



Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Sekrece inzulínu u žen se syndromem polycystických ovarií

Doktorandská dizertační práce
MUDr. Tereza Grimmichová

Školitel : MUDr. Jana Vrbíková PhD.
Školitel-konzultant: Doc. MUDr. Karel Vondra DrSc.

Praha 2009

Obsah

Poděkování	str. 3
Seznam užitých zkratk	str. 4-5
Úvod	str. 6
1) Syndrom polycystických ovaríí	str. 6-8
2) Sekrece inzulínu	str. 8-9
3) Sekrece inzulínu a diabetes mellitus 2. typu	str. 9-11
4) Pulzní sekrece inzulínu	str. 11-13
Viz přílohy: <u>Grimmichová T.</u> , Vrbíková J., Vondra K. Pulzní sekrece inzulínu. DMEV, roč.10, č.1, 2007, str. 12-18 (<u>příloha 1</u>) <u>Grimmichová T.</u> , Vrbíková J., Vondra K. Pulzní sekrece inzulínu. In: Stárka L. a kol. Pokroky v Endokrinologii, Praha, Maxdorf, 2007, str. 641-648 (<u>příloha 2</u>)	
5) Inkretiny	str. 13-18
6) Syndrom polycystických ovaríí a sekrece inzulínu	str. 18-20
Cíle práce	str. 21
Soubory a metodika	str. 22-27
Výsledky	str. 28-30
Viz přílohy: Vrbíkova J., <u>Grimmichova T.</u> , Dvorakova K., Hill M., Stanicka S., Vondra K. Family history of diabetes mellitus determines insulin sensitivity and beta cell function in polycystic ovary syndrome. <i>Physiol res.</i> 2008, 57:547-53 (<u>příloha 3</u>) <u>Grimmichova T.</u> , Vrbíkova J., Matucha P., Vondra K., Veldhuis P.P., Johnson M.L. Fasting insulin pulsatile secretion in lean women with polycystic syndrome. <i>Physiol. Res.</i> 2008, Feb., 57 (suppl. 1): S91-98 (<u>příloha 4</u>) Vrbíkova J., Hill M., Bendlova B., <u>Grimmichova T.</u> , Dvorakova K., Vondra K., Pacini G. Incretin levels in polycystic ovary syndrome. <i>European Journal of Endocrinology</i> , 2008, Vol 159, 121-127 (<u>příloha 5</u>) Vrbíkova J., Dvorakova K., <u>Grimmichova T.</u> , Hill M., Stanicka S., Cibula D., Bendlova B., Starka L., Vondra K. Prevalence of insulin resistance and prediction of glucose intolerance and type 2 diabetes mellitus in women with polycystic ovary syndrome. <i>Clin Chem Lab Med</i> , 2007; 45: 639-44 (<u>příloha 6</u>)	
Diskuse	str. 31-35
Závěry	str. 36
Literatura	str. 37-43
Seznam příloh	str. 44

Poděkování

Upřímné poděkování na prvním místě patří MUDr. Janě Vrbíkové PhD. za trpělivé vedení mého postgraduálního studia a za mnoho užitečných rad a nápadů nejen ve vědecké práci. Studie by nebylo možné uskutečnit bez podpory pana docenta MUDr. Karla Vondry a zázemí, které poskytla Laboratoř funkční diagnostiky Endokrinologického ústavu. Mé díky patří MUDr. Kateřině Dvořákové za laskavé zaškolení v clampových i jiných technikách. Dále bych ráda poděkovala Oddělení molekulární genetiky a Oddělení steroidních hormonů Endokrinologického ústavu za provedení rutinních hormonálních vyšetření. Na neposledním místě děkuji mé rodině, která je vždy mou velkou oporou.

Seznam užitých zkratek

ADP - adenosin-difosfát

ATP - adenosin-trifosfát

ApEn - approximate entropy

BMI – index tělesné hmotnosti (body mass index)

cAMP - cyklický adenosin-monofosfát

CNS - centrální nervový systém

GABA - kyselina γ -aminomáselná

hCG – lidský choriogonadotropin

DM 1- diabetes mellitus 1. typu

DM 2 - diabetes mellitus 2. typu

FSH - folitropin

GIP - glukózo-dependenční inzulínotropní polypeptid

GLP-1 – glukagonu podobný peptid 1 (glukagon-like peptid 1)

GLP-2 – glukagonu podobný peptid 2 (glukagon-like peptid 2)

GLUT 4 - na inzulínu závislý glukózový transportér typu 4

GnRH - gonadotropiny stimulující hormon

GWAS - celogenomová asociační studie

HDL - lipoprotein o vysoké hustotě (high-density lipoprotein)

HOMA-IR - homeostatic model assessment of insulin resistance

IFG - porušená lačná glykémie (impaired fasting glucose)

IGF-1 - inzulínu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)

IGFBP-1 – inzulínu podobný růstový faktor vázající protein 1 (insulin-like growth factor binding protein)

IR - inzulínová rezistence

IS - inzulínová senzitivita

ivGTT - intravenózní glukózový toleranční test

KI - konfidenční interval

LADA – latent autoimmune diabetes in adults

LDL - lipoprotein o nízké hustotě (low-density lipoprotein)

LH - lutropin

Min- minuta

MODY – maturity onset diabetes of the young

NGT – normální glukózová tolerance

OGIS - oral glucose insulin sensitivity index

oGTT - orální glukózový toleranční test

PCO – polycystická ovaria

PCOS - syndrom polycystických ovarií

PGT - porušená glukózová tolerance

QUICKI - quantitative insulin sensitivity check index

SHBG - pohlavní hormony vázající protein (sex-hormone binding protein)

S_I - index inzulínové sensitivity

VMK - volné mastné kyseliny

VLDL - lipoprotein o velmi nízké denzitě (very-low density lipoprotein)

Úvod

1) Syndrom polycystických ovarii

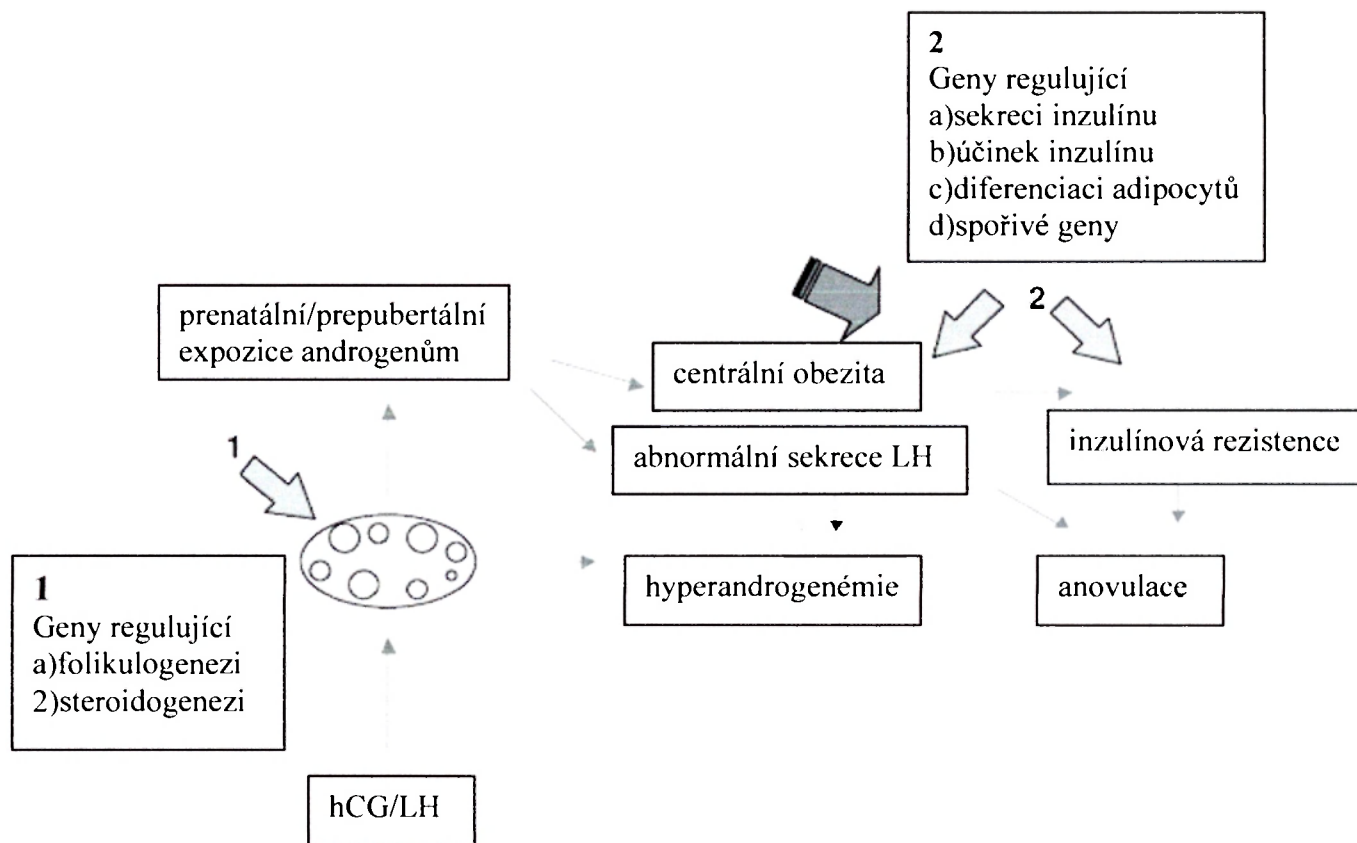
Syndrom polycystických ovarii (PCOS) je jednou z nejčastějších endokrinopatií, postihuje 5-10 % žen ve fertilním věku (Carmina a Lobo 1999). Původní diagnostická kritéria definovaná panelem expertů National Institute of Health (NIH) v roce 1990 doporučovala stanovit diagnózu PCOS při přítomnosti hyperandrogenismu a/nebo hyperandrogenémie a chronické anovulace. Současně musela být vyloučena další onemocnění, která by mohla podobné klinické projevy způsobit. Jsou to především tumory nadledvin nebo ovarii s nadprodukcí androgenů, kongenitální adrenální hyperplázie, hyperprolaktinémie, tyreoidální dysfunkce či Cushingův syndrom (Zawadski a Dunaif 1992). V roce 2003 na konferenci Evropské společnosti pro lidskou reprodukci a embryologii (ESHRE) a Americké společnosti pro reprodukční medicínu (ASRM) v Rotterdamu (Revised 2003 consensus) byla upravena původní diagnostická kritéria. Pro diagnózu PCOS musela být splněna dvě z následujících tří kritérií: 1) oligo- a/nebo anovulace, 2) klinické nebo biochemické známky hyperandrogenismu, 3) sonografický nález polycystických ovarii (PCO). V roce 2006 Androgen Excess Society navrhla modifikaci těchto kritérií, podle níž je nezbytnou podmínkou pro stanovení diagnózy PCOS biochemické nebo klinické známky hyperandrogenismu (hirsutismus). Dalším diagnostickým kritériem je přítomnost buď oligoanovulace nebo sonografického obrazu PCO. Jako třetí bod musí být vyloučena onemocnění, která by mohla mít podobné klinické projevy (Azziz et al. 2006).

Podle klasických Adamsových kritérií je obraz PCO přítomen při sonografickém popisu aspoň 8 subkapsulárně uložených folikulárních cyst o průměru do 10 mm a ovariálního stromatu tvořícího více než 25 % objemu ovaria (Adams et al. 1985). Tato kritéria byla opět modifikována ESHRE (Balen et al. 2004). Jako PCO se nověji označuje obraz ovarii, která obsahují aspoň 12 folikulů měřících v průměru 2-9 mm nebo která jsou zvětšená (> 10 cm³). Není třeba hodnotit distribuci folikulů ani objem stromatu.

Zásadním symptomem PCOS je nadbytek androgenů, avšak etiologie PCOS zůstává nejasná. Předpokládá se genetický podklad vzhledem k tomu, že je znám familiární výskyt. Pravděpodobně se jedná o oligogenně až polygenně podmíněný syndrom. Studie se shodují, že podstatnou roli hraje ⁽¹⁾ovariální dysfunkce vedoucí k nadbytku androgenů a další ⁽²⁾genetické defekty regulující sekreci a působení inzulínu a energetický metabolismus. Zevní faktory jako pohybová aktivita či dieta dále ovlivňují projevy PCOS a jejich intenzitu (Franks et al. 1997; Kashar-Miller a Azziz 1999; Abbott et al. 2002).

Nadměrná sekrece ovariálních androgenů je popsána u pacientek s předčasnou pubarché, která je asociována se zvýšenou incidencí PCOS, hyperinzulinémií a dyslipidemií. U těchto dívek je také častější anamnéza nízké porodní váhy (Ibanez et al. 1998; Driscoll 2003). Studie na zvířecím modelu podporují tezi rozvoje PCOS již před obdobím dospívání. Samičky opice *Macacus rhesus* měly po intrauterinní expozici vyšší hladině androgenů typické projevy PCOS včetně abdominální obezity (Abbott et al. 2002). Během těhotenství mají ženy zvýšené hladiny SHBG a je dostatečně účinná aktivita placentární aromatázy. Plod je tak chráněn před exogenním nadbytkem androgenů (Blank et al. 2008). Předpokládá se tedy, že u žen s PCOS se prenatálně na hyperandrogenémii podílí především ovárium s geneticky podmíněnou

Obr. 1. Hypotéza vzniku PCOS. Během těhotenství dochází vlivem sekrece placentárního hCG a fetálního LH k nadprodukci androgenů ováriem s geneticky podmíněnou poruchou folikulogeneze či steroidogeneze ovaria. Časná expozice zvýšené hladině androgenů má za následek oslabenou zpětnou vazbu mezi steroidy ovaria a LH hypofýzy. Dochází ke zvýšenému ukládání abdominálního tuku a rozvoji inzulínové rezistence (IR). Hyperinzulinémie a LH se podílejí na trvalé nadprodukci ovariálních steroidů, což vede k zástavě dozrávání folikulů a k anovulaci. Spořivé geny (thrifty genes) podporují vznik inzulín-rezistentního fenotypu. Za fyziologických podmínek pomáhají efektivně využívat a ukládat energii při nedostatku potravy. Naopak při nadbytku potravy typickém pro západní civilizaci dochází vlivem těchto genů k obezitě (Holte 1998; volně dle Abbott et al. 2002).



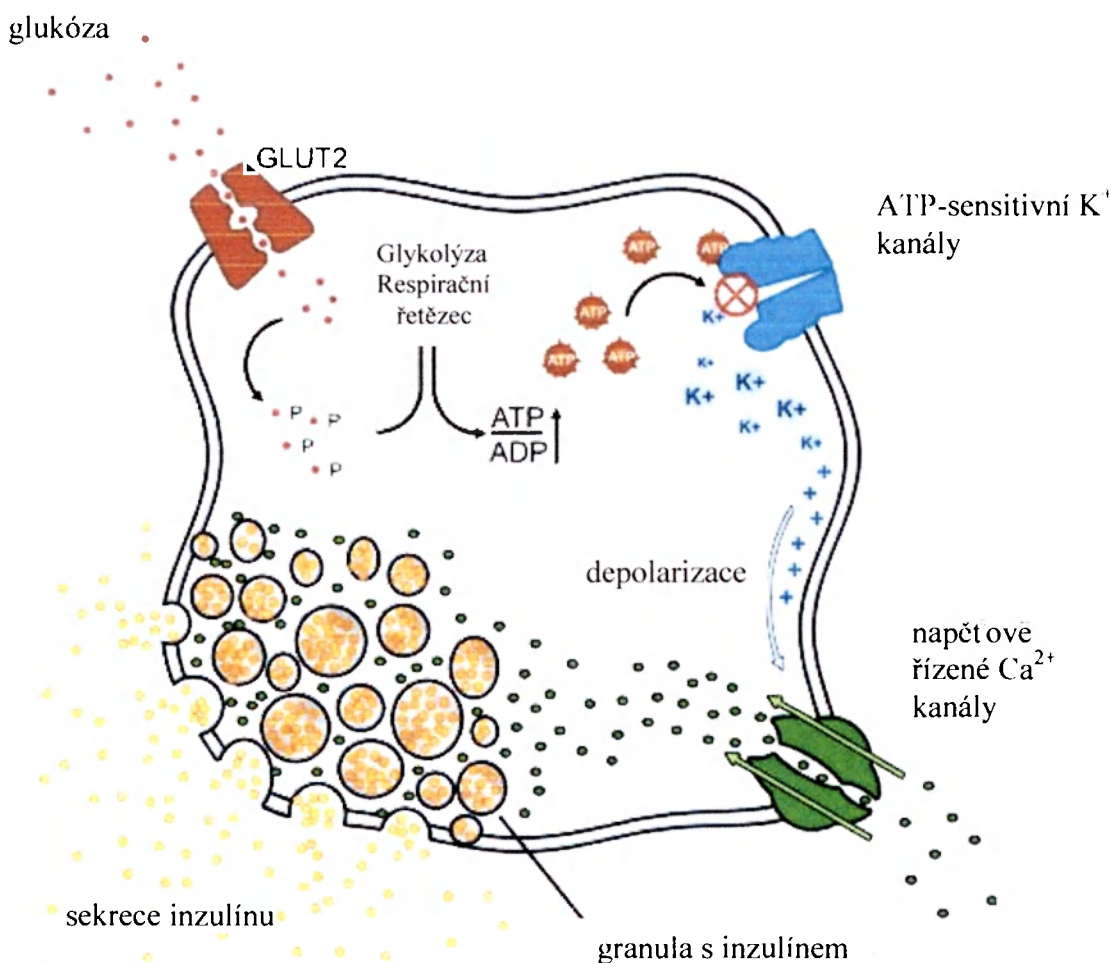
poruchou folikulogeneze či steroidogeneze. In vitro je popsána vystupňovaná sekrece androgenů thekálními buňkami polycystického ovaria ve srovnání s normálním ovariem (Obr.1) (Abbott et al. 2002).

Časná intrauterinní expozice androgenům má dále za následek hypersekreci LH vedoucí k další produkci ovariálních androgenů. Pravděpodobně se jedná o porušenou zpětnou vazbu mezi steroidy ovaria a sekrecí LH hypofýzou (Abbott et al. 2002). U žen s PCOS je popsána rychlejší frekvence pulzní sekrece GnRH, která upřednostní sekreci LH. Relativní nedostatek FSH vede ke snížené aromatizaci androgenů na estrogény a k zástavě růstu dominantního folikulu s poruchou menstruačního cyklu. Endogenní či exogenní progesteron zpomaluje frekvenci pulzů GnRH. Nicméně u žen s PCOS jsou k zpomalení frekvence pulzů GnRH třeba suprafyziologické dávky progesteronu, což svědčí pro oslabené zpětné působení progesteronu v hypotalamu. Snížená citlivost hypotalamu na progesteron je podmíněna hyperandrogenií, neboť při blokadě androgenních receptorů flutamidem došlo k obnovení této citlivosti (Abbott et al. 2002; Blank et al. 2008; Suhail 2008).

2) Sekrece inzulínu

Glukóza je nejvýznamnějším podnětem, který ovlivňuje sekreci inzulínu v jednotlivé β -buňce Langerhansových ostrůvků pankreatu. Samotná glykolýza má v β -buňce cyklické výkyvy vlivem opakující se aktivace klíčového enzymu glykolýzy fosfofruktokinázy. Snížená aktivita tohoto klíčového enzymu glykolýzy vede k prodloužení periody oscilací hladin inzulínu (Schellenberger et al. 1984). Při nedostatečné funkci fosfofruktokinázy, jak je tomu u autozomálně recesivně dědičného onemocnění glykogenózy VII, nejsou oscilace inzulínu přítomny. U těchto pacientů je popsána inzulínová rezistence (IR) a zvýšené riziko rozvoje diabetes mellitus 2. typu (DM 2) (Bergsten 2000; Ristow et al. 1999). Oscilace glykolýzy jsou doprovázeny oscilacemi v poměru ATP/ADP. Zvýšení ATP nebo snížení ADP vede k uzavření ATP-senzitivních K^+ kanálů. Následně dochází k depolarizaci β -buněk a k aktivaci kalciových kanálů. Nárůst koncentrace intracelulárního kalcia vede k exocytóze granul s inzulínem (Obr.2). Oscilace intracelulárního kalcia nejsou podnětem pro oscilace inzulínu, ale mohou je zesilovat (Tornheim 1997).

Obr. 2 Sekrece inzulínu je spuštěna vstupem glukózy do β -buňky zprostředkovaným transportérem GLUT-2. Fosforylace glukózy během procesu glykolýzy vede ke zvýšení poměru ATP/ADP. Dochází k inaktivaci ATP-senzitivních K^+ kanálů a k depolarizaci buněčné membrány. Otvírají se napětově řízené Ca^{2+} kanály a ionty Ca^{2+} vstupují do β -buňky. Zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} vede k uvolnění inzulínu ze zásobních granula a k sekreci inzulínu (volně dle Beta cell biology consortium 2004).



3) Sekrece inzulínu a diabetes mellitus 2. typu

V patofyziologii vzniku a rozvoje DM 2 se uplatňuje jak porucha sekrece inzulínu, tak inzulínová rezistence (IR). Pro rozvoj poruchy glukózové tolerance je důležitá porucha souhry těchto dvou procesů. Bergman v r. 1981 prvně postuloval zpětnou vazbu mezi inzulínovou senzitivitou a sekrecí inzulínu (Bergman et al. 1981). Tento vztah byl pak potvrzen dalšími autory, kteří prokázali, že parametry popisující sekreci inzulínu ($AIR_{\text{glukóza}}$ (časná odpověď sekrece inzulínu při ivGTT), AIR a slope v argininovém testu) a senzitivitu k inzulínu (S_I při ivGTT) jsou navzájem závislé (Kahn et al. 1993). Tato závislost u vyšetřených zdravých osob byla nejlépe definovaná pomocí hyperbolické funkce (viz obr. 6).

Násobek sekrece inzulínu a inzulínové senzitivity (tzv. dispoziční index) je konstantní veličina, (Ahren and Pacini 2004), pokud je zachována stejná úroveň glukózové tolerance. Normální glukózová tolerance je při zhoršení inzulínové senzitivity (IS) udržena za cenu zvýšené sekrece inzulínu. Pokud byla navozena inzulínová rezistence (např. podáváním nikotinové kyseliny) a současně došlo ke zhoršení glukózové tolerance, sekreční kompenzace byla neúplná (Kahn et al. 1993).

Je známo, že u řady jedinců s IR se nikdy nerozvine DM 2, protože mají dostatečnou sekreční kompenzaci. IR sama o sobě tedy ke vzniku DM 2 nestačí. Porucha sekrece inzulínu je důležitým mechanismem, který se uplatňuje při vzniku a rozvoji DM 2 (Stumvoll et al. 2007). Funkce beta buněk a schopnost sekreční kompenzace jsou geneticky podmíněné. Dispoziční index má vysokou heritabilitu (Elbein et al. 1999). V celogenomových asociačních studiích (GWAS) byla prokázána asociace DM 2 s geny, jejichž produkty hrají roli při sekreci inzulínu, ale ne s geny, kódující faktory ovlivňující působení inzulínu (Frayling 2007). Tento výsledek může být dán provedením GWAS, kdy byl minimalizován vliv BMI, a tedy i IR. Inzulínová rezistence je silněji ovlivněna faktory zevního prostředí a má nižší heritabilitu než sekrece inzulínu (Florez 2008). Porucha sekrece inzulínu byla prokazatelná u normoglykemických potomků diabetiků 2. typu v některých studiích častěji než porucha inzulínové senzitivity (Pimenta et al. 1995). V prospektivních studiích pak bylo prokázáno, že IR a porušená sekrece inzulínu jsou nezávislými prediktory poruchy glukózové tolerance (Weyer et al. 2001). V longitudinální studii bylo prokázáno, že sekrece inzulínu u osob, u nichž se v průběhu sledování rozvinul DM 2, poklesla mnohem výrazněji nežli inzulínová senzitivita (Weyer et al. 1999).

Většina pacientů s DM 2 (85-90 %) je obézních s abdominální predispozicí ukládání tuku (Wajchenberg 2000). U pacientů s DM 2, kteří snížili svou tělesnou hmotnost, došlo ke zlepšení inzulínové senzitivity. Naopak nebylo pozorováno zlepšení porušené sekrece inzulínu (Gerich 2000). U pacientů, kteří mají zvýšené riziko rozvoje DM 2 jako jsou příbuzní prvního stupně pacientů s DM 2, je popsána porušená sekrece inzulínu. Naopak IR byla pozorována v některých studiích v podobném zastoupení jak u pacientů s rodinnou zátěží DM 2 tak u zdravých kontrol bez této rodinné anamnézy. Podle těchto prací se může předpokládat, že porucha funkce β -buněk se objevuje ještě před rozvinutím IR (Gerich 2003).

Dyslipidémie, která je běžně pozorována u pacientů s DM 2, může přispívat k dysfunkci β -buněk. Mluví se o tzv. lipotoxicitě. U jedinců s predispozicí k DM 2 a pacientů s DM 2 přispívají k poruše β -buněk zvýšené hladiny volných mastných kyselin (VMK). Za fyziologických podmínek se VMK podílejí na glukózou stimulované sekreci inzulínu (Boden

2002). Při dlouhodobě zvýšené hladině VMK však sekrece inzulínu klesá (Schmitz et al. 2001). Na lipotoxicitě se také podílejí VLDL a LDL lipoproteinové částice, které vedou k apoptóze a tlumí proliferaci β -buněk. Částice HDL naopak chrání β -buňky před apoptózou. Lipotoxicita se neprojeví bez dlouhotrvající hyperglykémie (Roehrich 2003). Chronická expozice ostrůvků pankreatu suprafyziologické hladině glukózy tzv. glukotoxicita vede k apoptóze β -buněk. Současně dochází k útlumu exprese genu pro inzulín a ke snížené biosyntéze a sekreci inzulínu. Pro PGT a DM 2 je charakteristické snížené množství β -buněk, což je především způsobeno vystupňovanou apoptózou β -buněk. Vznik nových ostrůvků pankreatu či replikace β -buněk je normální či zvýšená. U pacientů s DM 2 je také snížená citlivost α -buněk na glukózu, což vede k hyperglukagonémii (Wajchenberg 2007).

Je pravděpodobné, že časná stádia DM 2 jsou charakterizována reverzibilní změnou množství i funkce β -buněk. Proto je důležitá časná diagnostika těchto pacientů (Wajchenberg 2007).

4) Pulzní sekrece inzulínu

U mnoha hormonů byla popsána pulzní sekrece, která má význam jak za fyziologických tak za patologických stavů. V roce 1922 Karen Hansenová popsala oscilace plazmatické hladiny glukózy v postabsorbčním stavu (tj. po nejméně 12-ti hodinovém lačnění) (Hansen 1923). Souvislost oscilací glykémie a hladin inzulínu byla zjištěna koncem 60. let (Anderson et al. 1967). O desetiletí později byly popsány oscilace hladin inzulínu (Lang et al. 1979).

Inzulín je z β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu uvolňován převážně v pulzech nasedajících na bazální (nepulzní) sekreci (Schmitz et al. 2002). Nalačno tvoří množství inzulínu uvolněné v průběhu pulzů přibližně 70 % celkové sekrece inzulínu. Při stimulaci glukózou se podíl pulzní sekrece inzulínu na celkové sekreci zvyšuje nejméně na 75 % (Porksen 2002; Porksen et al. 1997).

Pulzní sekrece inzulínu je charakterizována rychlými a pomalými (ultradiánními) pulzy. Rychlé pulzy o nízké amplitudě s periodicitou 5-15 min nasedají na pomalé oscilace o větší amplitudě s periodicitou 60-140 min (Porksen 2002). Rychlé pulzy inzulínu mají v portálním řečišti mnohem vyšší amplitudu než posthepatálně v systémovém řečišti. Proto se předpokládá, že rychlé pulzy inhibují zejména jaterní produkci glukózy a že jejich posthepatální efekt na utilizaci glukózy je jen malý (Meneilly et al. 1997; Porksen 2002). Pulzní podání inzulínu ve srovnání s kontinuálním účinněji inhibuje jaterní glukoneogenezi

(Bratusch-Marrain et al. 1986; Komjati et al. 1986). Expresse receptorů pro inzulín na hepatocytech byla signifikantně vyšší při pulzním podání inzulínu ve srovnání s kontinuální infúzí (Goodner et al. 1988).

Každá β -buňka pankreatu má pravděpodobně vlastní pacemaker, který řídí oscilace inzulínu (Bergstrom et al. 1989). Synchronizace sekrece inzulínu β -buněk jednotlivého ostrůvku pankreatu je podmíněna depolarizací membrány. Pokud není membrána depolarizována, je koordinace sekrece inzulínu β -buněk v každém ostrůvku pankreatu zajištěna signálními molekulami jako cAMP, ATP či NO, které prostupují spojením (gap junction) mezi jednotlivými β -buňkami (Bergsten 2000).

V izolovaných perfundovaných pankretech jsou rychlé pulzy inzulínu detekovatelné v médiu i při stabilní hladině glukózy. Proto se předpokládá, že rychlé pulzy inzulínu mohou být řízené tzv. intrapankreatickým neuronálním pacemakerem nezávisle na oscilacích glykémie (Stagner et al. 1980). Intrapankreatický neuronální pacemaker je tvořen intrapankreatickými ganglii, které mají spontánní pacemakerovou aktivitu (King et al. 1989). Nervová regulace sekrece inzulínu je důležitá pro koordinovanou pulzní sekreci inzulínu ze všech ostrůvků pankreatu. Po transplantaci ostrůvků pankreatu do portálního řečiště u potkanů byla pozorována plně synchronizovaná pulzní sekrece inzulínu přibližně za 7 měsíců, což odpovídá reinervaci těchto ostrůvků. U transplantovaných ostrůvků byla také popsána pomalejší frekvence oscilací inzulínu (14 min) ve srovnání s frekvencí 5 minut u perfundovaného pankreatu, což může ukazovat na odlišnou spontánní pacemakerovou aktivitu v játrech (Porksen et al. 1994).

In vivo se při regulaci rychlých pulzů uplatňuje oscilace glykémie a/nebo nervové vlivy. Při srovnání rychlých pulzů inzulínu nalačno a po stimulaci glukózou je zřejmé že, frekvence rychlých pulzů inzulínu odpovídá na změnu intervalu podávání infúze glukózy (tzv. entrainment); pulzy inzulínu jsou pravidelnější a jsou zřetelněji oddělené (Porksen et al. 2000). Při hyperglykémii je popisováno zvýšení frekvence oscilací inzulínemie (Porksen 2002).

Entrainment je definován jako změna frekvence pulzní sekrece inzulínu v reakci na změnu podnětu (např. synchronizace pulzní sekrece inzulínu s periodou 10 min při podání glukózy každou 10 min). Předpokládá se, že samotný neuronální intrapankreatický pacemaker je citlivý na změny hladiny glukózy (Porksen et al. 2000).

Nicméně autoři studií in vitro na izolovaných ostrůvkách pankreatu a perfundovaných pankretech nepozorovali změnu frekvence sekrece inzulínu následující po podání infúze glukózy v pravidelném intervalu 10. min a to ani za podmínek hyperglykémie. Dle

těchto autorů se při podání infúze s glukózou zvětší amplituda a množství inzulínu uvolněné během jednoho pulzu. Frekvence se nemění a zesílí se pouze pulzy, které jsou již přítomny a jsou snadněji detekovatelné (Ritzel et al. 2005; Stagner et al. 1980). Nicméně za podmínek in vitro chybí plná vaskularizace a inervace pankreatu.

Mnoho studií popsalo poruchu pulzní sekrece inzulínu jak u pacientů s DM 2 (Porksen 1999), tak u příbuzných prvního stupně pacientů s DM 2 (O'Rahilly et al. 1988), u obezity (Peiris et al. 1992, Zarkovic et al. 2000) nebo u starších jedinců (Meneilly et al. 1999). U diabetiků 2. typu i jejich příbuzných prvního stupně byla např. popsána porucha entrainmentu. Při periodickém podávání infúze glukózy u nich nedocházelo k odpovídající sekreci inzulínu. Tento jev označujeme jako odpojení oscilací glykémie od oscilací inzulínémie (Hollingdal et al. 2000).

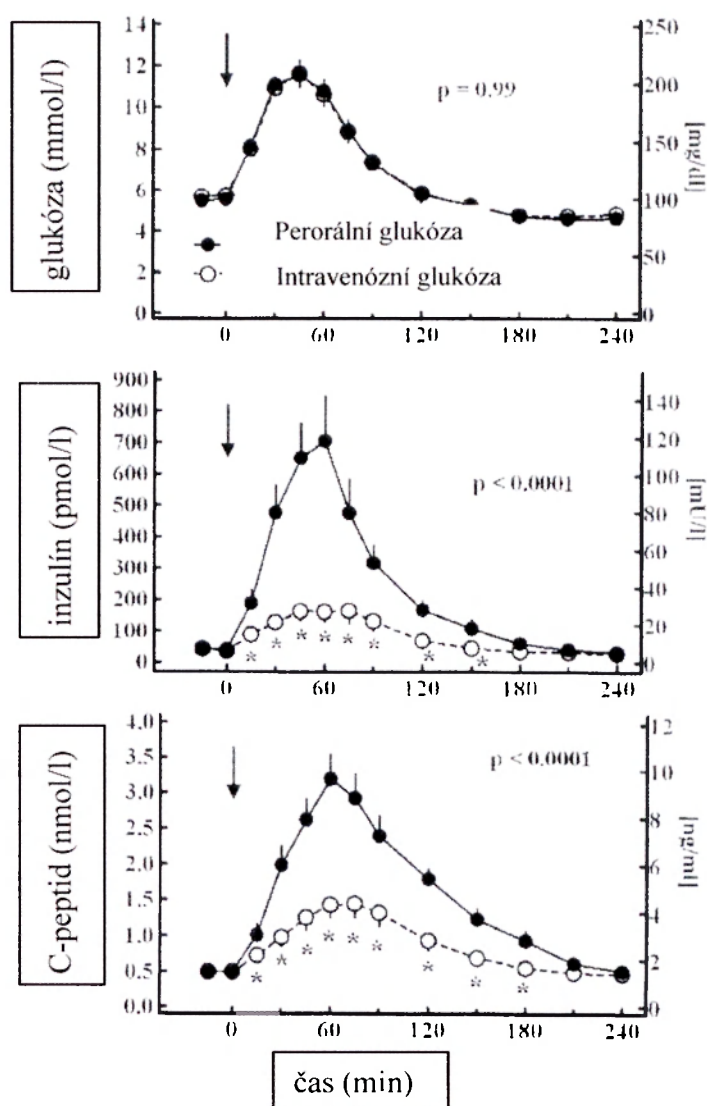
Mezi oscilacemi glykémie a pomalými pulzy inzulínu je jednoduchá zpětná vazba (Sturis et al. 1991). Pomalé pulzy inzulínu ovlivňují periferní utilizaci glukózy. Při supresi endogenní produkce inzulínu somatostatinem byla glykémie výrazněji snižována po pulzním podání inzulínu ve srovnání s konstantní rychlostí podávání inzulínu (Matthews et al. 1983; Schmitz et al. 1986; Paolisso et al. 1991). Některé studie však nepozorovaly významnější účinek pulzně podaného inzulínu (Verdin et al. 1984; Kerner et al. 1988). Rozdílné výsledky mohou být dány odlišným časováním podání inzulínu, dobou trvání studie a optimální hladinou glukagonu (cca 75 pg/ml), která je nutná k účinnosti pulzní sekrece inzulínu (Paolisso et al. 1991; Courtney et al. 2003). Pulzní podání inzulínu snížilo spotřebu inzulínu o 40 % oproti konstantnímu podání u pacientů s DM 1 a DM 2 (Bratusch-Marrain et al. 1986, Paolisso et al. 1988^{a,b}). Pulzní sekrecí je ovlivněn účinek inzulínu (inzulínová sensitivita) v periferních tkáních, což je dáno mj. kinetikou inzulínových receptorů, kdy kontinuální podání inzulínu ve srovnání s pulzním podáním vede k výraznější down-regulaci inzulínových receptorů (Porksen 2002). Méně výrazné oscilace hladin inzulínu popisované u DM 2 mohou pravděpodobně vést k down-regulaci inzulínových receptorů (Lang et al. 1981).

5) Inkretiny

Sekrece inzulínu je ovlivněna kromě glukózy dalšími substancemi jako jsou např. aminokyseliny, gastrointestinální peptidy a neurotransmitery. Hormonální kontrola zprostředkovaná gastrointestinálními peptidy se významně podílí na regulaci sekrece inzulínu. Tyto peptidy se označují jako inkretiny. Při navození stejné hladiny glykémie po perorálním podání glukózy je sekrece inzulínu o 30 - 60 % vyšší než při parenterálním podání

glukózy (tzv. inkretinový efekt) (Nauck et al. 1986) (Obr.3). Inkretiny se uvolňují po požití jídla z neuroendokrinních buněk gastrointestinálního traktu. Nejdůležitějšími inkretiny jsou glukagon-like peptid 1 (GLP-1) a glukózo-dependenční inzulínotropní polypeptid (GIP). GLP-1 je produkován v L-buňkách ilea a tlustého střeva a GIP v K-buňkách duodena a jejunu. Oba peptidy potencují glukózou stimulovanou sekreci inzulínu a tento efekt je závislý na dávce glukózy.

Obr. 3 Inkretinový efekt-při perorálním podání glukózy při oGTT bylo dosaženo signifikantně vyšších hladin inzulínu a C-peptidu ve srovnání s intravenózním podáním glukózy u zdravých jedinců. Při parentálním podání infúze s glukózou byla vždy docílena stejná glykémie jako při oGTT (volně dle Nauck et al. 2004).



Sekrece inkretinů se zvyšuje po příjmu potravy již při hladinách glukózy v rozmezí lačné glykémie, ačkoliv GLP-1 působí především při vyšších hladinách glukózy (Vilsboll et al.

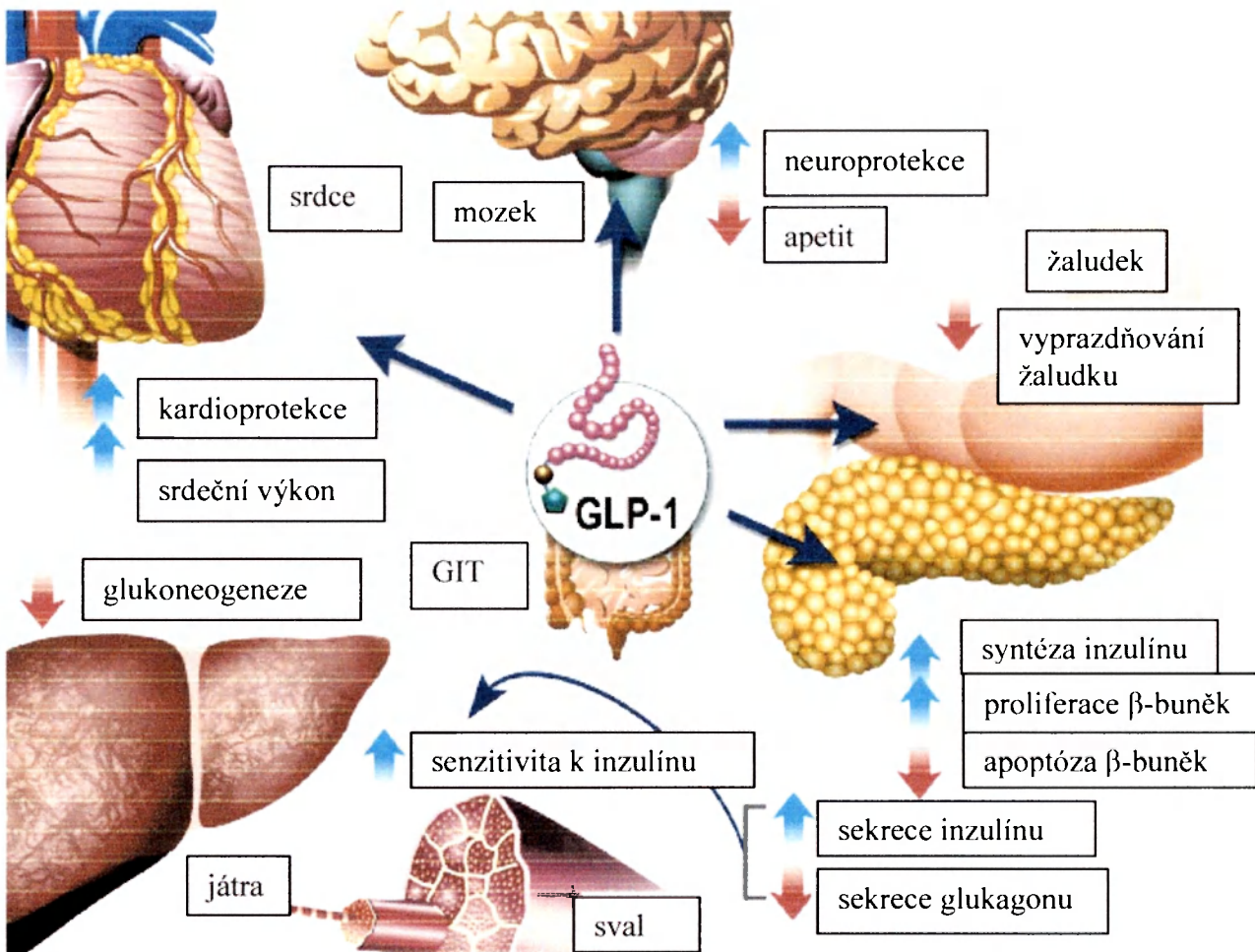
2003^a). Inkretiny zvyšují biosyntézu a aktivují transkripci inzulínového genu. Dále stimulují proliferaci β -buněk, zabraňují jejich apoptóze a podporují neogenesi ostrůvků pankreatu. Koncentrace GIP jsou v periferní cirkulaci desetinásobně vyšší než hladiny GLP-1, avšak GLP-1 je účinnější inkretin. Účinek obou inkretinů má u lidí aditivní charakter (Drucker 2006).

Receptory pro GLP-1 jsou u lidí exprimovány na β - a δ - buňkách pankreatu, v gastrointestinálním traktu, mozku, srdci a ledvinách. Sekreci GLP-1 stimulují mimo glukózy také lipidy, leptin, glycin a GABA. Sekrece GLP-1 je inhibována sympatickým nervovým systémem, glukagonem, VMK a somatostatinem. GLP-1 kromě přímého působení na β -buňky pankreatu působí na glukózové sensory v portálním řečišti, které předávají do CNS cestou parasympatického aferentního nervového systému informaci o hladině glukózy. Odpověď CNS je stimulace sekrece inzulínu eferentní parasympatickou nervovou dráhou. GLP-1 také zvyšuje lipolýzu, což vede k uvolnění VMK z tukové tkáně. Krátkodobě zvýšené hladiny VMK potencují glukózou stimulovanou sekreci inzulínu. GLP-1 podporuje utilizaci glukózy v játrech a svalové tkáni nezávisle na inzulínu. GLP-1 tlumí sekreci glukagonu přímo ovlivněním receptorů na α -buňkách a/nebo nepřímo stimulací sekrece inzulínu a somatostatinu (Drucker 2006; Wajchenberg 2007). Inhibice sekrece glukagonu pomíjí při dosažení normální glykémie či hypoglykémie. GLP-1 má anorexigenní účinek, omezuje příjem potravy a chuť k jídlu. Hladina GLP-1 je snížena u obézních pacientů a redukce váhy vedla k normalizaci hladin GLP-1 (Ranganath 2008). GLP-1 zpomaluje vyprazdňování žaludku, což vede k nižšímu vzestupu postprandiální glykémie. Současná distenze žaludku slouží jako periferní signál sytosti a snižuje gastrinem stimulovanou sekreci žaludeční kyseliny i exokrinní sekreci pankreatu. Pro žaludeční motilitu a sekreci je důležitá parasympatická inervace, neboť po vagotomii došlo k vymizení těchto účinků GLP-1 (Obr. 4 a 5) (Holst 2007).

GIP snižuje postprandiální glykémii stimulací sekrece inzulínu a postrádá účinky na vyprazdňování žaludku (Vilsboll et al. 2003^a). Receptory pro GIP jsou exprimovány mj. na α - a β - buňkách pankreatu, v tukové tkáni, mozku a žaludku. Ovlivněním receptorů na adipocytech má GIP v tukové tkáni podobné účinky jako inzulín. Zvyšuje utilizaci glukózy, aktivitu lipoproteinové lipázy, syntézu VMK a jejich zabudování do tukové tkáně a inhibuje lipolýzu (Flatt 2008). Myši s defektním receptorem pro GIP (GIPR^{-/-}) měly méně tukové tkáně, nepřibíraly na váze po příjmu potravy s vysokým obsahem tuků a měly lepší inzulínovou

senzitivitu. Nadměrný příjem tuků potravou vede ke zvýšené sekreci GIP. Hypersekrece GIP působí zvýšené ukládání triacylglycerolů do adipocytů, což vede k rozvoji obezity provázené IR a následně DM 2. U lidí GIP při exogenním podání pravděpodobně zvyšuje příjem potravy

Obr. 4. GLP-1 má přímý účinek na mozek, srdce, žaludek a pankreas, na játra a sval působí nepřímo. GIT-gastrointestinální trakt (volně dle Drucker 2006).



a snižuje výdej energie (Drucker 2006; Ranganath 2008)(Obr.5).

U pacientů s DM 2 je popisována snížená sekrece GLP-1, který však má zachovanou inzulínotropní aktivitu. Při podání infúze s GLP-1 se u pacientů s DM 2 obnovila první a druhá fáze sekrece inzulínu. Vzhledem k tomu, že pacienti se zvýšeným rizikem rozvoje DM 2 jako jsou příbuzní prvního stupně pacientů s DM 2 a ženy s gestačním diabetem v anamnéze, neměli porušenou sekreci GLP-1, předpokládá se, že porucha sekrece GLP-1 je spíš funkčního

charakteru, vyplývající z metabolického stavu DM 2. Ve studii jednovaječných dvojčat se snížená sekrece GLP-1 vyskytovala pouze u jedince s rozvinutým DM 2 (Holst 2007). Pacienti s krátce trvajícím DM 2 měli stejnou sekreci GLP-1 při oGTT či testu se standardním jídlem ve srovnání se zdravými kontrolami, což podporuje tezi, že GLP-1 není pravděpodobně rozhodujícím faktorem při etiopatogenezi DM 2 (Vollmer et al. 2008).

Agonisté GLP-1 a inhibitory dipeptidyl peptidázy IV (prodlužují biologický poločas inkretinů inhibicí jejich degradace) jsou také úspěšně využívány k léčbě DM 2. Snižují glykémii,

Obr.5 Přehled účinků GLP-1 a GIP. P-označuje přítomnost účinku; N-označuje chybění účinku (volně dle Drucker 2007).

	GLP-1	GIP
Pankreas		
Stimulace glukózou stimulovanou sekreci inzulínu	P	P
Zvýšení transkripce inzulínových genů a biosyntézy inzulínu	P	P
Inhibice sekrece glukagonu	P	N
Stimulace sekrece somatostatínu	P	N
Zvýšení odpovědi β -buněk na glukózu	P	P
Stimulace neogeneze a proliferace β -buněk	P	P
Inhibice apoptózy β -buněk	P	P
Zvýšení exprese klíčových genů důležitých pro diferenciaci funkce β -buněk	P	P
Gastrointestinální trakt		
Inhibice vyprazdňování žaludku	P	N
Inhibice sekrece žaludečních šťáv	P	P
CNS		
Inhibice příjmu potravy a vody	P	N
Stimulace pocitu sytosti a úbytku na váze	P	N
Zlepšení paměti a neuroprotektce	P	P
Aktivace nervové dráhy vedoucí k nevolnosti/zvracení	P	N
Srdce		
Úprava kardiovaskulárních funkcí po ischemické příhodě	P	N
Snížení rozsahu nekrózy kardiomyocytů při experimentálním poškození	P	N
Tuková tkáň		
Inzulínu podobné lipogenní účinky	N	P
Ukládání tukových zásob	N	P
Kost		
Anabolický a proliferační účinek	N	P
Resorpce	N	N

hladinu glykovaného hemoglobinu, VMK, tělesnou váhu a chuť k jídlu. Zlepšují také IS (Zander et al. 2002). GIP má naopak u pacientů s DM 2 sníženou inzulínotropní aktivitu a jeho sekrece byla popisována jako normální, snížená či zvýšená (Flatt 2008). Hladina GIP byla vyšší po podání standardní snídani či při oGTT u pacientů s DM 2 ve srovnání se zdravými kontrolami. U příbuzných prvního stupně pacientů s DM 2 s normální glukózovou tolerancí byl pozorován snížený inzulínotropní účinek GIP ve srovnání se zdravými kontrolami bez této rodinné anamnézy. Předpokládala se primární geneticky podmíněná porucha účinku GIP (Meier 2001). Nicméně později byla prokázána porucha inzulínotropního účinku GIP nejen u pacientů s DM 2, ale i u pacientů s jinými typy diabetu, jako je DM 1, sekundární diabetes při chronické pankreatitidě, diabetes typu MODY či LADA. Porucha sekrece GIP podle této studie je spíše následkem metabolického stavu při diabetickém onemocnění, ačkoliv význam genetických faktorů autoři zcela nevylučují (Vilsboll et al. 2003^b). K léčbě DM 2 nelze GIP využít vzhledem k rezistenci β-buněk na jeho účinek (Drucker 2006; Ranganath 2008).

6) Syndrom polycystických ovarií a sekrece inzulínu

PCOS se považuje za rizikový faktor rozvoje porušené glukózové homeostázy. Porušená glukózová tolerance (PGT) se vyskytuje až u 30 % a diabetes mellitus 2. typu až u 10 % těchto žen (Ehrmann et al. 1999; Legro et al. 1999). Hyperinzulinémie a IR je častým nálezem u žen s PCOS. Inzulín má klíčovou roli při vzniku a manifestaci PCOS (Obr.1). IR je tkáňově specifická, postihuje tukovou tkáň a sval, ale ne ovárium. Ovárium exprimuje receptory pro inzulín a inzulín synergicky s LH aktivuje klíčové enzymy steroidogeneze, což vede k nadprodukcii androgenů (Dunaif 1997). Inzulín také nepřímo zvyšuje počet receptorů pro LH v ovariu a zvyšuje citlivost gonadotropů uvolňujících LH na účinek GnRH (Poretsky 1999). Inzulín inhibuje syntézu IGFBP-1 a zvyšuje tak dostupnost IGF-1 pro periferní tkáň. IGF-1 se podílí na růstu a formaci cyst ovarií. Podání inzulínu vede k expresi receptorů pro IGF-1 v ovariu, což zvyšuje účinek jak IGF-1, tak samotného inzulínu (Gambineri et al. 2002).

U žen s PCOS byla popsána postreceptorová porucha signalizační kaskády inzulínu. Byla prokázána snížená exprese GLUT-4 (na inzulínu závislý glukózový transportér typu 4) v tukové tkáni, svalu i v ovariu vedoucí k inzulínové rezistenci (Diamanti-Kandarakis et al.

Handwritten notes:
 LH - aktivace ovárií → PA
 1 → Prol. R. pro LH v ov.
 Prol. gonadotropin. unit. - H. ov. 6. 2. 18
 1 → inhib. IGF-1 → Prol. IGF-1
 inhib. + tvorba cyst

2008). Popisovaná hyperinzulinémie u žen s PCOS zvyšuje produkci ovariálních androgenů. Inzulín zvyšuje také biologickou dostupnost testosteronu supresí syntézy SHBG. Testosteron může nepřímo přispívat k inzulínové rezistenci. Nadbytek androgenů vede k přednostnímu ukládání viscerálního tuku, který je rizikový pro rozvoj IR, metabolického syndromu a kardiovaskulárních onemocnění (Nestler et al. 1991; Holte 1994). Dále testosteron usnadňuje uvolnění VMK z abdominální tukové tkáně a pravděpodobně přímo snižuje inzulínem zprostředkovanou utilizaci glukózy ve svalu, zvyšuje jaterní glukoneogenezi a snižuje jaterní extrakci inzulínu, což přispívá k periferní hyperinzulinémii (Holte et al. 1995).

Hyperinzulinémie byla u žen s PCOS prvně popsána v 80. letech minulého století (Burghen et al. 1980). Je důsledkem kombinace inzulínové rezistence (IR), kompenzatorní vyšší sekrece inzulínu a snížené clearance inzulínu v játrech (Dunaif 1997; Holte et al. 1994; Holte et al. 1995). U části pacientek s PCOS může být primární porucha spíše v nadměrné sekreci inzulínu než ve snížené inzulínové senzitivitě (Holte et al. 1994). Inzulínová rezistence se vyskytuje u řady, ale ne u všech pacientek s PCOS. Vzájemné souvislosti jsou zastřeny často přítomnou obezitou. Pacientky s PCOS jsou totiž podle různých sestav v 15 - 50 % obézní (Pasquali et al. 2003) a to většinou s preferenční lokalizací tuku v abdominální oblasti. I ženy s PCOS s BMI v normálním rozmezí měly podle některých studií více viscerálního tuku než zdravé kontroly (Kirchengast a Huber 2001). Nicméně některé studie neprokázaly rozdíl v množství viscerální tukové tkáně mezi ženami s PCOS a zdravými kontrolami, ačkoliv ženy s PCOS byly více inzulín-rezistentní. Předpokládá se, že ženy s PCOS mohou mít ektopickou tukovou tkáň v játrech či ve svalech (Barber et al. 2008).

Není vyloučené, že na rozdílných výsledcích studií o výskytu IR u PCOS se podílejí i zřetelné etnické vlivy (např. vyšší výskyt IR a abdominální obezity u hispánsko-americké populace). Práce pocházející z USA nebo Asie popisují IR nezávisle na BMI, tedy u štíhlých i obézních žen, a tak považují IR za poruchu patřící do projevů PCOS (Dunaif et al. 1992; Toprak et al. 2001), zatímco v pracích evropských autorů se setkáváme s názorem, že IR je spíše získaným faktorem v důsledku obezity (Ovesen et al. 1993). Při redukci váhy došlo ke zlepšení IS, ale nebylo pozorováno snížení časné odpovědi inzulínu na i.v. podání glukózy, což svědčí pro primární poruchu sekrece inzulínu u žen s PCOS. Vysvětlením vystupňované sekrece inzulínu může být zvýšená citlivost na glukózu nebo zvýšená celková masa β -buněk. U žen s PCOS jsou popsány nižší hladiny glykovaného hemoglobinu ve spojení s hyperinzulinémií (Holte et al. 1995; Holte 1998).

Porucha pulzní sekrece inzulínu a nepravidelná sekrece inzulínu je považována za časný znak poruchy funkce β -buňky (Bingley et al. 1992; O'Rahilly et al. 1988; Schmitz et al. 2001). Rychlé pulzy inzulínu u žen s PCOS byly hodnoceny v jedné studii popisující inzulínovou pulzní sekreci před a po léčbě ethinyl-estradiolem v kombinaci s cyproteron-acetátem. Frekvence rychlých pulzů inzulínu a celkové množství uvolněného inzulínu a inzulínu uvolněném během jednoho pulzu byla srovnatelná mezi ženami s PCOS a zdravými kontrolami (Armstrong 2001). Ve studii popisující pomalé pulzy inzulínu byla zjištěna významně vyšší bazální sekrece inzulínu a oslabená odpověď inzulínu na podání jídla, se snížením amplitudy pulzu inzulínu bez změny frekvence (O'Meara et al. 1993).

V jediné studii na omezeném souboru pacientek s PCOS nebyla pozorována porušená sekrece inkretinů, i přestože ženy s PCOS měly vyšší koncentraci inzulínu a C-peptidu (Gama et al. 1996).

Cíle práce

- 1) Vyšetřit jak je funkce β -buněk ovlivněna rodinnou zátěží DM 2 u žen s PCOS**
- 2) Vyšetřit pulzní sekreci inzulínu u žen s PCOS**
- 3) Vyšetřit sekreci inkretinů u žen s PCOS**
- 4) Vyšetřit prevalenci poruch sacharidového metabolismu u žen s PCOS
a možnosti jejich predikce**

Soubory a metodika

1) Ve studii zabývající se rodinnou zátěží DM 2 u pacientek s PCOS a ovlivněním inzulínové sensitivity (IS) a funkce β buněk bylo zahrnuto 22 žen s PCOS, z toho 8 pacientek (věk $27,5 \pm 3,2$ let; BMI $23,54 \pm 6,04$ kg/m²) mělo příbuzného prvního stupně postiženého DM 2 (PCOS RA+) a 14 pacientek (věk $24,2 \pm 4,8$ let; BMI $22,52 \pm 2,8$ kg/m²) bylo bez rodinné anamnézy DM 2 (PCOS RA-). Diagnóza PCOS byla definována dle kritérií NIH (Zawadski a Dunaif 1992). Zdravých kontrol bylo celkově 13 ve věku $28,7 \pm 5,6$ let a s BMI $21,82 \pm 2,24$ kg/m². Byla provedena následující vyšetření: bazální odběry krve nalačno, oGTT, euglykemický hyperinzulinemický clamp a argininový test. Glukózová tolerance byla hodnocena dle WHO kritérii (1999). Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty \pm SD.

2) Ve studii zabývající se pulzní sekrecí inzulínu bylo vyšetřeno 8 žen s PCOS ve věku 25,1 let (KI 21,8-29,5); BMI 21,9 kg/m² (KI 20,2-23,5) a 7 zdravých žen (věk 30,2 (KI 25,1-38,1) let; BMI 20,1 (KI 18,9-21,2) kg/m²). Diagnóza PCOS byla stanovena dle ESHRE/ASRM kritérií (Revised 2003 consensus). Obě skupiny pacientek podstoupily nalačno bazální odběry a odběry každou minutu celkově po 60 minut k hodnocení rychlých pulzů inzulínu. Pulzní sekrece inzulínu byla hodnocena dekonvoluční analýzou (software AutoDecon) a pravidelnost sekrece inzulínu pomocí metody approximate entropy (ApEn). Inzulínová senzitivita byla hodnocena indexem QUICKI. Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty a 95% konfidenční interval (KI).

3) Ve studii sledující sekreci inkretinů u žen s PCOS bylo celkově zahrnuto 21 žen s PCOS s normální glukózovou tolerancí a bez rodinné anamnézy DM 2 (věk $25,8 \pm 4,1$ let; BMI $21,6 \pm 1,7$ kg/m²) a 13 zdravých žen (věk $28,5 \pm 7,2$ let; BMI $20,3 \pm 2,5$ kg/m²). Ke stanovení diagnózy PCOS byla využita ESHRE/ASRM kritéria (Revised 2003 consensus). Odběry krve nalačno na stanovení hladiny glukózy, inzulínu a C-peptidu proběhly v 0.min před podáním 75 g glukózy při oGTT a dále pokračovaly odběry krve po podání glukózy v 30., 60., 90., 120., 150., a 180.min. Hladiny aktivního GLP-1 a celkového GIP byly stanoveny v 0., 30., 60., 120. a 180. min. IS byla hodnocena nalačno indexem QUICKI a během oGTT za využití OGIS. Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty \pm SD.

4) Ve studii sledující prevalenci inzulinové resistance a zastoupení poruchy glukózové tolerance a/nebo DM 2 u žen s PCOS bylo celkově zahrnuto 244 žen s PCOS ve věku $27 \pm 7,5$ let s BMI $27,5 \pm 6,9$ kg/m². Tyto ženy byly srovnány s kontrolním souborem zdravých žen (n=57; $26,8 \pm 5,8$ let; BMI $21,3 \pm 2,1$ kg/m²). PCOS byl diagnostikován dle ESHRE/ASRM kritérií (Revised 2003 consensus). Glykémie, kompletní lipidogram, inzulinémie a hladina C-peptidu byla stanovena z bazálního odběru nalačno. Dále ženy podstoupily oGTT. Glukózová tolerance byla hodnocena dle WHO kritérií (1999). Inzulinová senzitivita byla hodnocena dle HOMA-IR a QUICKI. Inzulinová resistance byla definována jako hodnota HOMA-IR vyšší než 95. percentil u zdravých kontrol ($2,29$ mmol x mIU/l²). Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty \pm SD.

Užité metody a výpočty

HOMA-IR (homeostatic model assessment of insulin resistance) (Matthews et al. 1985):

bazální inzulinémie (mIU/l) x bazální glykémie (mmol/l) /22,5

QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index) (Katz et al. 2000):

$1 / ((\log \text{ bazální inzulinémie (mIU/l)}) + \log \text{ bazální glykémie (mg/dl)})$

OGIS (oral glucose insulin sensitivity index) (Mari et al. 2001):

popisuje clearance glukózy při postprandiální části oGTT

Jaterní extrakce inzulinu (Tura et al. 2001): množství inzulinu (%) vstupující do jater; podíl jaterní clearance inzulinu (l/min) a průtoku krve játry (l/min). Jaterní extrakce inzulinu byla počítána bazálně a během oGTT jako molární poměr hladiny C-peptidu k inzulinémii podle „model-derived method“

Index volného testosteronu: $100 \times \text{testosteron (nmol/l)} / \text{SHBG (nmol/l)}$

oGTT (orální glukózový toleranční test): glykémie, inzulinémie a hladina C-peptidu je stanovena z bazálního vzorku krve nalačno. Po podání 75 g glukózy p.o. pokračují odběry krve v 30., 60., 90., 120., 150., a 180. minutě.

Euglykemický hyperinzulinemický clamp (DeFronzo et al. 1979)

Při euglykemickém hyperinzulinemickém clampu je pacientovi zavedena jedna kanyla do kubitální žíly sloužící k infúzi 15% glukózy a současnému podání inzulínu o rychlosti 1 mIU. kg⁻¹.min⁻¹ s cílem dosáhnout průměrné glykémie 5,0 mmol/l. Druhý žilní vstup je na dorsu ruky a slouží k odběrům arterializované krve (ruka s kanylou je uložena pod vyhřívací podušku) na stanovení inzulinémie před zahájením clampu, v 90., 105. a 120. minutě vyšetření a glykémie opakovaně každou 5. min celkově po 120 minut. Uvedené výpočty jsou počítány z 310ti-minutového intervalu mezi 90. a 120. minutou, kdy je dosaženo ustáleného stavu s glykemií přibližně 5,0 mmol/l (CV do 5%).

M: spotřeba glukózy (μmol/(kg.min)) - množství infundované glukózy nutné k udržení cílové glykémie 5,0 mmol/l (CV do 5%)

ISI: index inzulinové senzitivity (μmol.l/(kg.min.mIU)) = M/I (I je průměrná inzulinémie ve sledovaném časovém intervalu) zkorigováno na kg váhy

MCRg: metabolická clearance glukózy (ml/(kg.min)) - podíl množství infundované glukózy nutné k udržení cílové glykémie a průměrné glykémie ve sledovaném časovém intervalu

Argininový test (Larsson et al. 1998)

Při argininovém testu jsou zavedeny kanyly do obou kubitálních žil. Jeden krevní vstup slouží k odběrům krve a podání bolusu argininu a druhý vstup je určen k podání infúze glukózy. Bazální odběry na stanovení hladiny inzulínu a glukagonu jsou odebrány -5. a -2. minutu, následně je podán bolus 5 g argininu (0.min). Odběry pokračují 2., 3., 4. a 5. minutou po podání argininu. Po dokončení první řady odběrů se začne podávat infúze s 15% glukózou s cílem zvýšit glykémii na 13-15 mmol/l. Po dosažení cílové glykémie se opakuje druhá řada odběrů v stejném schématu jako předchozí odběry. Maximální odpověď α a β buněk je docílena dalším podáním argininu s infúzí glukózy. Cílem je dosažení glykémie > 25 mmol/l. V našich studiích nebyla maximální sekreční odpověď hodnocena. Podrobněji viz Obr. 5.

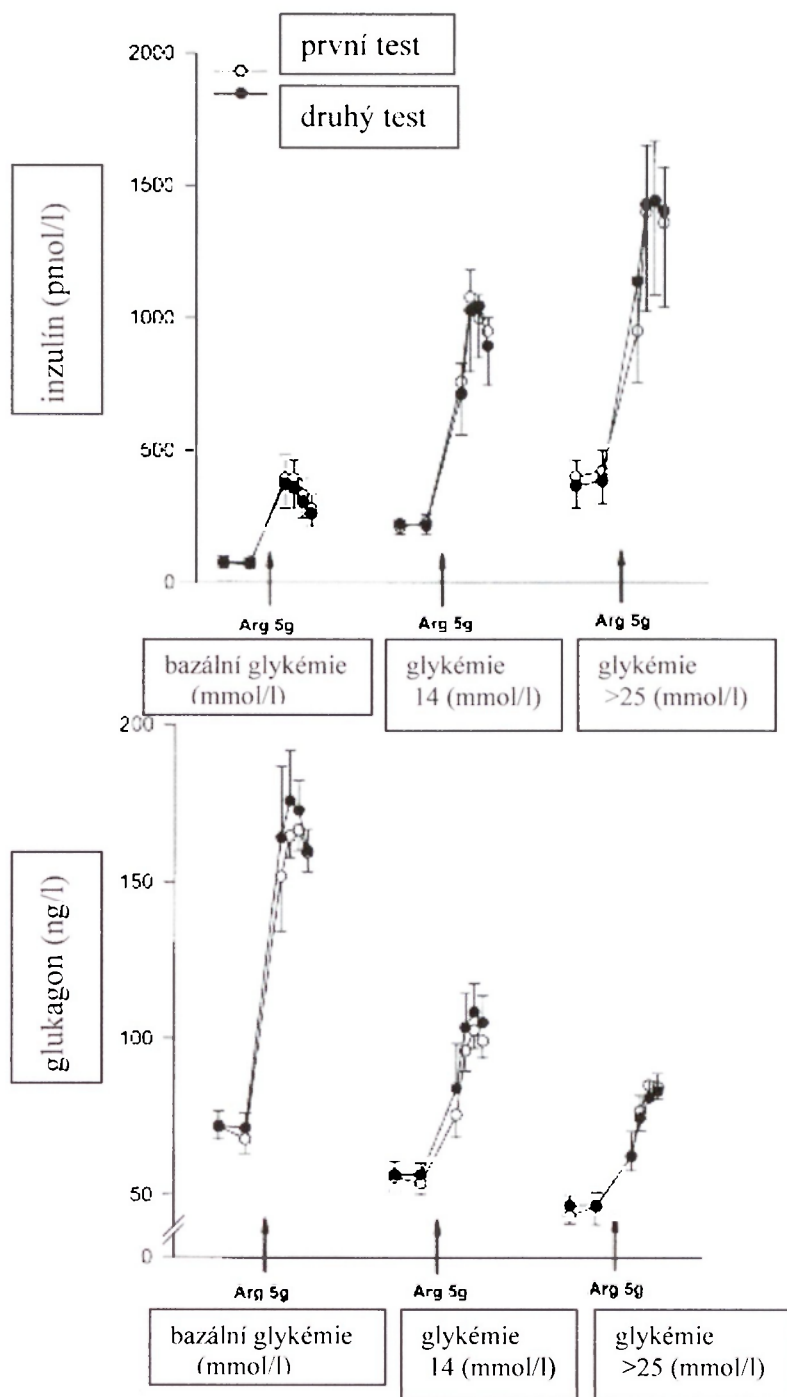
AIR: akutní odpověď inzulínu na arginin (mUI/l) - průměrná inzulinémie mezi 2.-5. minutou po podání bolusu argininu minus průměrná bazální inzulinémie. Kvantifikuje přímou a akutní odpověď β-buněk na náhlé podání argininu, což úzce souvisí s mechanismem exocytózy inzulínu z β-buněk

AIR_{gbas}: akutní odpověď inzulínu na arginin při bazální glykémii

AIR_{g14}: akutní odpověď inzulínu na arginin při navozené hyperglykémii (průměr 14 mmol/l)

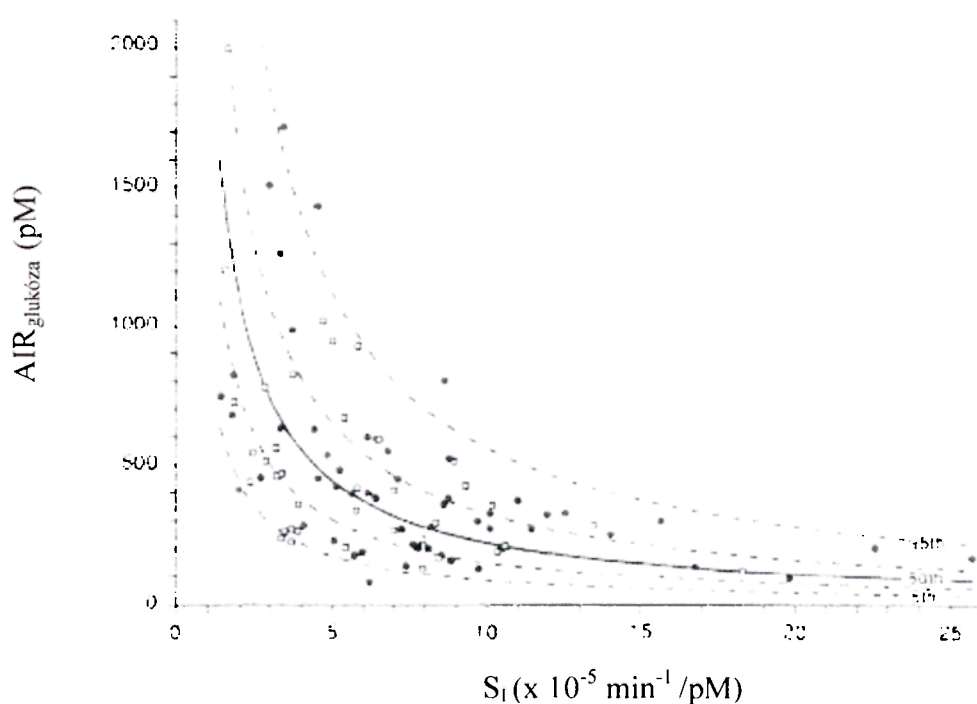
Slope: $\Delta AIR/\Delta G$; $\Delta AIR = AIR_{g14} - AIR_{gbas}$; ΔG je vzestup glykémie vyvolaný infúzí glukózy.
 Je to ukazatel potenciace sekrece inzulínu při hyperglykémii

Obr.5 Hladina inzulínu a glukagonu při dvou po sobě následujících argininových testech (sledování reprodukovatelnosti testu) při různých cílových hladinách glykémie u sedmi zdravých žen (volně dle Larsson a Ahren 1998).



Dispoziční index (Kahn et al. 1993): v naší studii je měřen z hodnot ISI (euglykemický hyperinzulinemický clamp), AIR_{gbas} , AIR_{g14} a $\text{Slope}_{\text{AIR}}$ (argininový test) (viz Obr. 6)

Obr. 6 Hyperbolická závislost mezi sekrecí inzulínu ($AIR_{\text{glukóza}}$) a inzulínovou senzitivitou (S_I) u 55 mužů (•) a 38 žen (o). Velké změny IS u inzulín-senzitivních jedinců nevedou k tak významným změnám v koncentracích inzulínu. Naopak u inzulín-rezistentních jedinců i malé změny IS vedou k relativně velkým změnám v hladinách inzulínu. Plná čára představuje optimální vztah mezi sekrecí inzulínu a IS (50. percentil). Přerušované čáry jsou 95., 75. a 5. percentil (převzato volně podle Kahn et al. 1993). $AIR_{\text{glukóza}}$ – časná odpověď inzulínu při ivGTT. S_I – index inzulínové senzitivity počítán z ivGTT.



Pulzní sekrece inzulínu (Veldhuis a Johnson 1994)

Po zavedení kanyly do kubitální žíly byla krev odebírána každou minutu celkově po 60 minut k hodnocení rychlých pulzů inzulínu. Pulzní sekrece inzulínu byla hodnocena dekonvoluční analýzou (software AutoDecon). **Dekonvoluční analýza** je matematická procedura vyvinutá pro výpočet základních znaků signálů či událostí, které nejsou pozorovány přímo (např. pulz, seismologická vlna). Poskytuje informace o očekávaném a na čase závislém oslabení původního signálu. V endokrinologii tato metoda hodnotí simultánně sekreci a eliminaci vybraného hormonu za pomoci konvolučního integrálu (Veldhuis a Johnson 1994).

Dekonvoluční analýzou lze u pulzní sekrece inzulínu hodnotit následující parametry: 1) určitý počet oddělených, inzulínových pulzů objevujících se v určitém čase a mající 2) individuální amplitudu (maximální sekreční výdej dosažený během pulzu); 3) obecný poločas pulzu (trvání algebraického, gaussovského pulzu v polovině maximální amplitudy), který je superimponován na 4) bazální, časově neměnnou sekreci inzulínu a 5) model mono-biexponenciální hormonální eliminace v systémové cirkulaci (Mulligan et al. 1994; Porksen 2002). Bi-exponenciální model eliminace inzulínu byl stanoven v minulosti s prvním (rychlým) poločasem inzulínu 2,8 min a s druhým (pomalým) poločasem 5,0 min (Johnson et al. 2004). My jsme stanovili poločas eliminace inzulínu na 3,3 min (KI 2,8-4,1) u žen s PCOS a 3,2 min (KI 2,6-4,1) u zdravých žen za využití softwaru AutoDecon. Software AutoDecon dále poskytuje informace o frekvenci pulzů inzulínu během 60 min. intervalu mezi pulzy, množství inzulínu uvolněné během jednoho pulzu (mUI/l), amplitudě pulzu (maximální sekreční výdej v jednom pulzu, mUI/l/min), AUC_{0-60} (plocha pod křivkou, celková sekrece inzulínu během 60 min, mUI/l), obecném poločase (mUI/min) a bazální sekreci (mUI/l/min). K hodnocení pravidelnosti sekrece inzulínu byla použita metoda **approximate entropy (ApEn)**. Větší pravidelnost (nižší hodnota ApEn) svědčí pro větší autonomii hodnocené hormonální sekrece a naopak větší nepravidelnost (vyšší hodnota ApEn) předpokládá významnější vnější vlivy (Pincus et al. 1999).

Výsledky

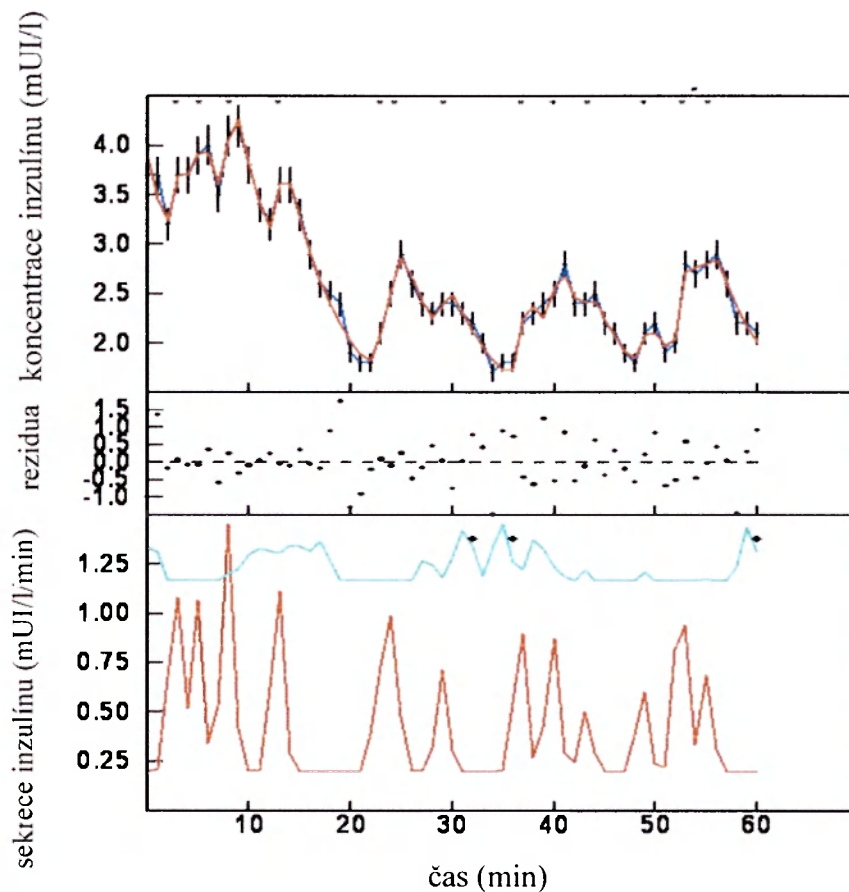
1) Ve studii zabývající se ovlivněním funkce β -buněk rodinnou zátěží DM 2 měly pacientky s PCOS a s pozitivní rodinnou anamnézou DM 2 (PCOS RA+) signifikantně vyšší hladinu triglyceridů ($p < 0,005$) a nižší hladinu HDL-cholesterolu ($p < 0,005$) ve srovnání s ženami s PCOS bez rodinné zátěže DM 2 (PCOS RA-) a kontrolní skupinou. PCOS RA+ i PCOS RA- měly vyšší hladinu testosteronu ($p < 0,002$) a LH ($p < 0,002$) ve srovnání s kontrolní skupinou. PCOS RA+ měly nižší hladinu DHEAS než PCOS RA- a kontrolní skupina ($p < 0,0001$). Bazální glykémie se nelišila mezi skupinami na rozdíl od bazální inzulinémie, která byla signifikantně vyšší u PCOS ve srovnání se zdravými probandkami ($p < 0,04$). PCOS RA+ měly vyšší hodnoty HOMA-1R ($p < 0,05$) a snížený index inzulinové senzitivity stanovený euglykemickým clampem ve srovnání se zdravými kontrolami ($p < 0,07$). PCOS RA- se v těchto ukazatelích nelišily od kontrolní skupiny. AIR_{gbas} při argininovém testu byla zvýšená u PCOS RA+ ve srovnání s PCOS RA- ($p < 0,05$), AIR_{g14} a $slope_{AIR}$ se nelišily mezi skupinami. PCOS RA+ a PCOS RA- se nelišily mezi sebou v hodnotách dispozičního indexu. PCOS RA- měly signifikantně vyšší hladinu glukagonu ve srovnání se zdravými ženami ($p < 0,02$).

2) Ve studii zabývající se pulzní sekrecí inzulinu měly ženy s PCOS podle očekávání vyšší hladinu testosteronu ($p < 0,02$), prolaktinu ($p < 0,05$), 17-OHP ($p < 0,03$) a estradiolu ($p < 0,05$) a nižší hladinu SHBG ($p < 0,0006$) než zdravé kontroly. Nejistili jsme rozdíly v bazální glykémii, inzulinémii, hladině C-peptidu a QUICKI. Ženy s PCOS i kontrolní skupina měly průměrnou frekvenci 10 rychlých pulzů inzulinu s rozmezím od 6 do 13 pulzů během 60 minut (Obr. 7). Nepozorovali jsme rozdíl v počtu pulzů, bazální sekreci inzulinu, amplitudě pulzů, množství inzulinu uvolněném během jednoho pulzu a intervalu mezi pulzy u pacientek s PCOS ve srovnání s kontrolní skupinou. U žen s PCOS byla celkově tendence k širším pulzům inzulinu určeno tzv. obecným poločasem (1,97 (KI 1,1-3,37) vs 0,89 (KI 0,51-1,49) mUI/min; $p < 0,07$). Bazální sekrece inzulinu korelovala negativně s HDL-cholesterolem ($r = -0,85$; $p < 0,004$), QUICKI ($r = -0,77$; $p < 0,002$) a pozitivně s hladinou triglyceridů ($r = 0,75$; $p < 0,03$). AUC_{0-60} korelovala negativně s QUICKI ($r = -0,99$; $p = 0,0001$), HDL-cholesterolem ($r = -0,89$; $p < 0,0006$) a pozitivně s hladinou triglyceridů ($r = 0,78$; $p < 0,009$). Amplituda pulzu inzulinu ($r = -0,61$; $p < 0,03$) a množství inzulinu uvolněné během jednoho pulzu ($r = -0,59$; $p < 0,03$) korelovaly negativně s QUICKI. Obecný poločas pulzu inzulinu koreloval pozitivně s koncentrací prolaktinu ($r = 0,76$; $p < 0,008$) a kortizolu ($r = 0,64$; $p < 0,03$). Množství inzulinu

uvolněné během jednoho pulzu korelovalo pozitivně s hladinou testosteronu ($r=0,61$; $p<0,05$;) a negativně s SHBG ($r=-0,88$; $p<0,0004$). Pravidelnost sekrece inzulinu hodnocena ApEn se nelišila mezi PCOS a zdravými kontrolami (1,14 (1,095-1,178) vs 1,079 (0,94-1,164); $p<0,2$). ApEn pozitivně korelovalo s hladinou prolaktinu ($r=0,68$; $p<0,03$) a s BMI ($r=0,57$; $p<0,04$).

3) Ve studii sledující sekreci inkretinů u žen s PCOS nebyla pozorována rozdílná inzulinová senzitivita a jaterní extrakce inzulinu nalačno a během oGTT ve srovnání s kontrolní skupinou. Ženy s PCOS měly signifikantně vyšší hladinu testosteronu ($p<0,00009$) a index volného testosteronu ($p<0,002$) než zdravé kontroly, i přestože SHBG nebylo rozdílné. Bazální glykémie byla stejná u žen s PCOS a zdravých kontrol ($p<0,69$). Ženy s PCOS měly vyšší hladinu C-peptidu než zdravé

Obr. 7. Rychlé pulzy inzulinu u zdravé ženy. Rezidua-rozdíl mezi měřenou a předpokládanou hodnotou.



kontroly ($p < 0,05$) a měly tendenci k vyšší inzulinémii ($p < 0,12$). Hladiny celkového GIP byly signifikantně vyšší u žen s PCOS ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,001$). Hladina aktivního GLP-1 měla signifikantně odlišný charakter v závislosti na čase během oGTT u žen s PCOS ve srovnání se zdravými ženami. Koncentrace aktivního GLP-1 byly podobné u žen s PCOS a kontrolami během časné fáze oGTT do 60. minuty, ale ve v 180. minutě dosáhly signifikantně nižších hladin u žen s PCOS oproti skupině zdravých žen ($p < 0,05$). Hladina C-peptidu pozitivně korelovala s koncentrací celkového GIP v 0. ($r = 0,40$; $p < 0,04$), 60. ($r = 0,46$; $p < 0,01$) a 180. minutě ($r = 0,60$; $p < 0,002$). Nebyla pozorována korelace mezi aktivním GLP-1 a C-peptidem. Celkový GIP ani aktivní GLP-1 nekorelovaly s inzulinem.

4) Ve studii sledující prevalenci poruch sacharidového metabolismu byla IR pozorována celkově u 40,2 % žen s PCOS. Ve skupině bylo 49,2 % štíhlých, 22,9 % s nadváhou a 27,9 % obézních žen s PCOS. IR byla nalezena u 14,6 % štíhlých, 42,5 % s nadváhou a u 71,8 % obézních žen s PCOS ($\chi^2 = 61,81$; $p < 0,0001$). Zdravé kontroly měly nadváhu v 4 % a obezitu v 10,5 %. IR byla přítomna u 7,2 % kontrolních probandek. Inzulín-rezistentní pacientky s PCOS byly ve srovnání s IS pacientkami signifikantně starší ($p < 0,003$), obéznější ($p < 0,0001$) a měly vyšší jak systolický ($p < 0,0001$) tak diastolický tlak ($p < 0,0001$). Měly také vyšší hladinu triglyceridů ($p < 0,02$), celkového cholesterolu ($p < 0,05$), lačnou glykémii ($p < 0,0001$), inzulinémii ($p < 0,0001$), hladinu C-peptidu ($p < 0,0001$) a nižší koncentraci HDL-cholesterolu ($p < 0,01$). Inzulín-rezistentní a inzulín-senzitivní pacientky s PCOS se nelišily v hladinách celkového testosteronu, androstendionu, 17-hydroxy-progesteronu, estradiolu, LH a FSH. Inzulín-rezistentní ženy s PCOS však měly signifikantně nižší hladinu SHBG ($p < 0,0001$) a vyšší index volného testosteronu ($p < 0,000001$). Porucha glukózové tolerance (PGT) byla zjištěna u 23 žen s PCOS (9,4 %) a DM 2 u 4 žen s PCOS (1,6 %). Porušená lačná glykémie (IFG) byla pozorována u 30 žen s PCOS (12,3 %); oGTT u těchto žen odhalilo poruchu glukózové tolerance u 6 pacientek a DM 2 u jedné pacientky.

Pro predikci PGT/DM 2 jsme využili antropometrické, klinické a biochemické parametry z bazálních odběrů krve. Hladina cholesterolu (s hraniční hodnotou 4,19 mmol/l) dosáhla senzitivity 91,7 % a specifity 38,7 %, sérová hladina triglyceridů (0,705 mmol/l) senzitivity 91,7 % a specifity 38,7 %, systolický tlak (110 mmHg) senzitivity 90 % a specifity 25 % a diastolický tlak (69,1 mmHg) senzitivity 91,7 % a specifity 28 %. Hodnota HOMA-IR 0,673 měla senzitivitu 92,6 %, ale specifita dosáhla pouze 11 %.

Diskuse

Syndrom polycystických ovaríí se považuje za rizikový faktor rozvoje porušené glukózové tolerance a diabetes mellitus 2. typu (Ehrmann et al. 1999; Legro et al. 1999).

Hyperinzulinémie a inzulínová rezistence je u PCOS zkoumána již od 80. let 20. století (Burghen 1980), zatímco sekreci inzulínu bylo u těchto žen věnováno mnohem méně pozornosti. V našich studiích jsme se proto zaměřili na různé aspekty sekrece inzulínu u žen s PCOS. Zvolili jsme i různé vyšetřovací metody a výpočty, které se navzájem doplňují a poskytují podrobnější charakteristiku možné dysfunkce β -buněk.

V první studii jsme sledovali ovlivnění funkce β -buněk rodinnou zátěží DM 2. IS byla měřena pomocí hyperinzulinemického euglykemického clampu a sekrece inzulínu byla hodnocena argininovým testem. Získali jsem tak dva vzájemně nezávislé parametry popisující IS a sekreci inzulínu umožňující výpočet dispozičního indexu. Bazální inzulínémie byla signifikantně vyšší u žen s PCOS ve srovnání se zdravými kontrolami. U žen s PCOS, které měly rodinnou zátěž DM 2, jsme prokázali sníženou inzulínovou senzitivitu, nicméně dispoziční index se nelišil od PCOS RA⁻. Předpokládali jsme, že u žen s PCOS RA⁺ nalezneme poruchu sekrece inzulínu, ale tento předpoklad nebyl potvrzen. Pouze sekrece inzulínu po podání bolusu argininu při bazální glykémii byla vyšší u PCOS RA⁺ než PCOS RA⁻. Kompenzační sekrece inzulínu se nelišila mezi PCOS a zdravými kontrolami. Naše výsledky jsou v souladu se studii popisujícími neporušený kompenzační mechanismus u osob s normální glukózovou tolerancí (Kahn et al. 1993). Ovšem výsledky publikovaných studií zaměřených na tuto problematiku u žen s PCOS jsou diskrepantní. Některé práce popisují snížený dispoziční index obecně bez závislosti na obezitě či rodinné anamnéze DM 2 (Dunaif a Finegood 1996), zatímco jiní autoři pozorovali zhoršenou funkci β -buněk pouze u pacientek s PCOS s rodinnou anamnézou DM 2 (Ehrmann et al. 1995). Další autoři popsali zvýšenou časnou fázi sekrece inzulínu a zvýšený dispoziční index u štíhlých i obézních pacientek s PCOS. Tato studie nebrala v potaz rodinnou anamnézu DM 2 (Holte et al. 1994).

V další studii jsme zvolili ne zcela běžně využívané hodnocení pulzní sekrece inzulínu a pravidelnosti sekrece inzulínu. Sledovali jsme rychlé pulzy inzulínu, které mají důležitou roli při regulaci glykémie. Dále jsme hodnotili pravidelnost sekrece inzulínu vypovídající o možných zevních vlivech. Předpokládá se, že porucha pulzní sekrece inzulínu se objevuje časně již u prediabetických stavů ještě dříve než je prokazatelná porušená první fáze sekrece inzulínu (O'Rahilly et al. 1988; Porksen 2002). Nepozorovali jsme rozdíl mezi počtem a amplitudou pulzů inzulínu, množstvím inzulínu uvolněného během jednoho pulzu, intervalem

mezi pulzy a pravidelností sekrece inzulínu. Ženy s PCOS měly tendenci k širším pulzům inzulínu. Nepravidelnější sekrece inzulínu (vyšší hodnota ApEn) a širší pulzy inzulínu korelovaly pozitivně s hladinami prolaktinu. Za podmínek in vitro exprimují β -buňky receptory pro prolaktin. Prolaktin podporuje růst ostrůvků pankreatu a stimuluje sekreci inzulínu (Ben-Jonathan et al. 2006). Prolaktin také reguluje inzulínovou senzitivitu. Ženy s PCOS a hyperprolaktinemií byly více inzulín-rezistentní než ženy s PCOS a s normální hladinou prolaktinu (Bahceci et al. 2003).

Pozorovali jsme pozitivní korelaci mezi hodnotami ApEn a BMI. Naše výsledky jsou v souladu s jinými autory, kteří popisují méně pravidelnou sekreci inzulínu u pacientů s obezitou a úpravu pravidelnosti sekrece inzulínu po redukci váhy (Zarkovic et al. 2000).

K určení inzulínové senzitivity u žen s PCOS a zdravých kontrol jsme využili indexu QUICKI. Pacientky s PCOS i kontroly se nelišily v IS. Pozorovali jsme negativní korelaci mezi IS a bazální sekrecí inzulínu. Naopak nebyla prokazatelná žádná korelace mezi IS a frekvencí nebo intervalem inzulínových pulzů. Výsledky studií popisujících vztah mezi IS měřenou euglykemickým clampem a frekvencí inzulínových pulzů se rozcházejí. Jedna ze studií uvádí, že zvýšená frekvence rychlých pulzů inzulínu korelovala pozitivně s tíží IR u pacientů s abdominální obezitou. Počet rychlých pulzů inzulínu se snížil a IS se upravila po redukci váhy (Peiris et al. 1992). Na druhou stranu, frekvence inzulínových pulzů nekorelovala s IS u zdravých kontrol (Courtney et al. 2003) nebo u žen s PCOS (Armstrong et al. 2001). Rozdílné výsledky mohou být způsobeny odlišným souborem pacientek a/nebo použitím různých metod hodnotících pulzní sekreci inzulínu.

V třetí studii jsme se zaměřili na roli inkretinů v patogenezi poruchy sacharidového metabolismu u žen s PCOS. Inkretiny, GIP a GLP-1, se významně podílejí na regulaci sekrece inzulínu. Jediná studie popisující sekreci inkretinů u malé skupiny štíhlých žen s PCOS nenalezla rozdíl v hladinách GIP nebo GLP-1 mezi PCOS a kontrolami, i přestože ženy s PCOS měly vyšší koncentraci inzulínu a C-peptidu (Gama et al. 1996). V naší studii štíhlé ženy s PCOS měly zvýšené hladiny celkového GIP a C-peptidu během oGTT ve srovnání se zdravými kontrolami. Hladina celkového GIP, na rozdíl od hladin aktivního GLP-1, signifikantně korelovala s koncentrací C-peptidu. Důvod nepřítomné korelace mezi GLP-1 a inzulínem či C-peptidem není jasný. Obě skupiny pacientek měly stejnou IS vypočítanou na lačno (QUICKI) i během oGTT (OGIS). Jiní autoři také popsali zvýšenou hladinu C-peptidu během oGTT, která nebyla doprovázená sníženou IS měřenou euglykemickým clampem u žen s PCOS (Ciampelli et al. 1997). Aktivní GLP-1 prokazoval signifikantně odlišnou charakteristiku v závislosti na čase u žen s PCOS ve srovnání s kontrolní skupinou. GLP-1

koncentrace byly podobné u žen s PCOS a kontrolami v časně fázi oGTT do 60 min, ale hladina GLP-1 byla signifikantně nižší u žen s PCOS ve srovnání se zdravými ženami ve 180. minutě oGTT. Ačkoliv se jedná o zajímavý výsledek, nejsme schopni tento fenomén jasně vysvětlit. Regulace sekrece GLP-1 není zatím plně objasněna. Leptin stimuloval v buněčné kultuře sekreci GLP-1, a obézní pacienti rezistentní na leptin mají nízké hladiny GLP-1 (Anini a Brubaker 2003). Dalším faktorem ovlivňujícím sekreci GLP-1 je glukagon, který za fyziologických podmínek u zdravých osob sekreci GLP-1 inhibuje. Postprandiální vzestup glykémie sníží hladinu glukagonu, což zvyšuje sekreci GLP-1. U pacientů s DM 2 je nedostatečná suprese sekrece glukagonu glukózou a porucha sekrece GLP-1 může být proto druhotná (Vollmer et al. 2008). U pacientů s DM 2 hladina glukagonu nalačno korelovala negativně s koncentrací GLP-1, ale postprandiálně (během oGTT či standardní test s jídlem) je korelace hladiny glukagonu a GLP-1 pozitivní. Vysvětlením by mohl být GLP-2, který se v ekvimolárním množství uvolňuje s GLP-1 z L-buněk gastrointestinálního traktu. GLP-2 je pomaleji eliminován z cirkulace a dosahuje několikanásobně vyšších koncentrací než GLP-1. GLP-2 stimuluje sekreci glukagonu a tento účinek pravděpodobně převáží inhibiční efekt GLP-1 (Vollmer et al. 2008).

Rozdílné výsledky našich vyšetření v porovnání se studií Gamy et al. (Gama et al. 1996) mohou být dány malým souborem pacientek a/nebo odlišnou metodou stanovení inkretinů. Na druhou stranu jsou naše výsledky souhlasné s autory popisující zvýšené hladiny GIP a snížené koncentrace GLP-1 u pacientů s DM 2 (Jones et al. 1989; Vilsbolls et al. 2001; Holst a Gromada 2004). U osob s porušenou glukózovou tolerancí i u zdravých příbuzných prvního stupně pacientů s DM 2 byla podobně pozorována při oGTT zvýšená hladina celkového GIP doprovázená zvýšenou hladinou C-peptidu (Theodorakis et al. 2004). Jedna z hypotéz vysvětlující zvýšené hladiny C-peptidu u žen s PCOS uvažuje nadměrnou aktivitu entero-inzulární osy (Holte 1998). Můžeme předpokládat, že zvýšená sekrece GIP nadměrně stimuluje β -buňky k produkci většího množství inzulínu. Nepřiměřeně zvýšená sekrece inzulínu pak při normální IS vede ke snížení glykémie. Pro tuto hypotézu svědčí nižší hladiny glykovaného hemoglobinu (Holte et al. 1994) a snížené vnímání hypoglykemických symptomů (Gennarelli et al. 1997) prokázané u žen s PCOS. Hladina GIP může být zvýšená jako kompenzace jeho snížené aktivity. V naší studii nemůžeme uzavřít, zda-li je hladina GIP zvýšená následkem porušené inzulínotropní aktivity. To lze hodnotit změřením inkretinového efektu po exogenním podání GIP během hyperglykemického clampu (Holst a Gromada 2004). Předpokládá se také zvýšená internalizace či snížená citlivost GIP receptorů (Holst a Gromada 2004). Snížený inzulínotropní efekt GIP byl popsán nejen u pacientů s DM 2, ale

také u jejich příbuzných prvního stupně s normální glukózovou tolerancí (Meier et al. 2001). Proto se předpokládalo, že porucha GIP je primárním genetickým defektem DM 2. Při vyšetření širšího spektra pacientů s různými typy DM, byla nalezena snížená odpověď na podání GIP také u osob s diabetem typu MODY nebo se sekundárním diabetem (VilSBoll et al. 2003^b). Porušená aktivita GIP může tedy být naopak důsledkem metabolického stavu při onemocnění DM (Nauck et al. 2004).

Jak již bylo zmíněno dříve, u žen s PCOS je zvýšené riziko rozvoje PGT a/nebo DM 2. Stanovením pouze lačné glykémie nemusíme zachytit až 30% pacientů s DM 2 a nelze stanovit diagnózu porušené glukózové tolerance (WHO 2006). Proto se doporučuje provést oGTT při stanovení diagnózy PCOS bez ohledu na BMI, i když jsou lačné hodnoty glukózy v pásmu normy, a dále každé 2-3 roky (Salley et al. 2007). Toto doporučení samozřejmě přináší velké nároky na zdravotní systém. V poslední studii jsme tedy použili data shromážděná v dřívějších letech na souboru 244 pacientek s PCOS vyšetřených pomocí oGTT a hodnotili jsme výskyt poruch glukózové homeostázy a možnosti jejich predikce z jednoduchých klinických a biochemických parametrů. Ke stanovení IS jsme využili jednoduchého výpočtu z bazálních hodnot inzulínu a glykémie, tzv. HOMA-IR. Porušenou lačnou glykémii jsme pozorovali u 12 %, PGT u 9,4 % a DM 2 u 1,6 % žen s PCOS. Inzulínová rezistence byla přítomna u 40 % žen s PCOS a u 7,2 % zdravých kontrol. Prevalence IR úzce korelovala s obezitou. Inzulín-resistentní ženy s PCOS oproti inzulín-senzitivním byly starší, obéznější a měly významnější výskyt rizikových faktorů kardiovaskulárního onemocnění (vyšší hodnoty krevního tlaku, celkového cholesterolu, triglyceridů a nižší hladinu HDL-cholesterolu. Vyšší výskyt IR je popisován u obézních PCOS pacientek (Deugarte et al. 2005; Carmina a Lobo 2004). Naše ženy s PCOS byly celkově štíhlejší, což může vysvětlovat menší procento inzulín-rezistentních pacientek ve srovnání s uvedenými studii. Nižší výskyt IR může být také způsoben rozdílem mezi námi použitými diagnostickými kritérii PCOS dle ESHRE/ASMR ve srovnání s NIH kritérii v citovaných studiích. Je známo, že u některých fenotypů PCOS dle definice ESHRE/ASMR není IR doprovodným symptomem. Na druhou stranu, 40 % výskyt IR může být nadhodnocen. Tzv. cutoff point pro IR je stanoven dle kontrolní skupiny žen, které se přihlásily na inzerát o vyšetření glycidového metabolismu. Mohlo by se jednat o ženy, které se více zajímají o zdravý životní styl a ochotněji se zúčastňují podobných studií. Hodnoty IR u nich mohou být nižší než v běžné populaci.

Pokusili jsme se také o nalezení biochemických či klinických parametrů, které by mohly sloužit k časnému odhalení pacientek se zvýšeným rizikem rozvoje poruchy glukózového metabolismu. U žen s PCOS byla nejvyšší senzitivita s 8-10 % falešně negativní chybou pozorována pro hodnoty celkového cholesterolu, triglyceridů, bazální glykémie, systolického a diastolického tlaku v normálním rozmezí, nicméně specificita byla nízká, což je nevyhovující pro screeningové vyšetření. Horní hranice normálního rozmezí pro výše uvedené parametry mělo jak nízkou specificitu tak senzitivitu. Tzv. cutoff hodnota HOMA-IR 0,7 prokazovala nejvyšší senzitivitu pro stanovení poruchy sacharidového metabolismu, nicméně specificita byla příliš nízká, neboť zachytila i řadu tzv. rizikových žen, které mají normální výsledek při oGTT. Proto jsme uzavřeli, že ani tento ukazatel nelze využít jako screeningové vyšetření. Naše práce nepodpořila výsledky studie, kde hodnota HOMA-IR byla vhodná k predikci poruchy glukózového metabolismu (Mohlig et al. 2006). Rozdílné výsledky je možné vysvětlit úzkým rozmezím BMI ($31,8 \pm 0,7 \text{ kg/m}^2$) v citované studii a významnější korelaci hodnot HOMA-IR a BMI v pásmu obezity ve srovnání s BMI v normálním rozmezí (Kim et al. 2004). Soubor našich pacientek měl mnohem heterogennější BMI.

Závěry

- 1) Sníženou inzulínovou senzitivitu jsme pozorovali pouze u žen s PCOS, které měly pozitivní rodinnou anamnézu DM 2 ve srovnání se zdravými ženami. Tyto ženy, pokud mají normální glukózovou toleranci, jsou schopny kompenzovat sníženou inzulínovou senzitivitu zvýšenou sekrecí inzulínu.
- 2) Štíhlé ženy s PCOS měly podobnou charakteristiku pulzní sekrece inzulínu až na tendenci k širším pulzům inzulínu ve srovnání se zdravými kontrolami. Prolaktin, kortizol a androgeny měly vztah k jednotlivým parametrům charakterizujícím pulzní sekreci inzulínu. Inzulínová senzitivita nesouvisela s parametry popisujícími pulzní sekreci inzulínu.
- 3) U štíhlých žen s PCOS jsme pozorovali zvýšené hladiny C peptidu, celkového GIP a nižší koncentraci aktivního GLP-1 během pozdní fáze oGTT ve srovnání se štíhlými zdravými kontrolami.
- 4) Z jednoduchých klinických a biochemických parametrů (antropometrie, krevní tlak, glykémie nalačno, lipidogram) neměl u žen s PCOS žádný dostatečnou senzitivitu a specifitu, aby mohl být využit k predikci PGT a/nebo DM 2. Proto doporučujeme používat diagnostický oGTT u všech pacientek s PCOS.

Literatura:

Revised 2003 consensus diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome (2004). *Fertil Steril* 81; 19-25.

Abbott, D.H., Dumesic, D.A., Franks, S. (2002). A developmental origin of polycystic ovary syndrome-a hypothesis. *J Endocrinol.* 174: 1-5.

Adams, J., Franks, S., Polson, D. W., Mason, H. D., Abdulwahid, N., Tucker, M., Morris, D. V., Price, J., Jacobs, H. S. (1985). Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet* 2(8469-70), 1375-1379.

Ahren, B., Pacini, G. (2004). Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta cell function in clinical studies. *European Journal of Endocrinology*, 150 (97-104).

Anderson, G. E., Kologlu, Y., Papadopoulus, C. (1967). Fluctuations in postabsorptive blood glucose in relation to insulin release. *Metabolism* 16: 586-596.

Anini, Y. a Brubaker, P.L. (2003). Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes.* 52 252-259.

Armstrong, V.L., Wiggam, M.I., Ennis, C.N., Sheridan, B., Traub, A.I., Atkinson, A.B., Bell, P.M. (2001). Insulin action and insulin secretion in polycystic ovary syndrome treated with ethinyl oestradiol/cyproterone acetate. *Qjm* 94: 31-37.

Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale H.F., Futterweit, W., Janssen, O.E., Legro, R.S., Norman, R.J., Taylor A.E., Witchel, S.F. (2006). Androgen Excess Society: Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* Nov; 91(11):4237-45.

Azziz, R. (2006). Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: The Rotterdam Criteria are premature. *J Clin Endocrinol Metab*, March, 91(3): 781-785.

Bahceci, M., Tuzcu, A., Bahceci, S., Tuzcu, S. (2003). Is hyperprolactinemia associated with insulin resistance in non-obese patients with polycystic ovary syndrome? *J Endocrinol Invest* 26: 655-659.

Balen, A.H., Laven, J.S., Tan, S.L., Dewailly, D. (2003). Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update* Nov-Dec; 9(6):505-14.

Barber, T.M., Golding, S.J., Alvey, Ch., Wass, J.A.H., Karpe, F., Franks, S., McCarthy, M.I.(2008). Global Adiposity rather than abnormal region fat distribution characterizes women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endo Metab* March, 93(3), 999-1004.

Ben-Jonathan, N., Hugo, E.R., Brandebourg, T.D., Lapensee, C.R..(2006). Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab* 17: 110-116.

Bergman, R. N., L. S. Phillips, et al. (1981). "Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man: measurement of insulin sensitivity and beta-cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose." *J Clin Invest* 68(6): 1456-67.

Bergsten, P. (2000). Pathophysiology of impaired insulin pulsatile release. *Diabetes Metab Res Rev.* 16: 179-191.

Bergstrom, R.W., Fujimoto, Y., Teller, D.C., De Haen, Ch. (1989). Oscillatory insulin secretion in perfused isolated rat islets. *Am J Physiol.* Oct;257(4 Pt 1):E479-85.

Blank, S.K., Helm, K.D., McCartney, M.C., Marshall, J.C. (2008). Polycystic ovary syndrome in adolescence. *Ann. N.Y. Acad Sci*, 1135: 76-84.

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

Bratusch-Marrain, P.R., Komjati, M., Waldhausl, W.K. (1986). Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose utilization in type I diabetic humans. *Diabetes*, Vol 35, Issue 8 922-926.

Burghen, G. A., Givens, J. R., Kitabchi, A. E. (1980). Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 50(1), 113-116.

Carmina, E., Lobo, R. A. (1999). Polycystic ovary syndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(6), 1897-1899.

Carmina, E., Lobo, R. A. (2004). Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 82:661-5.

Courtney, C.H., Atkinson, A.B., Ennis, C.N., Sheridan, B., Bell, P.M. (2003). Comparison of the priming effects of pulsatile and continuous insulin delivery on insulin action in man. *Metabolism* 52: 1050-1055.

Ciampelli, M., Fulghesu, A.M., Cucinelli, F., Pavone, V., Caruso, A., Mancuso, S., Lanzone, A. (1997). Heterogeneity in beta cell activity, hepatic insulin clearance and peripheral insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 12 1897-1901.

DeFronzo, R.A., Tobin, J.D., Andres, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol. Sep*; 237(3): E214-23.

Deugarte, C.M., Bartolucci, A.A., Azziz, R. (2005) Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril* 83:1454-60.

Diamanti-Kandarakis, E., Argyrakopoulou, G., Economou, F., Kandaraki, E., Koutsilieris, M. (2008). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 109: 242-246.

Driscoll, D.A. (2003). Polycystic syndrome in adolescence. *Ann. N.Y.Acad.Sci*, 997:49-55.

Drucker, D.J. (2006). The biology of incretins hormones. *Cell Metabolism*, Mar., 3:153-165.

Drucker, D.J. (2007). The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest*, Jan; 117(1).

Dunaif, A., Segal, K. R., Shelley, D. R., Green, G., Dobrjansky, A., Licholai, T. (1992). Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*, 41(10), 1257-1266.

Dunaif, A. a Finegood, DT. (1996). β -cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 81: 942-7.

Dunaif, A. (1997). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. 18(6), 774-800.

Ehrmann, D. A., Barnes, R. B., Rosenfield, R. L., Cavaghan, M. K., Imperial, J. (1999). Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*, 22(1), 141-146.

Ehrmann, DA., Kasza, K., Azziz, R., Legro, RS., Ghazzi, MN. (2005) Effects of race and family history of type 2 diabetes on metabolic status of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 66-71.

Elbein, S. C., S. J. Hasstedt, et al. (1999). Heritability of pancreatic beta-cell function among nondiabetic members of Caucasian familial type 2 diabetic kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* 84(4): 1398-403.

Elbein, C.S, Wegner, K., Kahn, S.E. (2000). Reduced β -cell compensation to the insulin resistance associated with obesity in members of Caucasian familial type 2 diabetic kindreds. *Diabetes Care* 23:221-227.

Ferrannini, E. (1998). Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19: 477-90.

Flatt, P.R. (2008). Dorothy Hodgkin Lecture 2008. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) revisited: a new therapeutic target for obesity-diabetes? *Diabet Med*. 2008 Jul;25(7):759-64.

Florez, J. C. (2008). Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia* 51(7): 1100-10.

Franks, S., Gharani, N., Waterworth, D., Batty, S., White, D., Williamson, R., McCarthy, M. (1997). The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 12, 2641-2648.

Frayling, T. M. (2007). Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat Rev Genet* 8 (9): 657-62.

Gama, R, Norris, F., Wright, J., Morgan, L., Hampton, S., Watkins, S., Marks, V. (1996). The entero-insular axis in polycystic ovarian syndrome. *Annals of Clinical Biochemistry*. 33 (Pt 3) 190-195.

Gambineri, A., Pelusi, C., Vicennati, V., Pagotto, U., Pasquali, R. (2002). Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obe*, 26: 883-896.

Gennarelli, G., Holte, J., Stridsberg, M., Niklasson, F., Berne, C., Backstrom, T.(1997). The counter-regulatory response to hypoglycaemia in women with the polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 46 167-174.

Gerich, J.E. (2000). Clinical perspective: insulin resistance is not necessarily an essential component of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol. Metab* 85: 2113-2115.

Gerich, J.E. (2003). Contributions of insulin resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 78: 447-456.

Goodner, C.J., Sweet, I.R., Harrison, H.C. Jr.(1988). Rapid reduction and return of surface insulin receptors after exposure to brief pulses of insulin in perfused rat hepatocytes. *Diabetes* 1988; 37: 1316-1323.

Hansen, K.M. (1923). Oscillations in the blood sugar of fasting normal persons. *Acta Endocrinol (Copenh)*.

Hollingsdal, M., Juhl, C. B., Pincus, S. M., Sturis, J., Veldhuis, J. D., Polonsky, K. S., Porksen, N., Schmitz, O. (2000). Failure of physiological plasma glucose excursions to entrain high frequency pulsatile insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes*, 49(8), 1334-1340.

Holst, J.J., Gromada J. (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 287 E199-206.

Holte, J., Bergh, T., Berne, C., Berglund, L., Lithell, H. (1994). Enhanced early insulin response to glucose in relation to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*, 78(5), 1052-1058.

Holte, J., Bergh, T., Berne, C., Wide, L., Lithell, H. (1995). Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(9), 2586-2593.

Holte, J. (1998). Polycystic ovary syndrome and insulin resistance: Thrifty genes struggling with over-feeding and sedentary life style? *J. Endocrinol. Invest*. 21:589-601.

Ibanez, L., de Zegher, F., Potau, N.(1998). Premature pubarche, ovaria hyperandrogenism, hyperinsulinism and the polycystic ovary syndrome: from a complex constellation to a simple sequence of prenatal onset. *J Endocrinol Invest*, Oct, 21(9): 558-66.

Johnson. M.L., Virostko, A., Veldhuis, J.D., Evans, W.S. (2004). Deconvolution analysis as a hormone pulse-detection algorithm. *Methods Enzymol*. 384:40-54.

Jones, I.R., Owens, D.R., Luzio, S., Williams, S., Hayes T.M. (1989). The glucose dependent insulinotropic polypeptide response to oral glucose and mixed meals is increased in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 32 668-677.

Kahn, S. E., Prigeon, R. L., McCulloch, D. K., Boyko, E. J., Bergman, R. N., Schwartz, M. W., Neifing, J. L., Ward, W. K., Beard, J. C., Palmer, J. P. (1993). Quantification of the Relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence

for a hyperbolic function. *Diabetes*, 42(11), 1663-1672.

Kashar-Miller, M. a Azziz, R. (1999). Heritability and the risk of developing androgen excess. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 69:261-268.

Katz, A., Namgi, S.S., Mather, K., Baron, A.D., Follmann, D.A., Sullivan, G., Quon, M.J. (2000). Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. Jul;85(7):2402-10.

Kerner, W., Bruckel, J., Zier, H., Arias, P., Thun, C., Moncayo, R., Pfeiffer, E.F. (1988). Similar effects of pulsatile and constant intravenous insulin delivery. *Diabetes Res Clin Pract*. 4: 269-274.

Kim, S.H., Abbasi, F., Reaven, G.M. (2004). Impact of degree of obesity on surrogate estimates of insulin resistance. *Diabetes Care*, August, 27(8), 1998-2002.

King, B.F., Love, J.A., Szurszewski, J.H. (1989). Intracellular recordings from pancreatic ganglia of the cat. *J. Physiol*. 419: 379-403.

Kirchengast S, Huber J. (2001). Body composition characteristics and body fat distribution in lean women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*; 16: 1255–1260.

Komjati, M., Bratusch-Marrain, P., Waldhausl, W. (1986). Superior efficacy of pulsatile versus continuous hormone exposure on hepatic glucose production in vitro. *Endocrinology*. Jan;118(1):312-9.

Lang, D.A., Matthews, D.R., Peto, J., Turner, R.C. (1979). Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N Engl. J. Med*. 301:1023-1027.

association with Japanese NIDDM subjects. *Diabetes*. 45 1701-1705.

Larsson, H., Ahren, B. (1998). Glucose-dependent arginine stimulation test for characterization of islet function: studie on reproducibility and priming effect of arginine. *Diabetologia*; Jul;41(7):772-7

Legro, R. S., Kunselman, A. R., Dodson, W. C., Dunaif, A. (1999). Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab*. 84(1), 165-169.

Mari, A., Pacini, G., Murphy, E., Ludvik, B., Nolan, J.J. (2001). A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care*. Mar; 24(3):539-48.

Matthews, D.R., Naylor, B.A., Jones, R.G., Ward, G.M., Turner, R.C. (1983). Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes*. 32: 617-621.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. Jul;28(7):412-9.

Meier, J.J., Hucking, K., Holst, J.J., Deacon, C.F., Schmiegel, W.H., Nauck, M.A. (2001). Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 50; 2497-2504.

Meneilly, G. S., Ryan, A. S., Veldhuis, J. D., Elahi, D. (1997). Increased disorderliness of Basal insulin release, attenuated insulin secretory burst mass, and reduced ultradian rhythmicity of insulin secretion in older individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 82(12), 4088 4093.

Mohlig, M., Spranger, J., Ristow, M., Pfeiffer, A.F., Schill, T., Schlosser, H.W., et al. (2006). Predictors of abnormal glucose metabolism in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 154:295-301.

Nauck, M. A., Homberger, E., Siegel, E. G., Allen, R. C., Eaton, R. P., Ebert, R., Creutzfeldt, W. (1986). Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab*. 63(2), 492-498.

Nauck, M.A., El-Ouaghli, A., Gabrys, B., Hucking, K., Holst, J.J., Deacon, C.F., Gallwitz,

B., Schmidt, W.E., Meier, J.J. (2004). Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and Incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept.*, Nov 15; 122(3): 209-17.

Nauck, M.A., Baller, B., Meier, J.J. (2004). Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes*, Dec; 53(3): S190-6.

Nestler, J.E., Powers, L.P., Matt, D.W., Steingold, K.A., Plymate, S.R., Rittmaster, R.S., Clore, J.N., Blackard, W.G. (1991). A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, Jan; 72(1): 83-9.

O'Meara, N.M., Blackman, J.D., Ehrmann, D.A., Barnes, R.B., Jaspan, J.B., Rosenfield, R.L., Polonsky, K.S. (1993). Defects in beta-cell function in functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 May;76(5):1241-7.

O'Rahilly, S., Turner, R. C., Matthews, D. R. (1988). Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med*, 318(19), 1225-1230.

Ovesen, P., Moller, J., Ingerslev, H. J., Jorgensen, J. O., Mengel, A., Schmitz, O., Alberti, K. G., Moller, N. (1993). Normal basal and insulin-stimulated fuel metabolism in lean women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 77(6), 1636-1640.

Paolisso, G., Sgambato, S., Torella, R., Varricchio, M., Scheen, A., D'Onofrio, F., Lefebvre, P.J. (1988^a). Pulsatile insulin delivery is more efficient than continuous infusion in modulating islet cell function in normal subjects and patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 66:1220-1226.

Paolisso, G., Sgambato, S., Gentile, S., Memoli, P., Giugliano, D., Varricchio, M., D'Onofrio, F. (1988^b). Advantageous metabolic effects of pulsatile insulin delivery in noninsulin-dependent diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 67: 1005-1010.

Paolisso, G., Scheen, A. J., Giugliano, D., Sgambato, S., Albert, A., Varricchio, M., D'Onofrio, F., Lefebvre, P. J. (1991). Pulsatile insulin delivery has greater metabolic effects than continuous hormone administration in man: importance of pulse frequency. *J Clin Endocrinol Metab*. 72(3), 607-615.

Pasquali, R., Pelusi, C., Genghini, S., Cacciari, M., Gambineri, A. (2003). Obesity and Reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update*. 9(4), 359-372.

Peiris, A. N., Stagner, J. I., Vogel, R. L., Nakagawa, A., Samols, E. (1992). Body fat distribution and peripheral insulin sensitivity in healthy men: role of insulin pulsatility. *J Clin Endocrinol Metab*. 75(1), 290-294.

Pimenta, W., M. Korytkowski, et al. (1995). Pancreatic beta-cell dysfunction as the primary genetic lesion in NIDDM. Evidence from studies in normal glucose-tolerant individuals with a first-degree NIDDM relative. *Jama* 273(23): 1855-61.

Pincus, S. M., Hartman, M. L., Roelfsema, F., Thorner, M. O., Veldhuis, J. D. (1999). Hormone pulsatility discrimination via coarse and short time sampling. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 1), E948-957.

Polonsky, K. S. (1993). Defects in beta-cell function in functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 76(5). 1241-1247.

Poretsky, L., Cataldo, N.A., Rosenwaks, Z., Giudice, L.C. (1999). The insulin related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999; 20: 535 – 582.

Porksen, N., Munn, S., Ferguson, D., O'Brien, T., Veldhuis, J., Butler, P. (1994). Coordinate pulsatile insulin secretion by chronic intraportally transplanted islets in the isolated perfused rat liver. *J Clin Invest*. 94(1), 219-227.

Porksen, N., Nyholm, B., Veldhuis, J. D., Butler, P. C., Schmitz, O. (1997). In humans at least 75% of insulin secretion arises from punctuated insulin secretory bursts. *Am J Physiol*, 273(5 Pt 1), E908-914.

Porksen, N., Juhl, C., Hollingdal, M., Pincus, S. M., Sturis, J., Veldhuis, J. D., Schmitz, O. (2000). Concordant induction of rapid in vivo pulsatile insulin secretion by recurrent punctuated glucose infusions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278(1), E162-170.

Porksen, N. (2002). The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia.* 45(1), 3-20.

Ranganath, L.R. (2008). Incretins: Pathophysiological and therapeutic implications of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1. *J Clin Pathol.* 2008 Apr;61(4):401-9.

Ristow, M., Vorgerd, M., Mohlig, M., Schatz, H., Pfeiffer, A. (1999). Insulin resistance and impaired insulin secretion due to phosphofructo-1-kinase-deficiency in humans. *J Mol Med.* Jan;77(1):96-103.

Ritzel, R.A., Veldhuis, J.D., Butler, P.C. (2006) The mass, but not the frequency, of insulin secretory bursts in isolated human islets is entrained by oscillatory glucose exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Apr; 290(4): E750-6.

Roehrich, M.E., Mooser, V., Lenain, V., Herz, J., Nimpf, J., Azhar, S., Bideau, M., Capponi, A., Nicod, P., Haefliger, J.A., Waeber, G. (2003). Insulin-secreting β -cell dysfunction induced by human lipoproteins. *J Biol Chem*, 278: 18368-18375.

Salley, K.E., Wickham, E.P., Cheang, K.I., Essah, P.A., Karjane, N.W., Nestler, J.E. (2007). Glucose intolerance in polycystic ovary syndrome: a position statement of the Androgen Excess Society. *J Clin Endocrinol Metab.* Dec;92(12):4546-56.

Schellenberger W, Eschrich K, Hofmann E. (1984). Effect of enzyme concentrations on Sustained oscillations in the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle. *Biomed. Biochim. Acta* 43: 227-231.

Schmitz, O., Arnfred, J., Nielsen, O.H., Beck-Nielsen, H., Orskov, H. (1986). Glucose uptake and pulsatile insulin infusion: euglycaemic clamp and [3-3H]glucose studies in healthy subjects. *Acta Endocrinol (Copenh).* 113: 559-563.

Schmitz, O., Brock, B., Hollingdal, M., Juhl, C. B., Porksen, N. (2002). High-frequency Insulin pulsatility and type 2 diabetes: from physiology and pathophysiology to clinical pharmacology. *Diabetes Metab.* 28(6 Suppl), 4S14-20.

Schmitz, O., Juhl, C. B., Hollingdal, M., Veldhuis, J. D., Porksen, N., Pincus, S. M. (2001). Irregular circulating insulin concentrations in type 2 diabetes mellitus: an inverse relationship between circulating free fatty acid and the disorderliness of an insulin time series in diabetic and healthy individuals. *Metabolism.* 50(1), 41-46.

Stagner, J. I., Samols, E., Weir, G. C. (1980). Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J Clin Invest.* 65(4), 939-942.

Stumvoll, M., B. J. Goldstein, et al. (2007). Pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Res* 32(1-2): 19-37.

Sturis, J., Van Cauter, E., Blackman, J. D., Polonsky, K. S. (1991). Entrainment of pulsatile Insulin secretion by oscillatory glucose infusion. *J Clin Invest.* 87(2), 439-445.

Suhail, A.R.D. (2008). Neuroendocrine dysfunction in PCOS: A critique of recent reviews. *Clin Med Res.* 6(2):47-53.

Theodorakis, M.J., Carlson, O., Muller, D., Egan, J.M. (2004). Elevated plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide associates with hyperinsulinemia in impaired glucose tolerance. *Diabetes Care.* 27; 1692-1698.

Toprak, S., Yonem, A., Cakir, B., Guler, S., Azal, O., Ozata, M., Corakci, A. (2001). Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Horm Res.* 55(2), 65-70.

Tornheim, K. (1997). Are metabolic oscillations responsible for normal oscillatory insulin secretion? *Diabetes.* 46(9), 1375-1380.

Tura, A., Ludvik, B., Nolan, J.J., Pacini, G., Thomaseth, K. (2001). Insulin and C-peptide secretion and kinetics in humans: direct and model-based measurements during OGTT. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism.* 281; E966-974.

Veldhuis, J. D., Johnson, M. L. (1994). Analytical methods for evaluating episodic secretory activity within neuroendocrine axes. *Neurosci Biobehav Rev.* 18(4), 605-612.

Verdin, E., Castillo, M., Luyck, A.S., Lefebvre, P.J. (1984). Similar metabolic effects of pulsatile versus continuous human insulin delivery during euglycemic, hyperinsulinemic glucose clamp in normal man. *Diabetes.* 33: 1169-1174.

VilSBoll, T., Krarup, T., Deacon, C.F., Madsbad, S., Holst, J.J. (2001). Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 50; 609-613.

VilSBoll, T., Krarup, T., Madsbad, S., Holst, J.J. (2003^a). Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regulatory Peptides.* 114; 115-121.

VilSBoll, T., Knop, F.K., Krarup, T., Johansen, A., Madsbad, S., Larsen, S., Hansen, T., Pedersen, O., Holst, J.J.(2003^b). The pathophysiology of diabetes involves a defective amplification of the late-phase insulin response to glucose by glucose-dependent insulinotropic polypeptide-regardless of etiology and phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4897-903.

Vollmer, K., Holst, J.J., Baller, B., Ellrichmann, M., Nauck, M.A., Schmidt, W.E., Meier, J.J. (2008). Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes.* 57; 678-687.

Wajchenberg, B.L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 21: 697-738.

Wajchenberg, B.L. (2007). β -cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocrine Reviews*, April 28(2): 187-218.

Weyer, C., C. Bogardus, et al. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 104(6): 787-94.

Weyer, C., P. A. Tataranni, et al. (2001). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes Care* 24(1): 89-94.

WHO/IDF (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.

WHO/IDF (2006). Definition and Diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia

Zander, M., Madsban, S., Madsen, J.L., Holst, J.J. (2002). Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and β -cell function in type 2 diabetes: a parallel group study. *Lancet*, 359: 824-30.

Zarkovic, M., Ciric, J., Penezic, Z., Trbojevic, B., Drezgic, M. (2000). Effect of weight loss on the pulsatile insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 3673-3677.

Zawadzki, J.K., Dunaif, A. (1992). Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif, A., Givens, J.R., Haleltine, F.P., Merriam, G.R. *Polycystic ovary syndrome.* Boston: Blackwell Scientific Publications: 377-384.

Seznam příloh

Příloha 1

Grimmichová T., Vrbíková J., Vondra K. Pulzní sekrece inzulínu. DMEV, roč.10, č.1, 2007, str. 12-18.

Příloha 2

Grimmichová T., Vrbíková J., Vondra K. Pulzní sekrece inzulínu. In: Stárka a kol. Pokroky v Endokrinologii, Praha, Maxdorf, 2007, str. 641-648.

Příloha 3

Vrbikova J., Grimmichova T., Dvorakova K., Hill M., Stanicka S., Vondra K. Family history of diabetes mellitus determines insulin sensitivity and beta cell function in polycystic ovary syndrome. *Physiol Res* 2008, 57:547-53.

Příloha 4

Grimmichova T., Vrbikova J., Matucha P., Vondra K., Veldhuis P.P., Johnson M.L. Fasting insulin pulsatile secretion in lean women with polycystic syndrome. *Physiol Res* 2008, Feb., 57 (suppl. 1): S91-98.

Příloha 5

Vrbikova J., Hill M., Bendlova B., Grimmichova T., Dvorakova K., Vondra K., Pacini G. Incretin levels in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*, 2008, Vol 159, 121-127.

Příloha 6

Vrbikova J., Dvorakova K., Grimmichova T., Hill M., Stanicka S., Cibula D., Bendlova B., Starka L., Vondra K. Prevalence of insulin resistance and prediction of glucose intolerance and type 2 diabetes mellitus in women with polycystic ovary syndrome. *Chem Lab Med*, 2007; 45: 639-44.

Příloha 1

PULZNÍ SEKRECE INZULINU

PULSATILE INSULIN SECRETION

TEREZA GRIMMICOVÁ, JANA VRBÍKOVÁ, PETR MATUCHA, KAREL VONDRA

Endokrinologický ústav, Praha

SOUHRN

Inzulín je z β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu uvolňován převážně v pulzech. Sekrece inzulínu je charakterizována rychlými pulzy o nízké amplitudě s periodicitou 8–15 minut a pomalými pulzy o vysoké amplitudě s periodicitou 60–140 minut. Rychlé pulzy inzulínu inhibují jaterní glukoneogenezi a pomalé pulzy inzulínu se podílejí na periferní utilizaci glukózy. Nejvýznamnějším podnětem stimulujícím sekreci inzulínu je glukóza. Mezi pomalými pulzy inzulínu a oscilacemi glykémie je jednoduchá zpětná vazba. Rychlé pulzy inzulínu jsou řízeny kromě oscilací glykémie i nervovými vlivy. Pankreas je bohatě nervově zásoben a tato inervace zajišťuje koordinovanou sekreci inzulínu ze všech ostrůvků pankreatu. Sekreci inzulínu ovlivňuje mnoho dalších metabolických substrátů, hormonů či neurotransmiterů. Změny jak v rychlých, tak v pomalých pulzech inzulínu mohou být časným projevem poruchy sacharidového metabolismu.

Klíčová slova: inzulín, pulz, oscilace, regulace, diabetes

SUMMARY

Insulin is secreted mostly in pulsatile manner from pancreatic β -cells. There are two types of insulin pulsatile secretion: rapid and slow. Rapid pulses have low amplitude and high frequency (8–15 minutes), on the other side, slow ultradian oscillations have high amplitude and low frequency (60–140 minutes). The pulsatility of insulin secretion influences insulin sensitivity. Rapid pulses suppress hepatic gluconeogenesis. Slow pulses influence glucose utilization in the peripheral tissues. Glucose is the most important regulator of insulin secretion, with the feedback loop between slow pulses and blood glucose levels. Rapid insulin pulses besides oscillations of plasma glucose are controlled by the neural influences arising from rich autonomic pancreatic innervation. Many other metabolic substrates, hormones or neurotransmitters could influence insulin secretion. The changes in insulin pulsatility are detected early in the course of impaired glucose metabolism and it could be early and sensitive marker of β cell dysfunction.

Key words: insulin, pulse, oscillation, regulation, diabetes

ÚVOD A TERMINOLOGIE

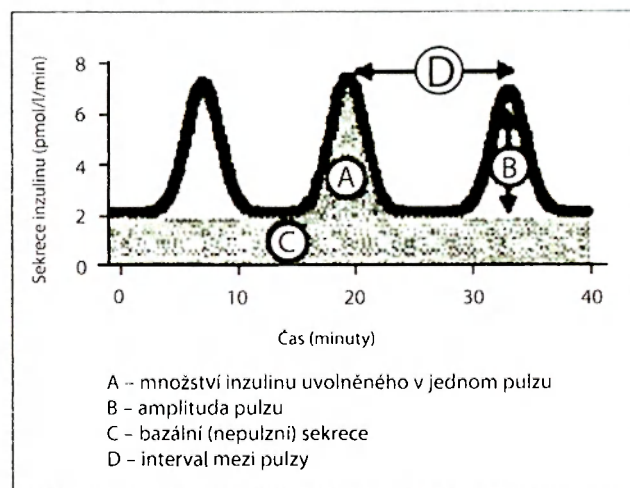
V roce 1922 Karen Hansenová popsala oscilace plazmatické hladiny glukózy v postabsorbčním stavu (tj. po nejméně 12hodinovém lačnění). Souvislost oscilací glykémie a inzulínie byla zjištěna koncem 60. let. Sekrece inzulínu z β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu má převážně pulzní charakter. Nalačno tvoří množství inzulínu uvolněné v průběhu pulzů přibližně 70 % celkové sekrece inzulínu. Při stimulaci glukózou se podílí pulzní sekrece inzulínu nejméně 75 % na celkové sekreci inzulínu. Předpokládá se proto, že jakýkoliv proces, který selektivně snižuje pulzní složku sekrece inzulínu, má zásadní vliv i na snížení celkové sekrece inzulínu (Porksen, 2002; Porksen et al., 1997).

Terminologie, se kterou se můžeme setkat v literatuře, není úplně jednotná (Del Prato et al., 2002; Porksen et al., 2000; Schmitz et al., 2002). Jako bazální sekrece je některými autory nazývána sekrece inzulínu, která nejeví pulzilitu. Jiní autoři jako bazální označují sekreci, která není indukovaná glukózou (tedy v postabsorbčním stavu). Pulzní sekrece inzulínu nasedá na bazální sekreci (obr. 1) (Schmitz et al., 2002).

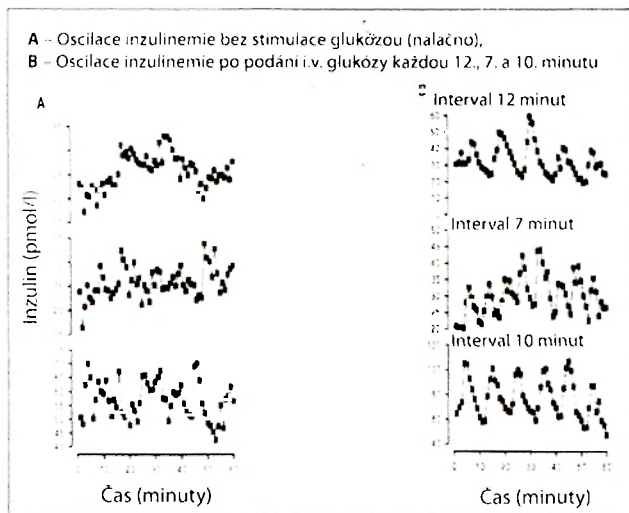
Pulzní sekrece inzulínu je charakterizována pomalými (ultradiálními) a rychlými pulzy. Rychlé pulzy o nízké amplitudě s periodicitou 8–15 minut nasedají na pomalé oscilace o větší amplitudě s periodicitou 60–140 minut. *In vivo* vzniká simultánní sekreci inzulínu až z 1 miliónu jednotli-

vých Langerhansových ostrůvků pankreatu jeden integrovaný pulz (Porksen, 2002).

V izolovaných perfundovaných pankreatech a v izolovaných Langerhansových ostrůvcích jsou rychlé pulzy detekovatelné v médiu i při stabilní hladině glukózy. Proto mohou být rychlé pulzy inzulínu řízené *intrapankreatickým neuronálním pacemakerem nezávisle na oscilacích glykémie* (Stag-



Obr. 1 Pulzní a bazální sekrece inzulínu.



Obr. 2 Ovlivnění rychlých pulzů inzulínu oscilacemi glykémie (volně podle Porksen et al., 2000).

ner et al., 1980). *In vivo* se při regulaci rychlých pulzů uplatňuje oscilace glykémie a/nebo nervové vlivy. Předpokládá se, že samotný hypotetický neuronální intrapancreatický pacemaker je citlivý na změny hladiny glukózy.

Při srovnání rychlých pulzů inzulínu nalačno (obr. 2A) a po stimulaci glukózou (obr. 2B) je zřejmé, že frekvence rychlých pulzů inzulínu odpovídá na změnu intervalu podávání infuze glukózy; pulzy inzulínu jsou pravidelnější a jsou zřetelněji oddělené. Dle této studie jsou malé oscilace glykémie ve fyziologickém rozmezí u zdravých osob schopné řídit pulzilitu sekrece inzulínu s odpovídající periodicitou od 7 do 12 minut (Porksen et al., 2000). Naopak oscilace inzuliniemie je nezbytná pro udržení plazmatické hladiny glukózy v úzkém fyziologickém rozmezí (Porksen et al., 2000).

Oscilace glykémie a pomalých pulzů inzulínu jsou blíže synchronní. Podobně jako osciluje hladina inzulínu, kolísá i hladina plazmatické glukózy. Změnou periodicity podávání i.v. infuze glukózy dosáhneme současně i změnu periodicity oscilací hladin inzulínu (tzv. entrainment). Proto se předpokládá jednoduchá zpětná vazba mezi oscilacemi glykémie a pomalými pulzy inzulínu (Sturis et al., 1991).

JÁTRA, INZULINOVÁ SENZITIVITA A PULZNÍ SEKRECE INZULINU

Hlavní cílové orgány působení inzulínu jsou játra, kosterní sval a tuková tkáň. Inzulín je z β -buněk pankreatu uvolňován do portálního řečiště. Při první pasáži játry je před dosažením systémového řečiště z 40–80 % vychytán. V portálním řečišti detekujeme proto koncentrace inzulínu o 80–500 % vyšší než v systémové cirkulaci. Jedna z nedávných studií udává, že amplituda pulzů inzulínu v systémovém řečišti tvoří pouze 1 % amplitudy v portálním řečišti (Meier et al., 2005). Odběry z portálního řečiště jsou ale v humánních studiích těžko schůdné, neboť jsou uskutečnitelné především za využití transjugulárního intrahepatického portosystémového shuntu (Song et al., 2000). Frakční extrakce inzulínu v játrech se může lišit podle toho, zda je glukóza jako sekreční podnět podána perorálně nebo intravenózně. Po p.o. podání glukózy je frakční extrakce inzulínu v játrech významně nižší nežli po i.v. aplikaci. Předpokládá se, že za snížení frakční jaterní extrakce inzulínu mohou být zodpovědné gastrointestinální hormony anebo nervové vlivy, které jsou stimulovány během požití glukózy (Nauck et al., 1986).

Před dosažením svalové anebo tukové buňky musí inzulín difundovat přes cévní endotel, což dále snižuje amplitudu pulzu. „Konečný signál“ v periferních tkáních je tedy celkově zeslaben v důsledku hepatální extrakce, dříve v systémovém řečišti a časového opoždění amplitudy pulzu (Porksen, 2002).

Pulzní sekrece ovlivňuje účinek inzulínu (inzulinovou senzitivitu) v periferních tkáních. Je to dáno mj. kinetikou inzulínových receptorů, kdy kontinuální podání inzulínu ve srovnání s pulzním podáním vede k výraznější down-regulaci inzulínových receptorů. Rychlé pulzy inzulínu mají v portálním řečišti mnohem vyšší amplitudu než posthepatálně v systémovém řečišti. Proto se předpokládá, že rychlé pulzy ovlivňují (inhibují) zejména jaterní produkci glukózy a že jejich posthepatální efekt na utilizaci glukózy je jen malý (Meneilly et al., 1997). Pulzní podání inzulínu účinněji než kontinuální inhibuje jaterní glukoneogenezu (Ahren, 2000; Porksen, 2002; Schmitz et al., 2001). Je zajímavé, že tento efekt je závislý na frekvenci pulzů. Podávání inzulínu v intervalu 13 minut má výrazný efekt na inhibici endogenní produkce glukózy, při intervalu 26 minut inhibiční efekt vymizel (Paolisso et al., 1991).

Naopak, pomalé pulzy inzulínu ovlivňují periferní utilizaci glukózy. Hladina glykémie je výrazněji snižována po pulzním podání inzulínu ve srovnání s konstantní rychlostí podávání inzulínu. Dostatečně velká amplituda pomalých pulzů inzulínu zajišťuje po intravenózním podání glukózy, při kontinuální enterální výživě anebo po podání jídla v intersticiu periferních tkáních, lepší využití glukózy (Porksen, 2002).

REGULACE PULZNÍ SEKRECE INZULINU

a) Metabolická kontrola pulzní sekrece inzulínu

Glukóza se považuje za nejvýznamnější podnět, který ovlivňuje sekreci inzulínu v jednotlivé β -buňce. Samotná glykolýza má v β -buňce cyklické výkyvy vlivem opakující se aktivace klíčového enzymu glykolýzy fosfofruktokinázy. Oscilace glykolýzy jsou doprovázeny oscilacemi v poměru ATP/ADP. Zvýšení ATP a/nebo snížení ADP vede k uzavření ATP-senzitivních K^+ kanálů. Následně dochází k depolarizaci β -buněk a k aktivaci kalciových kanálů. Nárůst koncentrace intracelulárního kalcia vede k exocytóze granul s inzulínem. Oscilace intracelulárního kalcia nejsou pravděpodobně podnětem pro oscilace inzulínu, ale mohou být důležité pro zesílení těchto oscilací (Tornheim, 1997). Hypotetický neuronální pacemaker je pravděpodobně také pod vlivem změn v koncentraci glukózy, neboť frekvence inzulínových pulzů se zvyšuje z periody 7–8 minut za bazálních podmínek na 4–5 minut při hyperglykémii (Juhl et al., 2002).

Dalším metabolickým regulátorem sekrece inzulínu jsou neesterifikované mastné kyseliny (VMK). Krátká expozice izolovaných β -buněk volným mastným kyselinám za podmínek *in vitro* stimuluje sekreci inzulínu. Naopak, při dlouhodobé expozici (více než 48 h) je sekrece inzulínu snižena. Mechanismus, kterým VMK řídí sekreci inzulínu, není zcela jasný. *In vivo* hladiny VMK také oscilují s periodicitou 7–11 minut (Getty et al., 2000). Oscilace hladin VMK jsou převážně pod vlivem sympatického nervového systému. Předpokládala se existence zpětnovazebního mechanismu mezi změnami hladin VMK a oscilacemi inzuliniemie. Lze předpokládat, že oscilace hladin VMK se mohou podílet na řízení sekrece inzulínu (Schmitz et al., 2001). Je známá také vzájemná závislost mezi oscilacemi hladiny inzulínu a leptinu, který je jedním z hormonů poskytujících informace o nutričním stavu

organizmu nadřazeným neuroendokrinním centrům. Vzájemný vztah těchto dvou hormonů není také plně objasněn. (Koutkia et al., 2003).

b) Nervová kontrola pulzní sekrece inzulinu

Sekrece jednotlivých β -buněk v jednom z Langerhansových ostrůvků je koordinována prostřednictvím elektrofyziologického spojení mezi jednotlivými buňkami. Langerhansovy ostrůvky pankreatu jsou bohatě inervovány parasympatickými, sympatickými i senzoryckými nervy. Nervová kontrola funkce endokrinního pankreatu zajišťuje *in vivo* synchronizaci sekrece všech Langerhansových ostrůvků (Ahren, 2000). Pro důležitou úlohu nervové regulace pulzní sekrece inzulinu mluví také sledování transplantovaných izolovaných ostrůvků. Reinervace ostrůvků pankreatu transplantovaných do jater se postupně objevuje mezi 4. až 14. týdnem po výkonu. Inzulin se uvolňuje v koordinovaných pulzech až po ukončení plné reinervace transplantovaných ostrůvků pankreatu (Porksen, 2002).

V pankreatu se nacházejí nervová ganglia, v nichž končí vlákna dorzálního motorického jádra n. vagus. V nervových zakončeních v gangliích se uvolňuje *acetylcholin (ACh)*, který aktivuje nikotinové receptory na postgangliových neuronech. Postgangliová nervová vlákna pak inervují jednotlivé Langerhansovy ostrůvky. Jako neurotransmitter zde funguje opět ACh, váže se na muskarinové receptory typu μ_3 . Parasymphatická inervace cestou n. vagus stimuluje sekreci inzulinu a také sekreci glukagonu, somatostatinu a pankreatického polypeptidu (PP). Stanovení PP se využívá jako nepřímý ukazatel parasymphatické aktivity nervů inervující pankreas.

Parasymphatická inervace je zajištěna i dalšími mediátory. V nervových zakončeních parasymphaticku byly prokázány pomocí imunohistochemických metod peptidergní mediátory, jako je *vazoaktivní intestinální polypeptid (VIP)*, *pituitární adenylát cyklázu aktivující polypeptid (PACAP)* a *gastrin releasing peptide (GRP)*. Předpokládá se, že neuronální intrapancreatický pacemaker koordinuje sekreci ostrůvků pankreatu právě za pomoci peptidergního nervového systému (Stagner et al., 1980).

Symphatická inervace pankreatu je zprostředkována postgangliovými adrenergními vlákny vycházejícími z ganglion coeliacum anebo přímo z pankreatických symphatických ganglií. Pregangliová symphatická vlákna začínají v hypothalamu a vystupují z míchy v úrovni C8-L3. Aktivace symphaticku globálně inhibuje bazální i glukózou stimulovanou sekreci inzulinu. Jako mediátory na symphatických nervových zakončeních fungují *noradrenalin (NA)*, *neuropeptid Y (NPY)* a *galanin*. NA inhibuje sekreci inzulinu vazbou na α_2 adrenergní receptory β -buněk, nicméně může sekreci inzulinu také stimulovat, a to jak přímo, vazbou na β_2 -adrenergní receptory β -buněk ostrůvků pankreatu, tak nepřímo aktivací β_2 a α_2 receptorů na α -buňkách, což vede k uvolnění glukagonu, antagonisty inzulinu. Celkový efekt NA na sekreci inzulinu je proto závislý na vzájemném poměru α_2 - a β_2 -receptorů na β -buňkách. Galanin a NPY sekreci inzulinu inhibují. Sekrece somatostatinu v δ -buňkách je symphatickem inhibována.

Langerhansovy ostrůvky mají také senzoryckou inervaci. Jako neurotransmitery byly v senzoryckých vláknech prokázány *substance P* a *calcitonin gene-related peptide-1 (CGRP-1)*, které inhibují sekreci inzulinu a stimuluje sekreci glukagonu (Ahren, 2000).

V pankreatu byla nalezena další nervová zakončení, která se nedají zařadit k parasymphatickému, symphatickému ani

senzoryckému systému. Mezi ně patří např. nervová zakončení uvolňující oxid dusnatý a cholecystokinin (Ahren, 2000).

Jako cefalickou fázi sekrece inzulinu označujeme sekreci spouštěnou senzoryckou inervací a ne absorbovanými nutrienty. Aferentní dráha cefalické fáze sekrece inzulinu je aktivována cestou čichové, vizuální a chuťové nervové dráhy a orofaryngeálními mechanickými receptory. Cefalická odpověď inzulinové sekrece je u lidí přítomna v prvních 3–4 minutách po podání jídla. Cefalická fáze sekrece inzulinu přispívá jen 1–3 % k celkové postprandiální sekreci inzulinu, ale předpokládá se, že zásadním způsobem ovlivňuje postprandiální vzestup glykemie, a tak i glukózovou toleranci. Pokud byla u potkanů podána glukóza tak, že byla obehita ústní dutina, a tedy vyloučen vliv cefalické fáze sekrece inzulinu, byla pozorována porucha glukózové tolerance (Steffens, 1976).

Autonomní inervace ostrůvků pankreatu je důležitá pro řízení cefalické fáze sekrece inzulinu, synchronizaci inzulinové sekrece ze všech ostrůvků pankreatu a optimalizaci hormonální sekrece ostrůvků pankreatu během stresových reakcí, jako je např. hypoglykemie (Ahren, 2000).

c) Hormonální kontrola pulzní inzulinové sekrece

Hormonální kontrola významně reguluje sekreci inzulinu. Inkretiny GLP-1 (glukagon-like peptid 1) a GIP (glukózo-dependenční inzulinotropní polypeptid) se uvolňují po požití jídla v gastrointestinálním traktu a stimuluje sekreci inzulinu. Proto je při navození stejné hladiny glykemie po perorálním podání glukózy sekrece inzulinu o 30–60 % vyšší než při parenterálním podání glukózy (tzv. inkretinový efekt). Inkretiny zvyšují množství inzulinu produkované v jednom pulzu bez ovlivnění frekvence a pravidelnosti pulzů (Nauck et al., 1986).

IGF-1 (insulin-like growth factor-1), angiotenzin II a somatostatin inhibují sekreci inzulinu tím, že snižují množství inzulinu produkované v jednom pulzu (Porksen, 2002; Schmitz et al., 2002).

PULZNÍ SEKRECE INZULINU U PORUŠENÉ GLUKÓZOVÉ TOLERANCE (PGT), DIABETU MELLITU (DM) A OBEZITY

Diabetes mellitus 2 typu (DM 2) je heterogenní onemocnění charakterizované inzulinovou rezistencí (IR) a nedostatečností sekrece inzulinu. Sekreční porucha u DM 2 zahrnuje snížení až vymizení první fáze sekrece inzulinu po glukózovém podnětu, opoždění a zeslabení sekreční odpovědi inzulinu na požití jídla, zvýšení molárního poměru proinzulin/inzulin v plazmě a postprandiální hyperglukagonemii vedoucí k nedostatečnému utlumení jaterní glukoneogeneze.

Porušená glukózová tolerance (PGT) a DM 2 jsou provázány poruchou pulzní sekrece inzulinu. U pacientů s DM 2 mají pulzy inzulinu celkově nižší amplitudu. Dále u nich nacházíme také sníženou jaterní extrakci inzulinu, která je závislá právě na pulzní sekreci inzulinu. Není však zcela jasné, zda-li je primární příčinou vedoucí k poruše pulzní sekrece inzulinu neuronální dysfunkce či dysfunkce β -buněk ostrůvků pankreatu (Ahren, 2000), kdy může jít o nedostatečnou citlivost β -buněk na glukózu a/nebo nedostatečnou odpověď na malé změny koncentrací glukózy (Hollingsdal et al., 2000).

U pacientů s PGT a s DM 2 měření intervalů mezi jednotlivými pulzy ukázalo zpomalení oscilací glykemií bez pododného zpomalení oscilací pomalých pulzů inzulinu jak například, tak po podání jídla. U neléčených pacientů s DM 2 bylo až 50 % inzulinových pulzů bez spojitosti s oscilacemi glykemií (Sturis et al., 1992). Tato částečná disociace mezi oscilacemi

glykemie a inzulinemie může být časným projevem narušení zpětnovazební smyčky (Porksén, 2002). Jinou příčinou této disociace jsou vlivy zasahující za patologických stavů do řízení oscilačního mechanismu; jako je např. hyperglukagonemie (Sturis et al., 1992). Pomalé pulzy inzulínu mají u již rozvinutého DM 2 menší amplitudu a jsou také méně pravidelné. Rychlé pulzy inzulínu jsou u DM 2 také méně pravidelné a kratší než u zdravých osob.

Zvýšený poměr proinzulin/inzulin v plazmě u pacientů s DM 2 je důsledkem uvolňování nezralých sekrečních granúl při chronicky zvýšeném nároku na β -buňky (hyperglykemie a IR při celkově sníženém množství β -buněk vlivem depozit amyloidu u DM2). Frekvence pulzů je zachována, množství inzulínu uvolněné během jednoho pulzu je zmenšeno, což vede k celkově snížené inzulinové sekreci (Laedtke et al., 2000).

Příbuzní prvního stupně pacientů s DM 2 mají vysoké riziko vzniku DM 2. Byla u nich pozorována nepravidelná pulzní sekrece inzulínu, i přestože měli normální glukózovou toleranci. Porucha pulzní sekrece inzulínu byla u nich prokazatelná, i když první fáze sekrece inzulínu byla ještě ve fyziologickém rozmezí (O'Rahilly et al., 1988). Proto běžně uznávané tvrzení, že porušená první fáze sekrece inzulínu je nejčasnější porucha inzulinové sekrece u DM 2, nemusí odpovídat skutečnosti. Porucha ultradiálních oscilací inzulínu během stavu na lačno by mohla být senzitivnějším markerem poruchy β -buněk než vymizení první fáze sekrece inzulínu po glukózovém podnětu.

U pacientů s recentním DM 1 jsou zachovány ultradiální oscilace hladiny inzulínu, a to i při celkově nižším sekrečním výdeji inzulínu. Dále byla i u nich zjištěna méně těsná vazba mezi oscilacemi glykemie a pomalými oscilacemi inzulinemie než u zdravých osob (Bingley et al., 1992).

U prvostupňových příbuzných pacientů s DM1, kteří měli pozitivní protilátky proti antigenům Langerhansových ostrůvků pankreatu byla srovnávána bazální sekrece inzulínu (nalačno) se zdravými kontrolami. U osob s pozitivními protilátkami proti antigenům ostrůvků pankreatu byla zjištěna nepravidelná sekrece inzulínu ve srovnání se zdravou skupinou. Porušená pulzní sekrece inzulínu byla detekovatelná i u osob s pozitivními protilátkami a s ještě fyziologickou sekrecí inzulínu při ivGTT (Bingley et al., 1992).

Pacienti s abdominální formou obezity mají jak bazální, tak jídlem stimulovanou hyperinzulinemii. Na tom se může podílet nadměrná nervově indukovaná cefalická fáze sekrece inzulínu (Ahren, 2000). U obezních pacientů byla zjištěna zvýšená frekvence rychlých pulzů. Zkrácení intervalu mezi jednotlivými rychlými pulzy korelovalo se současným snížením inzulinové senzitivity. Ultradiální pomalé oscilace hladiny inzulínu mají u obezních vyšší amplitudu ve srovnání se zdravými osobami (Peiris et al., 1992).

METODY POUŽÍVANÉ K HODNOCENÍ PULZNÍ SEKRECE INZULINU

1) Santen a Bardin (1973)

Santen-Bardinův algoritmus je jedna z prvních metod užívaných k hodnocení pulzní sekrece. Santen a Bardin definovali pulz jako minimálně 20% nárůst koncentrace sledovaného hormonu nad předcházejícím nadírem (viz níže). Hranice 20 % byla zvolena jako trojnásobek průměrného intra-assay koeficientu variace (Santen, Bardin, 1973).

2) ULTRA program (1981)

Hlavní princip tohoto algoritmu je eliminace všech vrcholů, pro které není žádný přírůstek (rozdíl mezi vrcholem

a předcházejícím poklesem) a snížení (rozdíl mezi vrcholem a následujícím poklesem) a které nepřekročí hranici související s chybou měření daného hormonu. Jako tato hranice je obvykle užíván dvojnásobek intra-assay koeficientu variace (Shapiro et al., 1988)

3) PULSAR program

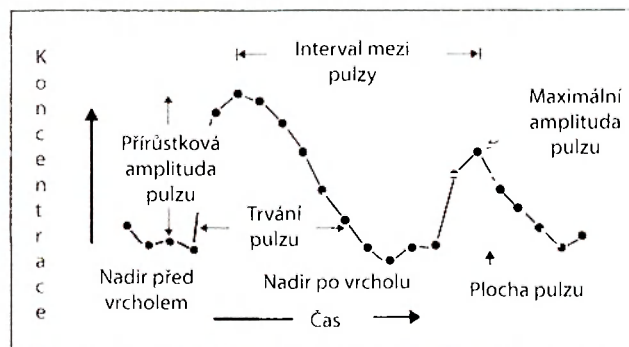
Podstatou této metody je identifikace dlouhodobého trendu v sérii dat vytvářející tzv. vyhlazenou základní čáru (smoothed baseline). Následně se hodnotí signifikantní nárůst nad tuto základní čáru. Je zde využíváno několik předpokládaných hranic (neboli tzv. G koeficientů) ve vztahu k výšce a šířce pulzu (Merriam, Wachler, 1982).

4) Clusterová analýza (shluková analýza)

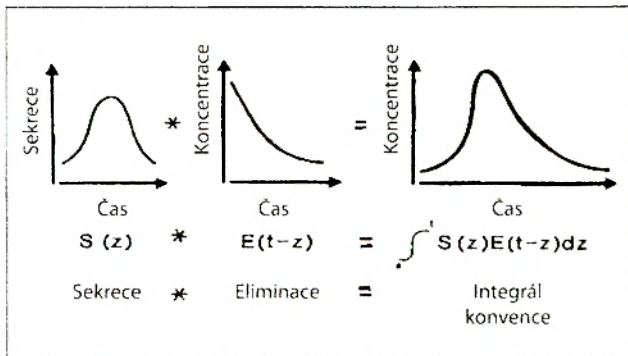
Clusterová analýza je v endokrinologii využívána k hodnocení sekrece mnoha hormonů (Veldhuis et al., 1986). Pulz je clusterovou analýzou definován jako signifikantní zvýšení hodnot vybraného hormonu nakupených v tzv. clusteru následované signifikantním snížením hodnot daného hormonu. Nadír je definován jako signifikantní pokles, který je okamžitě následován signifikantním nárůstem. Vrchol je definován jako signifikantní nárůst koncentrace sledovaného hormonu následovaný signifikantním poklesem, tato formulace vrcholu požaduje přítomnost nadíru na obou dvou stranách uvažovaného vrcholu. Clusterová analýza umožňuje určit průměrnou šířku pulzu v minutách, maximální výšku vrcholu, průměrnou výšku vrcholu jako procento nárůstu nad nadírem, který je těsně před vrcholem, dále přírůstkovou amplitudu pulzu a plochu pod vrcholem. Interval mezi vrcholy je identifikován jako oblast s nadíry bez přerušujícího vrcholu (obr. 3). Program clusterové analýzy by měl poskytovat následující výhody: 1) detekci pulzů i při měnlivé bazální koncentraci hormonů, 2) v sérii dat není nutná uniformní amplituda pulzů, 3) statisticky jednoznačná definice signifikantního nárůstu a poklesu v sérii dat, což umožňuje určit přesně šířku vrcholu, 4) možnost použití multiple-point kritérií k vymezení signifikantních nadírů a vrcholů, 5) senzitivita k assay přesnosti v aktuální experimentální sérii dat, 6) nezávislost na variabilitě falešně-positivních chyb daných širokým rozmezím intra-assay koeficientu variace.

5) Dekonvoluční analýza

Dekonvoluční analýza je matematická procedura vyvinutá pro výpočet základních znaků signálů či událostí, které nejsou pozorovány přímo (např. pulz, seismologická vlna). Poskytuje informace o očekávaném a na čase závislém oslabení původního signálu. V endokrinologii tato metoda hodnotí simul-



Obr. 3 Základní nomenklatura pulzní sekrece hormonu (volně podle Urban et al., 1988).



Obr. 4 Schematické znázornění využití konvolučního integrálu při hodnocení sekrece hormonů (volně podle Veldhuis et al., 1994).

S – sekreční funkce (množství hormonu uvolněné za určitý čas do distribučního objemu)

E (t-z) – eliminační funkce (množství hormonu odstraněné za jednotku času z distribučního objemu)

Dz – časový diferenciál

tánně sekreci a eliminaci vybraného hormonu za pomoci konvolučního integrálu (obr. 4). Hormonální eliminace je popsána mono- nebo multi-exponenciální funkcí. Sekreční funkce může mít podobu jednoduchého pulzu, čtvercové vlny, gaussovské křivky nebo může být zešíkmená.

Dekonvoluční analýza při hodnocení pulzní sekrece může využívat dva modely:

- 1) tzv. na vlně závislý model (waveform-dependent), který můžeme použít, pokud známe tvar sekreční vlny hormonu. Tento model hodnotí zásadní sekreční epizody, jejich počet, množství uvolněného daného hormonu během 1 pulzu na objem systémového, distribučního objemu, délku trvání této epizody, amplitudu a současně počítá kinetiku odbourávání vybraného hormonu neboli jeho poločas $t_{1/2}$.
- 2) tzv. na vlně nezávislý model (waveform-independent) používáme, pokud neznáme přesně tvar sekreční epizody. Pro použití tohoto modelu je nutné a priori znát model kinetiky eliminace daného hormonu (Veldhuis, Johnson, 1994). Dekonvoluční analýzou lze u pulzní sekrece inzulínu hodnotit následující parametry: 1) určitý počet oddělených, inzulínových pulzů objevujících se v určitém čase a mající 2) individuální amplitudu (maximální sekreční výdej dosažený během pulzu), 3) obecný poločas pulzu (trvání algebraického, gaussovského pulzu v polovině maximální amplitudy), který je superimponován na 4) bazální, časově neměnnou sekreci inzulínu a 5) model mono-biexponenciální hormonální eliminace v systémové cirkulaci (Mulligan et al., 1994; Porksen, 2002). Dekonvoluční analýza správně identifikuje více než 90 % pulzů (senzitivita) a správně rozpoznává jejich absenci (specifita). Senzitivita dekonvoluce je ovlivněna amplitudou pulzu i frekvencí odběrů vzorků ke stanovení hladiny hormonů (Porksen et al., 1997; Veldhuis, Johnson, 1995).

6) Approximate entropy (ApEn)

Metoda sloužící k hodnocení pravidelnosti hormonální sekrece. Narušení pravidelnosti pulzní sekrece hormonů bývá časným znakem endokrinní poruchy jako např. u inzulínové sekrece pacientů s DM 2. ApEn přiřazuje přirozené (nezáporné) číslo k časové řadě. Větší pravidelnost (nižší hodnota ApEn) svědčí pro větší autonomii hodnocené hormonální sekrece a naopak větší nepravidelnost (vyšší hod-

nota ApEn) předpokládá významnější vnější vlivy a/nebo vyšší sílu vazby (Pincus et al., 1999).

7) Spektrální a korelační analýza

Frekvenci inzulínových pulzů můžeme hodnotit také pomocí spektrální nebo korelační analýzy. Tyto metody informují o frekvenci dané změnou koncentrací vybraných hormonů. Mají svá omezení, zejména pokud je přítomna velká variabilita ve frekvenci nebo amplitudě pulzů, anebo pokud máme detekovat pulzy o relativně malé amplitudě (Porksen et al., 1995).

ZÁVĚR

Znalost mechanismu vývoje poruchy pulzní sekrece inzulínu u DM 2, stejně jako i u jiných onemocněních doprovázených poruchou sacharidového metabolismu, nám může pomoci pochopit příčiny dysfunkce β -buněk. Porucha rychlých i pomalých oscilací hladin inzulínu pravidelně provází rozvinutý DM 2. Pokud je porucha pulzní sekrece inzulínu přítomná i u prediabetických stadií, tak by mohlo její vyšetření sloužit k časné detekci ohrožených osob.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR 8759-3.

LITERATURA

1. Ahren, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease. *Diabetologia* 2000; 43(4), 393-410.
2. Bingley, P. J., Matthews, D. R., Williams, A. J., Bottazzo, G. F., Gale, E. A. Loss of regular oscillatory insulin secretion in islet cell antibody positive non-diabetic subjects. *Diabetologia* 1992; 35(1), 32-38.
3. Del Prato, S., Marchetti, P., Bonadonna, R. C. Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51 Suppl 1, S109-116.
4. Getty, L., Panteleon, A. E., Mittelman, S. D., Dea, M. K., & Bergman, R. N. Rapid oscillations in omental lipolysis are independent of changing insulin levels in vivo. *J Clin Invest* 2000; 106(3), 421-430.
5. Hollingdal, M., Juhl, C. B., Pincus, S. M., Sturis, J., Veldhuis, J. D., Polonsky, K. S., Porksen, N., Schmitz, O. Failure of physiological plasma glucose excursions to entrain high-frequency pulsatile insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; 49(8), 1334-1340.
6. Juhl, C., Grofte, T., Butler, P. C., Veldhuis, J. D., Schmitz, O., Porksen, N. (2002). Effects of fasting on physiologically pulsatile insulin release in healthy humans. *Diabetes*, 51 Suppl 1, S255-257.
7. Koutkia, P., Canavan, B., Johnson, M. L., DePaoli, A., Grinspoon, S. Characterization of leptin pulse dynamics and relationship to fat mass, growth hormone, cortisol, and insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285(2), E372-379.
8. Laedtke, T., Kjemis, L., Porksen, N., Schmitz, O., Veldhuis, J., Kao, P. C., Butler, P. C. Overnight inhibition of insulin secretion restores pulsatility and proinsulin/insulin ratio in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(3), E520-528.
9. Meier, J. J., Veldhuis, J. D., Butler, P. C. Pulsatile insulin secretion dictates systemic insulin delivery by regulating hepatic insulin extraction in humans. *Diabetes* 2005; 54(6), 1649-1656.

10. Meneilly, G. S., Ryan, A. S., Veldhuis, J. D., Elahi, D. Increased disorderliness of basal insulin release, attenuated insulin secretory burst mass, and reduced ultradian rhythmicity of insulin secretion in older individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(12), 4088-4093.
11. Merriam, G. R., Wachter, K. W. Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am J Physiol* 1982; 243(4), E310-318.
12. Mulligan, T., Deleamarre-van de Waal, H. A., Johnson, M. L., Veldhuis, J. D. Validation of deconvolution analysis of LH secretion and half-life. *Am J Physiol* 1994; 267(1 Pt 2), R202-211.
13. Nauck, M. A., Homberger, E., Siegel, E. G., Allen, R. C., Eaton, R. P., Ebert, R., Creutzfeldt, W. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63(2), 492-498.
14. O'Rahilly, S., Turner, R. C., Matthews, D. R. Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1988; 318(19), 1225-1230.
15. Paolisso, G., Scheen, A. J., Giugliano, D., Sgambato, S., Albert, A., Varricchio, M., D'Onofrio, F., Lefebvre, P. J. Pulsatile insulin delivery has greater metabolic effects than continuous hormone administration in man: importance of pulse frequency. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(3), 607-615.
16. Peiris, A. N., Stagner, J. I., Vogel, R. L., Nakagawa, A., Samols, E. Body fat distribution and peripheral insulin sensitivity in healthy men: role of insulin pulsatility. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(1), 290-294.
17. Pincus, S. M., Hartman, M. L., Roelfsema, F., Thorner, M. O., Veldhuis, J. D. Hormone pulsatility discrimination via coarse and short time sampling. *Am J Physiol* 1999; 277(5 Pt 1), E948-957.
18. Porksen, N. The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia* 2002; 45(1), 3-20.
19. Porksen, N., Juhl, C., Hollingdal, M., Pincus, S. M., Sturis, J., Veldhuis, J. D., Schmitz, O. Concordant induction of rapid in vivo pulsatile insulin secretion by recurrent punctuated glucose infusions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278(1), E162-170.
20. Porksen, N., Munn, S., Steers, J., Vore, S., Veldhuis, J., Butler, P. (1995). Pulsatile insulin secretion accounts for 70% of total insulin secretion during fasting. *Am J Physiol*, 269(3 Pt 1), E478-488.
21. Porksen, N., Nyholm, B., Veldhuis, J. D., Butler, P. C., & Schmitz, O. In humans at least 75% of insulin secretion arises from punctuated insulin secretory bursts. *Am J Physiol* 1997; 273(5 Pt 1), E908-914.
22. Santen, R. J., Bardin, C. W. Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis, clinical interpretation, physiologic mechanisms. *J Clin Invest* 1973; 52(10), 2617-2628.
23. Shapiro, E. T., Tillil, H., Polonsky, K. S., Fang, V. S., Rubenstein, A. H., & Van Cauter, E. (1988). Oscillations in insulin secretion during constant glucose infusion in normal man: relationship to changes in plasma glucose. *J Clin Endocrinol Metab*, 67(2), 307-314.
24. Schmitz, O., Brock, B., Hollingdal, M., Juhl, C. B., Porksen, N. High-frequency insulin pulsatility and type 2 diabetes: from physiology and pathophysiology to clinical pharmacology. *Diabetes Metab* 2002; 28(6 Suppl), 4514-20.
25. Schmitz, O., Juhl, C. B., Hollingdal, M., Veldhuis, J. D., Porksen, N., Pincus, S. M. Irregular circulating insulin concentrations in type 2 diabetes mellitus: an inverse relationship between circulating free fatty acid and the disorderliness of an insulin time series in diabetic and healthy individuals. *Metabolism* 2001; 50(1), 41-46.
26. Song, S. H., McIntyre, S. S., Shah, H., Veldhuis, J. D., Hayes, P. C., Butler, P. C. Direct measurement of pulsatile insulin secretion from the portal vein in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(12), 4491-4499.
27. Stagner, J. I., Samols, E., Weir, G. C. Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J Clin Invest* 1980; 65(4), 939-942.
28. Steffens, A. B. Influence of the oral cavity on insulin release in the rat. *Am J Physiol* 1976; 230(5), 1411-1415.
29. Sturis, J., Polonsky, K. S., Shapiro, E. T., Blackman, J. D., O'Meara, N. M., van Cauter, E. Abnormalities in the ultradian oscillations of insulin secretion and glucose levels in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1992; 35(7), 681-689.
30. Sturis, J., Van Cauter, E., Blackman, J. D., Polonsky, K. S. Entrainment of pulsatile insulin secretion by oscillatory glucose infusion. *J Clin Invest* 1991; 87(2), 439-445.
31. Tornheim, K. Are metabolic oscillations responsible for normal oscillatory insulin secretion? *Diabetes* 1997; 46(9), 1375-1380.
32. Veldhuis, J. D., Johnson, M. L. Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol* 1986; 250(4 Pt 1), E486-493.
33. Veldhuis, J. D., Johnson, M. L. Analytical methods for evaluating episodic secretory activity within neuroendocrine axes. *Neurosci Biobehav Rev* 1994; 18(4), 605-612.

Adresa autora:

MUDr. Tereza Grimmichová

Endokrinologický ústav

Národní 8

Praha 1, 116 94

e-mail: tgrimmichova@endo.cz

Příloha 2

28. Nelson ME, Chou HK, Hamrick ME, Seibin PE, Cooper C. Analysis of environmental factors in familial versus sporadic Paget's disease of bone. The New England Research for Paget's disease of bone. J Bone Miner Res. 2003;18:1419-24.
29. Spencer H, O'Sullivan V, Soutar SJ. Exposure to lead: a potentially hazardous toxic cause of disease of bone. J Trace Elements Exp Med. 1998;8:163-74.
30. Stackey BC, Liu LM, Kent GN, Ward LC, Goffers AB, DH. Bisphosphonate therapy for Paget's disease in a patient with hypoparathyroidism: Profound hypocalcemia, rapid response, and prolonged remission. J Bone Miner Res. 2001;16:1219-23.
31. Van Hul W. Paget's disease from a genetic perspective. Bone. 1999;24:298-305.
32. Walsh JP. Paget's disease of bone. Med J Australia. 2004;181:262-5.

8 ENDOKRINOLOGICKÉ ASPEKTY METABOLICKÝCH ONEMOCNĚNÍ

8.1 PULZNÍ SEKRECE INZULINU

Tereza Grimmichová, Jana Vrbíková, Karel Vondra

8.1.1 Úvod

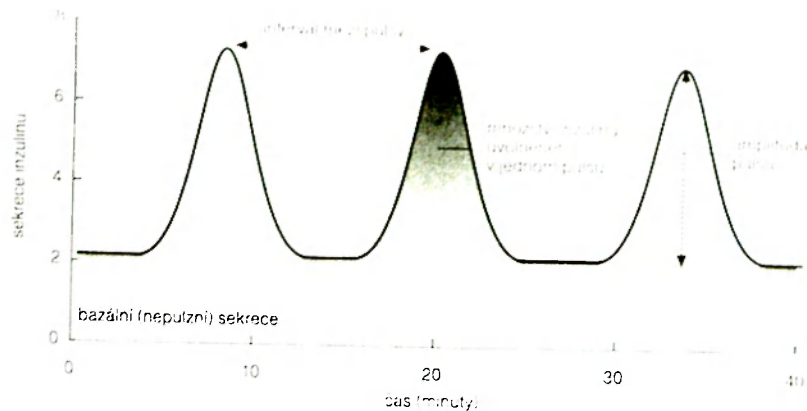
Sekrece inzulínu z beta-buněk Langerhansových ostrůvku pankreatu má převážně pulzní charakter. Množství inzulínu uvolněné v průběhu pulsu tvoří nejméně 75% celkové sekrece inzulínu. V roce 1922 Karen Hansenová popsala, že hladina glykémie není konstantní hodnotou, a to ani v postabsorpčním stavu (po nejméně 12hodinovém lačnění). Souvislost oscilací glykémie a inzulíniemie byla zjištěna koncem 60. let minulého století [13].

Jako *bazální sekrece* je některými autory nazývána sekrece inzulínu, která nejví pulzatilitu. Jiní autoři jako bazální označují sekreci, která není indukovaná glukosou (tedy v postabsorpčním stavu). Terminologie, se kterou se tedy můžeme setkat v literatuře, není úplně jednotná [3, 12, 14]. *Pulzní sekrece* inzulínu nasedá na bazální sekreci (obr. 8.1) [14].

Rychlé pulsy inzulínu jsou přítomné i v izolovaných perfundovaných pankreatech, a to i pokud je v médiu stabilní hladina glukosy. Proto se předpokládá, že i *in vivo* jsou rychlé pulsy inzulínu řízeny *intrapankreatickým pacemakerem nezávisle na oscilacích glykémie*, nicméně v literatuře není o tom úplná jednota [16] a nacházíme protichůdné údaje. Podle jiných autorů mohou být rychlé pulsy inzulínu řízeny oscilacemi glykémie nebo nervovými vlivy [4].

Pomalé oscilace glykémie a hladiny inzulínu jsou blízce synchronní. Podobně jako osciluje hladina inzulínu, kolísá i hladina plasmatické glukosy. Zmínou periodicity podávání i. v. infuze glukosy dosáhneme současně i změny periodicity oscilací hladin inzulínu (tzv. entrainment). Proto se předpokládá *jednoduchá zpětná vazba mezi glykemií a pomalými pulsy inzulínu* [18].





Obr. 8.1 Základní pojmy pulzní sekrece inzulínu

Rychlé i pomalé pulsy jsou přítomny za bazálních podmínek při lačnění i při konstantní infuzi glukosy. Při stimulaci glukosou je zvýšena amplituda jak rychlých, tak pomalých oscilací inzulínu. *In vivo* vzniká simultánní sekrece inzulínu až z 1 miliónu jednotlivých Langerhansových ostrůvků pankreatu i integrovaný puls.

Je znám vliv pulzní sekrece inzulínu na *účinek inzulínu* (na inzulínovou senzitivitu) v periferních tkáních. Protože inzulín je vychytáván až z 80 % při první pasáži játry, mají rychlé oscilace v portálním řečišti mnohem vyšší amplitudu než posthepatálně v systémovém řečišti. Proto se předpokládá, že rychlé pulsy ovlivňují (inhibují) zejména jaterní produkci glukosy a že jejich posthepatální efekt na utílizaci glukosy je jen malý [6].

Naopak, pomalé (ultradiánní) oscilace s periodicitou 80–150 minut o velké amplitudě stimuluje periferní utílizaci glukosy. Po intravenózním podání glukosy, kontinuální enterální výživě anebo po podání jídla dostatečně velká amplituda pomalých pulsu inzulínu zajišťuje v intersticiu periferních tkání výraznější periferní využití glukosy.

Hladina glykémie je výrazněji snižována po pulzním podání inzulínu ve srovnání s konstantní rychlostí podávání inzulínu. Pulzní podání inzulínu účinněji inhibuje jaterní glukoneogenezi stimulovanou glukagonem [1, 11, 15]. Je zajímavé, že tento efekt je závislý na frekvenci pulsu. Podávání inzulínu v intervalu 13 minut má výrazný efekt na inhibici endogenní produkce glukosy, při intervalu 26 minut inhibiční efekt vymizel [9].

8.1.2 Pulzní sekrece inzulínu a játra

Hlavní cílové orgány působení inzulínu jsou játra, kosterní sval a tuková tkáň. Inzulín je z β buněk pankreatu uvolňován do portálního řečiště. Při první pasáži játry je před dosažením systémového řečiště z 40–80 % vychytán. V portálním řečišti denní průměrné koncentrace inzulínu o 80–500 % vyšší než v systémové cirkulaci. Odběry z portálního řečiště jsou však v humánních studiích těžko schůdné, neboť jsou uskutečnitelné především za využití transjugulárního intrahepatického porto-systémového shuntu. Frakční extrakce inzulínu v játrech se může lišit podle toho, zda je glukosa podána perorálně, nebo pokud obejdeme gastrointestinální trakt, podáním glukosy i. v. Po p. o. podání glukosy je frakční extrakce inzulínu v játrech významně nižší nežli po i. v. aplikaci. Předpokládá se, že za snížení frakční jaterní extrakce inzulínu mohou být zodpovědné gastrointestinální hormony anebo nervové vlivy, které jsou stimulovány během požití glukosy [7].

V arteriálním řečišti je amplituda pomalých i rychlých pulsu inzulínu snížena na cca 30 %. Před dosažením svalové anebo tukové buňky musí inzulín difundovat skrz cévní endotel, což dále snižuje amplitudu pulsu. V důsledku hepatální extrakce, diluce v systémovém řečišti a časovým opožděním amplitudy pulsu je celkově oslaben „konečný signál“ [11].

8.1.3 Regulace pulzní sekrece inzulínu

8.1.3.1 METABOLICKÁ KONTROLA PULZNÍ SEKRECE INZULINU

Glukosa se považuje za nejvýznamnější podnět, který ovlivňuje řízení pulzní sekrece inzulínu. Samotná glykolýza má cyklické výkyvy. Katabolismus glukosy vede ke zvýšení intracelulárního poměru ATP/ADP, k depolarizaci β -buněk uzavřením ATP-senzitivních K^+ kanálů a následně k aktivaci kalciových kanálů. Nárůst koncentrace intracelulárního kalcia vede k exocytóze granul s inzulínem. Předpokládá se, že každá jednotlivá β -buňka funguje jako pacemaker pro pulzní regulaci metabolismu glukosy a sekreci inzulínu. Hypotetický neuronální pacemaker je pravděpodobně také pod vlivem změn v koncentraci glukosy, neboť frekvence inzulínových pulsu se zvyšuje z periody 7–8 minut za bazálních podmínek na 4–5 minut při hyperglykémii [5].

Krátká expozice neesterifikovaným mastným kyselinám (FFA) stimuluje sekreci inzulínu za podmínek *in vitro* na izolovaných β -buňkách. Naopak, při dlouhodobé expozici (více než 48 h) je sekrece inzulínu snížena. *In vivo* hladiny FFA také oscilují. Oscilace FFA je pravděpodobně řízena centrálním nervovým systémem, při použití β -blokady dochází k narušení pravidelnosti oscilací hladiny FFA. Předpokládala se existence zpětnovazebního mechanismu mezi FFA a inzulínem. Nieméně při podání glukosy je vidět vzájemná nezávislost oscilací koncentrací FFA a inzulínu, což tuto teorii nepodporuje [15].

Langerhansovy ostrůvky pankreatu jsou bohatě inervovány parasympatickými, sympatickými i senzorickými nervy. Nervová kontrola funkce endokrinního pankreatu zajišťuje *in vivo* synchronizaci sekrece všech Langerhansových ostrůvků. Sekrece jednotlivých buněk v jednom ostrůvku je pak koordinována prostřednictvím elektrofyziologického spojení mezi jednotlivými buňkami [1].

V pankreatu jsou nervová ganglia, v nichž končí vlákna dorzálního motorického jádra *n. vagus*. V nervových zakončeních v gangliích se uvolňuje *acetylcholin (ACh)*, který aktivuje nikotinové receptory na postgangliových neuronech. Postgangliová nervová vlákna pak inervují jednotlivé Langerhansovy ostrůvky. Jako neurotransmiter zde funguje opět ACh, váže se na muskarinové receptory typu μ_3 . Vagová inervace však využívá i další mediatory, v nervových zakončeních parasympatiku byly prokázány pomocí imunohistochemických metod peptidergní mediatory, jako je *vazoaktivní intestinální polypeptid (VIP)*, *pituitární adenylátcyclázu aktivující polypeptid (PACAP)* a *gastrin releasing peptide (GRP)*. Parasympatická aktivita přes *n. vagus* stimuluje také sekreci glukagonu, somatostatinu a *pankreatického polypeptidu (PP)*; jeho stanovení se využívá jako nepřímý ukazatel parasympatické aktivity nervů inervujících pankreas).

Sympatická inervace pankreatu je zprostředkována postgangliovými adrenergními vlákny, vycházejícími z ganglion coeliacum anebo přímo z pankreatických sympatických ganglií. Pregangliová sympatická vlákna začínají v hypothalamu a vystupují z míchy v úrovni C8-L3. Aktivace sympatiku globálně inhibuje bazální i glukosou stimulovanou sekreci inzulínu. Jako mediatory na sympatických nervových zakončeních fungují *noradrenalin (NA)*, *neuropeptid Y (NPY)* a *galanin*. NA může sekreci inzulínu stimuluovat, a to jak přímo (vazbou na β_2 -adrenergní receptory na β -buňkách), tak nepřímo aktivací β_2 a α_2 -receptorů na α -buňkách, což vede k uvolnění glukagonu, antagonisty inzulínu. NA však také může inhibovat sekreci inzulínu, pokud se váže na α_2 -receptory na β -buňkách. Celkový efekt NA na sekreci inzulínu je proto závislý na vzájemném poměru α_2 a β_2 -receptoru. Galanin a NPY sekreci inzulínu inhibují. Sekrece somatostatinu v δ -buňkách je sympatikem inhibována.

Langerhansovy ostrůvky mají také *senzoricke inervaci*. Jako neurotransmitery byly v senzorickech vláknkách prokázány *substance P* a *calcitonin gene-related peptide 1 (CGRP1)*, které inhibují sekreci inzulínu a stimuluji sekreci glukagonu [1].

Pulzní sekrece inzulínu je řízena odlišně od pulzní sekrece glukagonu [8]. V pankreatu byla nalezena další nervová zakončení, která se nedají zařadit k parasympatickému, sympatickému ani senzorickeému systému. Mezi ně patří např. *nervová zakončení uvolňující oxid dusnatý* (inhibice syntázy oxidu dusnatého inhibuje sekreci inzulínu) a *cholecystokinin* (stimuluje sekreci inzulínu). Před-

pokládá se primární cetero-pankreatický nervový mechanismus, neboť jsou známa nervová propojení mezi ganglii duodena a pankreatu [1].

Jako *cefalickou fázi sekrece inzulínu* označujeme sekreci spouštěnou senzorickeou inervací a neabsorbovanými nutrienty. Aterentní dráha cefalické fáze sekrece inzulínu je aktivována cestou čichové, vizuální a chutové nervové dráhy a orofaryngeálními mechanickými receptory. Cefalická fáze sekrece inzulínu přispívá jen 1–3% k celkové postprandiální sekreci inzulínu, ale předpokládá se, že zásadním způsobem ovlivňuje postprandiální vzestup glykemie, a tak i glukosovou toleranci. Cefalická odpověď inzulínové sekrece je u lidí přítomna v prvních 3–4 minutách po podání jídla.

8.1.3.3 HORMONÁLNÍ A FARMAKOLOGICKÁ KONTROLA PULZNÍ INZULINOVÉ SEKRECE

Hormonální kontrola významně reguluje sekreci inzulínu. *Inkretiny* *GIP 1* (glukagon-like peptide 1) a *GIP* (glucose dependent insulinotropic polypeptide) se uvolňují po požití jídla v gastrointestinálním traktu a stimuluji sekreci inzulínu. Proto je při navození stejné hladiny glykemie po perorálním podání glukosy sekrece inzulínu vyšší o cca 30–60% než při parenterálním podání glukosy (tzv. *inkretinový efekt*). Inkretiny zvyšují množství inzulínu produkované v jednom pulsu bez ovlivnění frekvence a pravidelnosti pulsu.

IGF-1 (insulin-like growth factor 1) a *angiotenzin II* inhibují sekreci inzulínu tím, že snižují množství inzulínu produkované v jednom pulsu [11, 14]. Také *somatostatin* inhibuje pulzní sekreci inzulínu.

Pulzní sekreci inzulínu lze ovlivnit i farmakologicky. *Perorální antidiabetika* zvyšují amplitudu pulsu inzulínu beze změny jejich frekvence [11, 14]. *Sulfonylureové deriváty* (gliklazid a tolbutamid) zvyšují množství inzulínu uvolněné v jednom pulsu, zatímco poměr mezi bazální a pulzní sekreci inzulínu se nemění. Repaglinid působí jako postprandiální regulátor hladiny glykemie, zvyšuje bazální sekreci i množství inzulínu uvolněné v jednom pulsu a neovlivňuje frekvenci pulsu.

Thiazolidindiony (TZD) zvyšují inzulínovou senzitivitu; jsou účinné zejména ve svalové a tukové tkáni, kde zvyšují využití glukosy, v hepatocytech snižují glukoneogenezi a mají i efekt antioxidační. Podání glitazonu je následováno významným poklesem plasmatických koncentrací FFA, což vede ke snížení jejich lipotoxického působení na β -buňky, a tedy „sekundárně“ ke zlepšení inzulínové sekrece. Při terapii troglitazonem dochází k úpravě pravidelnosti ultradiální pulzní sekrece inzulínu.

8.1.4 Pulzní sekrece inzulínu u porušené glukosové tolerance (PGT), diabetu mellitus (DM) a obezity

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) je heterogenní onemocněním charakterizovaným inzulínovou rezistencí (IR) a absolutní nebo relativní nedostatečností sekrece inzulínu. Sekreční porucha u DM2 zahrnuje snížení až *vymizení první fáze sekrece inzulínu* po glukosovém podnětu, opoždění a zeslabení sekreční odpovědi inzulínu na požití jídla a zvýšení molárního poměru proinzulín/inzulín v plasmě.

U pacientů s PGT a s DM2 měření intervalu mezi jednotlivými pulsy ukázalo zpomalení oscilací glykemie bez podobného zpomalení oscilací hladin inzulínu jak za stavu lačnění, tak při podání jídla. Tato částečná *disociace mezi oscilacemi glukosy a inzulínu* může být časným projevem narušení zpětnovazebné smyčky [11]. U neléčených pacientů s DM2 byla prokázána porucha ve zpětné vazbě mezi hladinami glykemie a sekrecí inzulínu, kdy je až 50% inzulínových pulsů bez spojitosti s oscilacemi glykemie [17]. Rychlé pulsy inzulínu jsou méně pravidelné a kratší než u zdravých osob. Ultradiánní oscilace hladiny inzulínu mají u již rozvinutého DM2 nižší amplitudu a jsou také méně pravidelné. Porucha inzulínové sekrece u DM2 pravděpodobně souvisí buď s nedostatečnou citlivostí na glukosu a/nebo nedostatečnou odpovědí na malé změny koncentrací glukosy [4].

Příbuzní prvního stupně pacientů s DM2 mají vysoké riziko vzniku DM2. Porucha pulzní sekrece inzulínu u nich byla detegovatelná, i když první fáze sekrece inzulínu byla ještě v normálním rozmezí. Proto běžně uznávané tvrzení, že porušená první fáze sekrece inzulínu je nejčasnější detegovatelná porucha inzulínové sekrece u DM2, nemusí odpovídat skutečnosti a je možné, že porucha ultradiánních oscilací inzulínu během stavu na lačno by mohla být senzitivnějším markerem poruchy β -buněk než *vymizení první fáze sekrece inzulínu* po glukosovém podnětu.

U pacientů s recentním DM1 jsou sice zachovány ultradiánní oscilace hladiny inzulínu, ale při nižším sekrečním výdeji inzulínu. Byla u nich zjištěna méně těsná vazba mezi oscilacemi glykemie a pomalými oscilacemi inzulinemie než u zdravých osob [2].

Pacienti s abdominální formou obezity mají bazální i stimulovanou hyperinulinemii po jídle, na čemž se může podílet nadměrná nervově indukovaná inzulínová sekrece a celá fáze sekrece inzulínu. U *obézních* pacientů byl zjištěn zkrácený interval mezi jednotlivými rychlými pulsy inzulínu, a tedy zvýšená frekvence rychlých pulsů. Zkrácení intervalu mezi jednotlivými rychlými pulsy korelovalo se *současným snížením inzulínové senzitivity*. Ultradiánní pomalé oscilace hladiny inzulínu mají u obézních vyšší amplitudu ve srovnání se zdravými osobami [10].

8.1.5 Pulzní sekrece inzulínu ve stáří

Proces stárnutí je charakterizován zhoršováním glukosové tolerance. Inzulínová sekrece se stává více nepravidelnou, což se projeví jako částečná *disociace* vazby mezi oscilacemi inzulinemie glykemie. U starých osob nepravidelnost pulzní sekrece inzulínu souvisí s involučními změnami v nervové regulaci pankreatických funkcí.

Za podmínek nalačno jsou rychlé pulsy charakterizovány snížením amplitudy i množství inzulínu uvolněného během jednotlivého pulsu. S věkem se snižuje postprandiální suprese játerní glukoneogeneze. Zdá se, že snížená amplituda rychlých inzulínových pulsů u starých lidí může přispívat ke zhoršené regulaci játerní produkce glukosy [6].

Ultradiánní oscilace inzulínu při podmínkách nalačno mají sníženou frekvenci bez změny amplitudy. Při hyperglykémii navozené infuzí glukosy je pak snižena i amplituda těchto ultradiánních oscilací.

Závěr

Znalost mechanismu vývoje poruchy pulzní sekrece inzulínu u DM2, stejně jako i u jiných onemocnění doprovázených poruchou sacharidového metabolismu, nám může pomoci pochopit příčiny dysfunkce β -buněk. Není jasné, zda při vzniku diabetické poruchy jsou primární metabolické defekty nebo geneticky podmíněné defekty funkce β -buněk. Výrazná porucha rychlých i pomalých oscilací hladin inzulínu pravidelně provází rozvinutý DM2. Pokud je porucha pulzní sekrece inzulínu přítomná i u prediabetických stadií, mohlo by její vyšetření sloužit k časně detekci ohrožených osob.

Práce byla podpořena grantem IGA MZd ČR NR 8759-3.

Literatura 8.1

1. Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease. *Diabetologia*. 2000;43:393–410.
2. Bingley PJ, Matthews DR, Williams AJ, Bottazzo GF, Gale EA. Loss of regular oscillatory insulin secretion in islet cell antibody positive non-diabetic subjects. *Diabetologia*. 1992;35:32–8.
3. Del Prato S, Marehetti P, Bonadonna RC. Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 1:S109–16.
4. Hollingdal M, Juhl CB, Pincus SM, Sturis J, Veldhuis JD, Polonsky KS, et al. Failure of physiological plasma glucose excursions to entrain high-frequency pulsatile insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49:1334–40.
5. Juhl C, Grofte T, Butler PC, Veldhuis JD, Schmitz O, Porksen N. Effects of fasting on physiologically pulsatile insulin release in healthy humans. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 1:S255–7.
6. Meneilly GS, Ryan AS, Veldhuis JD, Elahi D. Increased disorderliness of basal insulin release, attenuated insulin secretory burst mass, and reduced ultradian rhythmicity of insulin secretion in older individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:4088–93.

7. Nairn EA, Hombrovec F, Samols EG, Allen PC, Lapos EP, Unger EH et al. Bursts of insulin increase glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;63:492-8.
8. Opara EC, Go VL. Effect of nerve blockade on pulsatile insulin and glucagon secretion in vitro. *Pancreas*. 1991;6:653-8.
9. Paolisso G, Scheen AJ, Giugliano D, Sgambato S, Albert A, Varrichio M et al. Pulsatile insulin delivery has greater metabolic effects than continuous hormone administration in man: importance of pulse frequency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;72:607-15.
10. Peiris AN, Stagner JL, Vogel RL, Nakagawa A, Samols E. Body fat distribution and peripheral insulin sensitivity in healthy men: role of insulin pulsatility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75:290-4.
11. Porksen N. The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia*. 2002;45:3-20.
12. Porksen N, Juhl C, Hollingdal M, Pincus SM, Sturis J, Veldhuis JD, Schmitz O. Concordant induction of rapid in vivo pulsatile insulin secretion by recurrent punctuated glucose infusions. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278:E162-70.
13. Porksen N, Nyholm B, Veldhuis JD, Butler PC, Schmitz O. In humans at least 75% of insulin secretion arises from punctuated insulin secretory bursts. *Am J Physiol*. 1997;273:E908-14.
14. Schmitz O, Brock B, Hollingdal M, Juhl CB, Porksen N. High-frequency insulin pulsatility and type 2 diabetes: from physiology and pathophysiology to clinical pharmacology. *Diabetes Metab*. 2002;28:4S14-20.
15. Schmitz O, Juhl CB, Hollingdal M, Veldhuis JD, Porksen N, Pincus SM. Irregular circulating insulin concentrations in type 2 diabetes mellitus: an inverse relationship between circulating free fatty acid and the disorderliness of an insulin time series in diabetic and healthy individuals. *Metabolism*. 2001;50:41-6.
16. Stagner JL, Samols E, Weir GC. Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J Clin Invest*. 1980;65:939-42.
17. Sturis J, Polonsky KS, Shapiro ET, Blackman JD, O'Meara NM, van Cauter E. Abnormalities in the ultradian oscillations of insulin secretion and glucose levels in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1992;35:681-9.
18. Sturis J, van Cauter E, Blackman JD, Polonsky KS. Entrainment of pulsatile insulin secretion by oscillatory glucose infusion. *J Clin Invest*. 1991;87:439-45.

8.2 LÉČBA GLUKOKORTIKOIDY A PORUCHY GLUKOSOVÉ TOLERANCE

Karel Vondra, Richard Hampl

8.2.1 ÚVOD

Zájem o poruchy metabolismu glukosy resp. glukosové tolerance při léčbě glukokortikoidy (GK) ve srovnání s pozorností, která je věnovaná vedlejším účinkům léčby GK v oblasti metabolismu kostí, růstu dětí nebo očních komplikací, zůstává stále jen malý. Především chybějí srovnatelná data z velkých prospektivních studií, k dispozici jsou jen výsledky malých klinických či klinicko-experimentálních studií. Cílem tohoto krátkého přehledu je upozornit na význam této oblasti stojící stranou hlavní pozornosti, na některé nové poznatky i moderní možnosti, jak ovlivnit nepříznivé účinky stále více předepisovaných GK na metabolismus glukosy.

8.2.2 Glukokortikoidy a metabolismus glukosy

Glukokortikoidy svým kontrainzulárním působením v oblasti glykoregulace a glukosové tolerance mají spolu s glukagonem, růstovým hormonem a katecholaminy zásadní význam při udržování glykemie ve fyziologickém rozmezí. To je důležité při negativní energetické bilanci a při zajišťování přednostního zásobování mozku a nervové tkáně glukosou v zátěžových situacích.

V mechanismu účinku GK na metabolismus glukosy se uplatňuje:

a) Zvýšení endogenní tvorby glukosy

GK mají podle současných představ přímý vliv na glukoneogenezi jen malý a ovlivňují její aktivitu hlavně nepřímo:

- Up-regulací genové exprese pro enzym fosfofruktokinázu -2 (PFK-2) zvyšují obsah tohoto enzymu v tkáních. Tímto mechanismem GK významně regulují hladinu fruktosa-2,6-bisfosfátu v játrech, který je důležitým intracelulárním regulačním faktorem aktivity glukoneogeneze.
- Zvýšením koncentrace glukoneogenních substrátů v krvi (laktát, alanin, glutamin, glycerol), aktivací lipolýzy a proteolýzy v periferních tkáních, zejména v tukové a svalové tkáni, i zvýšením tvorby laktátu ve svalu. GK po vazbě na cytosolové receptory a translokaci k buněčnému jádru, zde v interakci s řadou dalších regulačních faktorů (jako jsou další steroidy, hormony štítné žlázy, mastné kyseliny a další molekuly), stimulují resp. inhibují expresi genů odpovídajících za syntézu enzymu z uvedených metabolických drah. Zda a do jaké míry se podílejí na rychlém zvýšení lipolýzy či proteolýzy v periferních tkáních i negenomové velmi rychlé účinky GK, je předmětem diskuse. Příkladem synergie genomových a negenomových účinků je aktivace dalšího rychlost určujícího enzymu glukoneogeneze – fosfoenolkarboxykinázy (PEPCK) – vedle kortisolu působícího prostřednictvím svých nitro-buněčných receptorů se zde uplatňuje signální dráha zahajovaná aktivací proteinkinázy A cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP), kde důležitým mezičlánkem fosforylační kaskády je aktivace dalšího enzymu – argininmethyltransferázy asociované s koaktivátorem (coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM-1). Dostupnost mastných kyselin jako energetického substrátu a glukoneogenních prekurzorů je významným regulátorem glukoneogeneze. Zvyšující se intenzita oxidace mastných kyselin v játrech je spojena se zvýšenou tvorbou acetyl-CoA a citrátu. Acetyl-CoA inhibuje aktivitu pyruvátdehydrogenázy, stimuluje naopak pyruvátkarboxylázu. Pyruvát tak zůstává přes tvorbu oxalacetátu k dispozici pro glukoneogenezi. Zvýšená koncentrace citrátu vede k inhibici fosfofruktokinázy 1 i 2 (PFK-1, PFK-2). Důsledkem je zvýšená konverze fruktosa-1,6-bisfosfát na fruktosa-6-fosfát a cestou glukosa-6-fosfátu i zvýšená tvorba glukosy. Zvyšuje se i poměr redukované formy NADH k formě oxidované NAD⁺. Zvýšený poměr NADH/NAD⁺ rovněž významně stimuluje aktivitu glukoneogeneze.

Příloha 3

Family History of Diabetes Mellitus Determines Insulin Sensitivity and β Cell Function in Polycystic Ovary Syndrome

J. VRBÍKOVÁ, T. GRIMMICOVÁ, K. DVOŘÁKOVÁ, M. HILL, S. STANICKÁ,
K. VONDRA

Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Received April 27, 2007

Accepted June 7, 2007

On-line July 26, 2007

Summary

Objective: To examine the impact of family history of diabetes mellitus 2 (DM 2) on insulin sensitivity and secretion in lean women with polycystic ovary syndrome (PCOS). Thirteen healthy women (C), 14 PCOS without family history of DM 2 (FH-) and 8 PCOS with family history of DM 2 (FH+) were examined using euglycemic hyperinsulinemic clamp and an arginine secretion test (insulin and glucagon at fasting glycemia (AIR_{FG} and AGR_{FG}) and at hyperglycemia (AIR_{14} and AGR_{14})). FH+ women were more insulin resistant than FH- with lower insulin sensitivity index corrected per lean body mass ($p < 0.05$). They had significantly higher triglycerides ($p < 0.05$) and lower HDL-cholesterol ($p < 0.05$) than C or FH- women. Concerning insulin secretion, AIR_{FG} was increased in FH+ women comparing FH- women ($p < 0.05$). Disposition indices derived from AIR_{FG} or AIR_{14} and insulin sensitivity index did not differ between FH+ or FH-. Thus, women with PCOS with the concomitant family history of DM 2 have lower insulin sensitivity than healthy control women. Insulin resistance observed in these women with PCOS is compensated by increased insulin secretion.

Key words

Polycystic ovary syndrome • Insulin resistance • Insulin secretion
• Diabetes mellitus

Corresponding author

J. Vrbíková, Institute of Endocrinology, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. Fax +420-2-24905325. E-mail: jvrbikova@endo.cz

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is considered as a risk factor for diabetes mellitus type 2 (DM 2). However, only a fraction of PCOS-affected women will eventually develop diabetes (Legro *et al.* 2004). It is possible to suppose that only a subgroup of PCOS-affected women is at a special risk for DM 2. Risk factors of DM 2 include family history of DM 2, obesity, insulin resistance and defects in insulin secretion.

Family history of DM 2 occurred with a significantly greater frequency in women with PCOS with impaired glucose tolerance (IGT) or with DM 2 than in those with normal glucose tolerance (Ehrmann *et al.* 2005). Insulin resistance is supposed to affect a significant proportion of women with PCOS (Legro *et al.* 2004), but not all women with PCOS are insulin-resistant. We have previously shown using euglycemic clamp that only obese, but not lean women with PCOS were more insulin-resistant than lean controls (Vrbíková *et al.* 2004). These results agree with other studies (Holte *et al.* 1994, Ovesen *et al.* 1993). However, some investigators have found insulin resistance in both lean and obese women with PCOS (Dunaif *et al.* 1989, 1992, Toprak *et al.* 2001). The cited studies were not controlled exactly for the factors known to influence the degree of insulin resistance, such as the family history of DM 2.

β -cell dysfunction is another risk factor contributing to the development of DM 2. It is important to examine simultaneously insulin sensitivity and secretion by independent methods, as these variables are interrelated. Insulin secretion increases with decreasing insulin sensitivity, and *vice versa*, to maintain normal

glucose tolerance (Kahn *et al.* 1993). Discrepant results concerning insulin secretion in women with PCOS were also published. β -cell dysfunction inherent to PCOS and independent of obesity and family history of DM 2 was described using ivGTT in women with PCOS (Dunaif and Finegood 1996). On the other hand, an increased insulin secretion normalized for insulin sensitivity over the entire range of BMI was found, when women with PCOS were examined by ivGTT and euglycemic clamp (Holte *et al.* 1994). Ehrmann *et al.* (1995) used ivGTT, oscillatory and graded i.v. glucose infusion to assess insulin secretion in obese women with PCOS and found β -cell dysfunction only in women with family history of DM 2.

We hypothesized that women affected with PCOS with a first degree relative suffering from DM 2 could have more profound defects in insulin sensitivity and β -cell function than those without family history of DM 2. We decided to use arginine secretion test to evaluate simultaneously different aspects of β - and α -cell function. Euglycemic clamp was used as an independent measurement of insulin sensitivity. Arginine secretion test has the advantage of using isoglycemic condition in all subjects and was thoroughly validated for the measurement of insulin secretion (Larsson and Ahren 1998).

Subjects and Methods

Women with PCOS (n=22) diagnosed according to NIH criteria (Dunaif 1997), were enrolled in the study in an outpatient tertiary endocrine care department. Eight of them had family history of DM 2 among their first degree relatives (FH+). The rest of the group (n=14) was free of family history of DM 2 (FH-). All women had a clinical manifestation of hyperandrogenemia presented as hirsutism and/or acne and an elevation of the free testosterone index > 6 and/or androstenedione above the upper limit of the normal range. All of the women were in good health without any other serious disorder. Women with epilepsy or migraines were excluded. In all patients 17-OH progesterone levels were determined in the early follicular phase of their cycle, and if levels were between 5-10 nmol/l, an ACTH test was used to exclude late-onset congenital adrenal hyperplasia. Hyperprolactinemia (prolactin levels), hypercortisolism (plasma cortisol, and if necessary, 24-h urinary cortisol excretion or short dexamethasone suppression test with 1 mg of dexamethasone at 22-23 p.m.), thyroid dysfunction (TSH, FT4, anti-thyroglobulin and anti-thyroid-peroxidase

antibodies) were excluded. The control group was composed of healthy women (n=13) who were free of any clinical signs of hyperandrogenism and showed regular menstrual cycles (28-33 days). They also had not used oral contraceptives for at least the preceding 3 months. They were recruited from the health care personnel and from subjects seeking endocrine evaluation, after excluding any endocrine pathology.

The local ethical committee of the Institute of Endocrinology approved the protocol of the study.

The patients and controls were evaluated at the clinical department as outpatients, and after signing a written informed consent they underwent clinical examination, and blood sampling for hormonal and biochemical examinations between days 3 and 6 of the menstrual cycle or, in the case of secondary amenorrhoea, at any time. Weight and height was measured and lean body mass was calculated according to the equation of Hume (1966). Two blood pressure readings were obtained from seated patients after a 10-min rest; the mean value was used for further analysis. After basal blood samples were taken, oral glucose tolerance test (oGTT) with sampling for blood glucose, insulin and C peptide in the 0th, 30th, 60th and 120th minutes was carried out with 75 grams of oral glucose load. Samples were centrifuged and plasma was frozen at -20 °C until analysis. Glucose tolerance was evaluated according to revised WHO criteria (1997). In controls and FH-, normal glucose tolerance was found, in one subject with FH+, impaired glucose tolerance was found.

Euglycemic hyperinsulinemic (1 mIU.kg⁻¹.min⁻¹) clamp was performed as described previously (DeFronzo *et al.* 1979). Insulin sensitivity was determined from the values obtained during the steady-state period, between 100th-120th minutes. Target blood glucose level was 5.0 mmol/l, with the coefficient of variance less than 5 %. Following parameters were calculated based on clamp results: glucose disposal rate (M) was defined as the amount of glucose supplied by the infusion to maintain the desired blood glucose level (M, μ mol.kg⁻¹.min⁻¹), and the insulin sensitivity index (ISI, μ mol.kg⁻¹.min⁻¹ per mIU.l⁻¹ x 100) was defined as the ratio of glucose disposal rate and the average insulin concentration during the observed period corrected either for kilogram of body weight (ISI) or per kilogram of lean body mass (ISI-LBM).

To evaluate α - and β -cell secretion, an arginine test was performed as described by Larsson *et al.* (1998). Briefly, intravenous cannulae were placed in antecubital

veins on both arms (one for glucose infusion and the second for sampling). Baseline samples for insulin and glucagon were taken at -5^{th} and -2^{nd} minutes. Subsequently, 5 g of arginine (diluted in 40 ml of physiological solution) was applied at time 0 during 50 s as an intravenous bolus and samples for insulin and glucagon were taken again at the 2^{nd} , 3^{rd} , 4^{th} and 5^{th} minute. After that, a variable-rate infusion of 15 % glucose solution was started in order to raise and maintain blood glucose levels between 13-15 mmol/l and finally, new baseline samples were taken; arginine bolus was repeated and new samples for insulin and glucagon were taken at the 2^{nd} , 3^{rd} , 4^{th} and 5^{th} minute thereafter.

Blood glucose was determined in the whole blood by electrochemical method (Super GL, Dr. Müller Geräte Bau, GmbH, Freital Germany). C peptide was estimated by IRMA (Immunotech, Prague, Czech Republic), with an intra- and inter-assay CV of 4.1 % and 5.1 %, respectively. Insulin was estimated by IRMA (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra- and inter-assay CV of 4.6 % and 5.3 %, respectively. Total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were assessed by photometry (Ecoline 25, Merck Vitalab Eclipse, Darmstadt, Germany), with intra-assay CVs 1.6 %, 1.7 % and 1.2 % and inter-assay CVs of 1.9 %, 2.1 % and 1.9 %, respectively. Testosterone (T) was determined by RIA with the use of own antiserum (anti-testosterone-3-carboxymethyloxid BSA), with intra-assay and inter-assay CVs of 10.2 % and 10 %, respectively. Androstenedione (A) was estimated by RIA with the use of own antiserum (anti-androstenedione-6-carboxymethyl-oxide BSA), with intra-assay and inter-assay CVs of 10 %, and 10.2 % respectively. Dehydroepiandrosterone (DHEA) was estimated after extraction with dichloromethane by RIA (Immunotech, Marseille, France), with an intra-assay CV of 6 % and inter-assay CV of 12.1 %. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) was estimated by RIA (Immunotech, Marseille, France), with an intra-assay CV of 3.5 % and inter-assay CV of 10.2 %. 17-OH progesterone (17 OHP) was determined after diethylether extraction with RIA (Immunotech, Prague, Czech Republic), with an intra-assay CV of 5.2 %, and inter-assay CV of 6.5 %. Estradiol was determined with RIA (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra-assay CV of 4.4 % and an inter-assay CV of 4.6 %. Luteinizing hormone (LH) was determined by IRMA (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra-assay CV of 3.7 % and an inter-

assay CV of 4.3 %. Follicle-stimulating hormone (FSH) was determined by IRMA (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra-assay CV of 2.6 %, and an inter-assay CV of 4.5 %. Sex-hormone binding globulin (SHBG) was determined by IRMA (Orion, Espoo, Finland) with an intra-assay CV of 6.1 %, and an inter-assay CV of 7.9 %.

Computations and statistics

The homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated as: fasting insulin (mIU/l) x fasting glucose (mmol/l) / 22.5 (Matthews *et al* 1985).

The acute insulin response (AIR) to arginine was calculated as the mean of $+2$ to $+5$ min samples minus the pre-stimulus insulin concentration for the fasting values (AIR_{FG}) and glucose-potentiated values (AIR_{I4}). The slope between AIR at fasting blood glucose and at blood glucose 14 mmol/l ($\text{slope}_{\text{AIR}} = \Delta \text{AIR} / \Delta \text{glucose}$) was calculated as a measure of the glucose potentiation of β -cell secretion since it is known that augmentation of the insulin response to arginine is linearly related to the glucose level at levels below 17 mmol/l. The acute glucagon response (AGR_{FG} , AGR_{I4}) and the slope $\text{slope}_{\text{AGR}}$ were calculated in the same manner. Disposition indices (Di) were calculated according to Kahn *et al.* (1993) using the values of ISI and AIR_{FG} (Di_{FG}), AIR_{I4} (Di_{I4}) or $\text{slope}_{\text{AIR}}$ (Di_{s}). Kruskal-Wallis one-way ANOVA was done. The individual differences between the subgroups were evaluated by Kruskal-Wallis robust multiple-comparison z-value test. $P < 0.05$ values were considered as significant. NCSS 2001 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA) was used for the calculations.

Results

Anthropometric and biochemical parameters are given in Table 1. Body mass index, lean body mass, systolic and diastolic blood pressure did not differ between groups. FH+ women have significantly higher triglycerides (ANOVA $p < 0.05$) and lower HDL-cholesterol (ANOVA $p < 0.05$) than C or FH- women. Concerning hormonal profile, higher testosterone and higher LH was present in both FH+ and FH- women (ANOVA $p < 0.002$ and $p < 0.02$; respectively) in comparison with the control group. FH+ women have lower values of DHEA-S than FH- or than C (ANOVA $p < 0.0001$).

Results from arginine secretion tests and

Table 1. Anthropometrical, biochemical and hormonal characteristics of women with polycystic ovary syndrome (PCOS) with (FH+) or without (FH-) family history of type 2 diabetes mellitus comparing healthy controls.

	PCOS FH- (n=14)		PCOS FH+ (n=8)		Controls (n=13)		ANOVA p<	Significant between group differences (p<0.05)
	mean	SD	mean	SD	mean	SD		
Age (years)	24.2	4.8	27.5	3.2	28.7	5.6		
Body mass index (kg m ²)	22.52	2.80	23.54	6.04	21.82	2.24		
Lean body mass (kg)	43.66	5.11	46.37	4.20	45.58	2.78		
Systolic BP (mm Hg)	112	8.9	121	13.5	114	7.8		
Diastolic BP (mm Hg)	71	7.5	75	8.2	74	7.9		
Cholesterol (mmol l)	4.24	0.51	4.26	1.21	4.13	0.66		
HDL-cholesterol (mmol l)	1.32	0.28	1.33	0.43	1.78	0.31	0.05	FH+ vs C, FH- vs C
Triglycerides (mmol l)	0.66	0.18	0.82	0.24	0.71	0.27	0.05	FH+ vs FH-
Testosterone (nmol l)	2.75	0.80	2.82	1.12	1.74	0.46	0.002	FH+ vs C, FH- vs C
Estradiol (nmol l)	0.23	0.14	0.18	0.08	0.18	0.11		
17 OH progesterone (nmol l)	1.99	0.96	1.71	0.78	1.78	0.87		
DHEAS (μmol l)	7.73	2.21	5.23	2.70	4.00	2.07	0.0001	FH+ vs FH-, FH+ vs C
DHEA (nmol l)	30.92	11.00	25.45	10.30	18.31	9.58	0.03	FH- vs C
Androstenedione (nmol l)	5.76	2.21	8.24	4.64	6.05	1.73		
LH (mIU l)	5.61	2.83	7.59	4.25	3.16	1.69	0.02	FH+ vs C, FH- vs C
FSH (mIU l)	4.81	2.02	4.73	1.68	4.95	2.57		
SHBG (nmol l)	45.72	20.01	48.34	17.97	65.84	42.28		

DHEAS – dehydroepiandrosterone sulfate; DHEA – dehydroepiandrosterone; FSH – follicle-stimulating hormone; LH – luteinizing hormone, SHBG – sex hormone binding globulin; BP – blood pressure.

euglycemic clamps are shown in Table 2. Fasting blood glucose did not differ between women with PCOS or controls. Fasting insulin was higher in both FH+ and FH- women than in C (ANOVA p<0.04). FH- women have higher basal glucagon (ANOVA p<0.02) than C and the similar trend for FH+ was observed. HOMA-IR was higher in FH+ women only than in C (ANOVA p<0.05). Similarly, insulin sensitivity index from euglycemic clamp corrected per LBM was lower in FH+ women than in C with no difference between FH- women and C (ANOVA p<0.05). During arginine secretion test, a similar degree of hyperglycemia was achieved in all subgroups. Concerning insulin secretion, AIR_{FG} was higher in FH+ women comparing FH- women (ANOVA p<0.05). AIR₁₄ and slope_{AIR} did not differ significantly. Glucagon secretion during the arginine tests did not differ between women with PCOS and C.

Disposition indices derived from AIR_{FG}, AIR₁₄ or slope_{AIR} and ISI did not differ between women with PCOS and C.

Discussion

The present study describes decreased insulin sensitivity only in women with PCOS and family history of DM 2. This finding is in accordance with the observations of insulin resistance as an early defect in the development of DM 2 (Ferrannini 1998). The second main finding is the preserved insulin secretory compensation in these women.

Women with PCOS and family history of DM 2 had significantly higher triglycerides with no difference in total cholesterol compared to their counterparts without family history of DM 2 or healthy subjects. Ehrmann *et al.* (2005) studied obese women with PCOS according to family history of DM 2 and found significantly higher waist circumference, hemoglobin A1C, fasting insulin and glucose in women with a positive family history of diabetes. However, the lipid levels were not evaluated in their study.

We observed an increased insulin secretion after arginine bolus at fasting blood glucose levels (AIR_{FG}) in

Table 2. Insulin sensitivity and β - and α -cell secretion in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) with (FH+) or without (FH-) family history of type 2 diabetes mellitus comparing healthy controls.

	PCOS FH- (n=14)		PCOS FH+ (n=8)		Controls (n=13)		ANOVA p<	Group differences (p<0.05)
	mean	SD	mean	SD	mean	SD		
<i>Fasting blood glucose (mmol/l)</i>	4.66	0.30	4.89	0.40	4.73	0.44		
<i>Blood glucose during arginine test (mmol/l)</i>	14.29	1.04	14.47	0.92	13.86	0.94		
<i>Glucagon (pmol/l)</i>	38.69	13.21	35.51	10.48	27.2	8.49	0.02	FH- vs C
<i>AGR_{FG} (pmol/l)</i>	45.26	29.05	55.78	38.23	43.47	27.04		
<i>AGR₁₄ (pmol/l)</i>	24.81	11.89	29.63	19.49	17.27	10.48		
<i>Suppressibility of G</i>	23.44	17.90	26.15	24.93	26.20	20.50		
<i>Slope_{AGR} (pmol/mmol)</i>	-2.18	2.25	-2.83	3.03	-2.99	2.53		
<i>Insulin (mIU/l)</i>	6.06	2.62	6.43	3.64	4.20	1.62	0.04	FH- vs C; FH+ vs C
<i>AIR_{FG} (mIU/l)</i>	20.68	8.76	32.71	7.18	29.27	21.84	0.05	FH+ vs FH-
<i>AIR₁₄ (mIU/l)</i>	132.68	65.63	131.78	22.56	161.67	128.60		
<i>Slope_{AIR} (mIU/mmol)</i>	84.73	49.54	74.65	12.60	110.57	99.02		
<i>HOMA-IR</i>	1.29	0.65	1.59	0.61	0.91	0.33	0.05	FH+ vs C
<i>Insulin during clamp (mIU/l)</i>	67.13	34.01	62.10	6.70	60.53	13.71		
<i>Insulin sensitivity index (ISI)</i>	71.98	23.94	51.50	28.53	76.03	22.13	0.07	FH+ vs C
<i>Insulin sensitivity index (ISI-LBM)</i>	99.83	33.28	73.04	39.00	102.51	28.50	0.05	FH+ vs FH- FH+ vs C
<i>Disposition Indices</i>								
<i>ISI*AIR_{FG}</i>	1446.10	693.20	1657.62	950.69	1994.74	1151.02		
<i>ISI*Slope_{AIR}</i>	5529.16	2642.44	3955.40	2649.03	7660.68	5905.03	0.14	FH+ vs C
<i>ISI*AIR₁₄</i>	8797.46	3595.58	6755.30	3933.23	11215.83	7225.44		

AIR_{FG} - the acute insulin response to arginine for the fasting values; AIR₁₄ - the acute insulin response to arginine for glucose-potentiated values; G - glucagon; AGR_{FG} - the acute glucagon response to arginine for the fasting values; AGR₁₄ - the acute glucagon response to arginine for glucose-potentiated values; HOMA-IR - homeostatic model assessment of insulin resistance; ISI - insulin sensitivity index; LBM - lean body mass; Slope_{AIR} - measure of the glucose potentiation of β -cell secretion; Slope_{AIR} - measure of the glucose suppression of α -cell secretion.

women with PCOS and family history of DM 2, compared to women with PCOS but without family history of DM 2. Previous studies conducted in women with PCOS used ivGTT to examine insulin secretion. These studies have found either β -cell dysfunction inherent to PCOS and independent of obesity and family history of DM 2 (Dunaif and Finegood 1996), or β -cell dysfunction in women with family history of DM 2 only (Ehrmann *et al.* 1995). Finally, Holte *et al.* (1994)

described an increased insulin secretion over the entire range of BMI. It is possible to encounter subjects with glucose intolerance and acute insulin response in normal range, while other subjects with the same degree of glucose intolerance completely lack this response. On the other hand, when subjects become diabetic, the first phase of insulin secretion is lost (Pratley and Weyer 2001). This heterogeneity could partly explain the observed discrepancies between the above cited studies.

Another explanation for the discrepant results could be the fact that during ivGTT, the subjects achieved different levels of blood glucose and insulin secretion was not examined under isoglycemic condition. We used arginine secretion testing which makes possible to achieve the same degree of hyperglycemia in all subjects. We observed increased acute insulin response to arginine in women with PCOS with family history of DM 2. The slope_{AIR} and insulin response at hyperglycemia was not different between women with PCOS and controls. The AIR_{IC} quantifies the direct acute β -cell response to a sudden arginine challenge and is therefore related to the rapid efficiency of the exocytotic machinery of the β -cell. We did not measure maximal secretory capacity of β -cell as this could be achieved when blood glucose is equal or higher than 25 mmol/L. Ahren and Larsson (2002) showed excellent correlation of all measures of insulin secretion at the different steps of arginine test. We cannot thus exclude that besides increased basal insulin secretion, the increase in maximal secretory capacity would also be seen.

Disposition index calculated from different measurements of β -cell function from the arginine test and from the insulin sensitivity index as derived from euglycemic clamp did not differ between women with PCOS and control healthy women. The disposition index describes the ability of β -cells to increase insulin secretion in response to decreased insulin sensitivity. This compensation is finely tuned, and in subjects with normal glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin secretion are related to each other in a hyperbolic manner. Our results thus agree with others describing intact compensation in subjects with normal glucose tolerance (Kahn *et al.* 1993). However, other investigators have found decreased disposition index in women with PCOS in general (Dunaif and Finegood 1996) or with family history of DM 2 (Ehrmann *et al.* 1995). Finally, Scandinavian authors (Holte *et al.* 1994) described

increased early insulin response and increased disposition index in both lean and obese PCOS. This study was not controlled for family history of DM 2.

Basal glucagon levels were higher in women with PCOS without family history of diabetes than in controls. On the other hand, basal blood glucose was not elevated concomitantly, as one might expect. Glucose inhibition of glucagon secretion was not different in women with PCOS compared to healthy women. These results are in agreement with those of Larsson and Ahren (1996, 2000) who found decreased glucose inhibition of glucagon secretion only in subjects with impaired glucose tolerance. Basal insulin levels tended to be increased in women with PCOS compared to controls. One of the explanations for the increase in both of these glucoregulatory hormones could be the increase in parasympathetic tone on the islets. The increased parasympathetic tone leads to both increased insulin and glucagon secretion (Ahren and Taborsky 1986, Balkan and Dunning 1995).

We conclude that family history of DM 2 is a risk factor for lower insulin sensitivity in PCOS. We observed that only women affected with PCOS with concomitant family history of DM 2 have lower insulin sensitivity than healthy control women. However, they are able to compensate for this decrease in sensitivity with increased insulin secretion.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by grant of Czech Ministry of Health NR 8759-3. The excellent technical assistance of Mrs. Romana Bajtlová, Jana Novotná and Stanislava Štursová in performing of metabolic examinations is gratefully acknowledged.

References

- AHREN B, LARSSON H: Quantification of insulin secretion in relation to insulin sensitivity in nondiabetic postmenopausal women. *Diabetes* **51** (Suppl 1): S202-S211, 2002.
- AHREN B, TABORSKY GJ, JR.: The mechanism of vagal nerve stimulation of glucagon and insulin secretion in the dog. *Endocrinology* **118**: 1551-1557, 1986.
- BALKAN B, DUNNING BE: Muscarinic stimulation maintains in vivo insulin secretion in response to glucose after prolonged hyperglycemia. *Am J Physiol* **268**: R475-R479, 1995.
- DI-FRONZO RA, TOBIN JD, ANDRES R: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* **237**: E214-E223, 1979.

- DUNAIF A: Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* **18**: 774-800, 1997.
- DUNAIF A, FINEGOOD DT: β -cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **81**: 942-947, 1996.
- DUNAIF A, SEGAL KR, FUTTERWEIT W, DOBRJANSKY A: Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* **38**: 1165-1174, 1989.
- DUNAIF A, SEGAL KR, SHELLEY DR, GREEN G, DOBRJANSKY A, LICHOLAI T: Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* **41**: 1257-1266, 1992.
- EHRMANN DA, STURIS J, BYRNE MM, KARRISON T, ROSENFELD RL, POLONSKY KS: Insulin secretory defects in polycystic ovary syndrome. Relationship to insulin sensitivity and family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* **96**: 520-527, 1995.
- EHRMANN DA, KASZA K, AZZIZ R, LEGRO RS, GHAZZI MN: Effects of race and family history of type 2 diabetes on metabolic status of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 66-71, 2005.
- FERRANNINI E: Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* **19**: 477-490, 1998.
- HOLTE J, BERGH T, BERNE C, BERGLUND L, LITHELL H: Enhanced early insulin response to glucose in relation to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* **78**: 1052-1058, 1994.
- HUME R: Prediction of lean body mass from height and weight. *J Clin Pathol* **19**: 389-391, 1966.
- KAHN SE, PRIGEON RL, McCULLOCH DK, BOYKO EJ, BERGMAN RN, SCHWARTZ MW, NEIFING JL, WARD WK, BEARD JC, PALMER JP: Quantification of the relationship between insulin sensitivity and β -cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* **42**: 1663-1672, 1993.
- LARSSON H, AHREN B: Islet dysfunction in obese women with impaired glucose tolerance. *Metabolism* **45**: 502-509, 1996.
- LARSSON H, AHREN B: Glucose-dependent arginine stimulation test for characterization of islet function: studies on reproducibility and priming effect of arginine. *Diabetologia* **41**: 772-777, 1998.
- LARSSON H, AHREN B: Glucose intolerance is predicted by low insulin secretion and high glucagon secretion: outcome of a prospective study in postmenopausal Caucasian women. *Diabetologia* **43**: 194-202, 2000.
- LEGRO RS, CASTRACANE VD, KAUFFMAN RP: Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv* **59**: 141-154, 2004.
- MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, TURNER RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**: 412-419, 1985.
- OVESEN P, MOLLER J, INGERSLEV HJ, JORGENSEN JO, MENGEL A, SCHMITZ O, ALBERTI KG, MOLLER N: Normal basal and insulin-stimulated fuel metabolism in lean women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **77**: 1636-1640, 1993.
- PRATLEY RE, WEYER C: The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* **44**: 929-945, 2001.
- TOPRAK S, YONEM A, CAKIR B, GULER S, AZAL O, OZATA M, CORAKCI A: Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Horm Res* **55**: 65-70, 2001.
- VRBÍKOVÁ J, CIBULA D, DVOŘÁKOVÁ K, STANICKÁ S, ŠINDELKA G, HILL M, FANTA M, VONDRA K, ŠKRHA J: Insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 2942-2945, 2004.
- WHO: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **20**: 1183-1197, 1997.

Příloha 4

Fasting Insulin Pulsatile Secretion in Lean Women with Polycystic Ovary Syndrome

T. GRIMMICHOVÁ¹, J. VRBÍKOVÁ¹, P. MATUCHA¹, K. VONDRA¹, P. P. VELDHUIS², M. L. JOHNSON²

¹Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic, ²Department of Pharmacology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA

Received November 12, 2007

Accepted January 17, 2008

On-line February 13, 2008

Summary

The aim of our study was to evaluate rapid insulin pulses and insulin secretion regularity in fasting state in lean women with polycystic ovary syndrome (PCOS) in comparison to lean healthy women. PCOS (n=8) and controls (n=7) underwent every minute blood sampling for 60 min. Insulin pulsatility was assessed by deconvolution and insulin secretion regularity by approximate entropy methodology. PCOS had higher testosterone ($p<0.02$), prolactin ($p<0.05$) and lower sex hormone binding globulin (SHBG) ($p<0.0006$) levels than controls. Approximate entropy, insulin pulse frequency, mass, amplitude and interpulse interval did not differ between PCOS and controls. PCOS had broader insulin peaks determined by a common half-duration ($p<0.07$). Burst mass correlated positively with testosterone ($p<0.05$) and negatively with SHBG ($p<0.0004$) and common half-duration correlated positively with prolactin ($p<0.008$) and cortisol levels ($p<0.03$). Approximate entropy positively correlated with BMI ($p<0.04$) and prolactin ($p<0.03$). Lean PCOS patients tended to have broader insulin peaks in comparison to healthy controls. Prolactin, androgens and cortisol might participate in alteration of insulin secretion in PCOS-affected women. Body weight and prolactin levels could influence insulin secretion regularity.

Key words

Insulin • Pulse • Polycystic ovary syndrome • Diabetes mellitus

Corresponding author

Tereza Grimmichová, Institute of Endocrinology, Národní 8, 11694 Prague 1, Czech Republic. E-mail: tgrimmichova@endo.cz

Introduction

Insulin is physiologically secreted in a pulsatile manner with a variable basal insulin release. The

contribution of pulsatile insulin secretion to total insulin secretion has been estimated as being at least 70 %, both in fasting and in postabsorptive states (Porksen *et al.* 1995, Porksen 2002).

Insulin pulsatility is composed of rapid regular pulses of 5 to 15 min in frequency, superimposed on ultradian (slow) oscillations with a period of 80-150 min. It has been assumed that rapid insulin pulses suppress hepatic gluconeogenesis and slow insulin pulses contribute to glucose utilization in the peripheral tissues (Porksen 2002). Glucose is the most important regulator of insulin secretion, with a feedback loop between slow pulses and blood glucose levels. Rapid insulin pulses, in addition to being driven by glycaemic oscillations, are controlled by the hypothetical intrapancreatic neuronal pacemaker arising from rich pancreatic innervation. Many other metabolic substrates, hormones or neurotransmitters also influence insulin secretion (Stagner *et al.* 1980, Ahren 2000, Porksen *et al.* 2000).

Polycystic ovary syndrome is one of the most common endocrinopathies of women in their fertile years. Together with the reproductive abnormalities of chronic anovulation and hyperandrogenism, hyperinsulinaemia and insulin resistance (IR) are present in a relevant number of women affected with PCOS. The incidence of impaired glucose tolerance (IGT) and diabetes mellitus type 2 (DM 2) is significantly increased in PCOS in comparison with healthy control subjects (Ehrmann *et al.* 1999, Legro *et al.* 1999).

Besides insulin resistance, insulin secretory dysfunction is another risk factor for DM 2. The alterations in insulin pulsatile secretion and insulin

release orderliness might be an early marker of beta-cell dysfunction. Abnormal insulin pulsatile patterns were detected even in first degree relatives of patients with DM 2, who still had normal first phase secretory response to glucose (O'Rahilly *et al.* 1988). Insulin secretion in PCOS was studied in a limited number of studies (Dunaif *et al.* 1996, Ehrmann *et al.* 1995, Holte *et al.* 1994, Vrbiková *et al.* 2007) and the data about insulin pulsatile release in PCOS is especially sparse (Armstrong *et al.* 2001). Concerning slow insulin pulses, others described significantly higher basal insulin secretory rates and attenuated secretory responses to meals in obese women with PCOS (O'Meara *et al.* 1993).

The aim of our study was to evaluate the rapid insulin pulses and the regularity of insulin secretion in lean women affected with PCOS in comparison to healthy lean women.

Methods

After an overnight fast, the participants were brought to the Clinical Research Unit in Institute of Endocrinology. The protocol was approved by the Institutional Ethical Committee. Before entering the study, written informed consent was obtained after written and oral information. The study group consisted of 8 women affected with PCOS fulfilling the diagnostic criteria by using definition ESHRE/ASRM (2004). The diagnosis of PCOS is accepted, when 2 out of 3 from: oligo/amenorrhoea, hyperandrogenaemia and or clinical manifestation of either acne or hirsutismus and ultrasonographic morphology of polycystic ovary are present. The control group (C) consisted of 7 healthy women with regular menstrual cycles and no clinical or biochemical signs of hyperandrogenemia. Pelvic ultrasonography was not performed in healthy controls. Both groups were without medication affecting carbohydrate metabolism including oral contraceptives at least for the preceding 3 months and without family history of diabetes mellitus. Impaired glucose tolerance, diabetes mellitus, thyroid dysfunction, hyperprolactinemia, hypercortisolism and the late onset congenital adrenal hyperplasia were all excluded using the appropriate biochemical parameters or tests.

Basal blood samples for the determination of testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), lutropin (LH), follitropin (FSH), progesterone, estradiole, 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) were taken in the fasting state in the early follicular

phase of the menstrual cycle (between 1st and 5th day at, 7-8.30 a.m.) or in the case of secondary amenorrhoea at any time. After the cannulae were placed in an antecubital vein for sampling purposes, the women affected with PCOS and control women underwent frequent blood sampling in 1-minute intervals for 60 min. Blood (cca 2 ml) was collected from 5 s before to 5 s after each minute. After finishing each blood sampling 0.6 ml of saline solution was administered to dead space. Ten seconds before sampling, the saline solution from the dead space was withdrawn and discarded. Serum insulin concentration was estimated each minute. The samples were analyzed the same day as the study was performed. The resultant insulin concentration time series was analyzed by deconvolution analysis. Insulin secretion regularity was estimated by approximate entropy. Both analyses are described below.

Quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) was calculated as $1/(\log(G_0) + \log(I_0))$ where G_0 is fasting plasma glucose (milligrams per deciliter), and I_0 is fasting plasma insulin (microunits per milliliter) (Katz *et al.* 2000).

Serum glucose concentrations were measured using the glucose-hexokinase method (Integra 400 plus, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Serum insulin was determined in singlet by ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) using two monoclonal murine antibodies. Intrassay CV 1.5 % and interassay CV 4.9 % are for insulin detection range of $5.93 \pm 0.09 \mu\text{U/ml}$. The higher insulin detection range is $14.5 \pm 0.13 \mu\text{U/ml}$ with intrassay CV 0.9 % and interassay CV 3.7 %. Minimal detection concentration is $0.20 \mu\text{U/ml}$. The assay has no cross-reactivity with proinsulin. C-peptide was measured by the electrochemiluminescence immunoassay ECLIA (Modular E170, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The cross-reactivity of antiserum with both insulin and glucagon is less than 0.05 % with intra- and inter-assay CV of 0.5 % and 1.6 %, respectively. Testosterone was determined by standard RIA using anti-testosterone-3-carboxymethyloxime: bovine serum albumin (BSA) antiserum and testosterone 3-carboxymethyloxime-tyrosylmethylester- (^{125}I) as a tracer; the intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV values) were 10.2 % and 10 % respectively, and the sensitivity is 0.21 nmol/l (normal range $0.4\text{-}3.0 \text{ nmol/l}$). Prolactin was measured in serum by chemiluminescence immunoanalysis ECLIA (Elecsys Prolactin II, Roche, Germany) (normal range $6\text{-}29.9 \text{ ng/ml}$). Androstenedione was determined using a standard RIA with anti-

androstenedione-6-carboxymethyloxime: BSA antiserum and (³H) androstenedione as a tracer. The intra-assay and inter-assay CV values were 10 % and 10.2 % respectively and the sensitivity was 0.39 nmol/l. Sex hormone binding globulin (SHBG) was estimated using IRMA method (Orion, Espoo, Finland) with an intra-assay CV of 6.1 % and an inter-assay CV of 7.9 % (normal range 43.2-94.8 nmol/l). DHEAS (normal range 2.4-14.5 umol/l; intra-assay CV of 3.5 % and inter-assay CV of 10.2 %), 17-OHP (normal range 1.1-8.4 nmol/l; intra-assay CV of 5.2 % and inter-assay CV of 6.5 %) and estradiol (normal range 0.11-1.29 nmol/l; intra-assay CV of 4.4 % and inter-assay CV of 4.6 %) were measured by the RIA kit from Immunotech (Prague, Czech Republic). LH was determined by IRMA (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra-assay CV of 3.7 % and an inter-assay CV of 4.3 %. FSH was estimated by IRMA (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra-assay CV of 2.6 % and an inter-assay CV of 4.5 %. Total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol and triglycerides were measured by photometry (Ecoline 25, Vitalab Elipse; Merck; Darmstadt; Germany) with intra-assay CVs 1.6 %, 1.7 % and 1.2 % and inter-assay CVs of 1.9 %, 2.1 % and 1.9 %, respectively.

Deconvolution analysis of the data

Deconvolution analysis was developed for endocrinological purposes as a mathematical procedure for measuring simultaneously hormone secretion and elimination. Insulin concentration time series were analyzed by deconvolution method to detect and quantify insulin secretory pulses. We employed several different deconvolution algorithms Pulse 2, Pulse 4 and AutoDecon. The principle of deconvolution software was described previously (Veldhuis and Johnson 1992, Veldhuis and Johnson 1994). Briefly, the deconvolution method is a multiparameter technique validated previously and correctly identifying more than 90 % of hormone pulses (sensitivity) as correctly recognizing their absence (Johnson *et al.* 2004). The insulin concentrations were assumed to result from five determinable and correlated parameters: 1) a finite number of separate insulin pulses occurring at specific times, 2) individual amplitudes, 3) a common half-duration (duration of an algebraically Gaussian secretory pulse at half-maximal amplitude), 4) basal time invariant insulin secretion and 5) monoexponential or biexponential insulin model of elimination in the systemic circulation. Biexponential model of insulin clearance was estimated with rapid (first)

2.8 min and slow (second) 5.0 min half-lives with fractional slow compartment of 0.28. We calculated monoexponential insulin half-life of 3.3 (2.8-4.1) min in PCOS and 3.2 (2.6-4.1) min in healthy controls.

We used the root mean square of residuals (RMS) and residual variance (%) to assess optimal insulin kinetics parameters (best fit curve). We derived the best fit curve with following RMS and residual variance in PCOS and healthy women (0.77±0.23 vs 0.9±0.26 mUI/l; 9.44±4.73 vs 9.14±8.79 %, respectively).

The following parameters were calculated: secretory pulse number (the number of significant secretory pulses per 60 min), interpulse interval (time in minutes separating successive pulses), pulse mass (the mass of the calculated secretory pulses) (mUI/l), amplitude (maximal secretory rate within a pulse) (mUI/l/min), AUC₀₋₆₀ (area under the curve, overall insulin secretion per 60 min) (mUI/l), common half-duration (mUI/min) and basal secretion (mUI/l/min).

Approximate entropy (ApEn) is used as a model-independent and scale-invariant statistic. In brief, ApEn assumes the orderliness of hormonal release patterns. ApEn is computed as the sum of the negative logarithms of the conditional probabilities that subpatterns of length m in a time series recur upon next $(m + 1)$ incremental comparison within a given tolerance range r . We used $m = 1$ and $r = 20$ % of the intraseries SD, which provides a normalized (scale-independent) ApEn statistics. ApEn was in detail described previously (Pincus *et al.* 1999).

Statistics

All data are given as retransformed means with a 95 % confidence interval. Unpaired t-tests and Pearson correlation coefficients were used on transformed data to evaluate differences between groups and the mutual relationship among the variables, respectively ($p < 0.05$) was considered statistically significant. RMS and residual variance are given as means±SD.

Results

The clinical, basal biochemical and hormonal parameters of women affected with PCOS and healthy subjects are given in Table 1. PCOS women had significantly higher testosterone ($p < 0.02$), prolactin ($p < 0.05$), 17-OHP ($p < 0.03$) and estradiol ($p < 0.05$) concentrations and lower SHBG levels ($p < 0.0006$). We did not observe significant difference between groups in basal insulinaemia, basal glucose levels, C-peptide and QUICKI.

Table 1. Clinical, hormonal and biochemical parameters of PCOS subjects (n=8) and controls (n=7)

	PCOS			Controls			p<
	Mean	CI Lower limit	CI Upper limit	Mean	CI Lower limit	CI Upper limit	
<i>BMI (kg/m²)</i>	21.9	20.2	23.5	20.1	18.9	21.2	NS
<i>Age (years)</i>	25.1	21.8	29.5	30.2	25.1	38.1	NS
<i>Insulinaemia basal (mUI/l)</i>	5.1	3.9	6.5	4.2	3.1	5.6	NS
<i>Blood glucose basal (mmol/l)</i>	4.17	4	4.35	4.12	4	4.4	NS
<i>C-peptide (nmol/l)</i>	0.54	0.4	0.71	0.51	0.23	0.96	NS
<i>QUICKI</i>	0.39	0.37	0.4	0.4	0.38	0.43	NS
<i>Total cholesterol (mmol/l)</i>	4	3.7	4.8	4	3.6	4.7	NS
<i>HDL cholesterol (mmol/l)</i>	1.6	1.2	1.8	1.8	1.6	1.9	NS
<i>Triglycerides (mmol/l)</i>	0.75	0.6	0.9	0.7	0.4	0.9	NS
<i>Testosterone (nmol/l)</i>	3.2	2.8	3.6	2.3	0	3.3	0.02
<i>DHEAS (mmol/l)</i>	7.1	5.6	8.3	5.5	0	8.1	NS
<i>Androstenedione (nmol/l)</i>	8.6	5.9	12.9	7.4	5	11.4	NS
<i>SHBG (nmol/l)</i>	46.3	28.4	64.1	98.1	83.1	113.1	0.0006
<i>Prolactin (ng/ml)</i>	23.8	16.8	32.5	13.7	6.3	25.4	0.05
<i>Estradiol (nmol/l)</i>	0.12	0.1	0.14	0.09	0.05	0.13	0.05
<i>Progesterone (nmol/l)</i>	2.5	1.4	3.6	2.8	0	7.4	NS
<i>LH (IU/l)</i>	4.5	2.8	8.4	6.5	3.1	20.4	NS
<i>FSH (IU/l)</i>	6.3	5.25	7.8	8	6.4	10.4	NS
<i>Cortisol (nmol/l)</i>	564	442	729	448.7	306	680	NS
<i>17-hydroxyprogesterone (nmol/l)</i>	2.5	1.8	3.7	1.4	0.9	2.2	0.03

Values are given as means and 95 % confidence interval (CI); p – value-statistical significance; NS – not significant; QUICKI – Quantitative insulin sensitivity check index; LH – luteinising hormone; FSH – follicle stimulating hormone; DHEAS – dehydroepiandrosterone sulfate; BMI – body mass index; SHBG – sex hormone binding globulin

Table 2. Deconvolution analysis results of rapid insulin pulsatile secretion in PCOS (n=8) and controls (n=7)

	PCOS			Controls			p<
	Mean	CI Lower limit	CI Upper limit	Mean	CI Lower limit	CI Upper limit	
<i>Number of peaks per 1 hour</i>	9.7	7.7	11.7	9.9	7.2	12.55	NS
<i>Basal secretion (mUI/l/min)</i>	0.7	0.4	0.98	0.5	0.24	0.82	NS
<i>Half-life of insulin (min)</i>	3.3	2.8	4.1	3.2	2.6	4.1	NS
<i>AUC₀₋₆₀ (mUI/l)</i>	300.5	235.6	398.2	255.3	188.2	340.2	NS
<i>Common half-duration (mUI/min)</i>	1.97	1.1	3.37	0.89	0.51	1.49	0.07
<i>Secretory pulse amplitude (mUI/l/min)</i>	1.1	0.7	2.1	1.5	1	2.6	NS
<i>Secretory pulse mass (mUI/l)</i>	2.1	1.55	3	1.4	0.96	2.4	NS
<i>Interpulse interval (min)</i>	5.87	5	7.2	5.56	4.6	7.1	NS
<i>Approximate entropy</i>	1.14	1.09	1.19	1.08	0.94	1.16	NS

Values are given as means and 95 % confidence interval (CI); NS-not significant; AUC₀₋₆₀ - area under the curve, overall insulin secretion during 1 hour; p-value-statistical significance

Table 3. Correlations in PCOS subjects (n=8) and controls (n=7)

	Basal insulin secretion (mUI/l/min)		Insulinaemia basal (mUI/l)		AUC ₀₋₆₀ (mUI/l)		ApEn		Common half-duration (mUI/min)		Insulin pulse mass (mUI/l)	
	r-value	p<	r-value	p<	r-value	p<	r-value	p<	r-value	p<	r-value	p<
<i>C-peptide</i> (nmol/l)	0.78	0.008	0.75	0.008	0.75	0.008		NS		NS		NS
<i>HDL cholesterol</i> (mmol/l)	-0.85	0.004	-0.88	0.0007	-0.89	0.0006		NS		NS		NS
<i>Triglycerides</i> (mmol/l)	0.75	0.03	0.78	0.008	0.78	0.009		NS		NS		NS
<i>QUICKI</i>	-0.77	0.002	-0.99	0.0001	-0.99	0.0001		NS		NS	-0.59	0.03
<i>Prolactin</i> (ng/ml)		NS		NS		NS	0.68	0.03	0.76	0.008		NS
<i>BMI</i> (kg/m ²)		NS		NS		NS	0.57	0.04		NS		NS
<i>Cortisol</i> (nmol/l)		NS		NS		NS		NS	0.64	0.03		NS
<i>Testosterone</i> (nmol/l)		NS		NS		NS		NS		NS	0.61	0.05
<i>SHBG</i> (nmol/l)		NS		NS		NS		NS		NS	-0.88	0.0004
<i>DHEAS</i> (nmol/l)		NS	0.73	0.02	0.73	0.02		NS		NS		NS

r-value-coefficient of correlation; p – value-statistical significance; NS – not significant; QUICKI – Quantitative insulin sensitivity check index; AUC₀₋₆₀ – 60 -area under the curve, overall insulin secretion per 60 minutes; ApEn – Approximate entropy; DHEAS – dehydroepiandrosterone sulfate; SHBG – sex hormone binding globulin

Pulsatile insulin secretion results

Deconvolution analysis results are given in Table 2. Women affected with PCOS and healthy controls had similar average frequency of 10 insulin pulses per 60 min. Variation in insulin burst frequency ranges from 6 to 13 insulin pulses per hour in both groups. We did not observe differences in number of insulin pulses, basal insulin secretion, pulse amplitude, pulse mass or in interpulse interval between the two groups. PCOS-affected women had broader insulin peaks in comparison to control group, as determined by the common-half pulse duration (1.97 (1.1-3.37) vs 0.89 (0.51-1.49) mUI/min; p<0.07).

Basal insulin secretion correlated negatively with HDL-cholesterol (r = -0.85; p<0.004), QUICKI (r = -0.77; p<0.002) and positively with triglycerides (r =

0.75; p<0.03). AUC₀₋₆₀ correlated negatively with QUICKI (r = -0.99; p=0.0001), HDL-cholesterol (r = -0.89; p<0.0006) and positively with triglycerides (r = 0.78; p<0.009) (Table 3.).

Insulin pulse amplitude (r = -0.61; p<0.03) similarly as insulin pulse mass (r = -0.59; p<0.03) correlated negatively with QUICKI. Common-half pulse duration correlated positively with prolactin (r = 0.76; p<0.008) and cortisol levels (r = 0.64; p<0.03). Burst mass correlated positively with testosterone (r = 0.61; p<0.05) and negatively with SHBG levels (r = -0.88; p<0.0004) (Table 3.).

Insulin secretion regularity

Insulin burst orderliness evaluated by ApEn did not differ significantly between women affected with

PCOS and healthy subjects (1.14 (1.095-1.178) vs 1.079 (0.94-1.164), respectively; $p < 0.2$). ApEn correlated positively with prolactin levels ($r = 0.68$; $p < 0.03$) and with BMI ($r = 0.57$; $p < 0.04$).

Discussion

The present study was designed to assess the rapid insulin pulses, insulin secretion regularity and the potential factors affecting insulin pulsatile secretion in lean women affected with PCOS in comparison to healthy lean women. The main findings are as follows: 1. PCOS-affected women tended to have different insulin pulsatile secretion patterns described by the broader insulin pulses in comparison to healthy controls. 2. Steroid hormones and prolactin levels were related to different aspects of insulin pulsatile secretion.

We observed the tendency toward broader insulin peaks in PCOS, but no differences between PCOS and controls in number of insulin secretory events, insulin pulse amplitude, pulse mass, interpulse interval or insulin secretion orderliness. Many studies have shown alterations in insulin pulsatility and insulin release orderliness in different states connected with insulin resistance, such as in patients with diabetes mellitus type 2 (Porksen 1999), in first degree relatives of DM 2 patients (O'Rahilly *et al.* 1988), in obesity (Peiris *et al.* 1992, Zarkovic *et al.* 2000) or in old people (Meneilly *et al.* 1999). Conversely, there are only few studies concerning insulin pulsatility in PCOS as in another states often connected with insulin resistance. In one of these studies, no significant difference in rapid fasting insulin pulse frequency, total insulin area or total pulse related area was found between PCOS and healthy controls (Armstrong *et al.* 2001).

We have found that higher prolactin levels were associated with more irregular insulin secretion as determined by higher ApEn and with different insulin secretory patterns. Prolactin could influence insulin secretion. In vitro, beta-cells of the pancreatic islets express prolactin receptors. Prolactin supports the growth of the pancreatic islets and stimulates insulin secretion (Ben-Jonathan *et al.* 2006). Prolactin could induce insulin resistance, as women with microprolactinomas were more insulin resistant than healthy women (Serri *et al.* 1986, Seki and Nagata 1991). Similarly hyperprolactinemic PCOS women were more insulin resistant than their normoprolactinemic counterparts (Bahceci *et al.* 2003). We have also observed a positive correlation between

insulin secretion regularity, as determined by ApEn values, and BMI. This finding is supported by other authors who have found an association of overweight and irregular insulin secretion with improvement after weight loss (Zarkovic *et al.* 2000).

Further, cortisol was positively correlated with the common half-duration of insulin peaks. Similarly to us, others shown that glucocorticoids could influence insulin secretion. Short-term glucocorticoid treatment impaired insulin pulsatility, probably by a disruption of the normal glucose-insulin feedback loop (Hollingdal *et al.* 2002).

Afterwards, we observed positive correlation of testosterone levels and negative correlation of SHBG and insulin pulse mass. Insulin increases the biological availability of testosterone through the suppression of SHBG synthesis. Hyperinsulinemia increases ovarian androgen production. Conversely, testosterone may indirectly contribute to insulin resistance through facilitating free fatty acids release from abdominal fat and perhaps directly from muscular tissue reducing insulin-mediated glucose uptake (Holte 1994, Holte *et al.* 1996, Cahová *et al.* 2007).

We used QUICKI to determine insulin sensitivity in PCOS-affected women and healthy controls. Both groups had the same insulin sensitivity. We observed a negative correlation between insulin sensitivity and basal insulin secretion. But we did not ascertain any correlation between insulin pulse frequency or interpulse interval and insulin sensitivity. Previously published results concerning the relationship between insulin sensitivity, measured by euglycaemic clamp, and insulin pulse frequency are, however, discrepant. One study concluded that the increased frequency of rapid insulin pulses might be related to the insulin resistance in patients with abdominal obesity. The number of rapid insulin pulses was reduced and insulin sensitivity was improved after weight loss (Peiris *et al.* 1992). On the other hand, insulin pulse frequency was not the indicator of insulin sensitivity in healthy subjects (Courtney *et al.* 2003) or women with polycystic ovary syndrome (Armstrong *et al.* 2001). These divergent results could be explained by different studied populations or by the use of varying approaches for assessment of insulin pulsatile secretion.

In conclusion, PCOS-affected women tended to have broader insulin peaks in comparison to healthy lean women. Prolactin, cortisol and androgens were related to some of the insulin pulsatile secretion characteristics,

whereas parameters describing insulin pulsatility were not significant determinants of insulin sensitivity.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grant MH CR NR 8759-3 and by the Albert Renold Fellowships of European Association for the Study of Diabetes (to Tereza Grimmichová). We thank Hana Zachystalová, Jana Novotná, Romana Bajtlová and Stanislava Štursová for excellent technical assistance.

References

- AHREN B: Autonomic regulation of islet hormone secretion-implications for health and disease. *Diabetologia* **43**: 393-410, 2000.
- ARMSTRONG VL, WIGGAM MI, ENNIS CN, SHERIDAN B, TRAUB AI, ATKINSON AB, BELL PM: Insulin action and insulin secretion in polycystic ovary syndrome treated with ethinyl oestradiol/cyproterone acetate. *QJM* **94**: 31-37, 2001.
- BAHCECI M, TUZCU A, BAHCECI S, TUZCU S: Is hyperprolactinemia associated with insulin resistance in non-obese patients with polycystic ovary syndrome? *J Endocrinol Invest* **26**: 655-659, 2003.
- BEN-JONATHAN N, HUGO ER, BRANDEBOURG TD, LAPENSEE CR: Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab* **17**: 110-116, 2006.
- CAHOVÁ M, VAVŘÍNKOVÁ H, KAZDOVÁ L: Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance. *Physiol Res* **56**: 1-15, 2007.
- COURTNEY CH, ATKINSON AB, ENNIS CN, SHERIDAN B, BELL PM: Comparison of the priming effects of pulsatile and continuous insulin delivery on insulin action in man. *Metabolism* **52**: 1050-1055, 2003.
- EHRMANN DA, BARNES RB, ROSENFELD RL, CAVAGHAN MK & IMPERIAL: Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* **22**: 141-146, 1999.
- HOLLINGDAL M, JUHL CB, DALL R, STURIS J, VELDHUIS JD, SCHMITZ O, PORKSEN N: Glucocorticoid induced insulin resistance impairs basal but not glucose entrained high-frequency insulin pulsatility in humans. *Diabetologia* **45**: 49-55, 2002.
- HOLTE J: Disturbances in insulin secretion and sensitivity in women with the polycystic ovary syndrome. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **10**: 221-247, 1996.
- HOLTE J, BERGH T, BERNE C, BERGLUND L, LITHELL H: Enhanced early insulin response to glucose in relation to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* **78**: 1052-1058, 1994.
- JOHNSON ML, VIROSTKO A, VELDHUIS JD, EVANS WS: Deconvolution analysis as a hormone pulse-detection algorithm. *Methods Enzymol* **384**: 40-54, 2004.
- KATZ A, NAMBI SS, MATHER K, BARON AD, FOLLMANN DA, SULLIVAN G, QUON MJ: Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 2402-2410, 2000.
- LEGRO RS, KUNSELMAN AR, DODSON WC, DUNAIF A: Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 165-169, 1999.
- MENEILLY GS, VELDHUIS JD, ELAHI D: Disruption of the pulsatile and entropic modes of insulin release during an unvarying glucose stimulus in elderly individuals. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 1938-1943, 1999.
- O'MEARA NM, BLACKMAN JD, EHRMANN DA, BARNES RB, JASPAN JB, ROSENFELD RL, POLONSKY KS: Defects in beta-cell function in functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* **76**: 1241-1247, 1993.
- O'RAHILLY S, TURNER RC, MATTHEWS DR: Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* **318**: 1225-1230, 1988.
- PEIRIS AN, STAGNER JI, VOGEL RL, NAKAGAWA A, SAMOLS E: Body fat distribution and peripheral insulin sensitivity in healthy men: role of insulin pulsatility. *J Clin Endocrinol Metab* **75**: 290-294, 1992.
- PINCUS SM, HARTMAN ML, ROELFSEMA F, THORNER MO, VELDHUIS JD: Hormone pulsatility discrimination via coarse and short time sampling. *Am J Physiol* **277**: E948-E957, 1999.
- PORKSEN N: Early changes in the function of pancreatic beta cells and insulin pulsatility as predictors of type 2 diabetes. *Diabetes Metab* **25**: 14-16, 1999.
- PORKSEN N: The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia* **45**: 3-20, 2002.

-
- PORKSEN N, MUNN S, STEERS J, VORE S, VELDHUIS J, BUTLER P: Pulsatile insulin secretion accounts for 70 % of total insulin secretion during fasting. *Am J Physiol* **269**: E478-E488, 1995.
- PORKSEN N, JUHL C, HOLLINGDAL M, PINCUS SM, STURIS J, VELDHUIS JD, SCHMITZ O: Concordant induction of rapid in vivo pulsatile insulin secretion by recurrent punctuated glucose infusions. *Am J Physiol* **278**: E162-E170, 2000.
- ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP: Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **81**: 19-25, 2004.
- SEKI K, NAGATA I: Levels of glucose and insulin during twenty-four hours in hyperprolactinemic women with pituitary microadenoma. *Gynecol Obstet Invest* **31**: 222-225, 1991.
- SERRI O, BEAUREGARD H, RASIO E, HARDY J: Decreased sensitivity to insulin in women with microprolactinomas. *Fertil Steril* **45**: 572-574, 1986.
- STAGNER JI, SAMOLS E, WEIR GC: Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J Clin Invest* **65**: 939-942, 1980.
- VELDHUIS JD, JOHNSON ML: Deconvolution analysis of hormone data. *Methods Enzymol* **210**: 539-575, 1992.
- VELDHUIS JD, JOHNSON ML: Analytical methods for evaluating episodic secretory activity within neuroendocrine axes. *Neurosci Biobehav Rev* **18**: 605-612, 1994.
- VRBÍKOVÁ J, GRIMMICHOVÁ T, DVOŘÁKOVÁ K, HILL M, STANICKÁ S, VONDRA K: Family history of diabetes mellitus determines insulin sensitivity and beta cell function in polycystic ovary syndrome. *Physiol Res*, Jul 26, 2007 (Epub ahead of print).
- ZARKOVIC M, CIRIC J, PENEZIC Z, TRBOJEVIC B, DREZGIC M: Effect of weight loss on the pulsatile insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 3673-3677, 2000.
-

Příloha 5

CLINICAL STUDY

Incretin levels in polycystic ovary syndrome

Jana Vrbikova, Martin Hill, Bela Bendlova, Tereza Grimmichova, Katerina Dvorakova, Karel Vondra and Giovanni Pacini¹

Institute of Endocrinology, Narodni 8, Prague 1 116 94, Czech Republic and ¹Metabolic Unit, Institute of Biomedical Engineering (ISIB), National Research Council (CNR), Padua, Italy

(Correspondence should be addressed to J Vrbikova; Email: jvrzikova@endo.cz)

Abstract

Objective: Polycystic ovary syndrome (PCOS) has been linked to a high risk of type 2 diabetes mellitus. Disturbances in the secretion of the incretin hormones glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) have been observed in states with impaired glucose regulation. This paper considers the secretion of GIP and GLP-1 after oral glucose load in a group of lean, glucose-tolerant PCOS women in comparison with age- and body mass index (BMI)-matched healthy women.

Design: Case control.

Methods: PCOS ($n=21$, 25.8 ± 4.1 years, BMI 21.6 ± 1.7 kg/m²) and control healthy women (CT, $n=13$, 28.5 ± 7.2 years, BMI 20.3 ± 2.5 kg/m²) underwent oral glucose tolerance test (OGTT) with blood sampling for glucose, insulin, C-peptide, total GIP, and active GLP-1. Insulin sensitivity was determined both at fasting and during the test.

Statistics: Repeated measures ANOVA.

Results: Glucose levels and insulin sensitivity did not differ between PCOS and CT. PCOS had significantly higher levels of C-peptide ($P<0.05$) and tended to have higher insulin levels. The levels of total GIP were significantly higher in PCOS than in CT ($P<0.001$). Active GLP-1 levels exhibited a significantly different time-dependent pattern in PCOS ($P<0.002$ for PCOS versus time interaction). GLP-1 concentrations were similar in PCOS and CT in the early phase of OGTT and then reached significantly lower levels in PCOS than in CT at 180 min ($P<0.05$).

Conclusions: Increased total GIP and lower late phase active GLP-1 concentrations during OGTT characterize PCOS women with higher C-peptide secretion in comparison with healthy controls, and may be the early markers of a pre-diabetic state.

European Journal of Endocrinology 159 121–127

Introduction

Incretins are peptide hormones, secreted from the gut, responsible for the augmentation of insulin secretion after oral glucose intake (1, 2). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), formerly known as gastric inhibitory polypeptide (GIP), are the most important of these.

An altered secretion pattern and/or insulinotropic activity of incretins have been described in diabetes and in other conditions connected with impaired glucose regulation. Impaired secretion of GLP-1, preserved insulinotropic GLP-1 activity, and, by contrast, loss of the insulinotropic action of GIP with normal or only moderately impaired GIP secretion have been seen in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) (3). In first-degree relatives of T2DM patients, GLP-1 secretion was unchanged and GIP responses after meals or OGTT were on average higher than in healthy control subjects (4). Furthermore, increased GIP levels have been observed in

obese subjects (5) and both GIP and insulin secretion decreased after successful gastric bypass (6). Similarly, increased GIP levels have been described in elderly subjects (7). The cited studies reflect the current marked interest in the evaluation of the role of incretin hormones in different metabolic states.

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders and affects 5–10% of women in their fertile years (8, 9). Women with PCOS have an increased prevalence of T2DM (10–12) and some studies suggest that patients with PCOS should undergo early screening for T2DM (13). With the exception of a small study demonstrating no differences in GIP and GLP-1 levels between PCOS and healthy subjects (14), to the best of the authors' knowledge, no study to date has evaluated the relationship of incretin secretion to β -cell function in PCOS. We therefore investigated the secretion of GIP and GLP-1 after oral glucose load in a group of lean glucose-tolerant PCOS women in comparison with healthy women matched for

body mass index (BMI) and age, with the aim of characterizing incretin release in a disorder known likely to be a pre-diabetic state.

Subjects and methods

Subjects

Of 34 lean PCOS women diagnosed according to the ESHRE consensus (15) at the Institute of Endocrinology between October 2005 and March 2007, 21 fulfilled the inclusion criteria of the study (a negative family history of T2DM, normal glucose tolerance, BMI < 25 kg/m², and the exclusion of any other serious illness). The subjects had been free of any medication influencing glucose metabolism, and of hormonal contraception, for at least 3 months. In all of the women, oligoamenorrhea was present in combination with either an elevation of testosterone and the index of free testosterone above the upper limit of the normal range (e.g., 0.40–2.65 nmol/l for testosterone, free testosterone index < 6) and with PCO morphology on transvaginal ultrasound (*n* = 17), or with the PCO and normal androgen levels but with significant hirsutism (*n* = 2), or with both elevation of the androgens and clinically significant hirsutism and normal/absent (as one subject refused to undergo ultrasound examination) ovarian ultrasound morphology (*n* = 2).

Thirteen healthy women with normal glucose tolerance, recruited via advertisements, served as the control population (CT, Table 1). They were free of any medication affecting glucose metabolism, had negative family history of T2DM, and were also free of any family history of hyperandrogenic symptoms and infertility. CT had no symptoms of hyperandrogenism, had a regular menstrual cycle (21–35 days), and had androgen levels within the reference range. Pelvic ultrasonography was not performed in CT.

Tests and assays

After signing written informed consent approved by the local Ethical Committee, weight (to the nearest 0.1 kg) and height (to the nearest cm) were measured. Basal fasting blood samples for lipid profile and hormonal parameters were taken from the cubital vein between the first and fifth day of the spontaneous menstrual cycle or, if amenorrhoea was present, at any day. Samples were centrifuged and serum was stored at –20 °C until analysis. OGTT was performed after overnight fasting by sampling blood before the 75 g glucose oral load and after 30, 60, 90, 120, 150, and 180 min. Samples for blood glucose, insulin, and C-peptide concentration measurements were centrifuged and serum frozen at –20 °C until analysis. GIP and GLP-1 were determined from samples at 0, 30, 60, 120, and 180 min. Blood was collected into pre-chilled tubes with EDTA. Immediately after sampling, 10 µl/ml dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor (Linco, St Charles, MO, USA) and 50 µl antilysin (Spofa, Prague, Czech Republic) were added, and the tubes were centrifuged at 2000 g for 10 min; plasma samples were immediately frozen at –70 °C until analysis.

Total cholesterol, high density lipoprotein (HDL)-cholesterol, and triglycerides were assessed by photometry (Ecoline 25, Merck Vitalab Eclipse). Plasma glucose was determined by the glucose oxidase method (Beckmann, Fullerton, CA, USA), with intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) of 1.8 and 2.6% respectively. C-peptide and insulin were assayed by IRMA (Immunotech, Prague, Czech Republic), with intra- and inter-assay CVs of 4.1 and 5.1% for C-peptide and 4.6 and 5.3% for insulin respectively. Testosterone (T) was determined by RIA with the use of our own antiserum (anti-testosterone-3-carboxymethylxime: BSA), with intra- and inter-assay CVs of 10.2 and 10% respectively. Sex hormone-binding globulin (SHBG) was determined by IRMA (Orion, Espoo, Finland) with intra- and inter-assay CVs of 6.1 and 7.9% respectively. Active GLP-1 was

Table 1 Anthropometric and biochemical data and insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) and controls (CT).

Variable	PCOS (<i>n</i> = 21)		CT (<i>n</i> = 13)		P value
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Age (years)	25.81	3.98	28.46	6.90	NS
Body mass index (kg/m ²)	21.57	1.68	20.27	2.37	NS
Waist-to-hip ratio	0.75	0.05	0.75	0.04	NS
Total cholesterol (mmol/l)	4.02	0.74	4.21	0.41	NS
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.74	0.39	1.64	0.37	NS
Triglycerides (mmol/l)	0.77	0.37	0.66	0.24	NS
Testosterone (nmol/l)	3.03	0.79	1.68	0.64	0.00009
SHBG (nmol/l)	52.05	15.50	60.83	26.78	NS
Free testosterone index	6.57	3.01	3.19	1.49	0.002
Basal hepatic insulin extraction (molar ratio)	0.71	0.50	0.67	0.58	NS
Hepatic insulin extraction during OGTT (%)	68.1	8.7	67.0	9.1	NS
Fasting insulin sensitivity (QUICKI)	0.39	0.04	0.39	0.03	NS
Dynamic insulin sensitivity (OGIS, ml/min per m ²)	536	69	556	53	NS

QUICKI, quantitative insulin sensitivity index; OGIS, oral glucose insulin sensitivity; SHBG, sex hormone-binding globulin.

determined by ELISA (Linco Research) with no cross reactivity with glucagon, GLP-2 or GLP-1 (9–36 amide). Intra- and inter-assay CVs were in the range of 6.7–7.8 and 1.8–6.1% respectively. Total GIP was determined by ELISA (Linco Research) with no cross-reactivity with oxyntomodulin, glucagon, GLP-1, or GLP-2. Intra- and inter-assay CVs were in the range of 7–9 and 1–13% respectively.

Calculations and statistics

Insulin sensitivity was assessed in fasting conditions with the quantitative insulin sensitivity index QUICKI (16), and in dynamic conditions with the oral glucose insulin sensitivity index (OGIS), which describes glucose clearance during the postprandial phase of the OGTT (17). These indices have been validated against the euglycemic hyperinsulinemic clamp and are widely used (18). Hepatic insulin extraction was computed in the basal state as the molar ratio of C-peptide to insulin levels, and during the OGTT according to a model derived method (19).

Comparisons were made using repeated measures ANOVA, with status (PCOS or CT) as the inter-subject factor and subject factor and time as the intra-subject factor and factor interaction, followed by least significant difference multiple comparisons. For multiple comparisons, a probability level of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Spearman's correlations between C-peptide or insulin and GIP or GLP-1 levels at different time points of the OGTT were computed. Due to the skewed data distribution and heteroscedasticity in both the dependent variables and the residuals, the data were treated by a power transformation to approximate a Gaussian data distribution and constant variance. The outliers were detected using residual diagnostic plots. Statgraphics v. 5.1 statistical software (Rockville, MA, USA) was used for the computations.

Results

The clinical, biochemical, and hormonal parameters of the subjects are given in Table 1. Age, BMI, waist-to-hip ratio (WHR), total cholesterol, HDL-cholesterol, and triglyceride levels did not differ between PCOS and CT. Insulin sensitivity and hepatic insulin extraction, both at fasting and during OGTT, were similar in PCOS and CT. As expected, PCOS had significantly higher testosterone levels ($P < 0.00009$) and free testosterone index ($P < 0.002$) than CT, even when SHBG levels were not different between the groups.

OGTT time courses are shown in Fig. 1a and b. Blood glucose was similar in PCOS and CT ($P < 0.69$). Women affected with PCOS exhibited higher levels of C-peptide than CT ($P < 0.05$) and tended to have higher levels of insulin ($P < 0.12$; Fig. 1a). The concentrations of total GIP were significantly higher in PCOS than in CT

($P < 0.001$). Active GLP-1 levels exhibited a significantly different time-dependent pattern in PCOS than in CT ($P < 0.002$ for PCOS versus time interaction). GLP-1 concentrations were similar in PCOS and CT in the early phase of OGTT until 60 min and reached significantly lower levels in PCOS than in CT ($P < 0.05$) at 180 min (Fig. 1b).

C-peptide levels correlated significantly with total GIP levels at 0 ($r = 0.40$; $P < 0.04$), 60 ($r = 0.46$; $P < 0.01$), and 180 min ($r = 0.60$; $P < 0.002$). No significant correlation was observed between active GLP-1 and C-peptide. Neither total GIP nor active GLP-1 correlated with insulin.

Discussion

Incretin hormones, GIP and GLP-1, are responsible for the augmentation of insulin secretion after oral glucose load (1, 2). To the best of the authors' knowledge, there is only one previous study of incretin hormones in a small group of lean PCOS, which found no difference in GIP or GLP-1 between PCOS and controls, even when the PCOS women had higher insulin and C-peptide levels (14). By contrast, in the study presented here, women with PCOS exhibited increased total GIP and increased C-peptide concentrations during OGTT in comparison with healthy control subjects. On the other hand, active GLP-1 levels exhibited a significantly different time course, being similar in PCOS and controls in the early phase, but lower in PCOS in the late phase of OGTT. The observed discrepancies between the present results and those of the cited investigation (14) could be due to either the limited sample size of the previous study or the methodological differences in the incretin hormone assays. Our results do on the other hand accord with other authors, describing increased GIP (20) and decreased active GLP-1 levels in patients with overt T2DM (21). Similarly, increased total and intact GIP levels accompanied by increased C-peptide levels have been shown in subjects with impaired glucose tolerance (22). Increased concentrations of total GIP together with increased C-peptide secretion have also been found in healthy first-degree relatives of patients with T2DM during day-long sampling profiles (4). All these findings, together with those of the present study in PCOS, show that incretins, and especially GIP, seem to be altered both in overt diabetes and in those metabolic states considered as pre-diabetic.

The studied cohort of women affected with PCOS exhibited increased β -cell function, as they had significantly increased concentrations of C-peptide in comparison with matching healthy subjects. Similar to C-peptide, insulin levels also tended to be higher in PCOS, but did not reach significance, probably due to the greater dispersion of insulin levels. Liver degradation of the hormone should not be responsible for the discrepancy between insulin and C-peptide.

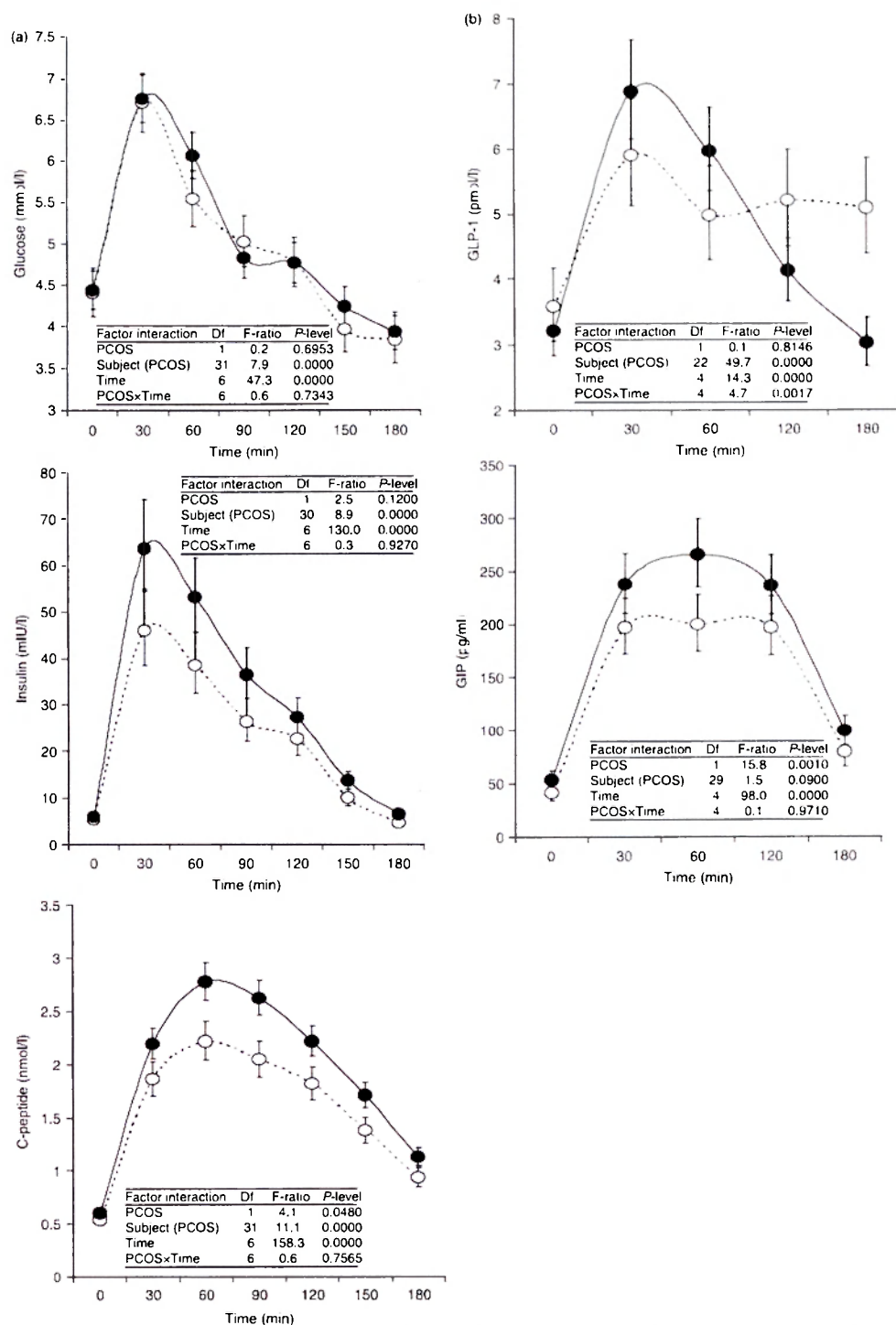


Figure 1 (a) Levels of glucose, C-peptide, and insulin after oral glucose load in women with polycystic ovary syndrome (closed circles, solid line) in comparison with age- and BMI-matched healthy women (open circles, hatched line). (b) Levels of total glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and active glucagon-like peptide 1 (GLP-1) after oral glucose load in women with polycystic ovary syndrome (closed circles, solid line) in comparison with age- and BMI-matched healthy women (open circles, hatched line).

because there was no difference in hepatic insulin extraction, both at fasting and during OGTT, in the PCOS and controls. The increased β -cell response is not due to obesity, as the patients and controls were lean with similar BMI and WHR. We have chosen lean PCOS for this study specifically to avoid the possible confounding effect of obesity on β -cell release.

β -Cell compensation for the given degree of insulin resistance (23) should not be responsible for the observed differences, as both groups had the same degree of insulin sensitivity measured in both a fasting state and during dynamic conditions. Similar insulin sensitivity is consistent with other reports employing the euglycemic clamp (24, 25). Other authors have also described increased C-peptide levels during OGTT, which were not accompanied by decreased insulin sensitivity as measured by euglycemic clamp in PCOS women (26). Increased β -cell activity has been described in other populations with a high risk of T2DM. Early insulin responses in OGTT, meal test, and IVGTT were exaggerated in the Pima Indians, for example, and could not be explained by insulin resistance (27). It is possible to speculate that increased β -cell activity is an early defect that is present even before subtle defects in insulin sensitivity can be discerned.

We have shown that total GIP secretion was an important factor contributing to increased C-peptide levels, which significantly correlated with GIP levels, but not with active GLP-1, at different time points of OGTT. The role of GLP-1 must not, however, be neglected, because although GIP levels are up to ten times higher than GLP-1 levels, both incretins act in an additive manner, with GLP-1 being predominant at higher glucose concentrations (28). The reasons for the lack of correlation between GLP-1 and insulin or C-peptide levels are not clear. Decreased GLP-1 secretion has been found in patients with overt T2DM, where, however, GLP-1 had preserved insulinotropic activity (3). In the present study, GLP-1 exhibited a significantly different time pattern in PCOS than in CT. GLP-1 concentrations were similar in PCOS and CT in the early phase of OGTT until 60 min and reached significantly lower levels in PCOS than in CT at 180 min. In our opinion, this was an interesting observation, although we were not able to provide a clear explanation of this phenomenon. The regulation of GLP-1 secretion is still not fully clarified. Rate of gastric emptying, leptin, and glucagon have been shown to influence GLP-1 secretion (1). In particular, leptin stimulates GLP-1 secretion, and this effect was attenuated in subjects with leptin resistance (29), while glucagon correlated negatively with GLP-1 during OGTT in patients with T2DM. On the other hand, no relationships between the parameters of glucose control, insulin sensitivity, and secretion with GLP-1 levels have been found (30).

One of the hypotheses explaining increased GIP levels in PCOS would be primary overactivity of the

enteroinsular axis. Increased GIP secretion could exaggerate the stimulation of β -cells to produce more insulin. The inappropriately increased insulin secretion should lead to lower blood glucose levels if insulin sensitivity is preserved. Indeed, lower levels of glycated hemoglobin (31) and a lower perception of hypoglycemic symptoms (32) have been observed in women affected with PCOS. We cannot conclude from our study whether the increased GIP levels in PCOS are associated with the altered insulinotropic effect of GIP: this remains to be evaluated by the administration of GIP during hyperglycemic clamp and by measurement of the incretin effect. Alternatively, GIP levels could be increased as a compensatory mechanism of decreased GIP activity (3). The decreased GIP activity observed in T2DM was originally supposed to result from the loss-of-function mutations of the GIP receptor, but no association of causative polymorphism or mutations in GIP receptor and T2DM has been identified (33, 34). Decreased GIP activity and concomitantly increased plasma GIP levels might also result from the decreased/absent expression of GIP receptors on the β -cells. In humans, however, the defective GIP action is restricted to the late phase of insulin secretion with preserved early phase GIP activity. Increased internalization or enhanced desensitization of GIP receptors has, therefore, been suspected (3). The decreased insulinotropic effect of GIP has been demonstrated not only in diabetic subjects, but also in their first-degree relatives with normal glucose tolerance (35) and thus, the GIP defect has been supposed to be a primary, genetically determined defect in T2DM. When subjects with different types of diabetes were examined, however, decreased responses to GIP in a similar range as in T2DM were also found in subjects with MODY or with secondary diabetes (36). The defective GIP activity could therefore result from the diabetic metabolic state (37).

In conclusion, increased total GIP and lower late phase active GLP-1 concentrations during OGTT were observed in lean PCOS women compared with BMI- and age-matched control subjects.

Acknowledgements

The excellent technical assistance of Romana Bajtlová, Jana Novotná, and Stanislava Stursová in performing the metabolic tests is gratefully acknowledged. This study was supported by grant NR/8759-3 of the Grant Agency of the Czech Ministry of Health.

References

- 1 Baggio LJ & Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007 **132** 2131–2157.
- 2 Kieffer TJ & Habener JE. The glucagon-like peptides. *Endocrine Reviews* 1999 **20** 876–913.

- 3 Holst JJ & Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2004 **287** E199–E206.
- 4 Nyholm B, Walker M, Gravholt CH, Shearing PA, Sturis J, Alberti KG, Holst JJ & Schmitz O. Twenty-four-hour insulin secretion rates, circulating concentrations of fuel substrates and gut incretin hormones in healthy offspring of type II (non-insulin-dependent) diabetic parents: evidence of several aberrations. *Diabetologia* 1999 **42** 1314–1323.
- 5 Elahi D, Andersen DK, Muller DC, Tobin JD, Brown JC & Andres R. The enteric enhancement of glucose-stimulated insulin release. The role of GIP in aging, obesity, and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1984 **33** 950–957.
- 6 Clements RH, Gonzalez QH, Long CL, Wittert G & Laws HL. Hormonal changes after Roux-en Y gastric bypass for morbid obesity and the control of type-II diabetes mellitus. *The American Surgeon* 2004 **70** 1–4 discussion 4–5.
- 7 Meneilly GS, Demuth HF, McIntosh CH & Pederson RA. Effect of ageing and diabetes on glucose-dependent insulinotropic polypeptide and depeptidyl peptidase IV responses to oral glucose. *Diabetic Medicine* 2000 **17** 346–350.
- 8 Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR & Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998 **83** 3078–3082.
- 9 Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S & Escobar-Morreale FH. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000 **85** 2434–2438.
- 10 Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK & Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 1999 **22** 141–146.
- 11 Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC & Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women [see comments]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 **84** 165–169.
- 12 Weerakiet S, Srisombut C, Bunnag P, Sangtong S, Chuangsoongnoen N & Rojanasakul A. Prevalence of type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Asian women with polycystic ovary syndrome. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics* 2001 **75** 177–184.
- 13 Salley KE, Wickham EP, Cheang KI, Essah PA, Karjane NW & Nestler JE. POSITION STATEMENT: glucose intolerance in polycystic ovary syndrome a position statement of the androgen excess society. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007 **92** 4546–4556.
- 14 Gama R, Norris F, Wright J, Morgan L, Hampton S, Watkins S & Marks V. The entero-insular axis in polycystic ovarian syndrome. *Annals of Clinical Biochemistry* 1996 **33** 190–195.
- 15 Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction* 2004 **19** 41–47.
- 16 Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G & Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000 **85** 2402–2410.
- 17 Mari A, Pacini G, Murphy E, Ludvik B & Nolan JJ. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* 2001 **24** 539–548.
- 18 Tura A, Kautzky-Willer A & Pacini G. Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2006 **72** 298–301.
- 19 Tura A, Ludvik B, Nolan JJ, Pacini G & Thomaseth K. Insulin and C-peptide secretion and kinetics in humans: direct and model-based measurements during OGTT. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2001 **281** E966–E974.
- 20 Jones IR, Owens DR, Luzio S, Williams S & Haves TM. The glucose dependent insulinotropic polypeptide response to oral glucose and mixed meals is increased in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1989 **32** 668–677.
- 21 Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S & Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2001 **50** 609–613.
- 22 Theodorakis MJ, Carlson O, Muller DC & Egan JM. Elevated plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide associates with hyperinsulinemia in impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2004 **27** 1692–1698.
- 23 Ahren B & Pacini G. Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta cell function in clinical studies. *European Journal of Endocrinology* 2004 **150** 97–104.
- 24 Ovesen P, Moller J, Ingerslev HJ, Jorgensen JO, Mengel A, Schmitz O, Alberti KG & Moller N. Normal basal and insulin-stimulated fuel metabolism in lean women with the polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993 **77** 1636–1640.
- 25 Urbikova J, Cibula D, Dvorakova K, Stanicka S, Sindelka G, Hill M, Fanta M, Vondra K & Skrha J. Insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 **89** 2942–2945.
- 26 Ciampelli M, Fulghesu AM, Cucinelli F, Pavone V, Caruso A, Mancuso S & Lanzzone A. Heterogeneity in beta cell activity, hepatic insulin clearance and peripheral insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 1997 **12** 1897–1901.
- 27 Lillioja S, Nyomba BL, Saad MF, Ferraro R, Castillo C, Bennett PH & Bogardus C. Exaggerated early insulin release and insulin resistance in a diabetes-prone population: a metabolic comparison of Pima Indians and Caucasians. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991 **73** 866–876.
- 28 Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S & Holst JJ. Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regulatory Peptides* 2003 **114** 115–121.
- 29 Anini Y & Brubaker PL. Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* 2003 **52** 252–259.
- 30 Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ehrlichmann M, Nauck MA, Schmidt WE & Meier JJ. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* 2008 **57** 678–687.
- 31 Holte J, Bergh T, Berne C, Berglund I, & Lithell H. Enhanced early insulin response to glucose in relation to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994 **78** 1052–1058.
- 32 Gemarelli G, Holte J, Stridsberg M, Niklasson F, Berne C & Backstrom T. The counterregulatory response to hypoglycaemia in women with the polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology* 1997 **46** 167–174.
- 33 Almind K, Ambye L, Ithammer SA, Hansen T, Echwald SM, Holst JJ, Gromada J, Thorens B & Pedersen O. Discovery of amino acid variants in the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor: the impact on the pancreatic beta cell responses and functional expression studies in Chinese hamster fibroblast cells. *Diabetologia* 1998 **41** 1194–1198.
- 34 Kubota A, Yamada Y, Hayami T, Yasuda K, Someya Y, Ihara Y, Kagimoto S, Watanabe R, Tamimoto T, Tsuda K & Seino Y. Identification of two missense mutations in the GIP receptor gene: a functional study and association analysis with NIDDM: no evidence of association with Japanese NIDDM subjects. *Diabetes* 1996 **45** 1701–1705.

- 35 Meier JJ, Hucking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegel WH & Nauck MA. Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001 **50** 2497–2504.
- 36 Vilsboll T, Knop FK, Krarup T, Johansen A, Madsbad S, Larsen S, Hansen T, Pedersen O & Holst JJ. The pathophysiology of diabetes involves a defective amplification of the late-phase insulin response to glucose by glucose-dependent insulinotropic polypeptide—regardless of etiology and phenotype. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003 **88** 4897–4903.
- 37 Nauck MA, El-Quaghli A, Gabrys B, Hucking K, Holst JJ, Deacon CF, Gallwitz B, Schmidt WE & Meier JJ. Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regulatory Peptides* 2004 **122** 209–217.

Received 20 May 2008

Accepted 22 May 2008

Příloha 6

Prevalence of insulin resistance and prediction of glucose intolerance and type 2 diabetes mellitus in women with polycystic ovary syndrome

Jana Vrbikova^{1,*}, Katerina Dvorakova¹, Tereza Grimmichova¹, Martin Hill¹, Sona Stanicka¹, David Cibula², Bela Bendlova¹, Luboslav Starka¹ and Karel Vondra¹

¹ Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

² Department of Obstetrics and Gynaecology, Charles University, 1st Medical Faculty, Prague, Czech Republic

Abstract

Background: Diabetes mellitus type 2 (DM2) affects 10% of women with polycystic ovary syndrome (PCOS). We evaluated the sensitivity and specificity of clinical and fasting biochemical parameters in screening for impaired glucose tolerance (IGT) and DM2.

Methods: Women with PCOS ($n=244$, age 27.4 ± 7.5 years, body mass index (BMI) 27.5 ± 6.9 kg/m²) and healthy women ($n=57$, age 26.8 ± 5.8 years, BMI 21.3 ± 2.1 kg/m²) underwent basal blood sampling and an oral glucose tolerance test (oGTT).

Results: Insulin resistance was identified in 40.2% of PCOS women. Impaired fasting glucose (5.6–6.9 mmol/L) was found in 30 subjects (12.3%), but the oGTT revealed IGT in only six of these cases and DM2 in one subject. IGT was found in 23 (9.4%) and DM2 in four (1.6%) of the women with PCOS. The conventional upper limits for total cholesterol, triglycerides, systolic and diastolic blood pressure and fasting glucose revealed low sensitivity for the identification of impaired glucose metabolism.

Conclusions: No single parameter nor any combination of them showed an accuracy sufficient for screening of IGT or DM2 in PCOS patients. All PCOS patients should be screened using an oGTT to identify disturbances in glucose metabolism.

Clin Chem Lab Med 2007;45:639–44.

Keywords: diabetes mellitus type 2; homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR); impaired glucose tolerance; polycystic ovary syndrome.

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common endocrine disorder in women of fertile age. It is recognised that insulin resistance (IR) may play a major role in the pathogenesis of PCOS (1, 2). IR is one of the risk factors for the development of diabetes mellitus type 2 (DM2). DM2 affects approximately 10% and impaired glucose tolerance (IGT) approximately 20% of PCOS patients, which are higher frequencies than for healthy women (3–7). It is likely that only a subgroup of PCOS women are at higher risk of IGT and DM2. The early identification of individuals at risk of DM2 and subsequent prevention could have a significant economic impact (8). In recent years, so-called prediabetes [impaired fasting glucose (IFG) and IGT] has again come into focus. Data for general populations suggest that not only DM2, but also isolated IGT, is consistently associated with increased cardiovascular morbidity and mortality, and with all-cause mortality (9). This increase in risk for IGT is higher (10) than for isolated IFG (11). To date, all large-scale studies aimed at preventing DM2 used IGT as an inclusion criterion. These studies proved that lifestyle (12) and pharmacological (13) interventions may prevent the development of DM2.

PCOS manifests early in the lifespan, and sufferers thus represent an ideal target group for the screening, prevention and early treatment of DM2. As the prevalence of PCOS is high in women of fertile age, hypothetically reaching 7%–10%, identification of fasting markers with high accuracy for the diagnosis of IGT/DM2 could substantially reduce the number of oral glucose tolerance tests (oGTTs) necessary. In PCOS, there have been only a few studies to date focusing on the prediction of glucose intolerance (14, 15). Indices of IR derived from basal values of blood glucose, insulin and androgen levels have been studied as potential predictors of glucose intolerance in women with PCOS (15).

The aims of the present study were: 1) to evaluate the IR prevalence as defined by the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) in Czech PCOS patients; and 2) to investigate the sensitivity and specificity of biochemical cardiovascular risk factors, IR indices and androgen levels in detecting IGT and DM2.

Patients and methods

Women with PCOS ($n=244$; mean age 27.4 ± 7.5 years, mean body mass index (BMI) 27.5 ± 6.9 kg/m²) diagnosed according to the consensus of the European Society for Human

*Corresponding author: Jana Vrbikova, MD, PhD, Institute of Endocrinology, Národní 8, Prague 1, 116 94 Czech Republic
Phone: +420 224 905111, Fax: +420 224 905325.
E-mail: jvrzikova@endo.cz

Reproduction and Embryology (ESHRE) and the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) (16) [the diagnosis is accepted when two of the following three symptoms are present: 1) oligo/anovulation; 2) clinical and/or biochemical signs of hyperandrogenism; and 3) polycystic ovaries (PCO)]. These subjects were enrolled consecutively in the study from an outpatient tertiary endocrine department between 1997 and 2006. Hyperandrogenaemia was defined as elevation of total testosterone, free testosterone index or androstenedione above the upper limit of the normal range: 0.40–3.00 nmol/L for testosterone; a value of < 6 for the free testosterone index (17); and 1.6–5.4 nmol/L for androstenedione (18). A total of 36 women refused to undergo vaginal ultrasound examination, mostly for non-compliance or personal reasons, and in 45 probands normal ultrasonographic appearance of the ovaries was observed. In all of these patients, a combination of chronic anovulation and clinical signs of hyperandrogenism, together with elevation of total testosterone or the free testosterone index or androstenedione above the upper limit of the normal range was observed. In 84.5% of women, oligo-amenorrhoea was present. These patients were classified as anovulatory. In 15.5% of cases, regular menstrual cycles were observed. These women all had sonographic evidence of PCOS and hyperandrogenaemia. Hyperandrogenaemia was present in 92.5% of the women studied.

Healthy controls were recruited via advertisement ($n = 57$; mean age 25.6 ± 4.8 years, mean BMI 21.3 ± 2.07 kg/m²). These all lacked symptoms of hyperandrogenism, had a regular menstrual cycle (21–35 days), and had androgen levels within the reference range. Pelvic ultrasonography was not performed in control subjects.

After signing informed consent approved by the local Ethics Committee, two blood pressure readings were obtained from seated patients after a 10-min rest; the mean was determined from the two values and was used for further analysis. Weight (to the nearest 0.1 kg) and height (to the nearest cm) were measured. The degree of obesity was classified as follows: lean, BMI < 25 kg/m²; overweight, BMI 25–30 kg/m²; obese, BMI > 30 kg/m² (19).

Basal fasting blood samples for lipid spectrum, glucose, C-peptide and insulin were taken from the cubital vein. Samples were centrifuged and serum was stored at -20 °C until analysis.

oGTTs with sampling for blood glucose, insulin and C-peptide at 0, 30, 60 and 120 min were carried out with a 75-g oral glucose load. Samples were centrifuged and plasma was frozen at -20 °C until analysis.

C-peptide was estimated by immunoradiometric assay (IRMA; Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra- and inter-assay CV of 4.1% and 5.1%, respectively. Insulin was estimated by IRMA (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra- and inter-assay CV of 4.6% and 5.3%, respectively. Blood glucose was estimated by the glucose oxidase method (glucose analyser, Beckmann, Fullerton, CA, USA) in venous plasma, with an intra- and inter-assay CV of 1.8% and 2.6%, respectively. Total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and triglycerides were assessed by photometry (Ecoline 25, Vitalab Eclipse; Merck, Darmstadt, Germany), with intra-assay CVs 1.6%, 1.7% and 1.2% and inter-assay CVs of 1.9%, 2.1% and 1.9%, respectively.

Testosterone was determined by radioimmunoassay (RIA) using anti-testosterone-3 carboxymethyloxide bovine serum albumin (BSA), with intra- and inter-assay CVs of 10.2% and 10%, respectively. Androstenedione was estimated by RIA using anti-androstenedione 6 carboxymethyloxide BSA, with intra- and inter-assay CVs of 10% and 10.2%, respectively.

Dehydroepiandrosterone (DHEA) was estimated by RIA after dichloromethane extraction (Immunotech, Marseille, France), with an intra-assay CV of 6% and inter-assay CV of 12.1%. DHEA sulfate (DHEAS) was estimated by RIA (Immunotech, Marseille, France), with an intra-assay CV of 3.5% and inter-assay CV of 10.2%. 17-OH progesterone was determined after diethylether extraction with RIA (Immunotech, Prague, Czech Republic), with an intra-assay CV of 5.2%, and inter-assay CV of 6.5%. Oestradiol was determined with RIA (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra-assay CV of 4.4% and an inter-assay CV of 4.6%. Luteinising hormone (LH) was determined by immunoradiometric assay (IRMA) (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra-assay CV of 3.7% and an inter-assay CV of 4.3%. Follicle stimulating hormone (FSH) was determined by IRMA (Immunotech, Prague, Czech Republic) with an intra-assay CV of 2.6%, and an inter-assay CV of 4.5%. Sex hormone-binding globulin (SHBG) was determined by IRMA (Orion, Espoo, Finland) with an intra-assay CV of 6.1% and an inter-assay CV of 7.9%.

IGT and DM2 were classified after an oGTT according to the revised criteria of the World Health Organization (WHO) (20). Plasma glucose between 7.7 and 11.1 mmol/L at 120 min is classified as IGT. DM2 is diagnosed when plasma glucose at 120 min is ≥ 11.1 mmol/L. IFG was diagnosed according to the American Diabetes Association (ADA) (11) as fasting values of between 5.6 and 6.9 mmol/L.

Calculations

The HOMA-IR was calculated as: $\text{fasting insulin (mIU/L)} \times \text{fasting glucose (mmol/L)} / 22.5$. The homeostatic model assessment of β -cell function (HOMA- β) was calculated as $20 \times \text{fasting insulin (mIU/L)} / \text{fasting glucose (mmol/L)} - 3.5$, as described by Matthews et al. (21). The quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) was computed as $1 / ((\log \text{fasting insulin (mIU/L)}) + \log \text{fasting glucose (mg/dL)})$, as described by Katz et al. (22).

For controls the 95th percentile of HOMA-IR was 2.29 mmol \times mIU/L² and this value was used as a cutoff value for the presence of IR.

Statistics

Mann-Whitney and χ^2 tests (NCSS 2002, Statgraphics Plus v. 5.1; Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA) were used for statistical analysis. Receiver operating characteristic (ROC) curves were analysed using SPSS statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data are reported as mean \pm SD.

Results

Prevalence of IR

The IR prevalence was 40.2% in the group of 244 PCOS patients, using the HOMA-IR 95th percentile in healthy controls as a cutoff value. PCOS subjects were lean in 49.2%, overweight in 22.9% and obese in 27.9% of cases. When the whole group was analysed according to BMI categories, IR was found in 14.6% of lean, 42.5% of overweight and 71.8% of obese women ($\chi^2 = 61.81$, $p < 0.0001$). Healthy controls were overweight in 4% and obese in 10.5% of cases. IR was present in 7.2% of controls.

Table 1 Comparison of anthropometric, clinical, biochemical and hormonal variables in insulin-sensitive and insulin-resistant women with PCOS.

Variable	Insulin sensitive PCOS (n = 146)		Insulin resistant PCOS (n = 98)		p
	Mean	SD	Mean	SD	
Age, years	26.25	6.60	29.06	8.36	0.0030
Ferriman-Gallwey score	6.95	6.33	10.06	6.20	0.0001
Systolic blood pressure, mm Hg	115.30	13.46	124.63	15.23	0.0001
Diastolic blood pressure, mm Hg	74.11	9.83	80.02	10.80	0.0001
Body mass index, kg/m ²	24.67	4.93	31.43	6.64	0.0000
Waist, cm	81.67	12.08	94.79	13.12	0.0020
Testosterone, nmol/L	2.71	1.09	2.48	0.84	0.0800
Free testosterone index	7.78	4.70	11.40	7.20	0.000001
Oestradiol, nmol/L	0.29	0.28	0.16	0.17	ns
17-OH progesterone, nmol/L	2.38	1.23	2.27	1.32	ns
Dehydroepiandrosterone sulfate, μ mol/L	7.21	3.66	7.84	4.59	ns
Dehydroepiandrosterone, nmol/L	30.75	19.77	29.37	17.22	ns
Androstenedione, nmol/L	7.89	3.59	8.39	3.91	ns
Luteinising hormone, IU/L	8.03	5.51	7.30	5.01	ns
Follicle stimulating hormone, IU/L	5.42	2.36	6.36	6.18	ns
Sex-hormone-binding globulin, nmol/L	44.31	26.16	28.77	18.10	0.0001
Insulin, mIU/L	6.14	2.59	20.66	16.59	0.000001
C-peptide, nmol/L	0.69	0.26	1.36	0.61	0.000001
Plasma glucose, mmol/L	4.65	0.49	5.19	0.68	0.0001
HOMA- β F, mIU/mmol	144.87	199.20	277.49	195.00	0.0001
HOMA-IR, mIU mmol/L ²	1.27	0.54	4.86	4.90	0.0001
Cholesterol, mmol/L	4.56	0.94	4.83	0.94	0.0447
HDL-cholesterol, mmol/L	1.61	0.97	1.23	0.34	0.0011
Triglycerides, mmol/L	1.05	1.08	1.52	0.85	0.0017

HOMA- β F, homeostatic model assessment of β -cell function; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance.

Table 1 provides a comparison of the anthropometric, clinical, biochemical and hormonal variables in the insulin-sensitive and insulin-resistant PCOS women. The latter group was statistically older ($p < 0.003$), more obese ($p < 0.0001$), and with higher systolic ($p < 0.0001$) and diastolic blood pressures ($p < 0.0001$). They had higher triglyceride ($p < 0.02$) and total cholesterol ($p < 0.05$) levels, lower HDL-cholesterol levels ($p < 0.01$), and higher fasting plasma glucose ($p < 0.0001$), insulin ($p < 0.0001$) and C-peptide levels ($p < 0.0001$). The insulin-resistant and insulin-sensitive PCOS subjects did not differ in total testosterone, androstenedione, 17-OH progesterone, oestradiol, LH or FSH levels. The insulin-resistant PCOS women had significantly lower SHBG ($p < 0.0001$) and a higher free testosterone index ($p < 0.000001$) than the insulin-sensitive PCOS women.

Prevalence of IFG, IGT and DM2

IGT was identified in 23 PCOS patients (9.4%) and DM2 in four patients (1.6%), assessed according to blood glucose levels at 120 min for the oGTT. IFG was observed in 30 women (12.3%); the oGTT revealed IGT in six of these cases and DM2 in one subject.

Predictors of IGT

ROC curves were constructed for oGTT blood glucose at 120 min > 7.7 mmol/L as a response parameter, and family history of DM2, BMI, systolic and diastolic blood pressures, HOMA-IR, QUICKI, HOMA- β F, fasting blood glucose, fasting insulin, total cholesterol,

HDL-cholesterol, triglycerides, testosterone, and SHBG as subsequent criteria. The area under the curve (AUC) was significantly different from 0.5 only for the following parameters: systolic and diastolic blood pressures, HOMA-IR, QUICKI, fasting blood glucose and insulin, total cholesterol and triglycerides (Table 2). The AUCs for these parameters, however, were not significantly different from each other.

The best accuracy for the identification of impaired glucose metabolism was found for the following parameters: total cholesterol, triglycerides, and systolic and diastolic blood pressures values (Figure 1). Sensitivity and specificity were 91.7% and 38.7% for total cholesterol (cutoff point 4.19 mmol/L), 91.7% and 38.7% for serum triglycerides (0.705 mmol/L), 90.9% and 28% for diastolic blood pressure of 69.1 mm Hg, and 90% and 25% for systolic blood pressure of 110 mm Hg. The HOMA-IR cutoff value of 0.673 showed a sensitivity of 92.6%, but specificity reached only 11%. This low specificity means that a large number of women defined as part of the "risk" group by HOMA-IR actually had normal oGTT results.

The conventional upper limits for total cholesterol, triglyceride, systolic and diastolic blood pressures and fasting glucose revealed low sensitivity for the identification of impaired glucose metabolism (Table 2).

Discussion

The first aim of the present study was to investigate the IR prevalence in PCOS women. We identified IR

Table 2 Diagnostic accuracy of various parameters for identification of impaired glucose metabolism.

Criterion	Cutoff	Sensitivity, %	Specificity, %	AUC
HOMA-IR, mmol mIU·L ⁻¹	0.67	92.6	11.0	0.668 (0.541-0.794)
QUICKI	0.41	92.6	10.0	0.668 (0.541-0.794)
Diastolic blood pressure, mm Hg	69.1	92.0	17.0	0.683 (0.561-0.805)
Systolic blood pressure, mm Hg	80.0	68.0	54.1	0.686 (0.583-0.788)
	110.0	90.0	25.0	
Total cholesterol, mmol/L	130.0	48.0	75.7	0.659 (0.554-0.764)
	4.19	91.7	38.7	
Triglycerides, mmol/L	5.00	46.0	68.7	0.673 (0.559-0.786)
	0.705	90.9	28.0	
Fasting blood glucose, mmol/L	1.8	31.8	82.0	0.671 (0.555-0.788)
	4.05	94.0	5.0	
Fasting insulin, mIU/L	5.60	26.0	89.8	0.656 (0.533-0.780)
	3.69	92.6	10.0	

AUC, cumulative area under the ROC curve, presented as mean (confidence interval).

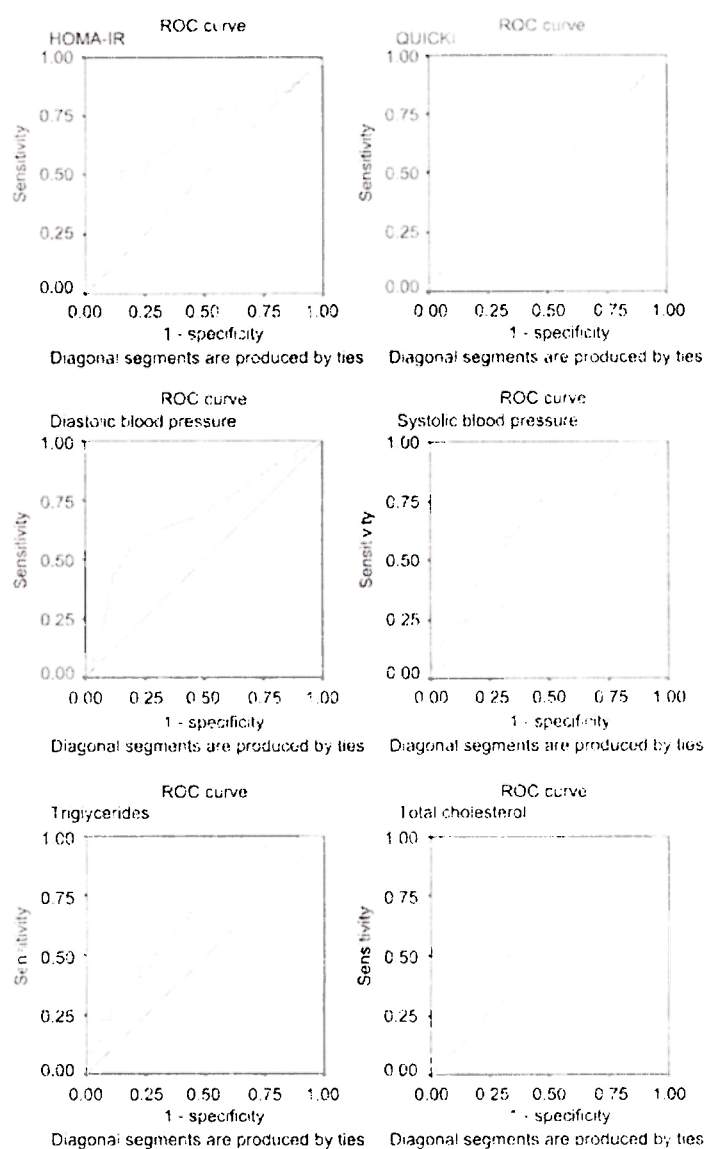


Figure 1 Construction of ROC curves for different criteria (HOMA-IR, QUICKI, systolic and diastolic blood pressures, total cholesterol and triglycerides) for identifying IGT or DM2

DM2, diabetes mellitus type 2; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; IGT, impaired glucose tolerance; QUICKI, quantitative insulin sensitivity check index; ROC, receiver operating characteristic.

in 40% of the PCOS women of fertile age, compared to 7.2% in their lean healthy counterparts.

The IR prevalence was closely correlated with obesity. Insulin-resistant PCOS women were older, more obese, and had more frequent presence of coronary risk factors (higher blood pressure, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides) than insulin-sensitive PCOS subjects. Higher HOMA- β F was also found in insulin-resistant individuals. These results are in accordance with other studies. Deugarte et al. (23) identified IR defined by HOMA-IR in 60% of PCOS women from the USA with BMI in the range 27–45 kg/m². Carmina and Lobo (24) found IR using HOMA-IR in 60% of Italian PCOS subjects with BMI < 27 kg/m² and in 95% of obese PCOS women. One weakness of our study is the potential bias in the estimation of IR in healthy women. The selection process was not truly random. Women with a greater interest in healthy habits might be expected to respond more often to advertisements for health examinations; the IR proportion in our controls and the HOMA-IR cutoff selected would thus be lower than in the “usual” population. This would, however, lead to over-estimation of IR in women with PCOS.

The use of different diagnostic criteria (NIH or ESHRE) may have led to differences in the proportions of metabolic disturbances observed. It is known that IR does not accompany some of the phenotypes defined as PCOS by ESHRE (25). Carmina and Lobo (24) based PCOS diagnosis on the NIH consensus. The authors diagnosed PCOS according to ESHRE criteria. A combination of regular menstrual cycles, PCO morphology and hyperandrogenism were found in 15.5% of their study subjects. It is known that up to 40% of these women exhibited anovulation when examined more thoroughly (26). It is possible that the different diagnostic criteria used influenced the IR prevalence observed. We suppose, however, that the aforementioned discrepancies in IR prevalence are more likely due to the different occurrences of obesity. In the study of Carmina and Lobo (24), average BMI was 27.6 kg/m² with an SD of 0.4 kg/m². On the other hand, nearly 50% of the PCOS women in the current study were lean, i.e., with BMI < 25 kg/m². Data from another study (27) describing similar insulin levels in lean PCOS women and lean controls agree with the low IR prevalence in our lean PCOS population.

The second aim of this study was to determine the sensitivity and specificity of various fasting biochemical and clinical parameters for the detection of impaired glucose metabolism. IR is one of the risk factors for DM2. There is, however, no recommendation (28) on how to detect IR in clinical practice. On the other hand, it has been convincingly shown that lifestyle and pharmacological intervention can prevent the development of DM2 in individuals with IGT. As IGT is entirely asymptomatic, it can be diagnosed only via oGTT. Fasting and 2-h glucose concentrations were shown to be equally good at predicting DM2 development over a 10-year period in Caucasian postmenopausal women (29). Because IGT is more common than IFG, measuring only fasting glucose

concentrations would result in missing a pre-diabetic stage in a large group of people at risk for DM2 and cardiovascular diseases. Attempts have been made to identify predictors of IGT/DM2 from fasting values for different biochemical parameters, because oGTT is inconvenient and time-consuming. We have shown that the conventional upper limits for total cholesterol, triglycerides, systolic and diastolic blood pressures and fasting glucose exhibit low sensitivity for the identification of impaired glucose metabolism in PCOS women. The sensitivity observed was approximately 92%, with a specificity of 17% for diastolic blood pressure and 35% for cholesterol. Both of these parameters, however, yielded approximately 8% false negative results, which is an unacceptably high proportion for a screening test. A HOMA-IR cutoff value of 0.7 yielded the highest sensitivity for the detection of impaired glucose metabolism, but sensitivity only approaching 90% is at the minimum level required for a screening test. Moreover, specificity was very low, reaching only 10%. If either HOMA-IR or cardiovascular risk factors are used as screening tests, the majority of oGTTs would be normal in women assigned to the risk group, and the number of false-negative diagnoses would be relatively high, reaching 12%. On the other hand, Mohlig et al. (15) found that HOMA-IR is a convenient predictor of IGT/DM2. At a cutoff point of 73.1%, HOMA-IR had a sensitivity of 95.5% and a specificity of 51.9%. These discordant results might be explained by the BMI heterogeneity in our Czech PCOS population in comparison to the cited cohort (15), which had a narrow BMI range of approximately 30 kg/m². It is known that HOMA-IR is more closely correlated to insulin action in obese individuals than in subjects with normal BMI (30). Other authors, however, have not confirmed that HOMA-IR is a useful tool in predicting DM2 in the general population. They found that the best predictor of subsequent development of DM2 is elevated C-reactive protein. Women with C-reactive protein in the highest tertile had an increased relative risk of developing diabetes, which changed only minimally after adjusting for BMI or HOMA-IR (31).

In conclusion, IR according to the HOMA-IR index was identified in approximately 40% of the PCOS population studied. The IR prevalence was highly dependent on BMI. IFG was present in 12%, IGT in 9.4% and DM2 in 1.6% of the subjects. No single parameter showed adequate accuracy for the detection of IGT in PCOS patients in this study. Conventional upper limits for cardiovascular risk factors showed low sensitivity. Based on these results, we suggest screening of all PCOS patients using an oGTT.

Acknowledgements

This study was supported by Grant No. 8759/3 of the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health. The results were presented in part at ENDO 2006 (88th Annual Meeting of the Endocrine Society) in Boston, MA, June 24–27, 2006.

References

- Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774-800.
- Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv* 2004;59:141-54.
- Weerakiet S, Srisombut C, Bunnag P, Sangtong S, Chuangsoongnoen N, Rojanasakul A. Prevalence of type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Asian women with polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 2001;75:177-84.
- Vrbikova J, Cifkova R, Jirkovska A, Lanska V, Platilova H, Zamrazil V, et al. Cardiovascular risk factors in young Czech females with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2003;18:980-4.
- Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:165-9.
- Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 1999;22:141-6.
- Cibula D, Cifkova R, Fanta M, Polerdne R, Zivny J, Skibova J. Increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus, arterial hypertension and coronary artery disease in perimenopausal women with a history of the polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2000;15:785-9.
- Azziz R, Marin C, Hoq L, Badamgarav E, Song P. Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4650-8.
- Borch-Johnsen K. IGT and IFG. Time for revision? *Diabet Med* 2002;19:707.
- The DECODE study group on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet* 1999;354:617-21.
- Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26:3160-7.
- Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001;344:1343-50.
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002;346:393-403.
- Mohlig M, Floter A, Spranger J, Weickert MO, Schill T, Schlosser HW, et al. Predicting impaired glucose metabolism in women with polycystic ovary syndrome by decision tree modelling. *Diabetologia* 2006;49:2572-9.
- Mohlig M, Spranger J, Ristow M, Pfeiffer AF, Schill T, Schlosser HW, et al. Predictors of abnormal glucose metabolism in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2006;154:295-301.
- The Rotterdam ESHRE FASRM sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;19:41-7.
- Himpl R. Comparison of three immunoassays for testosterone determination. In: Gorög S, editor. *Advances in steroid analysis* 93. Budapest: Akademiai Kiado, 1994: 163-9.
- Putz Z, Himpl R, Vanuga A, Velerninsky J, Starka L. A selective radioimmunoassay of androstenedione in plasma and saliva. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982;20:761-4.
- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-97.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2402-10.
- Dejagarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril* 2005;83:1454-60.
- Carmina E, Lobo RA. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;82:661-5.
- Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC. PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: change in prevalence among WHO II anovulation and association with metabolic factors. *Br J Obstet Gynaecol* 2006;113:1210-7.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4237-45.
- Acien P, Quereda F, Matallin P, Villarroya E, Lopez-Fernandez JA, Acien M, et al. Insulin, androgens, and obesity in women with and without polycystic ovary syndrome: a heterogeneous group of disorders. *Fertil Steril* 1999;72:32-40.
- American Diabetes Association. Consensus Development Conference on Insulin Resistance. Nov 5-6, 1997. *Diabetes Care* 1998;21:310-4.
- Larsson H, Lindgarde F, Berglund G, Ahren B. Prediction of diabetes using ADA or WHO criteria in postmenopausal women: a 10 year follow up study. *Diabetologia* 2000;43:1227-8.
- Kim SH, Abbasi F, Reaven GM. Impact of degree of obesity on surrogate estimates of insulin resistance. *Diabetes Care* 2004;27:1998-2002.
- Han TS, Sattar N, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Lean ME, Haffner SM. Prospective study of C reactive protein in relation to the development of diabetes and metabolic syndrome in the Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care* 2002;25:2016-21.