

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Šárka Doleželová

**VLIV n-3 POLYNENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN V DIETĚ NA
REGULACI SEKRECE INZULÍNU A GLUKÓZOVÉ HOMEOSTÁZY U MYŠÍ**

THE EFFECT OF DIETARY n-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN THE REGULATION OF
INSULIN SECRETION AND GLUCOSE HOMEOSTASIS IN MICE

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Martin Rossmeisl, PhD.

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.; Oddělení biologie tukové tkáně

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele MUDr. Martina Rossmeisla, PhD. na Oddělení biologie tukové tkáně ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Uvedla jsem všechny použité informační zdroje a literaturu a tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 2. 5. 2011

.....
Šárka Doleželová

Děkuji svému školiteli MUDr. Martinu Rossmeislovi, PhD. za odborné vedení mé diplomové práce. Dále chci poděkovat MUDr. Janu Kopeckému, DrSc. za možnost vypracovat experimentální část na Oddělení biologie tukové tkáně, FgÚ, AV ČR a všem ostatním členům oddělení za poskytnutou pomoc během mé práce, užitečné rady a přátelské prostředí.

Děkuji také své rodině za podporu a vytvoření pevného zázemí, které mi umožnilo nerušeně studovat.

1 Obsah

1	Obsah	4
2	Abstrakt	6
3	Klíčová slova.....	7
4	Seznam zkratk	8
5	Úvod	10
6	Teoretická část	11
6.1	Obezita.....	11
6.2	Metabolická flexibilita.....	13
6.3	Inzulín a inzulínová rezistence	15
6.3.1	Inzulínová rezistence	15
6.3.2	Tvorba inzulínu v pankreatu.....	15
6.3.3	Regulace sekrece inzulínu	16
6.3.4	Inzulínová signální kaskáda	18
6.3.5	Mechanismy inzulínové rezistence	20
6.3.6	Inzulínová rezistence v tukové tkáni	25
6.3.7	Inzulínová rezistence v játrech	25
6.3.8	Inzulínová rezistence v kosterním svalu	27
6.4	Inkretiny	29
6.4.1	Glukózo-dependentní insulinotropický polypeptid	29
6.4.2	Glucagonu podobný peptid 1	30
6.5	Polynenasycené mastné kyseliny řady n-3	33
6.5.1	Působení n-3 LC-PUFA v tukové tkáni	34
6.5.2	Působení n-3 LC-PUFA v dalších orgánech	36
6.5.3	Metabolismus LC-PUFA.....	36
6.6	Interakce n-3 LC-PUFA a inkretinů	38
7	Cíle diplomové práce	39

8	Experimentální část	40
8.1	Obecné schéma pokusu	40
8.2	Metody.....	43
8.2.1	Glukózový toleranční test.....	43
8.2.2	Metabolity a hormony v plazmě.....	43
8.2.3	Lipidy ve tkáni.....	48
8.2.4	Histologické metody.....	49
8.3	Statistické zpracování výsledků	51
9	Výsledky.....	52
9.1	Metabolické účinky suplementace vysokotukové diety koncentrátem n-3 LC-PUFA	52
9.1.1	Účinek n-3 LC-PUFA na tělesnou hmotnost a příjem potravy	52
9.1.2	Vliv n-3 LC-PUFA na lipidové metabolity v plazmě	54
9.1.3	Vliv n-3 LC-PUFA na akumulaci lipidů v játrech	55
9.1.4	Vliv n-3 LC-PUFA na beta-buňky pankreatu	57
9.1.5	Vliv n-3 LC-PUFA na hladiny inzulínu v plazmě	59
9.2	Glukózový toleranční test.....	59
9.2.1	Porovnání účinků orálního a intraperitoneálního podání glukózy na glukózovou homeostázu organismu.....	59
9.2.2	Vliv n-3 LC-PUFA na hladiny glukózy a inzulínu ve stavu na lačno.....	63
10	Diskuse	65
11	Závěry	69
12	Seznam obrázků a tabulek	70
13	Použitá literatura	73

2 Abstrakt

Příjem polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem řady n-3 (n-3 LC-PUFA), konkrétně kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) má hypolipidemický účinek a působí preventivně proti rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Jedním z hlavních cílů n-3 LC-PUFA je tuková tkáň, kde aktivují tzv. „metabolické přeprogramování“ vedoucí ke zlepšení lipidového a glukózového metabolismu. V této práci nahrazení části tuků n-3 LC-PUFA snižuje hladiny volných mastných kyselin, akumulaci triacylglycerolů v játrech a zlepšuje systémovou citlivost k inzulínu u myši krmených vysokotukovou dietou. Také bylo pozorováno mírné snížení objemu β -buněk a méně nefunkčních β -buněk při příjmu n-3 LC-PUFA.

Inkretinové hormony jsou sekretovány ze střevních buněk v odpověď na příjem potravy a zesilují glukózou stimulovanou sekreci inzulínu. Tato práce také vyhodnocovala vliv n-3 LC-PUFA v dietě na sekreci inzulínu indukovanou po intraperitoneálním nebo orálním podání glukózy. Výsledky ukázaly, že n-3 LC-PUFA usnadňují vstřebávání glukózy do tkání v odpověď na její orální podání, a že tento efekt lze přičíst vyšší sekreci inzulínu v porovnání s intraperitoneálním podáním glukózy. Tyto výsledky naznačují, že zvýšení sekrece inkretinů při chronickém podávání n-3 LC-PUFA může být odpovědné za zlepšení glukózového metabolismu po podání glukózy.

Dietary intake of long-chain polyunsaturated fatty acids of n-3 series (n-3 LC-PUFA), especially eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), exert hypolipidemic effect and prevent cardiovascular disease. One of the main targets of n-3 LC-PUFA is adipose tissue, where they activate so called „metabolic switch“, resulting in an improvement of lipid and glucose metabolism. In this report, n-3 LC-PUFA supplementation decreased plasma levels of free fatty acids, accumulation of triacylglyceroles in the liver and improved systemic insulin sensitivity in mice fed a high fat diet. There was also a slight decrease in the β -cell mass and lower dysfunction of β -cells in response to n-3 LC-PUFA feeding.

Incretin hormones are secreted from an intestinal cells in response to the ingestion of food, while they also enhance glucose-stimulated insulin secretion. This thesis also analyzed the effect of dietary n-3 LC-PUFA on insulin secretion induced either by the intraperitoneal or oral administration of glucose. The results demonstrated that n-3 LC-PUFA facilitate glucose clearance in response to its oral administration, an effect that is attributable to increased insulin secretion as compared to the effect of intraperitoneal glucose administration. These results suggest that elevated incretin secretion in response to chronic dietary consumption on n-3 LC-PUFA might be responsible for the improved glucose metabolism after glucose administration.

3 Klíčová slova

inzulínová rezistence, obezita, tuková tkáň, triacylglyceroly, β -buňky, inkretiny, glukagonu podobný peptid 1, dipeptidylpeptidáza IV, polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem řady n-3, kyselina eikosapentaenová, kyselina dokosaheptaenová, orální podání glukózy

4 Seznam zkratek

AA	kyselina arachidonová (arachidonic acid)
AC	adenylát cykláza (adenylate cyclase)
ACC	acetyl-koenzym A karboxyláza (acetyl coenzyme A carboxylase)
acyl-CoA	acyl koenzym A (acyl coenzym A)
Akt	protein kináza B (protein kinase B)
ALA	kyselina α -linolenová (α -linolenic acid)
AMP	adenosin monofosfát (adenosine monophosphate)
AMPK	AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMP-activated protein kinase)
AOX	acyl-CoA oxidáza (acyl-CoA oxidase)
ATP	adenosin trifosfát (adenosin triphosphate)
BMI	body mass index
cAMP	cyklický adenosin monofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
cAMP-GEF II	cAMP-regulovaný guanine-nukleotidový výměnný factor II (cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II)
CLS	koruně-podobná struktura (crown like structure)
COX	cyklooxygenáza (cyclooxygenase)
cPDH	komplex pyruvát dehydrogenázy (pyruvate dehydrogenase complex)
CPT1	karnitin-palmitoyl transferáza 1 (carnitine palmitoyltransferase 1)
DAG	diacylglycerol
DHA	kyselina dokosaheptaenová (docosahexaenoic acid)
DPP IV	dipeptidyl-peptidáza IV (dipeptidyl-peptidase IV)
EPA	kyselina eikosapentaenová (eicosapentaenoic acid)
ER	endoplazmatické retikulum (endoplasmic retikulum)
FAS	syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)
G6Pase	glukóza-6-fosfatáza (glucose-6-phosphatase)
GIP	glukózo-dependentní insulintropický polypeptid (glucose-dependent insulinotropic polypeptide) / žaludeční inhibující polypeptid (gastric inhibitory polypeptide)
GLP-1	glukagonu podobný peptid-1 (glucagon-like peptide-1)
GLP-1R	GLP-1 receptor
GLUT-2, GLUT-4	glukózový transporter 2, 4 (glucose transporter)
GRP40, GRP120	receptory spřažené s G-proteiny (GPCR – G-protein coupled receptor)
GS	glykogensyntáza (glykogensynthase)
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (high-density lipoprotein)
HIF-1 α	hypoxií indukovaný faktor 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α)
HLS	hormon-senzitivní lipáza (hormone sensitive lipase)
IL-6, IL-12	interleukin 6, 12

IR	inzulínová rezistence (insulin resistance)
IRS	substráty inzulínového receptoru (insulin receptor substrate proteins)
K _{ATP} -kanál	ATP-dependentní draslíkový kanál (ATP-dependent potassium channel)
LA	kyselina linolová (linoleic acid)
LC-ACoA	acyl-CoA s dlouhým řetězcem (long-chain Acyl-coenzym A)
LOX	lipooxygenáza (lipooxygenase)
LPL	lipoprotein lipáza (lipoprotein lipase)
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinová kináza (mitogen-activated protein kinase)
MCP-1	chemotaktický protein monocytů (monocyte chemoattractant protein-1)
MS	metabolický syndrom (metabolic syndrome)
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acids)
n-3 LC-PUFA	polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem řady n-3 (long-chain polyunsaturated fatty acids of n-3 series)
NEFA	neesterifikované mastné kyseliny (non-esterified fatty acids)
NO	oxid dusnatý (nitric oxide)
PD1	protektin D1 / neuroprotektin D1
PKA, PKC	fosfoinositid-dependentní kináza 1 a 2 (phosphoinositide-dependent kinase)
PEPCK	fosfoenolpyruvát karboxykináza (phosphoenolpyruvate carboxykinase)
PGC-1 α	PPAR γ koaktivátor 1 α (PPAR γ coactivator 1 α)
PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza (phosphatidylinositol-3 kinase)
PIP ₂	fosfatidylinositol bisfosfát (phosphoinositol biphosphate)
PIP ₃	fosfatidylinositol trifosfát (phosphoinositol triphosphate)
PKA, PKC	protein kináza A, C (protein kinase)
PLA ₂	fosfolipáza A2 (phospholipase A2)
PPAR- γ , PPAR- α	peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor γ , α (peroxisome-proliferator-activated receptor γ , α)
PVAT	perivaskulární tuková tkáň (perivascular adipose tissue)
RIA	(radioimmunoassay)
ROS	reaktivní kyslíkové částice (reactive oxygen species)
RvE1	resolvin E1
SFA	nasyčené mastné kyseliny (saturated fatty acids)
T2DM	diabetes mellitus 2.typu (type 2 diabetes mellitus)
TAG	triacylglycerol
TNF- α	faktor nekrotizující záněty (tumor necrosis factor α)
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou (very low-density lipoprotein)
WAT	bílá tuková tkáň (white adipose tissue)

5 Úvod

Nadměrný příjem vysokoenergetické stravy a nedostatek pohybu představuje v současné době velký problém moderní společnosti. Vede k nadměrné akumulaci tuku, které je spojeno se vznikem obezity a s ní spojených komplikací jako je glukózová intolerance a rozvoj inzulínové rezistence (IR), hypertenze a dyslipidémie, které zvyšují riziko cévních a srdečních chorob, souhrnně označované jako metabolický syndrom (MS). IR patří mezi hlavní složky metabolického syndromu a je mimo jiné způsobena zvýšenou hladinou volných mastných kyselin, které se ukládají v periferních tkáních, ale také zánětlivými cytokiny sekretovanými hypertrofickými adipocyty (buňkami tukové tkáně).

Obezita tedy představuje zdravotní problém, jehož léčba je již dlouhou dobu v popředí zájmu základního i klinického výzkumu. Nejúčinnější ochranou před vznikem obezity a s ní spojenými metabolickými onemocněními představují preventivní opatření. Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem řady n-3 (n-3 LC-PUFA) jsou již dlouhou dobu studovány pro své preventivní působení při vzniku dietou-indukované obezity, diabetes mellitus 2. typu (T2DM) a při rozvoji aterosklerózy, kardiovaskulárních onemocnění a IR.

Na již rozvinutý diabetes byla vyvinuta řada léků, které zvyšují citlivost organismu k inzulínu a snižují hladiny glukózy, ale které jsou také často spojeny s řadou vedlejších komplikací jako je nárůst tělesné hmotnosti, nebo extrémně rychlé snížení hladiny glukózy s rizikem vzniku hypoglykémie. Jako slibný lék se u diabetických pacientů jeví agonisté inkretinových receptorů jako je glukagonu-podobný peptid 1 (GLP-1). Inkretiny jsou sekretovány ve střevě po orálním příjmu nutrientů a potencují glukózou-stimulovanou sekreci inzulínu. Jejich účinek je tedy závislý na množství glukózy v krvi, a proto je s jejich podáním spojeno nízké riziko vzniku hypoglykémie na rozdíl od jiných léků

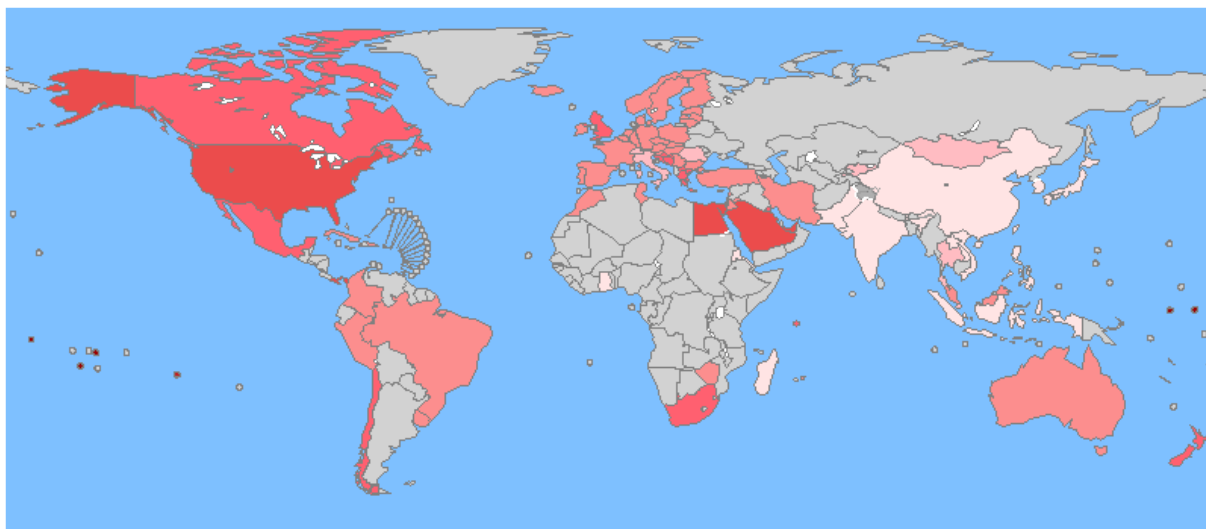
Cílem této práce je ukázat prospěšný vliv n-3 LC-PUFA na metabolismus tukové tkáně a glukózovou homeostázu a demonstrovat možnou úlohu inkretinů v benefičním účinku dlouhodobého podávání n-3 LC-PUFA na glukózovou homeostázu.

6 Teoretická část

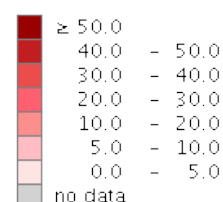
6.1 Obezita

Obezita se stává celosvětovým problémem. Trpí jí stále větší procento populace nejen v rozvinutých zemích, ale v poslední době také v zemích rozvojových, jak je vidět na obr.1. Obezita přitom představuje zvýšené riziko vzniku metabolických onemocnění jako IR, dyslipidémie a hypertenze. Tato onemocnění jsou společně nazývána metabolický syndrom, který je někdy označován také jako syndrom inzulínové rezistence. Tento syndrom se objevuje i u nediabetické populace a představuje soubor klinických, biochemických a humorálních poruch, které vznikají v souvislosti s poruchou účinku inzulínu v glukózovém metabolismu. Také je prokázán úzký vztah mezi obezitou a dalšími chronickými onemocněními jako jsou srdeční a cévní choroby, nádorová onemocnění, ale také krátké poruchy dýchání během spánku (spánková apnoe) a degenerativní onemocnění pohybového aparátu v důsledku jeho přetěžování.

O obezitě mluvíme při body mass indexu (BMI) vyšším než 30 kg/m^2 . Hodnota BMI je obvykle pozitivně asociována s rizikem rozvoje diabetes mellitus 2.typu a infarktem myokardu. Obézní lidé umírají předčasně až 3x pravděpodobněji než hubení jedinci a to zejména kvůli těmto dvěma komplikacím. BMI ale nevyjadřuje podíl tuku a ostatní tělesné hmoty. Například ženy mají vyšší podíl tuků než muži, nebo sportovci s vysokým podílem svalové hmoty mají vyšší BMI a rozdíly jsou i mezi jednotlivými populacemi. Přesto je BMI důležitým měřítkem stanoveným Světovou zdravotnickou organizací, podle kterého se dají ve většině případů určit zdravotní rizika spojená s obezitou.



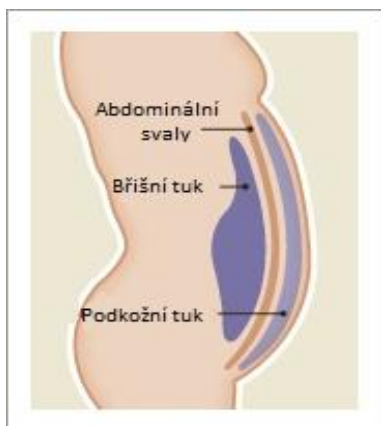
Obr.1. Procenta obézních jedinců (BMI ≥ 30) v populaci jednotlivých států světa



(převzato z www.who.int)

Obvykle rozlišujeme 2 typy obezity – v prvním méně závažném případě se tuk ukládá do podkožních oblastí, druhý typ obezity se někdy nazývá centrální (viscerální) a je charakterizován ukládáním tuku v abdominální oblasti (obr.2). Tento typ nejvíce přispívá k rozvoji MS, který byl Mezinárodní diabetologickou federací definován jako spojení centrální obezity a nejméně dvou dalších faktorů (Kopelman 2000), mezi které patří:

- centrální obezita - obvod pasu: muži > 94 cm, ženy > 80 cm (hodnoty pro evropské etnikum)
- hypertriglyceridémie - koncentrace TAG v plazmě > 150 mg/dl (1,7 mmol/l)
- nízká koncentrace HDL cholesterolu – muži < 40 mg/dl (1,03 mmol/l), ženy < 50 mg/dl (1,29 mmol/l)
- hypertenze – systolický tlak krve > 130 mm Hg, diastolický TK > 85 mm Hg
- glykémie na lačno – konc. glukózy > 100 mg/dl (5,6 mmol/l)



Obr.2. Uložení tuku v oblasti břicha

Tuk se u lidí ukládá jednak do podkožních oblastí, což je spojeno s nižším rizikem vzniku metabolického syndromu a jednak v břišní dutině, kde obklopuje vnitřní orgány a přispívá k rozvoji metabolického syndromu.

(upraveno z <http://drpinna.com/visceral-fat-9928>)

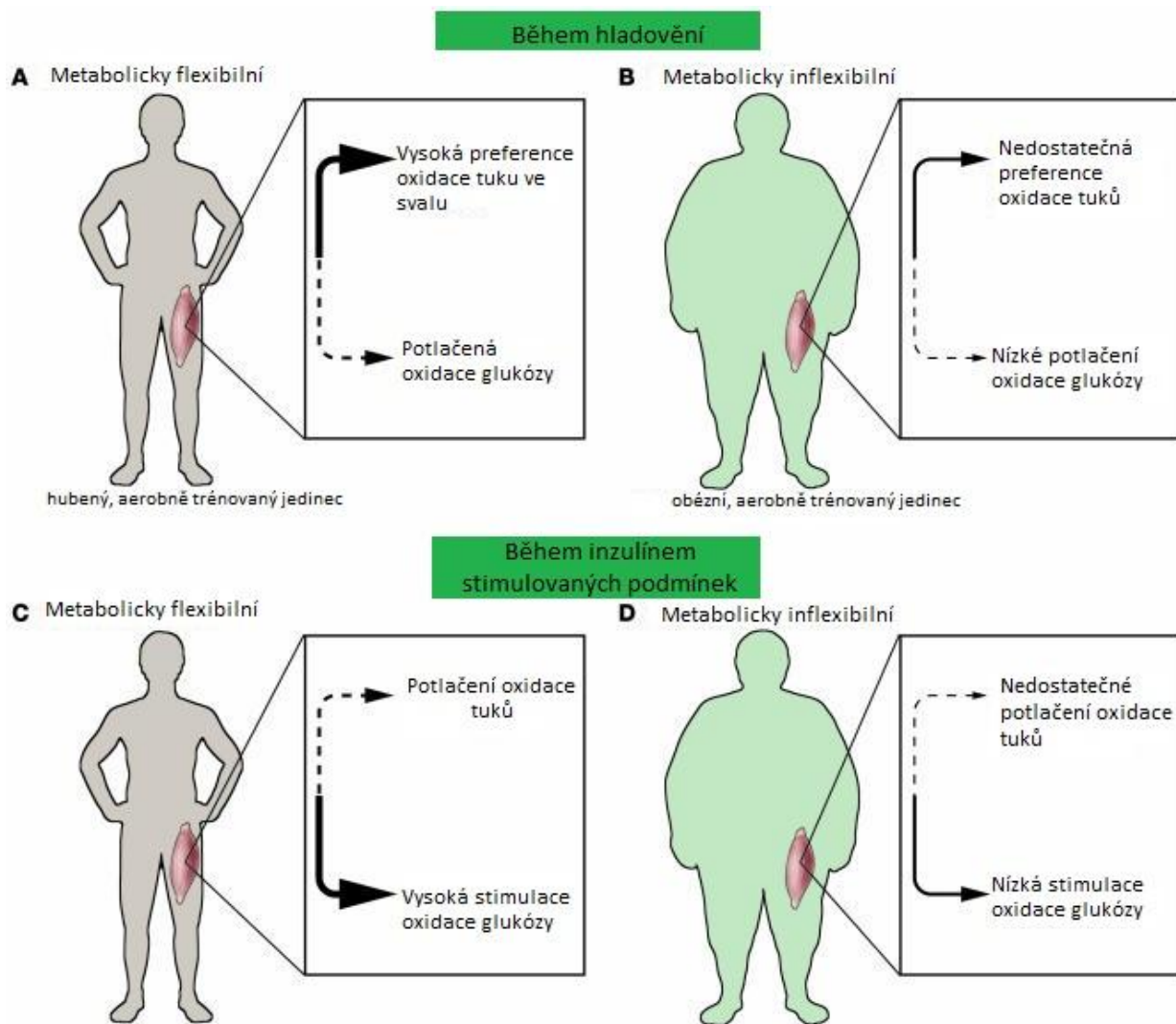
6.2 Metabolická flexibilita

Organismus živočichů se musí umět adaptovat na různé nutriční stavy. To znamená mít schopnost skladovat přijaté živiny po příjmu potravy a následně je využít v době hladovění. V době hladovění kosterní sval oxiduje lipidy (obr.3-A), zatímco po příjmu potravy, kdy se zvýší hladina glukózy v krvi, je přednostně využívána jako energetický substrát glukóza (obr.3-C).

Schopnost metabolizovat rozdílné energetické substráty v závislosti na nutričním stavu se nazývá „metabolická flexibilita“ a její narušení („inflexibilita“) je charakteristickým znakem u jedinců s MS.

Mezi projevy metabolické inflexibility patří jednak narušení výše zmíněných schopností organismu, ale také poškození časně fáze sekrece inzulínu během příjmu potravy a s tím související nedostatečné potlačení jaterní produkce glukózy a uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) z tukové tkáně. Neschopnost zvýšit v kosterním svalu oxidaci mastných kyselin a snížit oxidaci glukózy je při hladovění typická u obézních pacientů i jedinců s IR (obr.3-B) (Storlien, Oakes and Kelley 2003).

Navíc bylo prokázáno, že potlačení oxidace tuků vlivem zvýšení hladiny glukózy je nepřímo asociováno s metabolickou flexibilitou a citlivostí k inzulínu a pozitivně koreluje s množstvím tělesného tuku a hladinou volných mastných kyselin během hladovění (Ukropcova et al. 2005).



(upraveno podle Kelley 2005)

Obr.3. Metabolická flexibilita organismu

Flexibilita svalů souvisí s citlivostí organismu k inzulínu, množstvím tělesného tuku a tělesnou kondicí. Zdraví jedinci se vyznačují schopností oxidovat v době hladovění lipidy, zatímco u obézních dochází k nižšímu využívání lipidů na úkor glukózy. Po stimulaci inzulínem dochází u zdravých jedinců k potlačení oxidace tuků a stimulaci oxidace glukózy, zatímco u obézních jedinců není oxidace tuků dostatečně potlačena, což narušuje utilizaci glukózy.

6.3 Inzulín a inzulínová rezistence

6.3.1 INZULÍNOVÁ REZISTENCE

IR vede ke snížené citlivosti periferních tkání k inzulínu. Definujeme ji jako stav, kdy normální hladina inzulínu vyvolává nižší biologickou odpověď organismu. IR ale nemusí znamenat pouze poruchy v metabolismu glukózy, může se též týkat např. metabolismu tuků nebo bílkovin.

IR se často objevuje i mnoho let před rozvojem diabetu. Ze začátku je IR kompenzována zvýšením produkce inzulínu z β -buněk pankreatu (hyperinzulinémie), ale hladina glukózy se postupně začíná zvyšovat a pokud je tento stav dlouhodobý, dochází k poškození β -buněk. Organismus už nestačí IR kompenzovat, hladina glukózy se dále zvyšuje a dochází k rozvoji T2DM. T2DM je charakterizován vysokou prevalencí vzniku pozdních metabolických komplikací, včetně zvýšeného výskytu kardiovaskulárních onemocnění, nárůstu očních onemocnění, poruch funkce ledvin a vzniku onemocnění tzv. diabetické nohy.

6.3.2 TVORBA INZULÍNU V PANKREATU

Inzulín je hlavním hormonem, který reguluje glukózovou homeostázu a vstup glukózy do buněk. Díky němu je udržována hladina glukózy v krvi v relativně úzkém fyziologickém rozmezí, což je u člověka 4 – 7 mmol/l (Saltiel and Kahn 2001). Inzulín je produkován β -buňkami v pankreatu, který je funkčně rozdělen na dvě hlavní části. Větší část má exokrinní funkci a produkuje směs trávicích enzymů (pankreatická šťáva), které jsou systémem kanálků odváděny do dvanáctníku (duodenum). Endokrinní část pankreatu je organizována do funkčních jednotek zvaných Langerhansovy ostrůvky a představuje pouhých 2% objemu celého orgánu. Ostrůvky obsahují pět typů buněk, které produkují hormony regulující glukózový metabolismus a ovlivňují příjem potravy. α -buňky produkují glukagon, β -buňky inzulín, δ -buňky somatostatin, ϵ -buňky grelin a PP-buňky tvoří pankreatický polypeptid (PP) (Collombat et al. 2010).

Inzulín je syntetizován jako preproinzulín a je následně upraven na proinzulín. Jeho produkce je regulována glukózou na transkripční i posttranskripční úrovni. Stimulace transkripce genu pro inzulín je také mechanismus, kterým ovlivňuje biosyntézu inzulínu inkretinová signalizace (Drucker and Nauck 2006). Konverze proinzulínu na inzulín probíhá v pozdější fázi sekreční dráhy (Docherty and Clark 1994).

β -buňky pankreatu jsou schopné adaptovat se na zvýšenou potřebu inzulínu během rozvíjející se IR. Pankreas je schopen produkovat čtyřikrát až pětkrát víc inzulínu než u jedinců s normální citlivostí k inzulínu, zatímco celkový objem β -buněk se zvýší pouze o 50 % (Butler et al. 2003). Také u myši s indukovanou obezitou a IR bylo pozorováno zvětšení Langerhansových ostrůvků.

Došlo zejména ke zvýšení počtu β -buněk spíše než k jejich zvětšení nebo k tvorbě nových ostrůvků (Hull et al. 2005).

Adaptace β -buněk pak vede k tomu, že pouze u 20% obézních jedinců se rozvine T2DM. Zbýlých 80% jedinců je sice rezistentní k inzulinu, ale jsou schopni vyšší sekrece inzulinu, což naznačuje genetické predispozice pro dysfunkci β -buněk (Boden and Shulman 2002).

6.3.3 REGULACE SEKRECE INZULÍNU

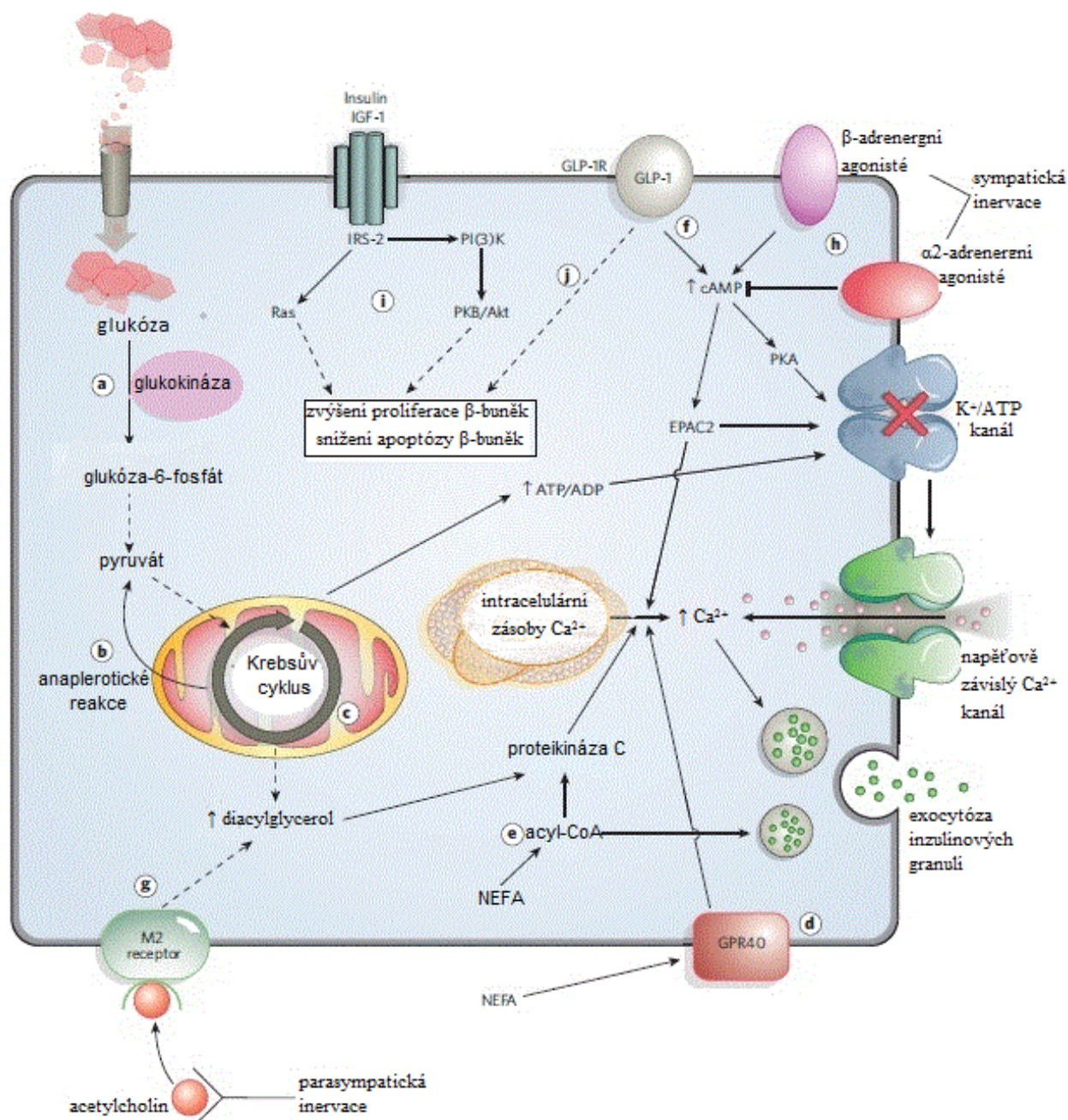
Sekrece inzulinu je regulována několika mechanismy, které jsou shrnuty na obr.4. Hlavním mechanismem je regulace množstvím glukózy v krvi. Ta je transportována do β -buněk prostřednictvím glukózového transporteru 2 (GLUT-2), kde je glukokinázou fosforylována na glukóza-6-fosfát. Ten je následně metabolizován na pyruvát a vstupuje do Krebsova cyklu, kde je dále metabolizován za vzniku adenosin trifosfátu (ATP). Zvýšené množství ATP v buňce vede k uzavření ATP-dependentních draslíkových kanálů (K_{ATP} -kanál), draslík se hromadí v buňce, až dojde k depolarizaci membrány a otevření napětově závislých kanálů pro vápenaté kationty. Jejich vtok do buňky spustí splývání inzulinových sekrečních váčků s membránou a sekreci inzulinu do krevního oběhu (Newgard and McGarry 1995).

Uvolňování inzulinu je regulováno také zpětnovazebnou smyčkou mezi tkáněmi citlivými k inzulinu a β -buňkami (Kahn et al. 1993).

Také NEFA jsou důležité pro funkci β -buněk jakožto důležitý zdroj energie. Podporují sekreci inzulinu, který je uvolňován v odpovědi na stimulaci glukózou, takže zvýšená hladina glukózy sama o sobě možná nehraje hlavní roli v adaptaci β -buněk při snížené citlivosti k inzulinu. Některé studie naznačují, že to může být způsobeno uvolňováním NEFA v průběhu noci. Jejich působení na β -buňky je zprostředkováno dvěma možnými mechanismy. Prvním je vazba NEFA na receptor spojený s G-proteiny (GPR40) na membráně β -buněk, což vede k aktivaci intracelulární signalizace a uvolnění vápenatých kationtů (Ca^{2+}) z intracelulárních zásob, které způsobí splývání inzulinových sekrečních granulí (Itoh et al. 2003). Druhou možností je tvorba acyl koenzymu A (acyl-CoA), který zvyšuje sekreci inzulinu jednak přímo stimulací sekrečních granulí a jednak aktivuje protein kinázu C (PKC), která spouští uvolňování intracelulárních zásob Ca^{2+} (Prentki et al. 2002).

Dalším možným mechanismem regulace sekrece inzulinu je zvýšená senzitivita k inkretinovým hormonům, které zesilují inzulinovou odpověď po orálním příjmu glukózy. Inkretiny a jejich působení bude podrobněji probráno v kapitole 6.4.

Značná inervace ostrůvků pankreatu nervovými vlákny sympatiku a parasympatiku, které se účastní regulace metabolismu, naznačuje možnou důležitou roli centrální nervové soustavy v adaptaci na snížení citlivosti organismu k inzulínu. Aktivace sympatického nervového systému vede ke snížení sekrece inzulínu, zatímco parasympatikus jeho uvolňování zvyšuje. Zvýšená sekrece inzulínu byla např. pozorována po experimentální lézi ventromediálního hypotalamu (centrum sytosti) (Kahn, Hull and Utzschneider 2006).



(upraveno podle Kahn et al. 2006)

Obr.4. Mechanismy adaptace β -buněk na sníženou citlivost organismu k inzulínu

a) Základním mechanismem je glukózou stimulovaná sekrece inzulínu. Zvýšení poměru ATP:ADP vede k depolarizaci membrány a vstupu Ca^{2+} , který způsobí vylití inzulínových sekrečních granulí + **b)** Anaplerotické reakce, které doplňují intermediáty Krebsova cyklu.

c) Glukóza také zvyšuje hladinu citrátu a následně malonyl-CoA, který zvyšuje hladiny LC-acyl-CoA, DAG a tak aktivuje PKC a spouští sekreci inzulínu přes výlev Ca^{2+} .

NEFA zesilují uvolňování inzulínu přes receptor GRP40 (**d**), nebo přes tvorbu acyl-CoA, který aktivuje PKC i přímo stimuluje sekreci inzulínových granulí (**e**).

f) GLP-1 stimuluje sekreci inzulínu přes GLP-1R a tvorbu cAMP.

g) Acetylcholin parasymptatiku stimuluje sekreci inzulínu přes dráhu DAG a PKC.

h) Sympatický nervový systém inzulínovou sekreci stimuluje přes β -AR a naopak inhibuje přes α 2-AR - působí na adenylyl cyklázu a zvyšuje resp. snižuje tvorbu cAMP.

Signální kaskáda inzulínového receptoru (**i**) a GLP-1 receptoru (**j**) pozitivně ovlivňuje proliferaci β -buněk a inhibuje jejich apoptózu.

acyl-CoA – acyl-koenzym A, DAG – diacylglycerol, PKA, PKC – proteinkináza A, C, NEFA - neesterifikované mastné kyseliny, GLP-1 – glukagonu podobný peptid 1, GLP-1R – GLP-1 receptor, cAMP – cyklický adenosin monofosfát, IRS-2 – substrát inzulínového receptoru 2, PI3K - fosfatidylinositol-3 kináza

6.3.4 INZULÍNOVÁ SIGNÁLNÍ KASKÁDA

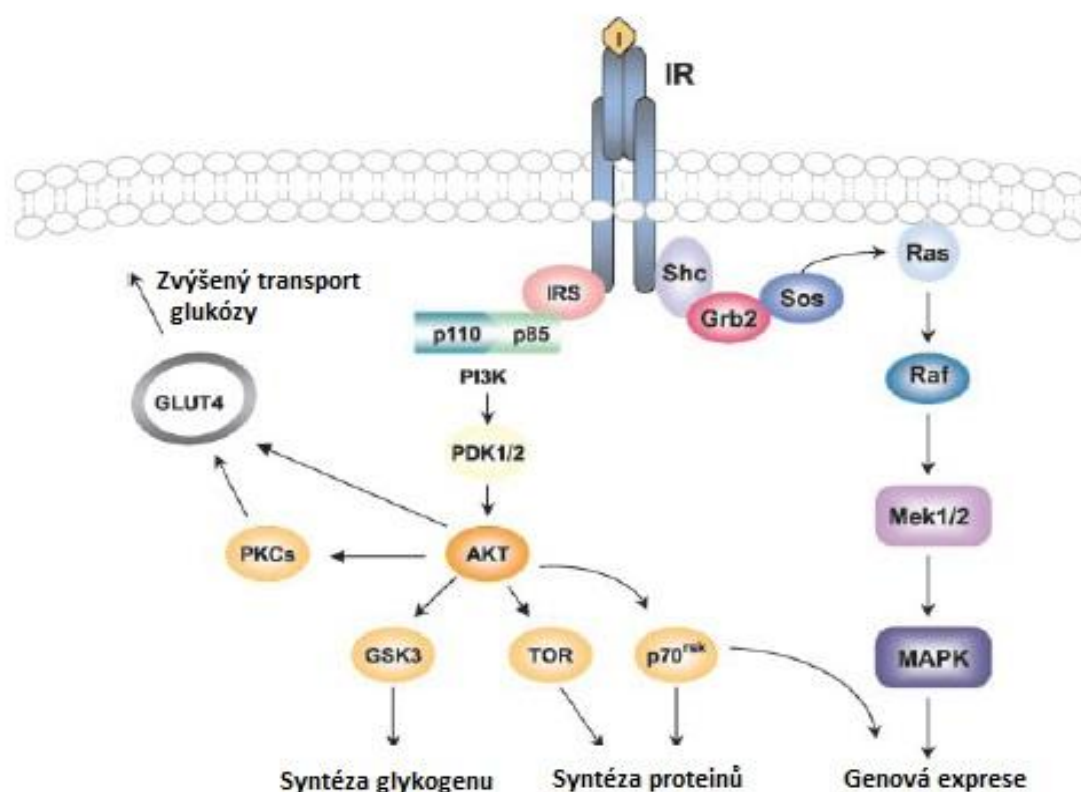
Inzulín reguluje glukózovou homeostázu na různých úrovních. Snižuje hladinu glukózy v krvi tak, že podporuje vstup glukózy do svalu a tukové tkáně a inhibuje jaterní produkci glukózy. Inzulín také ovlivňuje ukládání glukózy ve tkáních ve formě glykogenu. Také stimuluje buněčný růst a diferenciaci buněk, lipogenezi a syntézu proteinů, zatímco inhibuje lipolýzu, glykogenolýzu a degradaci proteinů (Saltiel and Kahn 2001).

Inzulín se v cílové tkáni váže na svůj receptor a spouští inzulínovou signální kaskádu (obr.5). Inzulínový receptor je tetramerní protein cytoplazmatické membrány s tyrosinkinásovou aktivitou. Obsahuje dvě transmembránové β -podjednotky spojené disulfidickými můstky a dvě extracelulární α -podjednotky, které váží inzulín.

Navázání inzulínu vyvolá autofosforylaci tyrosinů na β -podjednotkách a aktivaci receptoru. Aktivovaný receptor následně fosforyluje substráty inzulínového receptoru (IRS) a další proteiny, např. protein obsahující homolog Src (Shc). Aktivované IRS fosforylují další komponenty inzulínové signální kaskády, které zprostředkovávají přenos signálu do buňky.

Takto je aktivováno mnoho proteinů, které dále ovlivňují celou řadu procesů včetně genové exprese, syntézy proteinů a glykogenu nebo transport glukózy do buněk.

Mezi nejdůležitější dráhy patří dráha vedoucí přes mitogeny aktivovanou proteinovou kinázu (MAPK), která řídí genovou expresi a zprostředkovává buněčný růst, a dále dráha, která zprostředkovává metabolické účinky inzulínu. Tato dráha vede přes fosfatidylinositol-3 kinázu (PI3K), která vytváří fosfatidylinositol trifosfát (PIP₃). PIP₃ pak aktivuje fosfoinositid-dependentní kinázu 1 a 2 (PDK1 a PDK2), která dále aktivuje protein kinázu B (Akt, protein kinase B) a její dráhy vedoucí k syntéze proteinů a glykogenu, nebo aktivuje PKC a dráhu vedoucí k inkorporaci glukózových transporterů do membrány (Korc 2003).



(upraveno podle Korc 2003)

Obr.5. Inzulínová signální kaskáda

Inzulín se váže na inzulínový receptor, tím dojde k jeho aktivaci a fosforylaci dalších proteinů kaskády, např. substrát inzulínového receptoru (IRS) nebo Shc proteinu. Na fosforylované proteiny nasedají další adaptorové proteiny, které přenáší signál uvnitř buňky a zajišťují jednak regulaci genové exprese prostřednictvím aktivace mitogeny aktivované proteinové kinázy (MAPK) nebo aktivací fosfoinositid-dependentních kináz (PDK), které aktivují řadu dalších kaskád regulujících syntézu proteinů a glykogenu nebo transport glukózy do buněk.

GLUT4 – glukózový transporter 4, AKT – proteinkináza B, PKC – protein kináza C

6.3.5 MECHANISMY INZULÍNOVÉ REZISTENCE

Primární inzulínová rezistence je způsobena genetickými změnami. Mutace v genu pro inzulínový receptor ale nejsou příliš časté. Častější jsou poruchy postreceptorové, tedy defekty v inzulínové signalizaci (Korc 2003).

Mechanismů, které se podílejí na vzniku sekundární IR je celá řada. Kromě humorálních faktorů a fyziologických změn (stárnutí, těhotenství, puberta, stres, hladovění) se uplatňují i změny metabolického charakteru jako hyperglykémie, dyslipidémie, změny v metabolismu lipidů, glukózy a minerálů a zejména ektopické ukládání tuků. Vznik IR může být ovlivněn také hormony tukové tkáně (adipocytokiny).

6.3.5.1 Poruchy inzulínové signální kaskády

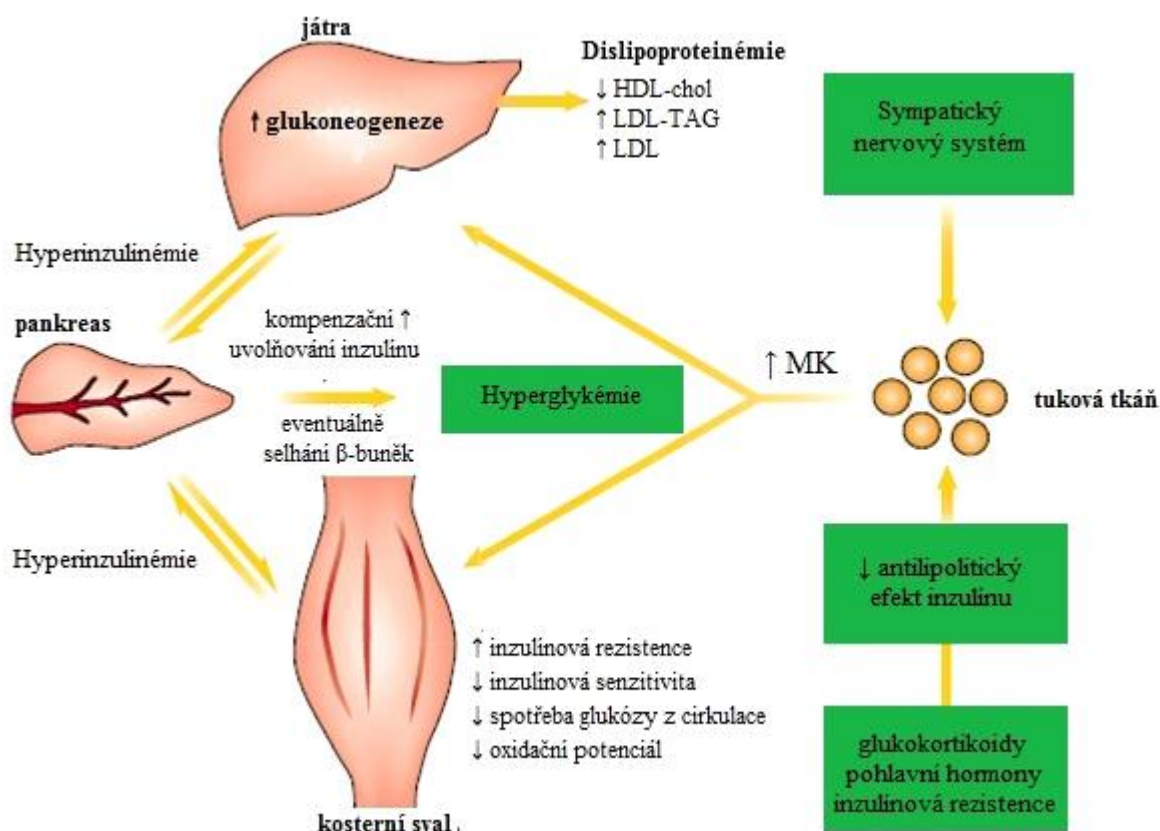
Signalizace může být porušena přímo na úrovni receptoru protein-tyrosinovými fosfatázami, které defosforylují tyrosinové zbytky β -podjednotek nebo naopak fosforylací serinových a treoninových zbytků β -podjednotek. Inzulínový receptor může být blokován také působením protilátek při některých autoimunitních onemocněních (např. lupus erythematodes) nebo může proti účinkům inzulínu působit jiný hormon (např. kortizol u Cushingova syndromu; růstový hormon u pacientů s akromegálií) (Korc 2003).

6.3.5.2 Působení triacylglycerolů

Zvýšená akumulace tuků v tukové tkáni vede ke vzniku hypertrofických adipocytů, které mají sníženou citlivost k působení inzulínu, což vede k nedostatečné inhibici lipolýzy (antilipolytický účinek inzulínu) a adipocyty tak uvolňují zvýšené množství mastných kyselin do oběhu. Důsledky zvýšení hladiny mastných kyselin jsou shrnuty na obr.6.

Hypertrofické adipocyty mají také nedostatečnou pufrovací kapacitu pro NEFA po příjmu potravy. Toto narušení schopnosti skladovat mastné kyseliny vede k jejich vysoké hladině v krvi a může vést k ektopickému ukládání tuků do periferních tkání (játra, kosterní sval, srdce, pankreatické ostrůvky) a vzniku IR v periferních orgánech. Snížená citlivost tkání k inzulínu brání inzulínem-stimulované translokaci glukózového transporteru 4 (GLUT-4) a následnému transportu glukózy do buněk (Boden and Shulman 2002).

Mastné kyseliny také kompetují s glukózou jako zdroj energie ve svalu a v tukové tkáni. Existuje spojení mezi metabolismem glukózy a mastných kyselin, tzv. cyklus glukózy a mastných kyselin. Zvýšení obsahu mastných kyselin ve svalu vede k jejich přednostní oxidaci před glukózou, což má za následek snížení inzulínem stimulovaného vstupu glukózy do buněk a jejího využití (Randle et al. 1963).



(upraveno podle Kopelman 2000)

Obr.6. Vliv nárůstu tukové tkáně na celotělovou citlivost k inzulínu

Zvýšení lipolýzy v tukové tkáni vede k uvolňování mastných kyselin do oběhu. Jejich lipotoxické působení narušuje účinek inzulínu v játrech, kde dochází ke zvýšení glukoneogeneze a uvolňování glukózy do krve. To může vést až k systémové hyperinzulinémii, snížení citlivosti k inzulínu v kosterním svalu a nižšímu vstupu glukózy do svalových buněk. β-buňky pankreatu se snaží sníženou citlivostí k inzulínu kompenzovat zvýšením jeho produkce, ale časem dochází k jejich selhání, hladina glukózy se zvyšuje až dojde k rozvoji T2DM.

6.3.5.3 Vliv hormonů tukové tkáně

Až do devadesátých let se myslelo, že bílá tuková tkáň (WAT) slouží pouze k ukládání energetických zásob a jako izolační vrstva a mechanická ochrana organismu. WAT má ale i endokrinní funkci, produkuje řadu hormonů (adipokinů, adipocytokinů), které ovlivňují citlivost k inzulínu (Torres-Leal et al. 2010).

Adiponektin je adipokin s protizánětlivým a antidiabetickým účinkem. Potlačuje syntézu prozánětlivých cytokinů jako faktor nekrotizující záněty (TNF- α), interleukin 6 a interleukin 12 (IL-6 a IL-12) (Tilg and Moschen 2006). Adiponektin také zvyšuje citlivost organismu k inzulínu tím, že zvyšuje oxidaci mastných kyselin, čímž snižuje obsah triacylglycerolů (TAG)

v játrech a kosterním svalu. Adiponektin zvyšuje i vstup glukózy do svalových buněk nezávisle na inzulínu a potlačuje jaterní produkci glukózy. Jeho hladina je nepřímo úměrná množství tukové tkáně. U obézních jedinců a pacientů s diabetem jsou hladiny nižší v porovnání se zdravými jedinci. Adiponektin také indukuje tvorbu oxidu dusnatého (NO) v endotelu krevních cév (Chen et al. 2003), který aktivuje regulační dráhy mitochondriální biogeneze a pomocí pozitivní zpětnovazebné smyčky reguluje sekreci adiponektinu (Hattori et al. 2005). Působení adiponektinu je zprostředkováno aktivací AMP-aktivované proteinové kinázy (AMPK), konkrétně zvýšením hladiny adenosin monofosfátu (AMP), který pozitivně reguluje aktivitu AMPK (Yamauchi et al. 2002, Daval et al. 2005).

AMPK hraje hlavní roli v energetickém metabolismu a v metabolismu substrátů. Obecně při aktivaci AMPK dochází k inhibici metabolických drah spotřebovávajících ATP a naopak k aktivaci drah, které zajišťují produkci ATP. AMPK snižuje expresi enzymů, které se účastní glukoneogeneze v játrech jako např. fosfoenolpyruvát karboxykináza (PEPCK) nebo glukóza-6-fosfatáza (G6Pase). Dále inhibuje lipogenezi a stimuluje katabolismus mastných kyselin. V kosterním svalu stimuluje β -oxidaci prostřednictvím inhibice acetyl-koenzym A karboxylázy (ACC) a dále stimuluje transport glukózy do svalových buněk nezávisle na inzulínu a indukuje biogenezi mitochondrií. V tukových buňkách AMPK inhibuje syntézu mastných kyselin a lipolýzu (Yamauchi et al. 2002, Daval et al. 2005, Fryer and Carling 2005, Viollet et al. 2009).

Leptin je adipokin, který zvyšuje celotělovou citlivost k inzulínu a hraje hlavní roli v regulaci příjmu potravy a energetického výdeje. Přímou ovlivňuje periferní tkáně jako jsou játra, kosterní sval, tuková tkáň a pankreas, ve kterých stimuluje oxidaci mastných kyselin a snižuje tak obsah TAG ve tkáni (Shimabukuro et al. 1997), zatímco stimuluje vstup glukózy do buněk (Kamohara et al. 1997). Účinky leptinu jsou stejně jako u adiponektinu zprostředkovány AMPK (Minokoshi et al. 2002). Leptin má i neuroendokrinní funkci, působí v centru sytosti v hypotalamu a slouží jako indikátor energetických zásob v organismu. Leptin snižuje chuť k jídlu a urychluje energetický metabolismus. Při jeho nedostatku (např. při hladovění nebo v případě mutací v genu pro leptin) mají jedinci zvýšenou chuť k jídlu. Ale jen malé procento obézních jedinců má poruchu v tvorbě leptinu. Většinou je hladina leptinu při obezitě zvýšena a mluví se o tzv. leptinové rezistenci jako výsledku poruchy v transportu leptinu do mozku, případně poruchy v leptinové signalizaci v hypotalamu (El-Haschimi et al. 2000).

Mezi adipokiny, které citlivost k inzulínu snižují, patří prozánětlivé cytokiny. Ty jsou produkovány zejména v hypertrofických adipocytech v tukové tkáni s rozvinutým zánětem. Patří sem např. TNF- α , IL-6, chemotaktický protein monocytů (MCP-1) a mnoho dalších. V případě výše zmíněných cytokinů byly zjištěny jejich zvýšené hladiny u obézních jedinců.

IL-6 je někdy řazen i mezi protizánětlivé adipokiny. Například při chronickém zánětu má prozánětlivé a inzulín desenzitizující účinky (Torres-Leal et al. 2010).

Mezi nejvýznamnější cytokiny z hlediska zánětlivého účinku patří TNF- α . Je sekretován adipocyty, ale ve větší míře jej produkují hlavně makrofágy. TNF- α zvyšuje lipolýzu v adipocytech zvýšením hladiny cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) a stimulací hormon-senzitivní lipázy (HSL) a následnému zvýšení hladiny NEFA v krvi (Zhang et al. 2002). Dále snižuje expresi peroxizomálními proliferátory aktivovaného receptor γ (PPAR γ), lipoproteinové lipázy (LPL) a GLUT-4, což vede k narušení esterifikace a ukládání mastných kyselin stejně jako k narušení vstupu glukózy do buněk (Guilherme et al. 2008). V játrech TNF- α zvyšuje expresi genů účastnících se *de novo* syntézy cholesterolu a mastných kyselin a snižuje expresi genů účastnících se metabolismu a oxidace mastných kyselin a vstupu glukózy do buněk (Guilherme et al. 2008). Práce Kern et al. (2001) dokazuje, že plazmatické hladiny TNF- α jsou u obézních zvýšeny a jeho exprese koreluje s inzulínovou rezistencí. V souladu s tím bylo prokázáno, že vyřazením genu pro TNF- α nebo TNF- α receptor se snížila hladina cirkulujících NEFA a významně se zlepšila citlivost k inzulínu u myší (Uysal et al. 1997).

6.3.5.4 Záněť v tukové tkáni

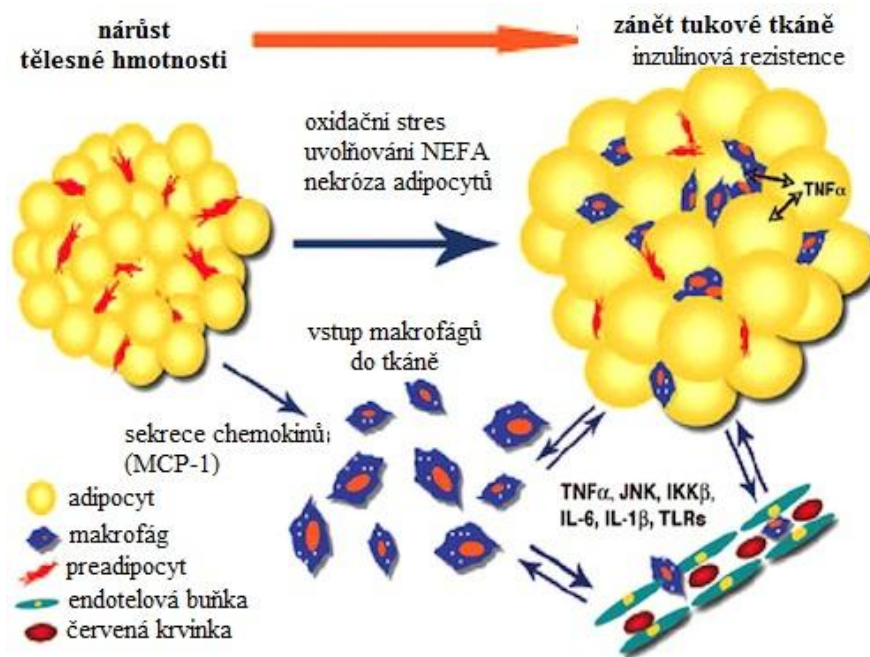
Akumulace tuku během rozvoje obezity způsobuje zvětšení adipocytů (hypertrofie), které je provázeno zvýšením angiogeneze, infiltrací makrofágů, aktivací buněk endotelu a produkcí zánětlivých mediátorů (obr.7). Některé jsou produkovány hypertrofickými adipocyty, jiné makrofágy, kteří infiltrují tukovou tkáň obézních jedinců. Obecně je WAT u obézních jedinců charakterizována určitým stupněm chronického zánětu (Torres-Leal et al. 2010). Nedávné studie ukazují významné zvýšení počtu makrofágů ve WAT u obézních myší. Makrofágy obklopují nekrotické adipocyty a vytváří kolem nich shluk koruně-podobných struktur (CLS), aby se zabránilo toxickému působení tukových kapének po rozpadu buňky (Murano et al. 2008).

Za normálních podmínek jsou v tukové tkáni přítomny buňky regulující imunitní odpověď (B a T lymfocyty). T_H1 buňky produkují prozánětlivé cytokiny a T_H2 představují regulační buňky. U dietou indukované obezity je počet T_H1 výrazně zvýšen, zatímco počet T_H2 buněk je výrazně nižší, což přispívá ke vzniku IR a dalšímu zvýšení prozánětlivých cytokinů (Feuerer et al. 2009). Také NK buňky v cévní vazivové tkáni epididymálního tuku přispívají k zánětu (Caspar-Bauguil et al. 2005). Experimentální stimulace NK buněk vedla ke glukózové intoleranci a infiltraci makrofágů do tkáně (Torres-Leal et al. 2010).

Velký význam v metabolických komplikacích obezity hraje perivaskulární tuková tkáň (PVAT), která obklopuje většinu cév. Sekrece zánětlivých adipokinů vede mimo jiné také k narušení

funkce endotelu, proliferaci buněk hladké svaloviny a jejich migraci, což přispívá ke vzniku aterosklerózy (Rajsheker et al. 2010). PVAT okolo tepének v hladkém svalu sekretuje cytokiny a chemokiny, což vede k infiltraci monocytů a jejich přeměně na makrofágy. Adipocyty potom uvolňují mastné kyseliny a inhibují inzulinovou signální kaskádu. Výsledkem je snížení inzulinem stimulovaného vstupu glukózy do buněk (Yudkin et al. 2005).

Také hypoxie přispívá ke vzniku zánětu v tukové tkáni a je pravděpodobně spojena s IR. Hypoxie inhibuje migraci makrofágů z hypoxické oblasti a indukuje nekrózu adipocytů (Yin et al. 2009). Makrofágy a hypoxické adipocyty produkují zánětlivé cytokiny a mediátory. Hlavním hypoxickým signálním mediátorem je hypoxií indukovaný faktor 1 α (HIF-1 α), který ovlivňuje expresi genů účastnících se zánětu a má řadu dalších funkcí. U obézních myši byl pozorován snížený mezibuněčný parciální tlak kyslíku v tukové tkáni, což souviselo také s nižší produkcí adiponektinu (Ye et al. 2007).



(upraveno z <http://www.nutritionreview.org/wp/2010/11/fatty-liver-and-nash-the-silent-epidemic/>)

Obr.7. Záněť tukové tkáně

Akumulace triacylglycerolů v tukové tkáni a vznik hypertrofických adipocytů vede k chronickému zánětu, produkci faktoru nekrotizujícího zánětu (TNF- α), chemotaktického proteinu monocytů 1 (MCP-1), který atrahuje makrofágy a dalších. Makrofágy produkují další prozánětlivé cytokiny (TNF- α , interleukiny (IL-6, IL-1, atd), které působí na tukovou tkáň a přispívají ke vzniku inzulinové rezistence. TNF- α také zvyšuje lipolýzu, což vede ke zvýšení hladiny cirkulujících NEFA a jejich lipotoxickému působení na ostatní periferní tkáň.

6.3.6 INZULÍNOVÁ REZISTENCE V TUKOVÉ TKÁNI

Adipocyty kromě produkce adipokinů také exprimují receptory pro některé hormony, cytokiny a růstové faktory, díky nimž může tuková tkáň komunikovat s ostatními tkáněmi a orgány, např. s kosterním svalem, endotelem nebo s CNS a účastnit se řízení energetického metabolismu, příjmu potravy atd. (Torres-Leal et al. 2010).

Ukládání mastných kyselin v tukové tkáni umožňuje snížit hladinu NEFA po jídle, ale kontinuální nadměrné ukládání tuků a vznik hypertrofických adipocytů představuje vysoké riziko vzniku IR, T2DM, dyslipidémie, hypertenze a jaterní steatózy (tzv. tučnost jater). Růst tukové tkáně může být způsoben také diferenciací nových adipocytů (hyperplazie), ale u jedinců, u nichž se obezita rozvinula až v dospělosti se jedná zejména hypertrofií adipocytů, zatímco u dětské obezity se jedná jak o hypertrofií adipocytů, tak i jejich zmnožení (Hirsch and Batchelor 1976).

Hypertrofické adipocyty mají narušenou fyziologickou regulaci sekrece adipokinů, neefektivně vychytávají mastné kyseliny z oběhu a zároveň mají sníženou citlivost k inzulínu a v důsledku toho je po jídle nedostatečně inhibována lipolýza. To vede ke zvýšení hladiny NEFA a k ektopickému ukládání mastných kyselin v jiných orgánech jako jsou játra nebo kosterní sval.

6.3.7 INZULÍNOVÁ REZISTENCE V JÁTRECH

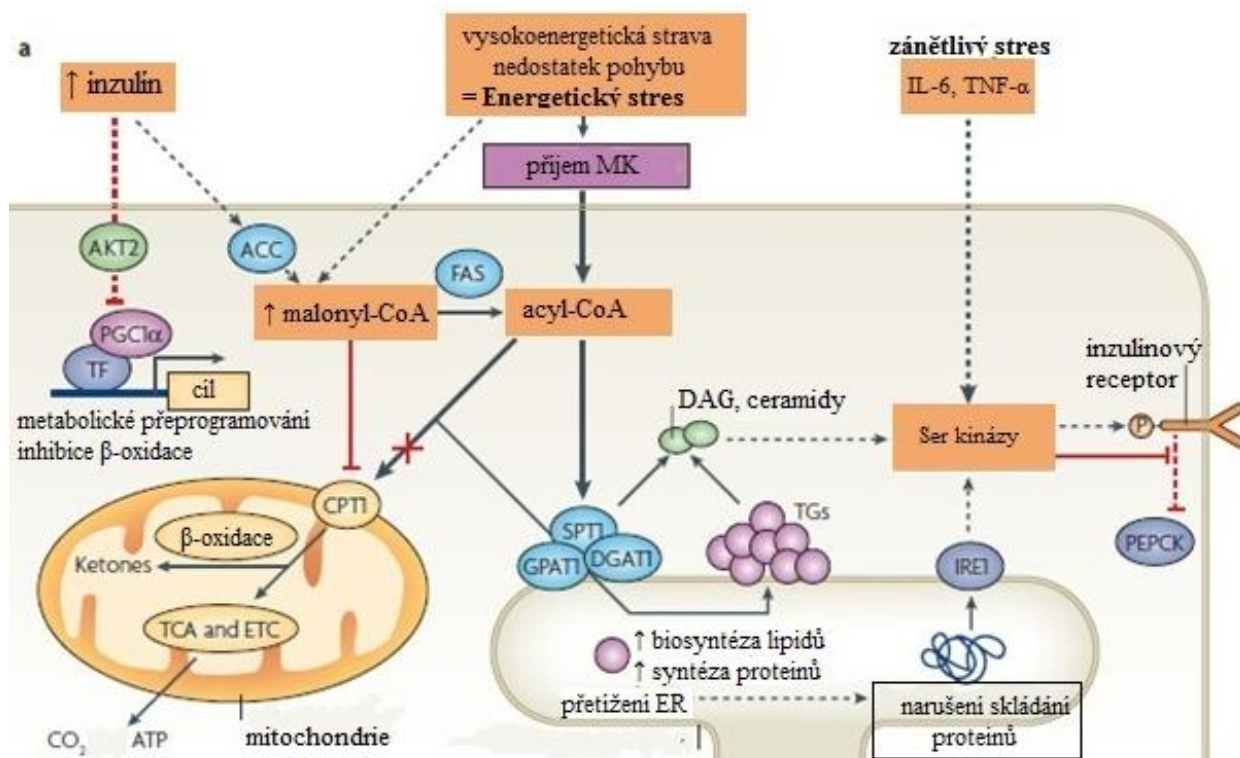
Játra představují centrální metabolický orgán. Probíhá v nich metabolismus sacharidů, lipidů a aminokyselin, udržují stálou hladinu glukózy a sekretují lipoproteiny, které transportují lipidy do organismu. Vznik IR v játrech je shrnut na obr.8.

Vysoká hladina inzulínu vede ke zvýšení aktivity ACC a zvýšení produkce malonyl-CoA, který slouží jako prekurzor *de novo* lipogeneze. Malonyl-CoA také inhibuje karnitin-palmitoyl transferázu 1 (CPT1), která přenáší aktivované mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LC-ACoA) do mitochondrie, kde probíhá jejich oxidace. Zvýšená hladina inzulínu zase inhibuje expresi genů, které se účastní oxidace mastných kyselin. Inhibice CPT1 a β -oxidace spolu s nadbytkem mastných kyselin z krve vede k akumulaci metabolitů mastných kyselin v cytosolu a jejich přeměrování do endoplazmatického retikula, kde jsou zpracovány za vzniku TAG a signálních intermediátů diacylglycerolů (DAG) a ceramidů. Hromaděním TAG ve tkáni dochází ke vzniku jaterní steatózy, onemocnění jater, které často provází obezitu a T2DM.

Nadbytek mastných kyselin silně zatěžuje ER a dochází k narušení správného skládání proteinů. To spolu s akumulací DAG a ceramidů způsobuje stres ER. Tím se aktivují stresem indukované serinové kinázy, které fosforylují serinové zbytky IRS-1/IRS-2 a přerušují tak působení inzulínu

v játrech. To vede k porušení inzulínem stimulovaného potlačení glukoneogeneze, k potlačení syntézy lipidů a zvýšení β -oxidace (Muoio and Newgard 2008).

Akumulace DAG také aktivuje prozánětlivou dráhu transkripčního faktoru NF- κ B, která v játrech vede k syntéze zánětlivých cytokinů (Boden et al. 2005).



(upraveno podle Muoio and Newgard 2008)

Obr.8. Metabolické přetížení v játrech

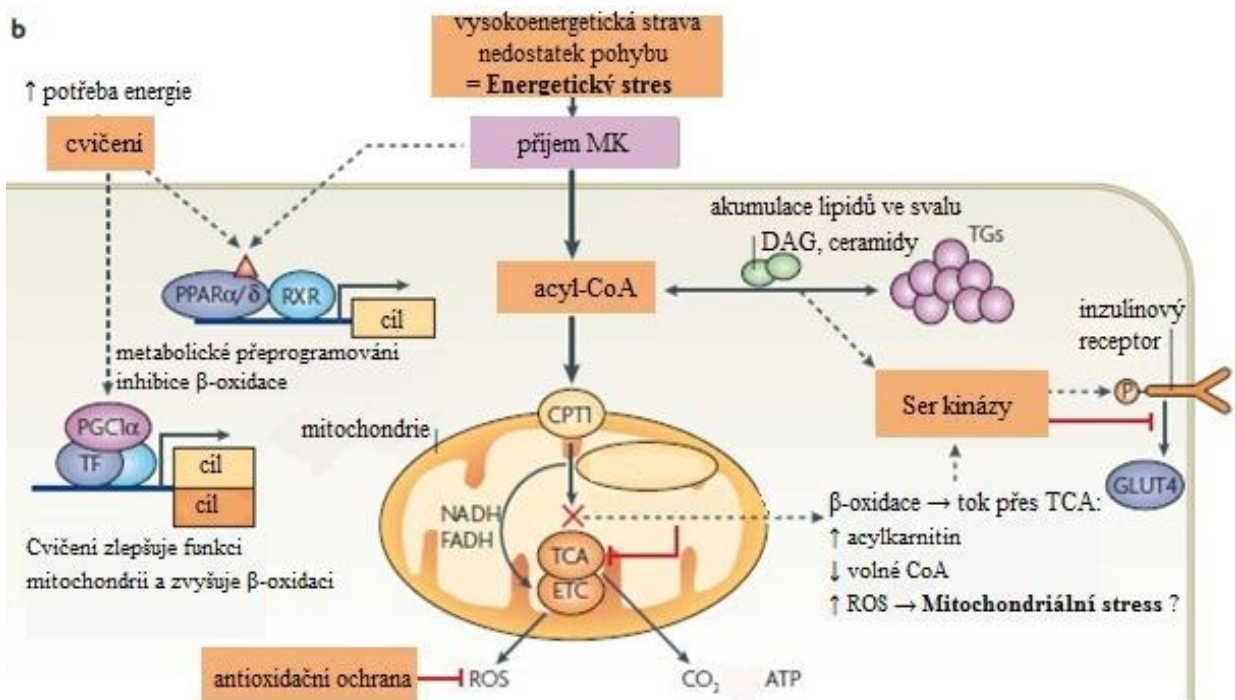
Vysoká hladina inzulínu aktivuje acetyl koenzym A karboxylázu (ACC) a tím zvyšuje tvorbu malonyl-CoA, který se účastní tvorby de novo mastných kyselin a zároveň inhibuje karnitin-palmitoyl transferázu 1 (CPT1). To vede k přesměrování acyl koenzymu A (acyl-CoA) k biosyntetickým enzymům endoplazmatického retikula (ER) (např. GPAT1, DGAT1 a SPT1) a tvorbě TAG, DAG a ceramidů. Přetížení ER vede k narušení skládání proteinů a aktivaci IRE1. Společně tyto mechanismy aktivují stresem indukované serinové kinázy a narušují inzulínovou signální kaskádu.

ACC – acetyl-CoA karboxyláza; CPT1 – karnitin palmitoyltransferáza 1; GPAT1 – glycerol-3-fosfát acyltransferáza 1; DGAT1 – diacylglycerol acyltransferáza 1; SPT1 – serin palmitoyltransferáza 1; IRE1 – inositol vyžadující kináza 1; FAS – syntáza mastných kyselin.

6.3.8 INZULÍNOVÁ REZISTENCE V KOSTERNÍM SVALU

Kosterní sval se podílí víc než 20 % na celkové energetické spotřebě organismu a je hlavním místem inzulínem stimulovaného transportu glukózy a jejího skladování ve formě glykogenu. Metabolické přetížení v kosterním svalu a znik IR v této tkáni je shrnuto na obr.9.

Regulace metabolismu glukózy je propojena s metabolismem dalších substrátů, zejména mastných kyselin, jejichž nadbytek v krvi vede k jejich vstupu do svalu a preferenčnímu využití jako hlavního energetického substrátu. Zvýšení β -oxidace vede ke vzestupu hladin acetyl-CoA a následně i citrátu v buňce. Zvýšení citrátu blokuje komplex pyruvát dehydrogenázy (cPDH) a brání tak vstupu pyruvátu do Krebsova cyklu (D'Alessandro, Chicco and Lombardo 2004). Dochází k hromadění meziproduktů β -oxidace v mitochondrii (např. acylkarnitin, reaktivní kyslíkové částice (ROS)), což aktivuje stresem indukované serinové kinázy a dochází k narušení inzulínové signalizace (Muoio and Newgard 2008). K narušení signalizace navíc přispívá zvýšená tvorba DAG, který aktivuje PKC θ fosforylující serinové zbytky IRS-1 (Yu et al. 2002). Aktivované mastné kyseliny ovlivňují také metabolismus glukózy inhibicí některých enzymů glykolýzy, např. hexokinázy. Glukóza se pak hromadí v buňce a inhibuje translokaci GLUT-4, čímž je zabráněno jejímu transportu z krve a dochází ke vzniku hyperglykémie (D'Alessandro et al. 2004).



(upraveno podle Muoio and Newgard 2008)

Obr.9. Metabolické přetížení v kosterním svalu

Nadbytek volných mastných kyselin vede k jejich vstupu do svalových buněk a aktivaci transkripčního faktoru PPARα/δ, který zvýší expresi genů účastnících se β-oxidace. Zároveň ale nedochází k adekvátnímu zvýšení aktivity následných drah (Krebsův cyklus, dýchací řetězec mitochondrií), což vede k hromadění meziproduktů β-oxidace (acylkarnitin, ROS), k přetížení mitochondrie a aktivaci stresem indukovaných serinových kináz, které naruší inzulínovou signální kaskádu a translokaci GLUT-4.

Cvičení snižuje lipidový stres aktivací transkripčního faktoru PGC1-α, který podporuje vstup substrátů do Krebsova cyklu a tak zlepšuje citlivost k inzulínu.

PPARα/δ – peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor α/δ; PGC1-α - koaktivátor PPARy; TCA - cyklus trikarboxylových kyselin (Krebsův cyklus); ETC – dýchací řetězec mitochondrií, ROS – reaktivní kyslíkové částice

6.4 Inkretiny

Inkretiny jsou peptidové hormony sekretované z endokrinních buněk střevního epitelu v odpověď na příjem potravy. Jejich receptory se nachází na buňkách pankreatických ostrůvků i v dalších tkáních a spolu s glukózou vedou ke stimulaci sekrece inzulínu a zesilují tak jeho endogenní uvolňování. Tomuto zesílení se říká „inkretinový efekt“, který je závislý na množství přijaté glukózy a hraje důležitou roli v systémové homeostáze. Hlavními dvěma inkretinovými hormony jsou glukózo-dependenční insulínotropický polypeptid (GIP) a glukagonu podobný peptid-1 (GLP-1).

Působení GIP a GLP-1 má krátké trvání, protože po uvolnění do cirkulace jsou rychle degradovány dipeptidyl-peptidázou IV (DPP IV). DPP IV odštěpuje 2 aminokyseliny z N-konce polypeptidu a vytvoří tak biologicky neaktivní produkt (Mentlein, Gallwitz and Schmidt 1993).

6.4.1 GLUKÓZO-DEPENDENTNÍ INSULINOTROPICKÝ POLYPEPTID

GIP je sekretovaný z enteroendokrinních K-buněk, které se nacházejí zejména v první (dvanáctník, duodenum) a druhé části tenkého střeva (lačník, jejunum) (Damholt, Kofod and Buchan 1999). GIP byl původně popsán u psů jako žaludeční inhibující peptid, který reguluje sekreci žaludečních kyselin a střevní motilitu (Borwn et al. 1969), ale Nauck et al. (1992) prokázali, že při podání lidského GIP ve fyziologických dávkách neinhibuje u zdravých jedinců sekreci žaludečních kyselin ani v kombinaci s GLP-1. Jeho hlavní účinek je tedy insulínotropický, a proto je vhodnější nově používaný název. Elahi et al. (1979) ukázali, že infuze GIP vede k sekreci inzulínu jen při zvýšení koncentrace glukózy, při hypoglykemických a hyperinsulinemických podmínkách se účinek GIP neprojeví.

GIP ovlivňuje také metabolismu lipidů prostřednictvím stimulace exprese LPL (Kim, Nian and McIntosh 2010) a ukládání mastných kyselin do adipocytů díky stimulaci syntézy mastných kyselin (Oben et al. 1991).

Stejně jako GLP-1 i GIP stimuluje proliferaci β -buněk. GIP s glukózou aktivují signální dráhy a transkripční faktory buněčné proliferace (Trumper et al. 2001). Ale na rozdíl od GLP-1 GIP neinhibuje sekreci glukagonu, ale naopak ji stimuluje (de Heer et al. 2008). Účinek GIP u diabetických pacientů je oslabený a GLP-1 má tedy větší potenciál působení (Nauck et al. 1993).

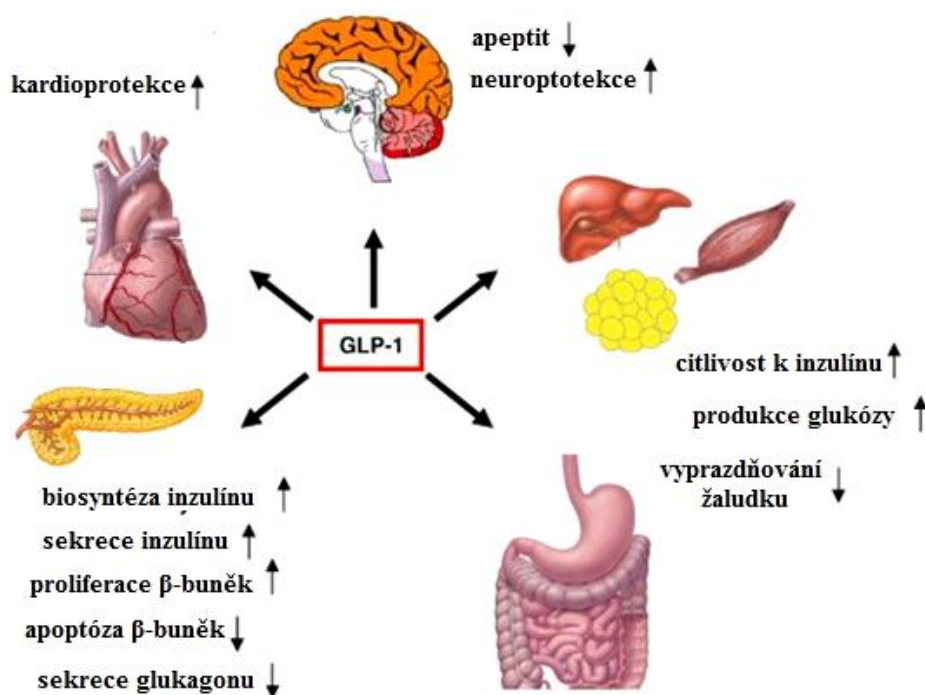
6.4.2 GLUCAGONU PODOBNÝ PEPTID 1

GLP-1 je sekretovaný po příjmu nutrientů z enteroglukagonových buněk (L buňky), zejména v tlustém střevě. Jeho fyziologické účinky jsou shrnuty na obr.10.

Hlavní úlohou GLP-1 v organismu je potenciace glukózou stimulované sekrece inzulínu. GLP-1 také inhibuje sekreci opačně působícího glukagonu (de Heer et al. 2008), zpomaluje vyprazdňování žaludku a uvolňování žaludečních kyselin (Ahren 1998).

Již starší studie ukazují, že při jeho akutním podání dochází ke snížení hladiny glukózy i u pacientů s diabetem 2. typu (Willms et al. 1993). GLP-1 má tedy velký potenciál jako lék na snižování hyperglykémie u pacientů s T2DM. Jeho dlouhodobé podávání (6 týdnů), na rozdíl od GIP, potencuje sekreci inzulínu u pacientů s T2DM a snižuje hladinu glukózy jak po příjmu potravy, tak i na lačno (Zander et al. 2002).

GLP-1 působí také v neuronech hypotalamu a účastní se řízení příjmu potravy (Turton et al. 1996).



(upraveno podle Yu and Jin 2010)

Obr.10. Fyziologické působení GLP-1

GLP-1 zvyšuje citlivost β -buněk k inzulínu, potencuje jeho sekreci a stimuluje také transkripci proinzulínu a biosyntézu inzulínu. GLP-1 navíc ovlivňuje nárůst hmoty β -buněk stimulací jejich proliferace a inhibicí apoptózy. GLP-1 zpomaluje vyprazdňování žaludku a snižuje sekreci opačně působícího glukagonu. Působí také v centrální nervové soustavě (CNS), kde ovlivňuje příjem potravy a účastní se také neuroprotektivních a kardioprotektivních mechanismů.

6.4.2.1 Sekrece GLP-1

GLP-1 je peptid s 30 aminokyselinami a amino skupinou na C-konci. Tvoří se stejně jako glukagon z pre-proglukagonu ve střevních L-buňkách, kde je skladován a připraven k sekreci po aktivaci receptoru GRP120. GRP120 je receptor spřažený s G proteiny, je hojně exprimován ve střevě a jeho ligandem jsou mastné kyseliny, zejména nenasyčené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jako je např. kyselina α -linolenová (α -LA). Naopak mastné kyseliny s řetězcem kratším než 14 uhlíků nejsou schopné receptor aktivovat (Hirasawa et al. 2005).

6.4.2.2 Působení GLP-1 v β -buňkách

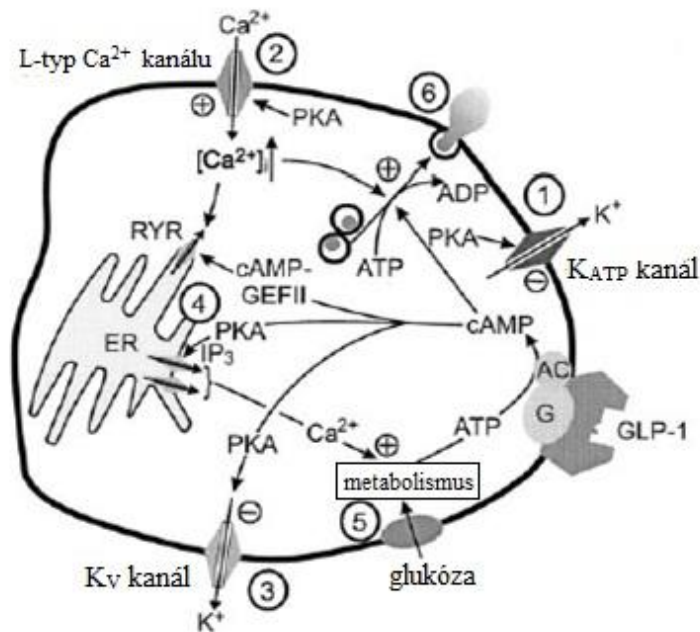
GLP-1 účinkuje prostřednictvím svých receptorů spojených s G-proteiny (GLP-1 receptor, GLP-1R). Potenciace sekrece inzulínu v β -buňkách je shrnuta na obr.11.

Vazba GLP-1 aktivuje adenylát cyklázu (AC), což vede k tvorbě cAMP. V β -buňkách tedy GLP-1 stejně jako glukóza zvyšuje produkci cAMP. AC je možné aktivovat jednak přes G-protein (GLP-1) a jednak kalmodulinem s Ca^{2+} (glukóza). cAMP aktivuje PKA a cAMP-regulovaný guanine nukleotidový výměnný faktor II (cAMP-GEFII). cAMP-GEFII je zodpovědný za výlev Ca^{2+} z intracelulárních zásob a PKA zvyšuje senzitivitu K_{ATP} kanálů k ATP, což vede k jejich zvýšenému zavírání, depolarizaci a vtoku Ca^{2+} (nezávisle na cAMP), vedoucí k sekreci inzulínu (Suga et al. 2000). GLP-1 inhibuje i K_v kanály (napětově závislé) a zvyšuje tak excitabilitu β -buněk i při nižší hladině glukózy, kdy je hladina ADP relativně vyšší (Gromada et al. 2004).

Vyšší sekrece inzulínu u obézních jedinců s IR může být způsobena ovlivněním řady mechanismů, které byly již popsány v kapitole 6.3.3. Pro mechanismus zvýšení citlivosti β -buněk k inkretinům svědčí i fakt, že u obézních jedinců nejsou zvýšeny hladiny GLP-1 (u morbidně obézních jsou dokonce sníženy) a přesto dochází ke zvýšené stimulaci sekrece inzulínu po příjmu potravy (Verdich et al. 2001).

GLP-1 u experimentálních zvířat podporuje růst ostrůvků pankreatu stimulací buněčné proliferace a nárůstu hmoty β -buněk a inhibicí apoptózy (Farilla et al. 2002). Navíc GLP-1 stimuluje transkripci proinzulínu a jeho biosyntézu (Fehmann and Habener 1992).

Yaney et al. (2001) navrhuje možnost účasti GLP-1 na energetické homeostáze prostřednictvím stimulace HSL, kdy cAMP zprostředkovaná lipolytická aktivita vede k produkci volných mastných kyselin, které mohou být dále metabolizovány prostřednictvím mitochondriální oxidace s následnou produkcí ATP.



(upraveno podle Gromada et al. 2004)

Obr.11. Model GLP-1 potencioné sekrece inzulínu

- 1) GLP-1 spolupracuje s glukózou na uzavření K_{ATP} kanálu a tím usnadňuje depolarizaci membrány a elektrickou aktivaci.
- 2) Posun Ca^{2+} kanálu k negativnějším hodnotám usnadňuje akční potenciál (AP). Každý další AP je spojen s vyšším vtokem Ca^{2+} .
- 3) GLP-1 inhibuje K_V kanály a následná depolarizace vede k další stimulaci vstupu Ca^{2+} a tedy Ca^{2+} dependentního výlevu
- 4) Výlev Ca^{2+} z intracelulárních zásob indukovaný jednak cAMP-GEFII a jednak zvýšením koncentrace intracelulárního Ca^{2+} (Ca^{2+} indukovaný výlev Ca^{2+})
- 5) Mobilizace Ca^{2+} aktivuje mitochondriální syntézu ATP, který zavřením K_{ATP} kanálů způsobuje depolarizaci. ATP je také potřeba pro stimulaci výlevu váček s inzulínem.
- 6) Ca^{2+} stimulovaná exocytóza inzulínu podpořená zvýšením cAMP po GLP-1 aktivaci.

6.4.2.3 Léčba diabetu GLP-1 preparáty

Díky svým pozitivním účinkům je GLP-1 v poslední době studován jako možný lék pro léčbu diabetu. Jeho výhodou oproti ostatním lékům používaných k léčbě diabetu je fakt, že jeho účinek je závislý na hladině glukózy, a proto je jeho užívání spojeno s nižším rizikem vzniku hypoglykémie.

Krátkodobé snížení hyperglykémie je možné intravenózní nebo podkožní injekcí GLP-1, ale pro dlouhodobou léčbu diabetu je snazší aktivovat GLP-1R nebo prodloužit působení GLP-1 tím, že se zabrání jeho degradaci v cirkulaci. Bylo vyvinuto několik agonistů GLP-1R (exenatid,

liraglutid), stejně jako inhibitorů DPP IV (vildagliptin, sitagliptin) a dlouho působících agonistů GLP-1R (exenatid s dlouhodobým uvolňováním, GLP-1 vázaný na albumin).

Exendin-4 byl původně objeven v ještěřčím jedu. Je z 53 % totožný s lidským GLP-1 a je rezistentní k degradaci DPP IV. Syntetický Exendin-4 (exenatid) byl vyvinut k léčbě diabetu. V klinických studiích se až u poloviny pacientů vyvinuly protilátky, které však měli většinou slabou afinitu a nízkou koncentraci a neovlivňovali tak antidiabetické působení exenatidu. V porovnání s podáváním inzulínu měl exenatid slabší účinek u pacientů na lačno, ale dokázal účinněji snižovat hladinu glukózy po jídle. Exenatid též způsobuje mírný úbytek tělesné hmotnosti, na rozdíl od inzulínu, který naopak podporuje váhový přírůstek. Exenatid může negativně ovlivnit gastrointestinální trakt a vyvolat pocit nevolnosti nebo průjem, nicméně tyto vedlejší účinky po delším užívání odeznívají. Ve Spojených státech byl schválen jako lék na T2DM v roce 2005, v Evropě získal povolení až v roce 2007.

Liraglutid je další analog GLP-1, který je rezistentní k působení DPP IV. Má delší působení než exenatid, takže stačí jedna injekční aplikace denně. Liraglutid rovněž snižuje hladinu glukózy po jídle a působí preventivně proti nárůstu tělesné hmotnosti.

DPP IV inhibitory snižují aktivitu DPP IV o víc než 80 % a působí až po dobu 24 hodin. Mají stejný účinek na sekreci inzulínu a glukagonu jako GLP-1R agonisté, nicméně nezpomalují vyprazdňování žaludku a nesnižují tělesnou hmotnost. U DPP IV inhibitorů nebyly popsány vedlejší efekty na GIT (Drucker and Nauck 2006)

6.5 Polynenasycené mastné kyseliny řady n-3

Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem řady n-3 (n-3 LC-PUFA) z mořských ryb hrají důležitou úlohu v ochraně organismu před nepříznivými projevy MS. Mají pozitivní vliv na metabolismus lipidů a zabraňují rozvoji aterosklerózy, cévních a srdečních chorob, IR i dietou indukované obezity. Mezi n-3 LC-PUFA patří především kyselina eikosapentaenová (EPA, 20:5 n-3) a dokosahexaenová (DHA, 22:6 n-3). n-3 LC-PUFA působí jako přirozená hypolipidemika, snižují hladinu TAG a LDL cholesterolu, zatímco zvyšují HDL cholesterol v cirkulaci. Brání akumulaci TAG v periferních tkáních, zlepšují glukózový metabolismus a navíc modifikují skladbu mastných kyselin ve fosfolipidech buněčných membrán, a tím ovlivňují inzulínovou signalizaci, aktivitu lipáz a biosyntézu eikosanoidů (Clamp et al. 1997). n-3 LC-PUFA působí v celém organismu, nicméně jedním z hlavních cílových orgánů je tuková tkáň (Lombardo, Hein and Chicco 2007, Flachs et al. 2009).

6.5.1 PŮSOBENÍ n-3 LC-PUFA V TUKOVÉ TKÁNI

Nahrazení mastných kyselin v dietě EPA a DHA působí preventivně proti ukládání tuku v břišní dutině a částečně tedy i proti vzniku obezity a IR (Flachs et al. 2009). n-3 LC-PUFA ovlivňují specificky metabolismus tukové tkáně, jejich účinky jsou shrnuty na obr.12.

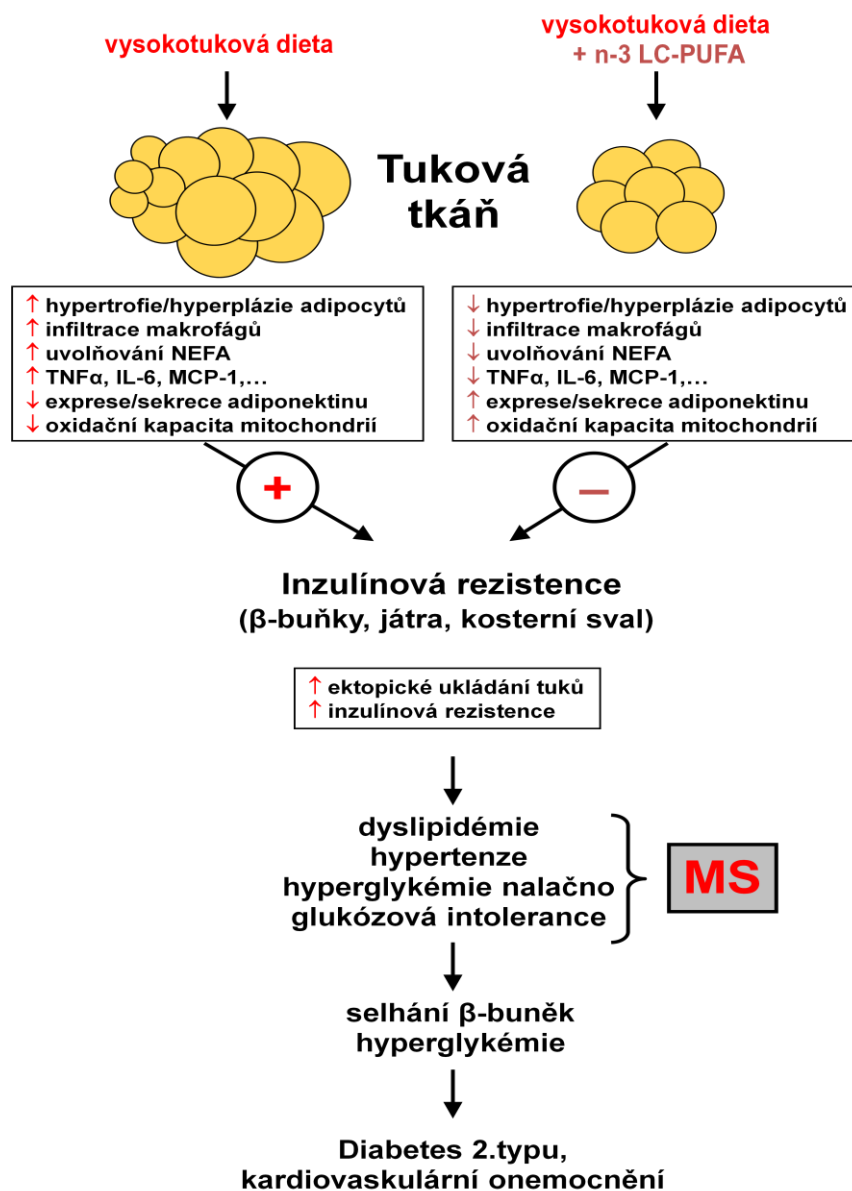
Metabolické efekty n-3 LC-PUFA v tukové tkáni jsou zprostředkovány zejména transkripčními faktory jaderného receptoru PPAR γ a aktivací AMPK. EPA a DHA zvyšují expresi mitochondriálních genů a regulačních faktorů, jako je např. PPAR γ koaktivátor 1 α (PGC-1 α). PGC-1 α aktivuje biogenezi mitochondrií a oxidaci mastných kyselin, čímž brání vzniku hypertrofických adipocytů. n-3 LC-PUFA inhibují diferenciaci adipocytů a snižují expresi enzymů účastnících se lipogeneze a uvolňování mastných kyselin do cirkulace, čímž brání lipotoxickému působení mastných kyselin. Tyto účinky n-3 LC-PUFA jsou dominantní zejména v abdominálním tuku (Flachs et al. 2005).

Použitím koncentrátů s různým poměrem EPA a DHA bylo prokázáno, že za hypolipidemický účinek n-3 LC-PUFA odpovídá zejména EPA a její metabolity, zatímco DHA redukuje tělesnou hmotnost inhibicí diferenciaci nových adipocytů (Flachs et al. 2009).

n-3 LC-PUFA také ovlivňují hladiny adipokinů, které zvyšují citlivost k inzulínu. Nahrazení tuků v dietě rybím olejem zvyšovalo hladinu adiponektinu a leptinu bez změny v jejich genové expresi (Rossi et al. 2005). Nová práce (Tishinsky, Ma and Robinson 2011) demonstruje rozdíl v působení EPA a DHA na adipokiny. DHA působí prostřednictvím aktivace PPAR γ , zatímco EPA ovlivňuje sekreci adiponektinu i přes další, zatím neznámý, mechanismus. Zvýšení hladiny adiponektinu představuje jeden z mechanismů, kterým n-3 LC-PUFA ovlivňují dietou indukovanou IR.

Nahrazení 15 % tuků v dietě koncentrátem EPA/DHA zvyšovalo expresi adiponektinu v epididymálním tuku, nikoli v podkožním tuku (Flachs et al. 2006).

Naopak hladiny zánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1, IL-6, atd), které snižují citlivost k inzulínu, jsou působením n-3 LC-PUFA snižovány (Mullen, Loscher and Roche 2010). Nahrazení části tuků koncentrátem n-3 LC-PUFA bránilo infiltraci makrofágů do tukové tkáně a snižovalo expresi genů zánětlivých faktorů. Zároveň nebylo ovlivněno množství akumulovaného tuku, což dokazuje, že protizánětlivé a anti-obezitní účinky n-3 LC-PUFA jsou na sobě nezávislé (Todoric et al. 2006).



(upraveno podle Flachs et al. 2009)

Obr.12. Benefiční účinky n-3 LC-PUFA na rozvoj obezity a inzulínové rezistence

Vysokotuková dieta vede ke vzniku hypertrofických adipocytů, zánětu tukové tkáně a infiltraci makrofágů. Adipocyty a makrofágy produkují zánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-6, MCP-1) a sekretují menší množství adiponektinu. Hypertrofické adipocyty mají nižší oxidační kapacitu mitochondrií a uvolňují mastné kyseliny do oběhu. Narušení jejich fyziologické funkce vede k nedostatečnému vychytávání mastných kyselin, které se pak ukládají do dalších tkání jako jsou β -buňky pankreatu, játra nebo kosterní sval, kde způsobují vznik inzulínové rezistence. V důsledku těchto změn dochází k rozvoji metabolického syndromu (MS), později až k hyperglykémii, selhání β -buněk a rozvoji diabetu a kardiovaskulárních onemocnění.

Nahrazení části tuků v dietě n-3 LC-PUFA výrazně zlepšuje všechny výše zmíněné negativní projevy nadměrného příjmu vysokoenergetické potravy.

6.5.2 PŮSOBENÍ n-3 LC-PUFA V DALŠÍCH ORGÁNECH

V játrech a kosterním svalu mohou být metabolické účinky n-3 LC-PUFA částečně zprostředkovány AMPK (Jelenik et al. 2010). AMPK zároveň představuje terapeutický cíl pro léčbu T2DM spojeného s obezitou jako je tomu v případě antidiabetických léků jako je metformin a TZD (Moller 2001).

V játrech n-3 LC-PUFA potlačují *de novo* lipogenezi snížením transkripce některých genů jako je syntáza mastných kyselin (FAS) a PDHc, zatímco zvyšují oxidační kapacitu jater stimulací transkripce acyl-CoA oxidázy (AOX) a vstupu mastných kyselin do mitochondrií přes CPT1 (Neschen et al. 2002). n-3 LC-PUFA tak snižují obsah TAG v játrech i v cirkulaci a snižují sekreci VLDL částic. n-3 LC-PUFA zabraňují hromadění tuků a jejich lipotoxickému působení ve tkáních.

Ovlivňují také glukózový metabolismus – zvýšením citlivosti organismu k inzulínu podporují např. vstup glukózy do buněk kosterního svalu stimulací exprese GLUT-4 (Lombardo et al. 2007, Yamauchi et al. 2002).

V pankreatu n-3 LC-PUFA působí příznivě proti akumulaci metabolitů mastných kyselin, které narušují funkci β -buněk. Akumulace TAG v ostrůvcích pankreatu vede k inhibici aktivity komplexu PDH prostřednictvím PDH kinázy, což vede ke snížení oxidace glukózy. Snížení oxidace glukózy, které představuje signál pro syntézu a sekreci inzulínu, nejspíš hraje důležitou roli v abnormální sekreci inzulínu u zvířat na dietě s vysokým obsahem cukrů (Pighin et al. 2003).

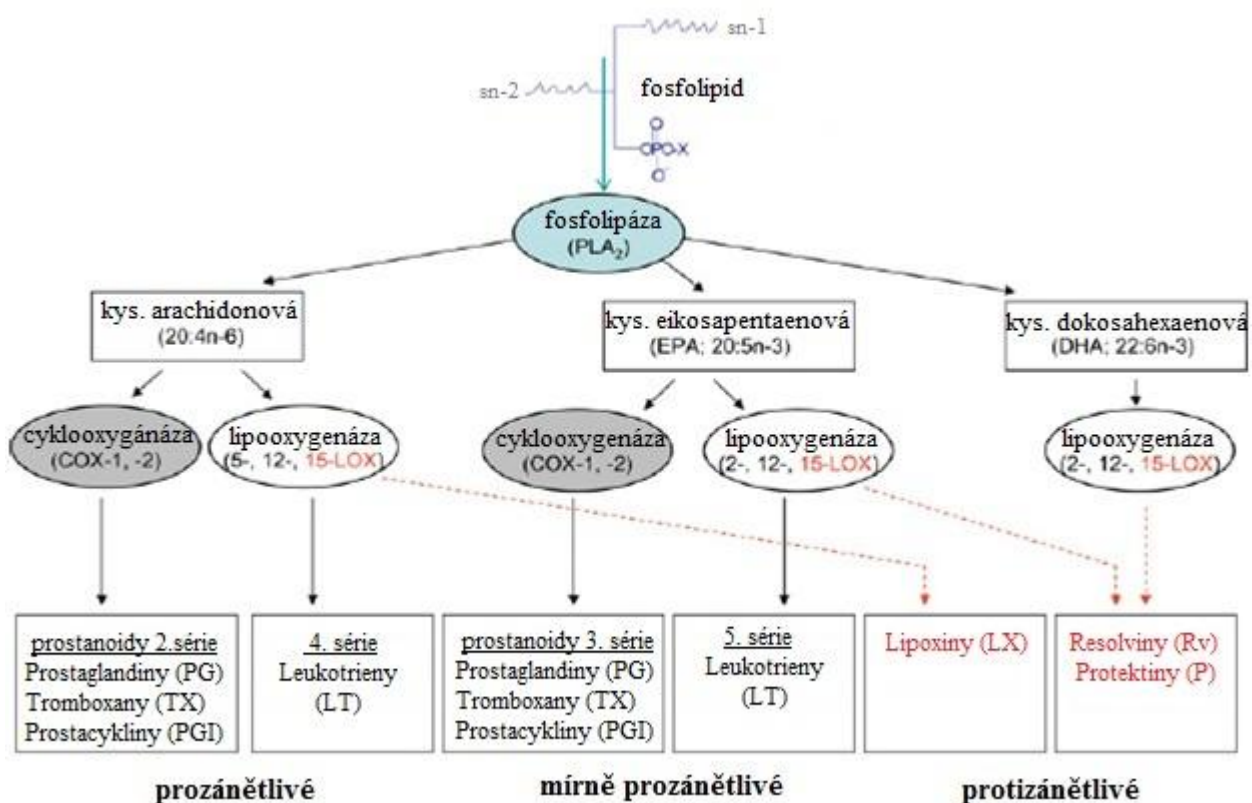
6.5.3 METABOLISMUS LC-PUFA

EPA a DHA jsou esenciální mastné kyseliny, jejichž hlavním zdrojem je mořský fytoplankton. Proto je možno konzumací mořských ryb získat dostatečné množství těchto mastných kyselin. Savci jsou schopni syntetizovat EPA a DHA z prekursoru, kterým je kyselina α -linolenová (ALA, 18:3 n-3) a to pomocí elongace a desaturace uhlovodíkového řetězce. Ale ALA kompetuje o enzym $\Delta 6$ desaturázu s kyselinou linolovou (LA, 18:2 n-6), takže nadbytek LA v potravě negativně ovlivňuje syntézu EPA a DHA z ALA. Nicméně tato syntéza je i bez inhibice velmi pomalá, proto má příjem EPA a DHA význam i při dostatku ALA v potravě.

Většina biologických účinků n-3 LC-PUFA je zprostředkována jejich aktivními metabolity (eikosanoidy). Ty jsou tvořeny po odštěpení EPA nebo kyseliny arachidonové (AA, 20:4 n-6) z pozice sn-2 membránových fosfolipidů působením fosfolipázy A_2 (PLA₂) (obr.13). Eikosanoidy působí autokrinně i parakrinně ve všech tkáních, v imunokompetentních buňkách a krevních destičkách. Syntéza prostaglandinů, tromboxanů a leukotrienů z PUFA závisí na

aktivitě enzymu cyklooxygenázy (COX), o kterou spolu EPA a AA kompetují. Zvýšení příjmu EPA a DHA brzdí syntézu eikosanoidů z AA, které mají prozánětlivé účinky na rozdíl od metabolitů n-3 LC-PUFA, které jsou schopné potlačit zánět v tukové tkáni spojený s obezitou (Flachs et al. 2009).

Naproti tomu enzym lipooxygenáza (LOX) tvoří z EPA lipidový mediátor resolvin E1 (RvE1) a z DHA protektin D1 (PD1), které také působí protizánětlivě, přispívají k regeneraci tkáně a poskytují ochranu před poškozením (Schwab et al. 2007).



(upraveno podle Flachs et al. 2009)

Obr.13. Formace aktivních metabolitů z LC-PUFA

LC-PUFA jsou fosfolipázou A₂ (PLA₂) uvolňovány z membránových fosfolipidů a jsou substrátem pro cyklooxygenázu (COX) nebo lipooxygenázu (LOX), které je metabolizují za vzniku pro- a protizánětlivých mediátorů (prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny).

6.6 Interakce n-3 LC-PUFA a inkretinů

Zpětnovazebné signály z tenkého a tlustého střeva generované při příjmu potravy jsou důležité pro správnou regulaci gastrointestinálních funkcí.

EPA a DHA významně zvyšují hypoglykemický efekt inzulínu, pravděpodobně prostřednictvím ovlivnění endogenní sekrece GLP-1, podobně jako v případě podání ALA (Adachi et al. 2006). U myšího modelu podání EPA nebo DHA do tlustého střeva zvyšovalo hladinu inzulínu rychleji a bylo dosaženo vyšších hodnot ve srovnání s ALA. Účinek EPA a DHA je závislý na dávce mastných kyselin, což naznačuje možnou stimulaci GLP-1 sekrece, která je vyšší u DHA než u EPA. Také byl prokázán jejich místně-specifický účinek. Například při podání do tlustého střeva se stimulovala sekrece GLP-1, zatímco při podání do žaludku nebo do tenkého střeva stimulace sekrece pozorována nebyla a také hladiny inzulínu byly výrazně nižší. Nicméně při podání EPA a DHA do tenkého střeva došlo ke snížení hladiny glukózy bez zvýšení sekrece inzulínu, což naznačuje, že n-3 LC-PUFA zvyšují citlivost organismu k inzulínu (Morishita et al. 2008).

Naopak ve studii na lidech (Robertson et al. 2002) podání diety obohacené o n-3 LC-PUFA v porovnání s nasycenými mastnými kyselinami (SFA), mononenasycenými (MUFA) a n-6 LC-PUFA bylo spojené s pomalejším uvolňováním cholecystokininu a nižšími hladinami GLP-1, a tedy i rychlejším vyprazdňováním žaludku.

Cholecystokinin je uvolňován po příjmu tuků, stimuluje uvolňování žluči do duodena a inhibuje plnění žaludku. Nižší sekrece cholecystokininu v odpověď na podání n-3 LC-PUFA může být způsobena nižší koncentrací TAG v chylomikronech, které řídí jeho uvolňování (Raybould et al. 1998).

Vliv chronického podávání n-3 LC-PUFA na sekreci GLP-1 zatím není dostatečně objasněn, ale dlouhodobé podávání ALA potkanům krmených vysokotukovou dietou signifikantně zvýšilo hladiny GLP-1, což vedlo ke zvýšení sekrece inzulínu a také pozitivně ovlivnilo proliferaci β -buněk (Tanaka et al. 2008).

Oh et al. (2010) demonstrovali protizánětlivé působení EPA a DHA prostřednictvím aktivace receptoru GPR120, který je exprimován nejen ve střevě, kde indukuje sekreci GLP-1, ale také v makrofázích a adipocytech tukové tkáně. EPA a DHA tímto mechanismem potlačují produkci zánětlivých cytokinů a tedy i tvorbu zánětu v tukové tkáni.

7 Cíle diplomové práce

1. Charakterizovat benefiční účinky chronického podávání n-3 LC-PUFA na metabolismus myši krmených vysokotukovou dietou.
2. Charakterizovat vliv n-3 LC-PUFA v dietě na regulaci glukózové homeostázy při orálním a intraperitoneálním podání glukózy.

8 Experimentální část

8.1 Obecné schéma pokusu

Modelový organismus

V pokusech byli použiti samci inbredního myšího kmene C57BL/6J (kmen se sklonem k rozvoji dietou indukované obezity). Myši byly chovány v konvenčním zvěřinci Fyziologického ústavu AV ČR.

Experimentální diety

- standardní laboratorní dieta R/M-H (**STD**); Ssniff Spezialdiäten, Německo
- vysokotuková dieta (**cHF**); dieta byla připravena ve FgÚ AV ČR
 - složení diety (1 kg):
 - 400 g standardní diety
 - 340 g Sunaru
 - 250 g kukuřičného oleje (Oleofarm, Polsko)
 - 10 g kukuřičného škrobu (Maizena)
 - 0,21 g α -tokoferolu
- vysokotuková dieta s 15 % koncentrátem EPA/DHA (**cHF+F**); připravena ve FgÚ AV ČR
 - složení diety (1 kg):
 - 400 g standardní diety
 - 340 g Sunaru
 - 197,5 g kukuřičného oleje (Oleofarm, Polsko)
 - 52,5 g koncentrátem EPAX 1050 TG (EPAX, Lysaker, Norsko)
 - (obsahuje 14% EPA a 46% DHA ve formě TAG, 4 mg/g α -tokoferolu)
 - 10 g kukuřičného škrobu (Maizena)

Tabulka 1. Zastoupení makronutrientů a energetický obsah experimentálních diet

	STD	cHF	cHF+F
Sacharidy (% hm)	55,3	35,4	35,4
Lipidy (% hm)	3,4	35,2	35,2
z toho n-3 LC PUFA (% hm z celkových lipidů)	0	0	15
Proteiny (% hm)	19,3	20,5	20,5
Energetický obsah (kJ/g)	13	22,8	22,8

Tabulka 2. Složení mastných kyselin v experimentálních dietách

Fatty acid (g/100 g)	Chow	cHF	cHF+F
8:0	–	0.33	0.40
10:0	–	0.56	0.59
12:0	0.04	2.15	2.22
14:0	0.15	2.06	2.15
14:1 n-5	–	0.11	0.11
16:0	15.18	13.67	12.77
16:1 n-9	0.05	0.03	0.04
16:1 n-7	0.18	0.27	0.40
18:0	2.54	2.97	3.10
18:1 n-9	16.18	27.10	24.00
18:1 n-7	1.00	0.83	0.85
18:2 n-6	57.78	47.63	40.44
18:3 n-6	–	0.01	0.01
18:3 n-3	6.01	1.71	1.65
18:4 n-3	–	0.05	0.18
20:0	0.17	0.16	0.30
20:1 n-9	0.30	0.12	0.31
20:2 n-6	0.07	0.06	0.11
20:3 n-6	–	–	0.02
20:4 n-6	–	–	0.19
20:3 n-3	–	–	0.03
20:4 n-3	–	–	0.10
20:5 n-3 (EPA)	–	0.02	2.10
22:0	0.18	0.09	0.14
22:1 n-9	0.02	–	0.04
22:4 n-6	–	–	0.03
22:5 n-6	–	–	0.19
22:5 n-3	–	–	0.52
22:6 n-3 (DHA)	–	–	7.11
24:0	0.09	0.05	–
Sum SFA	18.4	22.1	21.6
Sum MUFA	17.8	28.5	25.7
Sum n-6 PUFA	57.9	47.7	41.0
Sum n-3 PUFA	6.0	1.8	11.7

Složení mastných kyselin stanoveno plynovou chromatografií.

(převzato z Kuda et al. 2009)

MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny

SFA – nasycené mastné kyseliny

„ - „ < 0,1 %

Uspořádání experimentu

Pokus probíhal po dobu 10 týdnů. Zvířata byla rozdělena do tří skupin – kontrolní skupina (STD) byla krmena standardní laboratorní dietou, druhá skupina (CHF) byla krmena vysokotukovou dietou za účelem rozvoje dietou indukované obezity, a třetí skupina (CHF+F) byla krmena vysokotukovou dietou s podílem n-3 LC PUFA.

V devátém týdnu pokusu byl u myši proveden glukózový toleranční test (GTT) – u poloviny zvířat byl proveden intraperitoneální glukózový toleranční test (IPGTT), druhá polovina absolvovala orální glukózový toleranční test (OGTT).

V desátém týdnu byl pokus ukončen, myši v éterové narkóze usmrceny a následoval odběr plasmy a tkání.

Podmínky chovu a manipulace se zvířaty

Pokusná zvířata byla chována při teplotě 22°C za standardních světelných podmínek (12 hod světlo : 12 hod tma). Po odstavu od matek byla umístěna do klecí (2 - 4 myši/klec) a krmena standardní laboratorní dietou.

Ve věku tří měsíců byly myši náhodně rozděleny do jednotlivých experimentálních skupin (STD, CHF a CHF+F). Myši měly volný přístup k vodě a potravě. V průběhu experimentu byla myšim každý týden vyměněna podestýlka, každá myš byla zvážena a zaznamenáván váhový přírůstek (na začátku pokusu vážili myši v průměru 25,8 g a mezi skupinami nebyly významné rozdíly).

Dvakrát týdně byla měřena spotřeba diety. Dieta byla zvážena a umístěna do klece a následující den byl zvážen zbytek diety v kleci. Vzhledem k tomu, že myši nebyly chovány samostatně, spotřeba diety na myš byla vypočtena z množství diety vydělené počtem myši v kleci.

Odběr tkání a plazmy

Myši byly usmrceny v etherové narkóze dislokací krční páteře. Krev byla odebrána do mikrokumavek obsahujících 5 μ l 0,5 M EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), aby se zabránilo jejímu srážení. Byla v ní stanovena koncentrace glukózy a následně byla krev stočena na centrifuze (10 min, 7000 ot/min, 4°C) za účelem izolace plasmy, která byla zamražena k pozdější analýze.

Vybrané tkáně byly odebrány, zváženy a okamžitě zamraženy v tekutém dusíku pro pozdější analýzu.

8.2 Metody

8.2.1 GLUKÓZOVÝ TOLERANČNÍ TEST

- Intraperitoneální glukózový toleranční test (IPGTT)
- Orální glukózový toleranční test (OGTT)

Přístroje:

Glukometr OneTouch Ultra + testovací proužky (LifeScan, USA)

Roztoky:

IPGTT: D-glukóza (Sigma-Aldrich, USA); 10 % roztok v H₂O

OGTT: D-glukóza (Sigma-Aldrich, USA); 30 % roztok v H₂O

Postup:

Myši byly večer před měřením odstaveny od potravy. Po celonočním hladovění (cca 15 h) byly myši zváženy a byla změřena hladina glukózy v krvi na lačno. Poté byly myši rozděleny na dvě části podle způsobu podání glukózy. Bylo analyzováno 6 skupin myší: skupina STD, cHF a cHF+F, která absolvovala IPGTT a skupina STD, cHF a cHF+F, která absolvovala OGTT.

Skupině na IPGTT byla intraperitoneální injekcí podána 10 % glukóza v dávce 1mg/g tělesné hmotnosti. Skupině na OGTT byla orálně podána 30% glukóza jako bolus v dávce 150 mg/myš. Hladina glukózy v krvi (glykémie) byla měřena pomocí glukometrů v intervalu 15, 30, 60, 120 a 180 minut po podání glukózy. Glykémie byla změřena z kapky krve, která byla odebrána z nastřiženého konce ocasu.

Myším byl také v průběhu testu odebrán z ocasu vzorek krve na pozdější stanovení hladiny inzulínu v plasmě. Ve stavu na lačno bylo odebráno přibližně 120 µl krve a 30 minut po podání glukózy dalších 80 µl krve do mikrozkrumavek obsahujících 2 µl 0,5M EDTA.

8.2.2 METABOLITY A HORMONY V PLAZMĚ

8.2.2.1 Stanovení triacylglycerolů a cholesterolu

Princip metody:

Reagenty Liquid od firmy BIOLATEST slouží k enzymatickému fotometrickému stanovení triacylglycerolů nebo cholesterolu v plasmě.

Triacylglyceroly ve vzorku jsou rozloženy lipázou (LPL) na glycerol a volné mastné kyseliny. Glycerol je v přítomnosti glycerolkinázy (GK) fosforylován a vzniklý glycerol-3-fosfát je oxidován glycerolfosfát-oxidázou (GPO) na dihydroxyacetonfosfát a peroxid vodíku (H₂O₂).

Vzniklý peroxid reaguje s 4-aminoantipyrinem a 4-chlorofenolem za vzniku chinon-iminového barviva, které se kolorimetricky stanovuje při vlnové délce 500 nm.

Schéma reakce:

TAGs → glycerol + FFAs

Glycerol + ATP → glycerol-3-P + ADP

Glycerol-3-P + O₂ → Dihydroxyacetonfosfát + H₂O₂

H₂O₂ + 4-aminoantipyrin + 4-chlorofenol → chinon-iminové barvivo + 4 H₂O

Výpočet koncentrace:

$$c \text{ [mmol/l]} = (\Delta A_{\text{vz}} - \Delta A_{\text{bl}}) / (\Delta A_{\text{std}} - \Delta A_{\text{bl}}) \cdot c_{\text{std}}$$

Přístroje:

Spektrofotometr Sunrise; Tecan, Rakousko

Chemikálie:

triglyceridy: TG Liquid 1x1000

standard TG Lyonom kalibrator

cholesterol: Chol Liquid 1x1000

standard Chol Lyonom kalibrator

(vše od firmy BIOLATEST Lachema, Česká republika)

Postup:

Postup je stejný pro stanovení triacylglycerolů i cholesterolu, liší se pouze v použitých reagentech.

Plazma byla uchovávána na ledu a před pipetováním vortexována. Na 96-jamkovou destičku byly napipetovány 3 μl od každého vzorku, jako blank byly použity 3 μl deionizované H₂O, a dále 3 μl standardu. Potom bylo co nejrychleji přidáno 300 μl reagentu TG Liquid pomocí osmikanálové pipety, destička přikryta alobalem a vzorky inkubovány 10 min v termostatu při 37°C. Ihned po inkubaci byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 500 nm. V případě, že byly ve vzorku bubliny, byly odstraněny pomocí jehly.

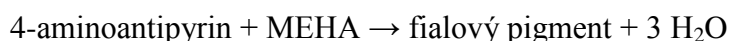
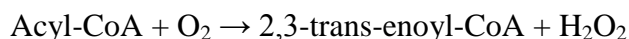
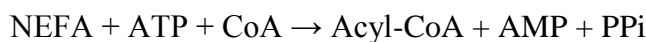
8.2.2.2 Stanovení neesterifikovaných mastných kyselin

Princip metody:

NEFA-HR(2) Set je *in vitro* enzymatická kolorimetrická metoda pro kvantitativní stanovení neesterifikovaných mastných kyselin v plazmě. Tato metoda je specifická pro volné mastné kyseliny a není ovlivněna ostatními plazmatickými komponentami.

NEFA ve vzorku reagují s koenzymem A (CoA) v přítomnosti acyl-CoA-syntetázy (ACS). Následným přidáním acyl-CoA oxidázy (ACOD) vzniká peroxid vodíku, který v přítomnosti peroxidázy (POD) dovoluje oxidativní spojení 3-methyl-N-ethyl-N-(β-hydroxyethyl)-anilinu (MEHA) s 4-aminoantipyrinem (4-AAP) a tím vzniká fialově zbarvený produkt, který může být kolorimetricky stanoven při vlnové délce 550 nm.

Schéma reakce:



Výpočet koncentrace:

$$c [\text{mmol/l}] = (\Delta A_{\text{vz}} - \Delta A_{\text{bl}}) / (\Delta A_{\text{std}} - \Delta A_{\text{bl}}) \cdot c_{\text{std}}$$

Přístroje:

Spektrofotometr Sunrise (Tecan, Rakousko)

Chemikálie:

NEFA-HR(2) Set (Wako Diagnostics, Japonsko)

Wako NEFA Standard (Wako Diagnostics, Japonsko)

Postup:

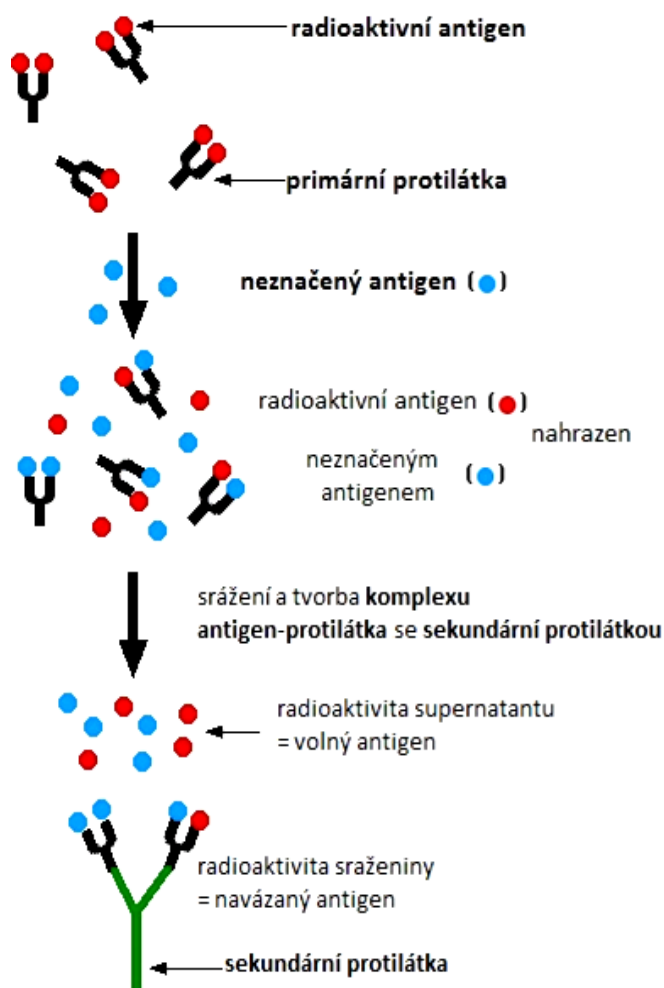
Plazma byla uchovávána na ledu a před pipetováním vortexována. Na 96-jamkovou destičku byly napipetovány 2 μl od každého vzorku, jako blank byly použity 2 μl deionizované H₂O, a dále 2 μl standardu. Potom bylo do každé jamky přidáno 86 μl reagentu R1a pomocí osmikanálové pipety a vzorky inkubovány 10 min v termostatu při 37°C. Po první inkubaci bylo přidáno ještě 43 μl reagentu R2a a vzorky opět inkubovány 10 min v termostatu. Ihned po inkubaci byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 550 nm. V případě, že byly ve vzorku bubliny, byly odstraněny pomocí jehly.

8.2.2.3 Stanovení inzulínu metodou RIA

Princip metody:

Metoda Radioimmunoassay (RIA) využívá známou koncentraci radioaktivně značeného ^{125}I -inzulínu, který je inkubován s konstantním množstvím protilátky. Po přidání neznačeného inzulínu nastane kompetice mezi značeným a neznačeným inzulínem o vazebná místa na protilátce. Neznačený inzulín vytěsňuje radioaktivní inzulín a snižuje tak množství vázané radioaktivity.

Kalibrační křivka se sestaví pomocí standardů obsahujících známé koncentrace neznačeného inzulínu. Z kalibrační křivky lze pomocí regresní rovnice vypočítat množství inzulínu v neznámém vzorku (ng/ml). Tyto výpočty se provádí pomocí předvoleného programu v přístroji Gamma Counter.



Obr.14. Princip RIA metody

(upraveno z <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/Radioimmunoassay.html>)

Přístroje:

centrifuga 3K18 (Sigma, Velká Británie)

gamma-counter Cobra II (Packard, USA)

Materiál a chemikálie

nepotahované borosilikátové zkumavky

Sensitive Rat Insulin RIA kit (LINCO Research, USA)

- protilátka (Guinea Pig anti-Rat insulin Serum)
- značený inzulín: ^{125}I – inzulín (specifická aktivita $367 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), lyofilizovaný
- inzulínové standardy: krysí inzulín o koncentraci: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 a 1 ng/ml
- kontroly kvality 1 a 2: purifikovaný krysí inzulín; hydratační pufr
- precipitační reagent: kozí anti-Guinea Pig IgG sérum

Postup:

Nejprve byly pipetovány roztoky standardů na kalibrační křivku do zkumavek 1-22 podle návodu (obr.15)

Kvůli relativně dobré citlivosti kitu a malému objemu získané plazmy byly vzorky o neznámé koncentraci pipetovány následovně: u hladových myší cca 50 μ l, u myší krmených *ad libitum* podle váhy 20-30 μ l. Objem pufru byl dopočítán do celkového objemu 200 μ l a napipetován do zkumavek. Poté byly napipetovány vzorky plazmy a dále se již postupovalo podle pipetovacího schéma. Třetí den byl dle návodu přidán 1 ml vychlazeného precipitačního reagentu. Po zvortexování byly vzorky inkubovány 20 min ve 4 °C a poté stočeny na centrifuze (30 minut, 2499 g, 4°C).

Stejný postup byl proveden i u zkumavek s blankem a inzulínovými standardy pro kalibrační křivku. Výsledná radioaktivita v peletu byla změřena na Oddělení radiometrie AV ČR.

Tabulka 3. Pipetovací schéma Insulin RIA kitu

1. den				2. den		3. den			
	přidat pufr	standard / QC / vzorek	přidat protilátku	zvortexovat, přikrýt a inkubovat 20-24 hod při 4°C	přidat ¹²⁵ I-inzulín	zvortexovat, přikrýt a inkubovat 20-24 hod při 4°C	přidat srážecí reagent	zvortexovat a inkubovat 20 min při 4°C	centrifugovat 30 min a slít supernatant
1,2	-	-	100 μ l		100 μ l		-		
3,4	300 μ l	-	100 μ l		100 μ l		1 ml		
5,6	200 μ l	-	100 μ l		100 μ l		1 ml		
7,8	100 μ l	100 μ l 0,02 ng/ml	100 μ l		100 μ l		1 ml		
9,10	100 μ l	100 μ l 0,05 ng/ml	100 μ l		100 μ l		1 ml		
11,12	100 μ l	100 μ l 0,1 ng/ml	100 μ l		100 μ l		1 ml		
13,14	100 μ l	100 μ l 0,2 ng/ml	100 μ l		100 μ l		1 ml		
15,16	100 μ l	100 μ l 0,5 ng/ml	100 μ l		100 μ l		1 ml		
17,18	100 μ l	100 μ l 1,0 ng/ml	100 μ l		100 μ l		1 ml		
19,20	100 μ l	100 μ l QC1	100 μ l		100 μ l		1 ml		
21,22	100 μ l	100 μ l QC2	100 μ l		100 μ l		1 ml		
23	100 μ l	vzorek	100 μ l	100 μ l	1 ml				

8.2.3 LIPIDY VE TKÁNI

8.2.3.1 Stanovení obsahu triacylglycerolů v játrech

Chemikálie:

3M KOH v 65% EtOH

TG Liquid 1x1000, BIOLATEST (Lachema, Česká republika)

standard TG Lyonom kalibrator, BIOLATEST (Lachema, Česká republika)

Princip + Přístroje + Chemikálie

stejně jako u stanovení triacylglycerolů v plazmě.

Postup:

Bylo odebráno cca 50 mg jater a zamraženo v tekutém dusíku. Hmotnost vzorku byla zaznamenána do protokolu kvůli výpočtu koncentrace.

Zmražená tkáň byla posléze přenesena do 2 ml mikrozkušavky a přidáno 150 µl 3M roztoku KOH tak, aby byla tkáň ponořena. Mikrozkušavky byly zvortexovány a poté stočeny na mikrocentrifuze. Víčka mikrozkušavek byla zajištěna a tkáň rozpouštěna po dobu 2 hod v termobloku při teplotě 70°C za průběžného vortexování. Po rozpuštění se obsah znovu zvortexoval, stočil na mikrocentrifuze a odebralo se 50 µl supernatantu do nové mikrozkušavky. Supernatant byl 10x zředěn redestilovanou vodou, zvortexován a stočen.

Dále byl postup stejný jako v případě měření koncentrace triacylglycerolů v krevní plazmě.

8.2.3.2 Barvení lipidů v kryořezech jater

Princip metody:

Olejová červeň je barvivo rozpustné v tucích, určené k biochemickému barvení TAG a neutrálních lipidů v zamražené tkáni (alkoholová fixace by odstranila z tkáně lipidy).

Přístroje:

Kryostat CM 1850 (Leica, Německo)

Světelný mikroskop AX 70 (Olympus, Japonsko)

- program: DP Olympus microscope, Japonsko

Chemikálie:

Olejová červeň (Oil red O) v 70 % ethanolu (Fluka, Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Hematoxylin (Dako, Německo)

montovací médium Aqueous Mounting Medium (AbD Serotec, Velká Británie)

formalín a ethanol

Postup:

Zamražená jaterní tkáň byla nařezána v kryostatu při -20°C na $8\ \mu\text{m}$ silné řezy, které byly umístěny na podložní sklíčka. Sklíčka byla inkubována 45 minut v 10 % formalínu a následně 10 minut v 50 % ethanolu. Vzorky se barvily 15 minut v olejové červení a poté byly 5 minut oplachovány v destilované vodě. Následovalo barvení hematoxylinem po dobu 1 minuty. Vzorky se osušily, zamontovaly do vodou rozpustného média a ihned se nafotily pod mikroskopem.

8.2.4 HISTOLOGICKÉ METODY

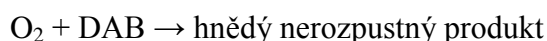
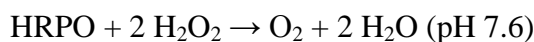
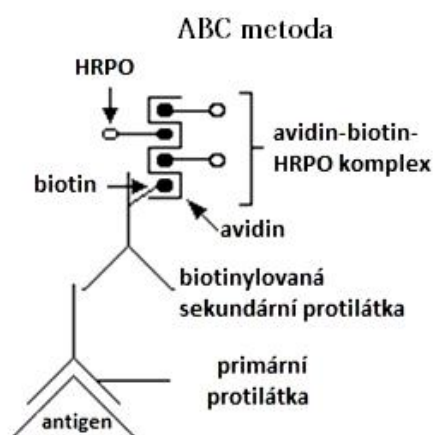
8.2.4.1 Imunohistochemická detekce inzulinu v pankreatu

Princip metody:

Nepřímá dvoustupňová imunohistochemická metoda je založena na imunologické vazbě značené sekundární protilátky na primární protilátku. Nespecifické povrchy tkáně jsou zablokovány blokovacím sérem ze zvířete, ve kterém byla připravena sekundární protilátka, aby se zajistila co nejvyšší specifita. Na tkáňové řezy se aplikuje primární monoklonální protilátka proti myšimu inzulinu. Posléze se nanese značená sekundární protilátka, která se váže na primární protilátku.

K vizualizaci slouží avidin-biotin komplex (ABC) a diaminobenzidin (DAB). Avidin obsahuje 4 vazebná místa pro biotin - některá jsou obsazena biotinem s navázanou křenovou peroxidázou (HRPO), jiná jsou volná pro navázání biotinylované sekundární protilátky. Celý komplex se zviditelní přidáním diaminobenzidinu s H_2O_2 . Peroxidáza reaguje se svým substrátem H_2O_2 a oxiduje DAB, který se účastní reakce jako donor elektronů. Výsledkem reakce je pak stabilní hnědý produkt, který je nerozpustný v alkoholu.

Schéma reakce:



Obr.15. Princip dvoustupňové imunohistochemické metody

(upraveno z http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1385_1-59259-771-8_073-0)

Přístroje:

Světelný mikroskop Olympus AX 70, Japonsko

- program: DP Olympus microscope, Japonsko

vyhodnocovací program: NIS-Elements AR (Nicon Corporation, Japonsko)

Materiál a chemikálie:

Humid box (na udržení vlhkosti)

Dako pen; Dako, Německo

Montovací médium Eukitt (Fluka, Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Blokovací sérum: Normal horse serum (Vector Laboratories, USA)

Primární protilátka: Monoclonal Anti-Insulin Antibody vyrobená v myši (Sigma-Aldrich, USA)

Sekundární protilátka: Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG Antibody (Vector Laboratories, USA)

ABC kit (avidin-biotin complex) (Vector Laboratories, USA)

DAB tablets (diaminobenzidin) (Sigma-Aldrich, USA)

barvivo Hematoxylin (Dako, Německo)

PBS (fosfátový pufr)

H₂O₂ (peroxid vodíku)

xylene a ethanol

Postup:

Pankreas byl odebrán i s částí duodena a sleziny kvůli snazší orientaci ve tkáni a umístěn do 20 ml 10% formaldehydu. Následně byl vzorek zalit do parafinových bločků, nařezán na 4 µm silné řezy a umístěn na podložní sklíčko.

Před barvením je nejprve potřeba rozpustit parafin a zavodnit vzorek v sestupné alkoholové řadě. Sklíčka s řezy byla zahřáta v termoboxu při 37°C po dobu 15 minut. Poté byla dána 2x na 10 minut do xylenu, 4x na 5 minut do 96% ethanolu, 5 minut do 75% ethanolu, 5 minut do 50% ethanolu a 5 minut do destilované vody. Poté se dala sklíčka se vzorky na 20 minut do 0,1% roztoku H₂O₂ v PBS, aby se zablokovala endogenní peroxidáza. Potom se vzorky oplachovaly 2x 15 minut v PBS. Po oplachu byla kolem řezů vytvořena hydrofóbní bariéra pomocí Dako pen, aby se zabránilo vylití následně pipetovaných roztoků. Nejprve se napipetovalo horse serum tak, aby byly řezy úplně zalité, reakce probíhala po dobu 30 minut v humid boxu při pokojové teplotě. Potom se horse serum slilo a napipetovala se primární protilátka naředěná v poměru 1 : 4000 v PBS. Reakce se nechala se přes noc inkubovat v humid boxu při teplotě 4°C.

Druhý den se vzorky oplachovaly 2x 15 minut v PBS, potom se napipetovala sekundární protilátka naředěná v poměru 1 : 200 v PBS a reakce probíhala 1 hodinu v humid boxu při pokojové teplotě. Následně se vzorky opět oplachovaly 2x 15 minut v PBS, PBS se slil a na řezy

se napipetoval předem namíchaný ABC roztok (1960 μ l PBS, 20 μ l roztoku A a 20 μ l roztoku B) a reakce probíhala 30 minut v humid boxu při pokojové teplotě. Po inkubaci se vzorky znovu oplachovaly 2x 15 minut v PBS, pak se na řezy napipetoval předem namíchaný roztok DAB (rozpuštěno v 2,5 ml destilované vody) a po 3 minutách v humid boxu při pokojové teplotě se sklíčka oplachovala 5 minut v kohoutkové vodě.

Následovalo barvení hematoxylinem po dobu 1 minuty, potom byla sklíčka ihned opláchnuta pod tekoucí vodou. Aby bylo možné řezy zafixovat, byly odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou - 10 minut v 50% ethanolu, 10 minut v 75% ethanolu a 10 v 96% ethanolu. Potom byly řezy 1 hodinu sušeny v termoboxu při 37°C a zafixovány pomocí montovacího média pod krycí sklíčko.

Vyhodnocení

Obarvené řezy byly nafoceny pod mikroskopem tak, aby z každého vzorku bylo alespoň 10 snímků náhodně vybraných Langerhansových ostrůvků a výsledky byly zprůměrovány.

Ostrůvek byl definován jako shluk více než sedmi buněk a u každého ostrůvku byla pomocí programu NIS-Elements spočítána celková plocha ostrůvku, plocha oblasti s buňkami produkujícími inzulin, a dále poměr těchto ploch. Následně se spočítal počet jader (buněk) v každém ostrůvku a vypočetla se inzulin-pozitivní plocha na 1 jádro.

8.3 Statistické zpracování výsledků

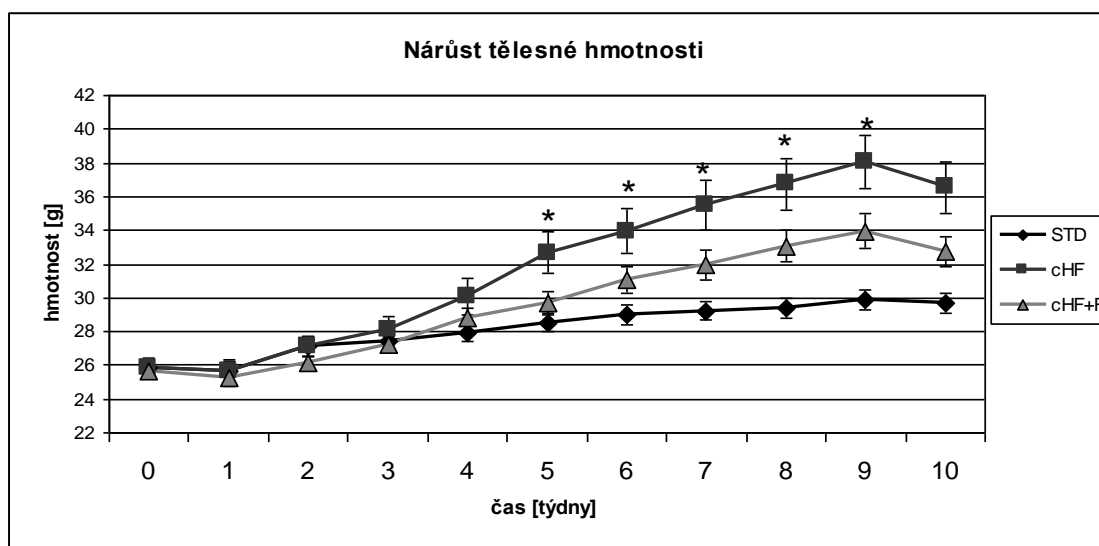
Výsledné hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2003. Všechny hodnoty v tabulkách a grafech jsou uváděny jako aritmetický průměr a variabilita je uváděna jako střední chyba průměru (SEM). Statistické testy byly provedeny pomocí programu SigmaStat 3.1 (Systat Software). Při předpokladu normálního rozložení dat byly získané hodnoty dvou srovnávaných skupin testovány t-testem. V případě, že test normality selhal, byl použit Mann-Whitney Rank Sum Test. Za statisticky významná byla považována data s hodnotou $P \leq 0,05$.

9 Výsledky

9.1 Metabolické účinky suplementace vysokotukové diety koncentrátem n-3 LC-PUFA

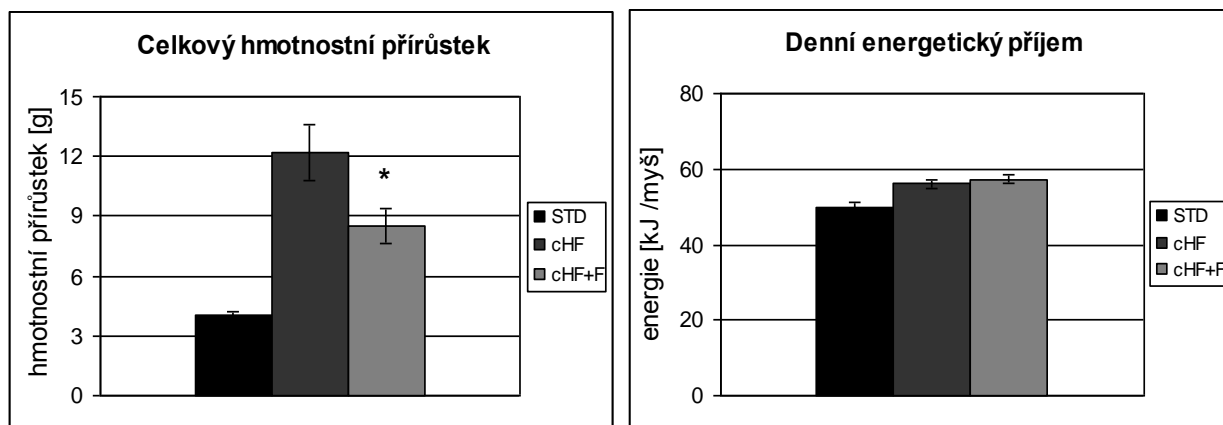
9.1.1 ÚČINEK N-3 LC-PUFA NA TĚLESNOU HMOTNOST A PŘÍJEM POTRAVY

Na začátku experimentu byla průměrná hmotnost myši $25,77 \pm 0,27$ g. V průběhu pokusu myši na vysokotukových dietách dosahovaly vyšší hmotnosti než myši na STD dietě. Nicméně po 5. týdnu cHF+F dieta způsobila významně nižší nárůst hmotnosti než cHF dieta a tento stav pokračoval až do konce pokusu (obr.17 a tab.3). Při porovnání spotřeby diet a jejich energetické hodnoty nebyly pozorovány významné rozdíly v energetickém příjmu. Nejvýznamnější podíl na rozdílech v tělesné hmotnosti má množství tělesného tuku, jak naznačuje hmotnost gonadálního tuku, které bylo signifikantně nižší u skupiny cHF+F (tab.3). Vliv diet na hmotnost srdce nebo jater nebyl pozorován (tab.3). Pokles tělesné hmotnosti po 9 týdnu byl způsoben tím, že myši podstoupily glukózový toleranční test v průběhu 9. týdne (obr.17).



Obr.16. Průběh nárůstu tělesné hmotnosti

Graf znázorňuje průběh nárůstu tělesné hmotnosti během 10-ti týdenního pokusu. Výchozí hmotnost byla u všech zvířat přibližně stejná a během pokusu se začaly projevovat váhové rozdíly mezi skupinami STD ($n=18$), cHF ($n=15$) a cHF+F ($n=18$). Již od 5. týdne se objevil významný rozdíl v tělesné hmotnosti mezi vysokotukovými dietami ($P < 0,05$).



Obr. 17. Celkový hmotnostní přírůstek a denní energetický příjem

Ačkoli denní energetický příjem byl u všech skupin přibližně stejný, hmotnostní přírůstek kontrolní STD skupiny byl menší ve srovnání se skupinami na vysokotukové dietě. Také došlo k významnému snížení hmotnosti u cHF+F ve srovnání s cHF skupinou ($P < 0,05$).

STD ($n=18$), cHF ($n=15$) a cHF+F ($n=18$) (hmotnostní přírůstek byl počítán jako rozdíl mezi tělesnou hmotností na začátku pokusu - týden 0 a tělesnou hmotností na konci pokusu - týden 9)

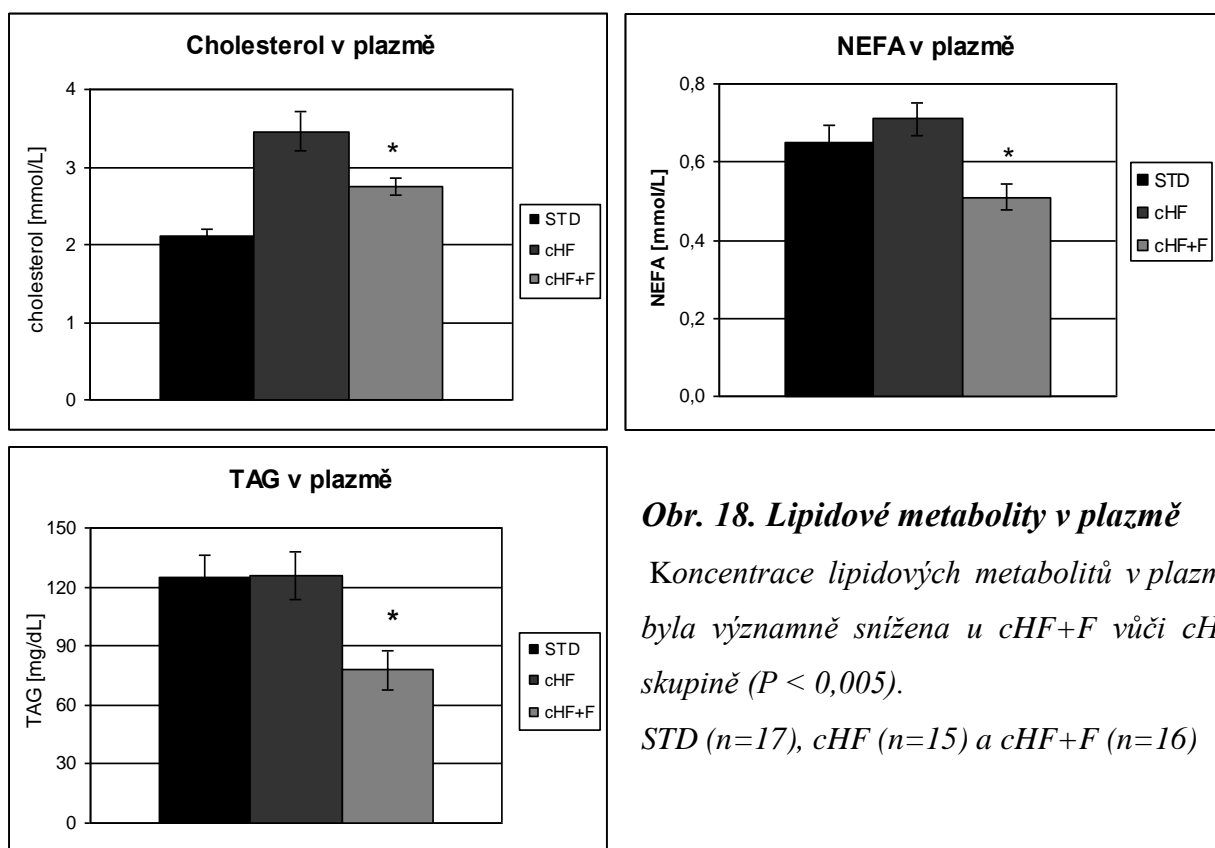
	STD	cHF	cHF+F
Energetická bilance			
počáteční váha	25,85 ± 0,57 g	25,85 ± 0,51 g	25,64 ± 0,34 g
konečná váha	29,87 ± 0,59 g	38,06 ± 1,61 g *	33,97 ± 1,02 g
váhový přírůstek	4,02 ± 0,17 g	12,21 ± 1,41 g *	8,49 ± 0,89 g
příjem potravy / den [g]	3,9 ± 0,1 g	2,5 ± 0,0 g	2,6 ± 0,1 g
příjem potravy / den [kJ]	50 ± 1,2 kJ	56 ± 1,1 kJ	57,3 ± 1,2 kJ
Váha tkání			
gonadální tuk	548,82 ± 30,89 g	1971,87 ± 209,12 g *	1443,13 ± 135,93
srdce	141,69 ± 6,34 g	139,20 ± 3,15 g	128,75 ± 3,45 g
játra	1488,18 ± 24,61 g	1371,60 ± 69,32 g	1220,81 ± 44,82
hnědá tuková tkáň	95,53 ± 5,42 g	134,67 ± 11,46 g	107,75 ± 9,92 g
Index tučnosti (celk.tuk : hmotnost myši)	33,5 ± 1,35	84 ± 7,22	68 ± 4,65

Tabulka 4. Základní charakteristiky myši v pokusech

Tabulka obsahuje údaje o tělesné hmotnosti na začátku a na konci pokusu, dále hmotnostní přírůstek, příjem potravy v gramech a přepočítaný energetický obsah (kJ) a hmotnost vybraných tkání. STD ($n=17$), cHF ($n=15$) a cHF+F ($n=16$); * $P < 0,05$

9.1.2 VLIV N-3 LC-PUFA NA LIPIDOVÉ METABOLITY V PLAZMĚ

Analýza hladin lipidových metabolitů v plazmě (obr.18) ukázala významné snížení koncentrace TAG a NEFA u CHF+F skupiny ve srovnání s CHF skupinou. Vysokotuková dieta také obecně zvyšovala koncentraci celkového cholesterolu v krvi, jehož hladiny jsou ale u CHF+F skupiny významně sníženy ve srovnání s CHF skupinou.



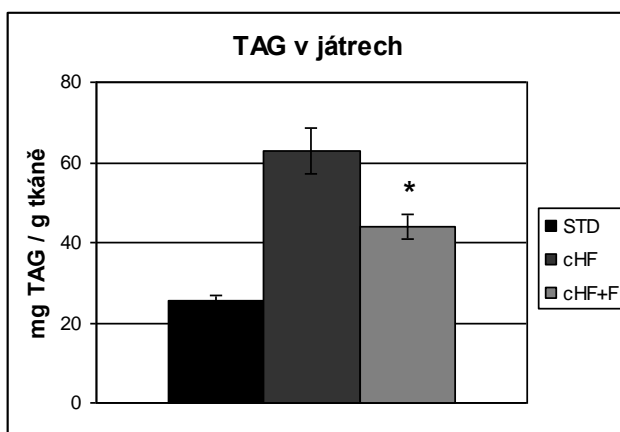
Obr. 18. Lipidové metabolity v plazmě

Koncentrace lipidových metabolitů v plazmě byla významně snížena u CHF+F vůči CHF skupině ($P < 0,005$).

STD ($n=17$), CHF ($n=15$) a CHF+F ($n=16$)

9.1.3 VLIV N-3 LC-PUFA NA AKUMULACI LIPIDŮ V JÁTRECH

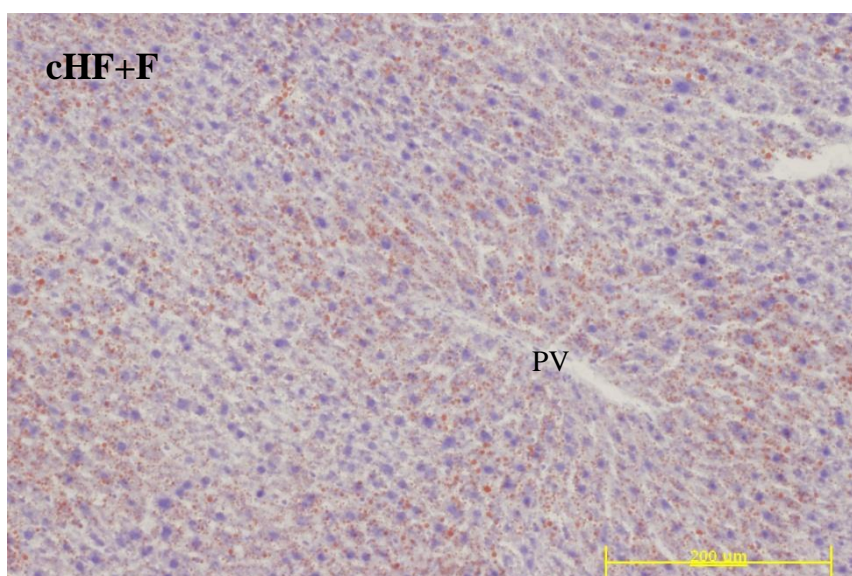
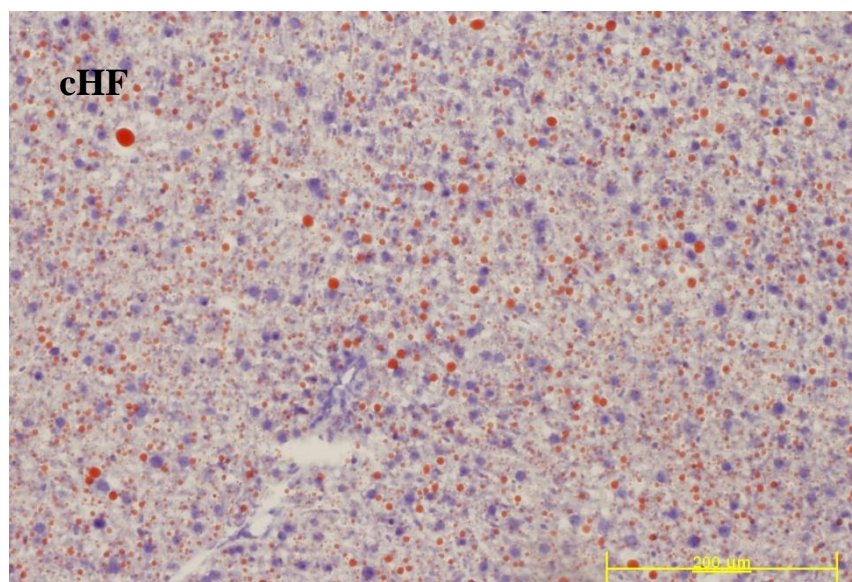
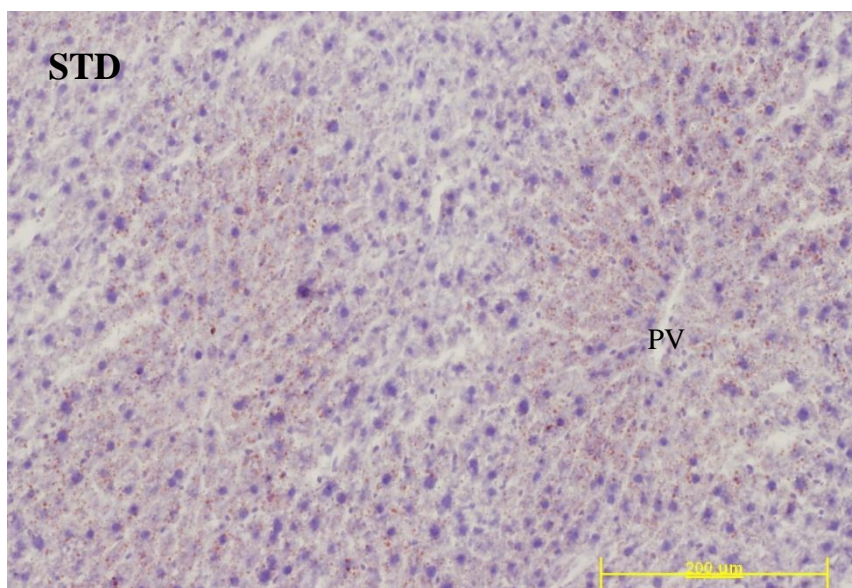
Z obr.19 je vidět, že cHF dieta výrazně zvyšovala obsah TAG v játrech, zatímco u cHF+F skupiny byla akumulace TAG v játrech významně snížena. Barvení lipidových kapének v kryořezech jater (obr.20) ukázalo akumulaci TAG kolem periportálních žilek v případě STD diety. Oproti tomu u cHF diety se TAG nachází téměř rovnoměrně v celé jaterní tkáni a tukové kapénky jsou navíc výrazně větší. U cHF+F diety je patrné snížení akumulace lipidů a částečná normalizace jejich distribuce.



Obr.19. Obsah TAG v játrech

Graf znázorňuje obsah TAG v jaterní tkáni u jednotlivých skupin myši. Je patrný výrazný nárůst TAG u cHF skupiny, naopak u cHF+F skupiny je obsah TAG významně snížen ($P < 0,05$).

STD ($n=17$), cHF ($n=15$) a cHF+F ($n=16$)



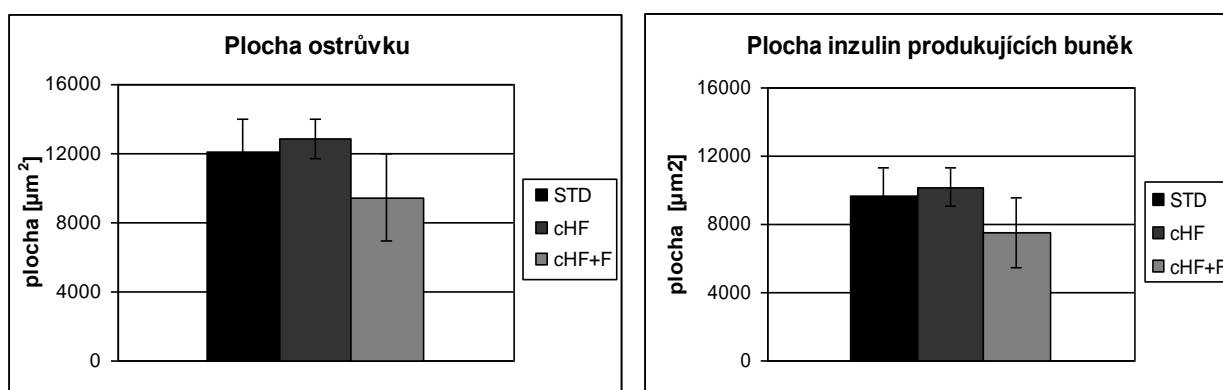
Obr.20. Vizualizace lipidových kapének v játrech

Obrázek ukazuje akumulaci TAG v játrech barvených olejovou červení. Z každé skupiny byl vybrán jeden reprezentativní vzorek.

Průměrné hodnoty TAG v játrech u jednotlivých skupin zvířat viz. obr.19.

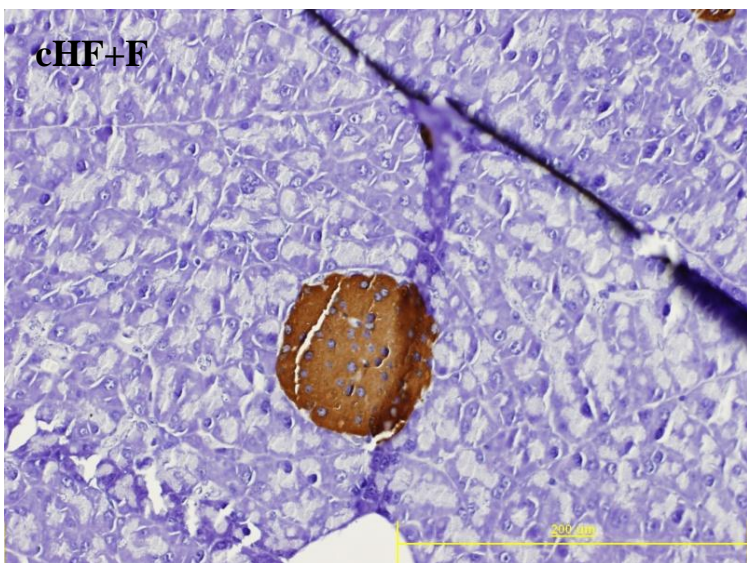
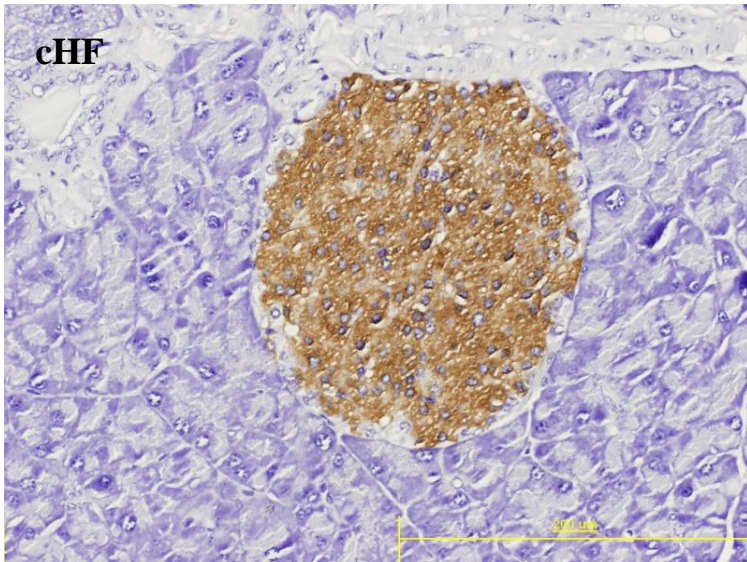
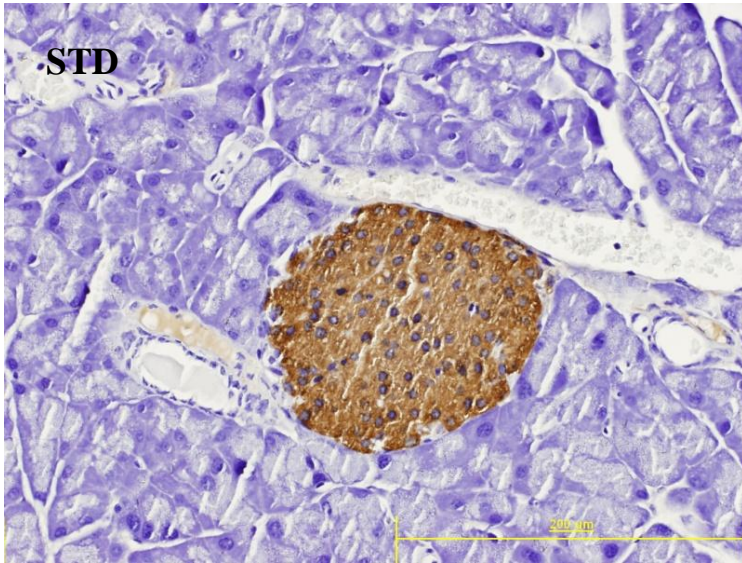
9.1.4 VLIV N-3 LC-PUFA NA BETA-BUŇKY PANKREATU

Produkce inzulínu v β -buňkách byla stanovena imunohistochemickým barvením. Jak je vidět na obr.21., u cHF skupiny ve srovnání s cHF+F skupinou byla zvětšená plocha jak ostrůvků, tak i plocha inzulín produkujících buněk v důsledku IR. Ačkoli rozdíly mezi skupinami nebyly významné, byl zde jasný pozorovatelný trend. Rozdíly ve velikosti ostrůvků jsou vidět i na obr.22, který navíc ukazuje jejich světlejší zbarvení u cHF skupiny v důsledku vyšší sekrece inzulínu z β -buněk. V případě poměru plochy ostrůvku a inzulín produkujících buněk potom vyšla stejná hodnota u obou vysokotukových diet (cHF = $0,79 \pm 0,03$; cHF+F = $0,79 \pm 0,02$).



Obr.21. Plocha Langerhansových ostrůvků a plocha inzulín produkujících buněk

Grafy znázorňují plochu pankreatických ostrůvků v histologickém řezu a plochu inzulín produkujících buněk imunohistochemicky obarvených na přítomnost inzulínu. Bylo pozorováno mírné, ale nesignifikantní zvětšení plochy ostrůvků i inzulín produkujících buněk u cHF skupiny a jejich zmenšení u cHF+F. (z každé skupiny bylo k vyhodnocení vybráno 6 jedinců, kteří se nejvíce blížili váhovému průměru skupiny)



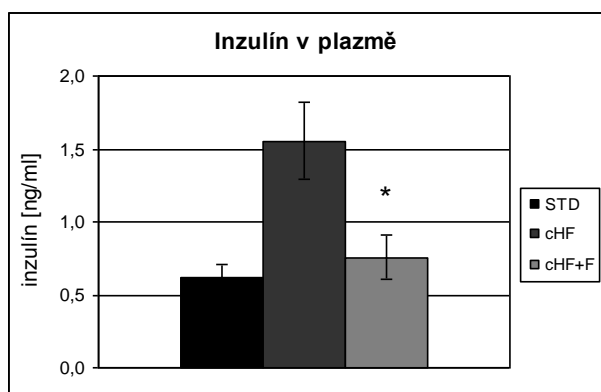
Obr.22. Morfologie

Langerhansových ostrůvků

Reprezentativní obrázek ostrůvků pankreatu u jednotlivých skupin myši z hlediska velikosti ostrůvků a množství inzulínu. V průměru byly ostrůvky u cHF skupiny větší a světlejší a měly menší inzulín-pozitivní plochu, zatímco u cHF+F skupiny byly ostrůvky oproti STD menší a tmavší. Nicméně všechny skupiny vykazovaly velkou heterogenitu

9.1.5 VLIV N-3 LC-PUFA NA HLADINY INZULÍNU V PLAZMĚ

Hladina glukózy měřená v krvi myši v sytém stavu nebyla mezi skupinami významně odlišná (STD = $192,06 \pm 7,28$, CHF = $207,33 \pm 10,57$ a CHF+F = $204,69 \pm 5,99$ mg/dl). Naopak u myši v CHF skupině byla naměřena vysoká hladina inzulínu v plazmě (obr.23), zatímco u CHF+F skupiny byla hladina inzulínu snížena téměř na stejnou úroveň jako v případě STD skupiny.



Obr.23. Koncentrace inzulínu v plazmě v sytém stavu

Koncentrace inzulínu v plazmě myši v sytém stavu u skupiny CHF+F je oproti CHF významně snížena ($P < 0,05$).

STD ($n=17$), CHF ($n=14$) a CHF+F ($n=16$)

9.2 Glukózový toleranční test

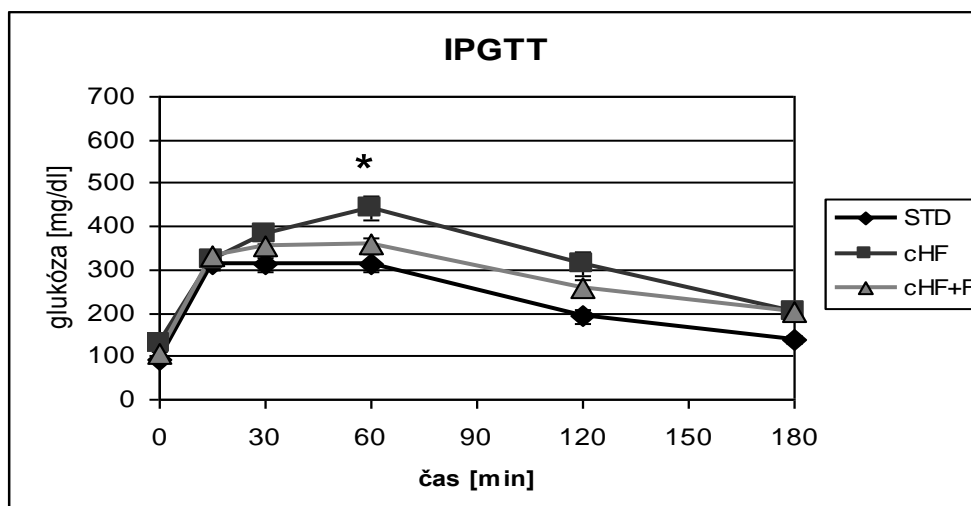
9.2.1 POROVNÁNÍ ÚČINKŮ ORÁLNÍHO A INTRAPERITONEÁLNÍHO PODÁNÍ GLUKÓZY NA GLUKÓZOVOU HOMEOSTÁZU ORGANISMU

Jak je vidět z obr. 24 a 25, průběh glykemických křivek z OGTT a IPGTT je odlišný. U OGTT (obr.25) dochází k rychlejšímu nástupu koncentrace glukózy a rychlejšímu vstřebání glukózy do buněk, což se projevilo strmějším poklesem křivky. Stav glukózové tolerance se dá vyjádřit výpočtem inkrementální a celkové plochy pod křivkou (AUC) (obr. 26 a 27). Nicméně absolutní hladiny glukózy v průběhu OGTT a hodnoty AUC byly vyšší ve srovnání s IPGTT také z důvodu vyšší dávky glukózy. Pouze v případě OGTT byl pozorován významný rozdíl ve výše uvedených parametrech mezi skupinami CHF a CHF+F (obr.27).

Z průběhu glykemické křivky je též patrný rozdíl mezi skupinami na vysokotukové dietě. U CHF+F skupiny byla v případě IPGTT i OGTT významně snížena glykémie v čase 60 minut po podání glukózy, zatímco v případě OGTT se objevil významný rozdíl i ve 120. minutě po podání glukózy. U OGTT se efekt n-3 LC-PUFA v CHF+F dietě projevil výrazněji – průběh glykemické křivky téměř kopíroval křivku pro STD skupinu (obr.25).

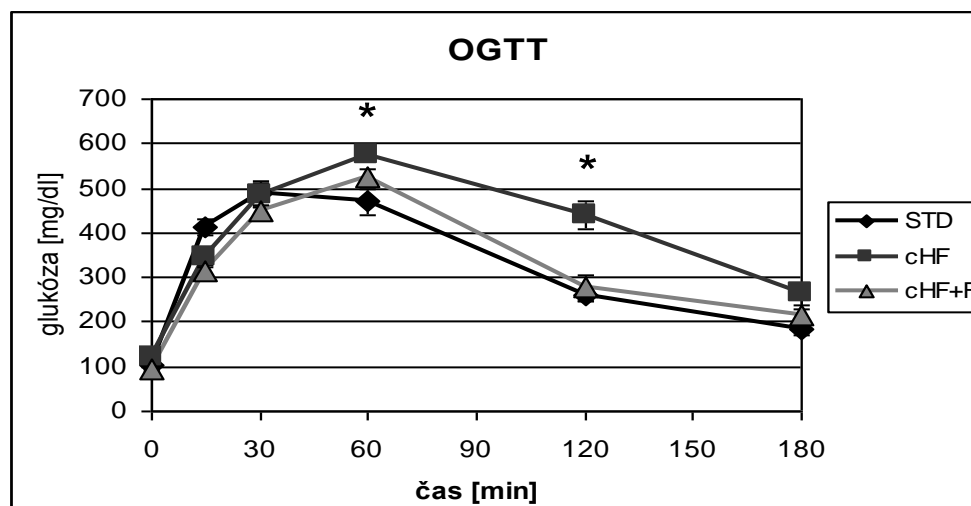
U hodnot glukózy i inzulínu na lačno byl rozdíl mezi CHF+F a CHF na hranici signifikance. Hladina inzulínu byla měřena před podáním glukózy (T0) a 30 minut po jejím podání (T30). Rozdíly v bazálních hodnotách inzulínu mezi skupinami nejsou významné, ale v čase T30 se

koncentrace inzulínu u všech skupin v průběhu OGTT zvýšila víc než dvojnásobně (obr.27). Při OGTT také došlo u cHF+F skupiny k významnému zvýšení hladin inzulínu oproti cHF skupině, které se ale v případě IPGTT neprojevilo.



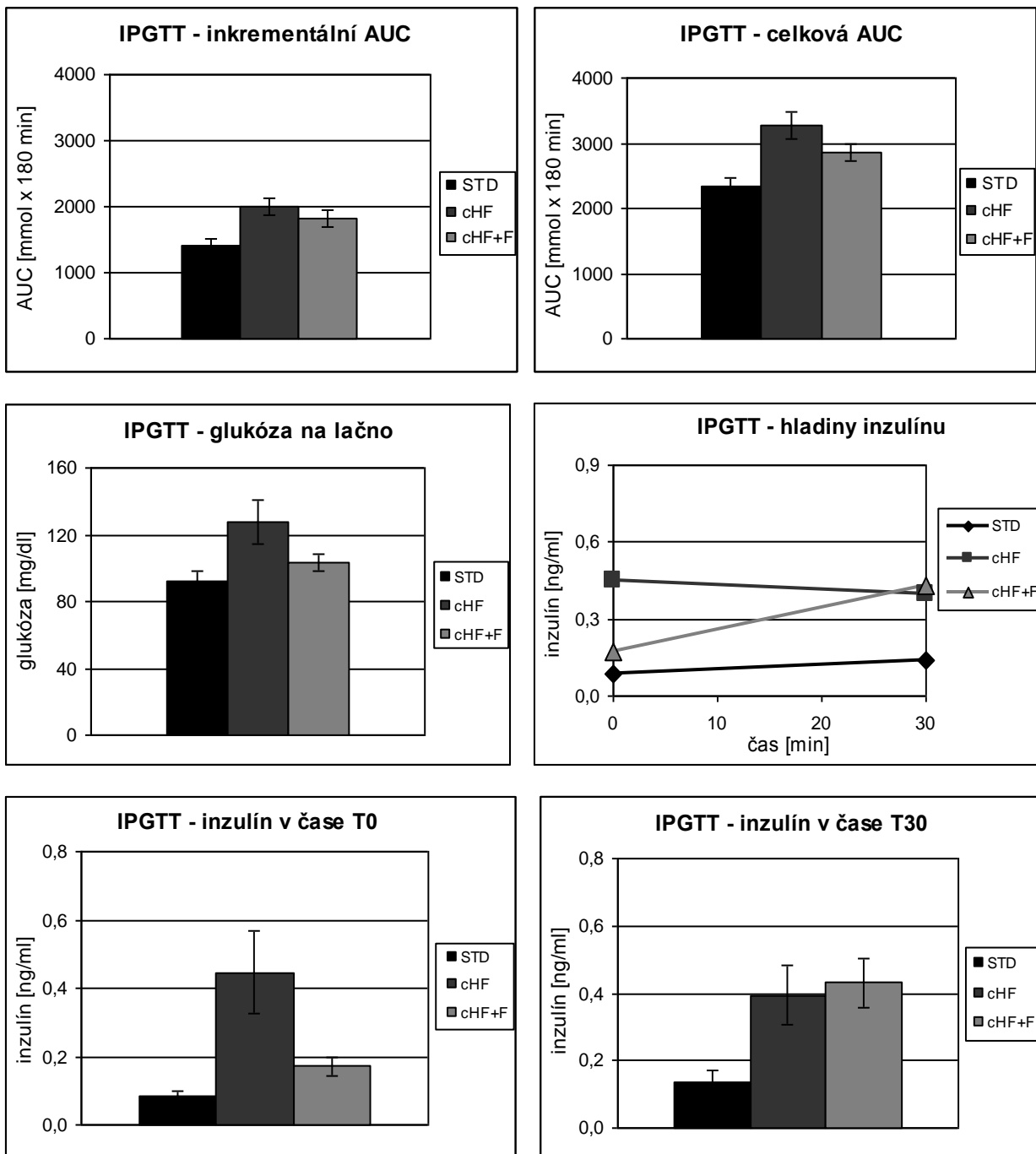
Obr.24. Intraperitoneální glukózový toleranční test

Graf znázorňuje průběh IPGTT. Hladiny glukózy v krvi v 60 minutě po podání glukózy byly významně odlišné ($P < 0,05$) mezi cHF a cHF+F skupinami. Obě skupiny měly zároveň vyšší hladiny glukózy než STD skupina, nicméně cHF+F skupina dosahovala nižších hodnot glykémie než cHF skupina. STD ($n=9$), cHF ($n=8$) a cHF+F ($n=9$); * $P < 0,05$



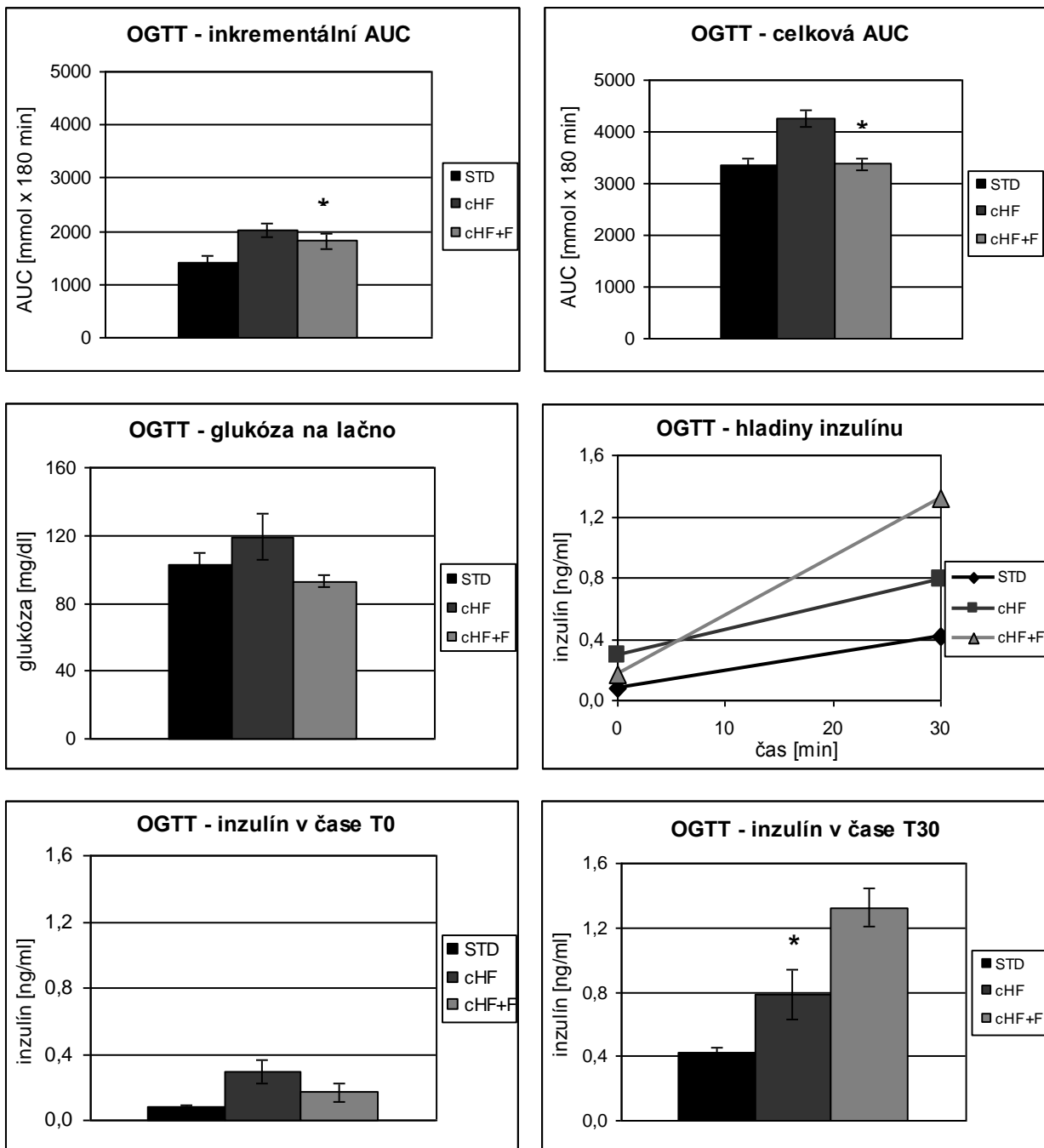
Obr.25. Orální glukózový toleranční test

Graf znázorňuje průběh OGTT. V čase 60 a 120 minut po podání glukózy byla glykémie u skupin cHF a cHF+F významně odlišná ($P < 0,05$). U cHF+F skupiny došlo téměř k normalizaci glykémie na úroveň STD skupiny. STD ($n=9$), cHF ($n=7$) a cHF+F ($n=9$); * $P < 0,05$



Obr.26. Parametry glukózové homeostázy v průběhu IPGTT

Grafy znázorňují inkrementální a celkovou plochu pod křivkou (AUC) v průběhu IPGTT, a dále koncentraci glukózy v krvi ve stavu na lačno. Znázorněny jsou také hladiny inzulínu na lačno a v čase T30 po podání glukózy. STD (n=9), cHF (n=8) a cHF+F (n=9); * $P < 0,05$



Obr.27. Parametry glukózové homeostázy v průběhu OGTT

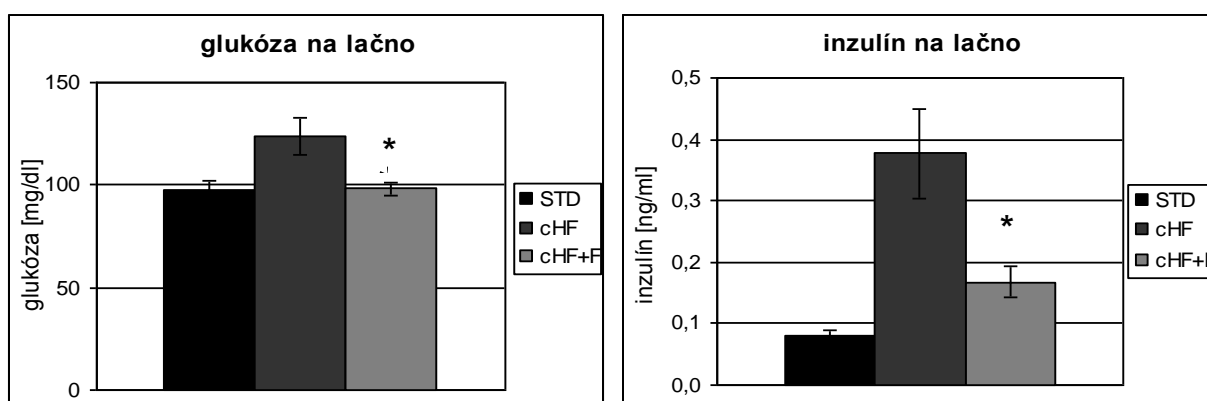
Grafy znázorňují inkrementální a celkovou plochu pod křivkou (AUC) v průběhu OGTT, a dále koncentraci glukózy v krvi ve stavu na lačno. U skupiny cHF+F bylo snížení hladiny glukózy na hranici významnosti ($P = 0,057$). Znázorněny jsou také hladiny inzulínu na lačno a v čase T30 po podání glukózy. STD ($n=9$), cHF ($n=7$) a cHF+F ($n=9$); * $P < 0,05$

9.2.2 VLIV N-3 LC-PUFA NA HLADINY GLUKÓZY A INZULÍNU VE STAVU NA LAČNO

Za účelem zjištění korelace parametrů glukózové homeostázy a váhového přírůstku byly hodnoty glykémie a inzulínu ve stavu na lačno u myši analyzovaných v rámci jednotlivých skupin v průběhu IPGTT a OGTT spojeny dohromady, tak aby bylo dosaženo co nejvyššího počtu zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách.

Koncentrace glukózy v krvi a inzulínu v plazmě byla působením n-3 LC-PUFA v cHF+F dietě významně snížena ve srovnání se skupinou na cHF+F dietě (obr. 28). U cHF skupiny byla zjištěna pozitivní korelace mezi hladinou glukózy i inzulínu na lačno a váhovým přírůstkem, která ale nebyla pozorována u cHF+F skupiny (obr. 30 a 31).

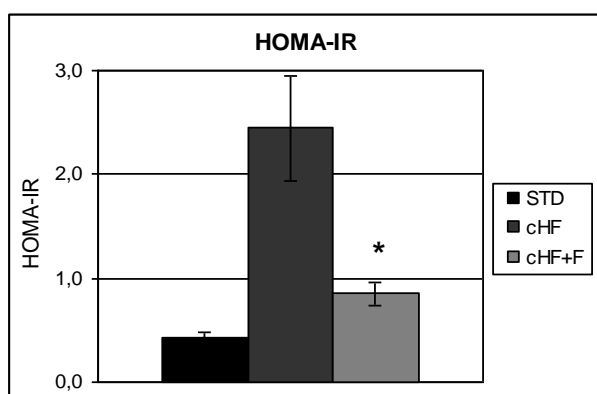
Stav IR organismu lze vyjádřit pomocí tzv. „HOMA-IR indexu“ (model hodnocení homeostázy), který se vypočítá z koncentrace glukózy v krvi a inzulínu v plazmě na lačno. HOMA-IR odhalil rozvinutou IR u cHF skupiny a zároveň významně vyšší citlivost organismu k inzulínu u skupiny na cHF+F dietě ve srovnání se skupinou na cHF skupinou (obr.29).



Obr.28. Hladiny glukózy a inzulínu ve stavu na lačno

Grafy znázorňují bazální hladiny glukózy a inzulínu v čase T0 ($P < 0,05$).

STD ($n=18$), cHF ($n=15$) a cHF+F ($n=18$) (data ze skupin z IPGTT a OGTT jsou sloučena)

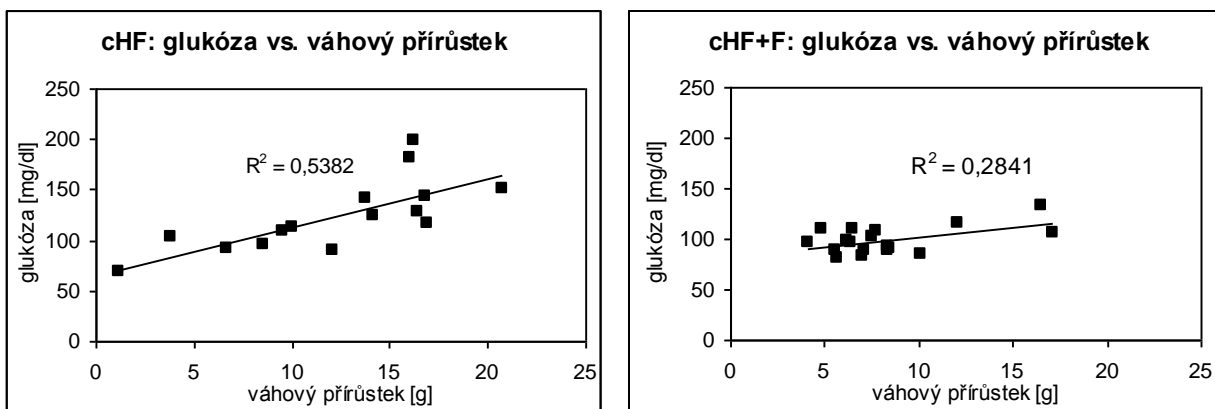


Obr. 29. Hodnoty „HOMA-IR indexu“

Graf znázorňuje hodnoty HOMA-IR.

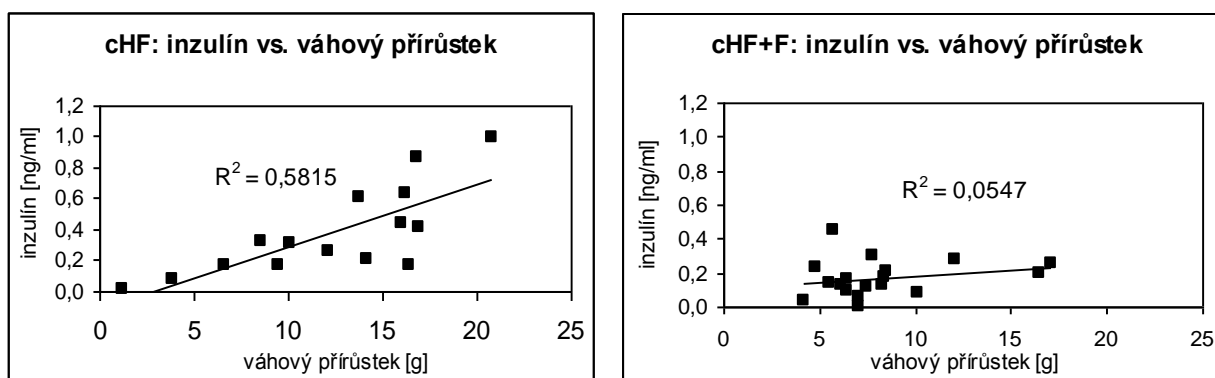
($P < 0,005$)

STD ($n=18$), cHF ($n=15$) a cHF+F ($n=18$)



Obr.30. Vztah mezi hladinou glukózy na lačno a hmotnostním přírůstkem

Na grafu je znázorněna závislost koncentrace glukózy v krvi ve stavu na lačno na hmotnostním přírůstku u CHF skupiny ($P < 0,005$, Spearmanův korelační koeficient = 0,782) a CHF+F skupiny ($P = 0,374$, Spearmanův korelační koeficient = 0,220). R^2 - koeficient determinace CHF ($n=15$) a CHF+F ($n=18$)



Obr.31. Vztah mezi hladinou inzulinu na lačno a hmotnostním přírůstkem

Na grafu je znázorněna závislost koncentrace inzulinu v plazmě ve stavu na lačno na hmotnostním přírůstku u CHF skupiny ($P < 0,005$, Spearmanův korelační koeficient = 0,75) a CHF+F skupiny ($P = 0,285$, Spearmanův korelační koeficient = 0,263). R^2 - koeficient determinace. CHF ($n=15$) a CHF+F ($n=18$)

10 Diskuse

Vliv n-3 LC-PUFA na tukovou tkáň

Jak již bylo popsáno dříve v naší laboratoři (Flachs et al. 2005), n-3 LC-PUFA (koncentrát EPA a DHA) snižují akumulaci tuku bez ovlivnění příjmu potravy. Dochází k metabolickému přeprogramování v adipocytech, které zahrnuje zvýšení β -oxidace a biogeneze mitochondrií. Snížení akumulace tělesného tuku bylo prokázáno i v tomto experimentu s použitím myšího kmene, který je náchylný k rozvoji dietou indukované obezity a IR. Na začátku experimentu měly všechny myši stejnou průměrnou váhu, nicméně již po pěti týdnech na vysokotukové dietě byl pozorován významně nižší hmotnostní přírůstek u CHF+F skupiny (s obsahem EPA/DHA v dietě) ve srovnání se zvířaty na kontrolní vysokotukové dietě (CHF) a tento rozdíl byl patrný až do konce pokusu. Pokles váhy v 10. týdnu pokusu je dán tím, že myši v 9. týdnu podstoupily glukózový toleranční test, který pro ně představuje i při nejopatrnějším zacházení značný stres, který se může projevit nižší spotřebou diety a následným poklesem hmotnosti.

Při porovnání spotřeby experimentálních diet nebyly pozorovány rozdíly v denním energetickém příjmu mezi jednotlivými skupinami, což naznačuje, že rozdíly v hmotnostním přírůstku jsou způsobeny především rozdílným složením experimentálních diet. Nejvýznamnější podíl na rozdílech v hmotnosti má množství tělesného tuku, zejména v gonadálním depu, které bylo působením CHF+F diety sníženo.

Vliv n-3 LC-PUFA na játra

Metabolické přeprogramování v tukové tkáni působením n-3 LC-PUFA má vliv i na další periferní tkáně. Kromě stimulace oxidace lipidů n-3 LC-PUFA také inhibují lipogenezi, a tak snižují uvolňování mastných kyselin a jejich lipotoxické působení v dalších orgánech (Flachs et al. 2005). Také v játrech n-3 LC-PUFA potlačují de novo lipogenezi a zvyšují oxidaci mastných kyselin, což je podkladem jejich antisteatotického účinku (Dentin et al. 2005). Jak bylo prokázáno v tomto experimentu, vysokotuková CHF dieta výrazně zvyšuje obsah TAG v játrech, což bylo pozorovatelné i během odběru tkání na konci experimentu, kdy byla játra těchto myši často steatotická. Barvení lipidových kapének v kryořezech jater ukazuje u kontrolní STD diety obsah TAG jen v oblasti okolo periportálních žilek, kde probíhá oxidace mastných kyselin (Braeuning et al. 2006), zatímco u jedinců krměných dietami s vysokým obsahem tuku (CHF, CHF+F) jsou TAG akumulovány v celé tkáni, ale v případě CHF skupiny jsou tukové kapénky výrazně větší. Akumulace TAG byla ale působením EPA/DHA v CHF+F dietě významně redukována a došlo také částečně k normalizaci jejich rozmístění.

Vliv n-3 LC-PUFA na lipidové metabolity v plazmě

S obsahem TAG v játrech a tukové tkáni také souvisí hladiny lipidových metabolitů. Benefiční působení n-3 LC-PUFA na hladiny lipidů v plazmě působením cHF+F diety bylo již v naší laboratoři prokázáno (Kuda et al. 2009) a potvrdilo se i v tomto pokuse. Koncentrace TAG, NEFA a cholesterolu byla u cHF+F skupiny významně snížena oproti kontrolám na cHF dietě. Použitá cHF dieta sice neobsahuje cholesterol, ale indukuje tvorbu endogenního cholesterolu, a proto jsou jeho hladiny především u cHF skupiny velmi vysoké.

Vliv n-3 LC-PUFA na β -buňky a produkci inzulínu v pankreatu

β -buňky jsou schopné adaptace na IR, u obézních nediabetických potkanů například dochází ke zvýšení počtu β -buněk a tedy zvětšení Langerhansových ostrůvků v důsledku snahy kompenzovat zvýšenou IR (Jones et al. 2010). Hladina glukózy byla u všech experimentálních skupin v tomto pokuse téměř shodná, bylo pozorováno pouze mírné zvýšení u vysokotukových diet. Naproti tomu byly pozorovány rozdíly v hladině inzulínu. Zvýšená hladina inzulínu v plazmě u cHF skupiny byla působením cHF+F diety snížena téměř na shodnou úroveň jako u kontrolní STD diety.

Vyšší hladina inzulínu u myši na cHF dietě naznačuje rozvinutou IR a adaptaci β -buněk. S tím je ve shodě i zvětšená plocha ostrůvků a inzulín produkujících buněk u skupiny na cHF dietě. Naopak plocha ostrůvků byla suplementací EPA/DHA v cHF+F dietě snížena pod úroveň kontrolní STD skupiny. Nicméně z důvodu vysoké heterogenity a malého počtu jedinců v experimentálních skupinách bylo obtížné z výše uvedených výsledků vyvodit jednoznačný závěr ohledně účinků jednotlivých diet. Důvodem může být i relativně krátká doba na vysokotukové dietě. V jiné studii bylo u nediabetických potkanů zjištěno, že k významnému zvýšení velikosti ostrůvků došlo až po 14 týdnech na vysokotukové dietě (Jones et al. 2010). Důvodem může být i fakt, že β -buňky jsou schopné produkovat čtyřikrát až pětkrát víc inzulínu, zatímco jejich celkový objem se zvýší jen asi o 50 % (Butler et al. 2003). Některé ostrůvky cHF skupiny byly hypertrofické, jiné nikoliv. Podíl na tom má zřejmě i fakt, že neogeneze β -buněk je stimulována zejména vysokou hladinou glukózy nezávisle na změnách v koncentraci inzulínu (Paris et al. 2003). Naopak v našem experimentu byly hladiny glukózy u všech skupin přibližně na stejné, relativně nízké úrovni. Dále, u obézních potkanů s diabetem byla pozorována výrazně nižší intenzita barvení na inzulín v β -buňkách, což svědčí o hypersekreci inzulínu (Jones et al. 2010). Světlejší Langerhansovy ostrůvky byly pozorovány i u cHF skupiny v tomto pokusu, i když i v tomto aspektu byla pozorována výrazná heterogenita. Také se u této skupiny častěji vyskytovaly buňky neprodukující inzulín, což naznačuje porušenou funkci β -buněk. Degenerace

ostrůvků byla v malé míře také pozorována u nediabetických obézních potkanů v práci Jones et al. (2010). V poměru plochy ostrůvku a inzulín-pozitivní plochy nebyl mezi vysokotukovými dietami pozorován výrazný rozdíl. U CHF skupiny bylo sice pozorováno vyšší procento β -buněk, které již neprodukovaly inzulín, naproti tomu byla u této skupiny také pozorována vyšší neogeneze β -buněk v důsledku kompenzace vyšší potřeby inzulínu při IR, takže poměr ploch zůstal zachován.

Vliv n-3 LC-PUFA na hladiny glukózy a inzulínu ve stavu na lačno

n-3 LC-PUFA podporují vstup glukózy do buněk nezávislý na inzulínu aktivací GLUT-4 v játrech a ve svalu (Lombardo et al. 2007) a zároveň snižují glukoneogenezi v játrech (Yamauchi et al. 2002), čímž snižují koncentraci glukózy v krvi. Benefiční působení EPA/DHA ve vysokotukové CHF+F dietě bylo pozorováno i v tomto experimentu, jak je patrné z nižších hladin glukózy i inzulínu ve stavu na lačno. To potvrzuje i výpočet tzv. „HOMA-IR indexu“, který odhalil rozvinutou IR u myši na CHF+F dietě a zároveň významné zvýšení citlivosti organismu k inzulínu u CHF+F skupiny. Na druhou stranu byla u CHF skupiny prokázána významná korelace mezi hladinou glukózy na lačno a hmotnostním přírůstkem, která ale nebyla patrná u CHF skupiny. S tím souvisí i pozitivní korelace mezi hladinou inzulínu na lačno a hmotnostním přírůstkem, která se rovněž projevila jen u CHF skupiny. Absence výše uvedených korelací u CHF+F skupiny je zřejmě způsobena tím, že jednak nedošlo k tak výraznému nárůstu hmotnosti u CHF+F skupiny a dále, že n-3 LC-PUFA pozitivně ovlivňují citlivost organismu k inzulínu, čímž brání vzestupu jeho koncentrace v krvi.

Porovnání orálního a intraperitoneálního podání glukózy – možný vliv inkretinů

Inkretiny potencují glukózou stimulovanou sekreci inzulínu o 50 až 70 % (Nauck et al. 1986). Jejich sekrece je aktivována prostřednictvím receptorů ve střevě (Ahren 1998) a tedy intraperitoneální podání glukózy by nemělo aktivovat jejich sekreci. Tento efekt se projevil na odlišném průběhu glukózových křivek během OGTT a IPGTT. V případě OGTT dochází k rychlejšímu vzestupu koncentrace glukózy v krvi, díky lepšímu vstřebávání ve střevě oproti intraperitoneálnímu podání, a také k rychlejšímu transportu glukózy do buněk, což se projevuje strmějším poklesem glykémie. Celkově vyšší hladiny glukózy u OGTT jsou dány tím, že myši dostaly vzhledem ke své váze relativně vyšší dávku glukózy než v případě IPGTT.

Na glykemických křivkách v průběhu OGTT a IPGTT je také vidět benefiční vliv n-3 LC-PUFA. Zatímco myši na CHF dietě mají nižší citlivost k inzulínu ve srovnání se STD skupinou, u myši ze skupiny CHF+F musí být citlivost k inzulínu zlepšena, neboť n-3 LC-PUFA snižují maximální

dosaženou hladinu glukózy v průběhu OGTT i IPGTT. Navíc hladiny inzulínu na lačno, které představují nepřímý ukazatel citlivosti organismu k inzulínu, byly u CHF+F skupiny významně snižené ve srovnání s CHF skupinou.

Naměřené hladiny inzulínu v čase 30 minut po podání glukózy se u IPGTT a OGTT výrazně lišily, což nepřímo naznačuje působení inkretinů a jejich vliv na glukózou stimulovanou sekreci inzulínu, která byla u OGTT přibližně dvakrát vyšší než v případě IPGTT ve všech experimentálních skupinách.

V případě OGTT byla také pozorována výrazná stimulace sekrece inzulínu po podání glukózy u skupiny CHF+F, naopak u IPGTT se žádný rozdíl mezi CHF a CHF+F skupinou neprojevil. To naznačuje benefiční vliv dlouhodobého podávání n-3 LC-PUFA (EPA/DHA) na glukózou stimulovanou sekreci inzulínu, pravděpodobně prostřednictvím stimulace sekrece inkretinů, jejichž receptory jsou účinkem n-3 LC-PUFA aktivovány při akutním podání (Morishita et al. 2008). Benefiční efekt EPA/DHA na sekreci GLP-1 doposud nebyl jinde testován, nicméně Tanaka et al. (2008) prokázali zvýšení hladin GLP-1 a potenciaci sekrece inzulínu u dlouhodobého podávání ALA.

Také je známo, že β -buňky jsou schopné adaptace na sníženou citlivost organismu k inzulínu. Jedním z mechanismů této adaptace je zvýšení sekrece inzulínu díky vyšším hladinám NEFA (Itoh et al. 2003) nebo zvýšení senzitivity β -buněk k inkretinům u obézních jedinců s IR (Verdich et al. 2001). Nabízí se tedy i možnost, že by vysokotuková CHF+F dieta obohacená o n-3 LC-PUFA mohla zatím neznámým mechanismem zvyšovat citlivost β -buněk k inkretinům a potencovat sekreci inzulínu.

Jelikož hladiny inkretinů během OGTT a IPGTT nebyly zatím změřeny, není možné zapojení uvedených mechanismů jednoznačně potvrdit.

11 Závěry

V rámci vytyčených cílů mé diplomové práce jsem zjistila, že:

- 1) Nahrazení části tuků v dietě n-3 LC-PUFA jednoznačně snižuje nárůst hmotnosti při příjmu vysokotukové diety a s tím související rozvoj IR. Vliv n-3 LC-PUFA na tělesnou hmotnost se projevil přednostním snížením akumulace tuků v tukové tkáni a významným snížením hladiny lipidových metabolitů v plazmě. V játrech n-3 LC-PUFA brání akumulaci TAG, zatímco ve stavu na lačno významně snižují hladiny glukózy a inzulínu v cirkulaci.
- 2) Použití OGTT a IPGTT odhalilo výrazné rozdíly v regulaci glukózové homeostázy u myší na vysokotukové dietě. V případě OGTT došlo k rychlejšímu vzestupu glykémie a k rychlejšímu vstupu do tkání, a to pravděpodobně díky aktivaci sekrece inkretinů, které zvýšily glukózou stimulovanou sekreci inzulínu na dvojnásobek ve srovnání s IPGTT.
- 3) V případě OGTT došlo u skupiny CHF+F ve srovnání se skupinou CHF k významnému zvýšení hladin inzulínu po podání glukózy, což nepřímo naznačuje stimulaci sekrece inkretinů vlivem n-3 LC-PUFA.

12 Seznam obrázků a tabulek

TEORETICKÁ ČÁST

- Obr.1. Procenta obézních jedinců (BMI \geq 30) v populaci jednotlivých států světa12**
<http://apps.who.int/bmi/index.jsp>
- Obr.2. Uložení tuku v oblasti břicha 12**
<http://drpinna.com/visceral-fat-9928>
- Obr.3. Metabolická flexibilita organismu 14**
Kelley, D. E. (2005) Skeletal muscle fat oxidation: Timing and flexibility are everything. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 1699-1702.
- Obr.4. Mechanismy adaptace β -buněk na sníženou citlivost organismu k inzulínu 17**
Kahn, S. E., R. L. Hull & K. M. Utzschneider (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444, 840-846.
- Obr.5. Inzulínová signální kaskáda 19**
Korc, M. (2003) Diabetes mellitus in the era of proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2, 399-404.
- Obr.6. Vliv nárůstu tukové tkáně na celotělovou citlivost k inzulínu 21**
Kopelman, P. G. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature*, 404, 635-643.
- Obr.7. Zánět tukové tkáně 24**
<http://www.nutritionreview.org/wp/2010/11/fatty-liver-and-nash-the-silent-epidemic/>
- Obr.8. Metabolické přetížení v játrech 26**
Muoio, D. M. & C. B. Newgard (2008) Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 193-205.
- Obr.9. Metabolické přetížení v kosterním svalu 28**
Muoio, D. M. & C. B. Newgard (2008) Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 193-205.
- Obr.10. Fyziologické působení GLP-1 30**
Yu, Z. W. & T. R. Jin (2010) New insights into the role of cAMP in the production and function of the incretin hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1). *Cellular Signalling*, 22, 1-8.

Obr.11. Model GLP-1 potencionané sekrece inzulínu	32
Gromada, J., B. Brock, O. Schmitz & P. Rorsman (2004) Glucagon-like peptide-1: Regulation of insulin secretion and therapeutic potential. <i>Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology</i> , 95, 252-262.	
Obr.12. Benefiční účinky n-3 LC-PUFA na rozvoj obezity a inzulínové rezistence	35
Flachs, P., M. Rossmeisl, M. Bryhn & J. Kopecky (2009) Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. <i>Clinical Science</i> , 116, 1-16.	
Obr.13. Formace aktivních metabolitů z LC-PUFA.....	37
Flachs, P., M. Rossmeisl, M. Bryhn & J. Kopecky (2009) Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. <i>Clinical Science</i> , 116, 1-16.	

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Obr.14. Princip RIA metody	46
http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/Radioimmunoassay.html	
Obr.15. Princip dvoustupňové imunohistochemické metody	49
http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1385_1-59259-771-8_073-0	
Tab.1. Zastoupení makronutrientů a energetický obsah experimentálních diet	41
Tab.2. Složení mastných kyselin v experimentálních dietách	41
Kuda, O., T. Jelenik, Z. Jilkova, P. Flachs, M. Rossmeisl, M. Hensler, L. Kazdova, N. Ogston, M. Baranowski, J. Gorski, P. Janovska, V. Kus, J. Polak, V. Mohamed-Ali, R. Burcelin, S. Cinti, M. Bryhn & J. Kopecky (2009) n-3 Fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet (vol 52, pg 941, 2009). <i>Diabetologia</i> , 52, 1455-1455.	
Tab. 3. Pipetovací schéma Inzulin RIA kitu	47
Sensitive Rat Insulin RIA kit (LINCO Research, USA)	

VÝSLEDKY

Obr.16. Průběh nárůstu tělesné hmotnosti	52
Obr.17. Celkový přírůstek váhy a denní energetický příjem	53
Obr.18. Lipidové metabolity v plazmě	54
Obr.19. Obsah TAG v játrech	55
Obr.20. Vizualizace lipidových kapének v játrech	56

Obr.21. Plocha Langerhansových ostrůvků a plocha inzulín produkujících buněk	57
Obr.22. Morfologie Langerhansových ostrůvků	58
Obr.23. Koncentrace inzulínu v plazmě v sytém stavu	59
Obr.24. Intraperitoneální glukózový toleranční test	60
Obr.25. Orální glukózový toleranční test	60
Obr.26. Parametry glukózové homeostázy v průběhu IPGTT	61
Obr.27. Parametry glukózové homeostázy v průběhu OGTT	62
Obr.28. Hladiny glukózy a inzulínu ve stavu na lačno	63
Obr.29. Hodnoty „HOMA-IR indexu“	63
Obr.30. Vztah mezi hladinou glukózy na lačno a hmotnostním přírůstkem	64
Obr.31. Vztah mezi hladinou inzulínu na lačno a hmotnostním přírůstkem.....	64
Tab.4. Základní charakteristika myší v průběhu pokusu	53

13 Použitá literatura

- Adachi, T., T. Tanaka, K. Takemoto, T. A. Koshimizu, A. Hirasawa & G. Tsujimoto (2006) Free fatty acids administered into the colon promote the secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340, 332-337.
- Ahren, B. (1998) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. *Bioessays*, 20, 642-651.
- Boden, G., P. X. She, M. Mozzoli, P. Cheung, K. Gumireddy, P. Reddy, X. Q. Xiang, Z. J. Luo & N. Ruderman (2005) Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappa B pathway in rat liver. *Diabetes*, 54, 3458-3465.
- Boden, G. & G. I. Shulman (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*, 32, 14-23.
- Borwn, J. C., R. A. Pederson, E. Jorpes & V. Mutt (1969) Preparation of highly active enterogastrone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 47, 113-&.
- Braeuning, A., C. Ittrich, C. Kohle, S. Hailfinger, M. Bonin, A. Buchmann & M. Schwarz (2006) Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *Febs Journal*, 273, 5051-5061.
- Butler, A. E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R. A. Rizza & P. C. Butler (2003) beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52, 102-110.
- Caspar-Bauguil, S., B. Cousin, A. Galinier, C. Segafredo, M. Nibbelink, A. Andre, L. Casteilla & L. Penicaud (2005) Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *Febs Letters*, 579, 3487-3492.
- Chen, H., M. Montagnani, T. Funahashi, I. Shimomura & M. J. Quon (2003) Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 45021-45026.
- Clamp, A. G., S. Ladha, D. C. Clark, R. F. Grimble & E. K. Lund (1997) The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids*, 32, 179-184.
- Collombat, P., X. B. Xu, H. Heimberg & A. Mansouri (2010) Pancreatic beta-cells: From generation to regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21, 838-844.
- D'Alessandro, M. E., A. G. Chicco & Y. B. Lombardo. 2004. A long-term sucrose-rich diet increases diacylglycerol content and membrane nPKC theta expression and alters glucose metabolism in skeletal muscle of rats. In *14th Argentine Congress of Diabetes*, 289-296. Mar del Plata, ARGENTINA.
- Daval, M., F. Diot-Dupuy, R. Bazin, I. Hainault, B. Viollet, S. Vaulont, E. Hajduch, P. Ferre & F. Fofelle (2005) Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 25250-25257.

- de Heer, J., C. Rasmussen, D. H. Coy & J. J. Holst (2008) Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. *Diabetologia*, 51, 2263-2270.
- Dentin, R., F. Benhamed, J. P. Pegorier, F. Fougere, B. Viollet, S. Vaulont, J. Girard & C. Postic (2005) Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 2843-2854.
- Docherty, K. & A. R. Clark (1994) Nutrient regulation of insulin gene-expression. *Faseb Journal*, 8, 20-27.
- Drucker, D. J. & M. A. Nauck (2006) The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*, 368, 1696-1705.
- El-Haschimi, K., D. D. Pierroz, S. M. Hileman, C. Bjorbaek & J. S. Flier (2000) Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 105, 1827-1832.
- Elahi, D., D. K. Andersen, J. C. Brown, H. T. Debas, R. J. Hershcopf, G. S. Raizes, J. D. Tobin & R. Andres (1979) Pancreatic alpha-cell and beta-cell responses to GIP infusion in normal man. *American Journal of Physiology*, 237, E185-E191.
- Farilla, L., H. X. Hui, C. Bertolotto, E. Kang, A. Bulotta, U. Di Mario & R. Perfetti (2002) Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*, 143, 4397-4408.
- Fehmann, H. C. & J. F. Habener (1992) Galanin inhibits proinsulin gene-expression stimulated by the insulinotropic hormone Glucagon-like peptide-1 (7-37) in mouse insulinoma Beta-TC-1 cells. *Endocrinology*, 130, 2890-2896.
- Feuerer, M., L. Herrero, D. Cipolletta, A. Naaz, J. Wong, A. Nayer, J. Lee, A. B. Goldfine, C. Benoist, S. Shoelson & D. Mathis (2009) Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine*, 15, 930-U137.
- Flachs, P., O. Horakova, P. Brauner, M. Rossmeisl, P. Pecina, N. Franssen-van Hal, J. Ruzickova, J. Sponarova, Z. Drahota, C. Vlcek, J. Keijer, J. Houstek & J. Kopecky (2005) Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia*, 48, 2365-2375.
- Flachs, P., V. Mohamed-Ali, O. Horakova, M. Rossmeisl, M. J. Hosseinzadeh-Attar, M. Hensler, J. Ruzickova & J. Kopecky (2006) Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, 49, 394-397.
- Flachs, P., M. Rossmeisl, M. Bryhn & J. Kopecky (2009) Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clinical Science*, 116, 1-16.
- Fryer, L. G. D. & D. Carling (2005) AMP-activated protein kinase and the metabolic syndrome. *Biochemical Society Transactions*, 33, 362-366.
- Gromada, J., B. Brock, O. Schmitz & P. Rorsman (2004) Glucagon-like peptide-1: Regulation of insulin secretion and therapeutic potential. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 95, 252-262.

- Guilherme, A., J. V. Virbasius, V. Puri & M. P. Czech (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 367-377.
- Hattori, S., Y. Hattori & K. Kasai (2005) Hypoadiponectinemia is caused by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 54, 482-487.
- Hirasawa, A., K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, Y. Sugimoto, S. Miyazaki & G. Tsujimoto (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine*, 11, 90-94.
- Hirsch, J. & B. Batchelor (1976) Adipose-tissue cellularity in human obesity. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 5, 299-311.
- Hull, R., K. Kodama, K. Utzschneider, D. B. Carr, R. L. Prigeon & S. E. Kahn (2005) Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia*, 48, 1350-1358.
- Itoh, Y., Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, R. Fujii, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Uejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinobara, S. Hinuma, Y. Fujisawa & M. Fujino (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, 422, 173-176.
- Jelenik, T., M. Rossmeisl, O. Kuda, Z. M. Jilkova, D. Medrikova, V. Kus, M. Hensler, P. Janovska, I. Miksik, M. Baranowski, J. Gorski, S. Hebrard, T. E. Jensen, P. Flachs, S. Hawley, B. Viollet & J. Kopecky (2010) AMP-activated Protein Kinase alpha 2 Subunit Is Required for the Preservation of Hepatic Insulin Sensitivity by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Diabetes*, 59, 2737-2746.
- Jones, H. B., D. Nugent & R. Jenkins (2010) Variation in characteristics of islets of Langerhans in insulin-resistant, diabetic and non-diabetic-rat strains. *International Journal of Experimental Pathology*, 91, 288-301.
- Kahn, S. E., R. L. Hull & K. M. Utzschneider (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444, 840-846.
- Kahn, S. E., R. L. Prigeon, D. K. McCulloch, E. J. Boyko, R. N. Bergman, M. W. Schwartz, J. L. Neifing, W. K. Ward, J. C. Beard, J. P. Palmer & D. Porte (1993) Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human-subject - evidence for a hyperbolic function. *Diabetes*, 42, 1663-1672.
- Kamohara, S., R. Burcelin, J. L. Halaas, J. M. Friedman & M. J. Charron (1997) Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, 389, 374-377.
- Kim, S. J., C. Nian & C. H. S. McIntosh (2010) GIP increases human adipocyte LPL expression through CREB and TORC2-mediated trans-activation of the LPL gene. *Journal of Lipid Research*, 51, 3145-3157.
- Kopelman, P. G. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature*, 404, 635-643.
- Korc, M. (2003) Diabetes mellitus in the era of proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2, 399-404.
- Lombardo, Y. B., G. Hein & A. Chicco (2007) Metabolic syndrome: Effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids*, 42, 427-437.

- Mentlein, R., B. Gallwitz & W. E. Schmidt (1993) Dipeptidylpeptidase-IV hydrolyses Gastric-inhibitory polypeptide, Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *European Journal of Biochemistry*, 214, 829-835.
- Minokoshi, Y., Y. B. Kim, O. D. Peroni, L. G. D. Fryer, C. Muller, D. Carling & B. B. Kahn (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415, 339-343.
- Moller, D. E. (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 414, 821-827.
- Morishita, M., T. Tanaka, T. Shida & K. Takayama (2008) Usefulness of colon targeted DHA and EPA as novel diabetes medications that promote intrinsic GLP-1 secretion. *Journal of Controlled Release*, 132, 99-104.
- Mullen, A., C. E. Loscher & H. M. Roche (2010) Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 444-450.
- Muoio, D. M. & C. B. Newgard (2008) Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 193-205.
- Murano, I., G. Barbatelli, V. Parisani, C. Latini, G. Muzzonigro, M. Castellucci & S. Cinti (2008) Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *Journal of Lipid Research*, 49, 1562-1568.
- Nauck, M., F. Stockmann, R. Ebert & W. Creutzfeldt (1986) Reduced incretin effect in Type-2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 29, 46-52.
- Nauck, M. A., E. Bartels, C. Orskov, R. Ebert & W. Creutzfeldt (1992) Lack of effect of synthetic human Gastric-inhibitory polypeptide and Glucagon-like peptide-1 7-36 amide infused at near-physiological concentration on Pentagastrin-stimulated gastric-acid secretion in normal human-subjects. *Digestion*, 52, 214-221.
- Nauck, M. A., M. M. Heimesaat, C. Orskov, J. J. Holst, R. Ebert & W. Creutzfeldt (1993) Preserved incretin activity of Glucagon-like peptide-1 7-36 amide but not of synthetic human Gastric-inhibitory polypeptide in patients with Type-2 Diabetes-mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 301-307.
- Neschen, S., I. Moore, W. Regittnig, C. L. Yu, Y. L. Wang, M. Pypaert, K. F. Petersen & G. I. Shulman (2002) Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282, E395-E401.
- Newgard, C. B. & J. D. McGarry (1995) Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal-transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 689-719.
- Oben, J., L. Morgan, J. Fletcher & V. Marks (1991) Effect of the enteropancreatic hormones, Gastric-inhibitory polypeptide and Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide, on fatty-acid synthesis in explants of rat adipose tissue. *Journal of Endocrinology*, 130, 267-272.

- Oh, D. Y., S. Talukdar, E. J. Bae, T. Imamura, H. Morinaga, W. Q. Fan, P. P. Li, W. J. Lu, S. M. Watkins & J. M. Olefsky (2010) GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell*, 142, 687-698.
- Paris, M., C. Bernard-Kargar, M. F. Berthault, L. Bouwens & A. Ktorza (2003) Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology*, 144, 2717-2727.
- Pighin, D., L. Karabatas, A. Rossi, A. Chicco, J. C. Basabe & Y. B. Lombardo (2003) Fish oil affects pancreatic fat storage, pyruvate dehydrogenase complex activity and insulin secretion in rats fed a sucrose-rich diet. *Journal of Nutrition*, 133, 4095-4101.
- Prentki, M., E. Joly, W. El-Assaad & R. Roduit (2002) Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity - Role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*, 51, S405-S413.
- Rajshaker, S., D. Manka, A. L. Blomkalns, T. K. Chatterjee, L. L. Stoll & N. L. Weintraub (2010) Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 191-196.
- Randle, P. J., P. B. Garland, E. A. Newsholme & C. N. Hales (1963) Glucose fatty-acid cycle - Its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances of Diabetes mellitus. *Lancet*, 1, 785-&.
- Raybould, H. E., J. H. Meyer, Y. Tabrizi, R. A. Liddle & P. Tso (1998) Inhibition of gastric emptying in response to intestinal lipid is dependent on chylomicron formation. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 274, R1834-R1838.
- Robertson, M. D., K. G. Jackson, B. A. Fielding, L. M. Morgan, C. M. Williams & K. N. Frayn (2002) Acute ingestion of a meal rich in n-3 polyunsaturated fatty acids results in rapid gastric emptying in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 232-238.
- Rossi, A. S., Y. B. Lombardo, J. M. Lacorte, A. G. Chicco, C. Rouault, G. Slama & S. W. Rizkalla (2005) Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 289, R486-R494.
- Saltiel, A. R. & C. R. Kahn (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.
- Schwab, J. M., N. Chiang, M. Arita & C. N. Serhan (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*, 447, 869-874.
- Shimabukuro, M., K. Koyama, G. X. Chen, M. Y. Wang, F. Trieu, Y. Lee, C. B. Newgard & R. H. Unger (1997) Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 4637-4641.
- Storlien, L., N. D. Oakes & D. E. Kelley. 2003. Metabolic flexibility. In *12th Conference of the International-Research-Group-on-the-Biochemistry-of-Exercise*, 363-368. Maastricht, NETHERLANDS.

- Suga, S., T. Kanno, Y. Ogawa, T. Takeo, N. Kamimura & M. Wakui (2000) cAMP-independent decrease of ATP-sensitive K⁺ channel activity by GLP-1 in rat pancreatic beta-cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 440, 566-572.
- Tanaka, T., T. Yano, T. Adachi, T. A. Koshimizu, A. Hirasawa & G. Tsujimoto (2008) Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 377, 515-522.
- Tilg, H. & A. R. Moschen (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6, 772-783.
- Tishinsky, J. M., D. W. L. Ma & L. E. Robinson (2011) Eicosapentaenoic Acid and Rosiglitazone Increase Adiponectin in an Additive and PPAR gamma-Dependent Manner in Human Adipocytes. *Obesity*, 19, 262-268.
- Todoric, J., M. Loffler, J. Huber, M. Bilban, M. Reimers, A. Kadl, M. Zeyda, W. Waldhausl & T. M. Stulnig (2006) Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*, 49, 2109-2119.
- Torres-Leal, F. L., M. H. Fonseca-Alaniz, M. M. Rogero & J. Tirapegui (2010) The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell Biochemistry and Function*, 28, 623-631.
- Trumper, A., K. Trumper, H. Trusheim, R. Arnold, B. Goke & D. Horsch (2001) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Molecular Endocrinology*, 15, 1559-1570.
- Tsai, C. H., M. Hill, S. L. Asa, P. L. Brubaker & D. J. Drucker (1997) Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 273, E77-E84.
- Turton, M. D., D. Oshea, I. Gunn, S. A. Beak, C. M. B. Edwards, K. Meeran, S. J. Choi, G. M. Taylor, M. M. Heath, P. D. Lambert, J. P. H. Wilding, D. M. Smith, M. A. Ghatei, J. Herbert & S. R. Bloom (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379, 69-72.
- Ukropcova, B., M. McNeil, O. Sereda, L. de Jonge, H. Xie, G. A. Bray & S. R. Smith (2005) Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 1934-1941.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino & G. S. Hotamisligil (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389, 610-614.
- Verdich, C., S. Toubro, B. Buemann, J. L. Madsen, J. J. Holst & A. Astrup (2001) The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety - effect of obesity and weight reduction. *International Journal of Obesity*, 25, 1206-1214.
- Viollet, B., B. Guigas, J. Leclerc, S. Hebrard, L. Lantier, R. Mounier, F. Andreelli & M. Foretz (2009) AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiologica*, 196, 81-98.
- Wellen, K. E. & G. S. Hotamisligil (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1785-1788.

- Willms, B., N. Kleine, C. Orskov, J. J. Holst, M. A. Nauck & W. Creutzfeldt (1993) Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous GLP-1 (7-36 amide) in Type-2-diabetic. *Diabetologia*, 36, A47-A47.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn & T. Kadowaki (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, 8, 1288-1295.
- Yaney, G. C., V. N. Civelek, A. M. Richard, J. S. Dillon, J. T. Deeney, J. A. Hamilton, H. M. Korchak, K. Tornheim, B. E. Corkey & A. E. Boyd (2001) Glucagon-like peptide 1 stimulates lipolysis in clonal pancreatic beta-cells (HIT). *Diabetes*, 50, 56-62.
- Ye, J. P., Z. G. Gao, J. Yin & Q. He (2007) Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293, E1118-E1128.
- Yin, J., Z. G. Gao, Q. He, D. Q. Zhou, Z. K. Guo & J. P. Ye (2009) Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296, E333-E342.
- Yu, C. L., Y. Chen, G. W. Cline, D. Y. Zhang, H. H. Zong, Y. L. Wang, R. Bergeron, J. K. Kim, S. W. Cushman, G. J. Cooney, B. Atcheson, M. F. White, E. W. Kraegen & G. I. Shulman (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 50230-50236.
- Yudkin, J. S., E. Eringa & C. D. A. Stehouwer (2005) "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet*, 365, 1817-1820.
- Zander, M., S. Madsbad, J. L. Madsen & J. J. Holst (2002) Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*, 359, 824-830.
- Zhang, H. H., M. Halbleib, F. Ahmad, V. C. Manganiello & A. S. Greenberg (2002) Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human Adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*, 51, 2929-2935.