

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**

**KATEDRA BIOCHEMIE**

**Úloha proteinkinázy C v patogenezi inzulinové rezistence a jejích komplikacích**

Mgr. Irena Marková

Disertační práce

2010

Školitel: Doc. RNDr. František Novák, CSc.  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze  
Katedra biochemie

Školitel konzultant: Ing. Ludmila Kazdová, CSc.  
Institut klinické a experimentální medicíny v Praze  
Oddělení metabolismu diabetu

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům Ing. Ludmile Kazdové, CSc. a Doc. RNDr. Františkovi Novákovi, CSc. za pedagogické vedení, předané teoretické a praktické informace a rady při sepisování této práce. Děkuji i Doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za cenné rady a veškerou pomoc, kterou mi poskytla v průběhu mé práce. Mé poděkování patří rovněž Ing. Michalovi Pravencovi, DrSc. za úspěšnou spolupráci na publikaci. Děkuji také spolupracovníkům z Oddělení metabolismu diabetu IKEM, spoluautorům publikací i mým nejbližším.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě studia literatury, vlastních výsledků a konzultací se svými školiteli. Tuto práci ani její podstatnou část jsem nepředložila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Mgr. Irena Marková

## SEZNAM ZKRATEK

AKAP	protein kotvící aktivované kinázy (z angl. <i>a kinase anchoring-protein</i> )
AMPK	5'adenosinmonofosfát-aktivovaná proteinkináza
aPKC	atypické izoformy proteinkinázy C
ATP	adenosintrifosfát
AUC	plocha pod křivkou orálního glukózového tolerančního testu
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>complementary DNA</i> )
CoA	koenzym A
cPKC	klasické izoformy proteinkinázy C
DAG	diacylglycerol
DM	diabetes mellitus
DM2	diabetes mellitus 2. typu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	D,L-dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor (z angl. <i>epidermal growth factor</i> )
EGTA	ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
ELISA	imunosorbentní enzymová imunoanalýza (z angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FAT/Cd36	translokáza mastných kyselin
FV	frakční velocita
GDP	guanosindifosfát
GLUT4	glukózový přenašeč 4
GS	glykogensyntáza
GSK3	kináza glykogensyntázy 3 (z angl. <i>glycogen synthase kinase 3</i> )
GTP	guanosintrifosfát
G6P	glukóza-6-fosfát
HSL	hormon senzitivní lipáza
HHTg	hereditárně hypertriglyceridemický potkan
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IKK	inhibitor κB kinázy (z angl. <i>inhibitor κB kinase</i> )
IL6	interleukin 6
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-trifosfát
IRS	substrát inzulinového receptoru (z angl. <i>insulin receptor substrate</i> )

JNK	c-Jun N-terminální kináza (z angl. <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
LCACoA	acylkoenzym A s dlouhým řetězcem (z angl. <i>long-chain acyl-CoA</i> )
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. <i>low density lipoproteins</i> )
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkináza
MK	mastná kyselina
MS	metabolický syndrom
mRNA	informační ribonukleová kyselina
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NAFLD	nealkoholická jaterní steatóza (z angl. <i>nonalcoholic fatty liver disease</i> )
NEMK	neesterifikované mastné kyseliny
nPKC	nové izoformy proteinkinázy C
NS	nesignifikantní
OGTT	orální glukózový toleranční test
PA	kyselina fosfatidová
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PC	fosfatidylcholin
PDK1	na fosfoinositidech závislá kináza 1 (z angl. <i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i> )
PEPCK	fosfoenolpyruvátcarboxykináza
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP <sub>3</sub>	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza (z angl. <i>phosphoinositide-3-kinase</i> )
PKB	proteinkináza B
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PPAR $\gamma$	jaderný receptor PPAR $\gamma$ (z angl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> )
PP1	proteinfosfatáza 1
PS	fosfatidylserin
RACK	receptor pro aktivovanou kinázu C (z angl. <i>receptor for activated C kinase</i> )
RBP4	z angl. <i>retinol binding protein 4</i>
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i> )
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )

SDS- PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SEM	střední chyba průměru (z angl. <i>standard error of the mean</i> )
SHR	spontánně hypertenzní potkan
SHR-TG	transgenní spontánně hypertenzní potkan
SOCS	supresor cytokinové signalizace
TNF $\alpha$	faktor nekrotizující nádory (z angl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
TTBS	pufr TTBS (z angl. <i>Tris buffered saline with Tween 20</i> )
TZD	thiazolidindiony
UDPG	uridin 5'-difosfoglukóza
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (z angl. <i>very low density lipoproteins</i> )
v/v	ředění objem/objem (z angl. <i>volume/volume</i> )
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. <i>World Health Organization</i> )
w/v	ředění hmotnost/objem (z angl. <i>weight/volume</i> )

# OBSAH

1.	<b>ÚVOD</b>	1
2.	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	2
2. 1.	<b>Metabolický syndrom</b>	2
2. 1. 1.	Inzulínová rezistence a hyperinzulinémie	2
2. 1. 2.	Dyslipidémie	3
2. 1. 3.	Hypertenze	4
2. 1. 4.	Zhoršená glukózová tolerance	4
2. 1. 5.	Obezita	5
2. 1. 6.	Další projevy MS	6
2. 2.	<b>Patogeneze inzulinová rezistence</b>	7
2. 2. 1.	Faktory ovlivňující inzulinovou rezistenci	7
2. 2. 2.	Příčiny inzulinové rezistence	9
2. 2. 2. 1.	Signalizační kaskáda inzulinu	11
2. 2. 2. 2.	Úloha NEMK v patogenezi inzulinové rezistence	16
2. 2. 2. 3.	Úloha tukové tkáně v patogenezi inzulinové rezistence	17
2. 2. 3.	Léčba inzulinové rezistence	20
2. 3.	<b>Proteinkináza C</b>	21
2. 3. 1.	Klasifikace a struktura PKC	22
2. 3. 2.	Tkáňová lokalizace izoenzymů PKC	23
2. 3. 3.	Regulace PKC	24
2. 3. 4.	Substráty PKC	25
2. 3. 5.	Zapojení PKC do buněčné signalizace	26
2. 3. 5. 1.	PKC a fosfoinositidová signální kaskáda	26
2. 3. 5. 2.	PKC v signální dráze inzulinu	27
2. 3. 5. 3.	PKC jako mediátor a inhibitor přenosu inzulinového signálu	29
2. 3. 6.	PKC, inzulinová rezistence a s ní spojené komplikace	30
2. 4.	<b>Nejčastěji využívané experimentální modely inzulinové rezistence</b>	34
2. 4. 1.	Nutričně indukovaná inzulinová rezistence	34
2. 4. 2.	Geneticky podmíněná inzulinová rezistence	34
3.	<b>CÍLE PRÁCE</b>	37
4.	<b>MATERIÁL A METODY</b>	38
4. 1.	<b>Experimentální modely a podávané diety</b>	38
4. 2.	<b>Uspořádání experimentů</b>	40
4. 2. 1.	Vliv nutričně indukované obezity u HHTg potkanů na PKC a inzulinovou rezistenci	40
4. 2. 2.	Aktivita glykogensyntázy při inzulinové rezistenci	40
4. 2. 3.	Vliv věku na PKC a inzulinovou rezistenci	40
4. 2. 4.	Vliv zvýšené exprese rezistinu v tukové tkáni na PKC a inzulinovou rezistenci	41
4. 2. 5.	Vliv dlouhodobého podávání pioglitazonu na PKC a inzulinovou rezistenci	41
4. 3.	<b>Biochemické analýzy</b>	41
4. 4.	<b>Analýzy k posouzení inzulinové rezistence ve tkáních a glukózové tolerance</b>	43
4. 5.	<b>Analýza PKC</b>	44
4. 6.	<b>Aktivita glykogensyntázy</b>	46

4. 7.	Statistické zpracování výsledků	47
5.	<b>VÝSLEDKY</b>	48
5. 1.	Vliv nutričně indukované obezity u HHTg potkanů na PKC a inzulínovou rezistenci	48
5. 2.	Aktivita glykogensyntázy při inzulínové rezistenci	54
5. 3.	Vliv věku na PKC a inzulínovou rezistenci	55
5. 4.	Vliv zvýšené exprese rezistinu v tukové tkáni na PKC a inzulínovou rezistenci	62
5. 5.	Vliv dlouhodobého podávání pioglitazonu na PKC a inzulínovou rezistenci	66
6.	<b>DISKUZE</b>	72
6. 1.	Vliv nutričně indukované obezity u HHTg potkanů na PKC a inzulínovou rezistenci	72
6. 2.	Aktivita glykogensyntázy při inzulínové rezistenci	75
6. 3.	Vliv věku na PKC a inzulínovou rezistenci	76
6. 4.	Vliv zvýšené exprese rezistinu v tukové tkáni na PKC a inzulínovou rezistenci	79
6. 5.	Vliv dlouhodobého podávání pioglitazonu na PKC a inzulínovou rezistenci	81
7.	<b>ZÁVĚR</b>	86
8.	<b>REFERENCE</b>	88
9.	<b>PŘÍLOHA – PUBLIKACE</b>	107

# 1. ÚVOD

Metabolický syndrom je souborem metabolických poruch, které výrazně zvyšují riziko rozvoje diabetu 2. typu a kardiovaskulárních příhod. Kromě poruch glukózové homeostázy a diabetu 2. typu zahrnuje metabolický syndrom také další rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění, jako je hyperinzulinémie, dyslipidémie, hypertenze, viscerální obezita, endoteliální dysfunkce a je provázen aktivací prozánětlivých a protrombotických faktorů.

Navzdory alarmující skutečnosti, že syndrom postihuje až čtvrtinu populace vyspělých zemí, patofyziologické mechanismy této poruchy a možná kausalita mezi jednotlivými výše uvedenými projevy syndromu nejsou kompletně objasněny. Chybějící poznatky o patofyziologických mechanismech uvedených poruch pochopitelně ztěžují možnosti jejich racionálního ovlivnění. Z literárních údajů vyplývá, že za sníženou utilizaci glukózy a rezistenci k inzulinu může být zodpovědná hypertriglyceridémie spolu s vzestupem neesterifikovaných mastných kyselin v cirkulaci. Nejsou dosud známy mechanismy vedoucí k akumulaci triglyceridů a neesterifikovaných mastných kyselin ve svalech a ke zvýšené rezistenci svalové tkáně k účinkům inzulinu.

Předpokládá se, že základní metabolickou odchylkou, která se uplatňuje v patogenezi metabolického syndromu, je inzulinová rezistence, která souvisí s poruchou signální kaskády vedoucí od inzulinového receptoru až k efektorovým molekulám zodpovědným za transport a utilizaci glukózy. V této kaskádě se také uplatňuje proteinkináza C, jejíž zásadní úloha je při rozvoji inzulinové rezistence v posledních letech opakovaně prokazována. Z literatury je známo, které izoformy proteinkinázy C a v jakých orgánech jsou aktivovány při komplikacích diabetu, avšak konkrétní úloha proteinkinázy C při rozvoji rezistence periferních tkání k účinku inzulinu není zatím uspokojivě vysvětlena.

Z uvedeného vyplývá, že studium patogeneze inzulinové rezistence na úrovni buněčné signalizace s použitím vhodných experimentálních modelů, je z hlediska prevence a terapie poruch asociovaných s metabolickým syndromem velice žádoucí. Cílem jak experimentálního, tak i klinického výzkumu je proto najít účinnou nutriční, farmakologickou nebo molekulárně genetickou terapii.



## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2. 1. Metabolický syndrom

Pod pojmem metabolický syndrom (MS) rozumíme soubor metabolických poruch, které zvyšují riziko diabetu 2. typu (DM2) a kardiovaskulárních poruch (Bartoš a Pelikánová 2000). Závažnost MS spočívá v jeho vysoké prevalenci, frekvence MS se v běžné populaci pohybuje kolem 25-30 % (Bartoš a Pelikánová 2000) a procento výskytu stoupá s věkem populace. MS je závažný také v tom, že hraje klíčovou roli v patogenezi mnoha chorob, především DM2, obezity, hypertenze, kardiovaskulárních onemocnění a dalších (Mlinar et al. 2007). Tento syndrom byl poprvé popsán Reavenem jako tzv. „metabolický syndrom X“ (Reaven 1988). V literatuře se rovněž označuje jako syndrom inzulínové rezistence, syndrom X, Reavenův syndrom nebo Kaplanův „smrtící kvartet“ (Reaven 1994; Bartoš a Pelikánová 2000). V roce 1998 Světová zdravotnická organizace (WHO) navrhla jednotnou definici tohoto syndromu a upřednostnila název „metabolický syndrom“ (Groop 2000).

MS je charakterizován rezistencí tkání k účinku inzulínu, hyperinzulinémií, poruchou glukózové tolerance, dyslipidemií, esenciální hypertenzí, abdominální (viscerální) obezitou, hyperurikémií, poruchami hemokoagulace a fibrinolýzy a endoteliální dysfunkcí (Timar et al. 2000). MS se postupně rozrůstá o další biochemické a klinické projevy, jako jsou např. mikroalbuminurie či změny zastoupení mastných kyselin v sérových a tkáňových lipidech (Timar et al. 2000; Bartoš a Pelikánová 2000). Uvedené klinické projevy se téměř pravidelně sdružují, ale pro vyslovení diagnózy MS není podmínkou přítomnost všech odchylek. Podle diagnostických kritérií, která byla stanovena WHO a dalšími organizacemi, bylo zjištěno, že u 15 až 25 % populace vyspělých zemí jsou přítomny alespoň tři metabolické abnormality uvedené v tabulce 1, jejichž přítomnost charakterizuje MS.

#### 2. 1. 1. Inzulínová rezistence a hyperinzulinémie

Inzulínová rezistence (IR) je základní metabolická odchylka MS. Můžeme ji definovat jako poruchu účinku inzulínu na metabolismus glukózy v cílových tkáních. IR je stav buňky, při kterém je k vyvolání kvantitativně normální odpovědi zapotřebí většího než normálního množství inzulínu (Berson and Yalow 1970).

IR zvyšuje nároky na sekreci inzulínu  $\beta$ -buňkami pankreatu a vede ke kompenzatorní hyperinzulinémii. V počáteční fázi IR je pankreas schopen zvýšit sekreci inzulínu aby vykompenzoval IR, ale postupem času  $\beta$ -buňky již nedokáží udržet dostatečně vysokou

sekreci inzulínu, a tím ztrácí schopnost IR kompenzovat, což vede ke zhoršené glukózové toleranci a může vyústit až k DM2.

Na IR se podílejí metabolické poruchy v kosterních svaích, játrech a tukové tkáni. V játrech se IR projevuje poruchou regulace produkce glukózy. Produkce glukózy není vzhledem k IR dostatečně blokována inzulínem, dochází ke zvýšené glukoneogenezi, která je příčinou hyperglykémie na lačno. Ve svalu, který je z hlediska účinku inzulínu kvantitativně nejvýznamnější tkáni, neboť odpovídá za 70-90 % odsunu glukózy z plazmy, se IR projevuje snížením inzulínem stimulované oxidativní i neoxidativní utilizace glukózy. Kvantitativně významnější je pokles neoxidativního metabolismu, který se projevuje nižší aktivitou glykogensyntázy a sníženou tvorbou glykogenu ve svaích (Bartoš a Pelikánová 2000). Porucha utilizace glukózy v tukové tkáni se podílí na prohlubování hyperglykémie. Výsledkem IR ve svaích, játrech a tukové tkáni je snížené inzulínem zprostředkované využití glukózy.

**Tabulka 1** – Definice metabolického syndromu pro evropskou populaci doporučená Mezinárodní diabetickou společností (International Diabetes Federation)

Abdominální obezita-objem pasu	muži > 94 cm, ženy > 80 cm
Hladina triglyceridů	≥ 1,7 mmol/l
HDL-cholesterol	muži < 1,03 mmol/l, ženy < 1,29 mmol/l
Krevní tlak	≥ 130 / ≥ 85 mm Hg
Glykémie na lačno	> 5,6 mmol/l

*Převzato od (Ford 2005).*

### 2. 1. 2. Dyslipidémie

Důležitou součástí MS jsou poruchy metabolismu lipidů, které hrají důležitou roli v rozvoji kardiovaskulárních poruch. Dyslipidémie u MS je charakterizována zvýšenými hladinami triglyceridů, zvýšenou postprandiální lipémií, sníženou hladinou HDL cholesterolu a vzestupem koncentrace malých denzních LDL (Verges 2005). Kromě těchto změn je MS provázen celou řadou dalších kvantitativních a kvalitativních abnormalit metabolismu lipoproteinů.

Příčinou zvýšené hladiny triglyceridů v plazmě je nadprodukce VLDL částic v játrech díky zvýšené nabídce neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) a jejich sníženému vylučování z plazmy, což je způsobeno nedostatečnou aktivací lipoproteinové lipázy inzulínem (Malmström et al. 1997). Endogenní nadprodukce VLDL v játrech se také podílí na

vzestupu postprandiální lipémie. Hypertriglyceridémie spojená s poklesem HDL cholesterolu je rizikovým faktorem ischemické choroby srdeční. Snížená koncentrace HDL cholesterolu je způsobena zvýšeným katabolismem HDL částic, na kterém se podílí zvýšená aktivita jaterní lipázy (Nikkila et al. 1977).

Integrální součástí MS je zvýšená hladina malých denzních LDL, subfrakce LDL částic. Hladina LDL cholesterolu je většinou v normě, ale LDL částice vykazují některé abnormality, ke kterým patří jejich menší velikost, delší biologický poločas v důsledku jejich nižší afinity k LDL receptorům, více podléhají oxidativní modifikaci v důsledku sníženého obsahu  $\alpha$ -tokoferolu a glykosylaci. Všechny zmíněné abnormality hrají důležitou roli v aterosklerotickém procesu (Verges 2005).

Při IR není v tukové tkáni inzulinem dostatečně blokována lipolýza, což vede ke zvýšení hladiny NEMK, které jsou klíčovými meziprodukty lipidového metabolismu. Zvýšené množství NEMK uvolňovaných z tukové tkáně je v játrech využito jako substrát pro syntézu triglyceridů a VLDL (Timar et al. 2000).

### **2. 1. 3. Hypertenze**

Hypertenze je diagnostikována u 30 – 60 % diabetických pacientů a její vyšší výskyt byl zaznamenán i u pacientů s MS (Ceriello 2008). Je popsána celá řada mechanismů, které vysvětlují asociaci IR s hypertenzí. Hyperinzulinémie zvyšuje reabsorpci sodíku a vody v ledvinách, zvyšuje aktivitu sympatického nervového systému, což má za následek zvýšení krevního tlaku (Timar 2000). Mezi další mechanismy, uplatňující se v patogenezi hypertenze, patří poruchy transportu iontů buněčnými membránami se zvýšenou akumulací intracelulárních iontů kalcia (Blaustein 1977), snížená aktivita  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy (Clausen 1986), porucha vazodilatace a zvýšená pohotovost cév k vazokonstrikci. MS je provázen endoteliální dysfunkcí, jejímž projevem je snížená syntéza NO, a tudíž i snížená schopnost vazodilatace. Uplatňovat se může i snížená produkce dalších mediátorů s vazodilatačním účinkem jako jsou např. prostaglandiny.

### **2. 1. 4. Zhoršená glukózová tolerance**

Typickými složkami MS jsou zhoršená glukózová tolerance a hyperglykémie. Zahrnují mírné poruchy glukózové homeostázy (zvýšená glykémie na lačno a porucha tolerance glukózy při orálním glukózovém tolerančním testu (OGTT), ale i vysoké koncentrace glukózy v plazmě při manifestaci DM (tabulka 2). Regulace hladiny glykémie je na základě OGTT

klasifikována do tří stavů od normoglykémie přes zhoršenou glukózovou toleranci až po diabetes (tabulka 2) (Bartnik et al. 2007). V řadě studií byl prokázán vzájemný úzký vztah mezi hyperglykemií, diabetem a kardiovaskulárními chorobami (Laakso 1999; Phillips et al. 1990; Wei et al. 1998). Hyperglykémie může vyvolat poškození buněk prostřednictvím celé řady mechanismů zahrnující např. aktivaci proteinkinázy C, tvorbu pokročilých produktů glykace nebo může vyvolat endoteliální dysfunkci díky indukci prozánětlivých cytokinů (Brownlee 2001). Dlouhodobě zvýšené hladiny glukózy v plazmě mohou těmito mechanismy zvyšovat riziko kardiovaskulárních chorob a orgánových komplikací diabetu. Ve studii Whitehall bylo prokázáno, že osoby se zhoršenou glukózovou tolerancí mají téměř dvojnásobné riziko kardiovaskulárních chorob oproti osobám s normální tolerancí glukózy (Fuller et al. 1980).

**Tabulka 2** – Klasifikace poruch regulace glukózy na základě OGTT podle Světové zdravotnické organizace (WHO)

	Glykémie na lačno (mmol/l)	Glykémie po zátěži (120. minuta OGTT) (mmol/l)
Normoglykémie	< 6,1	< 7,8
Zhoršená glukózová tolerance	6,1 – 7,0	7,8 – 11,1
Diabetes mellitus	> 7,0	> 11,1

*Převzato od (Bartnik et al. 2007).*

### 2. 1. 5. Obezita

Většina pacientů s MS je obézních, i když výskyt MS byl často pozorován i u osob, které nejsou obézní. Obezita je jedním z faktorů, které přispívají k rozvoji IR a DM2 a představuje významný rizikový faktor kardiovaskulárních chorob (Després and Lemieux 2006). Výsledky řady studií ukazují, že v případě obezity má na inzulinovou senzitivitu rozhodující vliv distribuce tělesného tuku. Některé populace s vysokou prevalencí DM2, jako např. indiáni kmene Pima a Mexičané, mají vysokou predispozici abdominální obezity (Saad et al. 1991). Androidní (abdominální) obezita, zvláště viscerální ukládání tuku (indikované vysokým poměrem pas:boky - waist:hip ratio, WHR), je častěji spojena s glukózovou intolerancí a dalšími symptomy MS, než gynoidní typ obezity (Pouliot 1992).

Tuková tkáň je metabolicky aktivní a ovlivňuje celkový metabolismus tím, že produkuje celou řadu metabolitů (NEMK, glycerol), hormonů (leptin, adiponektin, rezistin a dalších) a cytokinů (TNF- $\alpha$ , interleukin 6). V případě obezity je produkce řady z těchto působků zvýšená. Důležitou roli má i ektopické ukládání lipidů (ukládání lipidů mimo tukovou tkáň).

Bylo prokázáno, že zvýšené hladiny intramyocelulárních lipidů jsou úzce spjaty s rezistencí kosterních svalů k účinku inzulinu (Machann et al. 2004).

### 2. 1. 6. Další projevy MS

**Hyperurikémie** – běžně souvisí s poruchami glukózové tolerance, dyslipidemií a hypertenzí (Reaven 1994) a je důsledkem snížené clearance kyseliny močové v ledvinách. Ledviny při hyperinzulinémii snižují sekreci kyseliny močové, což vede k jejím zvýšeným plazmatickým koncentracím (Mlinar et al. 2007).

**Poruchy hemokoagulace a fibrinolýzy a endoteliální dysfunkce** – na zvýšené tvorbě trombů při MS se podílí zvýšená agregabilita destiček, změny v koagulačním systému, poruchy fibrinolýzy a endoteliální dysfunkce provázená změnou produkce působků s vazoaktivními účinky (Palomo et al. 2006). Endotel cévních buněk syntetizuje řadu vazoaktivních peptidů, růstových faktorů a cytokinů. Tyto působky regulují rovnováhu mezi vazokonstrikcí a vazodilatací, koagulací a fibrinolýzou, adhezí a agregací trombocytů, proliferací a apoptózou buněk (Baumgartner-Parzer and Waldhausl 2001). U pacientů s MS byly nalezeny zvýšené hladiny faktoru VII, fibrinogenu a von Willebrandova faktoru (Lansbury et al. 2002).

**Mikroalbuminurie** – je výrazem endoteliální dysfunkce při MS a u nemocných s DM2. Je považována za časný ukazatel nefropatie u diabetických a hypertenzních pacientů (Timar et al. 2000). U diabetických pacientů byla nalezena významná spojitost mikroalbuminurie s dyslipidemií zahrnující hypertriglyceridémii, sníženou hladinu HDL cholesterolu a zvýšenou koncentraci LDL cholesterolu (Niskanen et al. 1990).

Poruchy asociované s MS shrnuje tabulka 3. Všechny symptomy MS jsou rizikovými faktory kardiovaskulárních chorob.

**Tabulka 3** – Poruchy asociované s metabolickým syndromem zvyšující riziko kardiovaskulárních onemocnění

<b>metabolický syndrom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>poruchy glukózové tolerance</b> → diabetes mellitus 2. typu →</li> <li>• <b>obezita</b> → ↑lipolýza v tukové tkáni → ↑sekrece VLDL →</li> <li>• <b>dyslipidémie</b>: hypertriglyceridémie, ↓HDL, ↑ malé LDL →</li> <li>• retence Na<sup>+</sup>, aktivace sympatiku, změny v transportu iontů → <b>hypertenze</b> → hypertrofie levé komory →</li> <li>• <b>endoteliální dysfunkce</b> → poruchy vazodilatace → orgánová ischemie →</li> <li>• ↑PAI-1, ↑fibrinogen → <b>poruchy fibrinolýzy a hemokoagulace</b> → komplikace aterosklerózy →</li> </ul>	<b>kardiovaskulární onemocnění</b>
----------------------------	---	------------------------------------

*PAI-1 inhibitor aktivátoru plazminogenu 1. Převzato od (Divišová 2001).*

## 2. 2. Patogeneze inzulinové rezistence

### 2. 2. 1. Faktory ovlivňující inzulinovou rezistenci

Příčiny vzniku a rozvoje IR jsou podle současných představ multifaktoriální. Na IR se podílí a ovlivňují ji genetické faktory, zvyšující se věk ale i zevní vlivy související s životním stylem jako je přejídání spojené s obezitou, nedostatek fyzické aktivity, psychický stres a některé léky.

**Genetické faktory** - IR se vyskytuje v některých populacích nebo rodinách častěji než v jiných a může být přítomná již v relativně mladém věku. V posledních dvaceti letech probíhá intenzivní výzkum genů, které by mohly být alespoň z části odpovědné za poruchu účinku inzulinu. Byly studovány varianty mnoha kandidátních genů, např. polymorfismus Gly972Arg v IRS1 (substrát inzulinového receptoru 1, z angl. insulin receptor substrate 1), varianty genu pro adiponektin a další (Stumvoll et al. 2005). Dosavadní výsledky svědčí pro polygenní základ fenotypových znaků MS, genetické pozadí IR a DM2 je velmi komplexní (Leahy 2005).

**Věk** - již dlouho je známo, že stárnutí je spojeno s poklesem citlivosti tkání k účinku inzulinu (Davidson 1979; DeFronzo et al. 1981; Lechleitner 2008; Zeyda and Stulning 2009), ale mechanismy, které jsou zodpovědné za tento jev, nejsou objasněny. Zřejmě jde o celou řadu faktorů, které se mění v závislosti na věku, jako je např. zdravotní stav jedince, fyzická aktivita či změny velikosti jater (Broughton and Taylor 1991). Výsledky studie „Baltimore Longitudinal Study of Aging“ ukazují významnou korelaci věku a glukózové tolerance

s ohledem na příspěvek obezity, tělesné konstituce a fyzické aktivity (Shimokata et al. 1991).

**Obezita** - je jedním ze symptomů MS, ale zároveň je významným faktorem, který přispívá k rozvoji IR a DM2. U obézních jedinců, zvláště těch s abdominální obezitou, byla nalezena snížená citlivost tkání k účinku inzulínu (Pouliot et al. 1992). Opakovaně bylo prokázáno, že snížení tělesné hmotnosti může vést k normalizaci citlivosti k účinku inzulínu u obézních diabetiků 2. typu (Freidenberg et al. 1988; Bak et al. 1992). V současnosti dochází k celosvětovému dramatickému nárůstu obezity a DM2. Zhruba 20 % amerických dětí je obézních a rozvíjejí se u nich základní součásti MS jako je IR, hypertenze, hyperlipidémie a glukózová intolerance (Weiss et al. 2004). Řada studií prokázala, že vhodná dieta a fyzická aktivita jsou schopné zpomalit manifestaci diabetu u osob se zhoršenou glukózovou tolerancí (Knowler et al. 2002; Tuomilehto et al. 2001).

**Výživa a životní styl** - složení potravy má významný vliv na rozvoj a průběh IR (López-Miranda and Pérez-Martínez 2007). Jakým způsobem a do jaké míry se tento vliv uplatňuje, je dáno jednak množstvím a složením přijímaných živin, jednak délkou trvání tohoto vlivu a dalšími faktory souvisejícími se stylem života (např. mírou fyzické aktivity). K IR přispívá jak dieta s vysokým obsahem tuků, tak sacharózy resp. fruktózy (Proietto et al. 1999). Vysoký přívod tuků v dietě vede k preferenčnímu využití mastných kyselin (MK) jako energetického substrátu, a tím inhibuje využití glukózy (Vessby 2000). Vysoký přívod tuků v dietě také stimuluje glukoneogenezi, která se podílí na zvýšené produkci glukózy v postprandiálním období. Chronické působení nadměrného množství glukózy (díky nedostatečně potlačené glukoneogenezi) zhoršuje inzulínovou senzitivitu svalové a tukové tkáně (Proietto et al. 1999). Dále se ukázalo, že na inzulínovou senzitivitu má vliv zastoupení MK v dietě. Zvýšený příjem satureovaných tuků zhoršuje glukoregulaci (Lichtenstein and Schwab 2000), zatímco nenasycené MK mají odlišný účinek. Bylo prokázáno, že dieta s rybím olejem, který je bohatý na n-3 MK, má protektivní účinek na zhoršenou glukózovou toleranci a DM (Feskens et al. 1995) a snižuje triglyceridémii (Rivellese et al. 1996). Předpokládá se, že vliv MK v dietě je alespoň částečně zprostředkován prostřednictvím změny zastoupení jednotlivých MK v buněčných membránách. Profil MK v membráně může ovlivnit působení inzulínu různými mechanismy zahrnujícími změny vazebné afinity inzulínového receptoru, ovlivnění permeability iontů membránami a změny na úrovni buněčné signalizace (López-Miranda and Pérez-Martínez 2007).

Také dieta s vysokým podílem sacharózy má nepříznivý vliv na inzulínovou senzitivitu (Mathers and Daly 1998). Metabolismus fruktózy má určité odlišnosti od metabolismu

glukózy. Fruktóza na své metabolické dráze nevyžaduje rychlost limitující krok katalyzovaný fosfofruktokinázou a v játrech se katabolizuje v glykolytické dráze rychleji než glukóza. Je tak akcentovaná syntéza a esterifikace MK a sekrece VLDL, stoupá koncentrace triglyceridů a inzulínu v plazmě a dochází k poruše glukózové homeostázy. Na rozdíl od vysokosacharóзовé diety, dieta s vyšším obsahem škrobu nemá nepříznivé účinky na inzulínovou senzitivitu (Thomsen et al. 1999).

### 2. 2. 2. Příčiny inzulínové rezistence

IR může být projevem genetické dispozice nebo může být důsledkem jakékoli hormonální či metabolické změny. Pravděpodobně se uplatňují jak genetické poruchy, tak sekundární defekty vzniklé v souvislosti se zevními podněty, ale i sekundární defekt navozený jinými geneticky určenými faktory, jako je například distribuce intraabdominálního tuku (Bartoš a Pelikánová 2000).

Tabulka 4 shrnuje výčet možných příčin IR, které představují abnormality v sekreci inzulínu  $\beta$ -buňkami pankreatu, abnormální molekuly inzulínu nebo neúplná přeměna proinzulínu na inzulín. Tyto poruchy se normalizují po podání exogenního inzulínu. Další možné příčiny IR jsou genové mutace. DM2 je onemocnění s častým familiárním výskytem, pravděpodobně s polygenní dědičností. Zatím nebyly objeveny mutace, které by se uplatňovaly u většiny nemocných. Složitost problematiky je dána množstvím signálních a regulačních proteinů, jejichž funkční nebo strukturální změny by se mohly uplatňovat. Uvažuje se, že roli může hrát polymorfismus genu pro substrát inzulínového receptoru (IRS1) (McGettrick et al. 2005), glykogensyntázu či glukokinázu (Glyon 2003) a celá řada dalších. Značná pozornost byla věnována poruchám inzulínového receptoru. Ačkoli bylo popsáno více jak 60 mutací genu pro tento receptor, zdá se, že příčinou IR jsou pouze zřídka (López-Miranda and Pérez-Martínez 2007; Bhattacharya et al. 2007; Mlinar et al. 2007).

Dále se na vzniku IR podílejí hormonální a metabolické příčiny. Uplatňuje se například hyperinzulinémie, která vede k down regulaci receptorů (snížení počtu inzulínových receptorů na povrchu buněk). Další příčinou může být hyperglykémie, která negativně ovlivňuje hlavní metabolické cesty, klíčové enzymy a geny  $\beta$ -buněk pankreatu, ale vyvolává i zánět, poškozují cévy a idukuje oxidační stres (Weyer et al. 1999; Jellinger 2007). Dále sem patří zvýšení NEMK a kontraregulačních hormonů, poruchy acidobazické rovnováhy, protilátky proti inzulínu a inzulínovému receptoru a další vlivy. Příčinou IR může být i celá řada dalších



látek, které jsou produkovány adipocyty, endotelem či imunokompetentními buňkami (prozánětlivé cytokiny - jako interleukin 6, TNF $\alpha$ , rezistin, PAI-1 a další).

**Tabulka 4** - Příčiny inzulinové rezistence

<p><b>I. Abnormální sekretorický produkt <math>\beta</math>-buněk pankreatu</b> Porucha se normalizuje po podání exogenního inzulinu.</p> <p>a) abnormální molekula inzulinu b) neúplná přeměna proinzulinu</p>
<p><b>II. Inzulinová rezistence v cílové tkáni</b> Porucha přetrvává i po podání exogenního inzulinu.</p> <p><b>a) primární porucha (mutace genů)</b> 1. mutace strukturálního genu inzulinového receptoru 2. mutace genů související s realizací účinků inzulinu - tyrosinkináza - signální proteiny - glukózové transportéry - glukokináza a její regulační protein - enzymy metabolismu glukózy, lipidů a proteinů - mitochondriální DNA</p> <p><b>b) sekundární porucha</b> (normalizuje se po odstranění příčiny, která k ní vede) 1. hormonální příčiny – zvýšení kontraregulačních hormonů – hyperinzulinismus 2. metabolické příčiny – zvýšení NEMK – hyperglykémie – acidóza x alkalóza – hyperosmolarita x hypoosmolalita 3. protilátky proti inzulinu a inzulinovému receptoru 4. prozánětlivé cytokiny, TNF<math>\alpha</math>, glykoprotein PC-1, fosfoprotein pp63</p>

*NEMK - neesterifikované mastné kyseliny, TNF $\alpha$  - faktor nekrotizující nádory  
Převzato a upraveno od (Bartoš a Pelikánová 2000).*

Lze konstatovat, že problematika patogeneze IR je velmi složitá a komplexní a roli může hrát defekt na kterékoliv úrovni v kaskádě dějů začínající vazbou inzulinu na inzulinový receptor, přes aktivaci tyrosinkinázy inzulinového receptoru, kaskádu fosforylačně-defosforylačních reakcí a končící aktivací efektorových systémů, které jsou zodpovědné za zprostředkování biologických účinků inzulinu. V současnosti je akceptována představa, že za snížený biologický účinek inzulinu jsou zodpovědné hlavně postreceptorové poruchy v cílových tkáních. Velká pozornost je také věnována úloze tukové tkáně, neboť ta nefunguje jako pouhá zásobárna energie ve formě triglyceridů, ale produkuje celou řadu působků, které se uplatňují v zánětlivém procesu, který je s obezitou úzce spjat a zároveň mohou interagovat s komponentami inzulinové signalizační kaskády, a tak přispívat k rozvoji IR. Adipocytokiny

se mohou uplatňovat i v kosterních svalech a játrech, kde mohou ovlivňovat inzulinovou senzitivitu (Kershaw and Flier 2004). Jak bylo již výše zdůrazněno, příčinou IR jsou také zvýšené hladiny NEMK (McGarry 2001; Eckel et al. 2005; Mlinar et al. 2007). Zvýšené hladiny NEMK zhoršují inzulinovou senzitivitu, negativně ovlivňují inzulinovou signální kaskádu (prostřednictvím aktivace buněčných kináz) a zvyšují oxidační stres (Ceriello 2000). NEMK také indukují IR v kosterních svalech (Boden et al. 2004).

#### 2. 2. 2. 1. Signalizační kaskáda inzulinu

**Normální přenos inzulinového signálu** – podmínkou k realizaci biologického účinku inzulinu je přítomnost specifického inzulinového receptoru na povrchu buněčné membrány a přenos informace na intracelulární výkonné systémy. Ty představují transportéry glukózy a enzymy jednotlivých metabolických drah. Schéma inzulinové signální kaskády je znázorněno na obrázku 1.

Inzulinový receptor je heterotetramerní glykoprotein složený ze dvou alfa a dvou beta podjednotek, které jsou spojeny disulfidickými můstky. Je přítomný na povrchu prakticky všech buněk, extrémně vysoký počet těchto receptorů je na povrchu buněk svalové, tukové a jaterní tkáně, které jsou cílovými tkáněmi působení inzulinu (Brunetti et al. 2001). Počet receptorů na povrchu buněk se liší v jednotlivých tkáních a není konstantní, závisí na syntéze, degradaci, internalizaci a recyklaci. Biologický poločas receptorů pro inzulin je 7-12 hodin (Bartoš a Pelikánová 2000). Inzulin se váže na alfa podjednotku receptoru, což vede k jejich oligomerizaci, k aktivaci tyrosinkinázy beta podjednotky a autofosforylaci tyrosinových zbytků beta podjednotky receptoru. Tak se zahajuje série fosforylačně-defosforylačních reakcí vedoucích k tvorbě signálu, který aktivuje glukózové transportéry a intracelulární enzymy. Tyrosinová kináza inzulinového receptoru dále fosforyluje zbytky tyrosinů IRS proteinů (IRS1-4), které fungují jako lešení, na které se váží další adaptorové proteiny signální kaskády (Stumvoll et al. 2005). Přenos inzulinového signálu je tedy realizován sérií fosforylačně-defosforylačních reakcí celé řady intracelulárních proteinů, kterých je v současnosti známo více jak 150. Od IRS proteinů se signální dráha rozchází do tří různých základních signálních cest: (i) cesta přes PI3 kinázu (PI3K, fosfatidylinositol-3-kináza, z angl. phosphoinositide-3-kinase), (ii) cesta přes CAP/Cbl/TC10, (iii) cesta vedoucí přes MAP kinázu (MAPK, mitogeny aktivovaná proteinkináza, z angl. mitogen activated protein kinase) (Pirola et al. 2004).

PI3 kináza interaguje s fosforylovanými tyrosiny na IRS proteinech, což má za následek fosforylaci PIP<sub>2</sub> (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát) na PIP<sub>3</sub> (fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát). PIP<sub>3</sub> funguje v buňce jako druhý posel, aktivuje PDK1 (na fosfoinositidech závislá kináza 1, z angl. phosphoinositide-dependent kinase 1), která dále fosforyluje proteinkinázu B (PKB, Akt) a atypické izoformy proteinkinázy C (PKC). Atypické izoformy PKC (αPKC) ζ a λ aktivují glukózové přenašeče GLUT4, které translokují z cytosolu k buněčné membráně, přes kterou transportují molekuly glukózy dovnitř do buňky. PKB fosforyluje, a tím inaktivuje kinázu glykogensyntázy 3 (GSK3, z angl. glycogen synthase kinase 3), což v konečném důsledku vede k syntéze glykogenu. PKB také zprostředkovává snížení aktivity genu pro fosfoenolpyruvátcarboxykinázu (PEPCK, z angl. phosphoenolpyruvate carboxykinase) a ovlivňuje expresi řady dalších genů a translokaci hlavního glukózového přenašeče GLUT4 k plazmatické membráně. PKB aktivuje i proteosyntézu, která je zprostředkována přes mTOR (mammalian target of rapamycin) (Mlinar et al. 2007; Pirola et al. 2004; Saltiel and Kahn 2001).

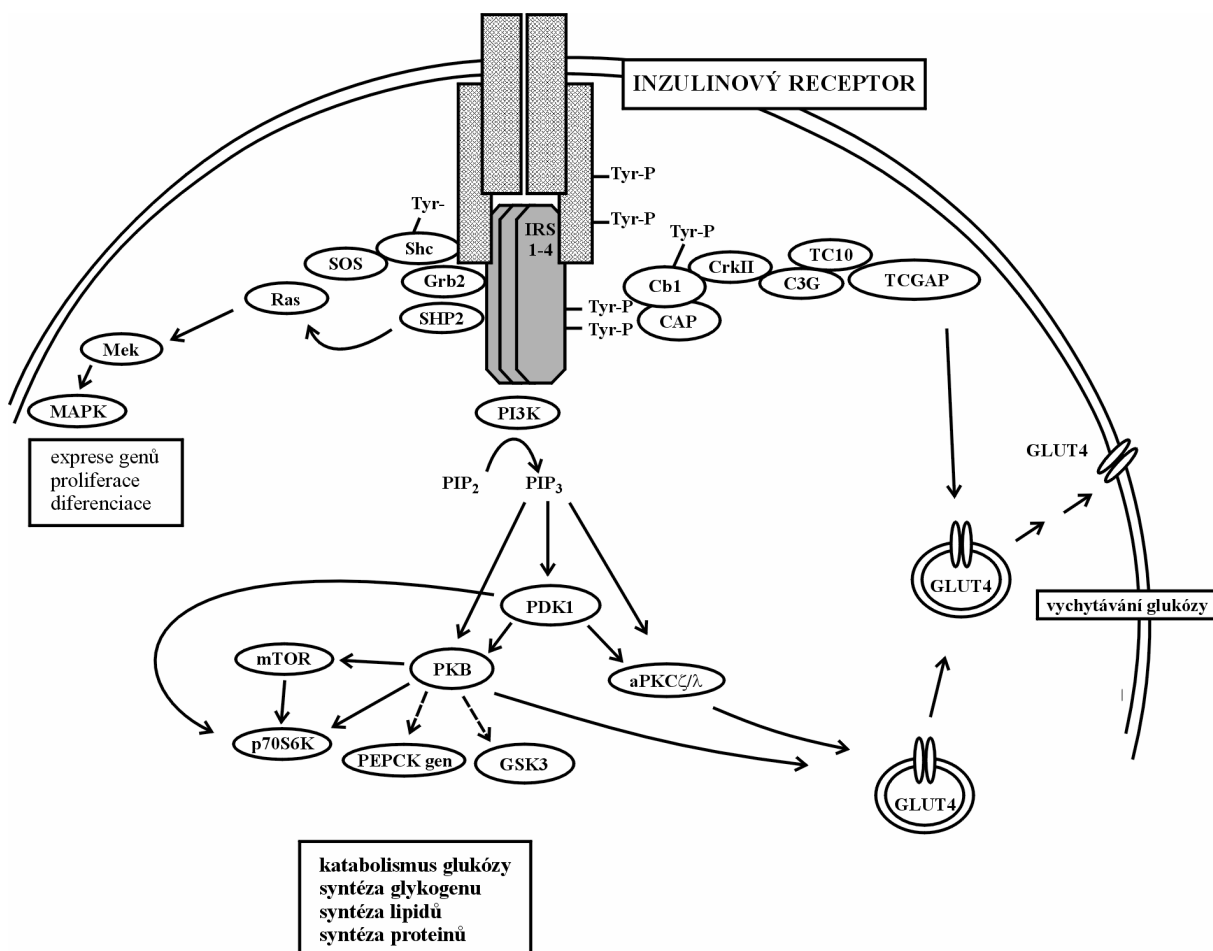
Druhá signalizační dráha zprostředkovává transport glukózy do buňky přes GLUT4. Signalizace se účastní adaptérový protein CAP, protoonkogen Cbl a další komponenty kaskády (CrkII, C3G, TC10 a TCGAP). Tato dráha funguje souběžně s dráhou vedoucí přes PI3K a společně se podílejí na vychytávání glukózy a jejím přenosu do buňky prostřednictvím GLUT4 (Pirola et al. 2004).

Třetí důležitá signální dráha inzulinové signalizační kaskády zprostředkovává účinky inzulinu na úrovni genové exprese. Zprostředkovává růstové funkce inzulinu, proliferaci a diferenciaci buněk. Přenosu signálu se účastní Ras, což je skupina GTP (guanosintrifosfát) vázajících proteinů, které odpovídají za aktivaci řady serin/threoninových kináz, jako je MEK proteinkináza a MAPK (Saltiel and Kahn 2001; Bevan 2001).

Prostřednictvím celé této signalizační dráhy se přenáší inzulinový signál a indukují se účinky inzulinu. Inzulin ovlivňuje energetický metabolismus, stimuluje anabolické a blokuje katabolické pochody v metabolismu glukózy, tuků a bílkovin. Významná je také jeho proliferační (mitogenní) aktivita a ovlivnění membránového transportu iontů. Hlavními cílovými tkáněmi inzulinu jsou svaly, játra a tuková tkáň. Z kvantitativního hlediska je nejdůležitější svalová tkáň (DeFronzo et al. 1981). Ve svalech inzulin aktivuje GLUT4 a zvyšuje vychytávání glukózy. Zvyšuje syntézu glykogenu, stimuluje glykolýzu a oxidaci glukózy a blokuje odbourávání glykogenu. Stimuluje vychytávání aminokyselin z plazmy,

stimuluje proteosyntézu a blokuje proteolýzu. Tříuhlíkaté produkty glykolýzy jsou transportovány do jater, kde jsou využity pro syntézu MK, glukoneogenezi a syntézu glykogenu, protože ve svalech neprobíhá lipogeneze. V játrech inzulín zvyšuje vychytávání glukózy z krve, její fosforylaci a tvorbu glykogenu a urychluje glykolýzu. Stimuluje syntézu MK a bílkovin.

**Obrázek 1** – Schéma inzulínové signalizační kaskády



*aPKC* – atypické proteinkinázy C, *GSK3* – kináza glykogensyntázy 3, *GLUT 4* – glukózové transportéry, *IRS-1-4* – substráty inzulínového receptoru, *MAPK* – mitogeny aktivovaná proteinkináza, *mTor* - cíl působení rapamycinu u savců, *PDK1* – na fosfoinositidech závislá kináza 1, *PEPCK* – fosfoenolpyruvátcarboxykináza, *PI3K* – fosfatidylinositol-3-kináza, *PIP<sub>2</sub>* – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, *PIP<sub>3</sub>* – fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát, *PKB* – proteinkináza B, *p70S6K* – p70 ribosomální S6 kináza  
Upraveno a převzato od (Mlinar et al. 2007).

V tukové tkáni inzulín inhibuje hormonsenzitivní lipázu a brání tak lipolýze zásobních triglyceridů. Zvyšuje lipogenezi tím, že stimuluje vychytávání glukózy z plazmy a glykolýzu, při které vzniká glycerol-3-fosfát, který je pak využit pro syntézu triglyceridů. Inzulín také

aktivuje lipoproteinovou lipázu, která štěpí triglyceridy v plazmatických lipoproteinech VLDL a chilomikronech na glycerol a MK, které jsou po vstupu do adipocytů využity k lipogenezi (Bartoš a Pelikánová 2000).

Inzulin má důležitou roli i v metabolismu minerálů. Zajišťuje optimální distribuci iontů sodíku a draslíku v organismu, podílí se na udržování gradientu mezi intra- a extracelulárním prostředím tím, že zvyšuje aktivitu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy, která transportuje ionty draslíku do buněk výměnou za ionty sodíku. Prokázán byl také vazodilatační účinek inzulinu, zprostředkovaný produkcí NO endoteliálními buňkami.

**Defekty v inzulinové signalizační kaskádě** – poruchy účinku inzulinu, kromě inaktivace samotného inzulinu během jeho cirkulace v krvi, zahrnují poruchy na receptorové a postreceptorové úrovni signalizační kaskády. Defekty jsou způsobeny genetickými faktory nebo enviromentálními vlivy (Mlinar et al. 2007). Bylo prokázáno, že příčinou IR může být genetická predispozice pro abnormální funkci určitých signalizačních proteinů, jako jsou např. IRS1, IRS2, aPKC, glykogensyntáza a další (Shinner et al. 2005). Na poruše přenosu inzulinového signálu se podílí dysfunkce celé řady komponent signalizační kaskády počínaje receptorem pro inzulin. V úvahu přichází jeho zvýšená degradace (Taylor et al. 1982) nebo fosforylace na zbytcích serinu a threoninu (Ser/Thr) prostřednictvím PKC (Bossenmaier et al. 2000). Defekty na postreceptorové úrovni zahrnují zvýšenou Ser/Thr fosforylaci IRS1, pravděpodobně následkem zvýšené hladiny  $\text{TNF}\alpha$  a hyperinzulinémie, která provází IR. Nadměrná Ser/Thr fosforylace IRS1, na které se podílejí PKC a MAPK, vede ke zvýšené proteosomální degradaci IRS1. Snížené hladiny proteinu IRS1 byly popsány u lidí, zvířat i buněčných kultur s IR (Pirola et al. 2004). Z uvedených nálezů vyplývá, že IRS proteiny hrají klíčovou roli v rozvoji IR (Montecucco et al. 2008).

Inzulin a cytokiny  $\text{TNF}\alpha$  a interleukin 6 (IL6) vyvolávají tvorbu významné skupiny faktorů přispívajících k IR – supresorů cytokinové signalizace SOCS1 a SOCS3, které působí nejméně třemi odlišnými mechanismy: (i) soutěží s IRS1 o vazbu a asociaci na inzulinový receptor, (ii) inhibují Janus kinázu, komponentu signalizační kaskády inzulinu, (iii) zvyšují proteosomální degradaci IRS1 (Kile et al. 2002).  $\text{TNF}\alpha$  také snižuje expresi GLUT4, přenašeče glukózy realizujícího transport glukózy v buňkách svalové a tukové tkáně pod vlivem inzulinu (Ruan et al. 2002). Důležitou úlohu může mít i hyperglykémie, která významně snižuje aktivitu PKB (Pirola et al. 2004).

Další významnou skupinou látek, podílejících se na zhoršeném přenosu inzulínového signálu, jsou NEMK. Zvýšené plazmatické koncentrace NEMK se podílejí na zvýšených intracelulárních hladinách acylkoenzymu A (acyl-CoA) a diacylglycerolu (DAG), který aktivuje PKC  $\theta$  (Yu et al. 2002). Aktivovaná PKC  $\theta$  zvyšuje Ser/Thr fosforylaci IRS, což zhoršuje interakci IRS1 s inzulínovým receptorem. Následkem zvýšených hladin NEMK jsou také zhoršené aktivity IRS2, PI3K, PKC $\lambda$ , PKC  $\zeta$  a GSK (Pirola et al. 2004).

V některých případech IR se na zhoršení citlivosti tkání k účinku inzulínu může podílet snížení počtu GLUT4 nebo jejich aktivity či porucha jejich translokace z intracelulárního kompartmentu k buněčné membráně (Kahn 1992).

**Glykogensyntáza (GS)** - GS je jednou z efektorových molekul zodpovědných za zprostředkování biologických účinků inzulínu. Je to rychlost limitující enzym, který kontroluje neoxidativní využití glukózy. Katalyzuje syntézu glykogenu z aktivovaných molekul glukózy v játrech a svalích. Enzym existuje ve dvou formách, jako aktivní, defosforylovaná forma a inaktivní, fosforylovaná forma. Kovalentní aktivace GS stimulovaná inzulínem je spojena s její defosforylací, cestou, která zahrnuje řadu dalších defosforylačních a fosforylačních enzymů, včetně proteinfosfatázy 1 (PP1) a GSK3. Jaterní GS je aktivovaná především koncentrací monosacharidů, zatímco svalová GS je aktivovaná inzulínem. Jaterní a svalová GS jsou kódovány odlišnými geny (Groop and Orho-Melander 2008).

Kosterní sval spotřebovává většinu energie produkované v organismu, proto je považován za nejdůležitější orgán z hlediska rozvoje IR. Charakteristickým znakem DM2 je zhoršené neoxidativní využití glukózy a snížená aktivita GS (Nikoulina et al. 2000). GS, jako klíčový enzym tohoto děje, je tudíž důležitým kandidátem pro možný genetický defekt způsobující IR. Ukázalo se však jako nepravděpodobné, že by mutace genu pro GS mohly hrát hlavní roli v patogenezi IR kosterních svalů u DM2, i když jich byla celá řada identifikována (Groop 2000). Předpokládá se, že hlavní defekt v aktivitě GS ve svalu zahrnuje změnu v allosterické a kovalentní regulaci aktivity enzymu, tedy poruchu v signalizační kaskádě, jíž je GS součástí (Park et al. 2000). Mezi tyto poruchy patří také snížení aktivity GS po její fosforylaci PKC (Blackmoore et al. 1986).

Z uvedeného výčtu vyplývá propojenost jednotlivých příčin IR s faktory, které negativně ovlivňují inzulínovou signalizační kaskádu. Na poruše přenosu signálu inzulínu se může prakticky podílet jakákoliv komponenta jeho signalizační dráhy. I přes intenzivní výzkum v této oblasti není molekulární podstata IR dosud plně objasněna.

#### 2. 2. 2. 2. Úloha NEMK v patogenezi inzulinové rezistence

Současné poznatky ukazují, že v rozvoji IR hraje klíčovou roli zvýšená dostupnost a využití NEMK (DeFronzo 2004). Abnormality v lipidovém metabolismu byly pozorovány u obezity, o které se uvažuje jako o jedné z možných příčin IR, neboť v řadě studií bylo opakovaně prokázáno, že přírůstek hmotnosti snižuje inzulinovou senzitivitu, zatímco redukce tělesné hmotnosti působí opačně (Beck-Nielsen et al. 1979; Freidenberg et al. 1988; Bak et al. 1992). Tuková tkáň obézních jedinců je vzhledem k rezistenci adipocytů k antilipolytickému účinku inzulinu významným zdrojem zvýšených hladin NEMK. Roli NEMK v indukci IR vysvětluje Randleův cyklus, jehož podstatou je kompetice mezi MK a glukózou jako energetickými substráty pro oxidaci ve svalové a tukové tkáni. Zvýšený přísun NEMK vede k jejich přednostní oxidaci před oxidací glukózy, jejíž vstup do buňky je při IR omezen (Randle et al. 1963). Tento posun je zprostředkován kaskádou zpětnovazebných inhibicí enzymů glykolýzy a oxidace glukózy. Zvýšená oxidace NEMK vede k vyčerpání nikotinamidadeninukleotidu (NAD) a inhibici Krebsova cyklu. Vzestup hladin acetyl-CoA a citrátu inhibuje aktivitu pyruvátdehydrogenázy a fosfofruktokinázy. Vzestup glukóza-6-fosfátu snižuje aktivitu hexokinázy. Výsledkem těchto abnormalit je hromadění glukózy, která nevstupuje do glykolýzy a není využívána k syntéze glykogenu (Bartoš a Pelikánová 2000). Snížené vychytávání a zpracování glukózy významně přispívá k hyperglykémii. Zvýšená hladina glukózy stimuluje  $\beta$ -buňky pankreatu k sekreci stále většího množství inzulinu, což vede k hyperinzulinémii, která následně vyvolává další zvýšení hladin triglyceridů (Kraegen et al. 2001).

Akutní i chronické zvýšení NEMK vyvolává IR ve svaích a játrech, přispívá k rozvoji DM2, hypertenze, dyslipidémie a nealkoholické jaterní steatózy (NAFLD, z angl. nonalcoholic fatty liver disease) (Boden 2006). V játrech jsou vysoké hladiny NEMK substrátem pro syntézu triglyceridů, VLDL a pro glukoneogenezi. Ve svaích NEMK podléhají  $\beta$ -oxidaci, což vede ke sníženému vychytávání a utilizaci glukózy a inhibici syntézy glykogenu (Boden et al. 1994). V  $\beta$ -buňkách pankreatu vede dlouhodobá expozice nadměrným hladinám NEMK k zhoršené sekreci inzulinu a inhibici exprese genu pro inzulin, tím, že působí jako toxické agens pro  $\beta$ -buňky (Poitout et al. 2006).

V mechanismu, kterým NEMK indukují IR, hraje významnou roli ektopické ukládání triglyceridů. Nadměrné množství triglyceridů se akumuluje v játrech, které se tímto poškozují, navozují jaterní IR a následně chronické poškození jater, které se může manifestovat jako NAFLD (Rector et al. 2008). V kosterních svaích se NEMK skladují ve formě kapének

triglyceridů (Eckel et al. 2005). V řadě studií bylo u lidí a zvířat opakovaně prokázáno silné propojení mezi nadměrnou akumulací lipidů a IR (Phillipis et al. 1996; Pan et al. 1997; Kreagen et al. 1991; Russell et al. 1998). NEMK se podílejí na poruchách přenosu inzulinového signálu tím, že ovlivňují inzulinovou signalizační kaskádu (Hegarty et al. 2003; Boden 2006; Timmers et al. 2007). NEMK, ale i další lipidové intermediáty DAG, acylkoenzymy A s dlouhým řetězcem (LCACoA, z angl. long-chain acyl-CoA) a ceramidy přispívají k IR tím, že aktivují nebo interagují s komponentami signalizační dráhy inzulinu. DAG a NEMK aktivují izoformu PKC  $\theta$  ve svalu potkana a PKC  $\beta$  a  $\delta$  v lidském svalu, které negativně ovlivňují přenos signálu inzulinu tím, že zvyšují fosforylaci serinů na IRS1 a inzulinovém receptoru, což vede ke snížené fosforylaci tyrosinů a inhibici působení inzulinu (Chin et al. 1993; Itani et al. 2002; Griffin et al. 1999). NEMK aktivují celou řadu dalších komponent signalizační kaskády inzulinu, jako například c-Jun N-terminální kinázu (JNK, z angl. c-Jun N-terminal kinase), inhibitor  $\kappa$ B kinázy (IKK, z angl. inhibitor  $\kappa$ B kinase) a další kinázy, a tak prostřednictvím jejich aktivace indukují IR v hepatocytech a kosterních svalech (Montecucco et al. 2008). NEMK se také podílejí na indukcii mírného zánětu v kosterních svalech a játrech prostřednictvím aktivace nukleárního faktoru  $\kappa$ B, což vede k produkci řady prozánětlivých a proaterogenních cytokinů (Boden 2006).

Zvýšené plazmatické hladiny NEMK jsou zodpovědné zhruba za 50 % případů IR u obézních pacientů s DM2. Snížení hladin NEMK u těchto pacientů nebo ovlivnění komponent signalizační kaskády, prostřednictvím které NEMK vyvolávají IR, by mohlo představovat slibný přístup k léčbě DM2 (Boden 2002).

### 2. 2. 2. 3. Úloha tukové tkáně v patogenezi inzulinové rezistence

MS a IR jsou úzce spjaty s abdominální obezitou. Abdominální obezita je jedním z nejběžnějších projevů MS, je ukazatelem dysfunkční tukové tkáně (Després and Lemieux 2006) a zároveň se považuje za jednu z příčin MS a s ním spojené IR (Després 2006). Nadměrná akumulace viscerálního tuku je asociovaná s řadou aterogenních a diabetogenních abnormalit a s chronickým zánětem, charakterizovaným abnormální produkcí cytokinů, zvýšenou produkcí reaktantů akutní fáze zánětu a řadou dalších mediátorů, které se podílejí na aktivaci signalizačních drah zánětu (Hotamisligil 2006) a regulaci inzulinové senzitivity. Buňky tukové tkáně produkují celou řadu cytokinů (adipocytokinů), které jsou považovány za spojovací článek mezi nadměrnou akumulací tuku a pozměněnou inzulinovou senzitivitou (Dyck et al. 2006). Některé adipocytokiny se podílejí na zhoršování inzulinové senzitivity



(rezistin, TNF $\alpha$ ), jiné naopak inzulinovou senzitivitu zvyšují (adiponektin, leptin) (Dyck et al. 2006).

**Rezistin** – rezistin je nedávno objevený protein sekretovaný tukovou tkání myší a potkanů (Steppan et al. 2001). Rezistin je považován za významný faktor přispívající k IR, např. zvýšené sérové koncentrace rezistinu byly pozorovány u obézních potkanů (Steppan et al. 2001). Infuze rekombinantního rezistinu neobézním kontrolním zvířatům indukovala IR, zatímco jeho imunoneutralizace zlepšila inzulinovou senzitivitu u inzulinorezistentních obézních zvířat (Bastard et al. 2006). Bylo prokázáno, že rezistin snižuje inzulinem stimulovaný transport glukózy *in vitro* a zvyšuje glykémii na lačno a jaterní produkci glukózy *in vivo* (Rajala et al. 2003; Moon et al. 2003; Pravenec et al. 2003). Rezistin přispívá k IR také tím, že indukuje expresi SOCS3, negativního regulátoru přenosu signálu inzulinu (Emanuelli et al. 2001). Ukázalo se, že hladinu rezistinu snižují thiazolidindiony, léky používané k léčbě DM2 (Steppan et al. 2001). U myší bylo pozorováno, že exprese mRNA pro rezistin je v adipocytech výrazně potlačena agonisty PPAR $\gamma$  (jaderný receptor PPAR $\gamma$ , z angl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Way et al. 2001). Zatímco myší rezistin je výhradně exprimovaný v bílé tukové tkáni, lidský rezistin je převážně exprimován v cirkulujících monocitech a makrofázích (Patel et al. 2003). Na základě výsledků studií na potkanech a myších je rezistin považován za možné pojítko mezi tukovou tkání, obezitou a IR, ale výsledky u lidí jsou kontroverzní. Většina studií nenašla žádnou korelaci mezi plazmatickými hladinami rezistinu, IR a obezitou (Bastard et al. 2006; Patel et al. 2003), takže úloha rezistinu u lidí zatím není známá (Mlinar et al. 2007).

**TNF $\alpha$**  - TNF $\alpha$  byl první protein sekretovaný tukovou tkání, o kterém bylo prokázáno, že ovlivňuje glukózovou homeostázu a je zahrnut v patogenezi obezity a IR (Hotamisligil 1999). Podle současných poznatků jsou hlavním zdrojem TNF $\alpha$  makrofágy tukové tkáně (Weisberg et al. 2003), ale je exprimován i v samotných adipocytech. Hladiny TNF $\alpha$  jsou zvýšené u obezity a dalších inzulinorezistentních stavů a pozitivně korelují s mírou obezity a IR (Hotamisligil et al. 1993). Chronická expozice TNF $\alpha$  indukovala IR, a naopak blokáda působení TNF $\alpha$  obnovila inzulinovou senzitivitu *in vitro* a *in vivo* (Rosen and Spiegelman 2006). TNF $\alpha$  je významným negativním regulátorem inzulinové signální kaskády, indukuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), a tak významně přispívá k rozvoji IR (Houstis et al. 2006). Dále ovlivňuje funkci adipocytů, inhibuje lipogenezi a zvyšuje lipolýzu, což vede ke zvýšeným hladinám NEMK (Kahn and Flier 2000).

**Adiponektin** – adiponektin je adipocytokin sekretovaný výlučně adipocyty. Má výrazné anti-diabetické vlastnosti tím, že ovlivňuje metabolismus glukózy a MK ve svalech a játrech (Dyck et al. 2006), kromě toho má také antiaterogenní a protizánětlivé vlastnosti (Van Gaal et al. 2006). Na rozdíl od většiny dalších adipocytokinů, jsou jeho plazmatické hladiny sniženy u obezity, diabetu a dalších inzulinorezistentních stavů jak u lidí, tak i potkanů (Van Gaal et al. 2006). Adiponektin zlepšuje inzulinovou senzitivitu různými mechanismy podle tkáně na kterou působí. V játrech indukuje oxidaci MK, snižuje syntézu lipidů, snižuje vychytávání NEMK a potlačuje glukoneogenezi. V kosterním svalu podporuje oxidaci glukózy a NEMK. Tyto inzulin senzitivující efekty jsou zprostředkované přes aktivaci AMP kinázy (AMPK, 5'adenosinmonofosfát-aktivovaná proteinkináza), která reguluje buněčné koncentrace malonyl-CoA tím, že inhibuje acetyl-CoA karboxylázu. Inhibice enzymu vede ke sníženým hladinám malonyl-CoA a následně ke snížené lipogenezi spojené se zvýšenou  $\beta$ -oxidací MK v mitochondriích (Chandran et al. 2003). Adiponektin snižuje plazmatické hladiny NEMK a glukózy, katabolismus NEMK je stimulován přes aktivaci nukleárních receptorů PPAR $\gamma$  (Stefan et al. 2002). Bylo prokázáno, že léčba adiponektinem zlepšuje inzulinovou senzitivitu u zvířecích modelů IR (Matsuzawa 2005). Hladiny adiponektinu stoupají při redukci tělesné hmotnosti a terapii thiazolididiony, agonisty nukleárních receptorů PPAR $\gamma$  (Mlinar et al. 2007).

**Leptin** – leptin je multifunkční protein sekretovaný adipocyty bílé tukové tkáně. Tento adipocytokin má ústřední roli v regulaci energetické homeostázy, kontroluje příjem potravy a energetický výdej (Van Gaal et al. 2006). Zvýšené hladiny leptinu byly zaznamenány u řady případů lidské obezity, předpokládá se, že leptin by mohl mít významnou úlohu při IR a MS (Van Gaal et al. 2006). Významným způsobem ovlivňuje glukózovou homeostázu, má antihyperglykemické účinky. Leptin snížil hyperglykémii u obézních myší (ob/ob myši) ještě před tím, než došlo k úpravě jejich tělesné hmotnosti (Pellemounter et al. 1995). Antihyperglykemické působení leptinu je zprostředkováno řadou různých orgánů. Ve svalech leptin zlepšuje inzulinovou senzitivitu a zabraňuje ektopickému ukládání lipidů prostřednictvím aktivace AMPK (Minokoshi et al. 2002). V játrech leptin také zlepšuje inzulinovou senzitivitu a redukuje intracelulární hladinu triglyceridů. Leptin ale funguje především na úrovni centrální nervové soustavy a mozku (hypotalamu), prostřednictvím kterého redukuje příjem potravy a zvyšuje energetický výdej (Rosen and Spiegelman 2006).

Mezi další intenzivně studované adipocytokiny patří interleukin 6 (IL6), RBP4 (angl. retinol-binding protein 4), visfatin, omentin a celá řada dalších. IL6 je cytokin úzce spjatý s IR, jeho

plazmatické hladiny jsou dobrým prediktorem rozvoje DM2 (Vozarova et al. 2001). Podání IL6 potkanům i lidem indukovalo hyperlipidémii, hyperglykémii a IR (Stith and Luo 1994). RBP4 je jeden z nejnovějších adipocytokinů, o kterém se předpokládá, že by mohl přispívat k IR indukované obezitou. Zvýšené sérové koncentrace RBP4 mohou přispívat k IR tím, že zhoršují inzulinem stimulované vychytávání glukózy ve svalech a zvyšují její jaterní produkci, ale mechanismus jeho působení není známý (Yang et al. 2005). Visfatin je protein produkovaný viscerální tukovou tkání a pravděpodobně nepřispívá k IR, ale naopak podporuje vychytávání glukózy tím, že se přímo váže na inzulinový receptor a aktivuje jej (Rosen and Spiegelman 2006). Omentin je další peptid sekretovaný převážně viscerální tukovou tkání. Podobně jako visfatin pozitivně ovlivňuje vychytávání glukózy a působí jako látka zvyšující inzulinovou senzitivitu (Yang et al. 2006). Mechanismus a cílové tkáně jeho působení zůstávají nejasné.

V současné době probíhá intenzivní výzkum adipocytokinů a jejich možných úloh v patogenezi IR. Vzhledem k tomu, že řada těchto působků byla objevena teprve nedávno (většina z nich ne více než před 10 lety), mechanismus jejich působení, cílové tkáně a signalizační dráhy, prostřednictvím kterých realizují své účinky, nejsou dostatečně vysvětleny.

### 2. 2. 3. Léčba inzulinové rezistence

Vzhledem ke stěžejní roli IR v patogenezi DM2 a jeho kardiovaskulárních komplikací, je léčba IR zaměřena především na zlepšení citlivosti tkání (svalové, tukové, jaterní) k účinku inzulinu. Terapie zahrnuje jednak změny životního stylu spolu s pravidelnou fyzickou aktivitou a redukcí tělesné hmotnosti, které snižují riziko rozvoje zhoršené glukózové tolerance a následného DM2, jednak léčbu farmakologickou (Stumvoll et al. 2005). V současnosti se používají k léčbě IR a DM2 zejména thiazolidindiony, metformin a deriváty sulfonylurey.

**Thiazolidindiony (TZD)** – thiazolidindiony, jako například rosiglitazon nebo pioglitazon, jsou léky používané k léčbě DM2, neboť zvyšují inzulinovou senzitivitu. Příznivě ovlivňují poruchy doprovázející DM2 tím, že snižují glykémii, zlepšují dyslipidémii, cévní funkce a zánětlivý stav. TZD jsou agonisté nukleárních receptorů PPAR $\gamma$ , které regulují transkripci genů citlivých k inzulinu a zapojených v kontrole metabolismu glukózy a lipidů v tukové a svalové tkáni. V tukové tkáni mění distribuci a metabolismus tuků a podněcují diferenciaci

preadipocytů ve zralé adipocyty, které mají dostatečnou kapacitu ke skladování triglyceridů. TZD redistribují triglyceridy z viscerální tukové tkáně do podkožní tukové tkáně, která vykazuje menší lipolytickou aktivitu, což má za následek snížení hladin NEMK v cirkulaci (Ye et al. 2004). Mezi další příznivé účinky TZD patří snížení hladin prozánětlivých cytokinů (např. TNF $\alpha$ , IL6), které přispívají k IR a zároveň zvyšují koncentraci adiponektinu, který má protizánětlivé vlastnosti a rovněž zvyšuje inzulinovou senzitivitu (Stumvoll et al. 2005). Na rozdíl od metforminu, TZD mohou být použity i pro léčbu pacientů se sníženou funkcí ledvin a jsou lépe tolerovány bez nepříjemných vedlejších vlivů v gastrointestinálním traktu. Hlavním nežádoucím vedlejším vlivem TZD je přírůstek hmotnosti, který souvisí s vlivem léků na remodelaci tukové tkáně a skladování triglyceridů. Dále byla u některých pacientů pozorována retence tekutin, která vedla k perifernímu otoku (Stumvoll et al. 2005). Mechanismus jejich působení není dosud zcela objasněn.

**Metformin** – metformin je vysoce účinný lék proti hyperglykémii. Snižuje jaterní produkci glukózy a má příznivé účinky na kardiovaskulární onemocnění (Bailey and Turner 1996; Mamputu et al. 2003). Metformin nemá tak velký vliv na IR, zánětlivé markery a cévní funkci v porovnání s TZD, ale jeho výhoda spočívá v tom, že nevede k hmotnostním přírůstkům, které jsou pozorované u léčiv zvyšujících sekreci inzulinu (Stumvoll et al. 2005).

**Deriváty sulfonylurey** – deriváty sulfonylurey (glibenclamid, glipizid, gliclazide, tolbutamid) zvyšují sekreci inzulinu, čímž zlepšují regulaci glykémie. Působí ve slinivce břišní, kde uzavírají kanály pro draselné ionty, což vede ke zvýšené sekreci inzulinu. Dále bylo prokázáno, že deriváty sulfonylurey snižují riziko makro- a mikrovaskulárních komplikací u pacientů s DM2 (studie UKPDS 1998).

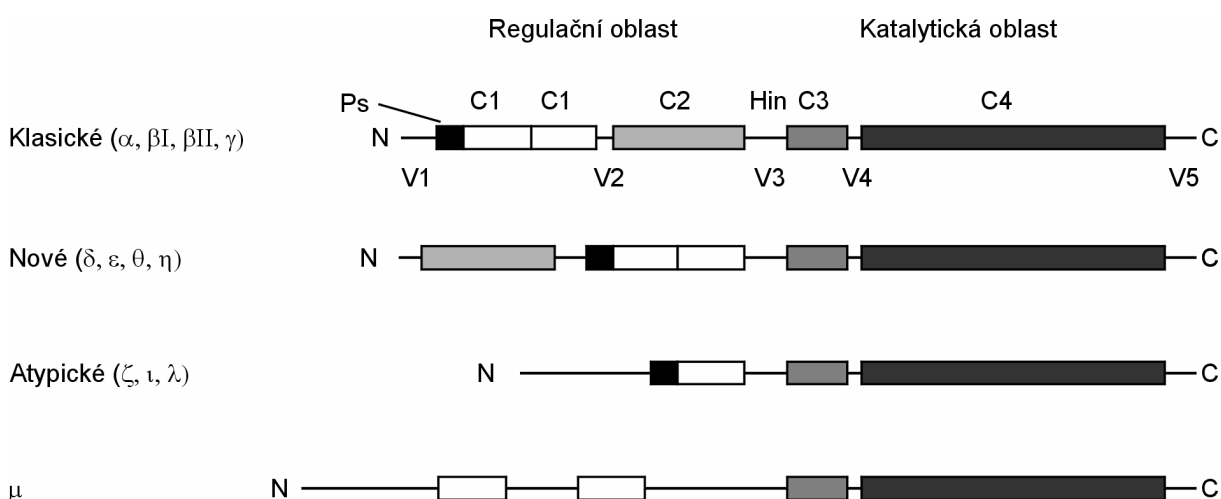
### 2. 3. Proteinkináza C

Proteinkináza C (PKC) byla poprvé popsána v roce 1977 v laboratoři Nishizuky a spol. (Takai et al. 1977) a její výzkum se poté stal středem zájmu mnoha laboratoří. PKC se vyskytuje v různých tkáních savců, je zde zapojena v celé řadě signálních drah a podílí se tak na regulaci buněčných dějů, jako je diferenciací buněk, kontrola růstu, kancerogeneze, apoptóza, transport iontů, metabolismus lipidů a glukózy, procesy spojené s pamětí a učením, zánětlivé procesy a imunitní odpovědi a celá řada dalších. Důležitou úlohu má v patogenezi řady chorob, např. hypertenze, aterosklerózy, diabetu a jeho makro- a mikrovaskulárních komplikací (Nishizuka 1989; Idris et al. 2001; Battainy and Mochly-Rosen 2007).

### 2. 3. 1. Klasifikace a struktura PKC

PKC je kináza fosforylující proteiny na hydroxylových zbytcích serinu a threoninu (Ser/Thr kináza). Je známo celkem 12 izoenzymů PKC, které se dělí na základě strukturálních a funkčních rysů do tří podskupin (obrázek 2) (Newton 1997). První podskupinu tvoří tzv. klasické PKC (cPKC). Jejými zástupci jsou izoformy  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II a  $\gamma$ . Jsou aktivovány ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG a fosfatidylserinem (PS). Další podskupina jsou tzv. nové izoformy PKC (nPKC), kam patří izoformy  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ , a  $\eta$ . Jsou aktivovány DAG a PS. Poslední podskupina jsou tzv. atypické PKC (aPKC), kam se řadí izoformy  $\zeta$ ,  $\iota$  a  $\lambda$ . Jejich regulace zatím nebyla zcela objasněna, je známo, že jsou aktivovány PS. Do zcela zvláštní třídy patří izoforma  $\mu$ , jejíž kinázové jádro se nejvíce podobá kalmodulin dependentním kinázám a postrádá pseudosubstrátový motiv (Newton 1997).

**Obrázek 2** – Schéma struktury izoenzymů PKC



*C1 až C4 - konzervativní domény, V1 až V5 – variabilní domény*

*Ps – pseudosubstrátová doména, C1 – doména bohatá na cystein vázající diacylglycerol, C2 – doména vázající kyselý fosfolipidy a u cPKC  $\text{Ca}^{2+}$ , Hin – variabilní doména oddělující regulační a kinázovou oblast, C3 – doména vázající ATP, C4 – doména vázající substrát*

*Upraveno a převzato od (Newton 1997).*

Molekuly jednotlivých PKC tvoří jediný polypeptidový řetězec o molekulové hmotnosti 80-90 kDa s N-koncovou regulační oblastí a C-koncovou kinázovou oblastí, který je rozdělen až do čtyřech C domén (C1 – C4) oddělených až pěti variabilními doménami (V1 – V5). Každá z izoforem PKC je kódována odlišnými strukturálními geny, kromě izoforem  $\beta$ I a  $\beta$ II, které jsou exprimovány alternativním sestřihem jednoho genu.

Regulační oblast enzymu je tvořena pseudosubstrátovou (autoinhibiční) doménou, jednou nebo dvěma C1 doménami, které jsou přítomné ve všech izoenzimech a C2 doménou

přítomnou v klasických a nových izoformách PKC. Pseudosubstrátová doména při absenci aktivátorů interaguje s katalytickým místem, což způsobí inaktivaci enzymu. C1 doména je tvořena sekvencí bohatou na cystein, jež koordinuje dva  $Zn^{2+}$  ionty a vytváří globulární strukturu dvou  $\beta$ -listů, které spolu dohromady tvoří dutinu vázající ligand. C2 doména se skládá převážně ze struktur  $\beta$ -listu a vytváří kapsu lemovanou kyselými zbytky aspartátu, které koordinují dva atomy  $Ca^{2+}$ . Při jejich vazbě dochází ke konformační změně domény a na její protější straně se vysunují tři lysinové zbytky, které mohou vázat kyselé fosfolipidy. C2 doména nových izoenzymů PKC neobsahuje zbytky kyseliny asparágové a neváže  $Ca^{2+}$ . Katalytická oblast PKC je tvořena C3 doménou, která obsahuje vazebné místo pro ATP a C4 doménou s kinázovou aktivitou (Newton 1997).

### 2. 3. 2. Tkáňová lokalizace izoenzymů PKC

Jednotlivé izoformy PKC se liší nejenom svojí strukturou, ale i specifickou funkcí, požadavky na aktivátory, substráty, interakcí s různými vazebnými proteiny a různou nitrobuněčnou a tkáňovou lokalizací. Isoformy PKC byly detekovány v mnoha tkáních různých živočišných druhů (např. myš, potkan, králík, prase, člověk). Tkáňovou distribuci jednotlivých izoform PKC a jejich požadavky na kofaktory stručně uvádí tabulka 5.

**Tabulka 5** – Výskyt izoform PKC ve tkáních a jejich požadavky na základní aktivační kofaktory

Izoforma	tkáňová distribuce	kofaktory potřebné pro aktivaci			
		$Ca^{2+}$	DAG	PS	
<b>Klasické PKC</b>	$\alpha$	široký výskyt	+	+	+
	$\beta I, \beta II$	široký výskyt	+	+	+
	$\gamma$	mozek	+	+	+
<b>Nové PKC</b>	$\delta$	široký výskyt	-	+	+
	$\epsilon$	mozek, srdce, sval	-	+	+
	$\eta$	srdce, kůže, plíce	-	+	+
	$\theta$	hlavně sval, mozek, trombo, T lymfo	-	+	+
<b>Atypické PKC</b>	$\zeta$	široký výskyt	-	-	+
	$\iota$	ledviny, mozek, varlata, vaječníky	-	-	+
	$\lambda$	ledviny, mozek, pankreas	-	-	+
	$\mu$	plíce, epiteliální buňky	-	+	+

DAG – diacylglycerol, PS – fosfatidylserin, široký výskyt - tyto izoformy jsou zastoupeny téměř ve všech studovaných orgánech (mozek, srdce, plíce, játra, slezina, ledviny, sval, atd.)  
Upraveno a převzato od (Idris at al. 2001).

### 2. 3. 3. Regulace PKC

I když jsou mechanismy regulace jednotlivých izoform PKC podobné, existují drobné rozdíly ve způsobech aktivace jednotlivých izoenzymů PKC, což souvisí s jejich rozdíly ve struktuře. Aktivace PKC je spojována s její translokací z cytosolu na membrány a další struktury jako je např. cytoskelet, perinukleární oblast nebo kontraktilní proteiny (Nishizuka 1995).

**Regulace fosforylací/defosforylací** - většina molekul PKC se v nestimulovaných buňkách nachází trojnásobně fosforylována. V katalytické doméně PKC (C4) se nacházejí tři klíčové pozice, na kterých dochází k fosforylaci. Jedná se o Thr 500 v oblasti aktivační smyčky, Thr 641 a Ser 660 v blízkosti C-konce, které jsou silně konzervovány v rámci rodiny PKC (Newton 1997). V procesu maturace je PKC nejprve fosforylována na Thr 500 v oblasti aktivační smyčky pravděpodobně kinázou PKC. Fosforylace na Thr 500 vyžaduje, aby byl pseudosubstrát mimo aktivní místo (Keranen et al. 1995). Tato fosforylace spouští dvě následné fosforylace - autofosforylaci na Thr 641, která způsobí uzavření molekuly PKC do konformace umožňující katalýzu a autofosforylaci na Ser 660, po které je molekula PKC uvolněna do cytosolu (Keranen et al. 1995).

Subcelulární lokalizace a funkce jednotlivých izoform PKC může být regulována defosforylací na těchto třech klíčových pozicích (Lee et al. 1996). Jednotlivé PKC mohou být navíc také fosforylovány na dalších hydroxylových zbytcích ve své molekule dalšími kinázami, a tak může být regulována jejich aktivita (Newton 1997).

**Regulace pomocí kofaktorů** - aktivace PKC vyžaduje odstranění autoinhibiční pseudosubstrátové domény z aktivního místa. Této konformační změny je dosaženo vysoce specifickou vazbou 1,2-sn-diacylglycerolu a fosfatidyl-L-serinu na dvě domény směřující k membráně buňky, na C1 a C2 (Newton 1997). V nepřítomnosti DAG se PKC váže bez zvláštní specifity na membrány se záporně nabitými skupinami. Aktivace PKC DAG je stereospecifická, a proto vyžaduje 1,2-sn-diacylglycerol, zatímco 1,3-sn-diacylglycerol a 2,3-sn-diacylglycerol PKC neaktivují (Rando and Young 1984).

C2 doména klasických izoform PKC obsahuje vazebné místo pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Vazba  $\text{Ca}^{2+}$  na C2 doménu zvyšuje afinitu PKC ke kyselým fosfolipidům, které posléze mohou způsobit aktivaci enzymu.  $\text{Ca}^{2+}$  mohou fungovat jako můstek mezi PKC a fosfolipidy v buněčné membráně. Předpokládá se, že mezi PKC,  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a fosfolipidy dochází k allosterické interakci (Bazzi and Nelsestuen 1990).

PKC je aktivována také celou řadou dalších fosfolipidů, např. kyselina lysofosfatidová, lysofosfatidylcholin (Sando and Chertihin 1996), polyfosfoinositidy (fosfatidylinositol-3,4-

bisfosfát, fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát) (Newton 1997). Dále PKC aktivují cis-nenasycené mastné kyseliny, jako je např. kyselina arachidonová (Khan et al. 1995), které významně zvyšují její aktivaci v přítomnosti DAG nebo esterů forbolu a které mohou PKC částečně aktivovat i v jeho nepřítomnosti (Shinomura et al. 1991).

Významnými aktivátory PKC jsou estery forbolu. Bylo prokázáno, že estery forbolu aktivují PKC stejným mechanismem jako DAG, zvyšují její afinitu k membráně buňky (Mosior and Newton 1996).

**Regulace prostřednictvím lokalizace v buňce** - jednotlivé izoformy PKC jsou lokalizovány v různých buněčných kompartmentech. PKC se váže nejen na lipidy, ale i na proteiny. Subcelulární lokalizace jednotlivých izoform PKC pomocí interakce se specifickými proteiny představuje významný regulační mechanismus (Jaken 1996). Byla identifikována řada proteinů, které váží PKC, např. RACK (receptory pro aktivované C kinázy) (Mochly-Rosen 1995) nebo protein vytvářející kotevní strukturu pro aktivované kinázy (AKAP 79) (Klauck et al. 1996). Některé izoformy PKC se specificky váží na určité proteiny. PKC  $\epsilon$  se selektivně váže na komponenty cytoskeletu a na aktin přes sekvenci mezi první a druhou C1 doménou (Prekeris et al. 1996).

Lokalizace PKC v určitých místech buňky je pravděpodobně stěžejní pro její schopnost efektivně odpovědět na stimulaci druhými posly a také pro snadný přístup k substrátům.

#### 2. 3. 4. Substráty PKC

Substrátové specifity jednotlivých podskupin PKC se liší. Například histon H3, protamin a protamin sulfát jsou výbornými substráty pro cPKC, ale nPKC mají k těmto substrátům podstatně nižší afinitu (Kitano et al. 1986).

PKC fosforyluje proteiny obsahující konsensus sekvenci X-Arg-X-X-Ser/Thr-X-Arg-X, kde X představuje téměř libovolné aminokyseliny (Newton 1997). Postupně bylo identifikováno mnoho proteinů, které jsou považovány za fyziologické substráty PKC. Tyto proteiny lze rozdělit do tří skupin:

- a) proteiny podílející se na buněčné signalizaci (inzulinové a EGF receptory, některé další proteinkinázy, např. Raf kináza)
- b) proteiny zapojené do metabolických drah (iontové kanály)
- c) proteiny zapojené do regulace genové exprese (transkripční a translační faktory)



## 2. 3. 5. Zapojení PKC do buněčné signalizace

### 2. 3. 5. 1. PKC a fosfoinositidová signální kaskáda

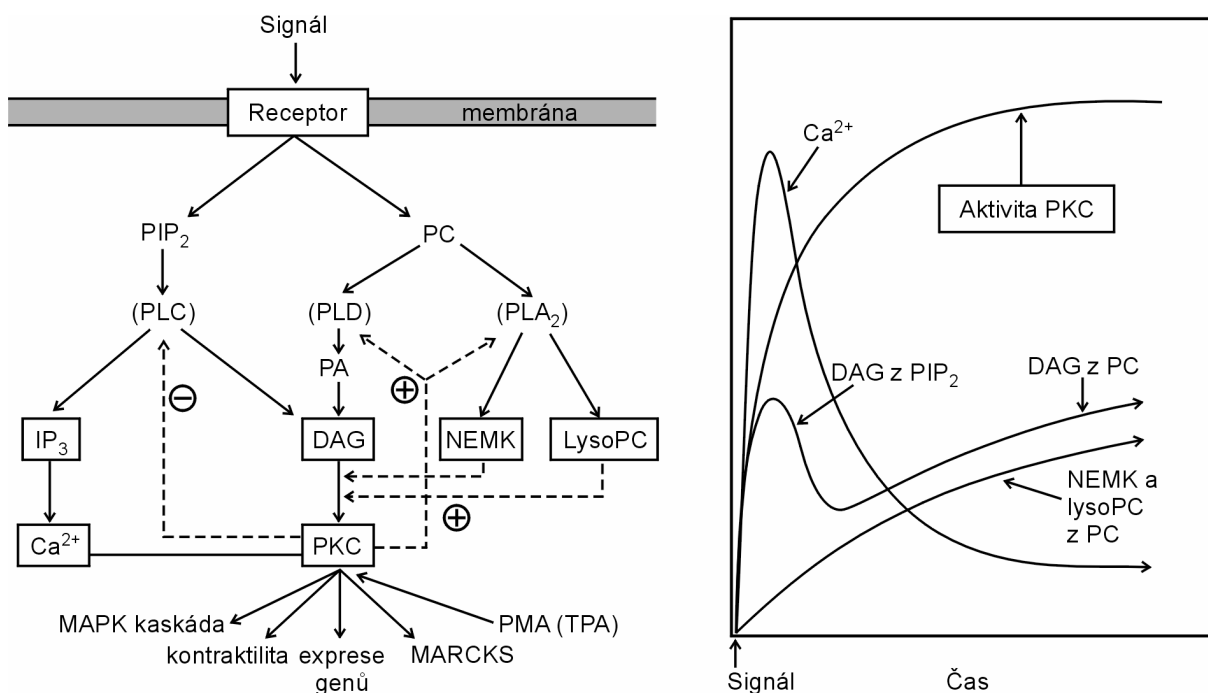
PKC je součástí fosfoinositidové signální kaskády, která zprostředkovává signalizaci prostřednictvím hydrolýzy fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP<sub>2</sub>). PKC se podílí na buněčných odpovědích vyvolaných stimulací receptorů agonisty jako jsou hormony, růstové faktory a neurotransmitery. PKC je tedy zapojena do signalizace vycházející od  $\alpha_1$ -adrenergických, muskarinových, angiotensinových a endotelinových receptorů (Puceát and Vassort 1996). PKC fosforyluje proteiny s různými fyziologickými funkcemi (např. aktin, proteiny iontových kanálů), ale i proteiny dalších signalizačních kaskád (např. IRS1, kaskáda proteinkináz aktivovaných mitogeny (MAPK)). Zjednodušené schéma fosfoinositidové signální kaskády je uvedeno na obrázku 3.

Po vazbě ligandu na receptor se sedmi transmembránovými jednotkami dochází v membránách cílových buněk k disociaci určitého G-proteinu na podjednotky  $\alpha$  a  $\beta\gamma$  a současně dojde k výměně GDP (guanosindifosfát) vázaného na  $\alpha$ -podjednotku za GTP (guanosintrifosfát). Dojde k aktivaci na membránu vázané fosfolipázy C (PLC), která katalyzuje hydrolýzu PIP<sub>2</sub> na lipofilní DAG a hydrofilní inositol-1,4,5-trifosfát (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> se váže na receptor na sarkoplazmatickém retikulu, stimuluje otevření vápníkového kanálu, což vede k uvolnění Ca<sup>2+</sup> iontů do cytosolu. Ca<sup>2+</sup> ionty stimuluji prostřednictvím kalmodulinu a jemu podobných proteinů řadu buněčných dějů. DAG, PS a Ca<sup>2+</sup> aktivují příslušné izoformy PKC. K aktivaci PKC dochází po její translokaci na buněčné membrány. PKC pak fosforyluje různé proteiny a mezi nimi i další proteinkinázy (Sugden and Bogoyevitch 1995).

DAG produkovaný z PIP<sub>2</sub> po hydrolýze PLC velmi rychle klesá působením diacylglycerolkinázy. Pro dlouhodobější odpovědi na signály vedoucí např. k buněčné proliferaci a růstu, je nutný další vzestup koncentrace DAG v membráně (Nishizuka 1995). Tento sekundární nárůst koncentrace DAG je zprostředkován fosfolipázou D (PLD), která hydrolyzuje fosfatidylcholin (PC) přítomný v buněčné membráně za vzniku kyseliny fosfatidové (PA) a cholinu. PA je následně hydrolyzována fosfatidátfosfohydrolázou na DAG (Sugden and Bogoyevitch 1995). Sekundární nárůst hladiny DAG přetrvává minuty až hodiny (obrázek 3) (Nishizuka 1995). PLD vyžaduje ke své aktivaci fosforylaci tyrosinkinázou a je stimulována DAG a PKC.

PC může být také hydrolyzován fosfolipázou A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) na lysofosfatidylcholin a cis-nenasycené mastné kyseliny, které se také podílejí na modulaci aktivity PKC (Nishizuka 1995).

**Obrázek 3** – Zjednodušené schéma fosfoinositidové signální kaskády a časový průběh tvorby druhých posílů



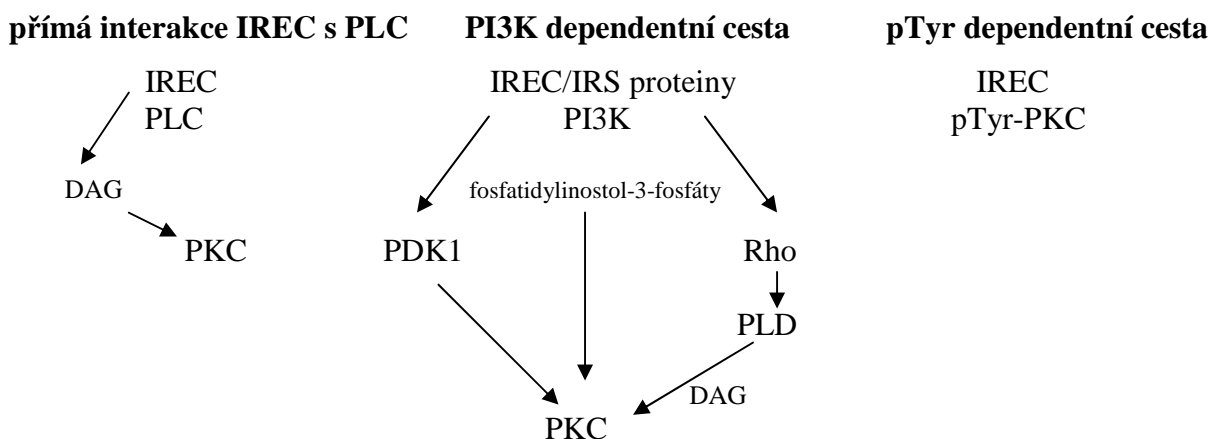
DAG – diacylglycerol, NEMK – neesterifikované mastné kyseliny, IP<sub>3</sub> – inositol-1,4,5-trifosfát, LysoPC – lysofosfatidylcholin, MAPK – mitogeny aktivovaná proteinkináza, MARCKS – myristoylovaný substrát proteinkinázy C bohatý na alanin, PA – kyselina fosfatidová, PC – fosfatidylcholin, PIP<sub>2</sub> – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, PLA<sub>2</sub> – fosfolipáza A<sub>2</sub>, PLC – fosfolipáza C, PLD – fosfolipáza D, PMA – forbol-12-myristát-13-acetát, TPA – 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetát  
Upraveno a převzato od (Nishizuka 1995).

### 2. 3. 5. 2. PKC v signální dráze inzulinu

PKC je také součástí signalizační kaskády inzulinu, kde má dvojí roli. Působí jednak jako mediátor, jednak jako inhibitor přenosu inzulinového signálu, a tak přispívá k IR. Existují nejméně dva obecné mechanismy, které vysvětlují aktivaci PKC inzulinem (obrázek 4). První mechanismus zahrnuje aktivaci enzymů (fosfolipázy, PI3 kináza). Produkty působení těchto enzymů přispívají k aktivaci PKC. Druhý mechanismus zahrnuje přímou interakci inzulinového receptoru s PKC (Formisano and Beguinot 2001).

Inzulinem aktivovaný inzulinový receptor může přímo interagovat s PLC  $\gamma$  a aktivovat ji, následkem aktivace dochází k produkci DAG, který aktivuje PKC. Molekulární mechanismus této reakce není dosud zcela objasněn. Experimenty se specifickým inhibitorem PLC (U73122) ukázaly sníženou inzulinem vyvolanou aktivaci MAPK v A-293 fibroblastech (Seedorf et al. 1995) a L6 buňkách kosterního svalu (Formisano et al. 2000) a inhibici transportu glukózy ve 3T3-L1 adipocytech (Kayali et al. 1998).

**Obrázek 4** – Možné mechanismy inzulinem stimulované aktivace PKC



DAG – diacylglycerol, IREC – inzulínový receptor, IRS – substrátové proteiny inzulínového receptoru, PDK1 – na fosfoinositidech závislá kináza 1, PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza, PLC – fosfolipáza C, PLD – fosfolipáza D, PKC – proteinkináza C, pTyr – fosforylované tyrosiny, Rho – malá guanosinová trifosfatáza  
Upraveno a převzato od (Formisano and Beguinot 2001).

Další mechanismus aktivace PKC předpokládá důležitou roli PI3K. PI3K převádí inzulínový signál na řadu dalších molekul, jako je Rho (malá guanosinová trifosfatáza) a PDK1. Rho aktivuje PLD, což vede ke zvýšené produkci DAG, který přispívá k aktivaci klasických a nových izoform PKC (Standaert et al. 1996). PDK1 může fosforylovat různé izoformy PKC, a tak regulovat jejich katalytickou aktivitu. Aktivita PI3K a produkce fosfatidylinositol-3-fosfátů je nezbytná pro inzulinem indukovanou aktivaci PKC  $\zeta$  a  $\lambda$  (Standaert et al. 1997).

Další možný mechanismus aktivace PKC zahrnuje její přímou interakci s inzulínovým receptorem a fosforylaci PKC na tyrosinových zbytcích. Předpokládá se, že tímto způsobem jsou aktivovány PKC  $\alpha$ , PKC  $\beta$ , PKC  $\delta$  a PKC  $\zeta$  (Formisano and Beguinot 2001).

Inzulín tedy aktivuje prostřednictvím PI3K především atypické izoformy PKC. Klasické a nové PKC také mohou být aktivovány PI3K, zde ale pravděpodobně záleží na typu buňky. Jiné možné cesty vedoucí k aktivaci PKC zahrnují aktivaci fosfolipáz a protein-proteinové interakce (Formisano and Beguinot 2001).

Je poměrně obtížné určit úlohu konkrétních izoform PKC v signalizační kaskádě inzulínu a výsledky různých studií jsou často kontroverzní. Je to dáno jednak značnými rozdíly v studovaných buněčných modelech, ale i řadou dalších faktorů. Individuální izoformy PKC mohou působit jako zprostředkovatelé a zároveň inhibitory inzulínového signálu a také

mohou mít opačné role v regulaci jednotlivých buněčných dějů, i přes vysoký stupeň strukturní homologie. Většina aktivátorů a inhibitorů PKC používaných ke studiu nerozlišuje jednotlivé izoformy PKC, např. estery forbolu jsou účinnými aktivátory klasických a nových PKC, proto je obtížné zjistit, která konkrétní izoforma PKC je zodpovědná za zprostředkování studovaného efektu (Newton 1997).

### 2. 3. 5. 3. PKC jako mediátor a inhibitor přenosu inzulínového signálu

Kosterní sval, játra a tuková tkáň jsou nejdůležitější tkáně z hlediska citlivosti k účinku inzulínu. Tyto tkáně exprimují izoformy PKC všech tří podskupin a odhaduje se, že v každé z těchto tkání se vyskytuje 6 – 8 jednotlivých izoform PKC. Ve tkáních citlivých na inzulín jsou exprimovány cPKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I a  $\beta$ II, nPKC  $\delta$ ,  $\epsilon$  a  $\theta$  a aPKC  $\zeta$  a  $\lambda$  (Sampson and Cooper 2006).

Mezi nejdůležitější zprostředkovatele přenosu signálu inzulínu patří atypické izoformy PKC, tj. PKC  $\zeta$  a PKC  $\lambda$ . Tyto dvě izoformy jsou nezbytné pro zprostředkování účinku inzulínu na translokaci transportérů GLUT4. Po aktivaci translokují PKC  $\zeta$  a  $\lambda$  k váčkům obsahujícím GLUT4 a napomáhají přemístění glukózových transportérů z cytoplazmy k plazmatické membráně. Mechanismus, jakým tyto PKC vyvolávají translokaci GLUT4 k membráně, je nejasný. Bylo prokázáno, že se účastní přestavby cytoskeletu, je tedy možné, že tato jejich schopnost se uplatňuje i v indukci translokace GLUT4 k membráně (Standaert et al. 1999).

PKC  $\zeta$  působí také jako mediátor účinků inzulínu na proteosyntézu,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  výměnu iontů, vychytávání iontů  $\text{K}^+$  a přispívá k aktivaci MAPK, ale mechanismy zodpovědné za zprostředkování těchto efektů nejsou dosud objasněny (Formisano and Beguinot 2001).

Klasické PKC zprostředkovávají účinky inzulínu ve svalových buňkách (Braiman et al. 1999). Zároveň bylo ale prokázáno, že PKC  $\alpha$  a  $\beta$  inhibují inzulínovou signalizaci, např. nadměrná exprese PKC  $\alpha$  ve fibroblastech zvyšuje degradaci inzulínového receptoru (Seedorf et al. 1995). Nadměrná aktivace cPKC (následkem hyperglykémie a s ní spojeným nárůstem koncentrace DAG *de novo* syntézou z tříuhlíkatých meziproductů glykolýzy) může mít důležitou úlohu v patogenezi diabetických komplikací. Zejména PKC  $\beta$  je zahrnuta v rozvoji mikrovaskulárních komplikací diabetu v retině (Idris et al. 2001). Na druhou stranu, PKC  $\beta$  zprostředkovává účinek inzulínu v kosterním svalu na transport glukózy a syntézu DNA (Braiman et al. 1999). Předpokládá se, že způsob aktivace cPKC je důležitý pro to, zda cPKC budou působit jako zprostředkovatelé nebo inhibitoři inzulínového signálu. Při dlouhodobé

aktivaci cPKC (např. při hyperglykémii) nebo při vysoké expresi izoform PKC, dochází k inhibičnímu efektu cPKC na inzulinovou signalizaci. Kdežto inzulinem vyvolaná akutní nebo přechodná aktivace cPKC vede, alespoň v některých typech buněk, k přenosu signálů inzulinu (Formisano and Beguinot 2001).

PKC  $\delta$ , patřící do skupiny nPKC, je jednou z nejvíce studovaných izoform. Také tato izoforma má dvojí roli v přenosu inzulinového signálu. Inzulinem aktivovaná PKC  $\delta$  působí jako negativní regulátor inzulinové signalizace, v nádorových jaterních buňkách vystavených hyperglykémii zeslabuje inzulinovou signalizaci (Nakajima et al. 2000). Naopak, řada studií prokázala, že PKC  $\delta$  působí jako pozitivní regulátor přenosu signálu inzulinu. Experimenty prováděné na NIH-3T3 fibroblastech prokázaly účast PKC  $\delta$  v inzulinem indukované internalizaci a transportu inzulinového receptoru (Formisano et al. 1998). V další studii bylo prokázáno, že inzulin vyvolává přímou asociaci PKC  $\delta$  s inzulinovým receptorem a tato izoforma má nepostradatelnou úlohu ve zprostředkování inzulinem stimulované fosforylaci tyrosinů a internalizaci inzulinových receptorů (Briman et al. 2001). PKC  $\delta$  také může mít zásadní úlohu v inzulinem indukované glukogenezi v hepatocytech (Sampson and Cooper 2006).

PKC  $\epsilon$ , podobně jako PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\delta$ , působí jako negativní i pozitivní modulátor inzulinového působení. Pozitivní úlohu v přenosu signálu inzulinu potvrdila studie na NIH-3T3 fibroblastech, kde nadměrná exprese PKC  $\epsilon$  byla doprovázena zvýšenou translokací GLUT1 k plazmatické membráně v porovnání s buňkami bez zvýšené exprese PKC  $\epsilon$ , kde dokonce nebyla zaznamenána žádná translokace (Cooper et al. 1999). PKC  $\epsilon$  je také zahrnuta v patogenezi IR a s ní spojenými defekty v signalizační kaskádě inzulinu (Laybutt et al. 1999).

PKC  $\theta$  je negativním regulátorem přenosu signálu inzulinu v kosterním svalu a adipocytech, což dokládá celá řada experimentů. U potkanů s IR, která byla indukována vysokofruktózovou dietou, bylo v bílém svalu detekováno zvýšené množství imunoreaktivní PKC  $\theta$ , což nasvědčuje tomu, že zvýšená aktivace PKC  $\theta$  vede k inhibici přenosu signálu inzulinu (Donnelly and Qu 1998).

### **2. 3. 6. PKC, inzulinová rezistence a s ní spojené komplikace**

Patofyziologických mechanismů IR se účastní celá řada izoform PKC. Negativním způsobem ovlivňují inzulinovou signalizační kaskádu, inhibují přenos inzulinového signálu na různých stupních signalizační dráhy, a tak přispívají k rozvoji IR v cílových tkáních.

Důležitou úlohu mají zejména izoformy PKC  $\alpha$ , PKC  $\beta$  a PKC  $\delta$  a v kosterním svalu zejména PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  (Sampson and Cooper 2006). Zjednodušené schéma zapojení PKC v mechanismu IR je uvedeno na obrázku 5.

PKC  $\alpha$  se podílí na rozvoji IR. Působí jako inhibiční regulátor inzulinové signalizační kaskády prostřednictvím své asociace s IRS. Vyvolává downregulaci IRS1, kterou mohou ještě podpořit nebo zesílit další faktory, např. TNF $\alpha$  (Sampson and Cooper 2006). Změny v množství nebo aktivitě PKC  $\alpha$  byly nalezeny u různých zvířecích modelů IR a DM2, např. u potkanů „sand rat“ (Psammomys obesus) byla nalezena v kosterním svalu zvýšená exprese řady izoform PKC, včetně PKC  $\alpha$  a PKC  $\epsilon$  (Ikeda et al. 2001). Zvýšené množství těchto izoform bylo nalezeno v membránové frakci a korelovalo s obsahem DAG, autoři předpokládají, že PKC  $\alpha$  a  $\epsilon$  jsou chronicky aktivované a tyto změny mohou přispívat k diabetu u tohoto experimentálního modelu.

PKC  $\beta$ I i  $\beta$ II negativně ovlivňují inzulinovou signalizaci především na úrovni receptoru pro inzulin. Fosforylují jej na serinových zbytcích, a tím inhibují autofosforylační aktivitu tyrosinové kinázy beta podjednotky receptoru (Bossenmaier et al. 1997). Účastní se i patogeneze komplikací hyperglykémie a DM2, jejich selektivní aktivace byla prokázána v řadě tkání, např.  $\beta$ I je aktivována především v ledvinách,  $\beta$ II v retině, myokardu a aortě (Idris et al. 2001).

PKC  $\delta$  je další izoforma, která se podílí na IR. Jejími prokázanými substráty jsou inzulinový receptor, IRS1 a také PKB (Sampson and Cooper 2006). Podobně jako další izoformy ze skupiny nPKC (zejména PKC  $\theta$ ), interaguje s inzulinovým receptorem a ovlivňuje úroveň jeho fosforylace. Fosforylace serinů místo tyrosinů inzulinového receptoru je jedním z mechanismů, který reguluje funkci receptorů. Fosforylace serinů inzulinového receptoru snižuje fosforylaci tyrosinů, a tak negativně ovlivňuje další šíření inzulinového signálu (Bhattacharya et al. 2007). Aktivace PKC  $\delta$  (společně s PKC  $\theta$ ) byla pozorována ve svalových buňkách u IR indukované NEMK (Boden and Schulman 2002). Aktivace PKC  $\delta$ , spolu s PKC  $\theta$ , a zhoršeným inzulinem stimulovaným využitím glukózy byla dokumentována v řadě studií u potkanů i lidí (Boden and Schulman 2002; Itani et al. 2002; Yu et al. 2002).

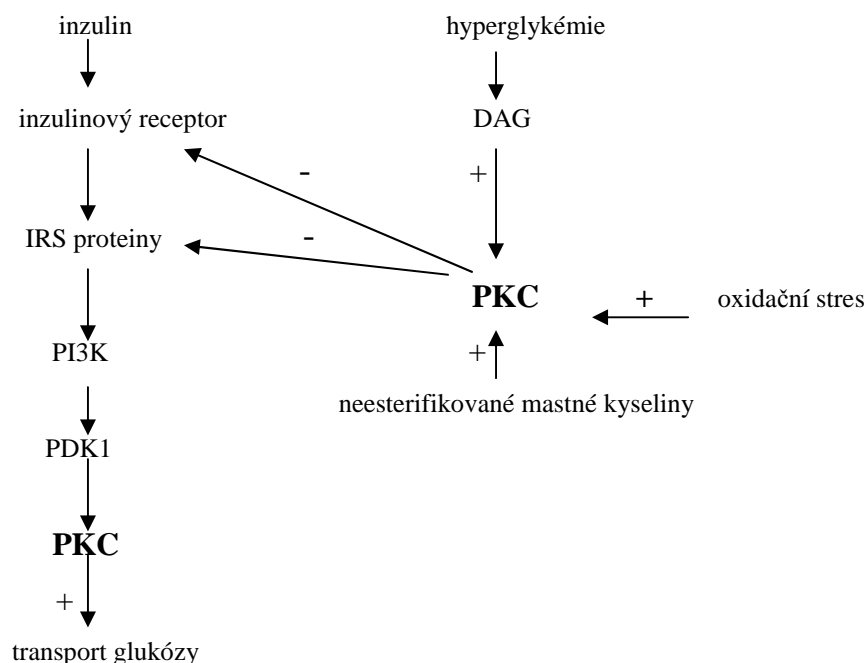
Z hlediska IR je zvláštní pozornost věnována především kosternímu svalu, neboť se zde po stimulaci inzulinem vychytává a zpracovává většina glukózy v organismu. V kosterním svalu, z kvantitativního hlediska nejdůležitější tkáni manifestace IR, mají klíčovou úlohu zejména PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$ , jejich selektivní aktivace byla prokázána u řady modelů dietně indukované IR (Schmitz-Peiffer et al. 1997; Donnelly et al. 1994; Donnelly et al. 1995).

Inzulinová senzitivita kosterního svalu je úzce spjata s obsahem triglyceridů. Zvýšené koncentrace DAG (meziprojektu syntézy triglyceridů a fosfolipidů) jsou považovány za spojovací článek mezi aktivací PKC, poruchami lipidového metabolismu a zvýšenou IR kosterních svalů. Akumulace lipidů v kosterních svalech a jejich metabolitů může ovlivňovat aktivitu PKC, a to zejména PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$ . Vysokotuková i vysokosacharózová dieta jsou spojeny se zvýšeným obsahem triglyceridů ve svalech i cirkulaci. U těchto modelů dietně indukované IR byla nalezena selektivní aktivace izoform PKC ve svalech.

PKC  $\epsilon$  je další izoformou, která je úzce spjata s IR. Nadměrná exprese PKC  $\epsilon$  byla nalezena v kosterním svalu diabetických zvířat i lidí. Tato nadměrná exprese a aktivace PKC  $\epsilon$  vede k redukci počtu inzulinových receptorů na povrchu buněčné membrány (Itani et al. 2002). Mechanismus, jakým PKC  $\epsilon$  zprostředkovává IR je nejasný, uvažuje se, že jejími potenciálními substráty by mohly být PKB a GSK3 (Sampson and Cooper 2006). Aktivace PKC  $\epsilon$  spolu se zvýšeným obsahem lipidů byla pozorována v kosterních svalech potkanů, u nichž byla IR vyvolána chronickou infuzí glukózy (Laybutt et al. 1999). I u dalšího modelu IR, obézních Zucker potkanů, byla nalezena zvýšená aktivita PKC, zvýšené množství DAG a obsah PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v membránové frakci kosterního svalu (Qu et al. 1999). Všechny tyto nálezy svědčí pro možnou účast PKC  $\epsilon$  v mechanismu IR.

PKC  $\theta$  má unikátní tkáňovou distribuci, je exprimována především v kosterním svalu, v němž je nejhojněji zastoupenou izoformou ze všech PKC. Zvýšená aktivita PKC může být jednou z příčin IR v kosterním svalu. Řada studií prokázala zvýšenou aktivitu nebo množství proteinu PKC  $\theta$  v kosterním svalu inzulinorezistentních zvířat (Griffin et al. 1999; Bell et al. 2000; Osada et al. 1992). Potkani se zvýšenými plazmatickými hladinami NEMK (indukovanými infuzí lipidů a heparinu) vykazovali významně snížený transport glukózy ve svalu, který byl doprovázen redukcí v inzulinové signalizaci a čtyřnásobným nárůstem membránově vázané PKC  $\theta$  (Griffin et al. 1999). Zvýšené hladiny proteinu a aktivace PKC  $\theta$  byly zaznamenány v kosterním svalu diabetických pacientů a podání některých neselektivních inhibitorů těmto pacientům zvýšilo inzulinem stimulovaný transport glukózy ve svalu (Itani et al. 2001). „PKC  $\theta$  knockout myši“ jsou chráněny proti defektům v inzulinové signalizaci a poruchám působení inzulinu. Zachovávají si normální fosforylaci tyrosinů IRS1, aktivaci PI3K a fyziologickou úroveň vychytávání glukózy ve svalu, dokonce i v přítomnosti lipidů. To vše naznačuje přímé zapojení PKC  $\theta$  v rozvoji IR kosterních svalů vyvolané nadměrným přísunem lipidů (Kim et al. 2004).

**Obrázek 5** – Schéma zapojení PKC v mechanismu IR



*DAG – diacylglycerol, IRS – substrát inzulinového receptoru, PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza, PKC – proteinkináza C*

Mnoho studií potvrdilo spojitost mezi lipidy indukovanou IR a aktivací nPKC, zejména izoformem  $\epsilon$  a  $\theta$ . Aktivace PKC byla zaznamenána i u modelů IR, kde nebyla IR indukována vysokotukovou dietou. Hyperinzulinémie a hyperglykémie jsou další faktory, které snižují inzulinovou senzitivitu ve svalech a mohou aktivovat PKC, pravděpodobně prostřednictvím zvýšených intracelulárních hladin DAG (Schmitz-Peiffer 2002). Je tedy pravděpodobné, že PKC je zahrnuta v IR indukované lipidy, ale i IR vyvolané vysokými hladinami glukózy nebo inzulinu.

PKC  $\theta$  působí jako zvláště silný inhibitor inzulinového signálu a to zejména v kosterním svalu, neboť fosforyluje hydroxylové skupiny serinů inzulinového receptoru (Ser 994, Ser 1023/25), jejichž fosforylace pak brání autofosforylaci inzulinového receptoru, ale i IRS (na Ser 307). Následkem toho dochází ke snížené aktivaci PI3K a sníženému inzulinem stimulovanému transportu glukózy (Strack et al. 2000). PKC  $\theta$  může přispívat k IR také tím, že fosforyluje i komponenty metabolismu glukózy nebo jejího transportu, např. GS (Blackmore et al. 1986). V úvahu přichází i jiné mechanismy, kterými PKC  $\theta$  může indukovat IR. Např. v adipocytech NEMK aktivují PKC  $\theta$ , která aktivuje IKK a JNK, které zprostředkovávají fosforylaci serinů IRS1 a jejich degradaci (Gao et al. 2004).



Významná redukce inzulínové senzitivity způsobená defekty v signalizační dráze inzulínu je jednou z hlavních příčin IR a s ní spojeným DM2. Nové izoformy PKC, zejména PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  jsou negativními regulátory signalizační kaskády inzulínu a nepříznivě ovlivňují její komponenty na různých stupních přenosu signálu. nPKC jsou úzce spjaty s poruchami signalizace vyvolanými lipidy, jež jsou považovány za hlavní příčinou IR a DM2.

## **2. 4. Nejčastěji využívané experimentální modely inzulínové rezistence**

Ke studiu patofyziologických mechanismů, prevence a terapie IR jsou používány zvířecí modely, u kterých jsou jednotlivé symptomy MS vyvolány nutričně nebo jsou geneticky podmíněné.

### **2. 4. 1. Nutričně indukovaná inzulínová rezistence**

U laboratorních zvířat je možné nutričně vyvolat IR buď zvýšením energetického příjmu nebo změnou ve složení základních živin v potravě. Příkladem může být vysokosacharózová resp. vysokofruktózová dieta (Shafir 1998; Vrána et al. 1993) nebo dieta s vysokým podílem tuků (Storlien et al. 1991).

Výhodou modelů s nutričně indukovanou IR je snadná dostupnost. Nevýhodou je, že u nich není MS rozvinut v celé šíři, ale vykazují se jen některé z jeho složek. Další komplikací je skutečnost, že projevy IR se u těchto modelů mění v závislosti na délce podávání diety (Chicco et al. 1994) a po vysazení stimulu navíc dochází k navrácení hodnot do fyziologické normy (Chicco et al. 1999).

### **2. 4. 2. Geneticky podmíněná inzulínová rezistence**

Mezi modely s geneticky podmíněnou IR lze zařadit např. Zucker fa/fa potkany, Wistar-Kyoto obézní (WKY/Ndrt-fa) či diabetické (WDF-TA-fa) potkany (Coleman 1982), OLETF potkany (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat) (Shima 1999), Goto-Kakizaki diabetické potkany (Goto et al. 1988), Koletského SHR potkany (Golda a Hilgertová 1998), Cohenovy potkany (Cohen et al. 1984), „sand rats“ (Psammomys obesus) (Shafir and Ziv 1998), C57BL/6j ob/ob myši, C57BL/6j db/db myši (Coleman 1982) a inbrední polydaktilní PD/Cub potkany (Vrána et al. 1993; Šedová et al. 2000).

Mezi další modely s geneticky podmíněnou IR patří spontánně hypertenzní potkani (SHR) a kmen hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (HHTg). Tyto kmeny byly použity v našich experimentech, a proto je dále podrobněji charakterizují.

### **Kmen hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (HHTg)**

Tento kmen byl vyšlechtěn začátkem 90. let na Metabolickém pracovišti Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze Doc. MVDr. A. Vránou, DrSc. z potkanů kmene Wistar. Selektce byla prováděna na základě senzitivity k hypertriglyceridemickému vlivu vysokosacharóзовé diety. HHTg potkani vykazují výraznou hypertriglyceridémii, jenž je geneticky fixována a potencována dietou s vysokým obsahem sacharózy. Vedle hypertriglyceridémie vykazuje kmen HHTg potkanů i zvýšené koncentrace NEMK v plazmě a další poruchy lipidového metabolismu, jako např. významně zvýšenou citlivost plazmatických lipoproteinů (frakce VLDL+LDL) k oxidativní modifikaci (měřenou *in vitro* podle kinetiky tvorby konjugovaných dienu) (Kazdová et al. 1997). Kromě poruch v metabolismu lipidů jsou u HHTg kmene přítomny další symptomy MS jako je zhoršená glukózová tolerance, hyperinzulinémie, hypertenze (Štolba et al. 1992) a zvýšená hladina kyseliny močové v plazmě (Kuneš et al. 1995).

Uvedené nálezy ukazují, že tento kmen je vhodným modelem pro studium patofyziologických mechanismů IR vzhledem k tomu, že vykazuje prakticky všechny symptomy MS (dyslipidémie, hyperinzulinémie, zhoršená tolerance glukózy, hypertenze). Značná výhoda HHTg kmene spočívá v tom, že není obézní a není u něho rozvinut DM2. U většiny výše jmenovaných modelů je totiž vedle IR přítomná obezita, která znamená obtíže v chovu a množení hlodavců, a tím jejich malou dostupnost.

Vzhledem k ustálenému slovnímu označení HHTg kmene potkanů jako hereditárně hypertriglyceridemický potkan a s ohledem na anglicky psanou literaturu je v celé práci používáno triviálního názvosloví triglyceridy a ne systematického označení triacylglyceroly.

### **Kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR)**

Tento kmen byl vyšlechtěn v Japonsku z outbrední kolonie potkanů kmene Wistar v laboratoři Okamoto a Aokiho (1963) za účelem získání genetického modelu pro zkoumání humánní esenciální hypertenze. Kolonie, která je až dosud inbredně udržována na Fyziologickém ústavu AV ČR, byla před 20 lety přivezena do Prahy z firmy OLAC z Anglie - SHR/Ola. Tito potkani patří k nejvíce používaným genetickým modelům esenciální hypertenze. Hypertenze se u kmene SHR prohlubuje během stárnutí a je provázána četnými vaskulárními změnami (Bernard et al. 1998). Vedle geneticky fixované hypertenze tento kmen vykazuje i další metabolické abnormality sacharidového a lipidového metabolismu, které lze u SHR potkanů zesílit podáváním speciální diety (např. vysokofruktóзовé): dyslipidémie, hyperinzulinémie, glukózová intolerance (Furukawa et al. 1998; Šeda et al.

2002; Rao 1993). Tento kmen potkanů je tedy díky predispozici k IR hojně využíván i jako model MS. U kmene SHR byla prokázána spojitost poruchy lipidového a sacharidového metabolismu s mutací genu FAT/Cd36 kódujícího důležitý transportér mastných kyselin (translokáza MK) (Aitman et al. 1999; Pravenec et al. 2001).

Pro naše experimenty jsme použili i kmen SHR potkanů označený SHR-4. Tento kmen se liší od standardního kmene SHR potkanů pouze tím, že obsahuje funkční gen pro FAT/Cd36.

### **Transgenní zvířata**

V poslední době se stále častěji využívá ke studiu patofyziologických mechanismů různých chorob či patologických stavů experimentálních modelů geneticky modifikovaných zvířat, které umožňují lépe objasnit spojitost mezi pozorovanou poruchou a příslušným genem. V této práci byli studováni transgenní spontánně hypertenzní potkani se zvýšenou expresí rezistinu (SHR-TG).

### **Kmen transgenních SHR potkanů se specificky exprimovaným genem pro myší rezistin (SHR-TG)**

Transgenní SHR potkani byli připraveni mikroinjekcí zygot cDNA konstruktem myšího rezistinu. Nový transgenní kmen SHR potkanů exprimuje myší rezistin v tukové tkáni pod kontrolou promotoru aP2, specifického pro tukovou tkáň (Pravenec et al. 2003). Tento unikátní kmen umožňuje studovat potenciální úlohu rezistinu v patogenezi IR u SHR potkanů.

### 3. CÍLE PRÁCE

Na základě studia dostupných literárních údajů byly stanoveny následující cíle práce:

#### 1. Rozšíření poznatků patogeneze IR

- studium parametrů lipidového a sacharidového metabolismu v souvislosti s buněčnou lokalizací a relativním množstvím proteinů PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v kosterním svalu u HHTg potkanů, experimentálního modelu IR
- vypracování metody pro měření aktivity GS s cílem přispět k objasnění úlohy GS v patogenezi IR v kosterním svalu u HHTg potkanů
- sledování parametrů IR ve vztahu k PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  při nutričně indukované obezitě u HHTg potkanů, vzhledem k tomu, že obezita je jedním z významných faktorů při rozvoji IR
- studium rozvoje IR v souvislosti s PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v kosterním svalu v průběhu ontogeneze HHTg potkanů, vzhledem k tomu, že přibývajícím věkem může potencovat rozvoj IR

#### 2. Studium úlohy rezistinu v patogenezi IR

- sledování vlivu zvýšené exprese rezistinu v tukové tkáni SHR potkanů na parametry lipidového a sacharidového metabolismu v souvislosti s buněčnou lokalizací a relativním množstvím proteinů PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v buněčných frakcích kosterního svalu

#### 3. Možnosti ovlivnění nutričně stimulované IR farmakologickou intervencí

- studium metabolických účinků dlouhodobého podávání pioglitazonu SHR-4 potkanům na subcelulární distribuci a aktivaci PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$ , ektopické ukládání triglyceridů ve svalech a citlivost tukové a svalové tkáně k účinku inzulinu

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4. 1. Experimentální modely a podávané diety

K pokusům byly použity následující kmeny potkanů:

- kmen hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (HHTg)
- kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR-4)
- transgenní kmen spontánně hypertenzních potkanů se specificky exprimovaným genem pro myší rezistin v tukové tkáni (SHR-TG)
- kmen potkanů Wistar

#### Kmen hereditárně hypertriglyceridemických potkanů (HHTg)

Chov je držen na Pracovišti experimentální medicíny IKEM, Praha.

#### Kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR-4)

Kmen SHR-4 byl připraven v USA, v laboratořích Charles River Laboratories, a pro naše experimenty byl dodán z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v Praze Ing. Michalem Pravencem, DrSc.

Standardní kmen SHR obsahuje deleční nefunkční variantu genu translokázy MK (FAT/Cd36). Kongenní kmen SHR-4 potkanů se liší od standardního kmene SHR potkanů pouze tím, že obsahuje funkční gen pro FAT/Cd36.

#### Kmen transgenních SHR potkanů se specificky exprimovaným genem pro myší rezistin (SHR-TG)

Transgenní SHR potkani se specifickou expresí myšího rezistinu v tukové tkáni byli připraveni ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky z konstruktu vyprodukovaném v USA, na univerzitě University of California, San Francisco. Kmen byl dodán pro naše pokusy z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v Praze Ing. Michalem Pravencem DrSc.

#### Kmen potkanů Wistar

Potkani kmene Wistar byli použiti jako normotriglyceridemické kontroly ke kmeni HHTg potkanů. Pochází z chovu firmy VELAZ, Praha.

Zvířata byla chována v chovných nádobách v místnosti se standardními podmínkami při konstantní teplotě a sledované vlhkosti vzduchu, měla volný přístup k pitné vodě a byla krmena ad libitum standardní peletovanou dietou, popř. dietou s vysokým podílem fruktózy nebo sacharózy (tabulka 6, 7, 8). Ve všech pokusech se jednalo o samce, a pokud není uvedeno jinak, zvířata byla dekapitována v sytém stavu bez anestezie. Experimenty probíhaly v souladu s předpisy etické komise a se zákonem ČNR č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.

**Tabulka 6** – Složení standardní diety (Fábry 1961)

<b>Standardní dieta</b>	
<b>Složení</b>	<b>hmotnostní %</b>
kasein	8
sušené mléko	10
vojtěška	4
vitamínová a minerální směs	3,5
rybí tuk	1
sušené droždí	4
pšeničný a sójový šrot	2,5
škrob	66
agar	1

**Tabulka 7** - Složení vysokofruktózové diety

<b>Dieta K4102.0, Hope Farms, Woerden, Holandsko</b>	
<b>Složení</b>	<b>hmotnostní %</b>
fruktóza	69,3
celulóza	5,0
sojový olej	5,0
kasein	15,0
cholin	0,4
methionin	0,2
MgO	0,2
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,4
sůl	0,3
KCl	0,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7
CaCO <sub>3</sub>	1,0
CaHPO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	1,3
směs vitamínů	0,25
směs stopových prvků	0,25

**Tabulka 8** – Složení vysokosacharóзовé diety (Fábry 1961)

<b>Vysokosacharózová dieta</b>	
<b>Složení</b>	<b>hmotnostní %</b>
kasein	12,5
sušené mléko	9,0
vojtěška	3,0
vitamínová a minerální směs	3,5
sacharóza	63,0
agar	9,0

## **4. 2. Uspořádání experimentů**

### **4. 2. 1. Vliv nutričně indukované obezity u HHTg potkanů na PKC a inzulinovou rezistenci**

Pokusy byly provedeny na samcích 18-ti měsíčních potkanů kmene Wistar (kontrola, K), inzulinorezistentních HHTg (HHTg) a obézních HHTg potkanů (HHTg+Ob). Obezita HHTg potkanů byla vyvolána nutričně, podáváním vysokosacharóзовé diety po dobu sedmi měsíců. K a HHTg potkani byli krmeni standardní laboratorní dietou. V této studii jsme sledovali vybrané parametry lipidového a sacharidového metabolismu, citlivost periferních tkání k účinku inzulinu a buněčnou lokalizaci a relativní množství PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v kosterním svalu.

### **4. 2. 2. Aktivita glykogensyntázy při inzulinové rezistenci**

Aktivitu GS jsme měřili v kosterním svalu u 4 měsíčních hypertriglyceridemických HHTg potkanů (HHTg) a jejich normotriglyceridemických kontrol, potkanů kmene Wistar stejného stáří (K). Obě experimentální skupiny byly 14 dní před koncem pokusu krmeny vysokosacharóзовou dietou, která potencovala abnormality metabolismu glukózy a lipidů. Experimenty byly provedeny po nočním hladovění (16 hodin). Polovina zvířat každé experimentální skupiny zůstala lačná, druhé polovině byla sondou do žaludku podána jedna dávka glukózy (3 g/kg tělesné hmotnosti) a po 30 minutách byla všechna zvířata dekapitována.

### **4. 2. 3. Vliv věku na PKC a inzulinovou rezistenci**

Pokusy byly provedeny u experimentálního modelu IR – u HHTg potkanů a normotriglyceridemických kontrolních potkanů kmene Wistar (K) ve věku 4 a 18 měsíců. Dva týdny před ukončením pokusu byla zvířata krmena vysokosacharóзовou dietou, která u

HHTg potkanů potencuje hypertriglyceridémii. V pokusu byly sledovány parametry sacharidového a lipidového metabolismu a intracelulární lokalizace PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v kosterním svalu během stárnutí potkanů.

#### **4. 2. 4. Vliv zvýšené exprese rezistinu v tukové tkáni na PKC a inzulinovou rezistenci**

Experimenty byly provedeny u rok starých transgenních SHR potkanů se specificky exprimovaným genem pro myší rezistin v tukové tkáni (SHR-TG). Kontrolní skupinu tvořili geneticky identičtí potkani (SHR) odpovídajícího věku s absencí transgenu. Potkani byli 14 dní před ukončením studie krmeni dietou s vysokým podílem fruktózy (70 kal %).

V této studii jsme testovali, zda zvýšená exprese rezistinu v tukové tkáni SHR potkanů ovlivní glukózovou toleranci, rezistenci periferních tkání k účinku inzulinu a relativní množství PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu.

#### **4. 2. 5. Vliv dlouhodobého podávání pioglitazonu na PKC a inzulinovou rezistenci**

Dospělým 4 měsíčním samcům SHR-4 potkanů byla podávána dieta s vysokým podílem sacharózy po dobu 4 měsíců s pioglitazonem v dávce 300 mg/kg diety (SHR-4+PIO). Kontrolní skupina byla krmena vysokosacharózovou dietou bez pioglitazonu (SHR-4). Zjišťovali jsme, zda dlouhodobé podávání pioglitazonu ovlivní aktivaci PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v kosterním svalu, parametry lipidového a sacharidového metabolismu, ektopické ukládání triglyceridů ve svalech a citlivost tukové a svalové tkáně k účinku inzulinu.

Kongenní kmen SHR-4 potkanů s genem FAT/Cd36 byl pro tyto pokusy vybrán místo standardního kmene SHR z toho důvodu, že FAT/Cd36 je považován za klíčový gen zprostředkovávající příznivé účinky pioglitazonu na senzitivitu tkání k účinku inzulinu (Qi et al. 2002).

### **4. 3. Biochemické analýzy**

Koncentrace všech biochemických analytů byly stanoveny v séru a ve tkáních. Všechny uvedené metody v této podkapitole jsou metody spektrofotometrické. Vzorky sér a tkání byly zpracovány ihned po odběrech nebo zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Koncentrace triglyceridů** byla stanovena enzymatickou metodou po hydrolýze triglyceridů lipoproteinovou lipázou na glycerol a mastné kyseliny pomocí analytické soupravy firmy Pliva-Lachema (Brno, ČR). Glycerol je poté fosforylován a oxidován a vzniklý peroxid



vodíku reaguje s 4-aminoantipyrinem za vzniku barevného produktu, jehož absorbance se měří při 540 nm.

**Koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin** byla stanovena enzymaticky po konverzi NEMK na acyl-CoA katalyzované acyl-CoA syntázou a následné oxidaci acyl-CoA oxidázou s použitím analytické soupravy firmy Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Německo). Vzniklý peroxid vodíku reaguje s 2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoovou kyselinou a 4-aminoantipyrinem za vzniku červeného roztoku, jehož absorbance se měří při 546 nm.

**Koncentrace glukózy** byla měřena enzymatickou metodou po deproteinaci kyselinou trichloroctovou a následné oxidaci glukózaoxidázou s využitím analytické soupravy firmy Pliva-Lachema (Brno, ČR). Vzniklý peroxid vodíku se stanovuje oxidační kopulací se substituovaným fenolem a 4-aminoantipyrinem katalyzovanou enzymem peroxidázou.

**Koncentrace cholesterolu** byla stanovena enzymatickou metodou po oxidaci cholesterolu cholesteroloxidázou a oxidační kopulací 4-aminoantipyrinu a fenolu peroxidem vodíku za použití analytické soupravy firmy Pliva-Lachema (Brno, ČR).

**Koncentrace inzulinu** byla měřena metodou ELISA pomocí komerčně dostupného kitu Rat Insulin ELISA (MercoDIA AB, Uppsala, Švédsko). Stanovení je založeno na přímé sendvičové technice, při které jsou dvě monoklonální protilátky nasměrovány proti odděleným antigenním determinantám molekuly inzulinu. Během inkubace inzulin ve vzorku reaguje s protilátkou konjugovanou s peroxidázou a s protilátkou navázanou na mikrotitrační destičce. Navázaný konjugát je detekován reakcí s 3,3',5,5'-tetrametybenzidinem.

**Koncentrace triglyceridů ve tkáních** - pro stanovení koncentrace triglyceridů ve vzorcích kosterních svalů (musculus gastrocnemius nebo musculus soleus), játrech a myokardu byly tkáně nejdříve rozdrčeny v tekutém dusíku a extrahovány po dobu 16 hodin ve směsi chloroformu a metanolu. Poté byl přidán 2 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a roztok byl centrifugován. Organická fáze byla odebrána a odpařena pod  $\text{N}_2$ . Výsledná peleta byla rozpuštěna v isopropylalkoholu a obsah triglyceridů byl stanoven za použití analytické soupravy (Pliva-Lachema, Brno, ČR).

**Stanovení koncentrace proteinů** - obsah proteinů v tkáňových homogenátech (kosterní sval, tuková tkáň) byl stanoven metodou podle Lowryho (Lowry et al. 1951). Lowryho metoda využívá Folinovo fenolové reagens, které poskytuje s tyrosylovými zbytky bílkovin modrofialové zabarvení, které je spektrofotometricky měřitelné při vlnové délce 750 nm.

**Stanovení adiponektinu** - sérové koncentrace adiponektinu byly měřeny ELISA metodou pomocí komerčně dostupného kitu Mouse/Rat Adiponectin ELISA Kit (B-Bridge International, Inc., Mountain View, CA, USA). Adiponektin ve vzorku se váže na primární polyklonální protilátku imobilizovanou v jamkách mikrotitrační destičky. Po promytí je

přidána biotinylovaná sekundární protilátka proti adiponektinu, která se během inkubace navazuje na adiponektin navázaný na primární protilátku. Po promytí se přidá do každé jamky konjugát křenové peroxidázy a streptavidinu. Po další inkubaci a promytí se přidá kolorimetrický substrát, intenzita zabarvení se měří při 450 nm.

#### **4. 4. Analýzy k posouzení inzulinové rezistence ve tkáních a glukózové tolerance**

Tyto analýzy jsou založené na *in vitro* měření inkorporace radioaktivně značené glukózy ( $^{14}\text{C}$ -U-glukózy) do glykogenu kosterního svalu (musculus soleus nebo musculus gastrocnemius) či bránice. V případě tukové tkáně do lipidů epididymálního tukového tělesa a to jak v nestimulovaném stavu (tzv. bazální inkorporace měřená v inkubačním médiu bez inzulinu) nebo po stimulaci inzulinem (250  $\mu\text{U}/\text{ml}$  inzulinu v inkubačním médiu). Výsledky glykogeneze/lipogeneze jsou vyjádřeny jako nmol (pmol)  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy/g tkáně/2 hod nebo nmol (pmol)  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy/mg proteinů/2 hod.

##### **Citlivost svalové tkáně k účinku inzulinu (glykogeneze)**

Syntéza glykogenu byla sledována v bránicích nebo kosterních svalech měřením inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do glykogenu. Svaly byly odebrány z potkanů po dekapitaci v sytém stavu, musculus soleus byl napnut na kovový rámeček. Každý sval byl inkubován ve 3 ml Krebs-Ringer bikarbonátového pufru (tabulka 9) s přidavkem 0,1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$   $^{14}\text{C}$ -U-glukózy, 5,5 mmol/l nezačtené glukózy a 250 mg/ml hovězího sérového albumínu při pH 7,4 a 37 °C, v plynné fázi 95 %  $\text{O}_2$  + 5 %  $\text{CO}_2$  po dobu 2 hodin bez či za přítomnosti inzulinu v inkubačním médiu (250  $\mu\text{U}/\text{ml}$ ). Po inkubaci byl z tkání extrahován glykogen způsobem, zahrnujícím var s 30 % KOH a srážení v koncentrovaném etanolu (Vrána a Kazdová 1970). Po přidavku scintilační tekutiny byla změřena radioaktivita.

##### **Citlivost tukové tkáně k účinku inzulinu (lipogeneze)**

Potkani byli dekapitováni v sytém stavu a byla vyjmuta celá epididymální tuková tělesa. K měření lipogeneze byla použita distální část epididymální tukové tkáně (200-250 mg), která byla inkubována ve 3 ml Krebs-Ringer bikarbonátového pufru (tabulka 9) s přidavkem 0,1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$   $^{14}\text{C}$ -U-glukózy, 5,5 mmol/l nezačtené glukózy a 250 mg/ml hovězího sérového albumínu při pH 7,4 a 37 °C, v plynné fázi 95 %  $\text{O}_2$  + 5 %  $\text{CO}_2$  po dobu 2 hodin bez či za přítomnosti inzulinu v inkubačním médiu. Po inkubaci byly z tkání extrahovány celkové

lipidy metodou dle Folche (Folch et al. 1957) a po přidavku scintilační tekutiny byla změřena radioaktivita.

**Tabulka 9** - Složení Krebs-Ringer bikarbonátového pufru

<b>Krebs-Ringer bikarbonátový pufr</b>	
<b>Složky</b>	<b>Koncentrace v mmol/l</b>
NaCl	118,0
KCl	4,7
CaCl <sub>2</sub>	2,5
MgSO <sub>4</sub>	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	25,0

#### **Orální glukózový toleranční test (OGTT)**

Glukózová tolerance byla sledována pomocí orálního glukózového tolerančního testu (OGTT). OGTT byl proveden u potkanů po celonočním lačnění. Glukóza, v dávce 300 mg/100 g tělesné hmotnosti, byla zvířatům podána sondou do žaludku. Krev byla odebírána bez anestezie z ocasní žíly v intervalech 0, 30, 60 a 120 minut po aplikaci glukózy. V krvi byla stanovena koncentrace glukózy. Dále byla spočítána plocha pod křivkou OGTT (AUC<sub>0-120 min</sub>).

## **4. 5. Analýza PKC**

### **Homogenizace a frakcionace**

PKC byla analyzována v kosterních svalech (musculus gastrocnemius), které byly ihned po odběru zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při –80 °C do dalšího zpracování. Svaly byly homogenizovány a frakcionovány upraveným postupem podle Gu (Gu and Bishop 1994). Veškeré operace při zpracování svalů byly prováděny za intenzivního chlazení. Zpracováno bylo obvykle 350-500 mg svalové tkáně. Při homogenizaci byly zmražené svaly rozetřeny pod tekutým dusíkem na jemný prášek, spláchnuty homogenizačním pufrům v poměru 8 ml pufru na 1 g svalové tkáně (12,5 mM Tris-HCl, 250 mM sacharóza, 2,5 mM EGTA, 1,0 mM EDTA, 100 mM NaF, 5 mM DTT, 300 μM PMSF, 120 μM pepstatin A, 200 μM leupeptin, 20 μM aprotinin, pH 7,4) do homogenizační zkumavky a dále homogenizovány v Potter-Elvehjemově homogenizátoru s teflonovým pístem. Homogenát byl centrifugován 105 000 x g 60 min. Takto získaný supernatant představuje cytosolickou frakci, sediment

(membránová frakce) byl resuspendován v homogenizačním pufru s 1 % Tritonem X-100, ponechán na ledu 60 min a znovu centrifugován 105 000 x g dalších 60 min. K cytosolické frakci byl přidán Triton X-100 tak, aby výsledná koncentrace Tritonu X-100 byla 1 %. Pomocí Tritonu X-100 byly připraveny extrakty buněčných frakcí. Extrakce proteinů představuje částečný purifikační krok, díky kterému se zjednodušil obraz elektroforeticky dělených proteinů. Z uváděných frakcí byly odebrány alikvoty na stanovení proteinů a relativního množství izoforem PKC a do dalšího zpracování byly skladovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Stanovení koncentrace proteinů**

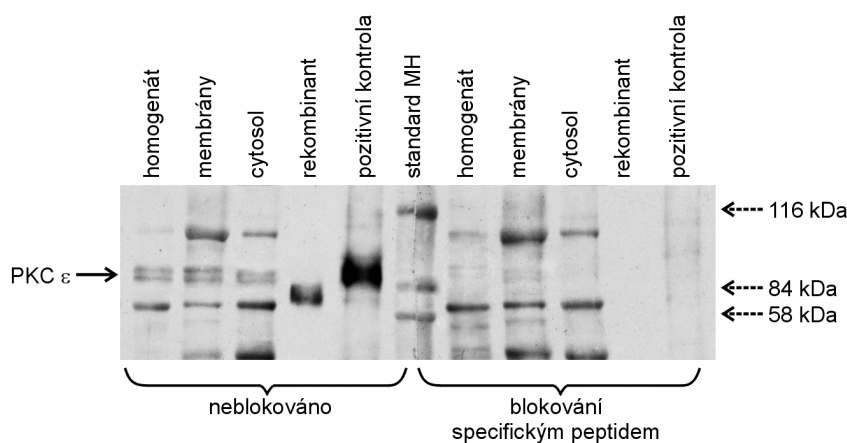
Koncentrace proteinů v extraktech vzorků cytosolické a membránové frakce byla stanovena pomocí analytické soupravy (Sigma, Saint Louis, USA), metodou podle Petersona (Peterson 1977). Jedná se o modifikovanou Lowryho metodu (Lowry et al. 1951) pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích obsahujících detergenty.

### **Elektroforéza a imunoblot**

Elektroforetické dělení proteinů jednotlivých vzorků bylo prováděno na plochých polyakrylamidových gelech v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Koncentrace akrylamidu ve startovním gelu byla 4 %, v dělicím gelu 8 %. Obvykle bylo nanášeno na gel 15-25  $\mu\text{g}$  proteinu z každé buněčné frakce. K ověření identity jednotlivých izoforem PKC byly spolu s analyzovanými vzorky na gel nanášeny standardy molekulových hmotností proteinů (Fluka, Buchs, Švýcarsko), vzorky rekombinantních proteinů PKC (PKC  $\epsilon$  i PKC  $\theta$ : Sigma, Saint Louis, USA) a extrakt homogenátu mozku potkana jako pozitivní kontroly. Na části membrán byla vazba protilátek u jednotlivých PKC zablokována specifickým peptidem (PKC  $\epsilon$  peptid: Sigma, Saint Louis, USA; PKC  $\theta$  peptid: Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (obrázek 6). Elektroforéza probíhala v předem vychlazeném pufru (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3) při konstantním proudu 0,02 A na gel po dobu asi 80 min na aparatuře Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Po elektroforetické separaci byly proteiny přeneseny na nitrocelulózoové membrány (Western Blotting), na kterých probíhala imunodetekce jednotlivých izoforem PKC. Membrány byly blokovány 1 hodinu v 5 % roztoku sušeného mléka v TTBS pufru (0,02 M Tris, 0,5 M NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, pH 7,5), promyty TTBS a inkubovány 1 hodinu s primárními protilátkami ředěnými v TTBS (PKC  $\epsilon$ : Sigma, Saint Louis, MO, USA; PKC  $\theta$ : Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Po dalším promytí byly membrány inkubovány 1 hod v ředěném (1: 4000)

roztoku sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (protilátka SwAR/Px, Sevapharma, Praha, ČR). Izoformy PKC byly vizualizovány metodou zesílené chemiluminiscence pomocí komerčně dostupného kitu (Star-Glo™, ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) a exponovány na autoradiografické filmy, které byly ručně vyvolány pomocí rentgenové vývojky a ustalovače v temné komoře. Proužky na filmech, které odpovídaly jednotlivým izoformám PKC byly dále skenovány a kvantifikovány pomocí programu Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Výstupem metody je denzitometrický objem, který byl přepočítán na 1 µg proteinu. Grafy a tabulky (v kapitole 5) jsou uvedeny v arbitrárních jednotkách vyjádřených jako podíl součtu denzitometrických objemů, který je roven 1.

**Obrázek 6** – Imunoblot PKC ε v kosterním svalu potkana



Reprezentativní imunoblot PKC ε (90 kDa) v homogenátu, membránové frakci a cytosolu v kosterním svalu kontrolního potkana kmene Wistar. Společně se vzorky byly analyzovány kontroly - rekombinantní protein PKC ε a pozitivní kontrola z mozкового extraktu potkana a standard molekulových hmotností proteinů (standard MH). Pozice standardů MH jsou označeny přerušovanými šipkami. Polovina filmu nebyla blokována, druhá polovina byla blokována PKC ε peptidem.

#### 4. 6. Aktivita glykogensyntázy

Aktivita GS byla měřena modifikovanou metodou podle Thomase a spol. (Thomas et al. 1968). Aktivita enzymu byla měřena inkorporací <sup>14</sup>C-glukózy (7,4 GBq/mmol) z uridin-5'-difosfoglukózy (UDPG) do glykogenu.

Vzorky kosterních svalů (musculus soleus) byly homogenizovány (50 mg tkáň/ml pufru) při 4 °C homogenizátorem Ultra-Turrax v homogenizačním pufru (2 mM EDTA, 2 mM 1,4-dithiothreitol, 20 mM NaF, 50 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Poté byl homogenát centrifugován 20 000 x g 20 min. Supernatant obsahující GS byl naředěn 1:5 puftrem (20 mM EDTA, 25

mM NaF, 50 mM Tris-HCl, pH 7,8). Reakce byla nastartována přidáním 30  $\mu$ l alikvotu homogenátu k 60  $\mu$ l reakční směsi ředícího pufru s 1 % glykogenem, 1,1 kBq [U-<sup>14</sup>C] uridindifosfoglukózy (UDPG), 0,3 mM UDPG a 0,1 nebo 10 mM glukóza-6-fosfátu (G6P). Reakce probíhala 30 min při 30 °C a byla ukončena precipitací 75  $\mu$ l alikvotů reakční směsi na čtverečkách filtračního papíru o velikosti 2 x 2 cm, okamžitě ponořených do 66 % etanolu vychlazeného na 4°C. Po 45 min promývání následovaly další dvě promytí, vždy po dobu 30 min ve vychlazeném 66 % etanolu a další promytí v acetonu po dobu 5 min. Čtverečky byly vysušeny, poté ponořeny do scintilační tekutiny, ve které byla změřena radioaktivita. Aktivita enzymu je vyjádřena jako nmol UDPG inkorporované do glykogenu za minutu na mg extrahovaného proteinu. Výsledky jsou vyjádřeny jako fractional velocity (FV) – poměrná rychlost přeměny glukózy na glykogen katalyzovaná GS (aktivita enzymu analyzována při 0,1 mM koncentraci G6P dělená aktivitou enzymu měřené při koncentraci 10 mM G6P). Takto vyjádřená aktivita GS je citlivým ukazatelem změn aktivity enzymu (Kochan et al. 1979).

#### **4. 7. Statistické zpracování výsledků**

Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  střední chyba průměru (SEM). Naměřená data byla statisticky vyhodnocena s použitím analýzy rozptylu ANOVA a Studentova t-testu. Za statisticky významný byl považován rozdíl s hladinou významnosti  $p < 0,05$ . Statistické hodnocení bylo provedeno v programu InStat verze 3.10 (GraphPad Software, San Diego, USA).

## 5. VÝSLEDKY

### 5. 1. Vliv nutričně indukované obezity u HHTg potkanů na PKC a inzulinovou rezistenci

Ve studii byly sledovány parametry lipidového a sacharidového metabolismu, citlivost periferních tkání k účinku inzulinu, buněčná lokalizace a relativní množství PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v kosterním svalu u hypertriglyceridemických HHTg potkanů a normotriglyceridemických kontrolních potkanů kmene Wistar v závislosti na přítomnosti nutričně indukované obezity.

HHTg potkani měli v porovnání s kontrolami nižší tělesnou hmotnost, zatímco hmotnost epididymálního tukového tělesa se od kontrol nelišila (tabulka 10). Podávání diety s vysokým podílem sacharózy po dobu 7 měsíců zvýšilo tělesnou hmotnost o 53 % a hmotnost epididymálního tukového tělesa o 73 % v porovnání s neobézními HHTg potkany.

**Tabulka 10** – Tělesná hmotnost a hmotnost epididymálního tukového tělesa u obézních a neobézních HHTg potkanů

	<b>K</b>	<b>HHTg</b>	<b>HHTg+Ob</b>
tělesná hmotnost (g)	481 ± 24	380 ± 12 *	582 ± 23 #
hmotnost epididymálního tukového tělesa (g/100 g t. hm.)	1,19 ± 0,14	1,26 ± 0,09	2,18 ± 0,14 #

*K – kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, HHTg+Ob – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani po vysokosacharóзовé dietě*

*HHTg vs K \*  $p < 0,01$*

*HHTg+Ob vs HHTg #  $p < 0,01$*

*Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (K a HHTg 5 zvířat ve skupině, HHTg+Ob 9 zvířat ve skupině)*

U HHTg potkanů krmených standardní dietou byly koncentrace triglyceridů a NEMK v séru vyšší v porovnání s kontrolami, zatímco glykémie se mezi skupinami nelišila (tabulka 11). Příjem vysokosacharóзовé diety výrazně zvýšil triglyceridémii, glykémii i koncentrace NEMK u HHTg potkanů.

U HHTg potkanů byly významně vyšší koncentrace triglyceridů v kosterním svalu (musculus gastrocnemius), játrech i myokardu (zde pouze trend) v porovnání s kontrolními zvířaty. Nutričně indukovaná obezita HHTg potkanů byla spojena s výraznou akumulací triglyceridů v játrech, stejný trend jsme pozorovali i v srdci a v kosterním svalu (obrázek 7).

**Tabulka 11** – Koncentrace triglyceridů, neesterifikovaných mastných kyselin a glukózy v séru u obézních a neobézních HHTg potkanů

parametr	K	HHTg	HHTg+Ob
triglyceridy (mmol/l)	1,82 ± 0,12	3,81 ± 0,27***	7,59 ± 0,41###
NEMK (mmol/l)	0,41 ± 0,03	0,55 ± 0,04*	0,73 ± 0,02 ##
glukóza (mmol/l)	4,84 ± 0,15	4,91 ± 0,17	5,82 ± 0,18 #

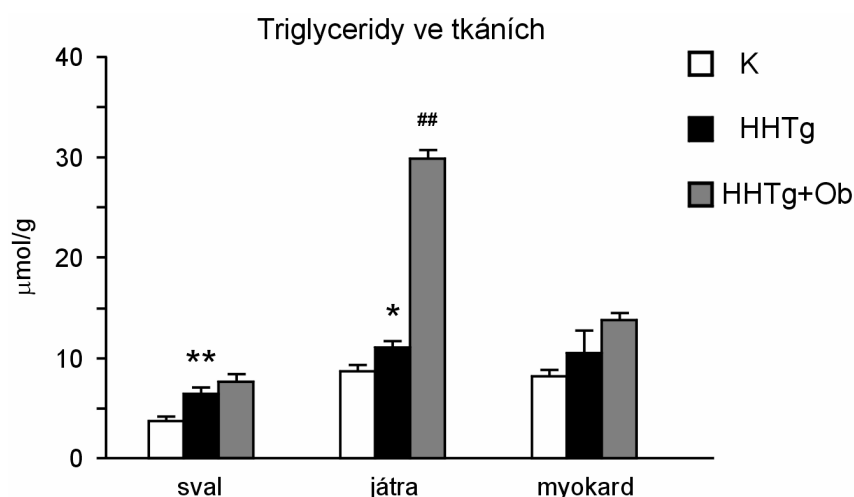
*K* – kontrolní potkani kmene Wistar, *HHTg* – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, *HHTg+Ob* – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani po vysokosacharóзовé dietě, *NEMK* – neesterifikované mastné kyseliny

*HHTg* vs *K* \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$

*HHTg+Ob* vs *HHTg* #  $p < 0,01$ , ##  $p < 0,005$ , ###  $p < 0,0001$

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (*K* a *HHTg* 5 zvířat ve skupině, *HHTg+Ob* 9 zvířat ve skupině)

**Obrázek 7** – Koncentrace triglyceridů ve tkáních u obézních a neobézních HHTg potkanů



*K* – kontrolní potkani kmene Wistar, *HHTg* – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, *HHTg+Ob* – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani po vysokosacharóзовé dietě

*HHTg* vs *K* \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

*HHTg+Ob* vs *HHTg* ##  $p < 0,001$

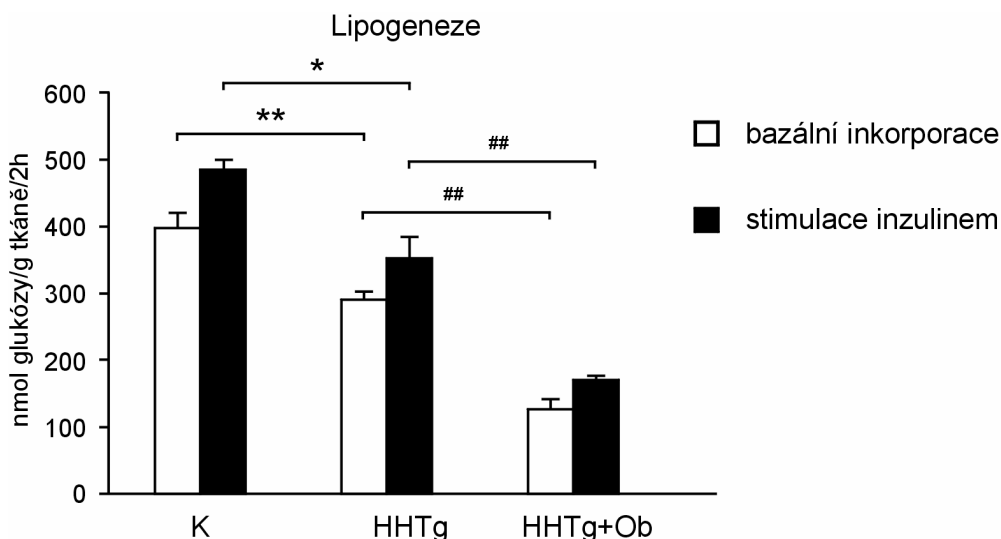
Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (*K* a *HHTg* 5 zvířat ve skupině, *HHTg+Ob* 9 zvířat ve skupině)

Citlivost tukové tkáně k účinku inzulínu měřená podle inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do lipidů epididymálního tukového tělesa *in vitro* (obrázek 8) byla u HHTg potkanů významně snížena v porovnání s kontrolami, a to jak v nestimulovaném stavu, tak po stimulaci inzulínem. Přítomnost obezity u HHTg potkanů dále snížila senzitivitu tukové tkáně k inzulínu. Nárůst lipogeneze po stimulaci inzulínem nebyl ani v jedné experimentální



skupině statisticky významný. Nízká senzitivita tukové tkáně obézních HHTg potkanů k inzulinu byla provázena sníženým obsahem proteinů v tukové tkáni (obrázek 9).

**Obrázek 8** – Inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do lipidů epididymální tukové tkáně obézních a neobézních HHTg potkanů



*K* – kontrolní potkani kmene Wistar, *HHTg* – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, *HHTg+Ob* – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani po vysokosacharóзовé dietě

*HHTg* vs *K* \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,002$

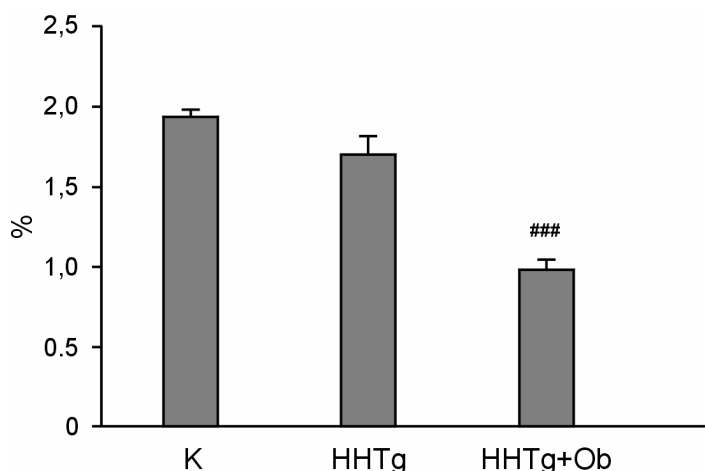
*HHTg+Ob* vs *HHTg* ##  $p < 0,001$

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (*K* a *HHTg* 5 zvířat ve skupině, *HHTg+Ob* 9 zvířat ve skupině)

Bazální inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do glykogenu v kosterním svalu nebyla rozdílná mezi kontrolními a HHTg potkany. Naproti tomu inzulinem stimulovaná syntéza glykogenu byla u HHTg potkanů nižší o 28 % v porovnání s kontrolními zvířaty (obrázek 10). Nutričně indukovaná obezita u HHTg potkanů tuto citlivost dále snížila, pokles senzitivity k inzulinu ale nebyl signifikantní. Přítomnost inzulinu v inkubačním médiu (250  $\mu\text{U/ml}$ ) zvýšila syntézu glykogenu o 86 % u kontrol, o 71 % u HHTg potkanů a u obézních HHTg potkanů pouze o 41 % (obrázek 10).

Relativní množství proteinu PKC  $\epsilon$  v cytosolické frakci kosterního svalu se mezi porovnávanými experimentálními skupinami nelišilo (obrázek 11). V membránové frakci HHTg potkanů jsme naměřili nižší množství PKC  $\epsilon$  o 25 % oproti kontrolním potkanům, obezita neovlivnila množství PKC  $\epsilon$  u HHTg potkanů.

**Obrázek 9** – Proteiny v tukové tkáni obézních a neobézních HHTg potkanů

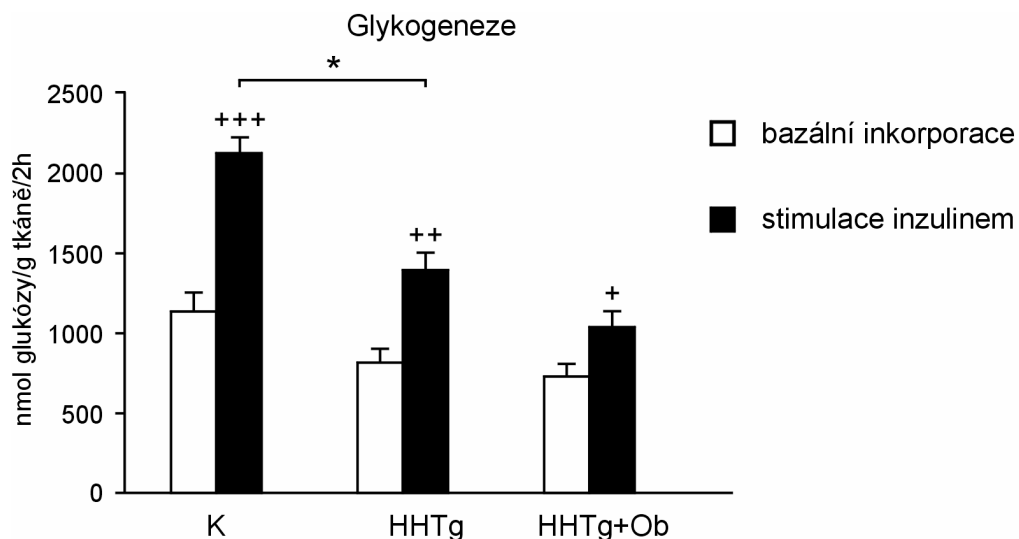


*K* – kontrolní potkani kmene Wistar, *HHTg* – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, *HHTg+Ob* – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani po vysokosacharóзовé dietě

*HHTg+Ob* vs *HHTg* <sup>###</sup>  $p < 0,0001$

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (*K* a *HHTg* 5 zvířat ve skupině, *HHTg+Ob* 9 zvířat ve skupině)

**Obrázek 10** – Inkorporace <sup>14</sup>C-U-glukózy do glykogenu v kosterním svalu obézních a neobézních HHTg potkanů



*K* – kontrolní potkani kmene Wistar, *HHTg* – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, *HHTg+Ob* – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani po vysokosacharóзовé dietě

*HHTg* vs *K* \*  $p < 0,01$

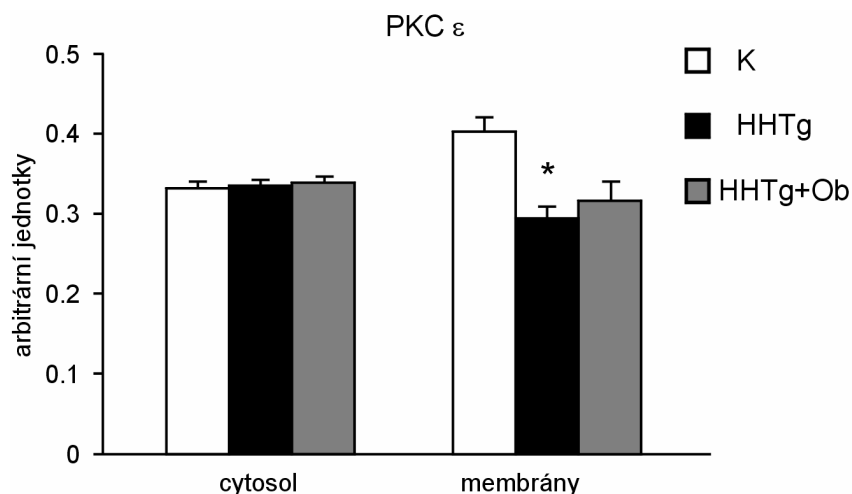
vliv inzulinu +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,005$ , +++  $p < 0,002$

Kosterní sval-musculus soleus

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (*K* a *HHTg* 5 zvířat ve skupině, *HHTg+Ob* 9 zvířat ve skupině)

V cytosolu HHTg potkanů jsme našli nižší množství PKC  $\theta$  o 36 % a v membránové frakci vyšší množství PKC  $\theta$  o 55 % vzhledem ke kontrolám (obrázek 12). Nutričně indukovaná obezita toto rozložení PKC  $\theta$  ve studovaných buněčných frakcích kosterního svalu HHTg potkanů dále neovlivnila. Vyjádříme-li aktivaci izoforem PKC jako poměr relativního množství membránové PKC ku relativnímu množství příslušné PKC v cytosolu (obrázek 13) vidíme, že aktivace PKC  $\epsilon$  je u HHTg potkanů nižší oproti kontrolám, kdežto v případě PKC  $\theta$  je tomu naopak. Poměr relativního množství PKC  $\theta$  v membránové frakci ku cytosolu je u HHTg potkanů vyšší o 69 %, přítomnost obezity měla tendenci tento poměr ještě mírně zvýšit. Obrázek 14 znázorňuje procento zvýšení syntézy glykogenu v kosterním svalu po stimulaci inzulinem. Nejcitlivěji reagoval na stimulaci inzulinem sval kontrol, méně citlivý byl u HHTg potkanů a nejvíce rezistentní k účinku inzulinu byl kosterní sval obézních HHTg potkanů. Snížená citlivost kosterního svalu k účinku inzulinu u HHTg potkanů byla doprovázena zvýšenou aktivací a translokací PKC  $\theta$  z cytosolu na membrány (obrázek 15).

**Obrázek 11** – Relativní množství proteinu PKC  $\epsilon$  v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu u obézních a neobézních HHTg potkanů



*K – kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, HHTg+Ob – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani po vysokosacharóзовé dietě*

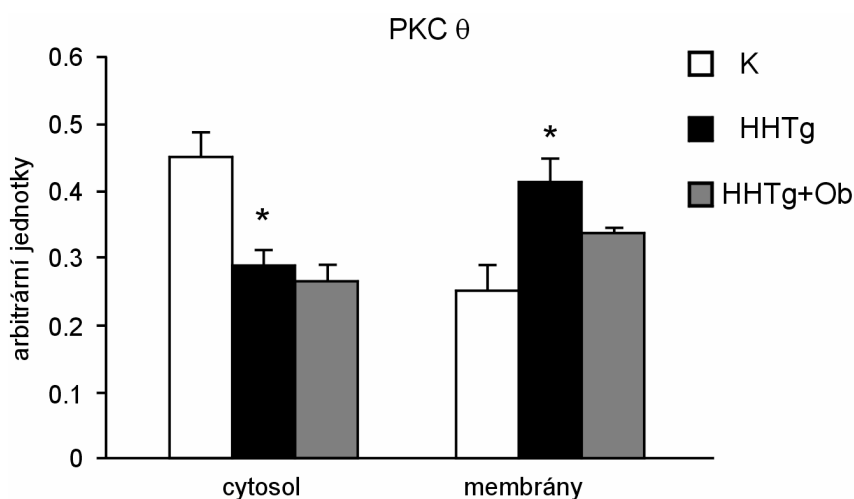
*Výsledky pěti nezávislých pokusů. Jednotlivé experimentální skupiny byly srovnávány na jednom filmu. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (přepočítaných na 1  $\mu$ g proteinu) všech experimentálních skupin v rámci jedné buněčné frakce je roven 1.*

*HHTg vs K \*  $p < 0,05$*

*Kosterní sval- musculus gastrocnemius*

*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (5 zvířat ve skupině)*

**Obrázek 12** - Relativní množství proteinu PKC  $\theta$  v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu u obézních a neobézních HHTg potkanů



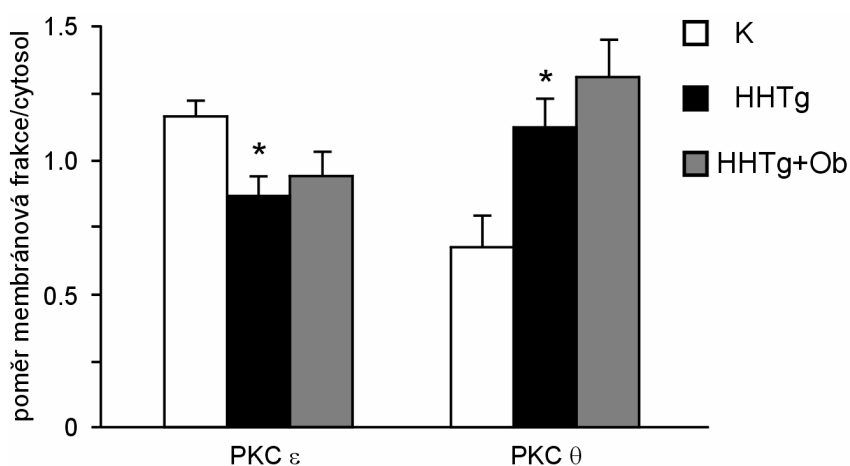
*K – kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, HHTg+Ob – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani po vysokosacharóзовé dietě*  
*Výsledky pěti nezávislých pokusů. Jednotlivé experimentální skupiny byly srovnávány na jednom filmu. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (přepočítaných na 1  $\mu$ g proteinu) všech experimentálních skupin v rámci jedné buněčné frakce je roven 1.*

*HHTg vs K \*  $p < 0,05$*

*Kosterní sval- musculus gastrocnemius*

*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (5 zvířat ve skupině)*

**Obrázek 13** – Aktivace izoforem PKC v kosterním svalu



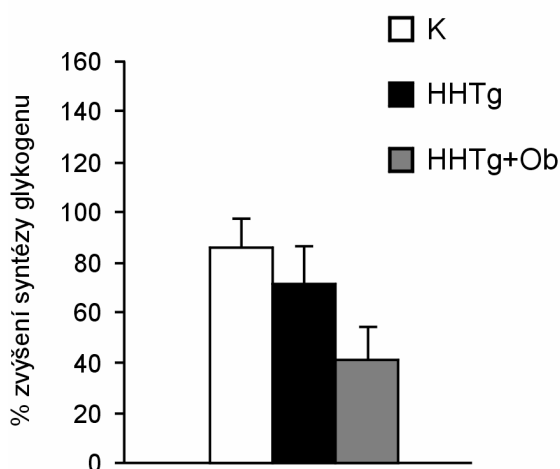
*K – kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, HHTg+Ob – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani po vysokosacharóзовé dietě*

*HHTg vs K \*  $p < 0,05$*

*Kosterní sval – musculus gastrocnemius*

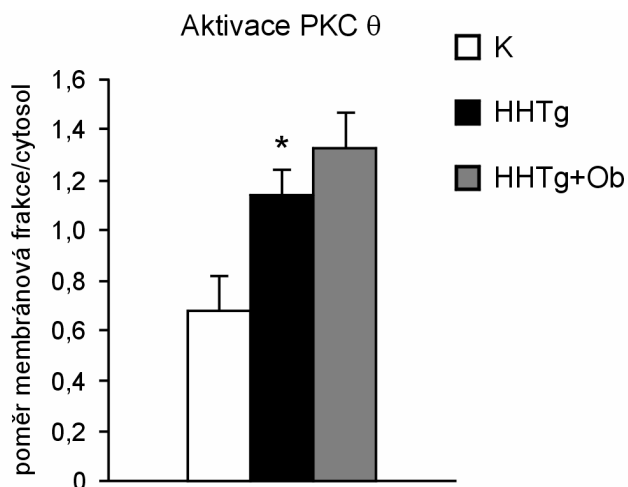
*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (5 zvířat ve skupině)*

**Obrázek 14** – Inzulímem stimulovaná syntéza glykogenu v kosterním svalu



*K – kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg – hereditárně hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, obézní HHTg+Ob – obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani  
Kosterní sval – musculus soleus  
Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (K a HHTg 5 zvířat ve skupině, HHTg+Ob 9 zvířat ve skupině)*

**Obrázek 15** – Aktivace PKC  $\theta$  v kosterním svalu



*K – kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg - hereditárně hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, HHTg+Ob - obézní hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani  
HHTg vs K \*  $p < 0,05$   
Kosterní sval – musculus gastrocnemius  
Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (5 zvířat ve skupině)*

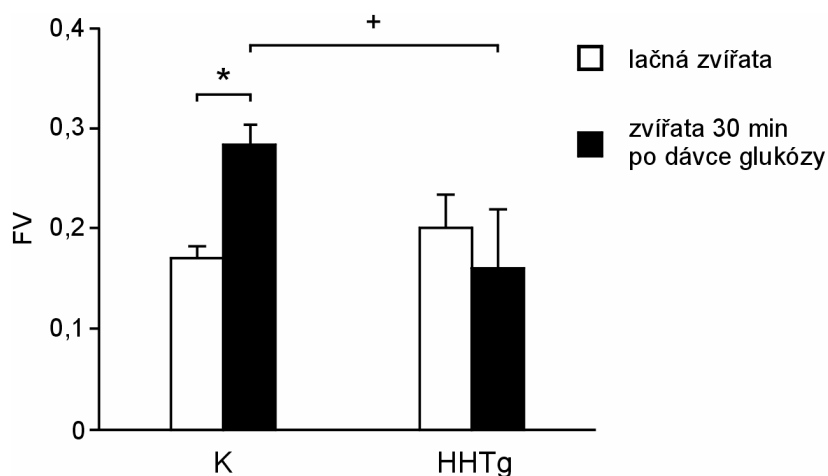
U HHTg potkanů jsme našli zvýšené hladiny triglyceridů a NEMK v séru, ektopické ukládání triglyceridů ve tkáních a sníženou citlivost periferních tkání k účinku inzulínu. Rezistence kosterních svalů k účinku inzulínu byla u HHTg potkanů asociovaná se zvýšenou aktivací a translokací izoformy PKC  $\theta$  a sníženým relativním množstvím PKC  $\epsilon$  v membránové frakci. Nutričně indukovaná obezita HHTg potkanů v řadě případů tyto metabolické abnormality spojené s IR ještě dále prohloubila.

## 5. 2. Aktivita glykogensyntázy při inzulínové rezistenci

Předmětem pokusu bylo zjistit zda, popřípadě jakým způsobem je ovlivněna aktivita GS u HHTg potkanů.

Aktivita GS se u lačných kontrolních a u HHTg potkanů nelišila. Po jednorázové dávce glukózy vzrostla aktivita enzymu u kontrol o 66 %, zatímco u HHTg potkanů se nezměnila ve srovnání s lačným stavem. Po stimulaci glukózou byla aktivita GS u HHTg potkanů nižší o 43 % oproti kontrolním potkanům (obrázek 16).

**Obrázek 16** – Aktivita glykogensyntázy v kosterním svalu u HHTg potkanů



*K – kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg – hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, FV – poměrná rychlost přeměny glukózy na glykogen katalyzovaná glykogensyntázou*

*HHTg vs K +  $p < 0,05$*

*Vliv jednorázové dávky glukózy: \*  $p < 0,05$*

*Kosterní sval-musculus soleus*

*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (5 zvířat ve skupině)*

U HHTg potkanů je zhoršená utilizace glukózy v periferních tkáních provázena sníženou aktivitou GS v kosterním svalu.

### 5. 3. Vliv věku na PKC a inzulinovou rezistenci

V pokusu jsme porovnávali parametry sacharidového a lipidového metabolismu, jejich ovlivnění dvoutýdenním podáváním diety s vysokým obsahem sacharózy a intracelulární lokalizaci PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v kosterním svalu během stárnutí potkanů.

Tělesná hmotnost HHTg a kontrolních potkanů se ve věku 4 měsíce nelišila a s postupujícím věkem narůstala u HHTg linie pomaleji (tabulka 12). Celkově se tělesná hmotnost potkanů v období mezi 4. a 18. měsícem zvýšila u kontrolní skupiny potkanů zhruba o 54 % a u HHTg potkanů o 28 %. Hmotnost epididymální tukové tkáně po přepočtu na 100 g tělesné hmotnosti (tabulka 12) byla u kontrolní skupiny ve stáří 18 měsíců mírně snížena a nezměnila se s přibývajícím věkem u HHTg skupiny.

**Tabulka 12** - Tělesná hmotnost a relativní hmotnost epididymálního tukového tělesa u HHTg a kontrolních potkanů ve věku 4 a 18 měsíců

	4 měsíce		18 měsíců	
	K	HHTg	K	HHTg
tělesná hmotnost (g)	336 ± 9	334 ± 7	516 ± 25 <sup>aaa</sup>	426 ± 30 <sup>*, aa</sup>
relativní hmotnost epididymálního tukového tělesa (g/100g t. hm.)	1,55 ± 0,06	1,39 ± 0,08	1,17 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,15

*K – kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg – hereditárně hypertriglyceridemiční potkani*

*HHTg vs K \* p<0,05*

*18 vs 4 měsíce <sup>a</sup> p<0,02, <sup>aa</sup> p<0,01, <sup>aaa</sup> p<0,001*

*Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (8 zvířat ve skupině)*

Koncentrace triglyceridů v séru potkanů v sytém stavu byla u HHTg potkanů krmených standardní dietou vyšší ve srovnání s kontrolami a zvyšovala se s přibývajícím věkem (tabulka 13). Příjem vysokosacharóзовé diety po dobu dvou týdnů zvyšoval triglyceridémii nezávisle na věku zvířat, a to o 80 % u HHTg potkanů a o 30 až 35 % u kontrolních potkanů. Rozdíl v sérové koncentraci NEMK v sytém stavu po krmení standardní dietou (tabulka 13) mezi HHTg a kontrolní skupinou byl ve věku 4 měsíce pouze naznačen (statisticky nevýznamné zvýšení o 13 %), ve věku 18 měsíců byly sérové koncentrace NEMK zvýšené již o 40 % u HHTg potkanů. Příjem vysokosacharóзовé diety koncentraci NEMK v séru dále zvyšoval, zvláště u skupiny HHTg potkanů.

**Tabulka 13** – Vliv stárnutí a vysokosacharóзовé diety na koncentraci triglyceridů a NEMK v séru u HHTg a kontrolních potkanů

		4 měsíce		18 měsíců	
		K	HHTg	K	HHTg
triglyceridy (mmol/l)	standardní dieta	1,69 ± 0,25	3,16 ± 0,47 *	2,57 ± 0,16 a	4,01 ± 0,22 **
	vysokosach. dieta	2,28 ± 0,25	5,68 ± 0,35 **, bb	3,34 ± 0,28 a, b	7,13 ± 0,40 **, a, bb
NEMK (mmol/l)	standardní dieta	0,571 ± 0,040	0,646 ± 0,053	0,671 ± 0,087	0,938 ± 0,060 *, aaa
	vysokosach. dieta	0,649 ± 0,046	0,829 ± 0,061 *, b	0,971 ± 0,074 a, b	1,251 ± 0,128 *,aa, b

*K – kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg - hereditárně hypertriglyceridemiční potkani, NEMK – neesterifikované mastné kyseliny*

*HHTg vs K \* p<0,05, \*\* p<0,001*

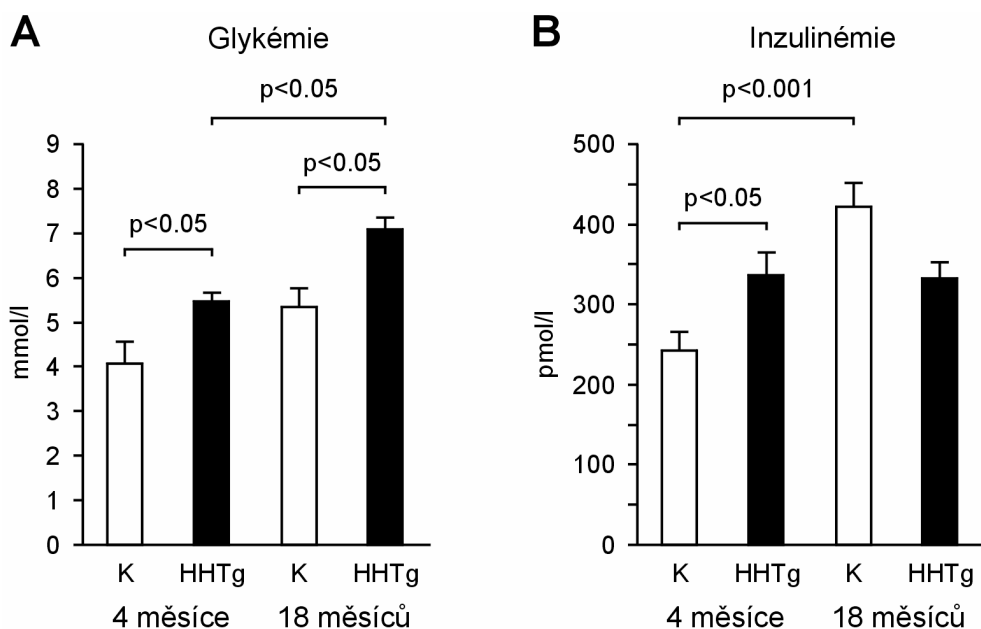
*18 vs 4 měsíce <sup>a</sup> p<0,02, <sup>aa</sup> p<0,01, <sup>aaa</sup> p<0,001*

*vzestup po vysokosacharóзовé dietě <sup>b</sup> p<0,05, <sup>bb</sup> p<0,001*

*Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (8 zvířat ve skupině)*

Koncentrace glukózy v séru potkanů krmených vysokosacharózovou dietou byla ve věku 4 měsíce u HHTg skupiny vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou a ve věku 18 měsíců stoupla až na hodnotu  $7,08 \pm 0,25$  mmol/l ( $p < 0,05$ ) (obrázek 17A). Dalším sledovaným parametrem ukazujícím na poruchu sacharidového metabolismu je inzulinémie (obrázek 17B). Naměřili jsme zvýšené sérové koncentrace inzulinu u HHTg skupiny ve věku 4 měsíce, ale s věkem inzulinémie již více nestoupala. Naproti tomu kontrolní skupina ve věku 18 měsíců vykazovala značnou hyperinzulinémií ( $421 \pm 62$  pmol/l). OGTT prokázal zhoršenou glukózovou toleranci HHTg potkanů (obrázek 18). Po intragastrické aplikaci glukózy 4 měsíčním potkanům byla její koncentrace v séru ve všech sledovaných časových intervalech u HHTg potkanů vyšší než u potkanů kontrolních. Toto zjištění je patrné i z vyjádření testu jako plochy pod křivkou – AUC (4 měs. HHTg  $907 \pm 29$  vs K  $790 \pm 20$  mmol/l/2 hod,  $p < 0,005$ ). Obdobný nález byl ve věku 18 měsíců, kdy byla glukózová tolerance u HHTg potkanů v porovnání se 4 měsíčními dále zhoršena ( $p < 0,05$ ). V tomto věku však rozdíly mezi HHTg a kontrolami nezůstaly tak výrazné, neboť i kontrolní zvířata vykazovala zhoršenou glukózovou toleranci.

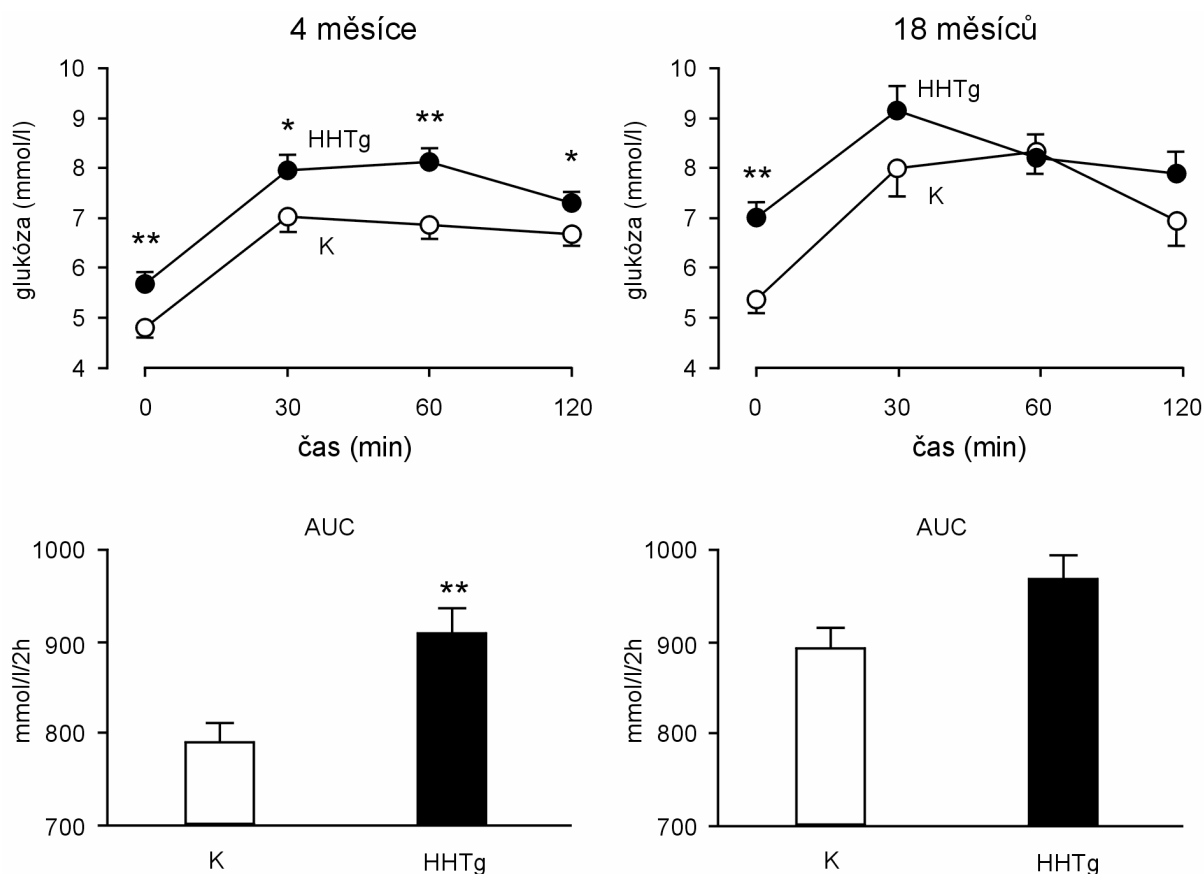
**Obrázek 17** – Koncentrace glukózy (17 A) a inzulinu (17 B) v séru 4 a 18 měsíců starých HHTg a kontrolních potkanů



*K - kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg - hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani*  
*Měřeno v sýtem stavu po dvoutýdenním podávání vysokosacharózové diety.*  
*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (8 zvířat ve skupině)*



**Obrázek 18** – Orální glukózový toleranční test a AUC u 4 a 18 měsíců starých HHTg a kontrolních potkanů



*K* - kontrolní potkani kmene Wistar, *HHTg* - hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani, *AUC* - vyjadřuje plochu pod křivkou OGTT (mmol/l/2 hod)

Glukóza byla podána intragastricky (3 g/kg) potkanům hladovějícím 14 hodin. Potkanům byla 2 týdny podávána vysokosacharózová dieta.

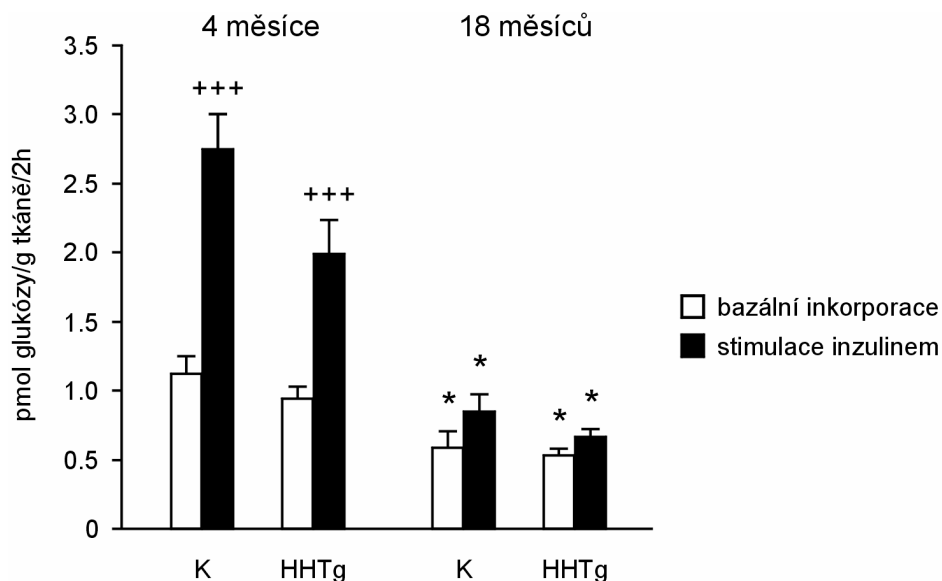
*HHTg* vs *K* \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

Věkový rozdíl *AUC* u *K* 18 vs 4 měsíce:  $p < 0,05$

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (8 zvířat ve skupině)

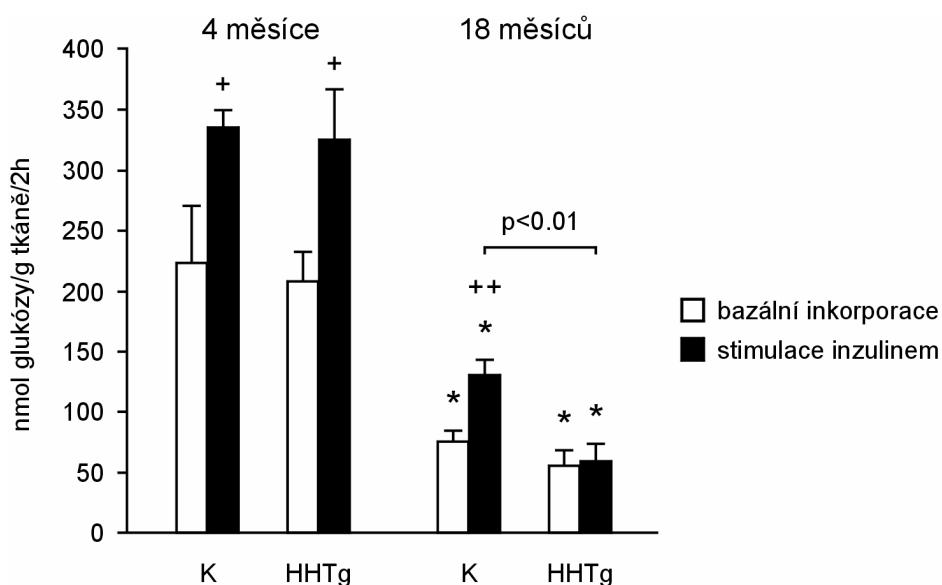
Inzulin zvýšil inkorporaci  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do lipidů epididymální tukové tkáně kontrolních potkanů ve věku 4 měsíce o 150 % v porovnání s bazální inkorporací. U *HHTg* potkanů ve věku 4 měsíce byla inzulinem stimulovaná inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy zvýšená o 113 % oproti bazální inkorporaci. Ve věku 18 měsíců byla citlivost epididymální tukové tkáně k účinku inzulinu výrazně snížena u *HHTg* potkanů i u kontrolních potkanů (obrázek 19). Podobná situace byla pozorována v bránici, kde byla tkáň 18-ti měsíčních *HHTg* potkanů zcela rezistentní k účinku inzulinu a inzulinová senzitivita tkáně stejně starých kontrolních potkanů značně snížena (obrázek 20).

**Obrázek 19** – Inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do celkových lipidů epididymální tukové tkáně u HHTg a kontrolních potkanů ve věku 4 a 18 měsíců



*K* - kontrolní potkani kmene Wistar, *HHTg* - hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani  
 vliv inzulinu: +++  $p < 0,001$   
 věkový rozdíl (18 vs 4 měsíce): \*  $p < 0,001$   
 Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (8 zvířat ve skupině)

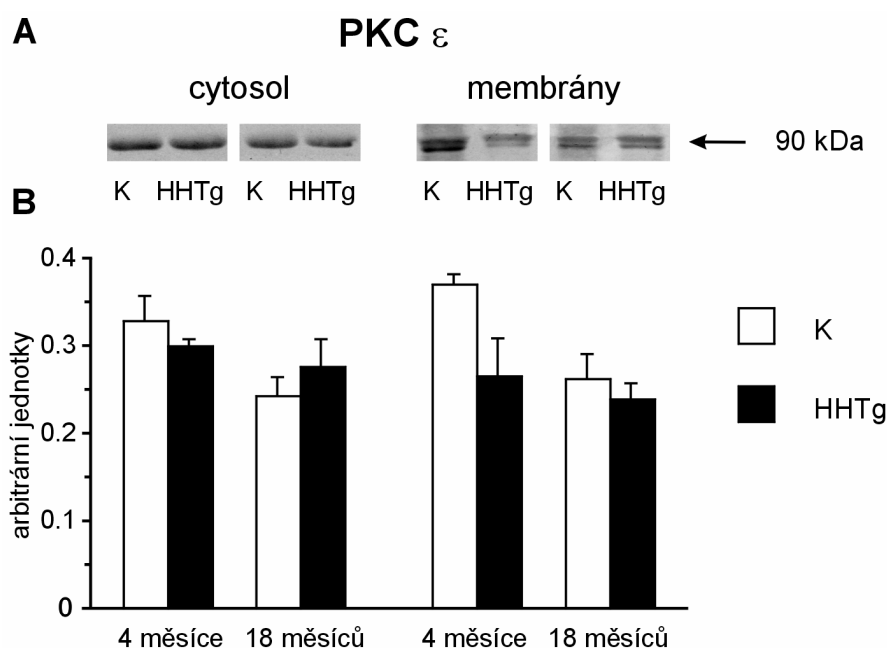
**Obrázek 20** - Inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do glykogenu bránice u HHTg a kontrolních potkanů ve věku 4 a 18 měsíců



*K* - kontrolní potkani kmene Wistar, *HHTg* - hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani  
 vliv inzulinu: +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$   
 věkový rozdíl (18 vs 4 měsíce): \*  $p < 0,001$   
 Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (8 zvířat ve skupině)

Relativní množství proteinu PKC  $\epsilon$  se nelišilo mezi 4 a 18-ti měsíčními HHTg a kontrolními potkany v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu (obrázek 21). U mladých, 4 měsíčních HHTg potkanů jsme nepozorovali rozdíly v PKC  $\theta$  v cytosolu a membránové frakci v porovnání s kontrolami (obrázek 22). Rozdíly v množství PKC  $\theta$  mezi HHTg potkany a kontrolními potkany Wistar jsme pozorovali až v pokročilém věku. U 18-ti měsíčních HHTg potkanů jsme našli vyšší množství PKC  $\theta$  v cytosolu o 78 % a v membránové frakci o 87 % oproti kontrolám. Stárnutí HHTg i kontrolních potkanů bylo doprovázeno změnami v relativním množství PKC  $\theta$  pouze v cytosolu. U 18-ti měsíčních kontrol jsme naměřili nižší množství PKC  $\theta$  v porovnání se 4 měsíčními kontrolami, u HHTg potkanů to bylo naopak – u starých HHTg potkanů jsme pozorovali vyšší množství PKC  $\theta$  oproti mladým HHTg potkanům.

**Obrázek 21** – Relativní množství proteinu PKC  $\epsilon$  v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu u HHTg a kontrolních potkanů ve věku 4 a 18 měsíců



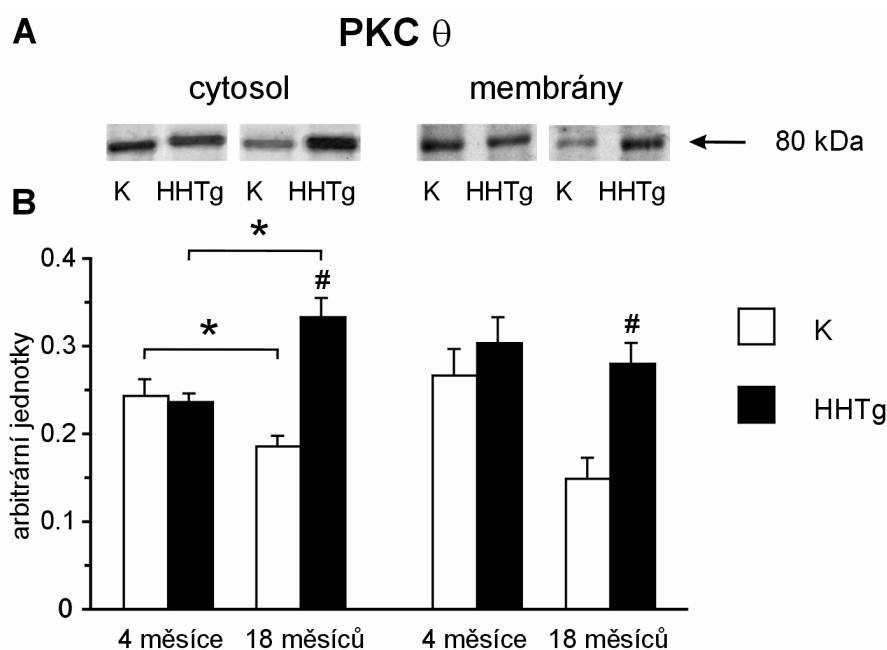
*K - kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg - hereditárně hypertriglyceridemičtí potkani*

*Reprezentativní imunoblot PKC  $\epsilon$  (A). Graf relativního množství PKC  $\epsilon$  (B) v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu (musculus gastrocnemius) u kontrolních a HHTg potkanů ve věku 4 a 18 měsíců.*

*Výsledky pěti nezávislých pokusů. Jednotlivé experimentální skupiny byly srovnávány na jednom filmu. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (přepočítaných na 1  $\mu$ g proteinu) všech experimentálních skupin v rámci jedné buněčné frakce je roven 1.*

*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (5 zvířat ve skupině)*

**Obrázek 22** – Relativní množství proteinu PKC  $\theta$  v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu u HHTg a kontrolních potkanů ve věku 4 a 18 měsíců



*K - kontrolní potkani kmene Wistar, HHTg - hereditárně hypertriglyceridemiční potkani*

*Reprezentativní imunoblot PKC  $\theta$  (A). Graf relativního množství PKC  $\theta$  (B) v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu (musculus gastrocnemius) u kontrolních a HHTg potkanů ve věku 4 a 18 měsíců.*

*Výsledky pěti nezávislých pokusů. Jednotlivé experimentální skupiny byly srovnávány na jednom filmu. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (přepočítaných na 1  $\mu$ g proteinu) všech experimentálních skupin v rámci jedné buněčné frakce je roven 1.*

*HHTg vs K #  $p < 0,05$*

*18 vs 4 měsíce \*  $p < 0,05$*

*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (5 zvířat ve skupině)*

U HHTg potkanů, experimentálního modelu IR, s přibývajícím věkem došlo k vzestupu sérových koncentrací triglyceridů a NEMK, ke zhoršení glukózové tolerance, téměř k úplné ztrátě citlivosti periferních tkání k účinku inzulínu a nárůstu relativního množství proteinu PKC  $\theta$  v kosterním svalu. Také u kontrolních potkanů stárnutí způsobilo výrazné změny v citlivosti tkání k účinku inzulínu a zhoršení glukózové tolerance, tyto poruchy však byly oproti stejně starým HHTg potkanům ještě kompenzovány hyperinzulinémií. Zhoršování IR s věkem nebylo spojené se zvýšením podílu tukové tkáně.

#### 5. 4. Vliv zvýšené exprese rezistinu v tukové tkáni na PKC a inzulinovou rezistenci

Ve studii jsme zjišťovali, zda zvýšená exprese rezistinu v tukové tkáni SHR potkanů ovlivní glukózovou toleranci, rezistenci periferních tkání k účinku inzulinu a relativní množství PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu.

Transgenní SHR potkani měli vyšší tělesnou hmotnost i hmotnost epididymálního tukového tělesa oproti kontrolním potkanům (tabulka 14).

**Tabulka 14** - Hmotnostní parametry SHR a transgenních SHR potkanů

	<b>SHR</b>	<b>SHR-TG</b>	<b>p</b>
tělesná hmotnost (g)	370 ± 5	389 ± 6	<0,05
hmotnost epididymálního tukového tělesa (g/100 g t. hm.)	0,71 ± 0,04	0,92 ± 0,04	<0,02

*SHR – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-TG – spontánně hypertenzní potkani s transgenní expresí rezistinu*

*Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (10 zvířat ve skupině)*

**Tabulka 15** - Koncentrace vybraných biochemických analytů v séru a ve tkáních u SHR a transgenních SHR potkanů

	<b>SHR</b>	<b>SHR-TG</b>	<b>p</b>
inzulin (pmol/l)	270 ± 24	339 ± 21	<0,05
NEMK (mmol/l)	1,17 ± 0,04	1,26 ± 0,04	NS
triglyceridy v játrech (μmol/g)	9,69 ± 1,36	9,55 ± 1,11	NS
triglyceridy ve svalu (μmol/g)	2,88 ± 0,09	3,12 ± 0,14	NS

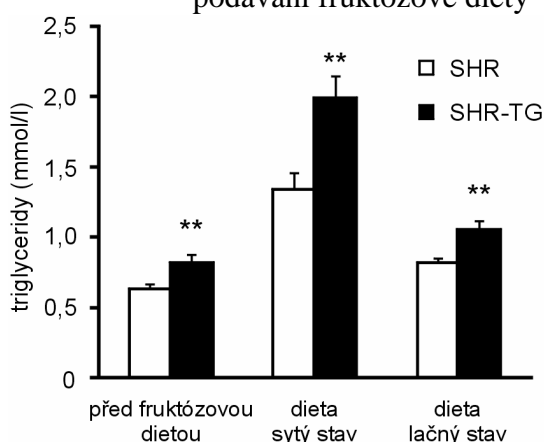
*SHR – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-TG – spontánně hypertenzní potkani s transgenní expresí rezistinu, NEMK – neesterifikované mastné kyseliny*

*Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (10 zvířat ve skupině)*

SHR potkani s exprimovaným rezistinem v tukové tkáni vykazovali vyšší koncentrace inzulinu v séru v porovnání s kontrolními SHR potkany. Koncentrace NEMK, triglyceridů

v játrech a kosterním svalu (musculus soleus) se mezi porovnávanými skupinami nelišila (tabulka 15). Sérové koncentrace triglyceridů u transgenických potkanů byly zvýšeny před podáváním fruktóзовé diety i po 14-ti denním podávání fruktóзовé diety, a to jak v sytém, tak i lačném stavu (obrázek 23). Transgenická exprese rezistinu významně zhoršila toleranci ke glukóзовé zátěži sledované OGTT (obrázek 24). Toto zjištění je patrné i z vyjádření testu jako plochy pod křivkou (AUC<sub>0-120</sub>: SHR-TG 1026 ± 131 vs SHR 725 ± 14 mmol/l/120 min, p<0,05).

**Obrázek 23** - Koncentrace triglyceridů v séru SHR a transgenických SHR potkanů před podáváním fruktóзовé diety a v sytém a lačném stavu po 14-ti denním podávání fruktóзовé diety

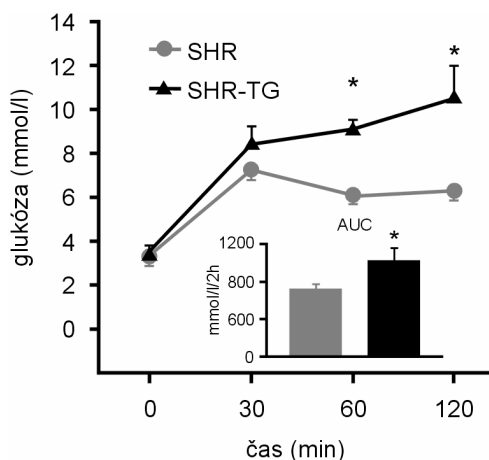


SHR – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-TG – spontánně hypertenzní potkani s transgenickou expresí rezistinu

SHR-TG vs SHR \*\* p<0,01

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (10 zvířat ve skupině)

**Obrázek 24** - Orální glukóзовý toleranční test u SHR a transgenických SHR potkanů



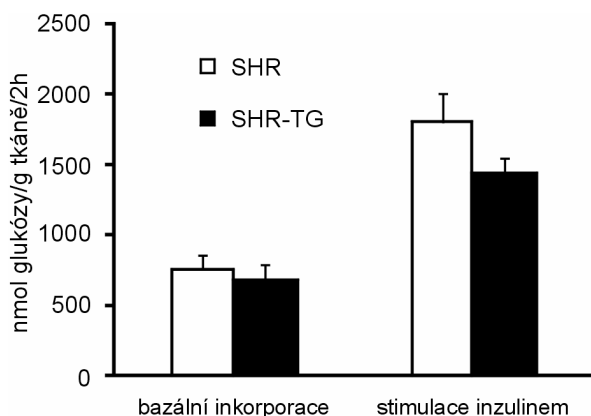
SHR – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-TG – spontánně hypertenzní potkani s transgenickou expresí rezistinu, AUC vyjadřuje plochu pod křivkou OGTT (mmol/l/120min)

SHR-TG vs SHR \* p<0,05

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (10 zvířat ve skupině)

Citlivost kosterních svalů (musculus soleus) k účinku inzulinu, měřená *in vitro* podle inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do glykogenu, se u transgenních SHR potkanů nezměnila, a to jak v případě bazální, tak inzulinem stimulované inkorporace (obrázek 25).

**Obrázek 25** - Inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do glykogenu v kosterním svalu u SHR a transgenních SHR potkanů

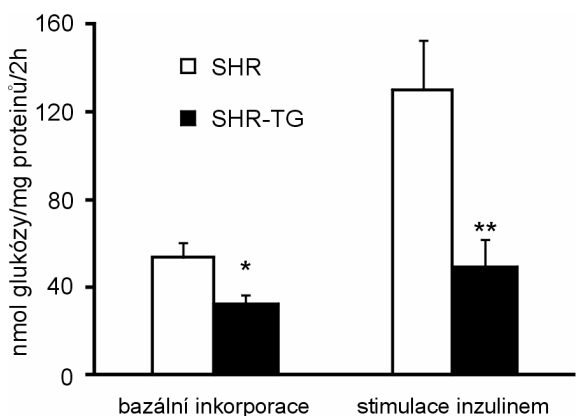


SHR – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-TG – spontánně hypertenzní potkani s transgenní expresí rezistinu

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (10 zvířat ve skupině)

Transgenní exprese rezistinu byla u SHR-TG potkanů asociována s téměř úplnou rezistencí tukové tkáně k účinku inzulinu sledované *in vitro* podle bazální inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do celkových lipidů epididymální tukové tkáně nebo po stimulaci inzulinem (obrázek 26).

**Obrázek 26** - Inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do lipidů epididymální tukové tkáně u SHR a transgenních SHR potkanů



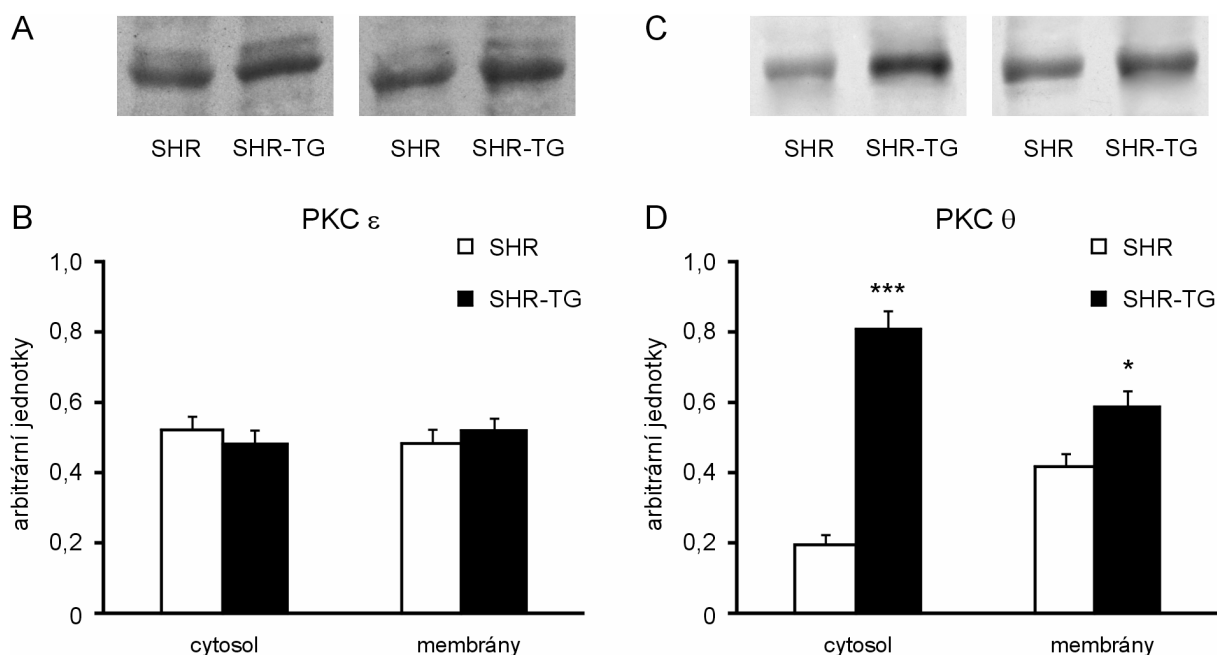
SHR – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-TG – spontánně hypertenzní potkani s transgenní expresí rezistinu

SHR-TG vs SHR \*  $p < 0,02$ , \*\*  $p < 0,01$

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (10 zvířat ve skupině)

Relativní množství proteinu PKC  $\epsilon$  se mezi SHR transgenními a kontrolními potkany v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu nelišilo (obrázek 27B). V případě PKC  $\theta$  jsme pozorovali zvýšení jejího relativního množství o 318 % v cytosolu a o 39 % v membránové frakci (obrázek 27 D).

**Obrázek 27** – Vliv transgenní exprese rezistinu na relativní množství PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu



SHR – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-TG – spontánně hypertenzní potkani s transgenní expesí rezistinu

Reprezentativní imunoblot PKC  $\epsilon$  (A) a PKC  $\theta$  (C). Grafy relativního množství PKC  $\epsilon$  (B) a PKC  $\theta$  (D) v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu (*musculus gastrocnemius*).

Výsledky čtyř nezávislých pokusů. Jednotlivé experimentální skupiny byly srovnávány na jednom filmu. Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (přepočítaných na 1  $\mu$ g proteinu) všech experimentálních skupin v rámci jedné buněčné frakce je roven 1.

SHR-TG vs SHR \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (4 zvířata ve skupině)

Chronická transgenní exprese rezistinu u jeden rok starých SHR potkanů byla asociována se zvýšenými sérovými hladinami triglyceridů, hyperinzulinémií, výrazně zhoršenou glukózovou tolerancí, rezistencí tukové tkáně k účinku inzulinu a výrazným nárůstem relativního množství PKC  $\theta$  v kosterním svalu.



## 5. 5. Vliv dlouhodobého podávání pioglitazonu na PKC a inzulinovou rezistenci

V této studii jsme zjišťovali, zda dlouhodobé podávání pioglitazonu ovlivní aktivaci PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$ , ektopické ukládání triglyceridů ve svalech a citlivost tukové a svalové tkáně k účinku inzulinu.

Dlouhodobé podávání pioglitazonu neovlivnilo tělesnou hmotnost a hmotnost perirenálního tukového tělesa, snížilo hmotnost jater a pouze mírně zvýšilo hmotnost epididymální tukové tkáně, která je ukazatelem viscerální obezity (tabulka 16). Koncentrace triglyceridů v játrech se mezi studovanými skupinami nelišila, obsah cholesterolu v játrech se u SHR-4 potkanů s pioglitazonem zvýšil. Sérové koncentrace NEMK byly u SHR-4 potkanů léčených pioglitazonem významně nižší (tabulka 17).

**Tabulka 16** - Hmotnostní parametry kontrolních a SHR-4 potkanů s pioglitazonem

	<b>SHR-4</b>	<b>SHR-4+PIO</b>	<b>p</b>
tělesná hmotnost (g)	436 ± 6	433 ± 12	NS
hmotnost epididymálního tukového tělesa (g)	1,41 ± 0,06	1,65 ± 0,08	<0,05
hmotnost perirenálního tukového tělesa (g)	1,89 ± 0,11	1,89 ± 0,15	NS
hmotnost jater (g)	3,15 ± 0,03	2,84 ± 0,04	<0,01

*SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčení pioglitazonem*

*Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (9 zvířat ve skupině)*

**Tabulka 17** - Koncentrace vybraných metabolitů v játrech a séru u kontrolních a SHR-4 potkanů s dlouhodobě podávaným pioglitazonem

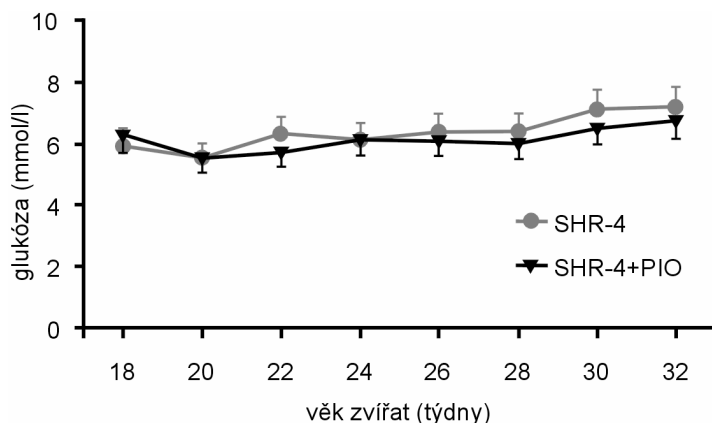
	<b>SHR-4</b>	<b>SHR-4+PIO</b>	<b>p</b>
triglyceridy v játrech (μmol/g)	7,75 ± 0,31	6,27 ± 0,16	NS
cholesterol v játrech (μmol/g)	8,68 ± 0,37	9,98 ± 0,28	<0,02
NEMK v séru (mmol/l)	1,22 ± 0,09	0,82 ± 0,09	<0,01

*SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčení pioglitazonem, NEMK – neesterifikované mastné kyseliny*

*Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (9 zvířat ve skupině)*

Porovnávané experimentální skupiny vykazovaly podobné koncentrace glukózy v séru (obrázek 28).

**Obrázek 28** – Koncentrace glukózy v séru u kontrolních a SHR-4 potkanů s pioglitazonem

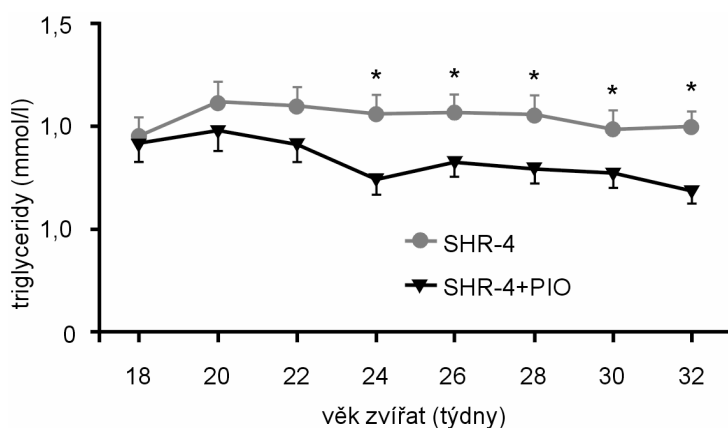


SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčeni pioglitazonem

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (9 zvířat ve skupině)

Dlouhodobé podávání pioglitazonu SHR-4 potkanům významně snížilo sérové koncentrace triglyceridů (obrázek 29). Podávání vysokosacharóзовé diety během experimentu vedlo k postupnému nárůstu sérových koncentrací inzulinu u kontrolních potkanů, zatímco u potkanů léčených pioglitazonem se koncentrace inzulinu v séru nezvyšovaly (obrázek 30).

**Obrázek 29** – Koncentrace triglyceridů v séru u kontrolních a SHR-4 potkanů s pioglitazonem

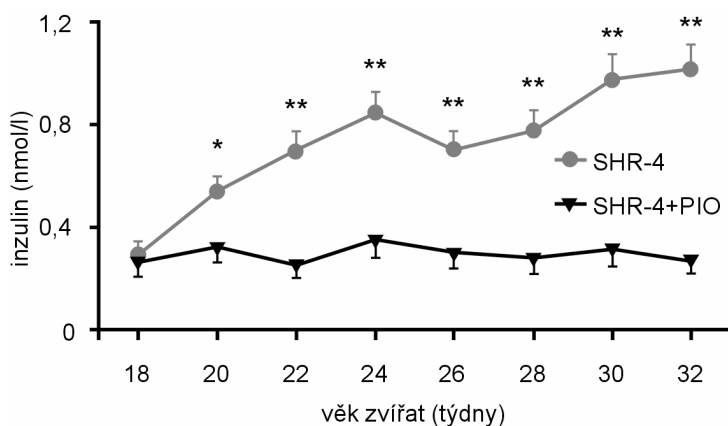


SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčeni pioglitazonem

SHR-4+PIO vs SHR-4 \*  $p < 0,01$

Data jsou uvedena jako průměr ± SEM (9 zvířat ve skupině)

**Obrázek 30** - Koncentrace inzulinu v séru u kontrolních a SHR-4 potkanů s pioglitazonem



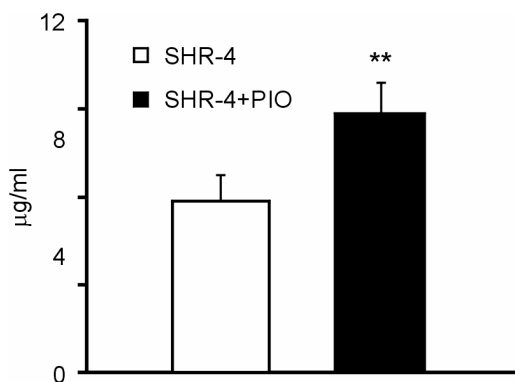
SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčeni pioglitazonem

SHR-4+PIO vs SHR-4 \*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,00001$

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (9 zvířat ve skupině)

Koncentrace adiponektinu v séru byly u SHR-4 potkanů s dlouhodobě podávaným pioglitazonem významně vyšší oproti kontrolám (obrázek 31).

**Obrázek 31** - Koncentrace adiponektinu v séru u kontrolních a SHR-4 potkanů s pioglitazonem



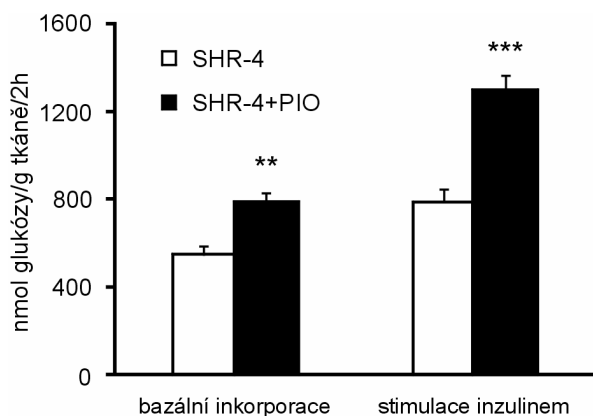
SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčeni pioglitazonem

SHR-4+PIO vs SHR-4 \*\*  $p < 0,01$

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (9 zvířat ve skupině)

U SHR-4 potkanů léčených pioglitazonem jsme na základě zvýšené bazální a inzulinem stimulované syntézy glykogenu pozorovali významné zlepšení IR v kosterních svalech (obrázek 32), přestože dlouhodobé podávání pioglitazonu SHR-4 potkanům bylo doprovázeno zvýšenou akumulací triglyceridů ve svalech (obrázek 33).

**Obrázek 32** - Inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do glykogenu v kosterním svalu u kontrolních a SHR-4 potkanů s pioglitazonem



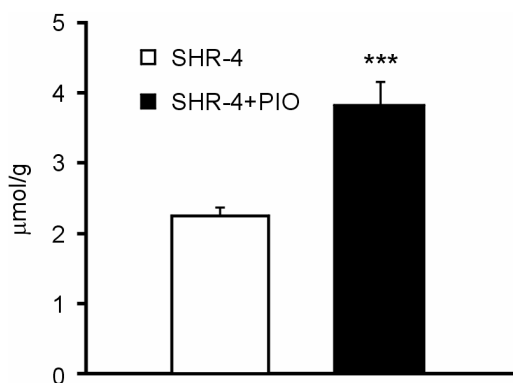
*SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčeni pioglitazonem*

*SHR-4+PIO vs SHR-4 \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0001$*

*Kosterní sval-musculus gastrocnemius*

*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (9 zvířat ve skupině)*

**Obrázek 33** - Koncentrace triglyceridů v kosterním svalu u kontrolních a SHR-4 potkanů s pioglitazonem



*SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčeni pioglitazonem*

*SHR-4+PIO vs SHR-4 \*\*\*  $p < 0,0001$*

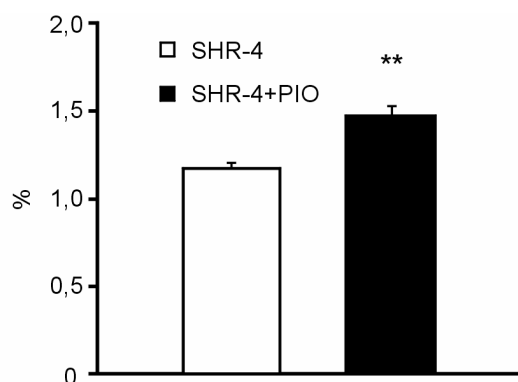
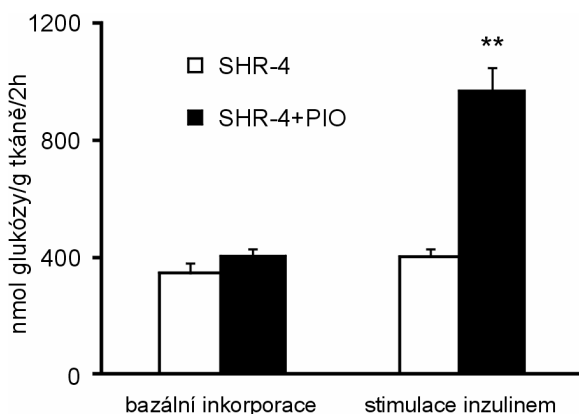
*Kosterní sval-musculus gastrocnemius*

*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (9 zvířat ve skupině)*

Léčba SHR-4 potkanů pioglitazonem zvýšila inzulinem stimulovanou inkorporaci  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do lipidů (obrázek 34). Zvýšená citlivost epididymální tukové tkáně k účinku inzulinu byla doprovázena zvýšeným obsahem proteinů v tukové tkáni (obrázek 35).

**Obrázek 34** - Inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U-glukózy do lipidů epididymální tukové tkáně

**Obrázek 35** - Proteiny v tukové tkáni



*SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčení pioglitazonem*

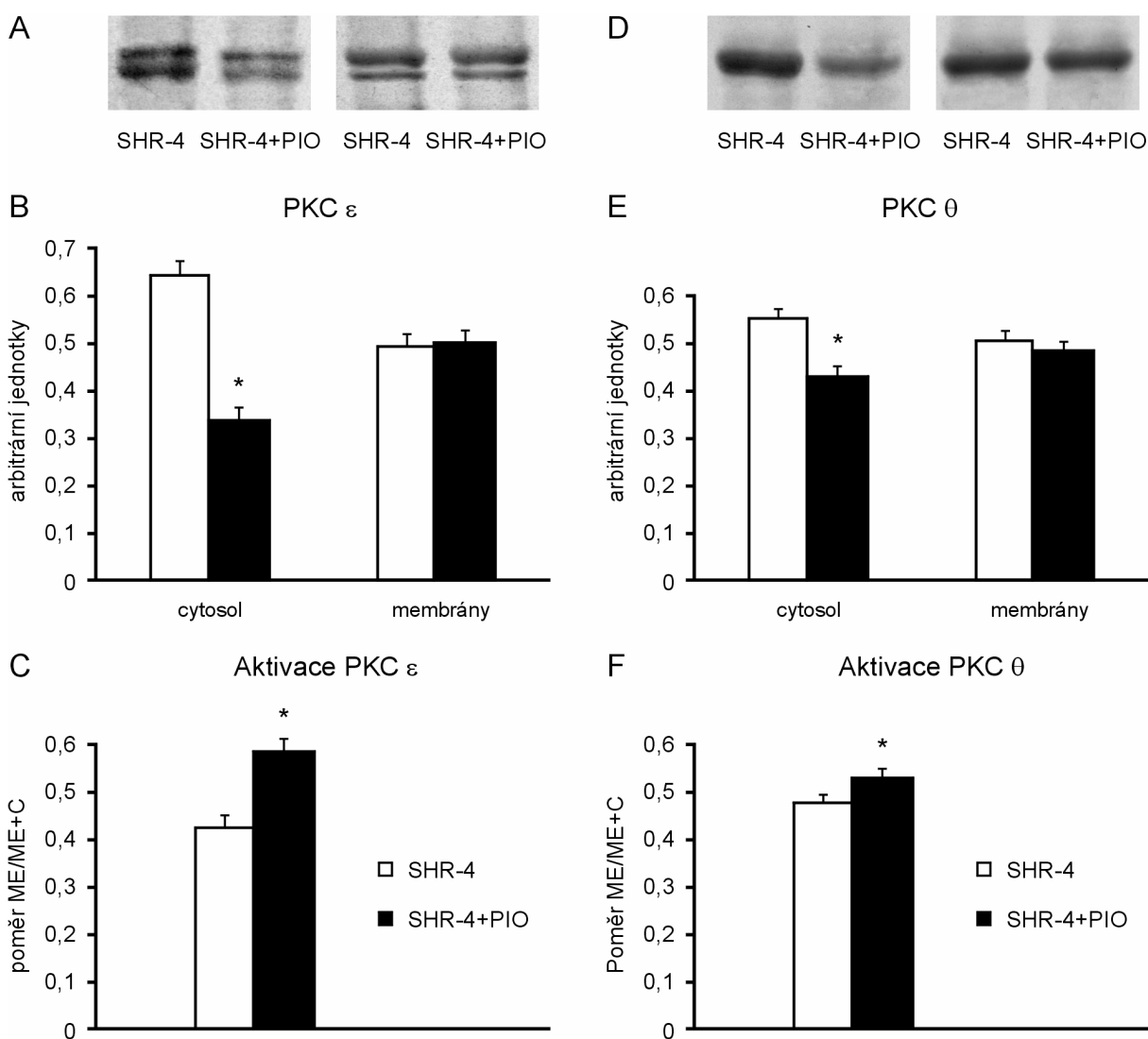
*SHR-4+PIO vs SHR-4 \*\*  $p < 0,01$*

*Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (9 zvířat ve skupině)*

U SHR-4 potkanů léčených pioglitazonem jsme v cytosolu kosterního svalu pozorovali snížené relativní množství PKC  $\epsilon$ , v membránové frakci se množství proteinu PKC  $\epsilon$  mezi porovnávanými skupinami nelišilo (obrázek 36B). V případě PKC  $\theta$  byl nález obdobný, relativní množství PKC  $\theta$  v cytosolu bylo sníženo u SHR-4 potkanů s pioglitazonem (obrázek 36E). Dlouhodobé podávání pioglitazonu aktivovalo obě izofomy PKC (obrázek 36C a 36F), aktivace je vyjádřena jako poměr relativního množství proteinu PKC v membránové frakci k celkovému množství proteinu příslušné izofomy.

Dlouhodobé podávání pioglitazonu SHR-4 potkanům příznivě ovlivnilo řadu parametrů lipidového a sacharidového metabolismu, zvýšilo sérové koncentrace adiponektinu a bylo doprovázeno zvýšenou akumulací triglyceridů v kosterním svalu a aktivací PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$ .

**Obrázek 36** – Vliv podávání pioglitazonu SHR-4 potkanům na množství a aktivaci PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu



SHR-4 – kontrolní spontánně hypertenzní potkani, SHR-4+PIO – spontánně hypertenzní potkani léčeni pioglitazonem

Reprezentativní imunoblot PKC  $\epsilon$  (A) a PKC  $\theta$  (D.) Graf relativního množství PKC  $\epsilon$  (B) a PKC  $\theta$  (E) v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu (musculus gastrocnemius). Aktivace PKC  $\epsilon$  (C) a PKC  $\theta$  (F) vyjádřena jako poměr relativního množství PKC  $\epsilon$  nebo PKC  $\theta$  v membránové frakci ku celkovému množství PKC  $\epsilon$  nebo PKC  $\theta$ . Celkové množství izoformy PKC je dáno součtem relativního množství dané izoformy PKC v cytosolu a membránové frakci. C-cytosol, ME-membrány

Výsledky pěti nezávislých pokusů. Jednotlivé experimentální skupiny byly porovnávány na jednom filmu.

Arbitrární jednotka: součet denzitometrických objemů (přepočítaných na 1  $\mu$ g proteinu) všech experimentálních skupin v rámci jedné buněčné frakce je roven 1.

SHR-4+PIO vs SHR-4 \*  $p < 0,01$

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SEM (5 zvířat ve skupině)

## 6. DISKUZE

Pokusy uvedené v této disertační práci byly zaměřené na studium úlohy PKC v kosterním svalu při IR. Jednotlivé izoformy PKC jsou důležitou komponentou signalizační kaskády inzulinu a poruchy v přenosu signálu inzulinu jsou v současné době považovány za jednu z hlavních příčin IR. Sledovali jsme i další patofyziologické mechanismy uplatňující se v patogenezi IR a zaměřili jsme se i na možnosti pozitivního ovlivnění IR farmakologickou intervencí.

### 6. 1. Vliv nutričně indukované obezity u HHTg potkanů na PKC a inzulinovou rezistenci

Obezita je jedním z klíčových faktorů, které přispívají k rozvoji IR, je významným rizikovým faktorem kardiovaskulárních chorob a DM2 (Qatani and Lazar 2007). V řadě studií u lidí i zvířat bylo prokázáno, že úbytek či přírůstek hmotnosti úzce korelují se zvýšením či snížením inzulinové senzitivity (Bak et al. 1992; Vergés 2009; Cherian et al. 2009; Reeds 2009).

Naším cílem bylo zjistit, do jaké míry obezita navozená dlouhodobým podáváním diety s vysokým obsahem sacharózy ovlivní symptomy MS a aktivaci a intracelulární lokalizaci PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v kosterním svalu u HHTg potkanů. Pokusy byly provedeny u 18 měsíců starých potkaních samců kmene Wistar, HHTg a obézních HHTg potkanů. Obezita HHTg potkanů byla vyvolána nutričně, podáváním vysokosacharóзовé diety po dobu 7 měsíců. Kontrolní a HHTg potkani byli krmeni standardní laboratorní dietou.

Zjistili jsme, že HHTg potkani mají v porovnání s kontrolními potkany výrazně vyšší sérové koncentrace triglyceridů, NEMK a zhoršenou citlivost periferních tkání k účinku inzulinu. Dalším charakteristickým znakem těchto potkanů je ektopické ukládání triglyceridů v játrech a kosterních svalech, které negativně ovlivňuje inzulinovou senzitivitu těchto tkání. U tohoto neobézního kmene není IR spojena s excesivní akumulací tělesného tuku, jako je tomu u obvykle používaných modelů MS - obézních potkanů s genetickou poruchou tvorby leptinu nebo leptinového receptoru (Golda a Hilgertová 1998). HHTg potkani jsou vhodným modelem ke studiu IR a jejich komplikací u neobézních jedinců.

Podávání vysokosacharóзовé diety HHTg potkanům po dobu 7 měsíců zvýšilo tělesnou hmotnost, hmotnost epididymálního tukového tělesa, glykémii, triglyceridémii i sérové koncentrace NEMK. Tento model nutričně indukované obezity poměrně dobře odpovídá situaci ve výživě lidí ekonomicky rozvinutých států, vzhledem k tomu, že zvýšený příjem sacharidů v posledních letech v souvislosti s používáním fruktóзовého sirupu

v potravinářském průmyslu je považován za jednu z příčin významného nárůstu obezity a s ní spojených komplikací.

Zvýšené sérové koncentrace glukózy, triglyceridů a NEMK u obézních HHTg potkanů jsou v souladu s literárními údaji. Zvýšené koncentrace triglyceridů, glukózy, ale i inzulínu v séru byly zaznamenány např. u inzulínorezistentních obézních Zucker potkanů (Qu et al. 1999), ale i obézních inzulínorezistentních pacientů (Itani et al. 2000). Charakteristickým nálezem u obézních jedinců jsou zvýšené sérové koncentrace NEMK uvolňované z nadměrné tukové tkáně (Qatani and Lazar 2007). NEMK ovlivňují metabolické funkce v řadě tkání a podílí se na IR periferních tkání. V naší práci jsme u HHTg potkanů s nutričně indukovanou obezitou zaznamenali výrazně sníženou inzulínovou senzitivitu tukové tkáně, tento trend byl patrný i v kosterním svalu. Obezita u HHTg potkanů v našem experimentu byla také doprovázena výraznou akumulací triglyceridů v játrech, v souladu s pracemi, které ukazují, že obezita je spojena s ektopickým ukládáním lipidů (Guo 2008).

V membránové frakci kosterního svalu HHTg potkanů jsme naměřili nižší relativní množství PKC  $\epsilon$  oproti kontrolám, nutričně indukovaná obezita množství PKC  $\epsilon$  u HHTg potkanů dále neovlivnila. V cytosolu neobézních HHTg potkanů jsme našli nižší a naopak v membránové frakci vyšší množství PKC  $\theta$  vzhledem ke kontrolám. Obezita u HHTg potkanů toto rozložení PKC  $\theta$  ve studovaných buněčných frakcích kosterního svalu dále neovlivnila. Úbytek relativního množství PKC  $\theta$  v cytosolu a naopak nárůst v membránové frakci kosterního svalu je považován za ukazatel translokace a aktivace PKC  $\theta$  (Schmitz-Peiffer et al. 1997; Timmers et al. 2008). Při nutričně indukované obezitě u HHTg potkanů byla pozorována tendence k další aktivaci PKC  $\theta$ . Snížená citlivost kosterního svalu HHTg potkanů k inzulínu byla tedy doprovázena aktivací PKC  $\theta$ . V řadě studií byla nalezena zvýšená aktivace PKC spolu se sníženou inzulínovou senzitivitou, zejména ve spojitosti se zvýšenou dostupností lipidů v cílových tkáních působení inzulínu (Schmitz-Peiffer 2000). Zvýšené množství PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  bylo nalezeno v membránové frakci kosterního svalu potkanů, u nichž byla IR vyvolána podáváním diety s vysokým podílem tuku. Zvýšené množství těchto izoforem PKC navíc korelovalo s obsahem triglyceridů a DAG ve svalu. Autoři u tohoto experimentálního modelu předpokládají, že specifické změny v PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  mohou přispívat k rozvoji IR kosterních svalů (Schmitz-Peiffer et al. 1997). Zvýšená aktivita PKC, zvýšené množství DAG a membránově vázané PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  bylo naměřeno i u dalšího modelu IR, který je navíc obézní, u obezních Zucker potkanů (Qu et al. 1999). PKC



$\theta$  byla také aktivovaná v kosterním svalu u potkanů s IR indukovanou infuzí lipidů (Griffin et al. 1999).

I když ve většině studií zabývajících se IR a rolí PKC  $\epsilon$  v její patogenezi byla nalezena zvýšená aktivita PKC  $\epsilon$ , v naší práci jsme u inzulinorezistentních HHTg potkanů naměřili nižší aktivaci PKC  $\epsilon$  oproti kontrolám. Podobný nález byl popsán i v další práci, kde Cooper a spol. naměřili sníženou aktivitu PKC a množství PKC  $\epsilon$  v kosterním svalu u obézních Zucker potkanů (Cooper et al. 1993). Odlišné nálezy aktivace PKC  $\epsilon$  při IR lze vysvětlit různě. Zvýšená aktivace PKC  $\epsilon$  může stimulovat translokaci, proteinový obrat ale i degradaci PKC. Uvažuje se i o snížené syntéze PKC dané defektní translací či sníženou transkripcí mRNA PKC, roli může hrát i genetická mutace způsobující pozměněnou funkci či inaktivaci PKC (Cooper et al. 1993). Zatím je také velmi málo známo o funkční specifitě jednotlivých izoform PKC. Funkce jednotlivých izoenzymů PKC, ač např. patří do stejné podskupiny, mohou být odlišné, jednotlivé izoformy se liší i substráty, které fosforylují, aktivátory, které vyžadují ke své aktivaci a intracelulární lokalizaci. To vše jsou možné důvody vysvětlující naše odlišné nálezy u PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  u HHTg potkanů.

Nález zvýšené aktivace PKC  $\theta$  u HHTg potkanů je v souladu s literárními údaji. Na aktivaci PKC se podílí akumulace triglyceridů v kosterním svalu, kterou jsme naměřili i v naší studii. Triglyceridy mohou být prekurzory dalších lipidových metabolitů, jejich hydrolýzou se uvolňuje DAG, klasický druhý posel a aktivátor PKC (Guo 2008). Aktivovaná PKC  $\theta$  fosforyluje hydroxylové skupiny serinů IRS1 a IRS2, což snižuje fosforylaci tyrosinů IRS1 a IRS2, vede ke snížené aktivitě PI3K a v konečném důsledku snižuje transport glukózy. Těmito účinky snižuje PKC  $\theta$  přenos signálu inzulinu a přispívá k IR (Haasch et al. 2006).

Uvedené nálezy ukazují, že HHTg potkani jsou vhodným modelem pro studium IR. Nutričně indukovaná obezita HHTg potkanů řadu abnormalit lipidového a sacharidového metabolismu spojených s IR ještě dále prohloubila. Výsledky naznačují, že PKC  $\theta$  by mohla být klíčovou izoformou uplatňující se v patogenezi IR kosterních svalů.

## 6. 2. Aktivita glykogensyntázy při inzulinové rezistenci

GS je jednou z efektorových molekul zodpovědných za zprostředkování biologických účinků inzulínu. Snížená aktivita GS v kosterním svalu je charakteristickým nálezem u pacientů s DM2 (Park et al. 2000). V naší práci jsme měřili aktivitu GS v kosterním svalu u čtyřměsíčních HHTg potkanů a kontrolních potkanů kmene Wistar. Obě porovnávané skupiny byly krmeny 14 dní před koncem pokusu vysokosacharózovou dietou, která potencovala abnormality glukózového a lipidového metabolismu u hypertriglyceridemických HHTg potkanů. Po nočním hladovění byla potkanům orálně aplikována glukóza a efekt jednorázové glukózové zátěže byl sledován za 30 minut po podání. Toto experimentální uspořádání nám umožnilo testovat odpověď organismu na vzestup endogenní inzulinémie, která zobrazuje skutečný metabolický stav. Tímto pokusem jsme se snažili rozšířit poznatky o patogenezi IR HHTg potkanů, identifikovat mechanismus zhoršené utilizace glukózy ve svalové tkáni během počáteční fáze OGTT.

V lačném stavu se aktivita GS mezi kontrolními a HHTg potkany nelišila. Po jednorázové dávce glukózy aktivita enzymu u kontrol výrazně vzrostla, zatímco u HHTg potkanů se nezměnila ve srovnání s lačným stavem. Tento nálezn je v souladu s pozorovanými sníženými hladinami glykogenu v kosterním svalu HHTg potkanů (Cahova et al. 2004). V řadě studií bylo prokázáno snížené inzulinem stimulované vychytávání glukózy u DM2, které bylo asocioáno se sníženou aktivitou GS a syntézou glykogenu (DeFronzo et al. 1992; Beck-Nielsen et al. 1992).

Při studiu možných mechanismů zodpovědných za sníženou utilizaci glukózy v kosterním svalu HHTg potkanů byly analyzovány glukózové přenašeče GLUT4. Jednorázová dávka glukózy nestimulovala translokaci GLUT4 k plazmatické membráně u HHTg potkanů, tento defekt pravděpodobně vysvětluje sníženou utilizaci glukózy ve svalech (Cahova et al. 2004). To může přispívat ke zvýšené glykémii, která byla u HHTg potkanů během OGTT opakovaně zjištěna (Klimeš et al. 1995; Divišová et al. 2002).

Naše nálezy ukazují, že u HHTg potkanů je snížená utilizace glukózy v periferních tkáních provázána sníženou aktivitou GS v kosterním svalu. Jedním z charakteristických rysů IR u HHTg potkanů je metabolická maladaptace při přechodu z hladovění do sytého stavu. Snížená aktivita GS a utilizace glukózy v periferních tkáních ukazují na pravděpodobný defekt v přenosu inzulinového signálu do buněk. Porucha jednoho nebo více kroků v této signální kaskádě, kde jednou z důležitých efektorových molekul je také GS, hraje roli při rozvoji IR.

### 6. 3. Vliv věku na PKC a inzulinovou rezistenci

Již dlouho je známo, že IR je spojená se stárnutím jak u lidí, tak potkanů (Davidson 1979; Lechleitner 2008; Zeyda and Stulning 2009). Podstata není plně objasněna, ale předpokládá se, že tyto poruchy jsou spojeny se zvýšeným podílem tukové tkáně a obezitou spíše než se stárnutím samotným (Coon et al. 1992; Barnard et al. 1995). Dále se na zhoršování IR může podílet nedostatečná sekreční kapacita inzulinu (Ferranini et al. 1996) či dyslipidémie (Howard 1999) nebo defekty v inzulinové signalizační kaskádě (Qu et al. 1999).

Cílem této studie bylo sledovat na HHTg potkanech některé parametry sacharidového a lipidového metabolismu a také intracelulární lokalizaci PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  ve věku 4 a 18 měsíců. Cílem bylo definovat změny, které mohou vést nebo přispívat ke vzniku a prohlubování IR v souvislosti s přibývajícím věkem. Metabolické poruchy spojené s IR a MS byly potencovány vysokosacharózovou dietou podávanou dva týdny před koncem pokusu. HHTg potkani jsou k tomuto nutričnímu podnětu extrémně citliví v porovnání s kontrolními potkany. Jako kontrola byl použit kmen potkanů Wistar, z kterého byli HHTg potkani vyselektováni na základě zvýšených sérových hladin triglyceridů po přívodu vysokosacharózové diety (Vrána a Kazdová 1990).

Relativní hmotnost epididymální tukové tkáně, která je považována za ukazatel viscerální obezity, se s přibývajícím věkem u HHTg potkanů nezměnila. Je známo, že tento parametr vysoce koreluje s procentem tělesného tuku (Eisen and Leatherwood 1981). Vzhledem k tomu, že u HHTg potkanů nestoupal podíl tukové tkáně s věkem, lze tvrdit, že příčinou zhoršování IR s postupujícím věkem nebyla obezita. Tento nálezn odporuje teorii, že zhoršení IR s přibývajícím věkem je dáno kvantitativně větším množstvím tuku v těle dané obezitou. Tato teorie byla formulována na základě studií, ve kterých nebyly nalezeny rozdíly v citlivosti k účinku inzulinu mezi skupinami mladých a starších osob se stejným obsahem „beztukové hmoty“ (Coon et al. 1992), nebo které prokázaly vznik a rozvoj IR v periferních tkáních potkanů indukovaný dietami s vysokým obsahem tuku nebo sacharózy, které zvyšovaly podíl tuku v těle (Barnard et al. 1995). K této teorii přispěly také experimenty, kdy u starších osob po snížení množství tuku v těle dosaženého pravidelným cvičením, došlo ke zmírnění IR (Kahn et al. 1992).

Obezita jistě hraje důležitou úlohu v patogenezi IR, nemusí ale vždy doprovázet MS. Výskyt MS byl pozorován i u pacientů, kteří nebyli obézní. V naší studii na HHTg potkanech jsme zjistili, že přítomnost obezity není nutnou podmínkou vzniku IR. Možným spojovacím článkem obou protichůdných tvrzení (zhoršení IR během stárnutí v důsledku obezity vs. naše

nálezy, že s obezitou nemusí souviset) představují NEMK. Zjistili jsme, že koncentrace NEMK v séru se v průběhu stárnutí u HHTg potkanů zvyšuje. Rozdíl v sérové koncentraci NEMK měřený v sytém stavu po krmení standardní dietou byl mezi kontrolní a HHTg skupinou ve věku 4 měsíců pouze naznačen, ve věku 18 měsíců byly koncentrace NEMK vyšší již o 40 %. Příjem vysokosacharóзовé diety koncentrace NEMK v séru dále zvyšoval, zejména u HHTg potkanů. Zvýšené sérové koncentrace NEMK byly nalezeny i u IR spojené s obezitou (Belfiore and Iannello 1998). V případě obezity se předpokládá, že se uplatňuje kvantitativně větší příspěvek produktů lipolýzy i při nezměněné lipolytické aktivitě v tukové tkáni. U námi studovaného modelu, HHTg potkanů, byla také prokázána zvýrazněná lipolýza v tukové tkáni (Vrána a Kazdová 1993) způsobená pravděpodobně zvýšenými koncentracemi adrenalinu a noradrenalinu (Štolba et al. 1993). Zvýšené sérové koncentrace NEMK mohou být primárním defektem vedoucím ke sníženému využití glukózy ve tkáních a následně k hyperinzulinémii (Waldhäusl and Roden 2000). Ta může být kompenzačním mechanismem IR v periferních tkáních, který zabraňuje zvyšování glukoneogeneze v játrech, a tím i hyperglykémii (Boden 1997). Navíc chronické zvýšení koncentrací NEMK může inhibovat sekreci inzulínu z  $\beta$ -buněk pankreatu (Poitout et al. 2006). Zvýšená koncentrace NEMK spolu se sníženou sekrecí inzulínu může dále snižovat využití glukózy ve tkáních, zvyšovat oxidaci NEMK, v játrech stimulovat glukoneogenezi, vést k hyperglykémii a k dalšímu zhoršení funkce  $\beta$ -buněk pankreatu a přispívat tak k rozvoji DM2 (Reaven 1995). Pro tuto hypotézu svědčí výsledky klinické studie, v níž zvýšené koncentrace NEMK byly rizikovým faktorem pro vznik diabetu (Paolisso et al. 1995). Svědčí pro ní i výsledky naší práce. Vedle zvýšených sérových koncentrací NEMK u HHTg potkanů jsme naměřili i zvýšené koncentrace triglyceridů a to jak u HHTg potkanů krmených standardní dietou, tak po příjmu vysokosacharóзовé diety. Hypertriglyceridémie je u kmene HHTg geneticky fixována a zvyšuje se s věkem. HHTg potkani jsou navíc velmi citliví k přívodu vysokosacharóзовé diety. Příjem této diety po dobu dvou týdnů zvýšil triglyceridémii o 80 % u HHTg potkanů a pouze o 30 až 35 % u kontrolních potkanů Wistar. Vysokosacharóзовá dieta navíc zvyšovala sérové koncentrace triglyceridů nezávisle na věku zvířat.

Dalším zajímavým zjištěním studie bylo snížené inzulínem stimulované využití glukózy u HHTg potkanů oproti kontrolám, zjišťované pomocí inkorporace  $^{14}\text{C}$ -U glukózy do lipidů epididymální tukové tkáně a bránice *in vitro* a OGTT. Poruchy utilizace glukózy byly závažnější u zvířat ve věku 18 měsíců v porovnání s mladšími. Ve věku 18 měsíců se zhoršená glukózová tolerance HHTg kmene ještě prohloubila a částečně se projevila u kontrolních potkanů. V tomto věku byla citlivost periferních tkání k účinku inzulínu u kontrol

jen o málo vyšší než u HHTg potkanů, kteří vykazovali úplnou rezistenci k působení inzulinu. Kontrolní potkani Wistar to dokázali kompenzovat výraznou hyperinzulinémií a zabránit tak přílišnému nárůstu glykémie, kdežto u 18-ti měsíčních HHTg potkanů nebyla zřejmě sekrece inzulinu dostatečná, což se projevilo hyperglykemií.

Snížený přenos inzulinového signálu v buňce představuje potenciální mechanismus zodpovědný za defekty v působení inzulinu charakteristické pro pokročilý věk. Byly studovány vlivy stárnutí na inzulinovou signalizaci na úrovni receptoru pro inzulin a IRS1 v játrech a kosterních svalech potkana, ale výsledky získané těmito experimenty jsou velmi rozdílné a nejednotné (Serrano et al. 2009). Při pokusech *in vitro* se inzulinem stimulovaná autofosforylace inzulinového receptoru v játrech a svalech neměnila během stárnutí (Kono et al. 1990). V jiné studii byla nalezena snížená fosforylace tyrosinů inzulinového receptoru a IRS1 po stimulaci inzulinem *in vivo* v játrech i kosterním svalu starých potkanů (Carvalho et al. 1996; Zhu et al. 2005). V patogenezi IR se může uplatňovat také PKC. Fosforylace zprostředkovaná PKC negativně ovlivňuje řadu komponent inzulinové signalizační kaskády, např. IRS1, Akt1, ale i GS. Aktivace PKC také může zvýšit degradaci receptoru pro inzulin (Qu et al. 1999). V kosterním svalu potkanů s dietně indukovanou IR byla nalezena zvýšená exprese PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  (Donnelly et al. 1994; Schmitz-Peiffer et al. 1997). PKC může také hrát důležitou roli v regulaci lipolýzy (Vikman et al. 1993).

V případě PKC  $\epsilon$  jsme nenašli žádné rozdíly v relativním množství proteinu mezi mladými a starými inzulinorezistentními HHTg a kontrolními potkany ani v cytosolu, ani v membránové frakci kosterního svalu. Tyto nálezy jsou v souladu s výsledky autorů Qu a spol, kteří na rozdíl od dietně indukovaných modelů IR také nenalezli žádné změny v aktivitě PKC a subcelulární distribuci PKC  $\epsilon$  i PKC  $\theta$  v kosterním svalu mezi mladými a starými nediabetickými potkany (Qu et al. 1999). Na rozdíl od výsledků výše uvedené studie jsme u PKC  $\theta$  pozorovali rozdíly, ale až v pokročilém věku. U HHTg potkanů jsme naměřili výrazně vyšší množství PKC  $\theta$  v cytosolu i membránové frakci. IR v pokročilém věku byla doprovázena celkovým zvýšením relativního množství proteinu PKC  $\theta$  v kosterním svalu. Jednotlivé izoformy PKC se mohou lišit svou expresí ve svalech, exprese se mění během diferenciací a izoformy mohou mít i odlišné funkce. PKC  $\theta$  je hlavní izoformou PKC exprimovanou v kosterním svalu a většina studií poukazuje na souvislost IR s PKC  $\theta$  (Griffin et al. 1999; Bell et al. 2000; Osada et al. 1992). Zvýšené množství PKC  $\theta$  u starých HHTg potkanů může souviset se zvýšenými koncentracemi triglyceridů v kosterním svalu, které jsou ukazatelem přítomnosti dalších intermediátů lipidového metabolismu, jako jsou např. DAG,

LCACoA, které jsou považovány za aktivátory PKC (Tucker and Turcotte 2003; Kelley et al. 1999). Akumulace triglyceridů v kosterním svalu HHTg potkanů byla nalezena v předchozí studii (Divišová et al. 2002).

Uvedené výsledky ukazují, že zvyšování IR a zhoršování některých parametrů sacharidového a lipidového metabolismu s přibývajícím věkem je u HHTg potkanů doprovázeno nárůstem relativního množství PKC  $\theta$  jak v cytosolu, tak membránové frakci kosterního svalu. Tyto nálezy svědčí pro možnou účast PKC  $\theta$  v poruchách IR kosterních svalů.

#### **6. 4. Vliv zvýšené exprese rezistinu v tukové tkáni na PKC a inzulinovou rezistenci**

Rezistin je protein produkovaný tukovou tkání, o kterém se předpokládá, že by mohl představovat důležité pojítko mezi obezitou, IR a DM2 (Stepann et al. 2001). Tuto hypotézu dokládají pozorování, při kterých byly u zvířecích modelů obezity a DM2 nalezeny zvýšené koncentrace rezistinu v séru (Stepann et al. 2001) a akutní *in vivo* podání vysokých dávek rekombinantního rezistinu vedlo k jaterní IR a zhoršené glukózové toleranci (Stepann et al. 2001; Rajala et al. 2003). I když v řadě experimentů, ve kterých byl podáván rezistin, bylo dosaženo vyšších hodnot než odpovídá fyziologickým koncentracím rezistinu v cirkulaci, pozorované metabolické účinky rezistinu byly poměrně mírné. Např. u transgenních myší byl téměř 200násobný nárůst koncentrace rezistinu v cirkulaci doprovázen pouze velmi slabým zhoršením glukózové tolerance a žádné změny nebyly zaznamenány v sérových koncentracích glukózy, inzulinu a lipidů (Rangwala et al. 2004). I když hyperrezistinémie může ovlivňovat metabolismus lipidů a glukózy pouze mírně, je možné, že autokrinní nebo parakrinní účinky rezistinu v tukové tkáni mohou dále přispívat k metabolickým abnormalitám doprovázející obezitu a zvýšené riziko diabetu.

V této práci byli studováni jeden rok staří transgenní spontánně hypertenzní potkani se zvýšenou expresí rezistinu. Tento kmen exprimuje myší rezistin v tukové tkáni, který není detekovatelný v cirkulaci, takže poskytuje unikátní příležitost ke studiu autokrinních účinků rezistinu v tukové tkáni (Pravenec et al. 2003). Kontrolní skupinu tvořili geneticky identičtí SHR potkani odpovídajícího věku s absencí transgenu. Abnormality lipidového a sacharidového metabolismu byly potencovány vysokofruktózovou dietou. Cílem studie bylo zjistit, zda zvýšená transgenní exprese rezistinu v tukové tkáni SHR potkanů ovlivní glukózovou toleranci, rezistenci periferních tkání k účinku inzulinu a relativní množství PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v cytosolu a membránové frakci kosterního svalu.

SHR potkani s chronickou transgenní expresí rezistinu v tukové tkáni měli mírně vyšší tělesnou hmotnost, pravděpodobně danou vyšší hmotností epididymálního tukového tělesa. Dále vykazovali vyšší koncentrace inzulínu v séru, výrazně zhoršenou glukózovou toleranci sledovanou OGTT i sérové koncentrace triglyceridů před podáváním vysokofruktóзовé diety, tak v sytém i lačném stavu po dietě. Tyto nálezy jsou v souladu s výsledky jiných studií na transgenních modelech s expresí rezistinu. Např. u potkanů kmene Wistar s chronickou nadměrnou expresí rezistinu byla nalezena glukózová intolerance během glukózového tolerančního testu, hyperinzulinémie i zvýšené sérové hladiny triglyceridů (Satoh et al. 2004). Zvýšená inzulinémie a zhoršená glukózová tolerance byla nalezena i u dalšího nového transgenního myšího modelu se specifickou expresí lidského rezistinu (Qatani et al. 2009). Transgenní exprese rezistinu u SHR potkanů neovlivnila inzulinovou senzitivitu kosterních svalů, nebyla doprovázena akumulací triglyceridů v kosterních svalech a v játrech ani zvýšenými hladinami NEMK v séru. Většina studií naopak našla zvýšené koncentrace NEMK v séru (Pravenec et al. 2003; Satoh et al. 2004; Qatani et al. 2009). Příčina těchto kontroverzních nálezů je nejasná.

Chronická transgenní exprese rezistinu u našeho experimentálního modelu byla asociována s téměř úplnou rezistencí tukové tkáně k účinku inzulínu měřenou *in vitro*. Námí použitý transgenní model exprimuje myší rezistin v tukové tkáni, kde rezistin pravděpodobně přímo působí a zdá se, že může negativně ovlivňovat inzulinovou signalizaci. Řada studií *in vivo* prokázala, že rezistin negativně ovlivňuje přenos signálu inzulínu v játrech, ale i v tukové tkáni a kosterním svalu (Steppan et al. 2005; Qi et al. 2006). U našeho transgenního modelu nebylo nalezeno žádné detekovatelné množství transgenního rezistinu v cirkulaci a sérové koncentrace endogenního rezistinu byly stejné jako hladiny rezistinu u kontrol (Pravenec et al. 2003). Tyto nálezy naznačují, že u jeden rok starých transgenních SHR potkanů mohou autokrinní účinky rezistinu podporovat poruchy v metabolismu glukózy tím, že zhoršují inzulinem stimulovanou inkorporaci glukózy do lipidů tukové tkáně. Ačkoli je vychytávání glukózy v periferních tkáních zprostředkováno především kosterními svaly, tuková tkáň může mít také důležitou úlohu v udržování glukózové homeostázy (Ducluzeau et al. 2002; Shafrir and Raz 2003).

Mechanismus, kterým rezistin nepříznivě ovlivňuje působení inzulínu v tukové tkáni není objasněn. Byly zkoumány interference rezistinu s komponentami inzulinové signální kaskády, např. hladiny proteinů IRS1 a IRS2 a úroveň jejich fosforylace v tukové tkáni, kosterním svalu i játrech. Zvýšené plazmatické koncentrace rezistinu u potkanů Wistar

(detekované 7 dní po intravenózní injekci adenoviru exprimující myší rezistin) byly spojené se zhoršenou inzulinovou signalizací, na které se podílelo snížené množství a aktivace IRS1 a IRS2. Autoři této studie se domnívají, že chronicky zvýšené hladiny rezistinu jsou doprovázené sníženou signalizací v tukové tkáni a kosterním svalu a jsou zprostředkované sníženou aktivitou a množstvím zejména IRS1 (Satoh et al. 2004). V jiné studii bylo prokázáno, že rezistin ve 3T3-L1 adipocytech zeslabuje řadu účinků inzulinu, včetně fosforylace inzulinového receptoru a IRS1, snižuje aktivaci PI3K a PKB. Rezistin také výrazně indukuje expresi SOCS3, které jsou známy svými silnými inhibičními účinky na inzulinovou signalizační dráhu (Steppan et al. 2005).

V naší studii jsme analyzovali subcelulární distribuci a relativní množství PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  v kosterním svalu. Chronická transgenní exprese rezistinu neovlivnila relativní množství proteinu PKC  $\epsilon$  ve studovaných buněčných frakcích, ale u PKC  $\theta$  jsme zaznamenali výrazný nárůst relativního množství proteinu v cytosolu i membránové frakci. Ve shodě s námi byla nalezena zvýšená aktivita PKC  $\theta$  v kosterním svalu u myší s transgenní expresí lidského rezistinu krměných vysokotukovou dietou. Ve svalu těchto zvířat bylo zvýšené množství triglyceridů a DAG. DAG aktivuje PKC  $\theta$ , která negativně ovlivňuje přenos signálu inzulinu ve svalech (Qatani et al. 2009). Důvod námi naměřeného výrazného nárůstu PKC  $\theta$  není jasný, neboť jsme na rozdíl od výše citované studie, u SHR transgenních potkanů nezaznamenali ektopické ukládání triglyceridů v kosterním svalu, ani zvýšené hladiny NEMK v cirkulaci. NEMK v cirkulaci mohou totiž přímo podněcovat tvorbu DAG ve svalech a aktivovat PKC  $\theta$  (Qatani and Lazar 2007).

Výsledky naší studie podporují hypotézu o úloze rezistinu v patogenezi IR, poukazují na jeho autokrinní účinky v tukové tkáni, které mohou být spolu s přibývajícím věkem predispozicí k diabetu. Zda a popřípadě jakým mechanismem se PKC může uplatňovat při zhoršování metabolických abnormalit doprovázených zvýšenou expresí rezistinu v tukové tkáni, není úplně jasné.

## **6. 5. Vliv dlouhodobého podávání pioglitazonu na PKC a inzulinovou rezistenci**

Tyto pokusy byly zaměřené na sledování metabolických účinků dlouhodobého podávání pioglitazonu spontánně hypertenzním potkanům (SHR-4). Pioglitazon patří do skupiny thiazolidindionů (TZD), léků používaných k léčbě DM2. TZD zvyšují citlivost tkání k účinku inzulinu a příznivě ovlivňují i další poruchy spojené s IR. Jsou to agonisté nukleárních receptorů PPAR $\gamma$ , které regulují transkripci genů citlivých k inzulinu a zapojených v regulaci



metabolismu glukózy a lipidů v tukové a svalové tkáni. Mechanismus jejich působení není dosud zcela objasněn (Zinn et al. 2008). V kosterních svalech je IR často asociována s akumulací intramyocelulárních lipidů, např. silná negativní korelace mezi lipidy ve svalech a inzulinovou senzitivitou byla nalezena u obézních nediabetiků a diabetiků 2. typu (Forouhi et al. 1999; Kelley et al. 2002) a u zvířecích modelů obezity a DM2 (Divišová et al. 2002; Qi et al. 2005). V řadě studií bylo prokázáno, že TZD snižují akumulaci lipidů ve svalech (Hockings et al. 2003; Jucker et al. 2003; Kim et al. 2003), je tedy možné, že redukce intramyocelulárních lipidů může představovat molekulární mechanismus, kterým TZD zvyšují citlivost kosterních svalů k účinku inzulinu. Akumulace triglyceridů ve svalech je spojena se zvýšeným obsahem dalších lipidových intermediátů, např. DAG nebo ceramidů, které mohou interferovat s inzulinovou signalizací. DAG aktivují izoformy PKC, které mohou inhibovat řadu kroků v signalizační kaskádě inzulinu, ale i enzymy zahrnuté v metabolismu glukózy, jako je např. GS (Shmitz-Peiffer et al. 2008). Zejména nové izoformy PKC jsou zahrnuty v patogenezi IR a jejich modulace může být důležitá z hlediska účinků inzulinu. Zvláště PKC  $\theta$  je hojně exprimována v kosterním svalu a je důležitým kandidátem regulace glukózové homeostázy. V naší studii jsme testovali hypotézu, zda TZD zlepšují IR ve svalech tím, že potlačují intramyocelulární akumulaci lipidů a aktivaci nPKC.

Pioglitazon byl podáván SHR-4 potkanům. Jedná se o kongenní kmen SHR potkanů s genem FAT/Cd36, který byl pro naši studii vybrán místo normálního kmene SHR, neboť normální kmen SHR potkanů má ve svém genotypu deleční variantu genu FAT/Cd36. FAT/Cd36 (transportér mastných kyselin) je klíčový gen uplatňující se v příznivých účincích pioglitazonu na senzitivitu tkání k působení inzulinu (Qi et al. 2002). SHR-4 potkani byli ve věku čtyř měsíců krmeni vysokosacharózovou dietou po dobu čtyř měsíců s pioglitazonem (300 mg/kg diety), kontrolní skupina SHR-4 potkanů byla krmena pouze vysokosacharózovou dietou po stejně dlouhou dobu bez pioglitazonu. Vysokosacharózová dieta vyvolává u SHR-4 potkanů metabolické poruchy doprovázené hypertriglyceridemií, hyperinzulinémií a poruchou glukózové tolerance, činí z tohoto kmene potkanů vhodný model pro studium MS.

Dlouhodobé podávání pioglitazonu v naší studii nezvýšilo tělesnou hmotnost potkanů, pouze mírně zvýšilo hmotnost epididymální tukové tkáně, která je ukazatelem viscerální obezity. Přírůstek tělesné hmotnosti je nejběžnějším negativním vedlejším efektem léčby TZD (Grossman et al. 2009), který souvisí s vlivem léku na remodelaci tukové tkáně a akumulaci triglyceridů. Léčba pioglitazonem snížila sérové koncentrace triglyceridů a NEMK, což je zřejmě metabolický následek aktivace receptorů PPAR $\gamma$  v tukové tkáni. Aktivace těchto

receptorů TZD snižuje množství uvolňovaných NEMK a zlepšuje inzulinem stimulovaný transport glukózy. Příčiny snížených hladin NEMK po léčbě TZD jsou multifaktoriální. Je to dáno jednak zvýšenou reesterifikací MK díky zvýšené expresi glycerolkinázy v adipocytech (Guan et al. 2002), ale i celkově potlačenou lipolýzou. Antilipolytické působení TZD je zprostředkováno redukcí hladin a působení TNF $\alpha$ , protože TZD zeslabují TNF $\alpha$  stimulovanou lipolýzu *in vitro* a snižují expresi genu pro TNF $\alpha$  (Souza et al. 1998; Miles et al. 1997). Podávání pioglitazonu SHR-4 potkanům zvýšilo citlivost tukové tkáně k účinku inzulinu, které bylo doprovázeno zvýšeným obsahem proteinů v tukové tkáni. Tento nálezní svědčí o remodelaci tukové tkáně, při které dochází ke zmnožení malých, metabolicky aktivních adipocytů, které jsou citlivější k účinku inzulinu (Smith 2003). Naše nálezy jsou v souladu s hypotézou, že TZD v tukové tkáni ovlivňují diferenciaci, velikost a množství adipocytů, ale i inzulinovou signalizaci, metabolismus lipidů a glukózy (Smith 2003).

Mezi další příznivé účinky dlouhodobého podávání pioglitazonu patří zabránění rozvoje hyperinzulinémie, která se v průběhu pokusu zvyšovala u kontrolní skupiny potkanů. Hladiny glykémie se během pokusu u experimentálních skupin nelišily, může to být dáno tím, že koncentrace glukózy v séru je regulována řadou dalších mechanismů zahrnujících řadu hormonů a ne pouze inzulin. Snížené sérové hladiny inzulinu, triglyceridů a NEMK vypovídají o zlepšení celkové IR a dyslipidémie potkanů krměných vysokosacharózovou dietou.

Léčba SHR-4 potkanů krměných vysokosacharózovou dietou pioglitazonem významně zvýšila inzulinovou senzitivitu kosterního svalu (musculus gastrocnemius), přesto, že koncentrace triglyceridů ve svalu byly výrazně zvýšené. Zlepšení IR v kosterních svalech bylo navíc spojeno s aktivací PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  dané zvýšeným poměrem membránově vázané PKC  $\epsilon$  (PKC  $\theta$ ) ku celkovému množství PKC  $\epsilon$  (PKC  $\theta$ ). Tyto nálezy nejsou v souladu se studii, ve kterých byla nalezena spojitost mezi IR vyvolanou vysokotukovou dietou a zvýšenými aktivitami nových izoforem PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$ . Autoři předpokládají, že aktivace nPKC může inhibovat inzulinovou signalizaci a indukovat IR (Shmitz-Peiffer et al. 1997; Yu et al. 2002). Na druhou stranu, experimenty provedené na „PKC  $\theta$  knockout myších“ ukázaly, že absence funkční PKC  $\theta$  predisponuje tyto myši při konzumaci vysokotukové diety k obezitě a IR (Gao et al. 2007). Také transgenní myši s dominantní negativní PKC  $\theta$  v kosterním svalu byly obézní a inzulinorezistentní (Serra et al. 2003). I „PKC  $\epsilon$  knockout myši“ vykazovaly zvýšené sérové hladiny inzulinu během intraperitoneálního glukózového tolerančního testu ukazující na IR v porovnání s kontrolami (Shmitz-Peiffer et al. 2007). Tyto

nálezky jsou v souladu s výsledky naší práce, kde zvýšená inzulinová senzitivita kosterních svalů SHR-4 potkanů léčených pioglitazonem byla doprovázena aktivací PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  a vypovídá o tom, že nPKC jsou přímo zahrnuty v regulaci citlivosti kosterních svalů k účinku inzulinu. Schmitz-Peiffer a spol. (1997) publikovali výsledky studie, kde čtyřdenní léčba Wistar potkanů krmených vysokotukovou dietou TZD preparátem BRL-49653 byla asociována s významným snížením poměru membránově vázané PKC  $\theta$  ku cytosolické PKC  $\theta$ , což naznačuje sníženou aktivaci PKC  $\theta$  u potkanů léčených BRL-49653. Toto zjištění není v souladu s naším pozorováním, kdy léčba pioglitazonem vedla k aktivaci PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$ . Jiní autoři nenašli žádné významné změny v celkové nebo membránově vázané PKC  $\theta$  v kosterním svalu (musculus soleus) izolovaném od obézních Zucker potkanů krmených standardní laboratorní dietou a léčených čtyři týdny rosiglitazonem v porovnání se štíhlými i obézními kontrolami (Lessard et al. 2004). Tyto odlišné výsledky mohou být vysvětleny rozdílnými použitými zvířecími modely, různými dietami, studiem odlišných typů svalů nebo různými TZD použitými k léčbě.

Léčba TZD obvykle vede k významnému snížení hladin lipidů v kosterním svalu (Forouhi et al. 1999; Kelley et al. 2002; Divišová et al. 2002; Qi et al. 2005). Vliv TZD na redukci hladin lipidů v kosterních svalech je považován za možný mechanismus, kterým TZD zlepšují inzulinovou senzitivitu. Tento efekt může být zprostředkován sníženými aktivitami nPKC. V naší práci jsme překvapivě zjistili, že dlouhodobé podávání pioglitazonu bylo spojeno se zvýšeným obsahem triglyceridů v kosterním svalu, aktivací PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$  a zlepšenou inzulinem stimulovanou glykogenezi. Tyto nálezy jsou podobné výsledkům Lessarda a spol. (2004), kteří u obézních Zucker potkanů léčených rosiglitazonem našli zlepšenou glukózovou toleranci navzdory skutečnosti, že tito potkani měli v kosterním svalu (musculus soleus) významně zvýšené hladiny triglyceridů v porovnání s kontrolami se zhoršenou glukózovou tolerancí. Možný důvod vysvětlující rozdílný vliv TZD na akumulaci lipidů v kosterních svalech je nejasný. Vliv TZD na akumulaci lipidů může být závislý na typu převládajících svalových vláken v kosterním svalu. Např. většina prací popisujících snížený obsah lipidů po léčbě TZD analyzovala svaly s vysokým obsahem svalových vláken typu II (glykolytická vlákna), zatímco Lessard a spol. (2004) analyzovali svaly musculus soleus, kde převažují svalová vlákna typu I (oxidativní vlákna). V naší práci jsme použili sval gastrocnemius, který obsahuje oba typy svalových vláken, což naznačuje, že rozdílné efekty TZD na akumulaci lipidů v kosterních svalech nemusí záviset na typu svalu. Je také možné, že zvýšený obsah lipidů v kosterních svalech může způsobovat snížená aktivita hormon

senzitivní lipázy (HSL), což je DAG lipáza, regulační enzym pro degradaci intramuskulárních triglyceridů (Heammerle et al. 2002). Snížená aktivita HSL může být spojována se zvýšenými hladinami DAG, které mohou ovlivnit aktivaci nPKC. Léčba rosiglitazonem byla asociována se 65 % nárůstem hladin DAG (Lessard et al. 2004). Obě námi studované izoformy PKC jsou aktivovány DAG. Další možné vysvětlení zvýšeného obsahu triglyceridů ve svalech po léčbě TZD bere v úvahu to, že TZD mění transport a oxidaci MK, např. rosiglitazon zvyšuje sarkolemální transport MK (Lessard et al. 2004).

Sérové koncentrace adiponektinu byly u SHR-4 potkanů s dlouhodobě podávaným pioglitazonem významně vyšší v porovnání s kontrolami. Jedním z mechanismů příznivého působení TZD na IR je stimulace produkce adiponektinu. Adiponektin je jedním z adipocytokinů, který se může uplatňovat v mechanismu zvyšujícím citlivost periferních tkání k účinku inzulínu (Smith 2003). Metabolické účinky adiponektinu jsou zprostředkovány AMP kinázou, která ovlivňuje celou řadu biochemických reakcí, např. zvyšuje transport glukózy ve svalech a tukové tkáni, zvyšuje oxidaci MK ve svalech a játrech, inhibuje lipogenezi a syntézu triacylglycerolů (Coletta et al. 2009).

Výsledky naší studie ukazují, že dlouhodobá léčba pioglitazonem zlepšuje IR v kosterních svalech a řadu dalších parametrů lipidového a sacharidového metabolismu. Zvýšená akumulace triglyceridů ve svalech po léčbě pioglitazonem byla spojena s aktivací PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$ . Příznivé účinky TZD jsou pravděpodobně důsledkem remodelace tukové tkáně a zvýšené sekrece adiponektinu.

## 7. ZÁVĚR

Cílem provedených studií bylo získání nových poznatků o uplatnění PKC v patogenezi IR a možnostech jejího ovlivnění nutriční a farmakologickou intervencí. Hlavní poznatky lze shrnout:

### ROZŠÍŘENÍ POZNATKŮ O PATOGENEZI IR A ÚLOHA PKC V MECHANIZMU IR

- U HHTg potkanů byly zvýšené sérové hladiny triglyceridů a NEMK spojeny s ektopickým ukládáním triglyceridů ve tkáních a se sníženou citlivostí periferních tkání k účinku inzulínu. Zhoršená utilizace glukózy v periferních tkáních byla provázena sníženou aktivitou GS v kosterním svalu. Snížená aktivita GS a utilizace glukózy v periferních tkáních ukazují na možný defekt v přenosu inzulínového signálu do buněk. V souladu s tím jsou naše nálezy, které ukazují, že rezistence kosterních svalů k účinku inzulínu byla asociována se zvýšenou aktivací a translokací PKC  $\theta$ .
- Nutričně indukovaná obezita HHTg potkanů v řadě případů tyto metabolické abnormality spojené s IR ještě dále prohloubila. Zjistili jsme, že zejména PKC  $\theta$ , by mohla přispívat k metabolickým abnormalitám spojeným s IR a obezitou.
- Se zvyšujícím se věkem se u HHTg potkanů dále zhoršovala IR a s ní související poruchy lipidového a sacharidového metabolismu, aniž by se zároveň zvyšoval podíl tukové tkáně.
- Zvyšování IR s přibývajícím věkem bylo u HHTg potkanů doprovázeno celkovým nárůstem relativního množství PKC  $\theta$ . Tyto nálezy svědčí pro možnou účast PKC  $\theta$  v poruchách IR kosterních svalů.

### POTENCIÁLNÍ ÚLOHA REZISTINU V MECHANIZMU PATOGENEZE IR

- U SHR potkanů byla chronická transgenní exprese rezistinu v tukové tkáni asociována s poruchami lipidového a sacharidového metabolismu, rezistencí tukové tkáně k účinku inzulínu a výrazným nárůstem relativního množství PKC  $\theta$  v kosterním svalu.
- Výsledky podporují hypotézu o úloze rezistinu v mechanismu IR a naznačují jeho autokrinní účinky v tukové tkáni. Zda se PKC může uplatňovat při zhoršování

metabolických abnormalit doprovázených zvýšenou expresí rezistinu v tukové tkáni, není úplně jasné.

#### VLIV PIOGLITAZONU NA PKC a IR

- Dlouhodobé podávání pioglitazonu příznivě ovlivnilo abnormality asociované s IR. Snížilo sérové koncentrace triglyceridů a NEMK, zvýšilo senzitivitu tukové a svalové tkáně k účinku inzulínu, sérové hladiny adiponektinu a zabránilo rozvoji hyperinzulinémie. Naproti tomu pioglitazon zvýšil akumulaci triglyceridů ve svalech a aktivoval PKC  $\epsilon$  a PKC  $\theta$ .
- Příznivé účinky TZD jsou pravděpodobně důsledkem remodelace tukové tkáně a zvýšené sekrece adiponektinu.

## 8. REFERENCE

- Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Křen V, Pravenec M, Ibrahimi A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J: Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nature Genet* 21, 76-83, 1999.
- Bailey CJ, Turner RC: Metformin. *N Engl J Med* 334, 574-579, 1996.
- Bak J, Moller N, Schmitz O, Saaek A, Pedersen O: In vivo insulin action and muscle glycogen synthase activity in type II (noninsulin dependent) diabetes mellitus: effect of diet treatment. *Diabetologia* 35, 777-784, 1992.
- Barnard R, Youngren J, Martin D: Diet, not aging, causes skeletal muscle insulin resistance. *Gerontology* 41, 205-211, 1995.
- Bartnik M, Norhammar A, Ryden L: Hyperglycaemia and cardiovascular disease. *J Int Med* 262, 145-156, 2007.
- Bartoš V, Pelikánová T a kolektiv: Praktická diabetologie, Maxdorf Jessenius, Praha, 2000.
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B: Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* 17, 4-12, 2006.
- Battainy F, Mochly-Rosen D: Happy birthday protein kinase C: Past and future of a superfamily. *Pharmacological Research* 55, 461-466, 2007.
- Baumgartner-Parzer SM and Waldhausl WK: The endothelium as a metabolic and endocrine organ: its relation with insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 (Suppl. 2), S166-S179, 2001.
- Bazzi MD, Nelsestuen GL: Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid-dependent process. *Biochemistry* 29(33), 7624-7630, 1990.
- Beck-Nielsen H, Pederson O, Lindskov HO: Normalization of the insulin sensitivity and the cellular insulin binding during treatment of obese diabetics for one year. *Acta Endocrinol (Copenh)* 90, 103-112, 1979.
- Beck-Nielsen H, Vaag A, Dampso P, Handberg A, Nielsen OH, Henriksen JE, Thye-Rønn P.: Insulin resistance in skeletal muscles in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 15, 418-429, 1992.
- Belfiore F, Iannello S: Insulin resistance in obesity: metabolic mechanisms and measurement methods. *Mol Genet Metab* 65, 121-128, 1998.

Bell KS, Schmitz-Peiffer C, Lin-Fraser M, Biden TJ, Cooney GJ, Kraegen EW: Acute reversal of lipid-induced muscle insulin resistance is associated with rapid alteration of PKC $\theta$  localization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, 1196-1201, 2000.

Bernard C, Merval R, Esposito B, Tedqui A: Resistance to endotoxic shock in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31, 1350-56, 1998.

Berson SA, Yalow RS: Insulin „antagonists“ and insulin resistance. In: Diabetes Mellitus: Theory and practise. M ELLENBERG and H RIFKIN (eds), McGraw-Hill, New York, 338-423, 1970.

Bevan P: Insulin signalling. *J Cel Sci* 114, 1429-1430, 2001.

Bhattacharya S, Dey D, Roy SS: Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci* 32(2), 405-413, 2007.

Blackmoore PF, Strickland WG, Exton JH: Phosphorylation of glycogen synthase by protein kinase C. *Biochem J* 237, 235-242, 1986.

Blaustein MP: Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: a reassessment and hypothesis. *Am J Physiol* 232, 165-173, 1977.

Boden G, Chen X, Ruiz J, White JW, Rossetti L: Mechanisms of fatty acid–induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 93, 2438-2446, 1994.

Boden G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46, 3-10, 1997.

Boden G, Shulman GI: Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 (Suppl. 3), 14-23, 2002.

Boden G, Laakso M: Lipids and glucose in type 2 diabetes: What is the cause and effect? *Diabetes Care* 27, 2253-2259, 2004.

Boden G: Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Current Diabetes Reports* 6, 177-181, 2006.

Bossenmaier B, Mosthaf L, Mishak H, Ullrich A, Haring HU: Protein kinase C isoforms beta 1 a beta 2 inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Diabetologia* 40, 863-866, 1997.

Bossenmaier B, Strack V, Stoyanov B, Krützfeldt J, Beck A, Lehmann R, Kellerer M, Klein H, Ullrich A, Lammers R, Häring HU: Serine residues 1177/78/82 of the insulin receptor are required for substrate phosphorylation but not autophosphorylation. *Diabetes* 49, 889-895, 2000.

Braiman L, Sheffi-Friedman L, Bak A, Tennenbaum T, Sampson SR: Tyrosine phosphorylation of specific protein kinase C isoenzyme participates in insulin stimulation of glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle. *Diabetes* 48, 1922-1929, 1999.



- Braiman L, Alt A, Kuroki T, Ohba M, Bak A, Tennenbaum T, Sampson SR: Insulin induces specific interaction between insulin receptor and PKC in primary cultured skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 15, 565-574, 2001.
- Broughton DL, Taylor R: Review: deterioration of glucose tolerance with age: the role of insulin resistance. *Age Ageing* 20(3), 221-225, 1991.
- Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-20, 2001.
- Brunetti A, Manfioletti G, Chiefari E, Goldfine ID, Foti D: Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high-mobility group protein HMGI(Y). *FASEB J* 15, 492-500, 2001.
- Cahova M, Vavrinkova H, Meschisvilli E, Markova I, Kazdova L: The impaired response of non-obese hereditary hypertriglyceridemic rats to glucose load is associated with low glucose storage in energy reserves. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112, 549-555, 2004.
- Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ: Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 137 (1), 151-159, 1996.
- Ceriello A: Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49, 27-29, 2000.
- Ceriello A: Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* 31 (Suppl. 2), S181-S184, 2008.
- Clausen T: Regulation of active Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> transport in skeletal muscle. *Physiol Rev* 66, 542-580, 1986.
- Cohen AM, Yanko L, Rosenmann E: Interrelation of genetics and nutrition in the production of diabetes in animals, v knize Lessons from Animal Diabetes, (Shafir E, Renol AE, eds.), Smith-Gordon, London, 73-80, 1984.
- Coleman DL: Diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetes* 31 (Suppl1), 1-6, 1982.
- Coletta DK, Sriwijitkamol A, Wajcberg E, Tantiwong P, Li M, Prentki M, Madijaru M, Jenkinson CP, Cersosimo E, Musi N, DeFronzo RA: Pioglitazone stimulates AMP-activated protein kinase signalling and increases the expression of genes involved in adiponectin signalling, mitochondrial function and fat oxidation in human skeletal muscle in vivo: a randomised trial. *Diabetologia* 52, 723-732, 2009.
- Coon P, Rogus E, Drinkwater D, Muller DC, Goldberg AP: Role of body fat distribution in the decline in insulin sensitivity and glucose tolerance with age. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 1125-1132, 1992.
- Cooper DR, Watson JE, Dao ML: Decreased expression of protein kinase-C  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\epsilon$  in soleus muscle of Zucker obese (fa/fa) rats. *Endocrinology* 133, 2241-2247, 1993.

Cooper DR, Watson JE, Patel N, Illingworth P, Acevedo-Duncan M, Goodnight J, Chalfant CE, Mishak H.: Ectopic expression of protein kinase C $\beta$ II, -delta, and -epsilon, but not -betaI or -zeta, provide for insulin stimulation of glucose uptake in NIH-3T3 cells. *Arch Biochem Biophys* 372, 69-79, 1999.

Davidson MB: The effect of aging on carbohydrate metabolism: A review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly. *Metabolism* 28, 688-705, 1979.

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* 30, 1000-1007, 1981.

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E: Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15, 318-368, 1992.

DeFronzo RA: Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88, 787-835, 2004.

Després JP: Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 38, 52-63, 2006.

Després JP, Lemieux I: Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881-887, 2006.

Divišová J: Patofyziologické mechanismy inzulínové rezistence a možnosti nutriční a farmakologické intervence u experimentálního modelu metabolického syndromu. Disertační práce, Metabolické pracoviště IKEM, Praha, 7, 2001.

Divišová J, Kazdová L, Hubová M, Meschisvili E: Relationship between insulin resistance and muscle triglyceride content in nonobese and obese experimental models of insulin resistance syndrome. *Ann NY Acad Sci* 967, 440-445, 2002.

Donnelly R, Reed MJ, Azhar S, Reaven GM: Expression of the major isoenzyme of protein kinase C in skeletal muscle, PKC- $\theta$ , varies with muscle type and in response to fructose-induced insulin resistance. *Endocrinology* 135, 2369-2374, 1994.

Donnelly R, Chang H, Azhar S, Reaven GM: Tissue-dependent activation of protein kinase C in fructose-induced insulin resistance. *Endocrine* 3, 129-133, 1995.

Donnelly R, Qu X: Mechanisms of insulin resistance and new pharmacological approaches to metabolism and diabetic complications. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25, 79-87, 1998.

Ducluzeau PH, Fletcher LM, Vidal H, Laville M, Tavaré JM: Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Diabet Metab* 28, 85-92, 2002.

Dyck DJ, Heigenhauser GJF, Bruce CR: The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol* 186, 5-16, 2006.

- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ: The metabolic syndrome. *Lancet* 365, 1415-1428, 2005.
- Eisen EJ, Leatherwood JM: Predicting percent fat in mice. *Growth* 45, 100-107, 1981.
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E: SOCS-3 inhibits insulin signaling and is -up regulated in response to tumor necrosis factor- $\alpha$  in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 276, 47944-47949, 2001.
- Fábry P: Některé modifikace laboratorních diet s různým podílem hlavních živin. *Čs Fyziol* 10, 164-166, 1961.
- Ferranini E, Vichi S, Beck-Nielsen H, Laakso M, Paolisso G, Smith U: Insulin action and age. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetes* 45 (7), 947-953, 1996.
- Feskens EJ, Virtanen SM, Rasanen L, Tuomilehto J, Stengard J, Pekkanen J, Nissinen A, Kromhout D: Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. A 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes Care* 18, 1104-1112, 1995.
- Folch J, Less M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226 (1), 497-509, 1957.
- Ford ES: Prevalence of metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* 28, 2745-2749, 2005.
- Formisano P, Oriente F, Miele C, Caruso M, Auricchio G, Vigliotta G, Condorelli G, Beguinot F: In NIH-3T3 fibroblasts, insulin receptor interaction with specific protein kinase C isoforms controls receptor intracellular rating. *J Biol Chem* 273, 13197-13202, 1998.
- Formisano P, Oriente F, Fiory F, Caruso M, Miele C, Maitan A, Andreozzi F, Vigliotta G, Condorelli G, Beguinot F: Insulin-activated PKC $\beta$  bypasses Ras and stimulates MAP kinase activity and cell proliferation in muscle cells. *Mol Cell Biol* 20, 6323-6333, 2000.
- Formisano P, Beguinot F: The role of protein kinase C isoforms in insulin action. *J Endocrinol Invest* 24, 460-467, 2001.
- Forouhi NG, Jenkinson G, Thomasel EL, Mullick S, Mierisova S, Bhonsle U, McKeigue PM, Bell JD: Relation of triglyceride stores in skeletal muscle cells to central obesity and insulin sensitivity in European and South Asian men. *Diabetologia* 42, 932-935, 1999.
- Freidenberg G, Reichart D, Olefsky J, Henry R: Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of weight loss. *J Clin Invest* 82, 1398-1406, 1988.
- Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, Jarrett RJ, Keen H: Coronary heart disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study. *Lancet* 1, 1373-1376, 1980.
- Furukawa LN, Kushiro T, Asagami T, Takahashi A, Kanmatsuse K, Ishikawa K: Variations in insulin sensitivity in spontaneously hypertensive rats from different sources. *Metabolism* 47, 493-496, 1998.

- Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J: Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18, 2024-2034, 2004.
- Gao Z, Wang Z, Zhang X, Butler AA, Zuberi A, Gawronska-Kozak B, Lefevre M, York D, Ravussin E, Berthoud HR, et al: Inactivation of PKC- $\theta$  leads to increased susceptibility to obesity and dietary insulin resistance in mice. *Am J Physiol* 292, E84-E91, 2007.
- Glyon AL: The search for type 2 diabetes genes. *Ageing Res Rev* 2, 111-127, 2003.
- Golda V, Hilgertová J: Development of lipid and glycid abnormalities in genetically hypertensive obese Koletsky rats and in their lean siblings. *Acta Medica (Hradec Králové)* 41, 163-166, 1998.
- Goto Y, Suzuki KI, Sasaki M, Ono T, Abe S: GK rat a model of nonobese, non-insulin-dependent diabetes. Selective breeding over 35 generations, v knize Lessons from Animal Diabetes, (Shafir E, Renol AE eds.), Smith-Gordon, London, 301-303, 1988.
- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI: Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48, 1270-1274, 1999.
- Groop L: Genetics of the metabolic syndrome. *Brit J Nutr* 83 (Suppl. 1), S39-S48, 2000.
- Groop L, Orho M: New insights into impaired muscle glycogen synthesis. *PLoS Med* 5(1), e25, 2008.
- Grossman LD, Parlan G, Bailey AL, Yee G, Yu M, Chan JYC: Tolerability outcomes of a multicenter, observational, open-label, drug-surveillance study in patients with type 2 diabetes mellitus treated with pioglitazone for 2 years. *Clin Ther* 31, 74-88, 2009.
- Gu X, Bishop SP: Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 75, 926-931, 1994.
- Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Stepan CM, Lazar MA: A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 8, 1122-1128, 2002.
- Guo Z: Intramyocellular lipids: Marker vs. marker of insulin resistance. *Medical Hypotheses* 70, 625-629, 2008.
- Haasch D, Berg C, Clampit JE, Pederson T, Frost L, Kroeger P, Rondinone CM: PKC $\theta$  is a key player in the development of insulin resistance. *Biochem Biophys Res Com* 343, 361-368, 2006.
- Haemerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussi C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R: Hormon-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277, 4806-4815, 2002.

- Hegarty BD, Furler SM, Ye J, Cooney GJ, Kraegen EW: The role of intramuscular lipids in insulin resistance. *Acta Physiol Scand* 178, 373-383, 2003.
- Hockings PD, Changani KK, Saeed N, Reid DG, Birmingham J, O'Brien P, Osborne J, Toseland CN, Buckingham RE: Rapid reversal of hepatic steatosis, and reduction of muscle triglyceride, by rosiglitazone: MRI/S studies in Zucker fatty rats. *Diabetes Obes Metab* 5, 234-243, 2003.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91, 1993.
- Hotamisligil GS: The role of TNF $\alpha$  and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *Inter Med* 245, 621-625, 1999.
- Hotamisligil GS: Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-866, 2006.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES: Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944-948, 2006.
- Howard BV: Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 84, 28J-32J, 1999.
- Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR: Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26, 2442-2450, 2003.
- Cherian B, Meka N, Katragadda A, Arora R: Therapeutic implications of diabetes in cardiovascular disease. *Am J Ther* 16, e51-e59, 2009.
- Chicco A, Soria A, Fainstein-Day P, Gutman R, Lombardo YB: Multiphasic metabolic changes in the heart of rats fed a sucrose-rich diet. *Horm Metab Res* 26, 397-403, 1994.
- Chicco A, Bernal C, Soria A, Giangrossi G, Lombardo Y: Dietary effects of partial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dyslipidemic rats. *Nutrition Research* 19, 291-293, 1999.
- Chin JE, Dickens M, Tavaré JM, Roth RA: Overexpression of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I, gamma, epsilon in cells overexpressing the insulin receptor. Effect on receptor phosphorylation and signaling. *J Biol Chem* 268, 6338-6347, 1993.
- Idris I, Gray S, Donnelly R: Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 44, 659-673, 2001.
- Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, Hansen LL, Busch AK, Hansen FB, Shafrir E, Mosthaf-Seedorf L: Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in *Psammomys obesus*: overexpression of protein kinase C epsilon in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes* 50, 584-592, 2001.
- Itani SI, Zhou Q, Pories WJ, MacDonald KG, Dohn GL: Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes* 49, 1353-1358, 2000.
- Itani SI, Walter JP, Kenneth GM, Dohm GL: Increased protein kinase C theta in skeletal muscle of diabetic patients. *Metabolism* 50 (5), 553-557, 2001.

- Itani SI, Ruderman NB, Frank S, Boden G: Lipid induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Diabetes* 51, 2005-2011, 2002.
- Jaken S: Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 8, 168-173, 1996.
- Jellinger PS: Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clinical Cornerstone* 8 (Suppl. 7), S30-S42, 2007.
- Jucker BM, Schaeffer TR, Haimbach RE, Mayer ME, Ohlstein DH, Smith SA, Cobitz AR, Sarkar SK: Reduction of intramyocellular lipid following short-term rosiglitazone treatment in Zucker fatty rats: an in vivo nuclear magnetic resonance study. *Metabolism* 52, 218-225, 2003.
- Kahn BB: Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest* 89, 1367-1374, 1992.
- Kahn S, Larson VG, Schwartz RS, Beard JC, Cain KC, Fellingham GW, Stratton JR, Cerqueira MD, Abrass IB: Exercise training delineates the importance of B-cell dysfunction to the glucose intolerance of human aging. *J Clin Endocrinol Metab* 74 (6), 1336-1342, 1992.
- Khan WA, Blobe GC, Hannun YA: Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell Signal* 7, 171-184, 1995.
- Kahn BB, Flier JS: Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 473-481, 2000.
- Kayali AG, Eichhorn J, Haruta T, Morris AJ, Nelson JG, Vollenweider P, Olefsky JM, Webster NJ: Association of the insulin receptor with phospholipase C-gamma (PLCgamma) in 3T3-L1 adipocytes suggests a role for PLCgamma in metabolic signaling by insulin. *J Biol Chem* 273, 13808-13818, 1998.
- Kazdová L, Žák A, Vrána A: Increased lipoprotein oxidability and aortic lipid peroxidation in an experimental model of the insulin resistance syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 827, 521-525, 1997.
- Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA: Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 277, E1130-E1141, 1999.
- Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L: Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 22, 325-346, 2002.
- Keranen LM, Dutil EM, Newton AC: Protein kinase C is regulated *in vivo* by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 5, 1394-1403, 1995.
- Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-2556, 2004.
- Kile BT, Shulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ: The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* 27, 235-241, 2002.

- Kim JK, Fillmore JJ, Gavrilova O, Chao L, Higashimori T, Choi H, Kim HJ, Yu C, Chen Y, Qu X: Differential effects of rosiglitazone on skeletal muscle and liver insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *Diabetes* 52, 1311-1318, 2003.
- Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos T, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI: PKC- $\theta$  knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114 (6), 823-827, 2004.
- Kitano T, Go M, Kikkawa U, Nishizuka Y: Assay and purification of protein kinase C. *Methods Enzymol* 124, 349-352, 1986.
- Klauck TM, Faux MC, Labudda K, Langeberg LK, Jaken S, Scott DJ: Coordination of three signalling enzymes by AKAP 79, a mammalian scaffold protein. *Science* 271, 1589-1592, 1996.
- Klimeš I, Vrána A, Kuneš J, Šeböková E, Dobešová Z, Štolba P, Zicha J: Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension. *Blood Press* 4, 137-142, 1995.
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM: Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346, 393-403, 2002.
- Kochan RG, Lamb DR, Lutz SA, Perrill CV, Reimann EM, Schlender KK: Glycogen synthase activation in human skeletal muscle: effect of diet and exercise. *Am J Physiol* 236, E660-E666, 1979.
- Kono S, Suzuya H, Okamoto M, Nishimura H, Kosaki H, Kakehi T, Okamoto M, Inoue G, Maeda I, Imura H: Changes in insulin receptor kinase with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 259, E27-E35, 1990.
- Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH: Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 40, 1397-1403, 1991.
- Kraegen EW, Cooney GJ, Ye J, Thompson AL: Triglycerides, fatty acids and insulin resistance- hyperinsulinemia. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 109 (4), 516-526, 2001.
- Kuneš J, Dobešová Z, Zicha J: High blood pressure of hypertriglyceridemic rats is related to metabolic disturbances. *Physiol Res* 44, 421-424, 1995.
- Laakso M: Hyperglycaemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 937-942, 1999.
- Lansbury AJ, Grant PJ, Catto AJ: Atherothrombotic risk factors in subjects with a family history of stroke. *Cerebrovasc Dis* 14, 153-160, 2002.

Laybutt DR, Schmitz-Peiffer C, Saha AK, Ruderman NB, Biden TJ, Kraegen EW: Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat. *Am J Physiol* 277, E1070-E1076, 1999.

Leahy JL: Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Archives of Medical Research* 36, 197-209, 2005.

Lee JY, Hannun YA, Obeid LM: Ceramide inactivates cellular protein kinase C  $\alpha$ . *J Biol Chem* 271, 13169-13174, 1996.

Lechleitner M: Obesity and the metabolic syndrome in the elderly – a mini-review. *Gerontology* 54, 253-259, 2008.

Lessard SJ, Lo Guicide SL, Lau W, Reid JJ, Turner N, Febbraio MA, Hawley JA, Watt MJ: Rosiglitazone enhances glucose tolerance by mechanisms other than reduction of fatty acid accumulation within skeletal muscle. *Endocrinology* 145, 5665-5670, 2004.

Lichtenstein AH, Schwab US: Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis* 150 (2), 227-243, 2000.

López-Miranda J, Pérez-Martínez P: Dietary fat, genes and insulin sensitivity. *J Mol Med* 85, 213-226, 2007.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275, 1951.

Machann J, Haring H, Shick F, Stumvoll M: Intramyocellular lipids and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 6, 239-248, 2004.

Malmström R, Packard LJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, Shepherd J, Taskinen MR: Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* 40, 454-462, 1997.

Mamputu JC, Wiernsperger NF, Renier G: Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence. *Diabetes Metab* 29, 6S71-76, 2003.

Mathers JC, Daly ME: Dietary carbohydrates and insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1 (6), 553-557, 1998.

Matsuzawa Y: Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atherosclerosis Supplements* 6, 7-14, 2005.

McGarry JD: Banting Lecture 2001. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 7-18, 2002.

McGettrick AJ, Feener EP, Kahn CR: Human insulin receptor substrate-1 (IRS-1) polymorphism G972R causes IRS-1 to associate with the insulin receptor and inhibits receptor autophosphorylation. *J Biol Chem* 280, 6441-6446, 2005.



- Miles PDG, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Rafaat K, Olefsky JM: TNF- $\alpha$  induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 46, 1678-1683, 1997.
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB: Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339-343, 2002.
- Mlinar B, Marc J, Janež A, Pfeifer M: Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta* 375, 20-35, 2007.
- Mochly-Rosen D: Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268, 247-251, 1995.
- Montecucco F, Steffens S, Mach F: Insulin resistance: A proinflammatory state mediated by lipid-induced signaling dysfunction and involved in atherosclerotic plaque instability. *Mediators of Inflammation* 2008, article ID 767623, 10 pages, 2008.
- Moon B, Kwan JJM, Duddy N, Sweeney G, Begum M: Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Phys* 285, E106-E115, 2003.
- Mosior M, Newton AC: Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry* 35, 1612-1623, 1996.
- Nakajima K, Yamauchi K, Shigematsu S, Ikeo S, Komatsu M, Aizawa T, Hashizume K: Selective attenuation of metabolic branch of insulin receptor down-signaling by high glucose in a hepatoma cell line, HepG2 cells. *J Biol Chem* 275, 20880-20886, 2000.
- Newton AC: Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9, 161-167, 1997.
- Nikkila EA, Huttunen JK, Ehnholm C: Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in diabetes mellitus. Relationship to plasma triglyceride metabolism. *Diabetes* 26, 11-21, 1977.
- Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Mohideen P, Carter L, Henry RR: Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 263-271, 2000.
- Nishizuka Y: The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA* 262, 1826-1833, 1989.
- Nishizuka Y: Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9, 484-496, 1995.
- Niskanen L, Uutsipa M, Sarlund H, Siitonen O, Voutilainen E, Penttilä I, Pyörälä K: Microalbuminuria predicts the development of serum lipoprotein abnormalities favouring atherogenesis in newly diagnosed type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33, 237-243, 1990.

- Osada S, Mizuno K, Saido TC, Suzuki K, Kuroki T, Ohno S: A new member of protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 12, 3930-3938, 1992.
- Palomo I, Alarcón M, Moore-Carraso R, Argilés JM: Hemostasis alterations in metabolic syndrome. *Int J Mol Medicine* 18, 969-974, 2006.
- Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH: Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 46, 983-988, 1997.
- Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E: A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 38, 3-13, 1995.
- Park KS, Ciaraldi TP, Carter L, Mudaliar S, Nikoulina SE, Webster NJG, Henry RR: Induction of insulin resistance in human skeletal muscle cells by downregulation of glycogen synthase protein expression. *Metabolism* 49 (8), 962-968, 2000.
- Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA: Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR $\gamma$  activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 472-476, 2003.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F: Effect of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540-543, 1995.
- Peterson GL: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-356, 1977.
- Phillips SJ, Whisnant JP, O'Fallon WM, Frye RL: Prevalence of cardiovascular diseases and diabetes mellitus in residents in Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 65, 344-349, 1990.
- Phillipis DI, Caddy S, Ilic V, Fielding BA, Frayn KN, Borthwick AC, Taylor R: Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism* 45, 947-950, 1996.
- Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E: Modulation of insulin action. *Diabetologia* 47, 170-184, 2004.
- Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS: Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *Journal of Nutrition* 136 (4), 873-876, 2006.
- Pouliot MC, Després JP, Nadeau A, Moorjani S, Prud'Homme D, Lupien PJ, Tremblay A, Bouchard C: Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 41, 826-834, 1992.
- Pravenec M, Landa V, Zídek V, Musilová A, Křen V, Kazdová L, Aitman TJ, Glazier AM, Ibrahimi A, Abumrad NA, Qi N, Wang JM, St Lezin EM, Kurtz TW: Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat Genet* 27 (2), 156-158, 2001.

- Pravenec M, Kazdová L, Landa V, Zídek V, Mlejnek P, Jansa P, Wang J, Qi N, Kurtz TW: Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem* 278, 45209-45215, 2003.
- Prekeris R, Mayhew MW, Cooper JB, Terrian DM: Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J Cell Biol* 132, 77-90, 1996.
- Proietto J, Filippis A, Nakha C, Clark S: Nutrient-induced insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol* 151, 143-149, 1999.
- Puceát M, Vassort G: Signalling by protein kinase C isoforms in the heart. *Mol Cell Biol* 157, 65-72, 1996.
- Qatani M, Lazar MA: Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices of the menu. *Genes Dev* 21, 1443-1455, 2007.
- Qatani M, Szwegold NR, Greaves DR, Ahima RS, Lazar MA: Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 119, 531-539, 2009.
- Qi N, Kazdová L, Zídek V, Landa V, Křen V, Pershadsingh HA, Lezin ES, Abumrad NA, Pravenec M, Kurtz TW: Pharmacogenetic evidence that Cd36 is a key determinant of the metabolic effect of pioglitazone. *J Biol Chem* 277, 48501-48507, 2002.
- Qi NR, Wang J, Zídek V, Landa V, Mlejnek P, Kazdová L, Pravenec M, Kurtz TW: A new transgenic rat model of hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hypertension* 45, 1004-1011, 2005.
- Qi Y, Zhenying N, Yun-Sik L, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA, Ahima RS: Loss of resistin improves homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 55, 3083-3090, 2006.
- Qu X, Seale JP, Donnelly R: Tissue and isoform-selective activation of protein kinase C in insulin-resistant obese Zucker rats - effect of feeding. *J Endocrinol* 162, 207-214, 1999.
- Qu X, Seale JP, Donnelly R: Tissue-and isoform-specific effect of aging on protein kinase C in insulin-sensitive tissues. *Clinical Science* 97, 355-361, 1999.
- Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule- $\beta$  selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111, 225-230, 2003.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholm EA: The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789, 1963.
- Rando RR, Young N: The stereospecific activation of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 122 (2), 818-823, 1984.

- Rangwala SM, Rich AS, Rhoades B, Shapiro JS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA: Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes* 53, 1937-1941, 2004.
- Rao RH: Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. Difference in interpretation based on insulin infusion rate or on plasma insulin in glucose clamp studies. *Diabetes* 42, 1364-1371, 1993.
- Reaven GM: Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607, 1988.
- Reaven GM: Syndrome X: 6 years later. *J Inter Med Suppl* 736, 13-22, 1994.
- Reaven GM: The fourth musketeer-from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia* 38, 3-13, 1995.
- Reeds DN: Nutrition support in the obese, diabetic patient: the role of hypocaloric feeding. *Curr Opin Gastroenterol* 25, 151-154, 2009.
- Rector RS, Thyfalt JP, Wei Y, Ibdah JA: Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol* 14, 185-192, 2008.
- Rivellese AA, Maffetonne A, Iovine C, Di Marino L, Annuzzi G, Mancini M, Riccardi G: Long-term effect of fish oil on insulin resistance and plasma lipoproteins in NIDDM patients with hypertriglyceridemia. *Diabetes Care* 19, 1207-1213, 1996.
- Rosen ED, Spiegelman BM: Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-853, 2006.
- Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF: Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- $\alpha$ : implications for insulin resistance. *Diabetes* 51, 3176-3188, 2002.
- Russell JC, Shillabeer G, Bar-Tana J, Lau DC, Richardson M, Wenzel LM, Graham SE, Dolphin PJ: Development of insulin resistance in the JCR: LA-cp rat: role of triacylglycerols and effect of MEDICA 16. *Diabetes* 47, 770-778, 1998.
- Saad MF, Lillioja S, Nyomba BL, Castillo C, Ferraro R, De Gregorio M, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Howard BV: Racial differences in the relation between blood pressure and insulin resistance. *N Engl J Med* 324, 733-739, 1991.
- Saltiel AR, Kahn CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806, 2001.
- Sampson SR, Cooper DR: Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulators of insulin signaling. *Molecular Genetics and Metabolism* 89, 32-47, 2006.
- Sando JJ, Chertihin OL: Activation of protein kinase C by lysophosphatidic acid: dependence on composition of phospholipid vesicles. *Biochem J* 317, 583-588, 1996.

- Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM: Adenovirus-mediated chronic “hyper-resistinemia” leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 114, 224-231, 2004.
- Seedorf K, Juhl L, Hansen L, Nielsen L, Mosthaf L: Insulin-induced activation of MAP kinase involves GRB2, SHPT2, PI3 kinase and PLC-gamma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104 (Suppl. 2), 138, 1995.
- Seedorf K, Shearman M, Ullrich A: Rapid and long-term effects on protein kinase C on receptor tyrosine kinase phosphorylation and degradation. *J Biol Chem* 270, 18953-18960, 1995.
- Serra C, Federici M, Buongiorno A, Senni MI, Morelli S, Segratella E, Pascuccio M, Tiveron C, Mattei E, Tatangelo L, Lauro R, Molinaro M, Giaccari A, Bouché M: Transgenic mice with dominant negative PKC-theta in skeletal muscle: a new model of insulin resistance and obesity. *J Cell Physiol* 196, 89-97, 2003.
- Serrano R, Villar M, gallardo N, Carrascosa JM, Martinez C, Andrés A: The effect of aging on insulin signalling pathway is tissue dependent: Central role of adipose tissue in the insulin resistance of aging. *Mech Ageing Dev* 130 (3), 189-197, 2009.
- Shafir E: Animal model of non-insulin-dependent diabetes. *Diab Metab Rev* 8, 179-208, 1998.
- Shafir E, Ziv E: Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance: the desert rodent *Psammomys obesus* and other animals in which insulin resistance leads to detrimental outcome. *J Bas Clin Physiol Pharmacol* 9, 347-385, 1998.
- Shafir E, Raz I: Diabetes: mellitus or lipidus? *Diabetologia* 46, 433-440, 2003.
- Shima K: Obesity and NIDDM, v knize Lessons from the OLEFT rats, (Shima K ed.), Elsevier, Amsterdam, 1999.
- Shimokata H, Muller DC, Fleg JL, Sorkin J, Ziemba AW, Andress R: Age is independent determinant of glucose tolerance. *Diabetes* 40(1), 44-51, 1991.
- Shinomura T, Asaoka Y, Oka M, Yoshida K, Nishizuka Y: Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (12), 5149-5153, 1991.
- Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A: Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med* 22, 674-682, 2005.
- Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Oakes ND, Watkinson A, Chisholm DJ, Kraegen EW, Biden TJ: Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes  $\epsilon$  and  $\theta$  are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat fed rat. *Diabetes* 46, 169-178, 1997.

Schmitz-Peiffer C: Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cellular signaling* 12, 583-594, 2000.

Schmitz-Peiffer C: Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Ann NY Acad Sci* 967, 146-157, 2002.

Schmitz-Peiffer C, Laybutt DR, Burchfield JG, Gurisik E, Narasimhan S, Mitchell CJ, Pedersen DJ, Braun U, Cooney GJ, Leitges M, Biden TJ: Inhibition of PKC epsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metab* 6, 320-328, 2007.

Smith SA: Central role of the adipocyte in the insulin-sensitising and cardiovascular risk modifying actions of the thiazolidinediones. *Biochimie* 85, 1219-1230, 2003.

Souza SC, Yamamoto MT, Franciosa MD, Lien P, Greenberg AS: BRL 49653 blocks lipolytic actions of tumor necrosis factor alpha: a potential new insulin-sensitising mechanism for thiazolidinediones. *Diabetes* 47, 691-695, 1998.

Standaert ML, Bandyopadhyay G, Zhou X, Galloway L, Farese RV: Insulin stimulates phospholipase D-dependent phosphatidylcholine hydrolysis, Rho translocation, de novo phospholipid synthesis, and diacylglycerol/protein kinase C signaling in L6 myotubes. *Endocrinology* 137, 3014-3020, 1996.

Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV: Protein kinase-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem* 272, 30075-30082, 1997.

Standaert ML, Bandyopadhyay G, Perez L, Price D, Galloway L, Poklepovic A, Sajan MP, Cenni V, Sirri A, Moscat J, Toker A, Farese RV: Insulin activates protein kinase C-zeta and -lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J Biol Chem* 274, 25308-25316, 1999.

Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Ravussin E, Weyer C, Tataranni PA: Plasma adiponectin levels are not associated with fat oxidation in humans. *Obes Res* 10, 1016-1020, 2002.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright ChM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312, 2001.

Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA: Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 25, 1569-1575, 2005.

Stith RD, Luo J: Endocrine and carbohydrate responses to interleukin-6 in vivo. *Circ Shock* 44, 210-214, 1994.

Storlien LH, Jenkins AB, Chrisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW: Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 40, 280-289, 1991.

Strack V, Hennige AM, Krütfeldt J, Bossenmaier B, Klein HH, Kellerer M, Lammers R, Häring HU: Serine residues 994 and 1023/25 are important for insulin receptor kinase inhibition by protein kinase C isoforms beta2 and theta. *Diabetologia* 43, 443-449, 2000.

Stumvoll M, Goldstein BJ, Van Haeften TW: Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333-1346, 2005.

Sugden PH, Bogoyevitch MA: Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res* 30, 478-492, 1995.

Šeda O, Šedová L, Kazdová L, Křenová D, Křen V: Metabolic characterization of insulin resistance syndrome feature loci in three brown Norway-derived congenic strains. *Folia Biol (Praha)* 48 (3), 81-88, 2002.

Šedová L, Kazdová L, Šeda O, Křenová D, Křen V: Rat inbred PD/Cub strain as a model of dyslipidemia and insulin resistance. *Folia Biol (Praha)* 46, 99-106, 2000.

Štolba P, Dobešová Z, Hušek P, Opltová H, Zicha J, Vrána A, Kuneš J: The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes. *Life Sci* 51, 733-740, 1992.

Štolba P, Opltová H, Hušek P, Nedvídková J, Kuneš J, Dobešová Z, Nedvídek J, Vrána A: Adrenergic overactivity and insulin resistance in nonobese hereditary hypertriglyceridemic rats. *Ann NY Acad Sci* 683, 281-288, 1993.

Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y: Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* 252, 7603-7609, 1977.

Taylor SI, Samuels B, Roth J, Kasuga M, Hedo JA, Gorden P, Brasel DE, Pokora T, Engel RR.: Decreased insulin binding in cultured lymphocytes from two patients with extreme insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 54, 919-930, 1982.

Timar O, Sestier F, Levy E: Metabolic syndrome X: A review. *Can J Cardiol* 16, 779-789, 2000.

Timmers S, Schrauwen P, Vogel J: Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiology & Behavior* 94, 242-251, 2008.

Thomas J, Schlender K, Lerner J: A rapid filter paper assay for UDPG-glucose –glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-<sup>14</sup>C- glucose. *Anal Biochem* 25, 486-499, 1968.

Thomsen C, Rasmussen O, Christiansen C, Pedersen E, Vesterlund M, Storm H, Ingersley J, Hermansen K: Comparison of the effects of a monounsaturated fat diet and a high carbohydrate diet on cardiovascular risk factors in first degree relatives to type-2diabetic subjects. *Eur J Clin Nutr* 53 (10), 818-823, 1999.

Tucker MZ, Turcotte LP: Aging is associated with elevated muscle triglyceride content and increased insulin-stimulated fatty acid uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E827-E835, 2003.

Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitpa M: Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344, 1343-1350, 2001.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352, 837-853, 1998.

Van Gaal LF, Mertens IL, De Block ChE: Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444, 875-880, 2006.

Verges B: New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 31 (5), 429-439, 2005.

Verges B: Nutrition in patients with type 2 diabetes. *Rev Prat* 59, 54-58, 2009.

Vessby B: Dietary fat and insulin action in humans. *Br J Nutr* 83 (Suppl. 1), S91-S96, 2000.

Vikman HL, Kaartinen JM, Tuominen RK, Ohisalo JJ: A possible role for protein kinase C in the regulatory differences between intra-abdominal and subcutaneous human adipose tissue. *Clin Sci* 85, 265-268, 1993.

Vrána A, Kazdová L: Insulin sensitivity of rat adipose tissue and of diaphragm in vitro: effect of the type of dietary carbohydrate. *Life Sci* 9, 257-265, 1970.

Vrána A, Kazdová L: The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: An experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc* 22, 2579, 1990.

Vrána A, Kazdová L, Dobešová Z, Kuneš J, Křen V, Bílá V, Štolba P, Klimeš I: Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains. Effects of dietary carbohydrates. *Ann N Y Acad Sci* 683, 57-68, 1993.

Vrána A, Kazdová L: Increased adipose tissue lipolysis in a hypertriglyceridemic rat line. *Ann NY Acad Sci* 827, 510-513, 1993.

Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE: Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9, 414-417, 2001.

Way JM, Görgün CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR Jr, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS: Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 276, 25651-25653, 2001.



- Waldhäusl WK, Roden M: The effect of free fatty acids on glucose transport and phosphorylation in human skeletal muscle. *Curr Opin Endocrinol Diab* 7, 211-216, 2000.
- Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP: Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause mortality and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 21, 1167-1172, 1998.
- Weiss R, Dziura J, Burget TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Sillen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin RS, Caprio S: Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Eng J Med* 350, 2362-2374, 2004.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr. AW: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808, 2003.
- Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE: The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 104, 787-794, 1999.
- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436, 356-362, 2005.
- Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC, Gong DW: Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E1253-E1261, 2006.
- Ye JM, Dzamko N, Cleasby ME, Hegarty BD, Furler SM, Cooney GJ, Kraegen EW: Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acids-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia* 47, 1306-1313, 2004.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI: Mechanisms by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277, 50230-50236, 2002.
- Zeyda M, Stulning TM: Obesity, inflammation, and insulin resistance – A mini-review. *Gerontology* 55, 379-386, 2009.
- Zinn A, Felson S, Fisher E, Schwartzbard A: Reassessing the cardiovascular risks and benefits of thiazolidinediones. *Clin Cardiol* 32, 397-403, 2008.
- Zhu M, de Cabo R, Anson RM, Ingram DK, Lane MA: Caloric restriction modulates insulin receptor signaling in liver and skeletal muscle of rat. *Nutrition* 21 (3), 378-388, 2005.

## 9. PŘÍLOHA - PUBLIKACE

Tato disertační práce byla sepsána na základě následujících publikací:

Cahova M, Vavrinkova H, Meschisvilli E, Markova I, Kazdova L: The impaired response of non-obese hereditary hypertriglyceridemic rats to glucose load is associated with low glucose storage in energy reserves. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112, 549-555, 2004.

Markova I, Zidek V, Musilova A, Simakova M, Mlejnek P, Kazdova L, Pravenec M: Long-term pioglitazone treatment augments insulin sensitivity and PKC- $\epsilon$  and PKC- $\theta$  activation in skeletal muscles in sucrose fed rats. *Physiol Res*, Epub ahead of print, 2009.

Další publikace autorky nezahrnuté v disertační práci:

Neckar J, Markova I, Novak F, Novakova O, Szarszoi O, Ostadal B, Kolar F: Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- $\delta$  in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H1566-H1572, 2005.

Orolin J, Vecera R, Markova I, Zacharova A, Anzenbacher P: Differences in hepatic expression of genes involved in lipid homeostasis between hereditary hypertriglyceridemic rats and healthy Wistar rats and in their response to dietary cholesterol. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2624-2630, 2009.