysiological doses of insulin (164 ± 5 mIU/l) in obese subjects with and without diabetes. However, clinical studies in humans do not show a consistent link between serum resistin and either insulin resistance or obesity (3–6).

In our study group, adiponectin plasma concentrations were not affected by hyperinsulinaemia, whereas its expression was stimulated by insulin. These findings are in agreement with recent evidence that circulating adiponectin *per se* is not a subject for acute regulation, but its expression seems to be regulated acutely (9), preceding thereby systemic changes. Consistent results *in vivo* were shown by Westerbacka *et al.* (28), who found an increased adiponectin expression in s.c. fat after 6 h of hyperinsulinaemia in insulin-sensitive subjects, which was not accompanied by any changes in serum levels of adiponectin. However, in the literature, a 7–8% decline

of circulating adiponectin during hyperinsulinaemia in healthy men (29–31) is reported, which is more pronounced (16–20% decrease) when a twofold higher insulin infusion rate is used (32, 33). To the contrary, other groups did not find any changes in plasma adiponectin in response to insulin (34, 35), which is in agreement with our results. The source of such discrepancies might lie partly in diverse analyses that were used or different ethnic groups that were studied (there is a broad range of reported absolute values for serum adiponectin: 2–20 µg/ml). Another point that should be specified accurately is a potential confounding factor of haemodilution during clamp. To further distinguish the regulations *in vivo*, it will be necessary to measure the adiponectin isoforms selectively, since the HMW form is known to be the most active one (8) and it correlates better with glucose disposal (36).

In accordance with previously mentioned study (28), we report an increase in adiponectin mRNA in s.c. adipose tissue in response to insulin *in vivo*. A 24-hour insulin treatment induced an increase in adiponectin mRNA in isolated human visceral adipose tissue (37), but a reduction of adiponectin expression was detected in 3T3-L1 adipocytes (38). Although the secretion of adiponectin from visceral and s.c. depots appears comparable (39), the regulations may exhibit some depot specificity (9). It will be important to further elucidate the effect of insulin on adiponectin production in different fat depots and in different stages of insulin resistance.

Acute ARB did not change the parameters of insulin sensitivity in our study group, that can be defined as insulin sensitive. Interruption of angiotensin II signalling was reached by administration of losartan 2×100 mg total, which ensured linear pharmacokinetics within the biological period of the drug (2 h) and its active metabolite (6–9 h). However, the plasma levels may not mirror effective tissue concentrations, which are crucial for potential metabolic effects. Recently, it was proved that the active losartan metabolite EXP3179 also shows a partial PPAR γ agonistic effect (40).

The effect of acute ARB on insulin sensitivity has not been studied in humans thus far; clinical trials using long-term administration of ARBs (other than telmisartan) with the HEC technique reported both increases (41, 22) and no effect (42, 43) on glucose disposal in insulin-resistant subjects. Hence, it is necessary to compare our findings in healthy controls with insulin-resistant subjects.

Independent of ARB, plasma concentrations of resistin increased during hyperinsulinaemia, and adiponectin plasma levels were not influenced. To the contrary, the insulin-stimulated expressions of resistin and adiponectin in s.c. adipose tissue were attenuated by losartan.

Our finding of increased plasma resistin in spite of decreased expression in s.c. fat implicates a role of another source of circulating resistin – a different fat depot or potential non-adipose sources (e.g. stromal vascular fraction of adipose tissue, macrophages or endothelium). Other studies in rodents and humans

(2, 5) found increased expression of resistin in visceral fat depots when compared with s.c. at basal conditions, although the source of resistin was thought to be non-adipocytes. Nevertheless, the attenuation of insulin-stimulated resistin expression following acute ARB implies a positive role of losartan in endocrine activity of adipose tissue.

An increase in circulating adiponectin after 2-month treatment with losartan in hypertensive patients has been reported (23), and there are other experimental data showing enhanced adiponectin expression in response to long-term ARB (44, 45), possibly via PPAR γ activation. All the experiments and clinical studies tested different ARB substances in different models of insulin resistance, and there is no evidence about the regulations in healthy subjects. We have observed that acute losartan administration attenuates the insulin-induced expression of adiponectin. This unexpected trend in adiponectin expression should be proven in long-term treatment to distinguish acute and long-term regulations *in vivo*. However, the limited sample size of our study should be considered as well. Further studies are needed to support the hypothesis that losartan exerts its positive effects on insulin sensitivity through other mechanisms than stimulation of adiponectin.

Recently, it was proven that the beneficial metabolic effect of ARB goes beyond simple interruption of RAS (12). Our results suggest potential effects of losartan on resistin and adiponectin expression that might influence further metabolic or proinflammatory factors.

Paradoxically, higher insulin plasma levels were detected in the steady-state period of AT-HEC when compared with HEC. There were no changes in body weight between the clamps, and therefore, the insulin infusion rates were comparable for both clamps. Higher insulin levels after losartan administration cannot be explained by involvement of insulin secretion, because angiotensin II receptor activation, not inhibition, was shown to stimulate insulin secretion (46). Impairment of insulin clearance in liver by ARB cannot be excluded, but there is no corresponding data available. However, the beneficial effects of losartan in our study were seen despite higher insulin levels.

We can conclude that in healthy subjects, acute hyperinsulinaemia stimulates an increase in plasma concentration and expression of resistin in s.c. adipose tissue. While the ARB does not modify the insulin-induced changes in plasma resistin, it attenuates the response of resistin expression in adipose tissue. Acute hyperinsulinaemia is associated with an increase in adiponectin expression, but not in its plasma levels. Losartan reduces the insulin-stimulated expression of adiponectin.

These findings have to be further investigated in larger cohorts in comparison with insulin-resistant subjects, by short- or long-term ARB administration, together with analysis of non-adipose sources of resistin.

Acknowledgements

We thank the skilful technical assistance of Ms Dana Lapesova and Ms Dagmar Sisakova. This study was supported by grant from the Health Ministry of the Czech Republic (project no. NR/8821-3).

References

- 1 Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001 **409** 307–312.
- 2 Stepan CM & Lazar MA. The current biology of resistin. *Journal of Internal Medicine* 2004 **255** 439–447.
- 3 Yu YH & Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circulation Research* 2005 **96** 1042–1052.
- 4 Arner P. Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia* 2005 **48** 2203–2205.
- 5 Kershaw EE & Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 **89** 2548–2556.
- 6 Menzaghi C, Coco A, Salvemini L, Thompson R, De Cosmo S, Doria A & Trischitta V. Heritability of serum resistin and its genetic correlation with insulin resistance-related features in nondiabetic Caucasians. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 2792–2795.
- 7 Minn AH, Patterson NB, Pack S, Hoffmann SC, Gavrilova O, Vinson C, Harlan DM & Shalev A. Resistin is expressed in pancreatic islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003 **310** 641–645.
- 8 Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K & Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 2006 **116** 1784–1792.
- 9 Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA & Prins JB. Adiponectin—a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2006 **8** 264–280.
- 10 Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Letters* 2006 **580** 2917–2921.
- 11 Berg AH & Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation Research* 2005 **96** 939–949.
- 12 Kurtz TW & Pravenec M. Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists: beyond the renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension* 2004 **22** 2253–2261.
- 13 Scheen AJ. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. *Diabetes & Metabolism* 2004 **30** 498–505.
- 14 Furuhashi M, Ura N, Takizawa H, Yoshida D, Moniwa N, Murakami H, Higashiura K & Shimamoto K. Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. *Journal of Hypertension* 2004 **22** 1977–1982.
- 15 Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S & Luft FC. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension* 2002 **40** 609–611.
- 16 Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK & Krekler M. Selective angiotensin II receptor antagonist reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension* 2001 **38** 884–890.
- 17 Wang CH, Leung N, Lapointe N, Szeto L, Uffelman KD, Giacca A, Rouleau JL & Lewis GF. Vasopeptidase inhibitor omapatrilat induces profound insulin sensitization and increases myocardial glucose uptake in Zucker fatty rats: studies comparing a vasopeptidase inhibitor, angiotensin-converting enzyme inhibitor, and angiotensin II type I receptor blocker. *Circulation* 2003 **107** 1923–1929.

- 18 Nielsen S, Hove KY, Døllerup J, Poulsen PL, Christiansen JS, Schmitz O & Mogensen CE. Losartan modifies glomerular hyperfiltration and insulin sensitivity in type 1 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2001 **3** 463–471.
- 19 Fishman S, Rapoport MJ, Weissgarten J, Zaidenstein R, Dishy V, Hartzeanu I & Golik A. The effect of Losartan on insulin resistance and beta cell function in chronic hemodialysis patients. *Renal Failure* 2001 **23** 685–692.
- 20 Scheen AJ. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 1. A meta-analysis of randomised clinical trials. *Diabetes and Metabolism* 2004 **30** 487–496.
- 21 Sonmez A, Kisa U, Uckaya G, Eyleten T, Comert B, Koc B, Kocabalkan F & Ozata M. Effects of losartan treatment on T-cell activities and plasma leptin concentrations in primary hypertension. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2001 **2** 112–116.
- 22 Furuhashi M, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Tanaka M, Moniwa N, Yoshida D & Shimamoto K. Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension* 2003 **42** 76–81.
- 23 Koh KK, Quon MJ, Han SH, Chung WJ, Ahn JY, Seo YH, Kang MH, Ahn TH, Choi IS & Shin EK. Additive beneficial effects of losartan combined with simvastatin in the treatment of hypercholesterolemic, hypertensive patients. *Circulation* 2004 **110** 3687–3692.
- 24 Pelikanova T, Smrckova I, Krizova J, Stribrna J & Lanska V. Effects of insulin and lipid emulsion on renal haemodynamics and renal sodium handling in IDDM patients. *Diabetologia* 1996 **39** 1074–1082.
- 25 Goodall I. HbA1c standardisation destination—global IFCC Standardisation. How, why, where and when—a tortuous pathway from kit manufacturers, via inter-laboratory lyophilized and whole blood comparisons to designated national comparison schemes. *Clinical Biochemist. Reviews* 2005 **26** 5–19.
- 26 McTernan PG, Fisher FM, Valsamakis G, Chetty R, Harte A, McTernan CL, Clark PM, Smith SA, Barnett AH & Kumar S. Resistin and type 2 diabetes: regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003 **88** 6098–6106.
- 27 Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E & Smith SR. Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 **89** 1844–1848.
- 28 Westerbacka J, Corner A, Kannisto K, Kolak M, Makkonen J, Korshennikova E, Nyman T, Hamsten A, Fisher RM & Yki-Jarvinen H. Acute *in vivo* effects of insulin on gene expression in adipose tissue in insulin-resistant and insulin-sensitive subjects. *Diabetologia* 2006 **49** 132–140.
- 29 Hojlund K, Frystyk J, Levin K, Flyvbjerg A, Wojtaszewski JF & Beck-Nielsen H. Reduced plasma adiponectin concentrations may contribute to impaired insulin activation of glycogen synthase in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006 **49** 1283–1291.
- 30 Mohlig M, Wegewitz U, Osterhoff M, Isken F, Ristow M, Pfeiffer AF & Spranger J. Insulin decreases human adiponectin plasma levels. *Hormone and Metabolic Research* 2002 **34** 655–658.
- 31 Brame LA, Considine RV, Yamauchi M, Baron AD & Mather KJ. Insulin and endothelin in the acute regulation of adiponectin *in vivo* in humans. *Obesity Research* 2005 **13** 582–588.
- 32 Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M & Olefsky JM. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002 **51** 2968–2974.
- 33 Koistinen HA, Remitz A, Koivisto VA & Ebeling P. Paradoxical rise in serum adiponectin concentration in the face of acid-induced insulin resistance 13-*cis*-retinoic. *Diabetologia* 2006 **49** 383–386.
- 34 Dullaart RP, Riemens SC, Meinardi JR, Wolffenbuttel BH & Sluiter WJ. Plasma adiponectin is modestly decreased during 24-hour insulin infusion but not after inhibition of lipolysis by Acipimox. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2005 **65** 523–531.
- 35 Heliovaara MK, Strandberg TE, Karonen SL & Ebeling P. Association of serum adiponectin concentration to lipid and glucose metabolism in healthy humans. *Hormone and Metabolic Research* 2006 **38** 336–340.
- 36 Fisher FF, Trujillo ME, Hanif W, Barnett AH, McTernan PG, Scherer PE & Kumar S. Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia* 2005 **48** 1084–1087.
- 37 Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y & Brichard SM. Secretion of adiponectin and regulation of *apM1* gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001 **288** 1102–1107.
- 38 Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M & Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002 **290** 1084–1089.
- 39 Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P & Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004 **145** 2273–2282.
- 40 Schupp M, Lee LD, Frost N, Umbreen S, Schmidt B, Unger T & Kintscher U. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by losartan metabolites. *Hypertension* 2006 **47** 586–589.
- 41 Paolisso G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Manzella D, Gualdiero P, Varricchio G, Verza M & Varricchio M. Losartan mediated improvement in insulin action is mainly due to an increase in non-oxidative glucose metabolism and blood flow in insulin-resistant hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension* 1997 **11** 307–312.
- 42 Fogari R, Zoppi A, Preti P, Fogari E, Malamani G & Mugellini A. Differential effects of ACE-inhibition and angiotensin II antagonism on fibrinolysis and insulin sensitivity in hypertensive postmenopausal women. *American Journal of Hypertension* 2001 **14** 921–926.
- 43 Yavuz D, Koc M, Toprak A, Akpınar I, Velioglu A, Deyneli O, Haklar G & Akalin S. Effects of ACE inhibition and AT1-receptor antagonism on endothelial function and insulin sensitivity in essential hypertensive patients. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2003 **4** 197–203.
- 44 Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, Clemenz M, Krikov M, Thone-Reineke C, Unger T & Kintscher U. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension* 2005 **46** 137–143.
- 45 Zorad S, Dou JT, Benicky J, Hutanu D, Tybitanclova K, Zhou J & Saavedra JM. Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *European Journal of Pharmacology* 2006 **552** 112–122.
- 46 Ramracheya RD, Muller DS, Wu Y, Whitehouse BJ, Huang GC, Amiel SA, Karalliedde J, Viberti G, Jones PM & Persaud SJ. Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans. *Diabetologia* 2006 **49** 321–331.

Received 19 January 2007

Accepted 13 July 2007

Activation of α_2 -adrenergic receptors blunts epinephrine-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue during a hyperinsulinemic euglycemic clamp in men

Vladimir Stich,¹ Tereza Pelikanova,² Petr Wohl,² Coralie Sengenès,³ Alexia Zakaroff-Girard,³ Max Lafontan,³ and Michel Berlan^{3,4}

¹Department of Sports Medicine, Third Faculty of Medicine, Charles University, ²Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic; ³Obesity Research Unit, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 586, and ⁴Department of Medical and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, 31073 Toulouse, France

Submitted 14 November 2002; accepted in final form 21 May 2003

Stich, Vladimir, Tereza Pelikanova, Petr Wohl, Coralie Sengenès, Alexia Zakaroff-Girard, Max Lafontan, and Michel Berlan. Activation of α_2 -adrenergic receptors blunts epinephrine-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue during a hyperinsulinemic euglycemic clamp in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E599–E607, 2003; 10.1152/ajpendo.00502.2002.—The aim of this study was to investigate whether hyperinsulinemia modifies adrenergic control of lipolysis, with particular attention paid to the involvement of antilipolytic α_2 -adrenergic receptors (AR). Eight healthy male subjects (age: 23.9 ± 0.9 yr; body mass index: 23.8 ± 1.9) were investigated during a 6-h euglycemic-hyperinsulinemic clamp and in control conditions. Before and during the clamp, the effect of graded perfusions of isoproterenol (0.1 and 1 μ M) or epinephrine (1 and 10 μ M) on the extracellular glycerol concentration in subcutaneous abdominal adipose tissue was evaluated by using the microdialysis method. Both isoproterenol and epinephrine induced a dose-dependent increase in extracellular glycerol concentration when infused for 60 min through the microdialysis probes before and during *hours* 3 and 6 of the clamp. The catecholamine-induced increase was significantly lower during the clamp than before it, with the inhibition being more pronounced in *hour* 6 of the clamp. Isoproterenol (1 μ M)-induced lipolysis was reduced by 28 and 44% during *hours* 3 and 6 of the clamp, respectively, whereas the reduction of epinephrine (100 μ M)-induced lipolysis was significantly greater (by 63 and 70%, $P < 0.01$ and $P < 0.04$, respectively) during the same time intervals. When epinephrine was infused in combination with 100 μ M phentolamine (a nonselective α -AR antagonist), the inhibition of epinephrine (10 μ M)-induced lipolysis was only of 19 and 40% during *hours* 3 and 6 of the clamp, respectively. The results demonstrate that, in situ, insulin counteracts the epinephrine-induced lipolysis in adipose tissue. The effect involves 1) reduction of lipolysis stimulation mediated by the β -adrenergic pathway and 2) the antilipolytic component of epinephrine action mediated by α_2 -ARs.

microdialysis; glycerol; isoproterenol; blood flow; α_2 -adrenergic receptor antagonist

NOREPINEPHRINE AND EPINEPHRINE control human adipocyte lipolysis through different adrenergic receptor (AR) subtypes (1, 7, 20, 30). In vitro studies in isolated human fat cells have shown that the activation of α_2 -ARs by epinephrine and norepinephrine impairs the β -adrenergic component of catecholamine-induced lipolysis (19, 20). In human fat cells, where α_2 -ARs outnumber β -ARs, the preferential recruitment of the α_2 -AR at the lowest catecholamine concentrations inhibits lipolysis (20). It is in subcutaneous adipose tissue from both men and women that the strongest α_2 -adrenergic effect has been observed (20, 30). The antilipolytic action of catecholamines in vitro, particularly that of epinephrine (which exhibits a higher affinity for α_2 -AR), is intense in subcutaneous adipocytes from obese subjects (20, 30). Many physiological and pathological studies have shown that the possible deregulation of adrenergic control in adipose tissue lipolysis in obese subjects is linked to an alteration of the β -adrenergic pathway. Although less investigated, the α_2 -AR has been shown to contribute to the lipolysis dysfunction. Using microdialysis, we have shown that exercise-induced lipolysis in subcutaneous abdominal adipose tissue (SCAAT) was five- to sixfold lower in obese than in lean subjects. The α_2 -AR contributes to this response, since the local lipolysis in SCAAT was strongly enhanced in the obese subjects and reached the levels found in lean subjects when the α_2 -ARs were blocked by a suitable antagonist (21).

Adipose tissue is also a major target for insulin action. Unlike catecholamines, insulin inhibits lipolysis and counteracts the action of β -AR by activating phosphodiesterase 3B, which hydrolyses cAMP (22, 25, 27), and by desensitizing the β -adrenergic responsiveness (3). Microdialysis allows the in situ study of the interaction of insulin with adrenergic pathways in adipose tissue. Catecholamines can be delivered through microdialysis probes and induce lipolysis stimulation in adipose tissue with no effect on the circulating

Address for reprint requests and other correspondence: M. Berlan, INSERM U 586, Laboratoire de Pharmacologie Médicale et Clinique, Faculté de Médecine, 37 Allées Jules Guesde, 31073 Toulouse cedex, France (E-mail: berlan@cict.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

concentration of the catecholamines. Simultaneously, insulin can be delivered intravenously during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp with no changes of catecholamine concentration in plasma or in dialysate from adipose tissue or muscle (23, 26). Animal studies have shown a decrease of the lipolytic response to norepinephrine during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp in adipose tissue (8). From additional human investigations, it has been concluded that the β -adrenergic lipolytic effect in adipose tissue is counteracted by the action of insulin (14, 18). Until now, no study has taken into account the role of the antilipolytic α_2 -adrenergic pathway in the in situ adrenergic response when plasma insulin levels are increased.

The first objective of the present study on the basis of in situ microdialysis use was to investigate the counteraction of hyperinsulinemia on the lipolytic effect of isoproterenol (a selective β -AR agonist) or epinephrine (a catecholamine exhibiting both α_2 - and β -AR agonist properties) in adipose tissue. The second objective was to delineate the contribution of the antilipolytic α_2 -AR pathway to the blunted adrenergic lipolytic response in adipose tissue during hyperinsulinemic-euglycemic clamp.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

For the study, eight healthy young men aged 23.9 ± 0.9 yr (range: 22–25 yr) with a body mass index ranging from 21.4 to 27.0 (mean \pm SD: 23.8 ± 1.9), who had not been submitted to any pharmacological or nutritional protocol before the study, were recruited. All had a stable weight during the previous 3 mo. Selection of the subjects was based on a screening evaluation of detailed medical history, a physical examination, and several blood chemistry analyses. The Ethical Committee of Third Faculty of Medicine, Charles University, approved the study. All subjects gave their informed consent for the experimental conditions after detailed explanation. The investigations were carried out in the Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

Experimental Protocol

Studies were performed in random order, and the eight subjects were studied on three separate occasions (twice with a clamp and once without). These three examinations were separated by a 5- to 8-day period, and patients were instructed to keep their nutritional and physical activity habits during that time. The subjects entered the hospital at 8:00 AM and were maintained in the supine position during the experimental period. An indwelling polyethylene catheter was inserted into the antecubital vein of each arm. At 8:30 AM, microdialysis probes (Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden) of 20×0.5 mm and 20,000-MW cutoff were inserted percutaneously into the abdominal SCAAT after epidermal anesthesia (200 μ l of 1% lidocaine; Roger-Bellon, Neuilly-s-Seine, France). When two probes were used, they were separated by at least 10 cm and inserted at a distance of 10 cm to the right of the umbilicus. When necessary, a third control probe was inserted in the contralateral side at a similar distance from umbilicus. The probes were connected to a microperfusion pump (Harvard Apparatus, SARL, Les Ulis, France) and infused with Ringer solution (in mM: 139 sodium, 2.7 potassium, 0.9 calcium, 140.5 chloride, 2.4 bicar-

bonate, and 5.6 glucose). Ethanol was added to the perfusate to estimate changes in the blood flow, as previously described (12, 13). The ethanol ratio was calculated as ethanol ratio (%) = (ethanol concentration in outgoing dialysate/ethanol concentration in ingoing perfusate) \times 100. The variations of the ethanol ratio were taken as an index of variations of adipose tissue blood flow (ATBF). After a 30-min equilibration period, a 30-min fraction of dialysate was collected at a flow rate of 0.5 μ l/min. Then, the perfusion flow rate was set at 2.5 μ l/min for the remaining experimental period. This simplified but relevant and less time-consuming method was selected in this long-lasting study (24, 30). The estimated extracellular glycerol concentration (EGC) was calculated by plotting (after log transformation) the concentration of glycerol in the dialysate measured at 0.5 and 2.5 μ l/min against the perfusion rates. The EGC found in the present study fits with previous determinations performed in lean subjects (16, 17). The average recovery of probes was calculated as the ratio of the concentration of glycerol in dialysate at the perfusion rate of 2.5 μ l/min and the calculated EGC. The mean recovery was $29 \pm 3\%$ (SD), and the range was from 27 to 33%.

Study 1. After calibration of the probe, two 15-min fractions of the outgoing dialysate were collected in all probes. Thereafter, one probe was infused with two graded epinephrine concentrations (1 and 10 μ M in Ringer solution) for 30 min each, and a second probe was infused with two graded isoproterenol concentrations (0.1 and 1 μ M in Ringer solution) for 30 min each. The concentrations of isoproterenol used were 10-fold lower than those of epinephrine because this agonist is 10-fold more potent than epinephrine toward β -AR. A third probe was infused with Ringer solution throughout the whole experimental period. After the end of the above-mentioned perfusions, a hyperinsulinemic-euglycemic clamp was started and performed for 6 h. During hours 3 and 6 of the clamp, the perfusions using epinephrine (*probe 1*) and isoproterenol (*probe 2*) were performed with identical concentrations to those before the clamp. During the time between the above-mentioned perfusions, the probes were infused with Ringer solution. Dialysate samples were collected for each 10-min period during the specific agent perfusions and for each 15 min during the rest of the time.

Study 2. The experimental protocol was identical to that of *study 1*, except that, in *probe 2*, the graded concentrations of epinephrine (1 and 10 μ M, i.e., the same concentrations as in *probe 1*) were infused each for 30 min with 100 μ M phentolamine.

Control study (8 subjects). One probe was inserted into SCAAT, and the repeated perfusions, which used the same concentrations of epinephrine and the same time schedule as those described in the experimental protocol, were performed, except that the hyperinsulinemic-euglycemic clamp was not realized (Fig. 1). Control assays were also performed with phentolamine in combination with epinephrine without insulin administration in six subjects.

Euglycemic-Hyperinsulinemic Clamp

The hyperinsulinemic-euglycemic clamp was performed by DeFronzo's method (9). A catheter for insulin and glucose infusion was inserted into an antecubital vein, and a second catheter for blood sampling was placed in a dorsal vein of the ipsilateral hand. The hand was kept in a warm box (60°C) to provide arterIALIZATION of venous blood. Priming plus continuous infusion of crystalline human insulin (1 mU \cdot kg $^{-1}$ \cdot min $^{-1}$; Actrapid Human, Novo, Bagsvaerd, Denmark) was given for 6 h. Euglycemia (the fasting blood glucose concen-

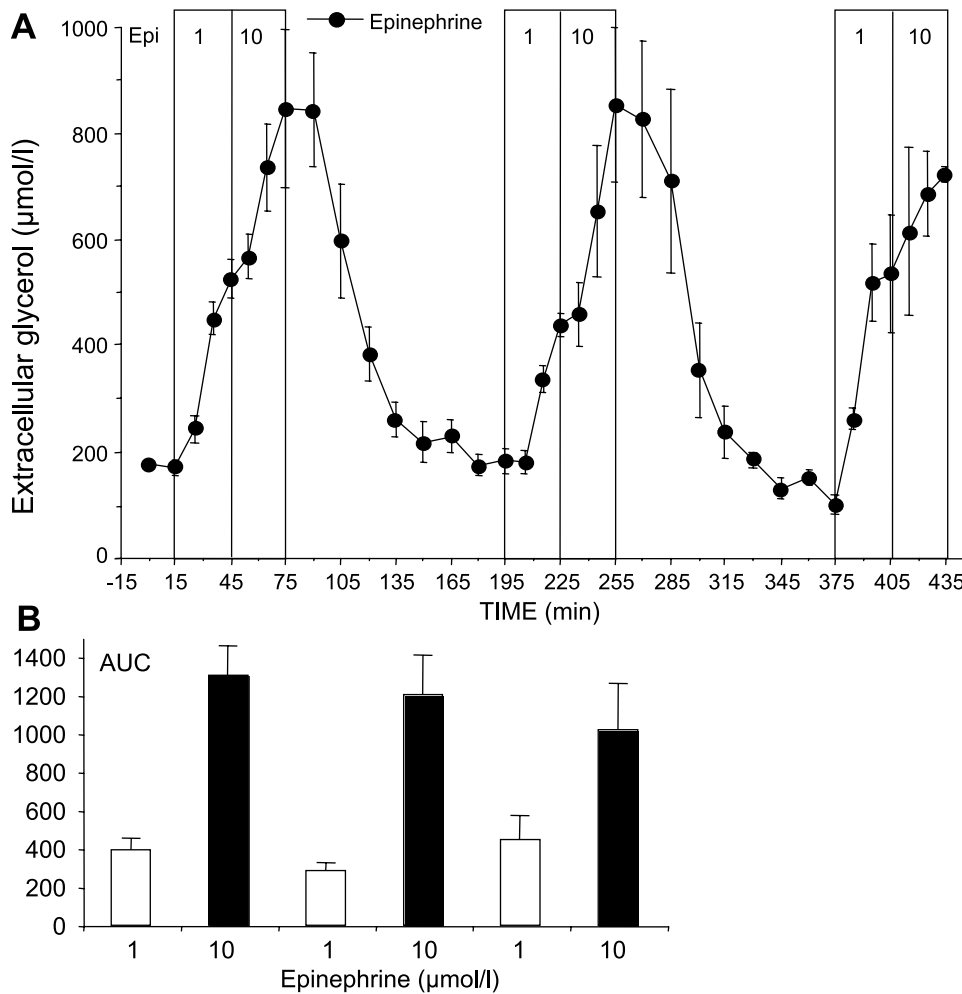


Fig. 1. In situ effects of 3 successive perfusions of graded concentrations of epinephrine (Epi; 1 and 10 μM) on extracellular glycerol concentration (EGC) in subcutaneous abdominal adipose tissue. Epi perfusion was applied through the microdialysis probes at each concentration for 30 min, and dialysate samples were collected for each 10-min period. The successive graded Epi perfusions were separated by 2 h, and dialysate samples were collected for each 15-min period. A: absolute values of EGC. B: area under curves (AUC; μM/30 min) of the variation of the EGC induced by Epi perfusion. Values are means ± SE.

tration: 4.34 ± 0.07 mM) was maintained by a variable 15% glucose perfusion. The perfusion rate was determined by measurement of arterialized plasma glucose (Beckman Glucose Analyzer, Beckman Instruments, Fullerton, CA) every 5 min. Plasma concentrations of glucose, glycerol, and free insulin were analyzed in the basal state (mean value of 3 samples obtained 70, 65, and 60 min before the start of the clamp) and every 60 min during the clamp.

Drugs and Biochemical Determinations

The following drugs were used: isoproterenol hydrochloride (Isuprel, Winthrop), epinephrine hydrochloride (Epinephrine, Braun), and phentolamine methanesulfonate (Regitine, Ciba-Geigy, Rueil-Malmaison, France). Ethanol in dialysate and perfusate was determined with an enzymatic method (5); the intra-assay and interassay variabilities were 3.0 and 4.5%, respectively. Glycerol was determined in plasma and in dialysate by using an ultrasensitive radiometric method (6); the intra-assay and interassay variabilities were 5.0 and 9.2%, respectively. Plasma glucose was assayed with a glucose oxidase technique (Biotrol, Paris, France); the intra-assay and interassay variabilities were 1.5 and 5.1%, respectively. Nonesterified fatty acids were assayed with an enzymatic method (Unipath, Dardilly, France); the intra-assay and interassay variabilities were 1.1 and 1.6%, respectively. Plasma insulin was measured by using an Immuno-tech Insulin IRMA kit (Immunotech, Prague, Czech Repub-

lic); the intra-assay and interassay variabilities were 2.7 and 5.8%, respectively.

Data Analysis

All values are given as means ± SE. A statistical comparison of the values was performed by using two-way ANOVA for repeated measures with experimental conditions (control vs. euglycemic-hyperinsulinemic clamp) as factors of the analysis. Subsequently, the effects of drug perfusions were analyzed in each experimental condition by using two-way ANOVA with time as the factor of the analysis and followed by a Bonferroni-Dunnnett post hoc test. The extracellular response curves were analyzed by using a paired *t*-test on the total integrated changes over baseline values [area under the curves (AUC)] by using the trapezoidal method. Values were considered statistically significant when *P* < 0.05. Statistical analyses were performed by using software packages (Statview 4.5 and SuperAnova 1.11, Abacus Concepts, Berkeley, CA).

RESULTS

The fasting plasma free insulin concentration was 6.2 ± 1.2 mU/l. Insulin infusion induced a steady-state insulin level of 83.5 ± 1.4 mU/l that remained stable during the time of the clamp with an average individual insulin level variation being 5.0 ± 2.0%. The fast-

ing arterial plasma glucose level was 4.34 ± 0.07 mM. The subjects were clamped at their individual fasting glucose levels. The coefficients of variation for the glucose levels during *hours 3* and *6* of the clamp were 4.36 ± 0.45 and $2.30 \pm 0.47\%$, respectively. The glucose consumptions were calculated from the exogenous glucose infusion rates during *hours 3* and *6* of the clamp, and the values were 9.44 ± 0.39 and 10.21 ± 0.26 mg \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹, respectively.

Lipolytic Response to Graded Epinephrine Perfusion in Subcutaneous Adipose Tissue: Control Study

After calibration of the probes, the two basal values of the EGC were similar. Addition of epinephrine to the perfusate caused a rapid dose-dependent increase in the EGC (Fig. 1). As soon as epinephrine was removed from the perfusate, EGC progressively decreased and returned to preperfusion values within 90 min. In the control investigation, i.e., without euglycemic-hyperinsulinemic clamp, the three successive epinephrine perfusion procedures at the two concentrations led to increases in EGC that were not different (Fig. 1A). The calculated AUC values were not significantly different among the three successive perfusions regardless of the epinephrine concentration used (Fig. 1B). Blood samples were taken before the start of each local perfusion for plasma glycerol concentration determination. No significant differences were found among the three values (48.4 ± 11.4 , 48.0 ± 15.1 , and 65.7 ± 11.4 μ M, respectively). In six subjects, addition of phentolamine into the perfusate did not significantly modify the maximal increase of EGC in response to epinephrine perfusion during all three perfusions mentioned above (not shown).

Lipolytic Response to Graded Epinephrine or Isoproterenol Perfusion in Subcutaneous Adipose Tissue During Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamp: Study 1

Immediately after the end of the first two graded epinephrine or isoproterenol perfusions in the probes, the hyperinsulinemic-euglycemic clamp was started. Before the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, perfusion with addition of 1 and 10 μ M epinephrine promoted an EGC increase (Fig. 2). Identical epinephrine perfusion during *hour 3* of the clamp induced an EGC increase that was markedly lower ($P = 0.05$) than that before the clamp (Fig. 2A). Finally, the reduction of the epinephrine-induced increase in EGC was even more pronounced during *hour 6* of the clamp ($P < 0.05$; Fig. 2B). From the calculated AUC values, it appeared that the effect of 1 and 10 μ M epinephrine perfusion was reduced by 72 and 63%, respectively, during *hour 3* of the clamp and by 81 and 70% during *hour 6* of the clamp.

In the same protocol, graded concentrations of isoproterenol (0.1 and 1 μ M) were infused in the second probe at the same time intervals (Fig. 2). Before the clamp, isoproterenol induced an increase in the EGC values. The maximal EGC values were close to those observed with the 10-fold higher concentration of epi-

nephrine. During *hour 3* of the clamp, isoproterenol-induced EGC increase was lower than before the clamp ($P < 0.05$). Finally, the reduction of the isoproterenol-induced increase in EGC was more pronounced during *hour 6* of the clamp ($P < 0.05$). When the calculated AUC values were used (Fig. 2B), the effect of the 0.1 and 1 μ M isoproterenol perfusion was reduced by 41 and 28%, respectively, during *hour 3* of the clamp and by 48 and 44%, respectively, during *hour 6* of the clamp. The reductions of the isoproterenol-induced increases in EGC were lower when compared with the reductions for epinephrine-induced increases at the same time interval: the effect of 0.1 μ M isoproterenol was compared with that of 1 μ M epinephrine ($P < 0.05$ at *hour 3* and $P < 0.01$ at *hour 6*) and that of 1 μ M isoproterenol with 10 μ M epinephrine ($P < 0.01$ at *hour 3* and $P < 0.04$ at *hour 6*).

Comparison of the Lipolytic Response to Graded Perfusion of Epinephrine Alone or Associated with Phentolamine During Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamp: Study 2

Two probes were used; both were supplemented with epinephrine solutions that were identical in concentrations and time schedule of administration to those of study, but in *probe 2*, 100 μ M phentolamine was added to all the epinephrine solutions. Before the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, addition of phentolamine into the perfusate did not significantly modify the maximal increase of EGC in response to epinephrine perfusion (Fig. 3). During *hour 3* of the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, the epinephrine perfusion resulted in a markedly decreased response when compared with that before the clamp. During the same time, the reduction of the lipolytic response was lower in the phentolamine-containing probe. The same situation also occurred during *hour 6* of the clamp. When the responses were evaluated by using AUC (Fig. 3B), it appeared that, during *hour 3* of the clamp, the epinephrine effect was reduced by 67 and 59% in the probe containing 1 and 10 μ M epinephrine, respectively. It was less reduced by 35 and 47% in the probe containing the phentolamine in addition to epinephrine. The difference between the responses in the two probes was significant. The same difference was shown during *hour 6* of the clamp, where the effect of the sole epinephrine perfusion was reduced by 75 and 67% and the effect in the phentolamine-containing probe was reduced by only 19 and 40%, respectively. The difference between the responses in the two probes remained significant. Thus, during the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, the responses of EGCs to epinephrine perfusion were significantly less reduced in the presence of phentolamine than in control probes containing epinephrine alone.

Extracellular and Plasma Glycerol Concentrations During the Euglycemic-Hyperinsulinemic Clamp

The changes of EGC during the euglycemic-hyperinsulinemic clamp were evaluated in a probe that was

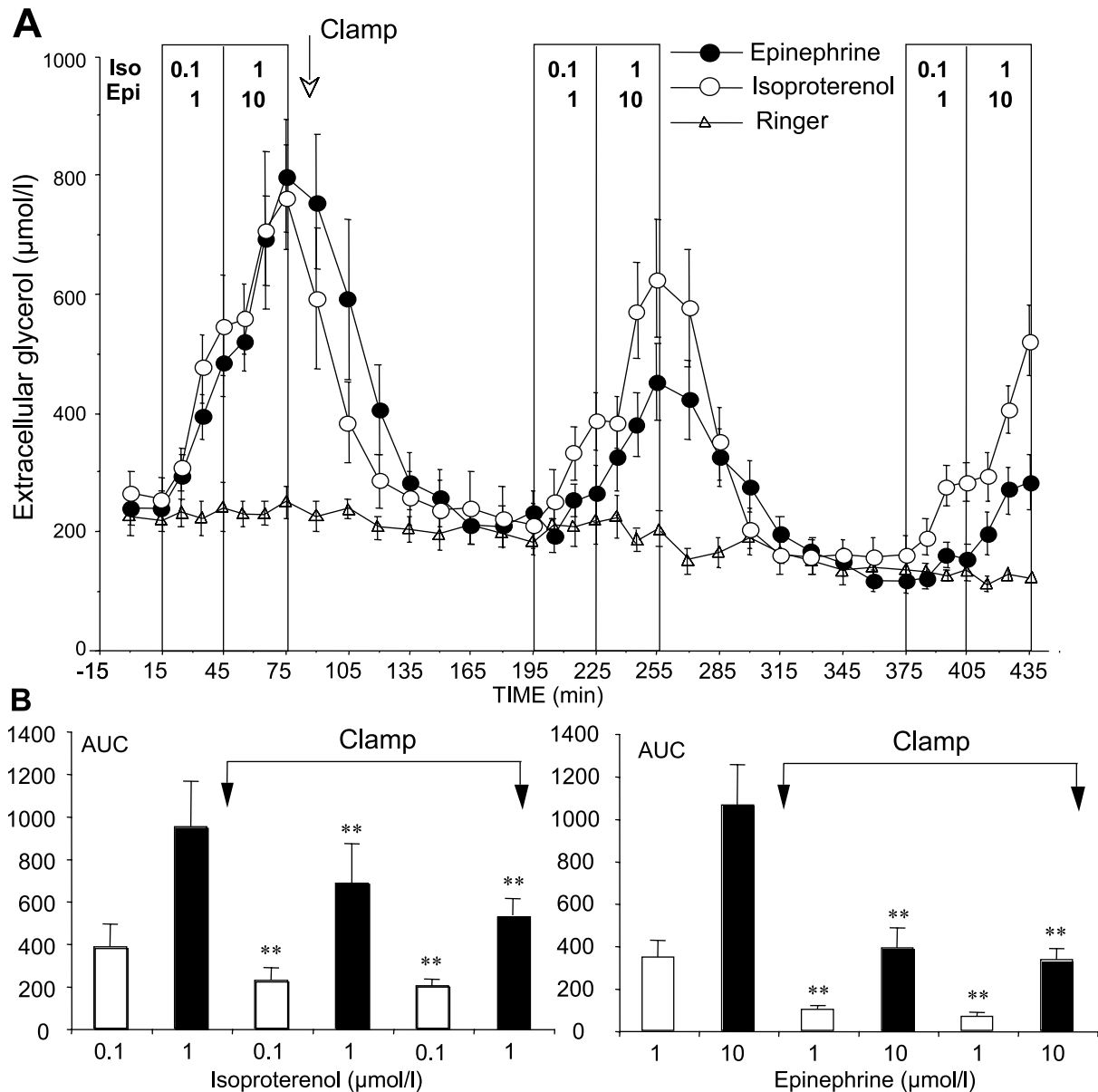


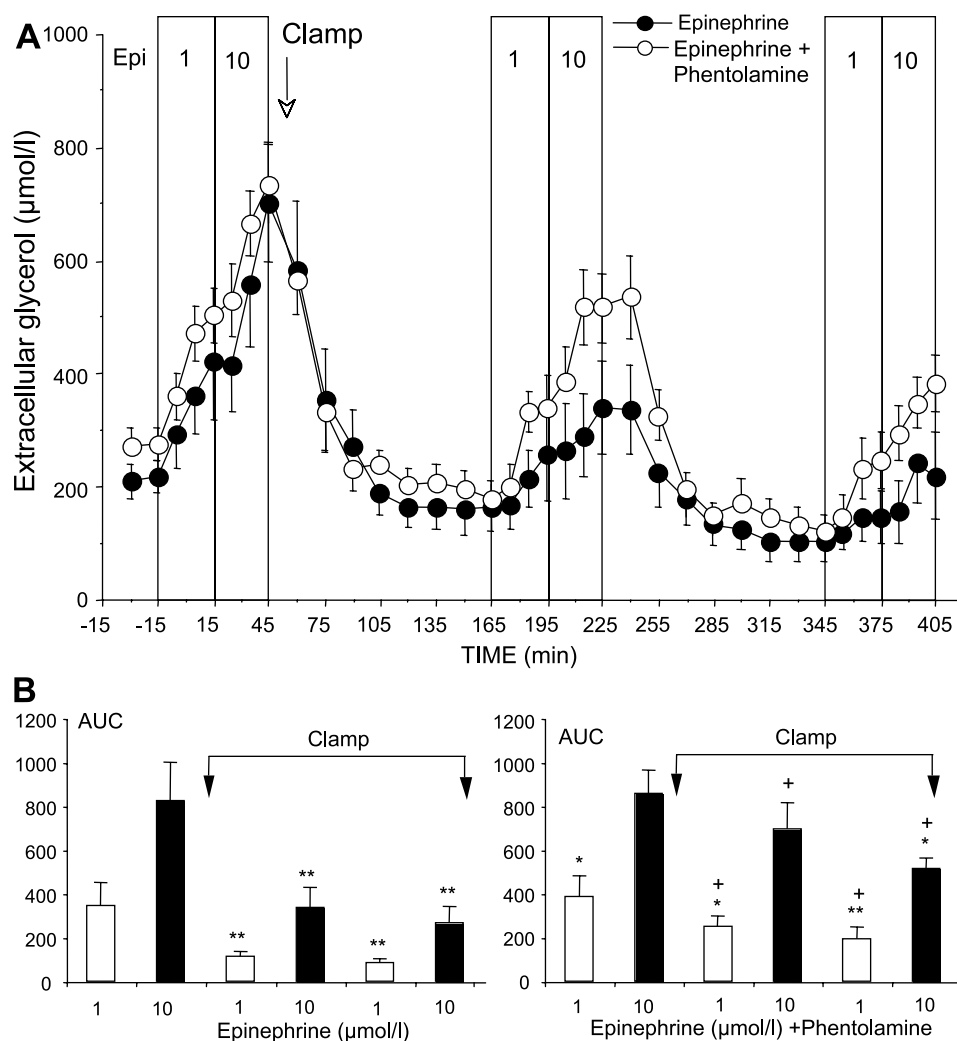
Fig. 2. In situ effects of 3 successive perfusions of graded concentrations of Epi (1 and 10 μM) or isoproterenol (Iso; 0.1 and 1 μM) on EGC in subcutaneous abdominal adipose tissue during euglycemic-hyperinsulinemic clamp. Epi or Iso perfusion was applied through the microdialysis probes at each concentration during 30 min, and dialysate samples were collected for each 10-min period. The successive graded Epi or Iso perfusions were separated by 2 h, and dialysate samples were collected for each 15-min period. The third probe was perfused with Ringer solution during the entire protocol. A: absolute values of EGC. The intravenous infusion of insulin was started immediately after Epi or Iso was removed from the probe, and euglycemic-hyperinsulinemic clamp was maintained until the end of the experimental period. B: AUC ($\mu\text{M}/30$ min) of the variation of the EGC induced by Epi or Iso during euglycemic-hyperinsulinemic clamp. Values are means \pm SE. ****** $P < 0.02$ compared with values obtained during the first graded perfusion of Iso.

infused with Ringer solution throughout the experimental protocol (Fig. 2). Dialysate samples were taken at the same time intervals as in the other probes. Blood samples were taken 5 min before the clamp and at minutes 180 and 360 of the clamp for plasma glycerol concentration determination. We observed a progressive decrease of EGC (246 ± 16.3 , 194 ± 36 , and 150 ± 37 μM) and plasma glycerol concentrations (34.8 ± 3.9 , 9.7 ± 2.5 , and 9.2 ± 2.1 μM) during the euglycemic-hyperinsulinemic clamp

Modifications of Regional ATBF

The changes in the local adipose tissue microcirculation were evaluated by using the method based on the measurement of ethanol washout. Ethanol ratio was calculated as reported in METHODS and taken as an index of ethanol washout. The higher ethanol ratio corresponds to the lower ethanol washout, and this reflects the lower regional ATBF. The average ethanol ratios measured during the last 10-min period of each

Fig. 3. In situ effects of 3 successive perfusions of graded concentrations of Epi (1 and 10 μ M) alone or associated with 100 μ M phentolamine on EGC in subcutaneous abdominal adipose tissue during euglycemic-hyperinsulinemic clamp. Epi perfusion alone (or with phentolamine) was applied through the microdialysis probes at each concentration for 30 min, and dialysate samples were collected for each 10-min period. The successive graded Epi perfusions were separated by 2 h, and dialysate samples were collected for each 15-min period. **A**: absolute values of EGC in experiments with infused Epi alone or with Epi plus phentolamine during the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. The intravenous infusion of insulin was started immediately after Epi or Epi plus phentolamine were removed from the probe, and euglycemic-hyperinsulinemic clamp was maintained until the end of the experimental period. **B**: AUC (μ M/30 min) of the variation of the EGC induced by Epi perfusion alone or by Epi plus phentolamine. Values are means \pm SE. * P < 0.05; ** P < 0.02 compared with values obtained with the first graded perfusion of Epi or Epi with phentolamine. + P < 0.05 compared with the corresponding values obtained with Epi alone.



graded perfusion of catecholamines are presented in Fig. 4. In the control study, there were no differences in the epinephrine-induced increase (at 10 μ M) in the ethanol ratio during the course of the protocol despite the fact that the increase did not reach a level of significance during the third perfusion (Fig. 4). In the study with clamp (*probe 2*), the epinephrine-induced increase in the ethanol ratio (10 μ M) before the clamp was not different from increases during the clamp. Both isoproterenol perfusion (*probe 1*) and the perfusion of epinephrine combined with phentolamine (*probe 2*) did not induce a significant decrease in ethanol ratios during the clamp.

DISCUSSION

The present study, using the microdialysis technique, reveals the impacts of hyperinsulinemia on the adrenergic regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue in situ. The lipolytic effects of epinephrine and of β -AR adrenergic agonist isoproterenol were reduced during a euglycemic-hyperinsulinemic clamp. This suggests that the β -adrenergic component of epinephrine action was reduced during hyperinsulinemia. In addition to that, the greater reduction of the lipolytic

effect of epinephrine (when compared with isoproterenol) might be explained by the involvement of the antilipolytic component of epinephrine action mediated by α_2 -ARs. This conclusion is supported by the finding that the lipolytic effect of epinephrine was enhanced by addition of the α_1 - α_2 -AR antagonist phentolamine during hyperinsulinemia; the EGC increase thus becomes similar to that initiated by isoproterenol.

Lipolysis in human fat cells is mainly controlled by insulin and catecholamine. Catecholamines (i.e., epinephrine and norepinephrine) promote the activation of both lipolytic β -ARs and antilipolytic α_2 -ARs. The occurrence of an antilipolytic potency of catecholamines, particularly epinephrine, which exhibits a higher affinity for the α_2 -AR, is noticeable in human subcutaneous adipocytes. Consequently, epinephrine is less efficient in stimulating lipolysis than a selective catecholamine that possesses only the β -AR potency. Moreover, the antilipolytic action of epinephrine is particularly expressed in subcutaneous adipocytes from obese subjects, and we have previously demonstrated that, in obese subjects, the activation of the α_2 -AR strongly reduces the lipolytic effect of physiological catecholamines during exercise (30). To assess the

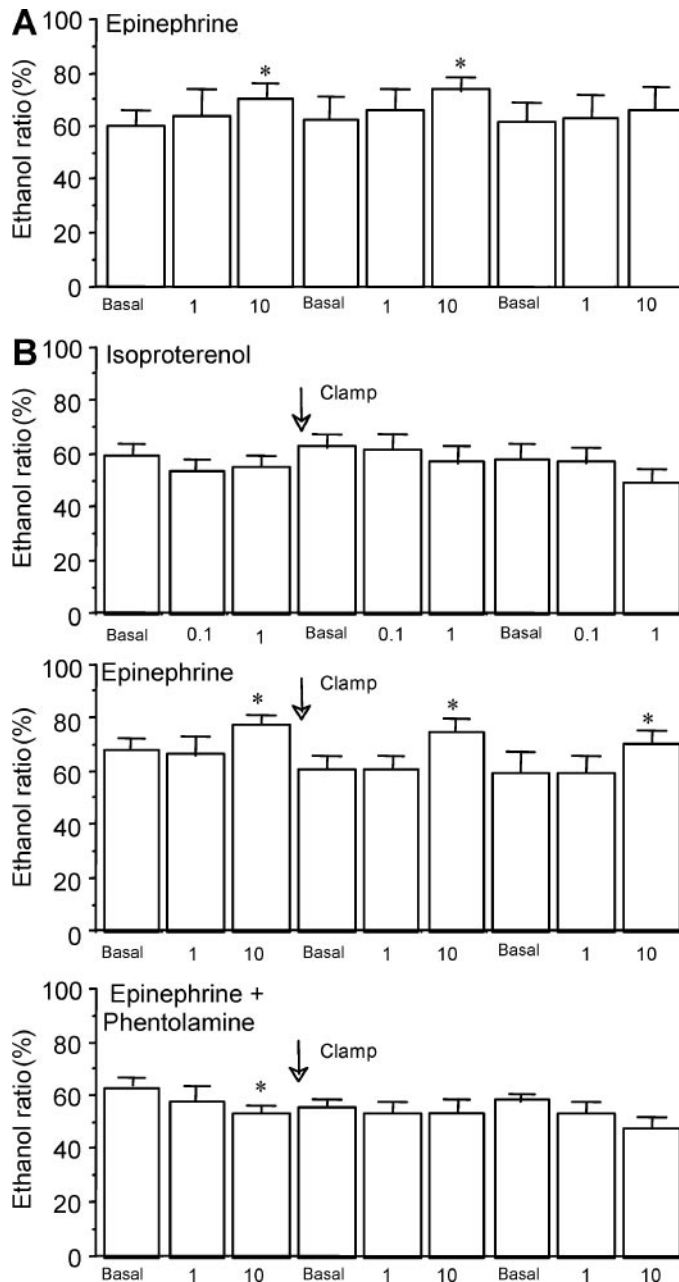


Fig. 4. Variations on the ethanol outflow-to-inflow ratio in subcutaneous abdominal adipose tissue in the control study and studies during an euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *A*: in situ effects of 3 successive perfusions of graded concentrations of epinephrine (1 and 10 μ M) in the control study. *B*: in situ effects of 3 successive perfusions of graded concentrations of Iso (0.1 and 1 μ M; *top*) (*study 1*), Epi (1 and 10 μ M; *middle*), and epinephrine plus 100 μ M phentolamine (*bottom*) (*study 2*). The ethanol concentrations in the dialysate were measured in the last 10-min period before drug perfusion (basal) and in the last 10-min period of each graded infused catecholamine. Values are means \pm SE. * P < 0.05 compared with values obtained before drug perfusion.

hypothesis of a balanced activity of β - and α_2 -ARs (when the involvement of the β -AR pathway is lowered in adipose tissue, the antilipolytic α_2 -AR component is strengthened), we compared the effect of insulin administration on the lipolytic effect of epinephrine with isoproterenol explored in situ.

At the beginning of the present studies, we verified the absence of desensitization when catecholamine perfusions were performed. The interval between the various epinephrine perfusions has been selected to prevent (or limit) the incidence of desensitization and limit its interference with the effect of insulin. Repeated intravenous perfusions of epinephrine (28) or microdialysis perfusion (24) could lead to desensitization of catecholamine-induced lipolysis in human adipose tissue. This phenomenon was not found in rat adipose tissue when norepinephrine was infused into microdialysis probes at 1-h intervals (8). In fact, it occurs in human adipose tissue when catecholamine perfusions are applied at intervals of 1 h (24) or less (28). We verified the absence of desensitization when catecholamine perfusions were realized in an interval of 2 h. In the control study without euglycemic-hyperinsulinemic clamp, the repeated perfusions of epinephrine into the probes were realized, and they resulted in the same EGC increase for both epinephrine concentrations (Fig. 1).

It has previously been shown that the in vitro incubation of fat cells with insulin significantly reduces the lipolytic effect of isoproterenol (10). This effect is classically attributed to the insulin-dependent activation of phosphodiesterase, an intracellular enzyme that hydrolyzes cAMP. An additional explanation involves cross-regulation between insulin and β_2 -AR, i.e., growth factor tyrosine kinase receptors, like insulin receptor, directly phosphorylating a G protein linked to the β_2 -AR (3). This mechanism probably leads to internalization of β -AR into the cytoplasmic compartment since binding studies have revealed a decrease in β -AR in the plasma membrane of human fat cells treated with insulin (10). It has also been shown that insulin has no effect on the binding of α_2 -AR-selective radioligands in human fat cells (10) and on the antilipolytic effect of the selective α_2 -AR adrenergic agonist UK-14304 (personal data). So, in insulin-treated fat cells, the β -/ α_2 -AR balance is modified in favor of the α_2 -AR antilipolytic pathway in human fat cells.

At the concentration used, insulin inhibits spontaneous lipolysis in the SCAAT and lipid mobilization in the fasted subjects. Moreover, hyperinsulinemia reduced the isoproterenol-induced lipolysis (Fig. 2). Isoproterenol exhibits an \sim 10-fold higher affinity for β -ARs than epinephrine. Thus the chosen concentrations of epinephrine infused in the probes were 10-fold higher than those of isoproterenol to obtain a similar increase in EGC with both amines. In such conditions, before the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, the increase in EGC was similar with the two catecholamines. The reduction of epinephrine-induced lipolysis during the clamp was significantly higher than that of isoproterenol-stimulated lipolysis for the corresponding concentrations. The blunting effect of insulin on the epinephrine-induced changes in subcutaneous EGC (an index of in situ lipolysis) could result from multiple mechanisms. The first one could be due to phosphodiesterase activation and/or phosphorylation of the G protein linked to the β -AR or the β -AR itself by insulin,

and the second one could result from the inhibition of the formation of cAMP through activation of fat cell α_2 -ARs (7, 19). The latter mechanism could be involved in differences observed between the effects of hyperinsulinemia on the lipolytic effects of epinephrine alone and epinephrine coupled with phentolamine. When phentolamine (an α_1 -/ α_2 -AR antagonist) was infused in the probe together with epinephrine, the EGC response was higher during the clamp than with epinephrine alone, and, consequently, the reduction in lipolytic effect promoted by epinephrine, during the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, was clearly less pronounced. It is noticeable that before the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, phentolamine alone did not significantly change the epinephrine-induced increase in EGC. The latter observation suggests that, in the presence of low plasma insulin concentrations, the α_2 -AR antilipolytic effect is not apparent. This is in disagreement with a previous report showing that phentolamine potentiates both spontaneous and norepinephrine-stimulated lipolysis (2) in a similar microdialysis protocol. However, in several other studies, the enhancing effect of phentolamine on spontaneous glycerol release has not been found (15, 21). In fact, it was shown that the potentiating effect of phentolamine resulting from α_2 -AR blockade in SCAAT could be discerned clearly during exercise when the activity of the adrenergic system is increased (21).

During interpretation of lipolysis data based on glycerol concentrations in dialysate outflowing from the microdialysis probe, the regional ATBF must be taken into account. It has been demonstrated that the EGC in human adipose tissue is influenced by the local blood flow (4, 11, 13). In the present study, it was not possible to evaluate ATBF changes induced by the perfusion of pharmacological agents through the probe by the conventional technique, i.e., the ^{133}Xe washout; the space of diffusion of the perfused agents, and consequently the volume in which the ATBF changes are produced in SCAAT are very narrow and different from the distribution volume of xenon injected directly into SCAAT. Consequently, the ^{133}Xe -washout method reflects the blood flow in larger and not identical volumes of adipose tissue. Thus a method based on the evaluation of ethanol washout, measured by using ethanol ratio, was used for assessment of changes in adipose tissue microcirculation. The increase in ethanol ratio reflects a decrease in ATBF (12). The ethanol method does not enable the corrections of individual EGC for ATBF values, but, reflecting the variations in ATBF, it provides a possibility to assess whether and in which sense the changes in EGC were influenced by the changes in ATBF. In this study, epinephrine induced a decrease in ATBF that was significant at the concentration of 10 μM (Fig. 4). This finding could suggest that the epinephrine-induced increase in EGC is enhanced because of the reduction of local blood flow and, consequently, that the increase in the rate of lipolysis is over estimated. During the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, the epinephrine effect on ATBF was not modified. This finding suggests that the reduction in

epinephrine-induced increase of EGC, observed during euglycemic-hyperinsulinemic clamp, was not influenced by the changes in ATBF and thus reflects the true inhibition of lipolytic processes in adipose tissue. Insulin by itself, at the concentrations used, does not change ATBF as previously shown (29). When epinephrine was perfused with phentolamine, a tendency toward a nonsignificant increase in ethanol washout (i.e., an increase in local ATBF) was observed. Thus the potentiating effect of phentolamine on an epinephrine-induced increase in EGC during euglycemic-hyperinsulinemic clamp could be attributed to the blockade of fat cell α_2 -ARs, and the slight phentolamine-induced vasodilatation could lead only to underestimation of potentiating action of phentolamine on epinephrine-induced lipolysis.

In summary, the present study demonstrates that hyperinsulinemia reduces the lipolytic effect of catecholamines in adipose tissue. The results suggest that several mechanisms are involved in the resulting insulin-induced blunting of the epinephrine-induced lipolysis in situ. First, the β -AR-dependent lipolytic pathway is reduced, presumably through the activation of phosphodiesterase-3B and by the desensitization of the β -AR-dependent mechanisms from insulin. These mechanisms could explain the reduction of the effect of isoproterenol. Second, the activation of the antilipolytic α_2 -AR-dependent pathway by epinephrine could contribute to counteraction of the β -AR-dependent lipolytic pathway, which would explain the alterations that occur in the action of epinephrine. The present study suggests that hyperinsulinemia contributes to alterations of adipose tissue characteristics that were described in insulin resistance (such as upper body obesity) and suggests the mechanisms by which β - and α_2 -AR-mediated pathways are involved in these alterations. It is not the only pathway related to hyperinsulinemia-induced actions, and its physiological importance, compared with other pathways, remains to be firmly established. Further studies investigating in vivo the relative contribution of β - and α_2 -AR-mediated pathways in adipose tissue metabolism in conditions related to altered levels of plasma insulin (physiological: nutrition; pathological: obesity, diabetes) are warranted.

We are grateful to M.-T. Canal and Z. Parizkova for excellent technical assistance, and to Dr. P. Winterton for revising the English version.

DISCLOSURES

This study was supported by a grant of Grant Agency of Czech Republic (GACR 303/00/0649). This study was also supported by the Direction Générale de la Coopération Internationale et du Développement (Programme d'Action Intégrées Franco-Tchèque) and by the Commission of the European Communities Research Technological Development programme (FATLINK: dietary fat, body weight control, and links between obesity and cardiovascular disease).

REFERENCES

1. Arner P. Adrenergic receptor function in fat cells. *Am J Clin Nutr* 55: 228–236, 1992.

2. **Arner P, Kriegholm E, and Engfeldt P.** In situ studies of catecholamine-induced lipolysis in human adipose tissue using microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 284–288, 1990.
3. **Baltensperger KV, Karoor H, Paul A, Ruhot MP, Czech MP, and Malbon CC.** The β -adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 271: 1061–1064, 1996.
4. **Barbe P, Millet L, Galitzky J, Lafontan M, and Berlan M.** In situ assessment of the role of the β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br J Pharmacol* 117: 907–913, 1996.
5. **Bernst E and Gutman I.** Determination of ethanol with alcohol dehydrogenase and NAD. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Bergmeyer HU. Verlag: Weinheim, 1974, vol. 2, p. 1499–1505.
6. **Bradley DC and Kaslow HR.** Radiometric assays for glycerol, glucose and glycogen. *Anal Biochem* 180: 11–16, 1989.
7. **Carey GB.** Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. In: *Skeletal Muscle Metabolism in Exercise and Diabetes*, edited by Richter EA. New York: Plenum, 1998, p. 157–170.
8. **Cimmino M, Agosto A, Minaire Y, and Gélouën A.** In situ regulation of lipolysis by insulin and norepinephrine: a microdialysis study during euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *Metabolism* 44: 1513–1518, 1995.
9. **DeFronzo RA, Tobin JD, and Andres R.** Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 237: 214–223, 1979.
10. **Engfeldt P, Hellmer J, Wahrenberg H, and Arner P.** Effect of insulin on adrenoceptor binding and the rate of catecholamine-induced lipolysis in isolated human fat cells. *J Biol Chem* 263: 1553–1560, 1998.
11. **Enoksson S, Nordenström J, Bolinder J, and Arner P.** Influence of local blood flow on glycerol levels in human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19: 350–354, 1995.
12. **Felländer G, Linde B, and Bolinder J.** Evaluation of the microdialysis ethanol technique for monitoring of subcutaneous adipose tissue blood flow in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 220–226, 1996.
13. **Galitzky J, Lafontan M, Nordenström J, and Arner P.** Role of vascular α_2 -adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. *J Clin Invest* 91: 1997–2003, 1993.
14. **Hagström-Toft E, Arner P, Johansson U, Erikson LS, Ungerstedt U, and Bolinder J.** Effect of insulin on human adipose tissue metabolism in situ. Interactions with β -adrenoceptors. *Diabetologia* 35: 664–670, 1992.
15. **Hellström L, Blaak E, and Hagström-Toft E.** Gender differences in adrenergic regulation of lipid mobilization during exercise. *Int J Sports Med* 17: 439–447, 1996.
16. **Jansson PA, Larsson A, Smith U, and Lönnroth P.** Glycerol production in subcutaneous adipose tissue of lean and obese humans. *J Clin Invest* 89: 1610–1617, 1992.
17. **Jansson PA, Smith U, and Lönnroth P.** Interstitial glycerol concentration measured by microdialysis in two subcutaneous regions in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 258: E918–E922, 1990.
18. **Jensen MD, Haymond MW, Gerich JE, Cryer PE, and Miles JM.** Lipolysis during fasting: decreased suppression by insulin and increased stimulation by epinephrine. *J Clin Invest* 79: 207–213, 1987.
19. **Lafontan M and Berlan M.** Evidence that epinephrine acts preferentially as an antilipolytic agent in abdominal human subcutaneous fat cells: assessment by analysis of β - and α_2 -adrenoceptors properties. *Eur J Clin Invest* 15: 341–346, 1985.
20. **Lafontan M and Berlan M.** Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34: 1057–1091, 1993.
21. **Lafontan M and Berlan M.** Fat cell α_2 -adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev* 16: 716–738, 1995.
22. **Lonnroth P and Smith U.** The antilipolytic effect of insulin in human adipocytes requires activation of the phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 141: 1157–1161, 1996.
23. **Mags DG, Jacob R, Rife F, Caprio S, Tamborlane WV, and Sherwin RS.** Counter-regulation in peripheral tissues. Effect of systemic hypoglycemia on levels of substrates and catecholamines in human skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes* 46: 70–76, 1997.
24. **Marion-Latard F, De Glisezinski I, Crampes F, Berlan M, Galitzky J, Suljkovicova H, Riviere D, and Stich V.** A single bout of exercise induces β -adrenergic desensitization in human adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R166–R173, 2001.
25. **Moberg E, Enoksson S, and Hagström-Toft E.** Importance of phosphodiesterase 3 for the lipolytic response in adipose tissue during insulin-induced hypoglycemia in normal man. *Horm Metab Res* 30: 684–688, 1998.
26. **Mokshagundam PL, Peiris AN, Stagner JI, Gingerich RL, and Samols E.** Interstitial insulin during euglycemic-hyperinsulinemic clamp in obese and lean individuals. *Metabolism* 45: 951–956, 1996.
27. **Rondinone CM, Carvalho E, Rahn T, Manganiello VC, Degerman E, and Smith UP.** Phosphorylation of PDE3B by phosphatidylinositol 3-kinase associated with the insulin receptor. *J Biol Chem* 275: 10093–10098, 2000.
28. **Stallknecht B, Bülow J, Frandsen E, and Galbo H.** Desensitization of human adipose tissue to adrenaline stimulation studied by microdialysis. *J Physiol* 500: 271–282, 1997.
29. **Stallknecht B, Larsen JJ, Mikines KJ, Simonsen L, Bülow J, and Galbo H.** Effect of training on insulin sensitivity of glucose uptake and lipolysis in human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E376–E385, 2000.
30. **Stich V, De Glisezinski I, Crampes F, Hejnova J, Cottet-Emard JM, Galitzky J, Lafontan M, Riviere D, and Berlan M.** Activation of α_2 -adrenergic receptors impairs exercise-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue of obese subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R499–R504, 2000.

Cirkadiánní variabilita vylučování urey do moči a hodnocení utilizace živin pomocí nepřímé kalorimetrie v kombinaci s hyperinsulinovým euglykemickým clampem u zdravých jedinců

Wohl P., Pelikánová T., Skibová J.

Centrum diabetologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Souhrn

Kombinace clampových metod s nepřímou kalorimetrií se používá k současnému měření oxidace živin a metabolismu glukosy. Významným parametrem, který ovlivňuje výsledky utilizace energetických substrátů měřených nepřímou kalorimetrií, jsou odpady dusíku do moči, které se obvykle hodnotí z 24hodinových sběrů moči. Cílem práce bylo zjednodušit sběry moči a minimalizovat chybu vznikající při kalkulaci oxidace živin pomocí odpadů urey do moči při euglykemickém hyperinsulinovém clampu u zdravých osob. Vyšetřeno bylo 11 zdravých dobrovolníků během 3denní hospitalizace při standardním bilancovaném dietním příjmu, u nichž byly změřeny odpady urey do moči a) v průběhu 24 hodin (porce I–VII) a b) během dvoustupňového hyperinsulinového (1 a 10 mU/kg/min) euglykemického clampu (bazální perioda: -120–0 min, perioda I: 0–120 min, perioda II: 120–240 min) doplněného nepřímou kalorimetrií. Zjistili jsme, že vylučování urey významně nekolísá během 24 hodin. Odpady urey se nemění ani během clampu (perioda I: 462 ± 157 vs perioda II: 436 ± 138 mmol/24 hodin), ale nastává pokles hladiny urey v séru (perioda I: $4,29 \pm 0,61$ vs perioda II: $3,8 \pm 0,63$ mmol/l; $p > 0,001$). Odpady urey korigované (perioda Ic a perioda IIc) na změny urey v distribučním prostoru během dvou clampových period se významně liší od hodnot odpadů urey bez korekce (perioda I: 462 ± 157 vs perioda Ic: 240 ± 170 mmol/24 hodin; $p > 0,001$; perioda IIc: 219 ± 122 vs perioda II: 436 ± 138 mmol/24 hodin; $p > 0,001$). Z výsledků vyplývá, že k měření substrátové utilizace během hyperinsulinového euglykemického clampu lze použít jen sběry, které jsou prováděny před clampem a během něho, a je nezbytné provedení korekce na změny v distribučním prostoru urey. Sběr moče během clampu nelze nahradit sběrem za 24 hodin či stanovením odpadů urey v některé ze sledovaných period. Vylučování urey do moči se během 24 hodin nemění.

Klíčová slova: utilizace živin, vylučování urey, insulin, glykemický clamp, nepřímá kalorimetrie.

Summary

Wohl P., Pelikánová T., Skibová J.: Circadian Variability in Urinary Urea Nitrogen Excretion and Substrate Utilization Measured by Hyperinsulinaemic Euglycaemic Clamp Combined with Indirect Calorimetry in Healthy Subjects

A hyperinsulinaemic euglycaemic clamp has been used together with indirect calorimetry for simultaneous measurement of substrate utilization and glucose metabolism. Correct urine collection is an important parameter influencing the results of substrate utilization estimated by indirect calorimetry. The aims of our study were a) to improve the timing of urine collection for measuring substrate oxidation during hyperinsulinaemic euglycaemic clamp and b) to evaluate the circadian variation in urinary urea nitrogen excretion in healthy subjects. The study was performed on 11 healthy subjects during 3 days with a standard dietary intake. Urinary urea excretion (UE) was measured by standard technique in urine samples collected a) during 24 hours (periods I–VII) and b) during hyperinsulinaemic (1 and 10 mU/kg/min) euglycaemic (5 mmol/l) clamp combined with indirect calorimetry (basal period: -120–0 min, period I: 0–120 min, period II: 120–240 min). The circadian variation in UE during 24 hours was not statistically significant. During hyperinsulinaemic euglycaemic clamp UE did not change (period I: 462 ± 157 vs period II: 436 ± 138 mmol/24 hours, NS), but the serum urea level decreased significantly (period I: 4.29 ± 0.61 vs period II: 3.8 ± 0.63 mmol/l; $p > 0.001$). There was a significant relationship between UE corrected for changes in urea pool size (period Ic and IIc) compared to uncorrected UE (period I and II) (period I: 462 ± 157 vs period Ic: 240 ± 170 mmol/24 hours; period IIc: 219 ± 122 vs period II: 436 ± 138 mmol/24 hours, $p > 0.001$). We conclude that urine collections made during the clamp and corrected for changes in urea pool size are most suitable for measurement of substrate utilization during hyperinsulinaemic euglycaemic clamp. Urine collections during clamp cannot be replaced by any urine collection from tested periods (periods I–VII) nor one 24-hour urine sample. Finally, we found no significant variation in UE during 24 hours in healthy subjects.

Key words: substrate utilization, urinary urea excretion, insulin, glycaemic clamp, indirect calorimetry.

Vylučování urey v moči za 24 hodin se běžně používá ke zhodnocení dusíkové bilance u nemocných na nutriční podpoře a k měření substrátové utilizace nepřímou kalorimetrií (12). Hyperinsulinový euglykemický clamp je zlatým standardem testování účinku insulinu in vivo. Míra účinku insulinu se hodnotí podle množství glukosy, kterou je třeba dodávat, abychom při standardně zvolené hyperinsulinémií (konstantní infuze insulinu) udrželi glykémii na předem požadované hodnotě. Sběr moči a jeho přesnost je významným parametrem přesného měření utilizace živin, protože oxidace jednotlivých substrátů se odvozuje z měření odpadů dusíku do moči. Kombinace nepřímé kalorimetrie a hyperinsulinového euglykemického clampu se používá k současnému měření oxidace živin a k odlišení oxidační a neoxidační složky metabolismu glukosy (2, 5, 14, 16). Vliv hyperinsulinémie navozené hyperinsulinovým euglykemickým clampem na změnu sérové a močové koncentrace urey je v literatuře již popsán, dochází k poklesu sérové koncentrace urey, a proto je třeba provést korekci odpadů urey na změnu obsahu urey v distribučním prostoru (14). Příčina těchto změn není plně objasněna, je možné, že hyperinsulinémie není jediným faktorem, který ovlivňuje vylučování urey během clampu (volumová zátěž, endogenní vlivy, změny hormonální během vyšetření). Tyto změny ovlivňují měření substrátové utilizace (4, 14, 16). Běžně se nepřímá kalorimetrie při hyperinsulinovém euglykemickém clampu provádí před zahájením clampu (bazálně), v průběhu a na konci clampu. K určení oxidace proteinů se používá sběr moči za 24 hodin jak k měření bazálního, tak k měření v průběhu clampu. V naší práci jsme se zaměřili a) na upřesnění sběru moči a optimalizaci sběrných period k měření substrátové utilizace při kombinaci nepřímé kalorimetrie s hyperinsulinovým euglykemickým clampem a b) na zhodnocení cirkadiánní variability vylučování urey během 24 hodin rozdělené na 3hodinové periody.

METODIKA

Soubor

Studie se účastnilo 11 zdravých neobézních (BMI 23+1,0) jedinců, kteří neměli v rodinné anamnéze diabetes mellitus či hypertenzi, neléčili se pro jiné závažné interní onemocnění a měli normální toleranci glukosy, která byla ověřena orálním glukosovým tolerančním testem. Charakteristiky souboru uvádí tabulka 1. Vyšetření byla v souladu s etickými normami a probíhala se souhlasem etické komise TN a IKEM, Praha.

Table 2. Dietary intake

Sodium, mmol/24 hrs	150 – 170
Potassium, mmol/24 hrs	50 – 80
Proteins, g/24 hrs/kg	80
Carbohydrates, g/24 hrs	275 – 325
Energy intake, kcal/24 hrs	2 500 – 2 800

Osoby byly zařazeny do studie poté, co byly seznámeny s cíli a případnými riziky studie a podepsaly informovaný souhlas.

Průběh a funkční vyšetření

Sledování probíhalo během 3denní hospitalizace při standardním bilancovaném dietním režimu (tab. 2) a bylo rozděleno do dvou částí. Prováděli jsme vyšetření cirkadiánního rytmu vylučování urey v průběhu jednoho dne a dvoustupňový hyperinsulinový euglykemický clamp doplněný nepřímou kalorimetrií.

a) Vyšetření cirkadiánního rytmu vylučování urey (UE): Moč byla sbírána 24 hodin od 6.00 hodin ráno do 6.00 hodin ráno druhého dne. Sběry moči jsme rozdělili do 6 sběrných period po 3 hodinách (perioda I–VI: od 6.00 do 24.00) a jednu sběrnou periodu noční (perioda VII: 24.00 – 06.00 hod).

b) Dvoustupňový hyperinsulinový (1 a 10 mU/kg/min) euglykemický clamp: Clampové vyšetření v trvání 240 min bylo provedeno modifikovanou metodou (13) podle autorů DeFronzo et al. (1) a bylo doplněno nepřímou kalorimetrií. Kanyla k aplikaci infuzí byla zavedena do antekubitální žíly. Druhá kanyla sloužící k odběrům krevních vzorků byla zavedena do žíly na hřbetě ruky a ruka byla umístěna ve vyhříváném boxu (60–70 °C) s cílem dosáhnout arterializace odebírané krve. V čase 0–120 min byl insulin podáván rychlostí 1 mU/kg/min, vedoucí k insulinémií kolem 75 µU/ml, a v čase 120–240 min rychlostí 10 mU/kg/min (insulinémie 1 500 µU/ml). Glykémie byla udržována infuzí 15 % glukosy na hodnotě 5 mmol/l. Rychlost infuze jsme měnili na základě glykemií, sledovaných v 5–15minutových intervalech. Před zahájením clampu (–45–0 min) a během clampu (v čase 75–120 min a 195–240 min) bylo provedeno měření substrátové utilizace nepřímou kalorimetrií metabolickým monitorem V MAX Sensor Medics (Sensor Medics, Anaheim, CA, USA) (4). Moč byla sbírána před zahájením clampu (cca od 6.00 hod do 8.00 hod ráno; bazální sběr). Před zahájením clampu se vyšetřovaní vymočili a moč byla sbírána v čase 0–120 min (perioda I) a 120–240 min (perioda II) v průběhu clampu. V čase 0, 120 a 240 min byla odebrána krev ke stanovení koncentrace urey v séru (S-urea).

Analytické metody

Glykémie byla měřena glukosooxidásovou metodou analyzátozem Beckman Analyzer (Beckman Instrument Inc. Fullerton, Ca, USA). Urea v moči (U-urea) a S-urea byla měřena standardní ureasovou metodou (10). Plazmatický imunoreaktivní insulin (IRI) byl stanoven radioimmunologicky pomocí standardních kitů (IMMUNOTECH Insulin IRMA kit; IMMUNOTECH a.s., Praha, Česká republika).

Matematické zpracování

Výpočty oxidace tuků, bílkovin a cukrů během kalorimetrie byly provedeny podle standardních kalkulací (4). Během clampu, kdy se mění hladiny S-urey, což je zdrojem chyb ve výpočtech oxidace proteinů (16), byly odpady urey v moči (UE) korigovány

Table 1. Characteristics of study group (n = 11)

Age, years	26 ± 1.9
BMI, kg/m ²	23 ± 1.0
Triglycerides, mmol/l	1.10 ± 0.4
Total cholesterol, mmol/l	4.13 ± 0.66
HDL cholesterol, mmol/l	1.16 ± 0.66
LDL cholesterol, mmol/l	2.03 ± 0.72
HbA _{1c} , %	4.82 ± 0.27

Explanations: BMI = body mass index, HbA_{1c} = glycosylated haemoglobin.

změnami urey v distribučním prostoru (14). Použili jsme vzorec korekce na změny urey v distribučním prostoru:

$$\text{Korigované odpady urey (g/24hod)} = \frac{\text{odpady urey (g/24hod)} - (\text{S-urea } 0 - \text{S-urea } 1) \times 0,6 \times \text{hmotnost} \times 24 \times 60 \times 0,028}{120}$$

(S-urea 0: sérová urea (mmol/l) v čase 0 min. clampu, S-urea 1 resp. 2: sérová urea v čase 120 resp. 240 min clampu, 24 a 60 – přepočít na 24 hodin, 0,6 : faktor tělesné vody pro muže, 0,028 – faktor k přepočtu koncentrace urey v mmol/l).

Utilizace glukosy a účinek insulinu během clampu byly hodnoceny pomocí spotřeby glukosy (M) a pomocí metabolické clearance glukosy (MCR) v intervalu 80–120 min (M_{submax} a MCR_{submax}) a v intervalu 200–240 min (M_{max} a MCR_{max}) (1, 5). MCR vyjádřená v ml/kg/min v daném intervalu byla počítána podle následujícího vztahu: $MCR = M$ (v uvedeném intervalu) / $G_{prům} \times 100/18$, kde $G_{prům}$ je průměrná hladina glykémie v daném intervalu vyjádřená v mmol/l. MCR je parametr, který odcloní vliv glykémie na spotřebu glukosy. Neoxidační spotřeba glukosy byla vypočtena jako rozdíl mezi spotřebou glukosy během clampu a oxidací glukosy měřenou pomocí nepřímé kalorimetrie. V naší studii jsme nesledovali jaterní produkci glukosy, bylo však prokázáno, že při námi volené hyperinsulinémii je u zdravých jedinců úplně zablokována (5).

Statistické hodnocení jsme prováděli pro zhodnocení cirkadiálního rytmu vylučování urey analýzou rozptylu s opakováním (ANOVA) a k určení optimalizace sběrů moči v průběhu clampu výpočtem korelačního koeficientu. Srovnání vylučování urey během clampu bylo provedeno párovým t-testem (Statgraphics, Statistical Graphics, Rockville, MD, USA).

Table 3. Circadian variability in urinary urea excretion (UE) in healthy subjects (n = 11)

Period (hrs)	UE (mmol/24 hrs)
24 hrs	470 ± 140
06 – 09 (I)	479 ± 134
09 – 12 (II)	510 ± 213
12 – 15 (III)	477 – 229
15 – 18 (IV)	474 ± 274
18 – 21 (V)	576 ± 273
21 – 24 (VI)	499 ± 103
24 – 06 (VII)	436 ± 125

Differences between periods I – VII are not statistically significant.

Table 5. Substrate oxidation measured by indirect calorimetry before (basal) and during two-step hyperinsulinaemic euglycaemic clamp (period 1c and period 2c) calculated after correction of urea excretion for changes in urea pool size

Period	REE (kcal/d)	CHox (mg/kg/min)	FATox (mg/kg/min)	PROox (mg/kg/min)	RQ	V _{O₂} (l/min)	V _{CO₂} (l/min)
Basal	1 848 ± 24	0.53 ± 0.47	1.16 ± 0.55	0.70 ± 0.19	0.75 ± 0.04	0.272 ± 0.03	0.213 ± 0.02
Period 1c	2 008 ± 27	2.35 ± 1.11	0.67 ± 0.54	0.42 ± 0.27	0.87 ± 0.07	0.287 ± 0.04	0.242 ± 0.03
Period 2c	2 269 ± 30	3.28 ± 0.93	0.52 ± 0.58	0.37 ± 0.18	0.97 ± 0.06	0.312 ± 0.04	0.294 ± 0.03

Explanations: REE = energy expenditure; CHox = carbohydrate oxidation; FATox = fat oxidation; PROox = protein oxidation; RQ = respiratory quotient; V_{O₂} = consumption of oxygen measured by indirect calorimetry, V_{CO₂} = production of carbon dioxide measured by indirect calorimetry.

Table 4. Urinary urea excretion (UE) and urinary nitrogen excretion (U – N) before (basal) and during two-step hyperinsulinaemic euglycaemic clamp from 0 to 120 min (period 1) and from 120 to 240 min (period 2) before and after correction for changes in urea pool size (period 1c and period 2c)

Period	UE (mmol/24 hrs)	U – N (g/24 hrs)
24 hrs	470 ± 140	13.98 ± 4.2
Basal	412 ± 125	15.54 ± 5.2
Period 1	462 ± 157	15.54 ± 5.7
Period 2	436 ± 138	14.67 ± 6.7
Period 1c	240 ± 170***	7.38 ± 4.10***
Period 2c	219 ± 122***	8.08 ± 5.74***

Statistical significance: *** p < 0.001; period 1c vs period I; and period 2c vs period II.

VÝSLEDKY

Hodnoty vylučování urey (UE) v průběhu 24 hodin během period I–VII jsou znázorněny v tabulce 3. Z tabulky vyplývá, že cirkadiální variabilita UE při standardním dietním příjmu není významná, nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v odpadech urey mezi testovanými periodami.

Výsledky UE během hyperinsulinového euglykemického clampu uvádí tabulka 4. Znázorněny jsou jak korigované, tak nekorigované hodnoty, které se vzájemně statisticky významně liší. Odpady dusíku urey v gramech po korekci, které dosadíme do kalkulační substrátové utilizace, se liší od nekorigovaných hodnot.

M_{submax} v první periodě clampu (0–120 min) při insulinémii kolem 75 μU/ml byla 13,53 ± 2,60 mg/kg/min, MCR_{submax} 17,42 ± 6,18 ml/kg/min při průměrné glykémii 4,66 ± 0,3 mmol/l s koeficientem variace 5,11 ± 3,2 %. V druhé periodě clampu (120–240 min) bylo M_{max} 23,32 ± 3,02 mg/kg/min, MCR_{max} 26,31 ± 4,41 ml/kg/min při průměrné glykémii 5,03 ± 0,39 mmol/l s koeficientem variace glykémie 3,91 ± 2,19 %. Neoxidační spotřeba glukosy v první periodě clampu byla 11,06 ± 2,34 mg/kg/min a ve druhé periodě 19,87 ± 2,62 mg/kg/min. Výsledky měření substrátové utilizace jsou uvedeny v tabulce 5. Během clampu se zvýšil respirační koeficient a oxidace sacharidů a poklesla oxidace lipidů a proteinů.

Vylučování urey (UE) během 24 hodin (porce I–VII z 24hodinového sběru) a UE během hyperinsulinového euglykemického clampu se nelišilo. Mezi UE během 24 hodin a UE během druhé periody clampu, které byly korigovány na distribuční prostor urey (UE_{2c}), byla nalezena hraniční korelace ($r = +0,639$; $p < 0,05$). Na základě nalezené korelace lze UE_{2c} přepočtené na mmol/24 h odvodit z následujícího vzorce: $UE_{2c} = -106 + 0,75 \times UE$ za 24 hodin (v mmol/24 h).

DISKUSE

Výpočet oxidace jednotlivých substrátů vychází ze zhodnocení utilizace bílkovin na základě přesného měření odpadů dusíku do moči. Hyperinsulinový euglykemický clamp v kombinaci s nepřímou kalorimetrií se používá k měření substrátové utilizace a k odlišení oxidačního a neoxidačního metabolismu glukosy (8). Přesnost sběru moči k určení odpadů dusíku je důležitou hodnotou, která se dále používá k výpočtu substrátové utilizace měřené nepřímou kalorimetrií (4, 10, 12). Odpady dusíku do moči je možno stanovit různými metodami, nejpřesnější je měření celkového močového dusíku Kjeldahlovou metodou, která je však technicky náročná (9). V současné době je nahrazována měřením odpadů dusíku urey, které je považováno za metodu poměrně spolehlivou (9, 12). V klinické výživě umožňuje vylučování urey za 24 hodin kalkulaci dusíkové bilance, která poukazuje na adekvátnost nutriční podpory a stupeň katabolismu (10, 12).

V naší studii jsme se zabývali otázkou, zda je možné nahradit technicky komplikovaný sběr moči před hyperinsulinovým euglykemickým clampem a během něho sběrem jiným, například za 24 hodin, nebo sběrem v některé ze sledovaných period (perioda I–VII). UE závisí nejen na dietním příjmu, ale především na energetické situaci organismu, funkci ledvin a stavu hydratace (12). UE se rovněž liší při srovnání sběrů moči v rozmezí několika dnů a tato variabilita je významná při měření oxidace substrátů (2, 16). V našem sledování nebylo nalezeno významné kolísání UE během 24 hodin, na rozdíl od diabetiků 1. typu bez diabetické nefropatie, u kterých jsme našli významnou variabilitu UE v průběhu jednoho dne za standardních podmínek (17).

Během hyperinsulinového euglykemického clampu je navození hyperinsulinémie ovlivněno nejen UE, ale také diuréza, množství urey v distribučním prostoru urey (pokles sérové koncentrace urey) a clearance urey (8, 14, 16). UE je proto nutno korigovat změnami v sérové koncentraci urey a tato vypočítaná hodnota se pak používá k měření substrátové oxidace nepřímou kalorimetrií. Z našeho sledování vyplývá statisticky významný rozdíl mezi korigovanou a nekorigovanou hodnotou UE. Není-li provedena korekce, je výsledná oxidace proteinů nadhodnocena a vypočtená oxidace sacharidů a lipidů je nižší (14, 16).

Insulin může inhibovat oxidaci proteinů a produkci urey více mechanismy (3, 6, 15). Rovněž bylo popsáno, že insulin inhibuje zároveň frakční vychytávání některých aminokyselin (alanin, glycin, fenylalanin a valin) splanchnickou oblastí (3). Běžně se používá k měření substrátové utilizace při kombinaci hyperinsulinového euglykemického clampu s nepřímou kalorimetrií UE v jedné 24hodinové periodě a tato hodnota se používá pro odhad utilizace živin jak za podmínek bazálních (lačných), tak za podmínek clampu, tedy během infuze glukosy s insulinem.

Korelace mezi 24hodinovým UE a UE během 2. periody clampu nabízí možnost testování vylučování urey během maximální utilizace glukosy hodnotou odpadů během 24 hodin, která bude korigována faktorem vycházejícím z korelačního koeficientu. Vzhledem k malému počtu testovaných osob v našem souboru však nelze vyslovit jednoznačný závěr k možnosti aplikace tohoto vzorce a jeho běžnému použití. V našem testování jsme nehodnotili změny ve vylučování iontů.

Z výsledků našeho sledování vyplývá, že u zdravých jedinců nelze nahradit sběr moči během hyperinsulinového euglykemického clampu sběrem za 24 hodin, stejně jako nelze sběr (24.00–06.00 hod) použít během clampu a nelze použít ani dalších sběrných period z cirkadiánní variability. K hodnocení substrátové utilizace živin před hyperinsulinovým euglykemickým clampem a během něho je nutné sbírat moč bazálně (6.00–8.00 hod) a odděleně v jednotlivých periodách clampu. Nezbytná je korekce odpadů urey na změny v distribučním prostoru.

Poděkování: Autoři děkují paní Daně Lapešové za spolehlivou technickou asistenci při provádění funkčních vyšetření.

LITERATURA

1. DeFronzo, R. A., Tobin, D. J., Andres, R.: Glucose clamp technique: A methods for quantifying insulin secretion and resistance. *Amer. J. Physiol.*, 237, 1979, s. E214–E227.
2. DeFronzo, R. A., Jacot, E., Jequier, E. et al.: The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetologia*, 25, 1983, s. 1000–1007.
3. Felig, P., Wahren, J.: Influence of endogenous insulin secretion on splanchnic glucose and amino acid metabolism in man. *J. clin. Invest.*, 50, 1971, s. 1702–1711.
4. Ferrannini, E.: The theoretical bases of indirect calorimetry: A review. *Metabolism*, 37, 1988, s. 287–301.
5. Ferrannini, E., Mari, A.: How to measure insulin sensitivity. *J. Hypertens.*, 16, 1998, s. 895–906.
6. Fugawa, N. K., Minaker, K. L., Rowe, J. W. et al.: Insulin-mediated reduction of whole body protein breakdown dose response effects on leucine metabolism in postabsorptive men. *J. clin. Invest.*, 76, 1985, s. 2306–2311.

7. **Gelfand, R. A., Barret, E. J.:** Effect of physiological hyperinsulinemia on skeletal muscle synthesis and breakdown in man. *J. clin. Invest.*, 80, 1987, s. 1–6.
8. **Jacot, E., DeFronzo, R. A., Jequier, E.:** The effect of hyperglycemia, hyperinsulinemia and route of glucose administration on glucose oxidation and glucose storage. *Metabolism*, 31, 1982, s. 922–930.
9. **Hawk, P.:** The Kjeldahl method. In: *Practical Physiology Chemistry*. 12th ed. Toronto, Blakiston 1947, s. 814–822.
10. **Konstantidines, F. M.:** Nitrogen balance studies in clinical nutrition. *Nutr. clin. Pract.*, 7, 1992, s. 231–238.
11. **Konstantidines, F. M., Konstantidines, N. M., Ci, L. J., Myaya, M. E., Cerra, F. B.:** Urinary urea nitrogen: too insensitive for calculation nitrogen balance studies in surgical clinical nutrition. *JPEN*, 15, 1991, s. 189–193.
12. **Mackenzie, T. A., Clark, G. N., Bistrrian, R. B., Flatt, J. P., Hallowell, M. E., Blackburn, G. L.:** A simple method for estimating nitrogen balance in hospitalized patients: A review and supporting data for previously proposed technique. *J. Amer. Coll. Nutr.*, 4, 1985, s. 575–581.
13. **Pelikánová, T., Kohout, M., Válek, J. et al.:** Sekrece inzulínu a inzulinová rezistence u diabetu 2. typu – vztahy ke složení mastných kyselin ve fosfolipidech séra. *Čas. Lék. čes.*, 129, 1990, s. 1605–1610.
14. **Tappy, L., Owen, O. E., Boden, G.:** Effect of hyperinsulinemia on urea pool size and substrate oxidation rate. *Diabetes*, 37, 1988, s. 1212–1216.
15. **Tessari, P., Inchistro, S., Biolo, G. et al.:** Differential effects of hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia on leucine-carbon metabolism in vivo: evidence for distinct mechanism in regulation of net amino acid deposition. *J. clin. Invest.*, 79, 1987, s. 1062–1069.
16. **Thronburn, A., Gumbier, B., Flynn, T., Henry, R. R.:** Substrate oxidation errors during combined indirect calorimetry – hyperinsulinemic glucose clamp studies. *Metabolism*, 40, 1991, s. 391–398.
17. **Wohl, P., Pelikánová, T., Skibová, J.:** Effect of circadian variability in urinary nitrogen excretion on substrate utilization measured by indirect calorimetry combined with hyperinsulinemic euglycemic clamp in diabetic patients. *Nutrition*, 16, 2000, s. V.

Do redakce došlo 19. 2. 2001

MUDr. Petr Wohl
Centrum diabetologie, IKEM,
Videňská 1958/4, 140 21 Praha 4

ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYŇE

Společnost sociálního lékařství a řízení péče o zdraví
ve spolupráci s

INCHEBA s.r.o. PRAHA

pořádají v rámci výstavy Pragomedica 2001 odborný seminář na téma

Výuka sociálního lékařství a veřejného zdravotnictví.

Seminář se koná

25. dubna 2001 od 9,30 hod. ve velkém sále Lékařského domu ČLS JEP
Sokolská 31, Praha 2.

Program:

Poslání sociálního lékařství a veřejného zdravotnictví
prof. MUDr. Jan Holčík, DrSc.

Problematika sociálního lékařství z hlediska World Medical Association
prof. MUDr. Jaroslav Blahoš, DrSc., ČLS JEP, WMA

Veřejné zdravotnictví v ČR z pohledu WHO
doc. MUDr. Alena Petráková, CSc., WHO ČR

Výsledky a záměry školy veřejného zdravotnictví
MUDr. Antonín Malina, MZ ČR a ŠVZ IPVZ
doc. MUDr. Ctibor Drbal, CSc., ŠVZ IPVZ

První zkušenosti s výukou zdravotnického managementu
prof. MUDr. Ivan Gladkij, CSc., MUDr. Kateřina Ivanová,
MUDr. Zdenka Koldová, Ing. Jaroslav Zlámal

PŘESTÁVKA

Diskuse a zprávy z některých pracovišť o výuce, informace, dotazy a poznámky.

Prof. MUDr. Jaroslav Blahoš, DrSc., předseda ČLS JEP
Prof. MUDr. Ivan Gladkij, CSc., předseda SSLŘPZ ČLS JEP
Ing. Jaroslav Čepek, ředitel Incheba Praha, s.r.o.

INZULINOVÁ REZISTENCE U DIABETIKŮ – METABOLICKÁ INFLEXIBILITA

INSULIN RESISTANCE IN DIABETIC PATIENTS – METABOLIC INFLEXIBILITY

PETR WOHL¹, EVA KRUŠINOVÁ¹, SIMONA KRATOCHVÍLOVÁ¹,
MARTA KLEMENTOVÁ¹, PAVEL WOHL², TEREZIE PELIKÁNOVÁ¹

¹Centrum diabetologie IKEM

²Klinika hepatogastroenterologie IKEM

SOUHRN

U štíhlých zdravých jedinců je svalová tkáň metabolicky flexibilní, kdy metabolickou flexibilitou rozumíme přesmyk mezi oxidací lipidů a zvýšenou utilizací mastných kyselin za podmínek nalačno, zatímco během podmínek stimulovaných inzulínem dochází k supresi oxidace lipidů a současně se zvyšuje vychytávání, oxidace a ukládání glukózy. U obézních a diabetiků 2. typu, u kterých je přítomna inzulinová rezistence, je popsána metabolická inflexibilita, která se projevuje trvalým zvýšením oxidace lipidů jak nalačno, tak během hyperinzulinového euglykemického clampu. Vlivem inzulinové rezistence nedochází k supresi lipolýzy ani oxidace lipidů. Podle Randleovy teorie o kompetici substrátů zvýšená utilizace mastných kyselin inhibuje glykolýzu i oxidaci glukózy. V současné době však některé studie prokazují, že při inzulinové rezistenci dochází ke zvýšení reesterifikace mastných kyselin oproti oxidaci lipidů, která se v průběhu hyperinzulinového clampu nemění a současně nedochází k vzestupu utilizace glukózy za podmínek stimulovaných inzulínem (postprandiálně). Tento stav metabolické inflexibility může být spojen se zvýšenou akumulací triacylglycerolů ve svalové tkáni při inzulinové rezistenci. Metabolickou inflexibilitu jsme našli také u diabetiků 1. typu se sekundární inzulinovou rezistencí. Význam těchto patofyziologických změn není plně objasněn a v literatuře nalezneme málo dat, která by hodnotila intervence s cílem ovlivnit tuto inflexibilitu s ohledem na chronické komplikace diabetes mellitus.

Klíčová slova: metabolická inflexibilita, inzulinová rezistence, Randleův cyklus, diabetes mellitus

SUMMARY

In lean healthy subjects, skeletal muscle displays substantial metabolic flexibility, which means the capacity to switch from lipid oxidation and high rates of free fatty acids uptake during fasting to the suppression of lipid oxidation and increased glucose uptake, oxidation and storage during insulin stimulated conditions. In obese and type 2 diabetes mellitus patients with insulin resistance, the concept of metabolic inflexibility has been described, which characterized by higher lipid oxidation both during fasting and insulin stimulated conditions during hyperinsulinemic euglycemic clamp. Lipolysis and lipid oxidation are not sufficiently suppressed in insulin resistance. According to Randle theory of substrate competition, higher free fatty acids utilization reduce glucose oxidation. Recent studies indicate, that skeletal muscle is disposed towards lipid reesterification rather than lipid oxidation, which remain unchanged, but glucose oxidation is not increased during insulin stimulated conditions or in postprandial state. This state of metabolic inflexibility could contribute to the accumulation of lipid products in muscle as has been observed in insulin resistance. The importance of this pathophysiological changes has not been fully evaluated. There are only a few data in the literature dealing with intervention influenced the metabolic inflexibility in connection with chronic complications of diabetes.

Key words: metabolic inflexibility, insulin resistance, Randle cycle, diabetes mellitus

Inzulinová rezistence (IR) v metabolismu glukózy je běžným nálezem u diabetiků 2. typu a u obézních jedinců. IR je pravděpodobně základní z řady klinických, biochemických a humorálních odchylek, které souhrnně označujeme jako metabolický syndrom, do kterého zahrnujeme dále esenciální hypertenzi, dyslipoproteinemii, viscerální obezitu, endotelovou dysfunkci a další odchylky (Reaven et al. 1988). IR hraje zásadní roli v progresi aterosklerózy a je spojena s vyšší kardiovaskulární mortalitou a morbiditou (Haffner et al. 1998, Laakso et al. 1997).

Z hlediska intracelulárního metabolismu glukózy je při inzulinové rezistenci u diabetes mellitus 2. typu snížena jak inzulínem stimulovaná oxidativní, tak neoxidativní utilizace glukózy, ačkoli kvantitativně je podstatně významnější pokles neoxidativního metabolismu, jak bylo prokázáno hodnocením substrátové utilizace kombinací hyperinzulinového euglykemického clampu a nepřímé kalorimetrie (DeFronzo et al. 1992). Diabetes mellitus 2. typu je spojen s některými abnormalitami v metabolismu lipidů, mezi které řadíme:

- a) zvýšení volných mastných kyselin,
- b) inzulínovou rezistencí navozenou poruchu suprese lipolýzy,
- c) sníženou clearance volných mastných kyselin během hyperglykemie (Kelly et al. 2000, Simonenau et al. 1997, Pelikánová 2003).

Navíc tuková tkáň produkuje řadu hormonů (adipocytokiny, cytokiny atp.), jejichž vzájemná interakce je v současné době velmi zkoumána ve vztahu k patogenezi metabolického syndromu, diabetes mellitus a aterosklerózy.

Významného pokroku bylo v posledních letech dosaženo v poznání molekulárních mechanismů, které zajišťují přenos signálu vzniklého po vazbě inzulínu na inzulínový receptor na nitrobuněčné efektorové systémy (inzulínová signální kaskáda) a zahrnují kaskádu fosforylačně-defosforylačních řady signálních molekul. Po fosforylaci substrát inzulínového receptoru 1-4 (IRS 1-4) se signalizace ubírá dvěma základními směry, jejichž pojitkem je fosfatidylinositol 3-kináza (PI 3-kináza) a Ras komplex. A) PI 3-kináza se cestou aktivace dalších kináz jako je proteinkináza B (PKB/Akt) a atypické proteinkinázy C (PKC) podílí na aktivaci enzymů proteosyntézy a aktivaci glukózových transportérů. B) Ras je skupina GTP vázajících proteinů, které odpovídají za aktivaci řady serin/treonin kináz, jako je cytoplazmatická serin kináza (Raf), mitogén aktivující protein kináza (MAP), MEK a serin kináza p90 S6. Cestou Ras komplexu jsou zajištěny mitogenní účinky inzulínu, syntéza glykogenu a lipidů (Khan et al. 1994). Signalizace je modulována řadou humorálních a metabolických faktorů, které mohou stát v pozadí IR. Jedním z mnoha faktorů mohou být znovu neesterifikované mastné kyseliny (NEMK), které by mohly přímo ovlivňovat aktivitu PKC, která je aktivována diacylglyceroly (DAG) a účastní se řady procesů spojených s IR a diabetes mellitus 2. typu (Itani et al. 2002). Tato inzulínová signalizační kaskáda je přítomna nejen v inzulín-dependentních tkáních, ale i v buňkách, které jsou považovány za nezávislé na inzulínu. Dosud nejsou molekulární mechanismy inzulínové rezistence plně objasněny, ale pravděpodobně je přítomna dysregulace účinků inzulínu a genetická determinace s různými fenotypickými projevy.

U obézních a diabetiků 2. typu je příčina IR multifaktoriální, zahrnující změny hormonálních a enzymatických reakcí, změny transportních mechanismů, dostupnosti substrátů, změny krevního průtoku a další vlivy, jako jsou fyzická aktivita, hmotnost a složení stravy (Simoneau et al. 1997). IR dělíme na primární, která je charakterizována genetickou dispozicí, nebo sekundární, která je důsledkem hormonálních či metabolických změn. U diabetiků 2. typu je přítomna sekundární inzulínová rezistence, která komplikuje metabolickou situaci (Reaven 1988, Yki-Jarvinen et al. 1995) a vzniká nejčastěji vlivem hormonálních a metabolických (např. hyperinzulinemie, hyperglykemie, zvýšení volných mastných kyselin, účinek kontraregulačních hormonů, protilátky proti receptorům a inzulínu, amylin a další vlivy) (DeFronzo et al. 1992). Sekundární IR může navodit všechny popsané receptorové i postreceptorové abnormality, které však mohou být plně reverzibilní.

Porucha účinku inzulínu a inzulínová rezistence je popsána i u diabetiků 1. typu (De Fronzo et al. 1982, Ebeling et al. 1998, Wohl et al. 2004) a to i u nemocných bez orgánových komplikací s uspokojivou metabolickou kompenzací (Ekstrand et al. 1998). U diabetiků 1. typu je přítomna porucha účinku inzulínu i při dávkách inzulínu (35 ± 2 U/den), které v klinickém kontextu nesvědčí pro IR. IR není typickým znakem diabetes mellitus 1. typu (DeFronzo et al. 1982). Na vzniku IR u diabetiků 1. typu se pravděpodobně podílí aplikace inzulínu do periferních tkání, kdy aplikovaný inzulín se v první fázi nedostává do portální krve a do jater (Hother-Nilsen et al. 1987). Při vzniku inzulínové rezistence u diabetiků 1. typu se mohou podílet některé faktory (redukce transportu glukózy v kosterním svalu, redukce krevního průtoku svalem, zvýšená jaterní produkce glukózy, dále i neuspokojivá metabolická kompenzace diabetu). Stejně jako u diabetiků 2. typu je i u diabetiků 1. typu postižena jak oxidativní, tak neoxidativní spotřeba glukózy (Yki-Jarvinen et al. 1987). Jsou publikovány studie, které prokazují, že vyšší denní dávka inzulínu (více jak $25-55 \mu\text{U/ml}$) je spojena s vyššími titry protilátek proti inzulínu, které mohou být další příčinou IR u diabetiků 1. typu. (Berson et al. 1959, Kumar et al. 1979, De Fronzo et al. 1982).

METABOLICKÁ INFLEXIBILITA

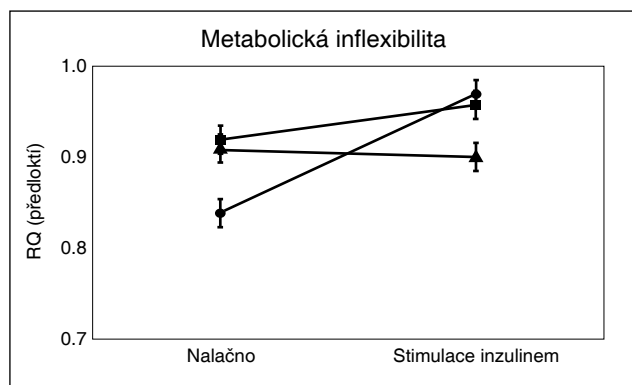
V podmínkách nalačno je oxidace mastných kyselin hlavním zdrojem energie pro kosterní sval u zdravých štíhlých jedinců. Za podmínek inzulín stimulovaných (postprandiálních) dochází k supresi oxidace lipidů a současně se zvyšuje vychytávání (uptake), oxidace a ukládání glukózy (Saltin et al. 1983, Kelly et al. 1990, Kelly et al. 1994, Kelly et al. 2002). Tato tzv. metabolická flexibilita neboli schopnost přesmyku mezi utilizací substrátů nalačno a postprandiálně je významná pro krytí energetických potřeb, efektivní tvorbu zásob a využití energie.

Obecně, za podmínek nalačno přechází sval na dominantní zdroj energie ve formě mastných kyselin. Při jejich nadbytku dochází ke snížení glykolýzy cestou akumulace acetyl CoA a citrátu, což vede k inhibici pyruvát dehydrogenázy a fosfofruktokinázy, tím dochází ke zvýšení glukóza 6-fosfátu, který blokuje hexokinázu a snižuje se oxidace a vstup glukózy do buněk (Randle 1986). Většina studií, které dokladovaly vzájemnou kompetici substrátů, byla založena na pokusech na zdravých jedincích. V současné době je význam tohoto cyklu zpochybněn za podmínek inzulínové rezistence. Experimentální studie na zvířecích modelech neprokázaly snížený inzulínem stimulovaný odsun glukózy po přidání mastných kyselin (Kelly et al. 2000). IR se projevuje redukcí účinku inzulínu v metabolismu glukózy, ale současně je snížena suprese lipolýzy a zvýšena oxidace lipidů. Neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) jsou vychytávány svalem a inkorporovány do tukových částic ve svalu (asi 70-90%) a dochází k jejich rychlé esterifikaci do triacylglycerolů (Kelly et al. 2001). Bylo prokázáno, že chronické i akutní zvýšení NEMK snižuje inzulínem stimulovanou utilizaci glukózy, syntézu glyko-

geny a aktivitu fosfatidylinositol 3-kinázy (Boden et al. 1999, Goodpaster et al. 1998). Zvýšené koncentrace NEMK při IR v cirkulaci mohou být důsledkem zvýšené mobilizace MK z triglyceridů tukové tkáně, snížené uti-
lizace ve tkáních nebo kombinací těchto procesů. Při IR byla popsána dysregulace lipoproteinových lipáz (Roden et al. 1996, Stumwoll et al. 2000).

Významnou roli by mohla hrát i porucha vazebného proteinu pro MK (fatty acid binding protein - FABP), který je zodpovědný za transport MK ve tkáních k mitochondriím (pro oxidaci mastných kyselin), k tukovým kapénkám (pro ukládání), do jádra (regulace transkripce enzymů lipidového metabolismu) a FABP má pravděpodobně i vlastnosti „scavangera“ volných radikálů (Storch et al. 2000). Ukládání tuku mimo tukovou tkáň (v kosterním svalu, v játrech, srdci, buňkách Langerhansových ostrůvků) je jednou z diskutovaných teorií vzniku IR a jejích projevů. Kromě kvantitativních změn mastných kyselin je řada experimentálních i in vivo dokladů o tom, že při patofyziologii IR se uplatňují i změny složení MK v sérových a tkáňových lipidech. IR je spojena s nižší aktivitou glykogensyntetázy a sníženou tvorbou glykogenu (DeFronzo et al. 1992, Yki-Jarvinen et al. 1995). U zdravých jedinců bez přítomnosti inzulinové rezistence jsou hlavním substrátem energie pro kosterní sval za podmínek nalačno volné mastné kyseliny. Odsun volných mastných kyselin do svalu za těchto podmínek je značný, jak dokazují studie, při kterých byl nalezen respirační koeficient $0,76 \pm 0,02$, svědčící, že lačná oxidace lipidů představuje až 80% spotřebu O₂ na předloktí (Kelly et al. 2000, Kelly et al. 2001). Vztah metabolických pochodů a adipocytokinů (adiponektin, resistin, TNF-alfa, a další) při inzulinové rezistenci není dosud plně objasněn.

U diabetiků 2. typu a obézních jedinců je v podmínkách nalačno oxidace glukózy zvýšená oproti hubeným zdravým jedincům, zatímco je snížena oxidace lipidů při zachování vychytávání mastných kyselin. Graf 1 popisuje změny za podmínek hyperinzulinového euglykemického clampu u zdravých jedinců, kdy dochází až k desetinasobnému zvýšení oxidace glukózy (RQ=1.00), zatímco u obézních a diabetiků jsou oxidace a vychytávání glukózy významně redukovány a prakticky se nemění ve srovnání s podmínkami nalačno (RQ=0,9) (Kelly et al. 2000). Tento jev metabolické inflexibility je pravdě-



Graf 1: Metabolická inflexibilita energetických substrátů nalačno a za podmínek inzulin stimulovaných u obézních (▲), diabetiků 2. typu (■) a zdravých jedinců (●) upraveno podle (Kelly et al. 2000), RQ (předloktí) – respirační koeficient měřen na předloktí.

podobně dalším klíčovým mechanismem, vedoucím ke zvýšené akumulaci lipidů ve svalové tkáni a mohl by se podílet na poruše metabolismu glukózy při inzulinové rezistenci (Kelly et al. 2000). Zvýšená oxidace glukózy nalačno negativně koreluje s inzulinovou senzitivitou, stejně jako vyšší oxidace lipidů během podmínek stimulo-
vaných inzulinem (Kelly et al. 2001).

U diabetiků a obézních jsou diskutovány mechanismy, kterými je metabolická inflexibilita manifestována:

1. porucha cefalické fáze inzulinové sekrece,
2. porucha na úrovni kosterního svalu v podmínkách nalačno a postprandiálně,
3. porucha postprandiálního odsunu mastných kyselin k ukládání,
4. mitochondriální porucha metabolismu mastných kyselin (Kelly et al. 2002, Storlien et al. 2004).

Na podkladě výsledků studií z posledních let se předpokládá, že excesivní akumulace lipidů v svalové tkáni je způsobena defektem v oxidaci lipidů a nikoli zvýšeným odsunem volných mastných kyselin. V současné době se však poukazuje na možnost zvýšené akumulace lipidů ve svalové tkáni, která se může podílet na rozvoji IR (Bachman et al. 2001). Akumulace lipidů ve svalové tkáni je podle výsledků mnoha studií způsobena snížením oxidace a zvýšením esterifikace mastných kyselin (Ruderman et al. 1999, Simonenau et al. 1997).

U obézních a diabetiků 2. typu je pravděpodobnou příčinou snížené oxidace mastných kyselin porucha vstupu acylCoA do mitochondrie v důsledku inhibice karnitin-palmitoyl-transferázy malonylem CoA (CPT) a tato inhibice vede ke snížení oxidativních pochodů v mitochondrii (Ruderman et al. 1999, Kelly et al. 2001). Právě aktivita karnitin-palmitoyl transferázy je při IR snížena, což má vztah v metabolismu mastných kyselin, ale ovlivňuje i metabolismus glukózy (Kelly et al. 2000, Ruderman et al. 1999). Akumulace dlouhých řetězců acyl Coa může negativně působit na přenos signálu přes inzulinové receptory cestou aktivace proteinkinázy C. Význam této kinázy spočívá ve schopnosti inaktivovat inzulinový receptor a jeho podjednotky fosforylační některých z jeho serinových komponent (Kelly et al. 2001, Kelly et al. 2000). Z uvedeného vyplývá, že akumulace lipidů ve svalové tkáni je zodpovědná za snížení účinku inzulinu v řadě jeho metabolických drah. Zvýšené množství sérových lipidů při inzulinové rezistenci koreluje se závažností této redukce. Většina studií v této problematice je zaměřena na diabetiky 2. typu, přítomnost metabolické inflexibility je rovněž popsána u diabetiků 1. typu (graf 2 a 3) (Wohl et al. 2004).

Kontroverzní je však nález u diabetiků 1. typu oproti diabetikům 2. typu, kdy zvýšený obsah lipidů ve svalové tkáni nekoreluje s inzulinovou senzitivitou (Ebeling et al. 1998). Na modelech krys závislých na inzulinu a u diabetiků 1. typu se prokázalo zvýšení lipolýzy, zvýšení hladiny volných mastných kyselin, zvýšení sérových hladin triglyceridů, zvýšení hladiny ketolátů a pokles respiračního kvocientu (Kelly et al. 2000).

Význam metabolické inflexibility není dosud dostatečně klinicky zhodnocen, podle některých autorů jde jen o fenotypický projev modelu inzulinové rezistence. V jedné studii se parametry substrátové uti-
lizace dávají

do souvislosti s progresí porušené glukózy tolerance do manifestního diabetes mellitus (Mensink et al. 2001). Je prokázáno, že fyzická aktivita může tyto změny pozitivně ovlivnit, ale názory se v této problematice liší (Kelly et al. 2001, Simonen et al. 1999). V posledních letech byla publikována data, která prokazují, že váhová redukce a zvýšení fyzické zátěže může mít význam v prevenci diabetes mellitus. Dosud není dořešeno, zda-li tyto postupy ovlivní některé metabolické odchylky, například pozitivní snížení tíže inzulínové rezistence, která je rizikovým faktorem aterosklerózy. V posledním období jsou publikovány práce, že fenomén metabolické inflexibility by mohl být významný v patogenezi metabolického syndromu. Klíčovou otázkou zůstává, jak obézní a diabetici ztrácejí tuto schopnost a jak ji lze ovlivnit terapeuticky? (Storlien et al. 2004)

Studie s thiazolidindiony (PPAR γ) prokázaly, že podání těchto preparátů může vést ke snížení míry inzulínové rezistence a zlepšení metabolické kompenzace diabetu u nemocných s diabetes mellitus 2. typu. Práce z posledních let prokázaly, že v experimentu na krysích modelech podávání agonistů PPAR α/γ je účinné ve snížení metabolické inflexibility (Ljung et al. 2002). Účinnost těchto postupů, s ohledem na metabolickou inflexibilitu, není u obézních a diabetiků 2. typu v současné době zatím doložena. Rovněž není zhodnocen klinický význam poruchy oxidačních pochodů u nemocných s diabetes mellitus v kontextu genotyp/genotyp. Je třeba dalších

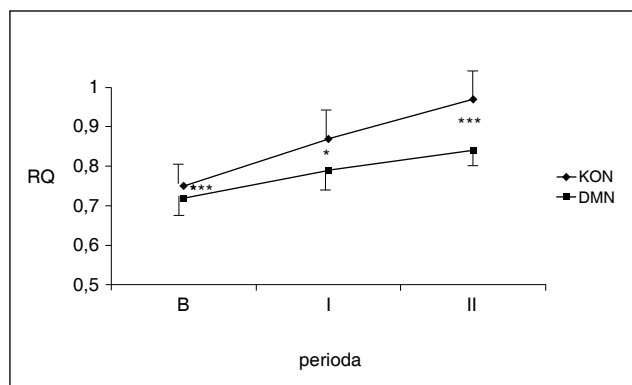
studií s cílem objasnit, zda intervence vedoucí ke snížení inzulínové rezistence vede ke zlepšení abnormálních metabolických cest při inzulínové rezistenci. Metabolická inflexibilita se jeví jako další významný faktor v patofyziologii energetického metabolismu a metabolismu glukózy při IR (Kelly et al. 2000).

Nelze vyloučit, že metabolická inflexibilita se může podílet na poruše substrátové utilizace u nemocných v kritickém stavu, zejména jde-li o dlouhotrvající stav, kdy dochází ke ztrátě fyziologické regulace kosterního svalu, tukové tkáně, β -buňek pankreatu a jater. Výsledkem, kromě dalších odchylek, je porucha oxidace lipidů za podmínek lačných i postprandiálních (inzulínem stimulovaných), neschopnost využít glukózu (oxidativně i neoxidativně), a tím nemusí vždy dojít k efektivnímu využití dodávaných substrátů ani dodávané energie. Thiazolidindiony jsou v současné době velmi studovány i na úrovni experimentálních septických stavů in vitro i in vivo s cílem ovlivnit míru zánětu při sepsi (Zingarelli 2005). V současné době ale nelze zhodnotit, jaký bude mít význam použití thiazolidindionů v klinické praxi z hlediska intenzivní medicíny. Spojení metabolických a protizánětlivých účinků thiazolidindionů je však potenciálně velmi slibné a je nutno vyčkat dalších výsledků experimentálních i klinických studií v problematice inzulínové rezistence nejen u diabetiků, obézních, ale i nemocných v kritických stavech.

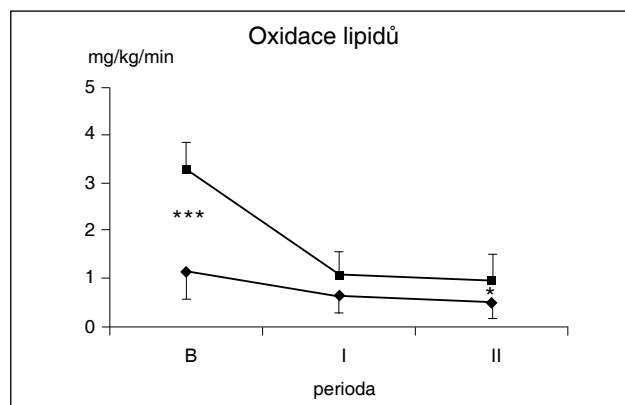
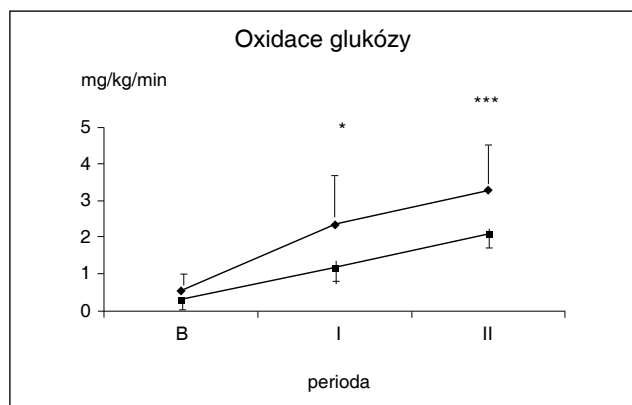
Práce podpořena VZ MZO 000 23001 a grantem NR 7880-3

LITERATURA:

1. Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, Haap M, Maier T, Loviscach M, Stumvoll M, Claussen CD, Schick F, Haring HU, Jacob S. Effect of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 2001; 50: 2579 – 2584.
2. Berson SA, Yalow RS. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody. *J Clin Invest* 1959; 38: 1996-2000.
3. Boden G. Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc assoc Amer Phys.* 1999; 111: 241-248.
4. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 1992; 15: 318-368.



Graf 2: Změny RQ v průběhu clampu u diabetiků 1 typu (DMN ■) a zdravých jedinců (KON ◆) za bazálních podmínek (B) a během dvoustupňového euglykemického hyperinzulinového clampu při rychlosti podávání inzulínu 1 (I) a 10 mU/kg.min (II). Upraveno podle (Wohl et al. 2004).



Graf 3: Změny oxidace glukózy a lipidů u diabetiků 1 typu (DMN ■) a zdravých jedinců (KON ◆) za bazálních podmínek (B) a během dvoustupňového euglykemického hyperinzulinového clampu při rychlosti podávání inzulínu 1 (I) a 10 mU/kg.min (II). Upraveno podle Wohl et al. 2004.

5. DeFronzo RA, Hendler R, and Simonson D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1982; 31: 795-801.
6. Ebeling P, Gustavsson BE, Tuominen JA, Koivisto VA. Intramuscular triglyceride content is increased in IDDM. *Diabetologia* 1998; 41: 111-5.
7. Ekstrand AV, Groop PH, Grönhagen-Riska C. Insulin resistance precedens microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 3079-3083.
8. Goodpaster BH, Kelley DE. Role of muscle in triglyceride metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 231-236.
9. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart diseases in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339: 229-234.
10. Hother-Nielsen O, Schmitz O, Bak J, Beck-Nielsen H. Enhanced hepatic insulin sensitivity, but peripheral insulin resistance in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1987; 30: 834-840.
11. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and I κ B- α . *Diabetes* 2002; 51: 2005-2011.
12. Kahn RC. Banting lecture: Insulin action, Diabetogenes, and the cause of type 2. diabetes. *Diabetes* 1994; 43: 1066-1084.
13. Kelly DE, Simonenau J-A. Impaired free fatty acids utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent Diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1994; 94: 2349-2356.
14. Kelly DE, Mandarino LJ. Perspectives in Diabetes. Fuel selections in human skeletal muscle in insulin resistance. A reexamination. *Diabetes* 2000; 49: 677-683.
15. Kelly DE. Skeletal muscle triglycerides: an aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Ann NY Acad Sci* 2002; 967: 135-45.
16. Kelly DE, Reilly J, Veneman T, Mandarino LJ. Effect of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. *Am J Physiol* 1990; 258: E 923-E929.
17. Kumar D. Immunoreactivity of insulin antibodies in insulin-treated diabetics. *Diabetes* 1979; 28: 994-1000.
18. Laakso M, Lehto S. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Rev* 1997; 5: 294-315.
19. Ljung B, Bamberg K, Dählöf B, Kjellstedt A, Oakes ND, Östling J, Svensson L, Camejo G. AZ 242, a novel PPAR α/γ agonist with beneficial effects on insulin resistance and carbohydrate and lipid metabolism in ob/ob mice and in obese Zucker rats. *J Lipid Res* 2002; 43: 1855-1863.
20. Mensink M, Blaak EE, van Baak MA, Wagenmakers AJ, Saris WH. Plasma free fatty acids uptake and oxidation are already diminished in subjects at high risk for developing type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 2548-2554.
21. Pelikánová T. Metabolický syndrom. *Vnitřní lékařství* 2003; 49: 900-906.
22. Randle PJ. Fuel selection in animals. *Biochem Soc Trans* 1986; 14: 799-806.
23. Reaven GM. Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
24. Roden, M, Price, TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Hulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996; 97: 2859-2865.
25. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA. Malonyl Coa, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276: E1-18, 1999.
26. Saltin B, Gollnick PD. Skeletal muscle adaptability. Significance for metabolism and performance. In: Peachy LD, Adrian RH, Geiger SR eds. *Handbook of Physiology.*, Baltimore: Williams & Wilkins, 1983; 555-631.
27. Simoneau JA, Kelly DA. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl. Physiol* 1997; 83: 166-171.
28. Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* 1999; 13: 2051-2060.
29. Storch J, Thumser A. The fatty acid transport function of fatty acid binding proteins. *BBA* 2000; 1486: 28-44.
30. Storlien L, Oakes ND, Kelly DE. Metabolic flexibility. *Proceedings of Nutrition Society* 2004; 63: 363-368.
31. Stumvoll M, Jacob S. Multiple sites of insulin resistance: muscle, liver and adipose tissue. *Exp. Clin. Endocrinol.* 1998; 107: 107-110.
32. Yki-Jarvinen H. Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia* 1995; 36: 1378-1388
33. Yki-Jarvinen H, Helve E, Koivisto VA. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes: *Diabetes* 1987; 36: 892-96.
34. Wohl P, Wohl P, Girman P, Pelikánová T. Inflexibility of energy substrate oxidation in type 1. *Diabetes. Metabolism* 2004; 53: 655-659
35. Zingarelli B, Cook JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* 2005; 23(5): 393-9.

MUDr. Petr Wohl
Centrum diabetologie IKEM
Klinika diabetologie
Vídeňská 1958/4, 142 00, Praha 4
tel: 261 363 375
e-mail: petr.wohl@medicon.cz

Inzulín zlepšuje koronární perfúzi u diabetiků s ischemickou chorobou srdeční – možné důsledky pro praxi

MUDr. PETR WOHL

Centrum diabetologie IKEM

NEUMM 2006; 1* 19

Nemocní s diabetes mellitus 2. typu jsou ve vysokém riziku kardiovaskulárních příhod. Studie autorů Lautamäki a spol. publikovaná počátkem roku v časopise *Diabetes* hodnotila vliv inzulínu na myokardiální perfúzi u 43 diabetiků 2. typu s rozvinutou formou ischemické choroby srdeční. U zdravých jedinců zlepšuje podání inzulínu průtok koronárním řečištěm, ale u diabetiků 2. typu tento jev dosud nebyl popsán. Průměrný věk nemocných byl (63 ± 7 roků), metabolická kompenzace diabetu hodnocená hladinou glykovaného hemoglobinu ($7,1 \pm 0,9$ %). Průtok krve myokardem byl hodnocen za klidových podmínek a během zátěže metodou SPECT (single-photon emission-computed tomography), echokardiografií a selektivní koronarografií. Měření myokardiálního průtoku bylo provedeno za lačných podmínek a během inzulín stimulovaných podmínek v průběhu hyperinzulinového euglykemického clampu ($n=43$) a dále během adenosinem ($140 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 7 min.) indukované hyperémie ($n=6$) s použitím PET (positron emission tomography) a ^{15}O – značené H_2O . Myokardiální průtok byl statisticky významně snížen v ischemických oblastech ve srovnání s neischemickými částmi myokardu ($p < 0,0001$) a po aplikaci inzulínu došlo k vzestupu průtoku ve srovnání s klidovou hodnotou ($p < 0,0001$). Inzulín zvýšil myokardiální průtok o 13 % v ischemických oblastech a o 22 % v neischemických oblastech. Inzulín tedy zlepšuje koronární perfúzi, a to jak v ischemic-

kých, tak v neischemických oblastech myokardu u diabetiků 2. typu s ischemickou chorobou srdeční. Tyto výsledky by mohly částečně podporovat pozitivní výsledky aplikace inzulínu u akutních koronárních syndromů klinických studiích.

Jaký by mohl být význam výsledků této studie pro praxi?

Intenzivní inzulínová léčba a léčba hyperglykémie je v současné době velmi studována u diabetiků i nediabetiků. Diabetici jsou ve stejné rizikové skupině ICHS jako nediabetici po prodělané koronární příhodě. Hyperglykémie je prokázaným nezávislým prediktorem mortality. DIGAMI-1 studie (Diabetes mellitus insulin-glucose infusion in acute myocardial infarction) prokázala snížení mortality a morbidity v intenzivně léčbě skupině inzulínem-glukózou-kaliem (GIK infuze). Studie, která podpořila výsledky DIGAMI -1, byla CREATE-ECLA, ve které byla snížena rekurence ischemie u skupiny léčené GIK infuzí. DIGAMI-2 však nepotvrdila vliv léčby inzulínem na zlepšení dlouhodobé prognózy diabetiků s ICHS, účinek této infuze byl hodnocen jako neutrální. V studii Lautamäkiho a spol. byl navíc efekt inzulínu na myokardiální průtok krve aditivní i přes současně aplikovanou interferující medikaci (betablokátory). Z praktického hlediska je kontrola glykémie a léčba inzulínem u akutních koronárních syndromů stále jedním ze základních postupů, které se mohou podílet na zlepšení prognostických ukazatelů.

LITERATURA

1. Riika Lautamäki at al. *Insulin improves myocardial blood flow in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. Diabetes* 55: 511-516, 2006

Inzulínová rezistence a blokátory angiotensin II typ 1 receptoru (potenciální metabolické účinky)

MUDr. PETR WOHL

Centrum diabetologie IKEM

NEUMM 2006; 1* 19-23

Inzulínová rezistence (IR) hraje zásadní roli v progresi aterosklerózy a je spojena s vyšší kardiovaskulární mortalitou a morbiditou (*Haffner at al. 1998, Laakso at al. 1997*). IR v metabolismu glukózy je běžným nálezem u diabetiků 2. typu a u obézních jedinců. IR je pravděpodobně základní z řady klinických, biochemických a humorálních odchylek, které souhrnně označujeme jako metabolický syndrom, do kterého zahrnujeme esenciální hypertenzi, dyslipoproteinémii, viscerální obezitu, endotelovou dysfunkci a další odchylky (*Reaven at al. 1988*). V roce 2005 byla vypracována nová klasifikace metabolického syndromu, kdy byl dán zřetel na abdominální obezitu a poruchy glukózové homeostázy. Nově byla upravena hodnota lačné glykémie, která byla snížena na $5,6 \text{ mmol/l}$ z původních $6,1 \text{ mmol/l}$ (*IDF 2005*). Velmi významnou součástí je hypertenze, která je v současné době

intenzivně studována s ohledem na patogenetické mechanismy inzulínové rezistence, diabetes mellitus a kardiovaskulární choroby a jejich vzájemné vztahy.

Studie s inhibitory angiotenzinového systému inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE inhibitory) a blokátory angiotenzin II typ 1 receptoru (ABR blokátory) z posledního období prokázaly snížení incidence diabetes mellitus 2. typu (*Grassi at al 2002, Linholm at al. 2003, Dahlof at al 2002, Kurtz at al 2005*). Mechanismus, který vede ke snížení výskytu diabetes mellitus 2. typu v těchto studiích, není v současné době znám. Potenciálním mechanismem se jeví parciální agonistická aktivita PPAR-gamma, některých ABR inhibitorů, která by mohla příznivě ovlivnit inzulínovou rezistenci, hladiny lipidů a některé další metabolické pochody zodpovědné za vznik cévních komplikací (*Pershadsingh at al 2005, Benson at al. 2004*). Zhodnocení vlivu léčby ACE a ABR blokátory na zlepšení inzulínové rezistence je literárně kontraverzní, v různých studiích jsou použity odlišné metody verifikace inzulínové rezistence, ale použití hyperinzulinového euglykemického clampu jako zlatého standardu není běžné (*Grassi at al 2003, Linholm at al 2003, Deroza at al 2004, Vitale at al 2005, Pershadsingh at al 2005, Fogari at al. 1998, Fogari at al 2001, Paolisso at al. 1997*). Experimentální studie s ACE

a ABR blokátorů poukázaly na možné ovlivnění metabolických pochodů cestou PPAR-gamma. Význam těchto dat je v současné době velmi důležitý, protože bude-li dokázán jejich potenciální metabolický účinek, bude nutné změnit strategii léčby diabetu, hypertenze i metabolického syndromu.

ABR ovlivnění PPAR-gamma receptorů

PPAR-gamma jsou nukleární receptory, které mají vliv na genovou expresi v metabolismu lipidů a glukózy, v současné době jsou již prokázány účinky tzv. thiazolidindionů (TZD). Studie s TZD prokázaly, že podání těchto preparátů může vést ke snížení míry inzulínové rezistence a zlepšení metabolické kompenzace diabetu u nemocných s diabetes mellitus 2. typu. Nevýhodou TZD je častý vzestup hmotnosti po zahájení léčby, sklon k retenci tekutin a tvorbě otoků (Schupp at al 2005). Aktivace syntetických agonistů PPAR-gamma TZD vedla ke zřetelnému zlepšení inzulínové sensitivity, poklesu lačné glykémie, lačné insulinémie a hladiny sérových triacylglycerolů (Staels at al 2005). Rozdíl úplných agonistů PPAR-gamma TZD a ABR je dán i tím, že parciální agonismus PPAR-gamma je spojen se snížením celkové genové exprese; je tedy ovlivněn menší počet cílových genů regulovaných PPAR-gamma. (Benson at al 2004). Přesné mechanismy, experimentálně zodpovědné za metabolické účinky parciálních agonistů PPAR-gamma, nejsou známy.

V posledním období bylo publikováno, že některé ABR blokátory (telmisartan, irbesartan, losartan) mohou mít podobnou strukturální homologii s PPAR-gamma ligandem pioglitazonem, a tím mohou aktivovat tyto nukleární receptory (Benson at al. 2004).

V experimentálních studiích s ABR blokátory bylo prokázáno, že parciální aktivace PPAR-gamma je nezávislá na jejich blokující aktivitě k angiotenzinu typu 1 receptoru. PPAR-gamma funguje jako transkripční regulátor v tukové tkáni, kde reguluje četné geny zahrnuté do metabolismu lipidů a glukózy (Schupp at al. 2006).

Potencionální mechanismy, kterými by mohly být ABR zodpovědné za antiaterosklerotický účinek, jsou:

1. Vliv na inzulínovou signalizační kaskádu, zlepšení inzulínové sensitivity.
2. Vliv na zlepšení průtoku krve tkáněmi.
3. Snížení oxidačního stresu a protizánětlivé účinky.
4. Snížení sympatické aktivity.
5. Vliv na adipogenezu, snížení hladiny mastných kyselin a triacylglycerolů, zvýšení inverzního transportu cholesterolu, snížení HDL cholesterolu.
6. Snížení krevního tlaku. (Kurtz at al. 2004)

Vliv ABR na poruchy substrátové utilizace při inzulínové rezistenci nebyl klinicky ani experimentálně dosud zhodnocen.

Telmisartan se jeví jako neúčinnější agonista PPAR-gamma, ze skupiny ABR (Benson at al 2004). Výhodou je, že tento účinek je zprostředkován již běžnými terapeutickými dávkami oproti losartanu (Kurtz at al 2004, Schupp at al. 2006). Experimentální studie s inzulín-rezistentními jedinci,

obezilou, diabetes mellitus 2. typu identifikovaly defekt mitochondriální oxidativní fosforylace, která je asociována se zvýšenou akumulací lipidů a triacylglycerolů ve svalové tkáni (Kelly at al. 2002). Ze skupiny ABR je telmisartan schopen zvýšit expresi PKC 1 genu, který kóduje fosfoenolpyruvát-karboxykinázu (PEPCK-C). PEPCK-C je zodpovědná za snížení hladiny mastných kyselin mechanismem zvýšení syntézy glycerolu a opětovné esterifikace mastných kyselin cestou aktivace PPAR-gamma (Tordjann at al 2003, Benson at al 2004). Navíc je popsáno, že telmisartan snižuje o 60 až 70 % expresi acetyl-CoA-karboxylázy 2 (ACC2); tato inhibice vede k současnému snížení syntézy mastných kyselin a ke zvýšení jejich oxidace (Kelly at al 2002, Tordjann at al. 2003). Právě ACC2 je jedním z hlavních regulátorů metabolismu mastných kyselin ve svalu, tento enzym zvyšuje koncentraci malonyl CoA, který je inhibitorem karnitin palmitoyltransferázy, klíčového enzymu regulujícího vstup mastných kyselin do mitochondrie a jejich využití. Zajímavým nálezem je, že pioglitazon ani irbesartan neměl vliv na ACC2 ve srovnání s telmisartanem. (Benson at al 2004). Efekt telmisartanu byl však prokázán ve skupině potkanů dietně intervenovaných dietou s vysokým obsahem tuku a sacharidů, ale nikoliv ve skupině myši typu Zucker, tedy u geneticky determinovaného modelu mutace leptinového receptoru. Zde se nabízí hypotéza, zda by mohl být benefit léčby telmisartanu závislý na intaktním leptinovém signalizačním systému (Benson at al 2004). *In vivo* ale chybí dosud jasné důkazy o účinku telmisartanu na inzulínovou sensitivitu, metabolismus glukózy a lipidů. Zatím bylo publikováno několik málo studií, ve kterých se zlepšily parametry lipidového metabolismu, kdy došlo k poklesu sérových hladin lipidů (Derosa at al 2004, Benson at al 2004, Vitale at al 2005). V jiné studii došlo k významnému poklesu glykovaného hemoglobinu (HbA1c) při použití relativně nízké dávky telmisartanu (20 nebo 40 mg/den) ve srovnání s candesartanem (8 mg/den); rovněž byl významný pokles lačné insulinémie u diabetiků 2. typu (Honjo at al 2005). Studie na 18 nemocných s diabetes mellitus 2. typu léčených deriváty sulfonylurey a hypertenzi prokázala vzestup hladiny adiponektinu, pokles hs-CRP, lačné insulinémie a lipidů ve skupině telmisartanu (40 mg/den) oproti skupině léčených valsartanem (80 mg/den) a candesartanem (8 mg/den) (Miura at al 2005).

Losartan je dalším ze skupiny ABR, u kterých je prokázána agonistická aktivita PPAR-gamma (Schupp at al 2004, Benson at al 2004). Z velké randomizované a multicentrické studie LIFE vychází snížení výskytu diabetes mellitus o 25 %, ale v této studii byl současně použit betablokátor se suspektním prodiabetickým účinkem (Dalhoff at al 2002). Mechanismus, kterým dochází ke snížení výskytu diabetes mellitus, není dosud znám, ale právě potencionální ovlivnění PPAR-gamma se jeví jako možný mechanismus. Zajímavým nálezem bylo zjištění, že losartan, který je aktivně metabolizován v játrech cestou cytochrom P450 (isoenzym CYP2C9), se rozpadá na dva základní metabolity – EXP3174 a EXP3179. EXP3174 má až desetinásobnou afinitu k AT1 receptoru ve srovnání s vlastním losartanem, ale EXP3179 tuto vlastnost postrádá. Soudí se, že právě EXP3179 může mít pleotropní účinky a parciální agonistickou aktivitu PPAR-gamma. EXP3179 je dále molekulárně podobný indometacinu (inhibitor cyklooxygenázy-COX), který je rovněž aktivátorem PPAR-gamma (Schupp at al 2006). Losartan rovněž zvyšuje hladinu

sérového adiponektinu u nemocných s esenciální hypertenzí a tímto možným mechanismem vede ke zlepšení inzulínové rezistence (Koh *et al.* 2004). Studie hodnotící vliv losartanu na zlepšení inzulínové sensitivity jsou ale dosud kontraverzní (Fogari *et al.* 1998, Fogari *et al.* 2001, Paolisso *et al.* 1997). Z klinického hlediska je důležité, že v případě losartanu je dosaženo aktivace PPAR-gamma jen ve vysokých koncentracích, proto se jeví tato hypotéza v případě losartanu nejistá v otázce snížení výskytu diabetu, ale tato problematika není dořešena (Schupp *et al.* 2006, Dalhof *et al.* 2002, Scheen 2004, Schupp *et al.* 2004).

Irbesartan v experimentálním modelu je spojen se zlepšením některých metabolických parametrů, které nacházíme u inzulín-rezistentních stavů, a to zejména snížení plazmatické hladiny inzulínu a zvýšení hladiny adiponektinu (Clasen *et al.* 2005), ale nebyl pozorován efekt na hladiny plazmatických lipidů (Henriksen *et al.* 2001). Zlepšení účinku inzulínu se projevilo zvýšením aktivity glukózového transportéru GLUT-4 (Henriksen *et al.* 2001), a jsou další data, která prokázala zlepšení celotělového účinku inzulínu i účinku inzulínu na úrovni kosterního svalu (Sloniger JA *et al.* 2005). Klinické důkazy účinku irbesartanu dosud chybí.

Candesartan není rovněž dosud z hlediska metabolických účinků experimentálně ani klinicky plně zhodnocen. Studie ALPINE A CROSS hodnotily nepřímo vliv candesartanu na inzulínovou sensitivity. Ve studii CROSS bylo naznačeno zlepšení inzulínové sensitivity, v ALPINE byl zaznamenán signifikantní pokles výskytu diabetes mellitus u nemocných s hypertenzí, ale nebyl prokázán vliv na inzulínovou sensitivity. V žádné dosud publikované studii však nebyl použit hyperinzulinový euglykemický clamp k objektivnímu zhodnocení vlivu candesartanu na inzulínovou rezistenci, ale byl aplikován HOMA model, ve kterém došlo ke zlepšení parametrů (Grassi *et al.* 2003, Lindholm *et al.* 2003). Candesartan po přidání k fenofibrátu snižuje endoteliální dysfunkci, zánětlivé markery a hladinu triacylglycerolů u nemocných s hypertenzí (Koh *et al.* 2006).

Valsartan je další ze skupiny, u kterého byl prokázán vliv na snížení incidence diabetes mellitus. Studie VALUE srovnávala valsartan proti amlodipinu, který je obecně považován za metabolicky neutrální (Kjeldsen *et al.* 2004). Kontraverzní je skutečnost, že ani ve studii LIFE, ani ve studii VALUE nebyla zahrnuta intervenovaná skupina s placebem. Stále není jisté, jestli je snížení incidence diabetu způsobeno per se bloádou renin-angiotensinového systému nebo zda je způsobeno opožděným nástupem diabetes mellitus. Studie NAVIGATOR by měla mít jako primární cíl hodnotit vliv valsartanu nebo nateglinidu na výskyt diabetes mellitus u nemocných s porušenou glukózovou tolerancí.

Závěr

„Metabolická léčba“ hypertenze je velmi slibnou strategií v léčbě metabolického syndromu, diabetes mellitus a aterosklerózy. Nelze vyloučit, že právě účinek přes nukleární receptory PPAR-gamma je spojen se snížením závažných kardiovaskulárních ukazatelů ve velkých klinických studiích. Aktivace PPAR-gamma není klinicky zřejmě spojena jen

s antidiabetickými účinky, ale jsou prokázány i protizánětlivé účinky. Nelze tedy vyloučit, že ovlivnění metabolických a klinických parametrů by mohlo být spojeno s jiným mechanismem než přes PPAR-gamma (Zingarelli B). Podobně nelze konstatovat, který efekt ABR je spojen se snížením incidence diabetes mellitus. Další otázkou, která se nabízí, je možnost protichůdné kompetice mezi TZD a ABR. Hypoteticky možný aditivní efekt TZD a ABR by měl být do budoucna zhodnocen. Z dosavadních publikovaných dat vyplývá, že je nutné dalších dlouhodobých experimentálních a klinických studií (např.: NAVIGATOR, ONTARGET). Výhodou ABR jako metabolických modulatorů by mohla být i skutečnost, že tato parciální agonistická aktivita ABR není spojena s nežádoucími účinky, které mají TZD, mezi které již řadíme retenci tekutin a sklon k edémům.

LITERATURA

1. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart diseases in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339: 229-234.
2. Laakso M, Lehto S. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Rev* 1997;5: 294-315.
3. Reaven GM. Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988 ;37:1595-1607.
4. IDF, 2005 International Diabetes Federation consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, 14 April 2005: www.idf.org/webdata/docs/Metac_syndrome_def.pdf.
5. Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Trevano FQ, Bombelli M, Scopelliti F, Facchini A, Mancia G. Comparative effects of candesartan and hydrochlorothiazide on blood pressure, insulin sensitivity, and sympathetic drive in obese hypertensive individuals: results of the CROSS study. *J Hypertens.* 2003; 21: 1761–1769.
6. Lindholm LH, Persson M, Alaupovic P, Carlberg B, Svensson A, Samuelsson O. Metabolic outcome during 1 year in newly detected hypertensives: results of the Antihypertensive Treatment and Lipid Profile in a North of Sweden Efficacy Evaluation (ALPINE study). *J Hypertens.* 2003; 21: 1563–1574.
7. Scheen, A.J. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the renin-angiotensin system *Drugs Volume 64, Issue 22, 2004, Pages 2537-2565.*
8. Kurtz TW. Treating the metabolic syndrome: telmisartan as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator. *Acta Diabetol.* 2005 Apr;42 Suppl 1:S9-16.
9. Pershadsingh HA, Kurtz TW. Insulin-sensitizing effects of telmisartan: implications for treating insulin-resistant hypertension and cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 2005 Feb;28(2):498.
10. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension.* 2004 May;43(5):993-1002. Epub 2004 Mar 8.
11. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Heltebold S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kint-

- scher U. Molecular Characterization of New Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (γ) Modulators With Angiotensin Receptor Blocking Activity. *Diabetes*. 2005 Dec;54(12):3442-52.
12. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2054-7. Epub 2004 Apr 26.
 13. Staels B., Fruchart JC: Therapeutics role of peroxisome proliferation -activated receptor agonist. *Diabetes* 2005 54, 2460-2470.
 14. Scheen AJ.Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs*. 2004;64(22):2537-65.
 15. Kurtz TW, Pravenec M, antidiabetic mechanism of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonist: betone the renin-angiotensin. *J Hypertension* 22: 2253-2261, 2004.
 16. Yamagishi S, Takenaka K, Inoue H.Role of insulin-sensitizing property of telmisartan, a commercially available angiotensin II type 1 receptor blocker in preventing the development of atrial fibrillation. *Med Hypotheses*. 2006;66(1):118-20. Epub 2005 Sep 12.
 17. D.E. Kelley, J. He, E.V. Menshikova and V.B. Ritov, Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes, *Diabetes* 51 (2002), pp. 2944-2950.
 18. Tordjman, G. Chauvet, J. Quette, E.G. Beale, C. Forest and B. Antoine, Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells, *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), pp. 18785-18790.
 19. Pershadsingh HA, Kurts TW: Insulin-sensitizing effects of telmisartan: implication for treating insulin-resistant hypertension and cardiovascular disease (Letter). *Diabetes Care* 27:1015, 2004.
 20. Miura Y, Yamamoto N, Tsunekawa S, Taguchi S, Eguchi Y, Ozaki N, Oiso Y. Replacement of valsartan and candesartan by telmisartan in hypertensive patients with type 2 diabetes: metabolic and antiatherogenic consequences. *Diabetes Care*. 2005 Mar;28(3):757-8.
 21. Honjo S, Nishi Y, Wada Y, Hamamoto Y, Koshiyama H: Possible beneficial effect of telmisartan on glycemic control in diabetic subjects (Letter). *Diabetes Care* 28:498, 2005.
 22. Derosa G, Ragonesi PD, Mugellini A, Ciccarelli L, Fogari R. Effects of telmisartan compared with eprosartan on blood pressure control, glucose metabolism and lipid profile in hypertensive, type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled 12-month study. *Hypertens Res*. 2004 Jul;27(7):457-64.
 23. G. Derosa, A.F. Cicero, G. Bertone, M.N. Piccinni, E. Fogari and L. Ciccarelli et al., Comparison of the effects of telmisartan and nifedipine gastrointestinal therapeutic system on blood pressure control, glucose metabolism, and the lipid profile in patients with type 2 diabetes mellitus and mild hypertension: A 12-month, randomized, double-blind study, *Clinical Therapeutics* 26 (2004), pp. 1228-1236.
 24. Vitale C, Mercurio G, Castiglioni C, Cornoldi A, Tulli A, Fini M, Volterrani M, Rosano GM.Metabolic effect of telmisartan and losartan in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol*. 2005 May 15;4:6.
 25. Koh KK, Quon MJ, Han SH, Chung WJ, Ahn JY, Seo YH, Kang MH, Ahn TH, Choi IS, Shin EK. Additive beneficial effects of losartan combined with simvastatin in the treatment of hypercholesterolemic, hypertensive patients. *Circulation*. 2004;110:3687-3692.
 26. Fogari R, Zoppi A, Corradi L, Lazzari P, Mugellini A, Lusardi P.Comparative effects of lisinopril and losartan on insulin sensitivity in the treatment of non diabetic hypertensive patients. *Br J Clin Pharmacol*. 1998 Nov;46(5):467-71.
 27. Fogari R, Zoppi A, Preti P, Fogari E, Malamani G, Mugellini A. Differential effects of ACE-inhibition and angiotensin II antagonism on fibrinolysis and insulin sensitivity in hypertensive postmenopausal women. *Am J Hypertens*. 2001 Sep;14(9 Pt 1):921-6.
 28. Paolisso G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Manzella D, Gualdiro P, Varricchio G, Verza M, Varricchio M. Losartan mediated improvement in insulin action is mainly due to an increase in non-oxidative glucose metabolism and blood flow in insulin-resistant hypertensive patients. *J Hum Hypertens*. 1997 May;11(5):307-12.
 29. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet* 2002;359:995-1003.
 30. Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, Clemenz M, Krikov M, Thone-Reineke C, Unger T, Kintscher U. PPAR γ -activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension*. 2005 Jul;46(1):137-43. Epub 2005 Jun 6.
 31. Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. Selective angiotensin II receptor antagonist reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension*. 2001;38:884-890.
 32. Sloniger JA, Saengsirisuwan V, Diehl CJ, Kim JS, Henriksen EJ. Selective angiotensin II receptor antagonism enhances whole-body insulin sensitivity and muscle glucose transport in hypertensive TG(mREN2)27 rats. *Metabolism*. 2005 Dec;54(12):1659-68.
 33. Koh KK, Quon MJ, Han SH, Chung WJ, Ahn JY, Kim JA, Lee Y, Shin EK. Additive beneficial effects of fenofibrate combined with candesartan in the treatment of hypertriglyceridemic hypertensive patients. *Diabetes Care*. 2006 Feb;29(2):195-201.
 34. Kjeldsen JS, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L et al. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimen based on valsartan and amlodipin. *Lancet* 2004; 363: 2022-2031.
 35. Zingarelli B, Cook JA : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* 2005; 23(5):393-9.
 36. Bernobich E, de Angelis L, Lerin C, Bellini G. The role of the angiotensin system in cardiac glucose homeostasis: therapeutic implications. *Drugs*. 2002; 62: 1295-1314.

Metabolický syndrom X

MUDr. Petr Wohl, Doc. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc., MUDr. Robert Bém

Centrum diabetologie IKEM, Praha

MUDr. Pavel Wohl

Transplantcentrum IKEM, Praha

Souhrn:

Metabolický syndrom (synonyma: syndrom X, syndrom inzulinové rezistence, Reavenův syndrom, Kaplanův „smrtící kvartet“) je definován jako soubor klinických projevů a odchylek, které zvyšují riziko aterosklerózy, zejména ischemické choroby srdeční, cévních mozkových příhod a ischemické choroby dolních končetin. Metabolický syndrom je spojen se vznikem diabetu mellitu 2. typu, který vede k orgánovým mikrovaskulárním a makrovaskulárním komplikacím. Důsledky jednotlivých odchylek jsou velmi závažné a jejich léčba je zásadním krokem v zlepšení dlouhodobé prognózy těchto nemocných. Možné ovlivnění metabolických poruch závisí významně na sociálních, ekonomických, kulturních možnostech, které ovlivňují dietní styl a cvičení, které jsou důležitým faktorem při vzniku metabolického syndromu a diabetu mellitu 2. typu.

Klíčová slova:

metabolický syndrom, ateroskleróza, terapie

Metabolický syndrom zahrnuje hyperinzulinémii, inzulinovou rezistenci, poruchu glukózové tolerance nebo diabetes mellitus 2. typu, obezitu centrálního typu, dyslipoproteinemii, arteriální hypertenzi, hyperurikémii, poruchy koagulace (19,22). Někteří autoři zahrnují do syndromu i jiné symptomy jako je mikroalbuminurie, hyperhomocysteinemie, ovariální hyperandrogenismus, hirsutismus a změny složení mastných kyselin v sérových a tkáňových fosfolipidech. U nemocných s metabolickým syndromem jsou narušeny mechanismy zodpovědné za udržení normální glukózové homeostázy, a které nacházíme pravidelně u diabetu mellitu 2. typu (normální sekrece inzulínu, normální účinek inzulínu v cílových tkáních (v játrech suprese produkce glukózy a ve svalch stimulační odsunu glukózy), normální non-inzulin-dependentní transport glukózy. Etiopatogeneze vzniku metabolického syndromu není plně objasněna, předpokládá se účast jak genetických vlivů, tak exogenních faktorů

(obezita, stres, kouření, malá fyzická aktivita, nadměrný denní energetický příjem, nevhodné složení stravy s vysokým podílem živočišných tuků (10). Tento syndrom je klinicky významný a je asociován se vznikem diabetu mellitu 2. typu a progresí aterosklerózy. Z hlediska aterosklerózy jsou diabetici 2. typu s negativní anamnézou infarktu myokardu ve stejné rizikové skupině jako nediabetici po infarktu myokardu. (6)

Diabetes mellitus 2. typu

Inzulinová rezistence je charakterizována poruchou účinku inzulínu v cílové tkáni, kdy normální koncentrace inzulínu vyvolává sníženou metabolickou odpověď. Samotná inzulinová rezistence bez poruchy sekrece inzulínu však nestačí k manifestaci diabetu mellitu 2. typu. U většiny nemocných je pravděpodobně prvotní abnormalitou stoupající inzulinová rezistence, která vede k postupně se zvětšující hyperinzulinémii a poruše sekrece inzulínu v β buňkách pankreatu (10, 19, 18). Pravě hyperinzulinémie způsobuje

některé cesty v metabolismu lipidů, proteinů, nukleových kyselin a minerálů, které jsou patrně závažnější než samotná hyperglykémie (15,18,19). Většinou je diabetes 2. typu diagnostikován náhodně a často již ve stadiu pokročilých cévních makroangiopatických a mikroangiopatických komplikací (až ve 30% případů). Podle studie UKPDS dochází v průběhu onemocnění k postupnému snižování sekreční kapacity β -buněk (i v závislosti s věkem) a tento pokles je nezávislý na zvoleném terapeutickém režimu (dieta, metformin a deriváty sulfonylurey).

Porucha metabolismu lipidů

Dyslipidémie je nedílnou součástí metabolického syndromu. Při metabolickém syndromu nacházíme hypertriacylglycerolemii, postprandiální hyperlipidémii, vyšší VLDL-TG, nižší hladiny HDL cholesterolu, malé densní LDL, vyšší apo B a nižší apo A1 (8). Vlivem inzulinové rezistence dochází ke zvýšené tvorbě triacylglycerolů, která je dána vyšším přísunem mastných kyselin do jater při zvýšené lipolýze v tukové tkáni (hormon senzitivní lipáza v tukové tkáni není suprimována inzulínem). Hypertriacylglycerolemie je asociována s hyperkoagulabilitou a poruchou fibrinolýzy (vyšší hladina inhibitoru tkáňového aktivátoru plasminogenu 1, zvýšení faktoru VII atp.) (9). Hladina celkového cholesterolu nemusí být inzulinovou rezistencí ovlivněna. Snížení HDL cholesterolu při normálním celkovém cholesterolu je spojeno s dvojnásobným rizikem ICHS a čtyřnásobným rizikem kardiovaskulární mortality u diabetiků 2. typu (14). V tabulce č. 1 jsou uvedena doporučení optimálních hladin lipidů pro diabetiky s ohledem na kardiovaskulární riziko (5).

Jak ukazují výsledky rozsáhlých studií (4S, LIPIDS, CARE, HPS a dalších), hypolipidemická léčba zlepšuje prognózu nemocných, kardiovaskulární riziko a výskyt cévních mozkových příhod u nemocných

s diabetem mellitem. Volba hypolipidemických preparátů je založena na typu lipidové poruchy. U izolované hypercholesterolemie volíme **statiny**, při hypertriacylglycerolémii doporučujeme **fibráty** a u smíšených poruch lze doporučit statiny ev. **kombinaci statinů a fibrátů** s ohledem na riziko nežádoucích účinků této kombinace. Strategie hypolipidemické léčby se zásadně neliší od nediabetiků. V léčbě hyperlipidemií lze dále použít pryskyřice a niacin. V prevenci ICHS je jednoznačný benefit prokázán u statinů (21). Za markery kardiovasku-

lobezních má hypertenzi a současně poruchu glukózové tolerance). Vlivem inzulinové rezistence a hyperinzulinémie dochází ke změně vaskulární reaktivity, ke změně transportu kationtů, k retenci natria a nárůstu aktivity sympatického nervového systému a dalším jevům, které vedou k rozvoji hypertenze (20). Z výsledků epidemiologických studií vyplývá, že agresivní léčba hypertenze vede snížení makrovaskulárního i mikrovaskulárního rizika u nemocných s diabetem mellitem (23). Léčba hypertenze u diabetiků 2. typu snižuje výskyt fatálních i nefatálních

tivní rodinnou anamnézou ICHS, kouření, hypertenzí, obezitou (BMI > 28 u žen, BMI > 27.3 u mužů), pozitivním nálezem mikroalbuminurie a proteinurie a při zvýšení sérových lipidů (3).

Hyperurikémie

Hyperurikémie je častým nálezem u nemocných s inzulinovou rezistencí, obeznicích a diabetiků 2. typu a představuje další rizikový faktor ICHS. Vyšší hladina kyseliny močové je dána sníženou renální clearancí této látky při inzulinové rezistenci. Klinicky se může častěji manifestovat jako dnová artritida a méně často jako urátová nefropatie. Vzhledem k antioxidačnímu účinku může být vliv hyperurikémie na organismus při metabolickém syndromu protektivní. Docházeli k nárůstu sérové koncentrace kyseliny močové v průběhu redukčních režimů u obeznicích či diabetiků 2. typu bývá často nutné zahájit farmakologickou léčbu (alopurinol).

Terapeutické možnosti

Léčba metabolického syndromu je založena na ovlivnění jednotlivých metabolických odchylek. Snížení inzulinové rezistence a hyperinzulinémie může být pozitivně ovlivněno změnou životního stylu (4). **Změna životního stylu je velmi významným parametrem, který snižuje incidenci diabetu mellitu 2. typu, jak prokázala studie srovnávající vliv metforminu v kombinaci s intervencí s cílem změnit životní styl.** Změna životního stylu byla účinnější než farmakologická léčba metforminem (26). Změna životního stylu byla definována jako intervence vedoucí k poklesu hmotnosti o více jak 7% počáteční hmotnosti, doplněna o nízkokalorickou racionální stravu s omezením tuků a zvýšením fyzické zátěže v trvání 150 minut týdně. Důležitým prvkem této studie byla behaviorální psychoterapie. Primární léčba inzulinové rezistence v současné době je založena na podávání preparátů ze skupiny **glitazonů** (rosiglitazon, pioglitazon) a je indikována u nemocných s diabetem mellitem 2. typu. V léčbě metabolického syndromu nebylo jejich postavení zatím jednoznačně definováno. Dietní opatření v léčbě metabolického syndromu jsou založena na snížení nadměrného denního energetického příjmu a snížení přísunu tuků pod 30% denního energetického příjmu. Tuky nahrazujeme sacharidy, jejichž podíl by měl činit 50–60%, ev. pro-

Tabulka č. 1

Doporučení optimálních hladin lipidů pro diabetiky

	nízké riziko AS	střední riziko AS	vysoké riziko AS
cholesterol (mmol/l)	< 4.8	4.4–6.0	> 6.0
LDL (mmol/l)	< 3.0	3.0–4.0	> 4.0
HDL (mmol/l)	> 1.2	1.0–1.2	< 1.0
Triglyceridy (mmol/l)	< 1.7	1.7–2.2	> 2.2

lárního rizika se považují rovněž koncentrace HDL cholesterolu < 1,0 mmol/l a triglyceridů > 2,0 mmol/l (21). U vysoce rizikových nemocných je cílem dosažení koncentrace celkového cholesterolu pod 5 mmol/l a LDL cholesterolu pod 3 mmol/l.

Obezita

Centrální (viscerální) typ obezity je jedním z nejdůležitějších faktorů, které hrají významnou roli v patogenezi inzulinové rezistence. O míře rizika viscerální obezity nás informuje index pas/boky a především obvod pasu (u mužů vyšší než 1, u žen vyšší než 0,85). Centrální obezita zhoršuje inzulinovou rezistenci a hyperinzulinemii se všemy důsledky. **Vzestup BMI nad 32 je spojen se čtyřnásobným vzestupem úmrtnosti na kardiovaskulární choroby (7).** Obezita je dále rizikovým faktorem řady jiných patologických stavů v problematice gastrointestinální a hepatobiliární, hemokoagulační, respirační, urologické, gynekologické, ortopedické, kožní, psychosociální atp. **Obezita vyjádřena BMI > 30 je vždy indikací k léčbě.**

Esenciální hypertenze

Hypertenze je u nemocných s metabolickým syndromem je spojena s vysokým rizikem kardiovaskulárních komplikací. Zejména vztah obezity a hypertenze je z klinického hlediska významný (až 80%

mozkových cévních příhod (24). Optimální hodnota krevního tlaku pro diabetiky by měla být pod 130/85 mmHg, při pozitivní proteinurii pod 130/75mmHg. V současné době jsou za léky 1. volby považovány inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu, selektivní betablokátory, alfa 1 blokátoary a inhibitory kalciových kanálů. Dosažení cílové hodnoty krevního tlaku je u většiny diabetiků možné jen při kombinaci léků. (21, 24). Snížení krevního tlaku je patrně důležitější než volba antihypertenzního preparátu (13). Dle intervenčních studií se kontrola krevního tlaku zdá být z hlediska aterosklerózy důležitější než kontrola glykémie.

Poruchy koagulace

Zvýšená pohotovost ke tvorbě trombů je rovněž součástí metabolického syndromu. Tento stav je patrně způsoben zvýšenou produkcí tromboxanu a dalších dysbalancí vasokonstrikčních, destičkových působků, endoteliální dysfunkcí a poruchou fibrinolýzy (zvýšení hladiny inhibitoru tkáňového aktivátoru plasminogenu 1 (PAI-1) (18). Antiagregační léčba je indikována u všech nemocných s diabetem mellitem v sekundární prevenci po prodělaném infarktu myokardu, dále u pacientů s angínou pectoris, s ICHDK a klaudikacemi a po cévní mozkové příhodě. V primární prevenci je tato léčba indikována u nemocných s posi-

teiny (10–15%). Je vhodné doporučit nemocnému tabulky potravin s obsahem tuků, sacharidů a proteinů. Motivační a edukační kontroly u lékaře, dietologa a dietních sester hrají důležitou roli v complianci nemocných. **Bylo prokázáno, že citlivost tkání na inzulín se zvyšuje při poklesu hmotnosti a při nárůstu váhy je tomu naopak (2).** Optimální je aerobní fyzická zátěž, kdy by tepová frekvence neměla přesáhnout u mladých 140 tepů/minutu, u osob středního věku 130 tepů/minutu a starších 110 tepů/minutu (7). Doba fyzické zátěže by měla být u většiny nemocných 45–60 minut 3–4x týdně. Mezi nevhodnější pohybovou aktivitu řadíme chůzi, plavání a jízdou na kole. Citlivost k inzulínu je tím vyšší, čím vyšší je relativní obsah aktivní svalové hmoty a trénovanost měřená maximální aerobní kapacitou a čím je nižší podíl intraabdominální tukové tkáně a nižší poměr pas/boky, který je ukazatelem obezity centrálního typu (16,17). **Medikamentózní léčba obezity představuje pouze doplněk dietních, pohybových, kognitivně-behaviorálních postupů.** V současné době lze doporučit např. léky ovlivňující vstřebávání tuků ze střeva a serotoninergní a katecholaminergní anorektika. V léčbě obezity se v současné době patří mezi nejdůležitější preparáty **orlistat**, jak ukazují některé studie z posledního období. Léčba orlistatem spolu s dietní intervencí vede k váhovému úbytku (dále byl pozorován pokles sérových lipidů, lačné glykémie,

glykovaného hemoglobinu), který je spojen se snížením kardiovaskulárního rizika. (25). 4–letá studie Xendos se 3304 pacienty rovněž potvrdila pozitivní vliv orlistatu na pokles hmotnosti. V této studii bylo pozorováno snížení rizika vzniku diabetu mellitu 2. typu o 37%. V případech již diagnostikovaného diabetu mellitu 2. typu by měla být zahájena terapie **akarbosou, metforminem** nebo **thiazolidindiony**, při nedostatečném efektu pak volba preparátů zvyšující endogenní sekreci inzulínu (deriváty sulfonylurey, meglitinidy nebo deriváty D-fenylalaninu). Důležitým ukazatelem v léčbě diabetika 2. typu je postprandiální glykémie, která je rizikovým kardiovaskulárním faktorem a cílem léčby by měla být agresivní strategie s cílem snížit tento parametr pod 9 mmol/l. (27). Velmi významným terapeutickým zásahem je snížení přechodu porušené glukózové tolerance v manifestní diabetes mellitus, kdy se zhoršují metabolické parametry. **Závěrem, lze říci, že intenzivní léčba jednotlivých odchylek metabolického syndromu je významná při snížení kardiovaskulárního rizika a mortality těchto nemocných.**

Literatura:

1. Bartoš, V.: Diabetes a iktus. DMEV 3, 2000, str. 227–232.
2. Boden, G.: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance nad NIDDM. Diabetes 1996, 45, p. 3–10.
3. Colwell, J.A.: Aspirin therapy in diabetes (Technical review). Diabetes Care 1997, 20, p. 1761–71.
4. Erikson, K.F., Lindgrde, F.: Prevention of type 2. (non insulin dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmö feasibility study. Diabetologia 1991, 4, p. 891–898.
5. European Diabetes Policy Group: Guidelines for Diabetes care. A desktop guide to type 2. type diabetes mellitus. IDF European re-

6. Hallner, S.M., Lehto, S., Rönnemaa, T., Pyörälä, K., Laakso, M.: Mortality from coronary artery in subjects with type 2. Diabetes and in non-diabetic subjects with and without prior myocardial infarction. N Eng J Med 1998, 39, p. 229–234.
7. Hainer, V.: Zdravotní rizika obezity In: Hainer, V., Kunešová M.: Obezita, Galén, Praha, 1997, str. 48–65.
8. Howard, V.B.: Insulin Actions in Vivo: Insulin and Lipoprotein metabolism In: Alberti, K.G.M., Zimmet, P., DeFronzo R.A.: International textbook of diabetes mellitus, Second edition, Wiley and Sons Ltd, 1997, p. 530–547.
9. Jirkovská, A.: Současný klinický pohled na dyslipoproteinémie u diabetiků, DMEV 2000, 3, str. 155–164.
10. Kahn, R.C.: Banting lecture: Insulin action, Diabetogenes, and the cause of type 2. diabetes, diabetes 1994, 43, p. 1066–1084.
13. Komers, R., Anderson, S.: Are angiotensin-converting enzyme inhibitors the best treatment for hypertension in type 2. diabetes? Current Opin. Nephrol.Hypertension, 2000, 9, p. 173–179.
14. Laakso, M.: Dyslipidemia, morbidity and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Lipoprotein and coronary artery diseases in Non insulin-dependent diabetes mellitus. J.Diab.Comp., 1997, 11, p. 137–141.
15. Moller, D., E.: Insulin resistance mechanism, syndromes and implications. N Eng. J. Med 1991, 325, p. 938–948.
16. Nuutila, P., Knutti, M. J., Heinonen, O. J.: Different alterations in the insulin-stimulated glucose uptake in the athlete's heart and skeletal muscle. J.Clin. Invest 1994, 93, p. 2267–2274.
17. Peiris, A.M., Struve, M.F., Mueller, R.A., Lee, M.B., Kissebah, A.H.: Glucose metabolism in obesity: influence of body fat distribution. J.Clin.Endocrinol. Metab 1988, 67, p. 760–767.
18. Pelikánová T.: Syndrom inzulínové rezistence. In: Bartoš, V., Pelikánová, T.: Praktická diabetologie, 2. vydání, Maxdorf, Praha, 2000, str. 72–79.
19. Reaven, G.M.: Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 1988, 37, p. 1595–1607.
20. Rocchini, A.P.: Insulin resistance and blood pressure regulation in obese and non-obese subjects. Hypertension 1991, 17, p. 837–842.
21. Společné doporučení Českých odborných společností: Prevence ischemické choroby v dospělém věku. Cor Vasa 42, 2000, 10 s. K225–K234.
22. Stern, M., P.: The insulin resistance syndrome. In: Alberti, K.G.M., Zimmet, P., DeFronzo R.A.: International textbook of diabetes mellitus, Second edition, Wiley and Sons Ltd, 1997, p. 255–283.
23. UKDPDS 39: Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2. Diabetes. UKPDS 39. BMJ 1998, 317, p. 713–720.
24. UKDPDS 38: Tight blood pressure control nad risk of macrovascular and microvascular complications in type 2. Diabetes. UKPDS 38, BMJ 1998, p. 703–713
25. Lindgärde F. On behalf OF the orlistat swedish multimorbidity study group. The effect of orlistat on body weight and coronary heart disease risk profile in obese patients: The Swedish multimorbidity study. Journal of internal medicine, 2000, 248: 245–254
26. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2. Diabetes with lifestyle intervention or metformin. NEJM, 2002, 346: 393–403
27. De Veg, F, Dekker, J.M, Ruhé, H, G et al: Hyperglycemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in Hoorn population: the Horn, population study, diabetologia, 1999, 42, s.926–931

Olfen® Gel

Diklofenak sodný

Složení: Diklofenak sodný 10 mg v 1 g gelu. **Indikace:** Olfen Gel je používán k léčbě místních příznaků zánětlivých a degenerativních kloubních onemocnění. **Dávkování:** V závislosti na velikosti léčené oblasti je doporučeno lehkým vtíráním aplikovat na kůži 2-3 g Olfen Gelu 3 - 4 x denně. **Kontraindikace:** Olfen Gel nesmí být používán u pacientů s přecitlivělostí na diklofenak, kyselinu acetylsalicylovou či jiná nesteroidní antirevmatika. Přípravek nesmí být používán kojícími ženami ani v těhotenství. **Nežádoucí účinky:** Výjimečně se mohou vyskytnout některé z následujících nežádoucích účinků - zarudnutí, svědění, kožní vyrážka. **Upozornění:** Olfen Gel nesmí přijít do kontaktu s otevřeným poraněním, sliznicí nebo do blízkosti očí. Oblast, na kterou je Olfen Gel nanášen nemá být kryta neprodyšným oděvem či obvazem. **Datum schválení poslední revize textu:** 20.9.2000. **Způsob výdeje:** Volně prodejný léčivý přípravek. **Způsob hrazení:** Přípravek je částečně hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění.

Přípravek	Balení	Úhrada	Orientační cena
Olfen	gel 50 g	42,50 Kč	51,50 Kč

Zdroj: číselník VZP

Podrobné informace obdržíte na níže uvedené adrese.



Sázavská 11, Praha 2, PSČ 120 00, tel.: 224 251 868

Tajemství pohybu

