

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Dizertační práce

Nutriční faktory rozvoje inzulínové rezistence  
kosterního svalu

Nutritional Factors in Skeletal Muscle Insulin Resistance Development

MUDr. Jan Gojda

Školitel: Prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

---

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Finanční prostředky byly čerpány výhradně ze zdrojů: výzkumný záměr MSM 0021620814, grant IGA NT 14416 a PRVOUK P30.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 7. 4. 2017

Jan Gojda

Podpis

---

Identifikační záznam:

GOJDA, Jan. *Nutriční faktory rozvoje inzulinové rezistence kosterního svalu. [Nutritional factors in skeletal muscle insulin resistance development]*. Praha, 2017. 105 stran, 4 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, II. interní linika 3. LF UK 2017. Prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

**Klíčová slova:** *inzulín, inzulinová rezistence, větvené aminokyseliny, vegan*

**Key words:** *insulin, insulin resistance, branched chain amino acids, vegan*

---

## Obsah

PŘEDMLUVA A PODĚKOVÁNÍ .....	5
LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	9
<i>Epidemiologie</i> .....	9
<i>Základní vymezení pojmů</i> .....	9
<i>Fyziologie glukózové homeostázy</i> .....	10
<i>Inzulínová rezistence</i> .....	17
<i>Selhání <math>\beta</math>-buněk</i> .....	25
<i>Nutriční faktory rozvoje IR, veganská dieta</i> .....	26
<i>Větvené aminokyseliny</i> .....	28
CÍLE ŘEŠENÍ A HYPOTÉZY .....	33
<i>Východiska</i> .....	33
<i>Specifické řešené okruhy</i> .....	33
<i>Cíle a hypotézy</i> .....	35
METODOLOGIE.....	36
<i>Design observační studie a subjekty</i> .....	36
<i>Design intervenční studie a subjekty</i> .....	37
<i>Autorizace a etická komise</i> .....	38
<i>Metody</i> .....	38
VÝSLEDKY .....	49
<i>Observační studie</i> .....	49
<i>Intervenční studie</i> .....	57
DISKUZE.....	65
<i>Observační studie</i> .....	65
<i>Intervenční studie</i> .....	69
IMPLIKACE PRO DIETOLOGII .....	74
SOUHRN .....	76
SUMMARY .....	79
REFERENCE .....	82
PUBLIKAČNÍ AKTIVITA .....	101
PŘÍLOHY .....	105

---

## Předmluva a poděkování

Dis-moi ce que tu manges, je te dirai ce que tu es; řekni mi, co jíš, a já ti povím, kdo jsi. Frází z Fyziologie chuti profesora Brillant-Savarina bychom mohli začít předmluvu k tématu vlivu nutričních faktorů na rozvoj syndromu inzulinové rezistence. Téma je v širším kontextu na pomezí dvou oborů, diabetologie a dietologie, se kterými jsem svázal nejen svou vědeckou, ale také klinickou kariéru.

Prevalence diabetu a chorob asociovaných s inzulinovou rezistencí je na vzestupu a dosahuje v celosvětovém měřítku pandemických rozměrů. Je zřejmé, že za takový posun musejí být zodpovědné environmentální faktory. Kandidátních „toxických“ faktorů v zevním prostředí je pospána celá řada, od nepoměru v příjmu a výdeji kalorií, přes expozici chemickým sloučeninám s účinky endogenních dysruptorů, až po fyzickou inaktivitu či psychický stres. Významnou roli přitom sehrávají právě faktory nutriční. Jedná se nejen o kvantitu příjmu makronutrientů, ale také kvalitu jednotlivých jejich komponent a komplexní dietní vzorec, ve kterém se dostávají do organismu. Kromě toho, že se v běžné stravě vyskytuje řada protektivních a problematických nutrientů, přijímáme stravou také řadu vyložené toxických substancí. Kromě toho, že nutrienty mají svoje funkce metabolické, mají také úlohy signální. A kromě toho, že působí na cílové tkáně v lidském organismu přímo svojí dostupností, modulují také střevní mikrobiom, jehož secernované působky mají potom přímý dopad na makroorganizmus. Již z tohoto je zřejmé, že problematika je komplexní, a že se výzkum v oblasti dietologie těší neutuchající vědecké pozornosti.

V základním výzkumu patofyziologie diabetu na humánních subjektech vycházíme z observačních dat porovnávacích modelové populace, které se liší v parametrech glukóze homeostázy. Tak byly například definovány základní patofyziologické mechanismy rozvoje IR na základě porovnání mezi hubenými a obézními subjekty, mezi inzulin rezistentními subjekty s diabetem a bez diabetu a podobně. Analogicky vliv environmentálních faktorů bylo možné popsat na základě studií monozygotních dvojčat diskordantních pro diabetes 2. typu. Pro řešení specifické otázky vlivu nutričních faktorů na inzulinovou rezistenci (IR) jsme zvolili jako vhodný model populaci veganů. Vegani mají na jedné straně výrazně odlišný způsob stravování s restrikcí celé řady základních složek “západní” diety,

---

a na straně druhé mají dle rozsáhlých epidemiologických dat nižší prevalenci stavů a chorob asociovaných s IR, zejména obezity a diabetu 2. typu, ale také některých nádorových onemocnění. Skupinu veganů jsme podrobili detailnější metabolické fenotypizaci s cílem experimentálně a kontrolovaně ověřit stávající epidemiologická data. Tato observační studie byla předmětem první části řešení dizertace. Potvrdili jsme, že vegani mají vyšší inzulínovou senzitivitu, a že jsou v lepší kondici v řadě metabolických parametrů. Následně byl model „vegan vs. omnivor“ využit v testování hypotézy, že aminokyseliny s větveným řetězcem (branched chain amino acids, BCAA) mají kauzální roli v časně fázi deteriorace inzulínové senzitivity tukové tkáně a kosterního svalu, jak naznačovala dostupná literatura.

Fyziologická část projektů probíhala na Oddělení klinické fyziologie 2. interní kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Toto pracoviště se během doby mého působení změnilo z vyšetřovny funkčních testů v kompetitivní pracoviště charakteru výzkumného oddělení, které splňuje přísné normy akreditace zdravotnického zařízení a dobré klinické praxe, kde v bezprostřední blízkosti vyšetřovny je preanalytická laboratoř s možností přípravy vzorků, a kde provoz zajišťuje kvalifikovaný personál.

Řešení projektů v rámci dizertace by nebylo možné bez institucionální (výzkumný záměr MSM 0021620814 a PRVOUK P30) a účelové (grant IGA NT 14416) finanční podpory, za kterou děkuji.

Zásadní byla spolupráce s kolegy z jiných laboratoří v rámci Centra pro výzkum diabetu, metabolismu a výživy 3. lékařské fakulty, jež jsou jmenovitě uvedeni jako spoluautoři publikací dizertace. Této spolupráce si velmi vážím a patří jim můj dík.

Díky patří také lidem, kteří nejsou uvedeni v seznamu spoluautorů publikací a to doc. Janu Polákovi a doc. Františku Duškovi, od kterých se mi vždy dostalo rady a povzbuzení, když ho bylo třeba.

Děkuji také všem kolegyním sestrám, které asistovaly u funkčních testů a biopsií: Dianě Čmuchačkové, Blance Hornikové, Ivaně Pánkové, Tereze Rychtaříkové, Zuzaně Jindrové, Anně Rácové, Hance Dvořákové a Lence Macounové.

Zvláštní dík patří technické vedoucí oddělení klinické fyziologie Janě Potočkové. Děkuji jí nejen za technickou podporu při realizaci projektů, logistice, přípravě vzorků

---

a vedení databází, ale zejména za její moudrý náhled, se kterým se chápe světa kolem sebe, a který je přínosem pro všechny vědecké projekty pracoviště.

A last but not least, bych rád poděkoval svému učiteli prof. Michalu Andělovi. Probudil ve mně lásku k fyziologii, byl mi trpělivým rádcem a průvodcem po nelehkých cestách kombinovaného doktorského studia a klinické praxe a v neposlední řadě mi byl, je i bude příkladným lékařem a vědcem kritického a nestárnoucího ducha.

---

## Seznam zkratek

4EBP-1: vazebný protein 1 pro eukaryotický iniciační faktor 4E	HEC: hyperinzulinemický euglykemický clamp
AA: aminokyseliny	IS: inzulínová senzitivita
ACOX: acyl CoA oxidáza	IR: inzulínová rezistence
AKT: protein kináza B	IRS: inulin receptor substrate
AT: adipose tissue, tuková tkáň	IU: mezinárodní jednotky
ATP: adenosin trifosfát	mTOR: mammalian target of rapamycin
BCAA: branched chain amino acids, aminokyseliny s větveným řetězcem	PPAR $\gamma$ : peroxisom proliferator activated receptor gamma
BCKDHA, BCKDHB: branched chain keto acid dehydrogenáza A a B	PLIN-1, PLIN-2: perilipiny
BIA: bioimpedance	ROS: reaktivní formy kyslíku
CD3g: cluster of differentiation 3, povrchový antigen T lymfocytů	S6K1: p70-S6 kináza 1
CPT1b: kreatin-palmitoyl tranferáza 1 $\beta$	SCD-1, SCD-5: stearyl CoA desaturázy
DAG: diacylglycerol	SM: skeletal muscle, kosterní sval
DGAT-2: diglycerol acyl transferáza	TAG: triglyceridy
FASN: fatty acid syntáza	T2DM: diabetes mellitus 2. typu
FFA: volné mastné kyseliny	VO <sub>2</sub> max: maximální spotřeba kyslíku během zátěžového testu
GLUT-4: glucose transporter 4	



---

## 1. Literární úvod a přehled problematiky

### 1.1. *Epidemiologie*

Obezita a diabetes 2. typu (T2DM) jsou rizikovými faktory rozvoje aterosklerózy a jejích komplikací (Zimmet et al. 2001) a podílejí se tak významnou měrou na kardiovaskulární mortalitě ve vyspělých zemích (Godsland et al. 2011). Diabetes mellitus 2. typu představuje jeden z nejvýznamnějších faktorů celosvětové nemocnosti a úmrtnosti. Celosvětová prevalence dosahuje pandemických rozměrů a podle odhadů International Diabetes Foundation bylo v roce 2013 evidován 382 miliónů případů tohoto onemocnění. Nejvyšší incidence je v současné době v rychle se rozvíjejících zemích Asie a Latinské Ameriky (International Diabetes Federation 2015).

V České Republice bylo v roce 2013 evidováno bezmála 862 tisíc pacientů s diabetem, z toho prakticky 95 % pacientů má T2DM (Zvolný 2015). Meziroční nárůst je asi 20 tisíc a od roku 1980 počet pacientů vzrostl 2,5 krát. Očekává se, že v roce 2035 bude mít každý desátý obyvatel České republiky diabetes. Morbidita a mortalita je dána jednak makrovaskulárními komplikacemi a jednak specifickými komplikacemi, retinopatií, nefropatií a neuropatií či jejich kombinací jako například syndromem diabetické nohy. I přes významné léčebné pokroky a komplexní péči, které se diabetikům dostává, se jejich očekávané dožití zkracuje až o 12 let oproti obecné populaci (Leal et al. 2009).

### 1.2. *Základní vymezení pojmů*

Diabetes je heterogenní skupina onemocnění, které sdílejí společný syndromologický základ v hyperglykémii a jejích symptomech. Dizertace se zabývá specificky diabetem 2. typu, který je součástí tzv. metabolického syndromu, a který jeví vysokou podmíněnost environmentálními faktory. Diabetes je definován jako přítomnost lačné glykémie nad 7,0 mmol/l či náhodná glykémie či glykémie v 2. hodině OGTT nad 11,1 mmol/l ve venózní krvi (minimálně ze dvou měření). I když diabetes dnes vnímáme jako komplexní poruchu

---

---

intermediárního metabolismu, která nevyjímá metabolické osudy ani jednoho ze základních energetických substrátů (sacharidů, lipidů a proteinů), v klinické praxi se zaměřujeme zejména na defekty v glukoregulaci. Tato praktická simplifikace má hned několik důvodů. Diabetes mellitus je syndrom, který se klinicky manifestuje právě symptomy z hyperglykemie (osmotická symptomatologie), a původně byla také tato jednotka definována přítomností sladké moči. Glykemie je těsně regulována a jeví velmi malou interindividuální variabilitu, je přístupná laboratornímu stanovení a její hodnoty korelují s metabolickou kompenzací diabetu a rizikem jeho pozdních komplikací. Hyperglykemie se mechanismem glukotoxicity podílí na chronických komplikacích diabetu poškozováním struktury makromolekul ve tkáních. A v neposlední řadě používáme mechanisticky glukoregulační smyčku (viz dále) k popisu snížené odpovědi hlavních glukoregulačních tkání na inzulín, tzv. inzulínové rezistenci.

Inzulínová rezistence (IR), jako fyziologický fenomén nižší metabolické odpovědi tkání na inzulín je v detailech popsána v příslušných kapitolách. Pokud hovořím v textu o IR, pak se jedná o pokles citlivosti cílových tkání na inzulín v širokém slova smyslu. Pokud hovořím o syndromu IR, pak mám na mysli tzv. metabolický syndrom, onemocnění charakterizované společným výskytem obezity, arteriální hypertenze, inzulínové rezistence či diabetu a dyslipidemie, které je významným kardiovaskulárním rizikovým faktorem. Pokud užívám v textu dizertace termín diabetes, není-li uvedeno jinak, mám na mysli diabetes 2. typu.

### **1.3. Fyziologie glukózové homeostázy**

Nositeli energie v organismu jsou makroergní sloučeniny na bázi fosfátu, zejména adenosin trifosfát (ATP), které jsou schopny uvolnit energii při exergonní hydrolýze svojí struktury. Jako energetické substráty pak označujeme uhlíkaté sloučeniny, které mohou být v buňce použity pro genezi makroergních vazeb. Mezi základní energetické substráty řadíme právě glukózu. Zdrojem pro glukózu jsou jednoduché či komplexní sacharidy ze stravy. Štěpení sacharidů je podmíněno aktivitou slinné a pankreatické amylázy a oligosacharidáz kartáčového lemu, které hydrolyzují složitější cukry za vzniku mono a disacharidů.

Ty jsou následně resorbovány do enterocytů a uvolněny do portální cirkulace. Portální krev před nabídkou do systémové cirkulace protéká slinivkou, kde omývá  $\beta$ -buňky a stimuluje sekreci inzulínu. Jedná se o zásadní glukostatický mechanismus (viz dále). Glukózu mohou využít všechny buňky v organismu, aby ale mohla svoje metabolické a signální funkce vykonat, musí se dostat přes cytoplazmatickou membránu. Tak se děje facilitovanou difúzí přes rodinu GLUT transportérů. V současné době je jich popsáno celkem 14, avšak jen málo z nich má známé a definované účinky v resorpci glukózy (Thorens a Mueckler 2010). S ohledem na glukoregulaci má významné postavení GLUT-4 transportér, který je exprimován zejména na buňkách kosterního svalu, srdečního svalu a adipocytu. Translokaci GLUT-4 na povrch buněk a tedy i jejich transportní kapacitu reguluje inzulínová signální kaskáda (viz dále).

**Tabulka 1** Schéma základních GLUT receptorů.  $K_m$  je konstanta Michaelis-Mentenové, která uvádí molární koncentraci, při které je dosaženo 50% transportní kapacity systému. Adaptováno z (Thorens a Mueckler 2010).

Transportér	Funkce	$K_m$ (mmol/l)	Tkáňová exprese
GLUT-1	Bazální odsun glukózy	~1,5	Ubikviterní, zejména neurony
GLUT-2	Glukózový senzor, exkrece glukózy	~17	$\beta$ -buňky, hepatocyt, tubulární epitelie, enterocyt
GLUT-3	Bazální odsun glukózy	~1,5	Neurony, placenta, krevní elementy, ubikviterní
GLUT-4	Inzulínem stimulovaný odsun glukózy	5	Kosterní sval, kardiomyocyt, adipocyt

Za aerobních podmínek slouží glukóza jako výchozí substrát pro glykolýzu a aerobní fosforylaci. Glukóza má unikátní postavení mezi energetickými substráty, protože je možné ji využít i za podmínek anaerobních, v takovém případě je konečným produktem anaerobní glykolýzy laktát a dvě molekuly ATP. Tkáně, které nejsou schopny využít jiné substráty než glukózu nazýváme glukóza dependentní, a s jistou rezervou mezi ně řadíme zejména neurony a buňky bez mitochondrií. Například centrální nervový systém člověka za normálních okolností denně spotřebuje v průměru 100 gramů glukózy. Úloha glukózy

---

v organismu však nespočívá jen v jejím oxidativním metabolismu. Glukóza je výchozím substrátem v řadě anaplerotických reakcí, kde je zdrojem uhlíku a substrátů intermediárního cyklu (Farfari et al. 2000). Dále je výchozím substrátem pentofosfátového cyklu (PPC), ve kterém je jejím osudem přeměna na pětiuhlíkatý cukr (ribózu, prekurzor pro syntézu ribonukleových kyselin). V oxidativní části PPC NADPH dehydrogenáza redukuje NADPH, což je redoxní ekvivalent s redukční funkcí v řadě syntetických drah a s podílem na redukování glutathionu a tedy buněčné antioxidační kapacitě. Je třeba si uvědomit, že glukóza se stává modulací dostupnosti ATP zřejmě nejvýznamnější a nejuniverzálnější signální molekulou v organismu (Thorens a Mueckler 2010).

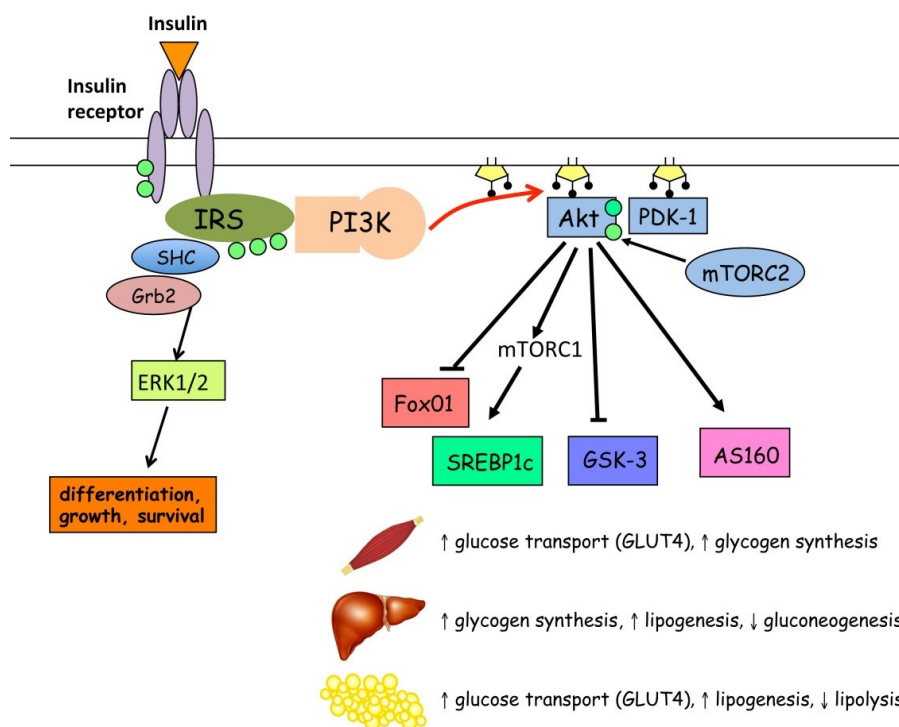
Z těchto četných funkcí glukózy v organismu je zřejmé, že glukózová homeostáza musí být těsně regulována. V pravdě je hladina cirkulující glukózy regulována nejtěsněji ze všech energetických substrátů. Klíčovým hormonálním systémem pro regulaci metabolismu glukózy je systém inzulínu a jeho kontraregulačních hormonů (glukagonu, kortizolu, katecholaminů a růstového hormonu). O převládajícím metabolickém efektu celého systému rozhodují molární poměry mezi inzulínem a jeho kontraregulačními protějšky, zejména glukagonem (Unger 1971). Inzulín je produkován a secernován v pulzech  $\beta$ -buňkami pankreatických ostrůvků. Je tedy vyplavován do portálního řečiště, kde dosahuje nejvyšších koncentrací. Inzulín je obecně anaboličným hormonem, jenž vykazuje účinky metabolické a prorůstové (Djiogue et al. 2013). Inzulínové receptory se nacházejí prakticky na všech buňkách v organismu (Kahn a Goldfine 1993). Jedná se o příslušníky rodiny receptorů insulin-like růstových faktorů, kterým je společná tyrozin-kinázová aktivita. Inzulínový receptor je transmembránový heterodimer. Vazba ligandu (inzulínu) na receptor vede k autofosforylaci intracelulární porce receptoru a fosforylaci inzulínových receptorových substrátů (IRS). Ty následně spustí signalizační kaskádu, která záleží v řadě fosforylačních reakcí ve dvou hlavních signálních drahách: přes fosfatidyl inositol trifosfát kinázu (PI3K) a protein kinázu B (neboli AKT kinázu) a přes ERK kinázovou kaskádu (extra cellular signal regulated kinase). Účinky kaskád jsou zprostředkované jak genomicky (cestou aktivace transkripčních faktorů a exprese genu), tak negenomicky. Efektů inzulínu je popsáno značné množství a jeví výraznou tkáňovou specifitu. Ale v zásadě se jedná o účinky metabolické (vstřebávání substrátů, syntéza makromolekul) a mitogenní (růst, diferenciace, antiapoptóza). Obecně se tedy jedná o efekty zajišťující růst a obnovu tkání a tomu odpovídající účinky na zvýšení dostupnosti substrátů. Účinky inzulínu jsou v různých tkáních

---

odlišné a ve většině z nich inzulín vykazuje pouze svoje účinky proproliferativní. Hlavními orgány, kde inzulín vykazuje účinky na intermediární metabolismus, jsou játra, kosterní sval a tuková tkáň (Turner 2013).

**Obrázek 1** Schematické znázornění inzulinové signální kaskády.

Adaptováno z (Turner 2013).



V játrech není vstřebávání glukózy závislé na aktivaci specifických přenašečů. Transport glukózy do hepatocytu se děje přes inzulín non dependentní GLUT-2 transportér. Dalším krokem je enzym glukokináza, která fosforyluje vstřebanou glukózu a udržuje tak její nízkou intracelulární koncentraci a koncentrační gradient. Vzniklý glukóza-6-fosfát je směřován buď k oxidaci či k neoxidativní utilizaci. Inzulín stimuluje syntézu glykogenu a tlumí jeho hydrolýzu a inhibuje glukoneogenezu. Tedy snižuje jaterní produkci glukózy. Akcelerací glykolýzy zvyšuje dostupnost acetyl CoA a malonyl CoA, které jsou jednak směřovány k přímé oxidaci v citrátovém cyklu a aerobní fosforylaci, a jednak se stávají prekurzory pro syntézu mastných kyselin a lipogenezi. Inzulín přímo aktivuje klíčový enzym acetyl CoA karboxylázu. Dále inzulín zvýšením dostupnosti malonyl CoA inhibuje transport

---

FA do mitochondrie (inhibicí CPAT, karnitin-palitoyl-acyl-transferázy), snižuje jejich oxidaci a FA jsou tak směřovány v inzulínem stimulovaném stavu primárně k lipogenezi. Nižší oxidace FA také znamená snížení ketogeneze. Inzulín dále aktivuje proteosyntézu cestou aktivace downstream kaskád od mTOR (mammalian target of rapamycin) a inhibuje proteolýzu.

V *kosterním svalu* vede aktivace inzulínové kaskády k translokaci GLUT-4 receptorů na sarkoplazmatickou membránu a dochází ke zvýšení sekundárně aktivního transportu glukózy do buněk. Glukóza je následně fosforylována hexokinázou a směřována buď k syntéze glykogenu či glykolýze. Část tříuhlíkatých produktů glykolýzy, která není dále oxidována, se stává ve svalu prekurzorem pro syntézu lipidů (Van Der Vusse a Reneman 2011) a část je uvolněna do cirkulace a stávají se prekurzory pro jaterní glukoneogenezu. Inzulín stimuluje facilitovanou difúzi aminokyselin do kosterního svalu (Bonadonna et al. 1993) a syntézu proteinů cestou mTOR (Timmerman et al. 2010).

Inzulín v *tukové tkáni* aktivuje heparin senzitivní lipoproteinovou lipázu, která štěpí triglyceridy (TAG) obsažené v cirkulujících lipoproteinech, glycerol a FA jsou následně vstřebány adipocytom, kde se stávají prekurzory pro resyntézu TAG. Inzulín naopak inhibuje hormon senzitivní lipázu (resp. je inhibována nižší hladinou kontraregulačních hormonů) a inhibuje lipolýzu (rev. in Murray 2012).

Z hlediska metabolického nastavení glukoregulační smyčky lze rozlišit v zásadě dva krajní stavy: postprandiální (po příjmu substrátů) a postabsorptivní (lačnění). Tomu odpovídá i regulační hormonální a vegetativní milieu. Výše zmíněný popis metabolických účinků inzulínu de facto odpovídá nastavení intermediárního metabolismu v období stimulované sekrece inzulínu, tedy postprandiálně. V době postprandiální je intermediární metabolismus nastaven na syntézu zásobních forem substrátů (glykogen, tuky, s jistou rezervou i viscerální a svalový protein), ze kterých čerpá po ukončení resorpce substrátů ze střeva. Naopak v průběhu lačnění postupně sekrece inzulínu klesá, zvyšuje se poměrné množství cirkulujících kontraregulačních hormonů, a organizmus je připraven na katabolismus zásob. Dochází k vystupňování jaterní produkce glukózy (glykogenolýza, glukoneogeneza), aby byla udržena glykemie. V tukové tkáni je deblokována hormon senzitivní lipáza, dochází k lipolýze a zvýšení fluxu volných FA a glycerolu do jater. V játrech jsou FA oxidovány, uvolňovány ve formě VLDL lipoproteinů do periferie a nadbytečný acetyl CoA se stává prekurzorem pro syntézu ketolátek (acetoacetát,  $\beta$ -hydroxybutyrát a aceton). Glycerol pak

---

---

substrátem pro glukoneogenezu. Ketolátky jsou uvolňovány do cirkulace a stávají se alternativním substrátem zejména pro glukóza-dependentní tkáně. Dochází k degradaci viscerálního a svalového proteinu, který se stává zdrojem glukogenních a ketogenních aminokyselin. I během protražovaného hladovění je však minimální sekrece inzulínu zachována a drží tak na uzdě jak jaterní produkci glukózy, tak lipolýzu v tukové tkáni a tedy i ketogenezu.

Schopnost této adaptivní metabolické fluktuace byla během fylogenetického vývoje člověka nezbytná pro zvládnání diskontinuálního příjmu stravy.

*Citlivost na inzulín* reflektuje míru biologických účinků inzulínu na periférii. Jen některé z těchto efektů je však možné experimentálně ověřit. Lze například stanovit rezpozivitu inzulínu na odsunu glukózy do kosterního svalu, na inhibici jaterní produkce glukózy či na lipolýzu v tukové tkáni. Citlivost na inzulín je tkáňově specifická, kolísá během dne i během života. Obecně ale platí, že relativně nejcitlivější na inzulín je inhibice lipolýzy, následovaná supresí endogenní produkce glukózy játry a odsunem glukózy do kosterního svalu (viz také dále).

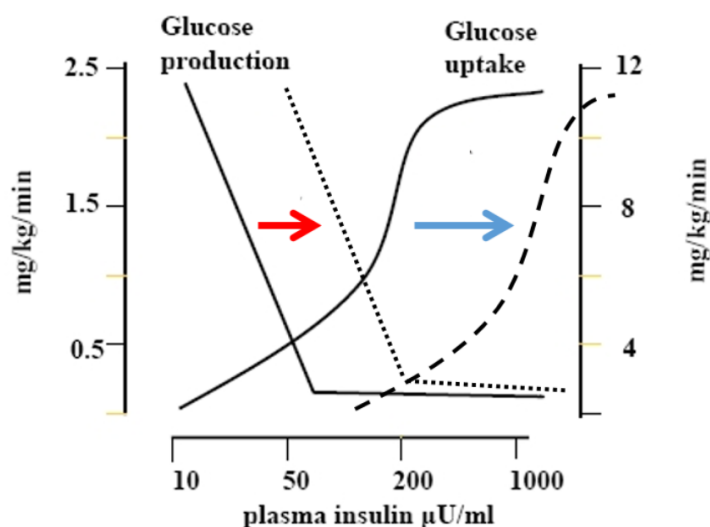
*Sekrece inzulínu.* Za syntézu a sekreci inzulínu jsou zodpovědné  $\beta$ -buňky Langerhansových ostrůvků. Inzulín je exprimován jako preproinzulín. Dalšími posttranslačními modifikacemi v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu vzniká samotná dvojřetězcová struktura inzulínu, a v ekvimolárním poměru také C-peptid (connecting peptide). Syntéza inzulínu je pod kontrolou dostupnosti ATP a tedy substrátového fluxu do buňky. Inzulín je deponován v sekrečních granulech a je připraven k exocytóze po stimulaci. Mechanismus stimulace sekrece inzulínu je komplexní a existuje hned několik drah, které konvergují na zvýšení intracelulární pohotovosti  $Ca^{2+}$ , která vede k posunu váčků mikrofilamenty a mikrotubuly. Primárním stimulem pro sekreci inzulínu je dostupnost energetických substrátů, zejména glukózy, ale také ketolátek, FA i některých aminokyselin. Kromě toho se také uplatňuje regulace humorální a vegetativní (Yang et al. 2006). Inzulín je secernován v pulzech v celkové denní dávce 20-40 IU. Stabilní celodenní trend sekrece označujeme jako bazální, naopak postprandiální navýšení sekrece označujeme jako stimulované.

*Stimulovaná sekrece.* Sekrece inzulínu za normálních okolností během dne kolísá tak, aby byla glykemie udržena v normálním rozmezí. V době postprandiální, tedy stimulované, se zvyšuje sekrece inzulínu, zvyšuje se odsun glukózy z extracelulárního poolu a snižuje jaterní produkce glukózy. Naopak v době postabsorptivní pokles inzulínu brání odsunu

---

glukózy z extracelulárního poolu a zvyšuje produkci glukózy v játrech (DeFronzo et al. 1983). Tento protisměrný regulační vztah je znázorněn na obrázku 2.

Obrázek 2



Vztah produkce (přísunu) a odsunu glukózy z extracelulární pohotovosti v závislosti na koncentracích inzulínu. Šipky znázorňují stav inzulínové rezistence, kdy jsou potřeba vyšší inzulinémie k dosažení efektu na inhibici produkce glukózy a stimulaci odsunu do kosterního svalu. Podle (DeFronzo et al. 1983; DeFronzo 2009).

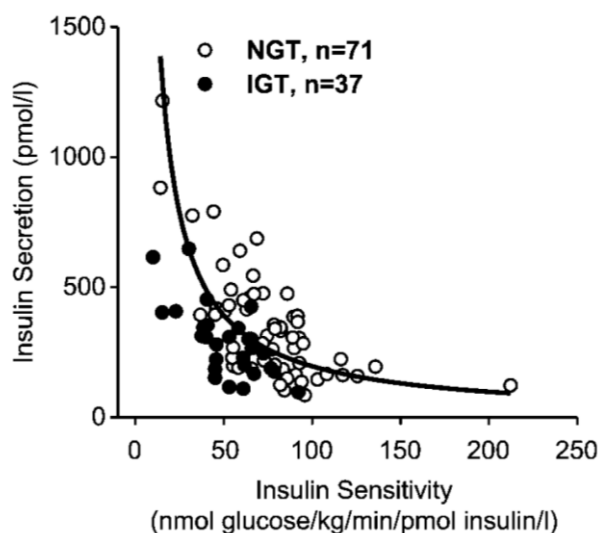
Citlivost na inzulín v periferních tkáních je ovšem proměnlivá i během delších post-absorptivních období. Modifikuje ji celá řada faktorů, například denní doba (nad ránem je obvykle IS nižší), akutní choroby, stres či fyzická aktivita (Ahrén a Pacini 2004).  $\beta$ -buňky adjustují svojí sekreci podle měnící se citlivosti, aby udržely euglykemii. Pokud bychom stanovili IS u jednoho člověka během dne, získáme rozdílné hodnoty odsunu glukózy. Pokud je vyneseme proti odpovídajícím hodnotám sekrece inzulínu, získáme hyperbolický vztah senzitivity vs. sekrece (Ahren a Pacini 2005). Tento poměr se vyjadřuje jako takzvaný dispoziční index (disposition index) a je reálným popisem dynamické funkce glukoregulační smyčky. Je-li glukózá tolerance zachovaná, člověk se pohybuje po „svojí“ hyperbole,



---

mění se senzitivě odpovídá sekrece (Kahn et al. 1993). V případě zhoršení glukózové tolerance se hyperbola posouvá doleva a dolů, jak je znázorněno na obrázku 6.

Obrázek 3



Vztah inzulínové senzitivity (měřeno pomocí hyperinzulinemického euglykemického clampu) a akutní inzulínové odpovědi (měřeno pomocí argininového testu) u 71 žen s normální tolerancí glukózy (NGT) vs. 31 žen s poruchou tolerance glukózy (IGT). Regresní linie je hyperbolická funkce vynesená u NGT skupiny. Adaptováno z (Ahrén a Pacini 2004).

#### 1.4. Inzulínová rezistence

IR je mechanisticky definována jako stav, kdy jsou k vyvolání kvantitativně normální odpovědi cílových tkání potřebná větší než normální množství inzulínu (Pacini a Mari 2003; Kahn et al. 1978). S ohledem na výše zmíněné principy glukoregulační smyčky ji definujeme jako posun doprava křivek dávka-odpověď pro inzulímem zprostředkovanou supresi produkce glukózy a inzulímem stimulovaný odsun glukózy (viz obrázek 2).

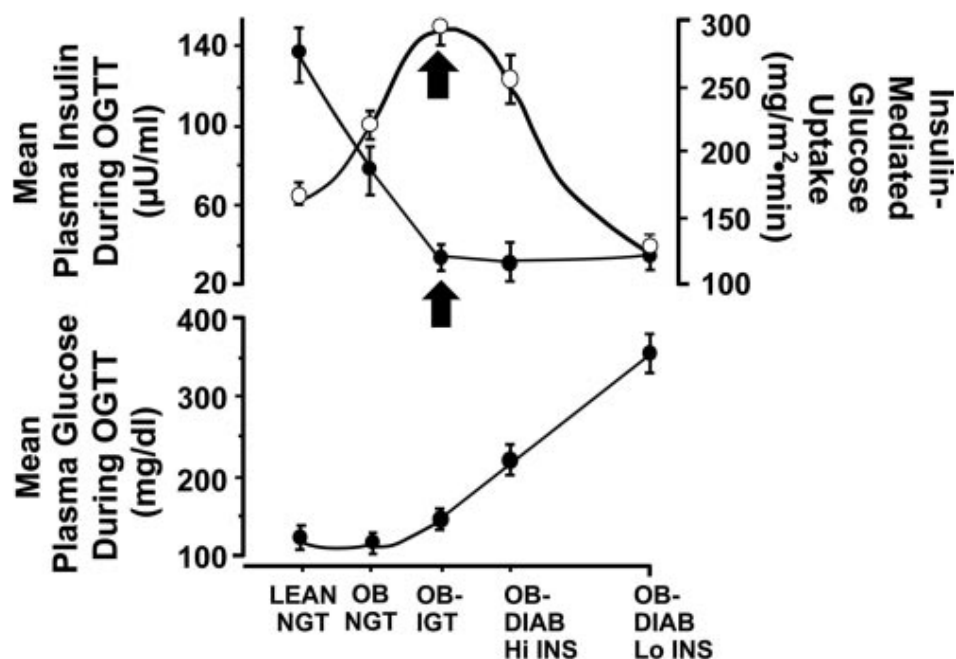
Inzulín vykazuje rozličné metabolické a prorůstové efekty prakticky ve všech tkáních organismu. S ohledem na těsné sepětí funkce inzulínu a glykemie a historickým klinickým souvislostem byla nižší odpověď na inzulín definována a zkoumána právě ve vztahu k jeho

---

glukoregulačním účinkům. Již ve 30. letech a dále i později se Krebs zabýval substrátovou kompeticí o respiraci mezi glukózou a aminokyselinami, acetoacetátem a palmitátem (Williamson a Krebs 1961). V 60. letech Randle dále rozpracoval cyklus glukóza–mastné kyseliny, který dodnes nese jeho jméno. V principu znamená, že vyšší dostupnost acetyl-CoA v mitochondrii inhibuje pyruvát dehydrogenázový komplex, fosfofruktokinázu a hexokinázu, tedy klíčové enzymy glykolytické dráhy. Dochází k poklesu oxidace glukózy a tedy k poklesu jejího vstřebávání do buňky (Randle 1998). Mechanismus, který v době hladovění zajistí šetření glukózou pro glukóza dependentní tkáň. Na druhou stranu T2DM je charakterizován právě vyššími cirkulujícími FFA. Bylo tedy postulováno, že právě vyšší hladiny FFA inhibují vstřebávání glukózy do kosterního svalu (Ferrannini et al. 1983). Od té doby byla identifikována řada defektů v postreceptorové inzulínové kaskádě a v glykolytické dráze, které jsou indukovány vyšší dostupností lipidů v buňce (Randle 1998). Obdobně byla substrátová kompetice popsána mezi aminokyselinami a glukózou (Felig et al. 1969; Krebs et al. 2002). Další konsekvence jsou popsány v následujících kapitolách.

V rozvoji syndromu IR se uplatňuje mnoho genetických a environmentálních faktorů. Je prokázáno, že genetická dispozice hraje významnou roli v rozvoji IR, je známá rodinná vazba pro dispozice k T2DM a je známá celá řada kandidátních genů, jejichž polymorfizmy představují rizikové faktory pro rozvoj tohoto onemocnění (Abdullah et al. 2014). Za současnou epidemií T2DM jsou však jistě zodpovědné faktory environmentální, zejména změna životosprávy ve vyspělých zemích, nevhodná skladba jídelníčku, fyzická inaktivita, ev. další toxické vlivy prostředí. Defronzo postuloval dnes obecně nejpřijímanější hypotézu mechanismu přirozeného vývoje T2DM (Defronzo 2009). Obezita, fyzická inaktivita a další faktory jsou spojeny se zhoršením citlivosti na inzulín. V takovém případě je fyziologických efektů inzulínu v cílových tkáních dosaženo jen za cenu zvyšování sekrece  $\beta$ -buněk. V této fázi ještě dlouhou dobu zůstává normální glukózová tolerance a to i přes to, že již obézní subjekt může být maximálně inzulín rezistentní (viz obrázek 4).

Obrázek 4



Vývoj diabetu 2. typu. Lean NGT: hubení s normální glukózovou tolerancí; OB NGT: obézní s normální glukózovou tolerancí; OB IGT: obézní s poruchou glukózové tolerance; OB DIAB Hi INS: obézní s diabetem se zachovalou sekrecí inzulínu; OB DIAB Lo INS: obézní s diabetem s vyhaslou sekrecí inzulínu.

Nedojde-li k zásadní životospřávné změně,  $\beta$ -buňky postupně nevyhnutelně vyhasínají ve své sekreční schopnosti, dochází k relativnímu nedostatku inzulínu a manifestací poruchy glukózové tolerance. Iničiálně zhoršením postprandiálních glykemií, následně vzestupem lačných glykemií a rozvojem diabetu. Tato teorie je postavena na základní práci Felbera a kolegů (Jallut et al. 1990). Obezita je asociována s 29% poklesem citlivosti na inzulín. Pokud obézní, maximálně inzulín rezistentní subjekt progreduje do poruchy glukózové tolerance (PGT), tak dochází k dalšímu poklesu citlivosti o 28 % (tedy o 57 % celkem oproti hubeným s normální inzulínovou citlivostí). Další progrese PGT do T2DM je dána poklesem sekreční odpovědi  $\beta$ -buněk a IR se již dále nezvyšuje (Jallut et al. 1990). A je to právě progrese selhávání  $\beta$ -buněk, které určuje další osud průběhu diabetu u pacienta (viz dále).

---

I když existuje značné množství evidence, že v rozvoji T2DM existuje kontinuum mezi obezitou – poruchou glukózové tolerance – T2DM, a že primárním defektem je IR a z ní rezultující progresivní selhání  $\beta$ -buněk (Weyer et al. 1999), nelze v tuto chvíli s jistotou potvrdit, že tato mechanistická teorie je plně platná. Známý je paradox, že 20 % obézních nemá inzulínovou rezistenci či jiné metabolické abnormality, a na druhou stranu 18 % pacientů s T2DM není obézních (tzv. lean-T2DM pacienti) (Iozzo 2009).

Rozvoj IR a T2DM je významně spjat s funkcí hlavních glukoregulačních orgánů, zejména svalové tkáně, tukové tkáně a jater. Kosterní sval je zodpovědný za největší podíl inzulínem stimulovaného odsunu glukózy a podílí se v postabsorptivním stavu katabolizmem aminokyselin na dodávce glukoplastických substrátů pro glukoneogenezu. Tuková tkáň je prvním puřem postprandiální nálože substrátů a její plasticita rozhoduje o dostupnosti substrátů pro další orgány, zároveň je také významným endokrinním orgánem secernujícím působky s vlivem na intermediární metabolismus a příjem potravy. Hepatocyt je energetickou továrnou organizmu, kde probíhá glukoneogeneza z necukerných prekurzorů. Dále zde probíhá syntéza ketolátek během akcelerované lipolýzy v postabsorptivním stavu. Hepatocyt disponuje také zásobou glykogenu, který je po degradaci na glukózu (díky přítomnosti glukóza-6-fosfatázy) dostupný pro periferní tkáně.

#### **1.4.1. Kosterní sval**

Kosterní sval je orgánem, který je za normálních okolností zodpovědný za 85% podíl inzulínem stimulovaného odsunu glukózy. Selhání účinku inzulínu v aktivaci transportu glukózy do SM je tedy nejvýznamnějším momentem poruchy glukózové tolerance. Tento jev se nazývá periferní IR, aby se odlišil od centrální, tedy hepatální, rezistence. Hubení pacienti s T2DM mají ve srovnání s kontrolami s normální tolerancí glukózy přibližně 50% snížení inzulínem stimulovaného odsunu glukózy do kosterního svalu, s tím souvisí také defektní inzulínová signalizace v myocyty. Defekty v inzulínové signalizaci byly popsány na úrovni poruchy transportu, fosforylování IRS-1 a transdukci signálu. Klesá jak utilizace neoxidativní (z větší části syntéza glykogenu), tak oxidativní (DeFronzo 2009).

Z hlediska substrátové preference je SM vcelku flexibilní orgán, myocyty mohou využít jak glukózu, tak FA či jiné ketoplastické prekurzory. V duchu pionýrských prací zabývajících se substrátovou kompeticí bylo postulováno, že významným faktorem ovlivňu-

---

jícím ve svalu citlivost k inzulínu jsou plazmatické hladiny volných mastných kyselin a s nimi spojená ektopická intramyocelulární depozice lipidů (IMCL), resp. depozice produktů nedokonalé oxidace FA uvnitř svalových buněk, jak již bylo naznačeno (Randle 1998). První práce v tomto duchu se ubíraly směrem k průkazu kauzální vazby mezi dietním tukem, resp. hladinami FFA a rozvojem IR. Bylo opakovaně prokázáno, že zvýšení hladiny plazmatických FA infúzí lipidové emulze (intralipidu) vede k poklesu odsunu glukózy (Roden et al. 1996). Vstup FA do myocytu je velmi regulovaný proces. Podílí se na něm hned několik transportních systémů: FA vázající protein (FABP, fatty acid binding protein), FA translokáza (fatty acid translocase, CD36) a skupina FA transportních proteinů (fatty acid transport proteins) (Kazantzis a Stahl 2012). Nejvíce studovaným systémem je FA translokáza, jejíž osud je podobný GLUT-4 transportéru. Je deponována v intracelulární vezikule a na signál je translokována na sarkolemu, kde facilituje vstřebávání FA. V inzulinizovaném svalu je transportér permanentně přítomen na membráně a dochází k setrvalému fluxu FA do sarkoplazmy, který naopak inhibuje aktivitu GLUT-4 translokace a tedy indukuje IR (rev. Turner et al. 2014). Intracelulárním osudem lipidů v SM je buď  $\beta$ -oxidace, nebo syntéza fosfolipidů a dalších lipidových intermediátů.

Dlouho se předpokládalo, že SM za fyziologických okolností není schopen lipidy ukládat, a že jejich osudem je oxidativní či neoxidativní metabolismus v buňce. V takovém případě jsou intramyocelulární lipidy odrazem nadbytku cirkulujících lipidů, které sval není schopen zutilizovat. Bylo postulováno, že zahlcení SM exogenními lipidy vede k IMCL depozici, poruše inzulínové signalizace a z toho rezultujícímu rozvoji IR (Randle 1998). Bylo prokázáno, že míra inzulínové rezistence koreluje pozitivně s množstvím lipidů deponovaných v kosterním svalu (Krssak et al. 1999), nehledě na typ vlákna (Malenfant et al. 2001). Vyšší obsah IMCL byl prokázán také u dětí a adolescentů s prediabetem (Sinha et al. 2002; Weiss et al. 2003). Avšak v této teorii se záhy objevily také kontroverze. Závislost mezi IMCL a IR je patrná pouze u osob s inzulínovou rezistencí. V některých studiích u neobéznic inzulín-senzitivních subjektů IMCL a IR nekorelují vůbec (Misra et al. 2003; Thamer et al. 2003; Lawrence et al. 2010). Byl také popsán atletický paradox, tedy průkaz vyššího obsahu IMCL u vysoce inzulín-senzitivních výkonnostních sportovců (Goodpaster et al. 2001).

Vztah mezi svalovými lipidy a inzulínovou rezistencí tedy není přímočarý. Na jedné straně bylo prokázáno, že deponované IMCL interferují s inzulínovou intracelulární signali-

---

zací (Shulman 2000), a dá se předpokládat, že jejich akumulace bude jednou z příčin rozvoje inzulínové rezistence. Dieta s kalorickou restrikcí vedla u pacientů s IR (T2DM, obézní s IGT) ke snížení IMCL a úměrnému zvýšení inzulínové citlivosti (Lara-Castro et al. 2008). Na druhou stranu však u zdravých subjektů snížení tuků v izokalorické dietě snížilo obsah IMCL, avšak nezměnilo míru citlivosti k inzulínu (Lawrence et al. 2010). Další výzkum se v tomto směru ubírá k bližšímu definování IMCL.

U výkonnostních sportovců jsou vyšší IMCL zásoby odrazem adaptace na výkon a představují rychlý zdroj substrátu pro aerobně pracující sval. Na této populaci bylo prokázáno, že jejich složení, denzita a velikost kapének, jakož i nitrobuněčná lokalizace jsou rozdílné oproti pacientům s obezitou a T2DM. U inzulinosenzitivních jedinců v SM převažují TAG (Dubé et al. 2008) a tyto jsou deponovány spíše intermyofibrilárně než subsarkolemárně (van Loon et al. 2004). Intervence dlouhodobou fyzickou aktivitou vedla u obézních subjektů v tomto duchu ke zlepšení IR asociovaném se změnou v lipidovém profilu SM. Došlo ke zvýšení poměru TAG/ diacylglyceroly (DAG) a ceramidy (CER) (Dubé et al. 2008). Tedy ke změně intracelulárního fluxu směrem od neoxidativního k oxidativnímu metabolismu lipidů.

Právě DAG a CER jsou metabolicky aktivní intermediáty, které mají řadu signálních funkcí. Oba metabolity například interferují s inzulínovou kaskádou: DAG cestou translokace protein kinázy C a inhibice inzulínového receptoru; CER inhibicí protein kinázy AKT. S ohledem na fakt, že sfingomyelinů může být v buňce odhadem až 60 tisíc různých druhů (mezi nimi právě i CER), je pátrání po aktivním metabolitu stále ještě otevřeno (Kitessa a Abeywardena 2016).

$\beta$ -oxidace mastných kyselin probíhá exkluzivně v mitochondriích. Bylo prokázáno, že pacienti s IR mají sníženou lačnou oxidaci lipidů a poruchu suprese lipidové oxidace v odpovědi na zátěž inzulínem (Kelley a Mandarino 2000). Této tzv. metabolické inflexibilitě odpovídá nižší oxidativní kapacita mitochondrií v SM u pacientů s T2DM (He et al. 2001) a celkově nižší množství svalových mitochondrií (Ritov et al. 2010). Proto další teorie rozvoje IR v SM soustředí se právě na poruchu mitochondriální oxidace. Vztah mezi inzulínovou rezistencí SM a poruchou mitochondriální funkce je znám již 40 let (Yamada et al. 1975) a stále se těší neutuchajícímu vědeckému zájmu (Patti a Corvera 2010; Dela a Helge 2013; Montgomery a Turner 2015).

---

Termín mitochondriální dysfunkce je však používán k popisu řady parametrů. Ve vztahu k funkci inzulínu se rozumí zejména kapacita aerobní fosforylace a substrátové oxidace. Reálně v experimentech je užíváno genové exprese mRNA pro markery mitochondriální biogeneze (např. PGC1 $\alpha$ ), proteomické analýzy či enzymoanalýzy klíčových mitochondriálních komplexů pro oxidativní funkce (např. citrátsyntáza), změn v mitochondriální denzitě a morfologii nebo přímo posouzení substrátové oxidace (Gojda et al. 2017; Montgomery a Turner 2015).

Snížení mitochondriální kapacity substrátové oxidace vede k akumulaci energetických prekurzorů zejména derivátů mastných kyselin, jak již bylo naznačeno. Vznikající DAG a CER interferují s inzulínovou signalizací inhibicí proteinkinázy A, resp. C, což lze chápat jako jakýsi ochranný mechanismus, kterým se mitochondrie brání energetickému stresu. Dalším mechanismem, kterým porucha oxidativní funkce mitochondrií může působit, je sáknutí elektronů z respiračního řetězce, pokud oxidace běží na nižší obrátky. Tyto elektrony indukují tvorbu superoxidu, který se podílí na vzniku dalších kyslíkových radikálů, poškozuje mitochondrii a vede k mitofagii (autofagii poškozených mitochondrií). Konečným výsledkem je pak nižší mitochondriální denzita (Sarparanta et al. 2016).

Avšak i teorie primární mitochondriální dysfunkce má svoje kontroverze. Existuje řada observačních studií, kde asociace mezi IR a mitochondriální dysfunkcí nevyšla (Boushel et al. 2007). Navíc hyperalimentace zdravých jedinců indukuje IR, ale nevede k poruše mitochondriální oxidace (Samocha-Bonet et al. 2012). Existují v tuto chvíli tři teorie: snížená, nezměněná či kompenzatorně zvýšená mitochondriální funkce u IR a všechny dohromady dokladují, že vztah mezi IR, IMCL a mitochondriální dysfunkcí je velmi komplexní a jsme ještě daleko jeho poznání (Montgomery a Turner 2015).

### **1.4.2. Tuková tkáň**

Tuková tkáň slouží jako pufr postprandiální nálože FA. Její plasticita tedy rozhoduje o dostupnosti substrátů pro další orgány. Adipocyt dokáže akumulovat maximálně cca 0,8  $\mu\text{g}$  lipidů. Větší adipocyty se stávají inzulín rezistentními, dochází u nich k selhání anti-lipolytického působení inzulínu, resp. poruše inzulínem zprostředkované suprese výdeje FFA (Groop et al. 1991; Bays et al. 2008) a dochází jak k postprandiálnímu „přetékání“ FA

---

do cirkulace, tak k setrvalému interprandiálnímu uvolňování FA do cirkulace (Iozzo 2009). Vyšší plazmatické hladiny FA rezultují v indukci hepatální glukoneogeneze (Boden et al. 1994), snížení odsunu glukózy do kosterního svalu (Roden et al. 1996) a v neposlední řadě pak ke snížení sekreční odpovědi  $\beta$ -buněk (Giacca et al. 2011), mechanismem zvaným lipotoxicita. V inzulin rezistentním adipocyty dochází také ke změně sekrečního profilu ve prospěch prozánětlivých adipocytokinů (Bays et al. 2008) a tuková tkáň je ve vyšší míře infiltrována makrofágy s vyšším proinflamačním potenciálem (Canello et al. 2005).

Tuková tkáň je také za fyziologických okolností zodpovědná za inzulinem zprostředkovaný odsun glukózy. Její podíl je podle různých studií 5 – 20 % (Iozzo 2009; Brehm a Roden 2007). Je známo, že delece adipocyt-specifického přenašeče GLUT-4 vede k rozvoji IR, zatímco delece myocyt-specifického GLUT-4 stimuluje odsun glukózy do tukové tkáně (Cahová et al. 2007).

Iozzo postulovala, že za rozvojem IR může stát porucha plasticity podkožní tukové tkáně, tedy schopnost nově diferencovaných adipocytů ukládat triglyceridy. Při překročení skladovacích kapacit podkožní tukové tkáně dochází k přetékání FA do cirkulace a k okamžité expanzi ektopických depozit tuku v primárně netukové tkáni, například ve svalu (Iozzo 2009).

### **1.4.3. Játra**

Játra jsou orgánem integrujícím intermediární metabolismus. Mozek je z větší části závislý na permanentní dodávce glukózy, která může činit za lačného stavu až 50 % z celkové spotřeby organismu. V období, kdy nejsou dodávány substráty zaživacím traktem, je tato potřeba uspokojována z endogenních zdrojů (DeFronzo 2009). V první době hepatální glykogenolýzou. Pro tyto účely je v hepatocytech deponováno až cca 600 g glykogenu. Následně, v druhé době, dochází k plné aktivaci hepatální glukoneogeneze. Výchozí substráty pro glukoneogenezu jsou zejména glycerol (z lýzy triglyceridů), glukoplastické aminokyseliny a laktát.

U subjektů s normální citlivostí na inzulin je po nočním lačnění hepatální produkce glukózy cca 2 g/kg/min. U pacientů s T2DM se zvyšuje na cca 2,5 g/kg/min. To může představovat asi 30 g glukózy během noci, což má vliv na ranní lačné glykemie (DeFronzo 2009).



---

Vzhledem k tomu, že lačné inzulinémie jsou u těchto IR pacientů několikanásobně vyšší, znamená to, že hepatocyt je rezistentní k účinkům inzulínu a tento jev se nazývá centrální (hepatální) inzulinovou rezistencí. Obdobně je hepatocyt rezistentní na postprandiální supresi glukoneogeneze inzulínem (Rizza 2010). Na centrální IR se podílí řada mechanismů. Jsou to 1) vyšší hladiny glukagonu a porucha suprese  $\alpha$ -buněk hyperglykemií (D'Alessio 2011), 2) vyšší hladiny FFA, které vedou k aktivaci fosfoenolpyruvát karboxykinázy a pyruvát karboxylázy, klíčových enzymů glukoneogeneze (jev, který je nazýván lipotoxicita) a 3) vyšší hladiny glukózy, které vedou k vyšší aktivaci glukóza-6-fosfatázy a vyššímu efluxu glukózy z buňky (jev, který je nazýván glukotoxicita) (DeFronzo 2009).

## 1.5. Selhání $\beta$ -buněk

Jak je zřejmé z předchozího, zvyšování inzulinové rezistence je provázeno vzestupem sekrece inzulínu tak, aby byla udržena euglykémie. Je známo, že v průběhu přirozeného vývoje diabetu je sekrece inzulínu nejvyšší v období maximální inzulinorezistence bez poruchy glukózové tolerance (obézní subjekty se zachovalou glukózovou tolerancí). I když v dalším průběhu hladina inzulínu a C-peptidu progresivně klesá, ještě dlouhou dobu po manifestaci diabetu jeví supranormální koncentrace a nejsou tedy vhodným parametrem pro hodnocení sekreční funkce  $\beta$ -buněk. Vhodným měřítkem je změna inzulinémie vztažená na změnu glykémie (po podání glukózy ev. jiného sekretagoga) při známé hodnotě IR ( $\Delta I/\Delta G/IR$ ). Tento parametr jsme schopni získat dynamickým testováním systému pomocí orální či intravenózní glukózy (orální či IV glukózový toleranční test) a některých aminokyselin (např. arginin). Takto stanovená akutní inzulinová odpověď (AIR, acute insulin response) adjustovaná na IR odpovídá sekreční kapacitě  $\beta$ -buněk, nehledě na absolutní inzulinémie (Pacini a Mari 2003). Vztah AIR a IR jeví hyperbolickou závislost a je nazýván dispozičním indexem (viz výše, také obrázek 4) (Kahn et al. 1993).

Na základě longitudinálních dat bylo prokázáno, že v době, kdy se manifestuje diabetes hyperglykemií, je již sekreční rezerva  $\beta$ -buněk redukována prakticky o 80 % (DeFronzo 2009). Etiologie progresivního selhávání  $\beta$ -buněk v průběhu rozvoje inzulinové rezistence není přesně známa, ale jistě je multifaktoriální. Jednoduchá teorie, že IR klade vyšší nároky

---

na  $\beta$ -buňku a  $\beta$ -buňka se tak postupně unaví a vyhasíná, je sice snadno uchopitelná, ale není založena na evidenci (Defronzo 2009). Faktory, které jsou v literatuře asociovány se selháváním  $\beta$ -buněk, jsou mnohé. Patří mezi ně věk, glukotoxicita, lipotoxicita, genetické pozadí, depozice ostrůvkového amyloidu či defektní enteroinzulární osa (Halban et al. 2014; Andel et al. 2014).

Jedna z teorií vysvětlujících selhání  $\beta$ -buněk hovoří o tzv. IR  $\beta$ -buňky (Rhodes et al. 2013a). Inzulínové receptory jsou přítomny také na samotných  $\beta$ -buňkách a je známo, že existuje inzulární autokrinní a parakrinní regulace. Inzulín vykazuje v  $\beta$ -buňkách zejména efekty proliferativní a antiapoptotické (Rhodes et al. 2013b). Pro-proliferativní aktivita inzulínové signální kaskády v  $\beta$ -buňce je klíčová v udržení kompenzatorní odpovědi na vyšší potřebu inzulínu na periférii během IR stavů. Bylo prokázáno, že myši s knock-out genem pro IRS-2 vyvinou progresivní selhání  $\beta$ -buněk (White et al. 1998). Hyperinzulinismus, který provází IR stavy, vede k down regulaci inzulínových receptorů na  $\beta$ -buňkách, a ty se tak stávají rezistentnějšími na jeho účinky. Je tedy třeba vyšších inzulínemií k inhibici sekrece inzulínu.

## 1.6. Nutriční faktory rozvoje inzulínové rezistence, veganská dieta

Existuje celá řada kandidátních environmentálních faktorů, které mohou mít vliv na rozvoj T2DM. Mezi ně se dá zařadit také skladba potravy. Z tohoto hlediska zasluhují pozornost skupiny lidí na dietách vylučujících některé běžné potraviny, a modifikující tak příjem nutrientů, který je běžný ve většinové populaci. Jedněmi z těchto restriktivních diet jsou diety s vyloučením masa a masných produktů, včetně ryb (vegetariánská či přesněji lakto-ovo vegetariánská dieta) či s vyloučením všech živočišných produktů, tedy kromě masa navíc mléka a mléčných produktů a vajec (veganská dieta).

V minulosti bylo prokázáno, že prevalence T2DM je v populaci vegetariánů nižší než v populaci stravující se bez omezení (Key et al. 1998; Aune et al. 2009; Tonstad et al. 2009), stejně jako mortalita na kardiovaskulární onemocnění (Key et al. 1998). Recentně byly publikovány závěry The Adventist Health Study-2 (Tonstad et al. 2011). V této kohortové studii s 60,903 participanty bylo zjištěno, že mezi vegany je více než dvojnásobně nižší zastoupení diabetiků 2. typu. Významnost tohoto výsledku se nezměnila, i když se preva-

---

lence adjustovala na tělesnou hmotnost. Zajímavým závěrem také je, že prevalence diabetu v jednotlivých skupinách (vegan, lakto-ovo vegetarián, pesko-vegetarián, semi-vegetarián, omnivor) stoupá v závislosti na příjmu masa. Obdobné výsledky poskytuje meta analýza dvanácti kohortových studií (Aune et al. 2009), skupiny populace s vysokým příjmem masa mají větší prevalenci T2DM, zejména pak příjem červeného masa a průmyslově upravovaného masa je asociován s vyšší prevalencí T2DM (Aune et al. 2009; Psaltopoulou et al. 2010; Steinbrecher et al. 2011).

Naopak lidé stravující se čistě rostlinnou stravou mají příznivější lipidové spektrum, parametry glukózové tolerance (lačná glykemie, HbA1c) a nižší IR v porovnání s kontrolami stravujícími se bez omezení (Kuo et al. 2004; Goff et al. 2005; Valachovicová et al. 2006). Kromě toho mají vegetariáni nižší index tloušťky intimy-medie (IMT) karotických tepen (Yang, 2011), jako známky časného morfologického substrátu endotelové dysfunkce. Výsledky Oxfordské kohorty EPIC studie (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition), ve které byla značná část respondentů rekrutována z řad vegetariánů a veganů, BMI pozitivně koreluje s příjmem masa, nejnižších hodnot BMI dosahovali vegani (Rosell, 2006). Obecně mají vegani nižší BMI (Spencer et al. 2003, 2002), nižší prevalenci hypertenze (Appleby, 2002) a nižší prevalenci diabetu (Agrawal et al. 2014).

V souladu s těmito pozorováními pak intervenční studie u pacientů s T2DM, ve kterých byla veganská, resp. lakto-ovo-vegetariánská strava porovnáována s konvenční diabetickou dietou (při srovnatelné fyzické aktivitě) prokázaly snížení hmotnosti, zlepšení kompenzace diabetu, zlepšení lipidového spektra (Trapp a Barnard 2010; Kahleova et al. 2011; Huang et al. 2016) a dokonce snížení parametrů oxidačního stresu a inzulínové rezistence stanovené jako inzulínem stimulovaný odsun glukózy (Kahleova et al. 2011). V jiném experimentu byl prokázán dlouhodobý (74 týdnů) efekt na redukci tělesné hmotnosti u veganského režimu bez kalorického omezení a bez redukce příjmu sacharidů (Barnard et al. 2009). Dále bylo prokázáno, že obézní lidé na veganské stravě redukuje hmotnost i přes absenci kalorických omezení (Barnard et al. 2005, 2009).

Data zabývající se nutričními hodnotami restriktivních diet jsou omezená. Prakticky všechny klasické práce jsou navíc zatíženy chybou reduktivní nutriční metodologie, která nebere v potaz vzájemné interakce složek stravy a kontext jídelních vzorců (Clarys et al. 2014). Doposud publikované práce zaměřující se na popsání odlišností ve skladbě vegetariánského/veganského jídelníčku vycházejí ze self-reported dotazníků velkých kohortových

---

studií. EPIC-Oxford (cca 65 tis. respondentů) (Spencer et al. 2003), AHS-2 (cca 61 tis. respondentů) (Rizzo et al. 2013) a recentně menší, avšak metodologicky přesnější belgická studie (1475 respondentů) (Clarys et al. 2014). Na základě výsledků těchto studií lze shrnout zásadní odlišnosti veganské diety.

Veganská dieta má nižší celkovou energetickou denzitu a relativně vyšší poměr sacharidů, zejména z komplexních zdrojů a je významně bohatší na vlákninu. Má nižší zastoupení tuků a spektrum jejich FA odpovídá spektru rostlinných olejů. Obsahuje nižší množství SFA a trans mastných kyselin a naopak vyšší množství PUFA a MUFA, vyjma arachidonové, na kterou je veganská dieta chudší (Spencer et al. 2003; Rizzo et al. 2013; Clarys et al. 2014). Pozoruhodné je zejména nižší zastoupení SFA ve veganské dietě. Je totiž známo, že zvýšení plazmatické hladiny FFA zvýšením podílu SFA ve stravě (Vessby et al. 2001) vede ke zvýšení IR a ke zvýšení depozice IMCL.

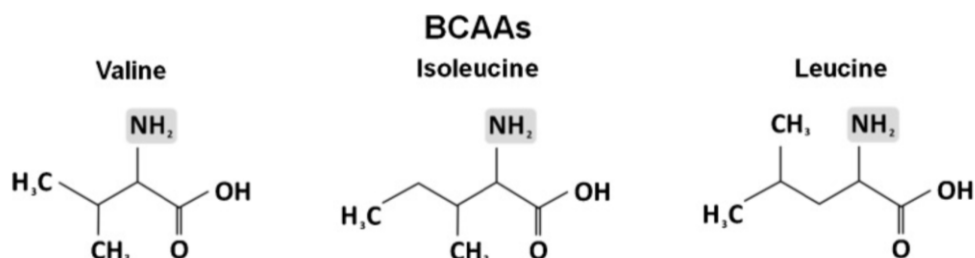
Veganská dieta má nižší relativní zastoupení proteinů, v absolutním příjmu je srovnatelná (Rizzo et al. 2013) či chudší (Spencer et al. 2003; Clarys et al. 2014). Specificky má zřejmě nižší obsah větvených aminokyselin (BCAA, branched chain amino acids) (Souci et al. 2000), jak je diskutováno dále. Veganská dieta má významně nižší příjem sodíku, vápníku a srovnatelný (Spencer et al. 2003) či nižší (Rizzo et al. 2013; Clarys et al. 2014) příjem železa, významně vyšší příjem hořčíku. Veganská dieta má vyšší zastoupení vitamínu C, E, B1 folátu a  $\beta$ -karotenu a naopak nižší zastoupení retinolu, vitamínu B12 a D (Spencer et al. 2003; Rizzo et al. 2013; Clarys et al. 2014).

## 1.7. Větvené aminokyseliny

Jedním ze substrátů, který je v literatuře spojován s inzulín rezistentními stavy jsou aminokyseliny s větveným řetězcem (branched chain amino acids, BCAA), kam se řadí leucin, valin a izoleucin. BCAA jsou esenciální AA, které buňky lidského organismu nemohou syntetizovat, a jsou tedy závislé na jejich exogenní dodávce. Kromě strukturální podobnosti uhlíkatého skeletu, BCAA také sdílejí zčásti stejný metabolický osud a jejich plazmatické hladiny jsou synchronizovány v řadě klinických stavů, fyzické aktivitě, lačnění (Nair et al. 1987), ale také diabetu (Cole 2015). V organismu jsou abundantně zastoupeny zejména v kosterním svalu, kde tvoří až 40 % z celkového množství aminokyselin (Shimomura et al. 2004). Kromě strukturální úlohy, mají také funkci v intermediárním

---

metabolizmu, slouží jako anaplerotické substráty pro Krebsův cyklus, či jsou přímo oxidovány.



Obrázek 5. Větvené aminokyseliny. Adaptováno z (de Campos-Ferraz et al. 2014).

#### 1.7.1.1. Resorpce a metabolismus BCAA

Po příjmu BCAA ve formě komplexních polypeptidů dochází k jejich hydrolýze v trávicím traktu a následné resorpci ve formě di/tripeptidů pomocí vodíkových/proteinových kotransportérů (PepT1, T2, SLC15A1, A2). Volné BCAA mohou být směňovány za jiné neutrální AA přes apikální membránu kartáčového lemu specifickými AA transportéry (SLC3A1, SLC7A9), obdobně také protisměrný přenos děje se přes membránu bazolaterální (SLC3A2) (Kohlmeier 2015). BCAA zřejmě nejsou významně resorbovány v colon, kde spíše podléhají fermentaci bakteriemi (Neis et al. 2015). Až 20 % BCAA je sekvestrováno ve střevě a podléhá zde další metabolizaci. BCAA jsou mezi ostatními esenciálními AA jedinečné v tom, že nepodléhají primárně ani intestinálnímu, ani jaternímu metabolismu, protože enterocyt ani hepatocyt neobsahuje dva první klíčové enzymy nutné pro deaminaci BCAA (viz dále), a jejich systémové cirkulující koncentrace tedy reflektují přímo podanou dávku BCAA a míru její resorpce (Wahren et al. 1976). Tato skutečnost je předurčuje, vedle jejich úlohy substrátu, k roli „nutrient–sensing“ signálů pro řadu cílových tkání (Pedroso et al. 2015). BCAA v plazmě cirkulují jako volné AA a jsou vstřebávány prakticky do všech tkání v organismu specifickými typy přenašečů.

Většina BCAA v buňkách je oxidována, jejich dusíkatý zbytek je pak eventuálně použit pro strukturální funkce. I když je další metabolický osud BCAA pro každou jednu aminokyselinu jedinečný, degradace BCAA sdílí dva první klíčové enzymatické komplexy.

---

Prvním krokem je transaminace katalyzovaná BCAA amino transferázou (BCAT), kdy dojde k deaminaci a přenosu amino skupiny na  $\alpha$ -keto-glutarát. Existuje mitochondriální a cytozlická izoforma BCAT, jejich distribuce se tkáň od tkáně liší. Produktem reakce katalyzované BCAT je keto-analog příslušné BCAA ( $\alpha$ -keto-izokaproát,  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvalerát nebo keto-izovalerát). Dalším krokem je oxidativní dekarboxylace katalyzovaná BC  $\alpha$ -keto-dehydrogenázovým komplexem (BCKDH). BCKDH je velký komplex v mitochondriální matrix, součást rodiny dekarboxylačních komplexů spolu s pyruvát dehydrogenázou a  $\alpha$ -ketoglutarát dehydrogenázou. Oxidativní dekarboxylace jednotlivých ketoanalog je nevratná reakce, která je vysoce regulovaná a je spřažena se syntézou NADH. Výslednými produkty reakce jsou izovaleryl CoA, izobutyryl CoA a  $\alpha$ -methyl-butyryl CoA. Tyto substráty následně podléhají sérii dehydrogenázových reakcí v mitochondrii, aby konečnými produkty degradace BCAA byly acetoacetát, acetyl CoA, propionyl CoA a sukcinyl CoA. V každém kroku pod BCKDH však mohou být intermediáty oxidace použity pro syntézu FA či cholesterolu (Cole 2015).

Distribuce BCAT a BCKDH izoenzymů vykazuje výrazné rozdíly v tkáňové distribuci (Cole 2015). Tedy i míra vstřebávání a další subcelulární osud BCAA se v různých tkáních liší. Na celotělové úrovni je největším odběratelem BCAA z extracelulárního poolu kosterní sval, který katabolizuje až 50 % dietních BCAA. Není bez zajímavosti, že právě oxidací BCAA hradí kosterní sval zvýšené energetické nároky během fyzické zátěže (Shimomura et al. 2004).

Obecně lze říci, že účinky BCAA jsou zprostředkovány komplexem mTOR (mammalian target of rapamycin), který dále aktivuje expresi genů a proteosyntézu. mTOR je aktivován vyšší dostupností produktů degradace BCAA. Detailní popis aktivity této signální kaskády přesahuje zaměření práce. Rámcově však je tento komplex ústředím, na kterém konverguje řada signálů iniciovaných přímo nutrienty či hormony podílejícími se na regulaci metabolismu. Hlavními cíli fosforylační aktivity mTOR jsou protein p70-S6 kináza 1 (S6K1) a vazebný protein 1 pro eukaryotický iniciační faktor 4E (4E-BP1) (Pedroso et al. 2015). Fosforylovaná kináza S6K1 fosforyluje také enzymy inzulínové signalizace a snižuje tak citlivost na inzulín a inzulín-dependentní vstřebání nutrientů v době jejich nadbytku (Tremblay et al. 2005). Kaskáda pod mTOR končí aktivací transkripčních faktorů pro řadu enzymů intermediárního metabolismu zajišťující anabolismus a proteosyntézu.

V humánních intervenčních studiích fortifikace jídel leucinem zvyšuje aktivitu mTOR a stimuluje postprandiální proteosyntézu v kosterním svalstvu. Mechanismus, jakým do-

---

cháží k BCAA zprostředkovně aktivaci mTOR, však zůstává předmětem bádání (Drummond a Rasmussen 2008).

Leucin stimuluje sekreci inzulínu z  $\beta$ -buněk. Na sekreci se podílí jednak vyšší produkcí ATP, je-li oxidován, ale také cestou alosterické aktivace glutamát dehydrogenázy. Kromě stimulace uvolňování preformovaného inzulínu ze sekrečních granul, leucin také aktivuje produkci inzulínu mechanismem stimulace mTOR (Yang et al. 2010).

Signalizace BCAA probíhá také v centrálním nervovém systému. Hypotalamická jádra, nucleus paraventricularis (NP) a arcuatus (NA), se podílejí na regulaci příjmu potravy, energetické bilance a glukózového metabolismu. Anorexigenní efekt zprostředkovává populace neuronů umístěných laterálně v NA, a to cestou exprese a sekrece neuromediátorů proopiomelanokortinu (POMC) a kokainem a amfetaminem regulovaného transkriptu (CART). Jejich exprese je regulována aktivitou mTOR signalizační kaskády. Bylo prokázáno, že centrální podání leucinu u kryš vede k anorexigennímu chování a v jejich hypotalamu ke snížení fosforylační aktivity mTOR. Tyto efekty byly revertovány následným podáním rapamycinu (Zampieri et al. 2013). Nutno však podotknout, že při podání leucinu orálně, výsledky nejsou jednoznačné. Jak shrnuje Pedroso, animální studie jsou zatíženy řadou metodologických nejasností, zejména vlivem averzivního chování s redukcí příjmu stravy obohacené o leucin (Pedroso et al. 2015). Data z kontrolovaných humánních studií k dispozici nejsou.

#### ***1.7.1.2. Cirkulující hladiny BCAA a diabetes***

Asociace mezi vyšší hladinou BCAA a inzulínovou rezistencí je popsána již přes třicet let (Felig et al. 1969) a dále byla potvrzena (Kamaura et al. 2010). Hladiny BCAA predikují riziko rozvoje T2DM dokonce 12 let před jeho projevením (Wang et al. 2011). Životní správná intervence, která revertuje metabolický syndrom, snižuje plazmatické hladiny BCAA (Kamaura et al. 2010).

Kauzalita mezi příjmem BCAA a jejich vyššími hladinami však není jasná. Na jednu stranu jsou BCAA esenciálními AA, a organizmus je zřejmě závislý na jejich příjmu (Kohlmeier 2015), i když se recentně podařilo prokázat BCAA biosyntetický potenciál střevního mikrobiomu (Pedersen et al. 2016). Složení dietního proteinu má však u zdravé populace rozhodující dopad na koncentrace BCAA (Nilsson et al. 2004; Calbet a MacLean 2002).

---

Možná kauzální souvislost mezi dietním příjmem BCAA a rozvojem IR byla popsána v intervenční studii na krysách (Newgard et al. 2009), kdy vyšší obsah BCAA ve vysokotukové dietě indukoval vyšší IR. Obdobně akutní intervence infúzním roztokem AA/BCAA moduluje u lidí odsun glukózy do kosterního svalu (Everman et al. 2015; Tremblay et al. 2005; Robinson et al. 2014). Na druhou stranu observační data z longitudinálních studií nepodporují hypotézu, že by u IR subjektů byl vyšší příjem BCAA (Wang et al. 2011).

Za vyšší hladiny BCAA by tak mohla být zodpovědná porucha jejich degradace v tukové a svalové tkáni. Bylo prokázáno, že exprese genů prvních klíčových enzymů odpovědných za katabolismus BCAA (BCKDHA, BCKDHB), je v tukové tkáni IR subjektů down-regulována (Lu et al. 2013). Právě AT byla recentně ustavena jako významný hráč v celotělovém metabolismu BCAA. AT je jednou z hlavních tkání, která vycytává exces BCAA, který není využit v periferních tkáních, zejména v kosterním svaly. Uhlíkatý skelet derivovaný deaminací BCAA slouží v AT jako prekurzor pro de novo lipogenezu. Podle některých je až 30 % lipogenního acetyl CoA v AT původem z BCAA (Green et al. 2016). Nižší kapacita AT pro metabolismus BCAA byla navržena jako možný spojující mechanismus mezi IR a vyššími hladinami BCAA (Herman et al. 2010).

Data o chronické expozici BCAA u lidí jsou stále omezená, což znemožňuje ustanovit kauzalitu, tedy, zda dietní přívod BCAA je sám o sobě dostačující k indukci IR, či zda jsou vyšší hladiny BCAA pouze odrazem rezistence kosterního svalu na inzulínem stimulovanou supresi proteolýzy.

Z tohoto ohledu se jeví zřetele hodná právě populace veganů. Z veganské stravy jsou eliminovány hlavní potravní zdroje BCAA: mléčné produkty, vejce a červené maso (Souci et al. 2000). I když velká část rostlinných zdrojů poskytuje dostatečné množství BCAA na gram proteinu (vhodný poměr BCAA/AA), celkový obsah proteinů v dietě a biologická dostupnost rostlinných proteinů je nižší ve srovnání se zdroji živočišnými (WHO technical report). V absolutních číslech lze tedy předpokládat, že celkový příjem BCAA je u veganů nižší než u omnivorů.



---

## 2. Cíle řešení a hypotézy

### 2.1. *Východiska*

**1/ *Observační studie.*** Populace veganů s extrémně odlišným způsobem příjmu nutrientů by mohla představovat unikátní model pro studium iniciálního zhoršování IS ve vztahu k dietním faktorům. Pokud by se nám podařilo verifikovat a zpřesnit nálezy dostupných studií a potvrdit, že vegani mají vyšší citlivost na inzulín, mohl by se tento model „vegan vs. omnivor“ zařadit mezi další standardní modelové populace v diabetologickém výzkumu. Dále pokud by se podařilo identifikovat rozdíly v metabolickém profilu mezi skupinami, pak by tento model mohl sloužit k intervencím s cílem popsat iniciální fáze zhoršování inzulínové senzitivity na celotělové i tkáňové úrovni ve vztahu k nutričním faktorům.

**2/ *Intervenční studie.*** Veganská strava, podle dostupných dat, může představovat protektivní faktor rozvoje řady onemocnění asociovaných s inzulínovou rezistencí. Od běžné stravy se odlišuje v celé řadě parametrů. Předpokládáme, že významným faktorem, který odlišuje veganskou stravu je nižší příjem BCAA. S ohledem na četné biologické funkce BCAA lze předpokládat, že právě nižší příjem BCAA může mít dopad na rozdílnou metabolickou kondici lidí na čistě rostlinné stravě. Navýšení podílu BCAA ve veganské stravě by mohlo modulovat parametry inzulínové citlivosti veganské populace ve směru populace stravující se bez omezení (omnivorů).

### 2.2. *Specifické řešené okruhy*

V rámci řešeného projektu byly provedeny čtyři studie zabývajícími se specifickými otázkami. První dva řešené okruhy byly metodologického rázu, na popis jejich řešení a výsledky v detailech odkazujeme na příslušné sekce v kapitole „Metodologie“ a na přiložené autorské články. Třetím okruhem je pilotní observační studie a čtvrtým okruhem je pak samotná studie intervenční.

---

1/ V první části řešení projektu bylo třeba do experimentální praxe v Centru pro výzkum diabetu, metabolismu a výživy 3. lékařské fakulty UK zavést metodu odběru vzorku kosterního svalu, tzv. svalovou biopsii. Svalová biopsie je metodou diabetologického výzkumu umožňující získat vzorek k *ex vivo* analýzám. O její rozšíření v tehdejším Československu se zasloužil prof. Vondra. Plánovali jsme, že s jeho pomocí budeme schopni metodu zavést i na našem pracovišti.

2/ S ohledem na předpokládané další zaměření studií na humánních subjektech na metabolismus BCAA, bylo třeba vyvinout reprodukovatelnou, snadno dostupnou metodu ke stanovení BCAA ve velkém souboru. Předpokládali jsme, že vhodnou metodou by mohla být bezkontaktní vodivostní kapilární elektroforéza.

3/ V první „observační studii“ jsme plánovali porovnat soubor veganů a omnivorů. Cílem této studie bylo popsat na větším souboru rozdíly v metabolických charakteristikách mezi exkluzivní skupinou veganů a jim odpovídajícím (věk, hmotnost, antropometrické charakteristiky, fyzická aktivita) kontrolám, a validovat model „vegan vs. omnivor“ pro plánovanou intervenci. Výsledky již citovaných observačních studií naznačují, že vegani mají vyšší IS kalkulovanou pomocí HOMA indexů. Zlatým standardem pro stanovení míry inzulínové citlivosti je však hyperinzulinemický euglykemický clamp (HEC). Toto vyšetření podle nám dostupných údajů u veganů zatím nikdo neprovedl. Zároveň množství IMCL bylo u veganů zkoumáno *in vivo* pomocí magnetické rezonanční spektroskopie (MRS) (Goff et al. 2005). Bylo zjištěno, že takto stanovený obsah IMCL v m. soleus (oxidativní pomalá vlákna) je u veganů signifikantně nižší.

Předpokládali jsme, že výstupy observační studie nám umožní vhled do posloupnosti rozvoje tkáňových defektů inzulínové funkce v rámci iniciálního zhoršování inzulínové citlivosti. Dále jsme předpokládali, že nám závěry studie poskytnou podklady pro další použití experimentálního modelu „vegan vs. omnivor“ pro intervence dietními modulačními.

4/ V druhé, „intervenční“, studii jsme plánovali na validovaném modelu „vegan vs. omnivor“ zkoumat účinky tříměsíční perorální suplementace BCAA u veganů a omnivorů, tedy

---

u populací lišících se v bazálním příjmu BCAA a parametrech inzulínové senzitivity. Vegan-  
ská dieta má nižší podíl proteinů (Clarys et al. 2014) a je prosta všech hlavních dietních  
zdrojů BCAA (Souci et al. 2000). Přitom mají vegani příznivější parametry glukózové tole-  
rance a nižší prevalenci T2DM než omnivoři (Gojda et al. 2013). Proto vegani představují  
vhodný model k intervenci BCAA s cílem poukázat na jejich možný vliv na modulaci IS.  
Předpokládali jsme, že dlouhodobá intervence BCAA u dvou skupin, lišících se v bazálním  
příjmu a citlivosti na inzulín, nám umožní poodhalit možný kauzální vztah mezi dietním  
příjmem BCAA a rozvojem IR.

## 2.3. Cíle a hypotézy

### 2.3.1. Observační studie

**Primární hypotéza.** Populace veganů má vyšší inzulínovou senzitivitu (stanovenou po-  
mocí HEC) a tomu odpovídající vyšší mitochondriální denzitu (jako ukazatel mitochondriální  
biogeneze) a nižší obsah IMCL v SM.

**Sekundární hypotézy.** Vegani mají nižší sérové koncentrace větvených AA a mají  
příznivější profil sérových lipidů a spektra volných mastných kyselin. Vegani mají nižší  
známky oxidačního poškození a endotelové dysfunkce a příznivější parametry glukózové  
a lipidové homeostázy. Dále mají vegani nižší tělesné zásoby železa.

Předpokládali jsme, že v případě potvrzení primární hypotézy, bude možné vegan-  
skou populaci použít jako model pro iniciační fáze zhoršování IS. Sekundární výsledky by  
nám pak poskytly data o potenciálně problematických nutričních faktorech omnivorní  
stravy, a vytvořily tak prostor pro formulování hypotéz o předpokládaném kauzálním vzta-  
hu těchto faktorů. Tyto hypotézy pak bylo možno verifikovat v intervenční studii.

---

### 2.3.2. Intervenční studie

**Primární hypotéza.** Suplementace BCAA povede u veganů ke zhoršení odsunu glukózy v clampovém vyšetření. V omnivorní skupině nepovede suplementace BCAA k žádným změnám.

**Sekundární hypotézy.** Suplementace BCAA povede u veganů ke zhoršení parametrů respirace v kosterním svalu, a tomu odpovídající změny v genové expresi (zvýšení katabolizmu BCAA, snížení inzulínové signalizace). V tukové tkáni veganů povede suplementace ke zvýšení genové exprese ve smyslu katabolizmu BCAA, zhoršení inzulínové signalizace a zvýšení lipolýzy.

Předpokládali jsme, že intervence BCAA podhalí kauzalitu mezi dietním příjmem BCAA, jejich sérovými hladinami a jejich vlivem na glukózovou homeostázu a funkci inzulínu na úrovni kosterního svalu a tukové tkáně. V případě, že bude potvrzena hypotéza, že BCAA modulují parametry metabolické homeostázy na celotělové úrovni, bude možné detekovat původ defektu na subcelulární úrovni a posloupnost změn v časných stádiích deteriorace citlivosti na inzulín.

## 3. Metodologie

### 3.1. *Design observační studie a subjekty*

Byla provedena observační case-control studie. Studovanou populací byl soubor 11 veganů (stravující se s úplným vyloučením živočišných produktů déle než 3 roky). Kontrolním souborem byla skupina 10 omnivorních subjektů (stravující se běžnou stravou a denně konzumující masné a mléčné produkty). Kontrolní skupina byla postavena tak, aby studované skupině odpovídala v parametrech taktéž asociovaných s IS (věk, pohlaví, BMI, míra fyzické aktivity, kalkulovaný proteino-energetický příjem). Do studie nebyly zařazeny subjekty, jejichž věk je pod 18 let, které trpí chronickými chorobami (zejména diabetem,

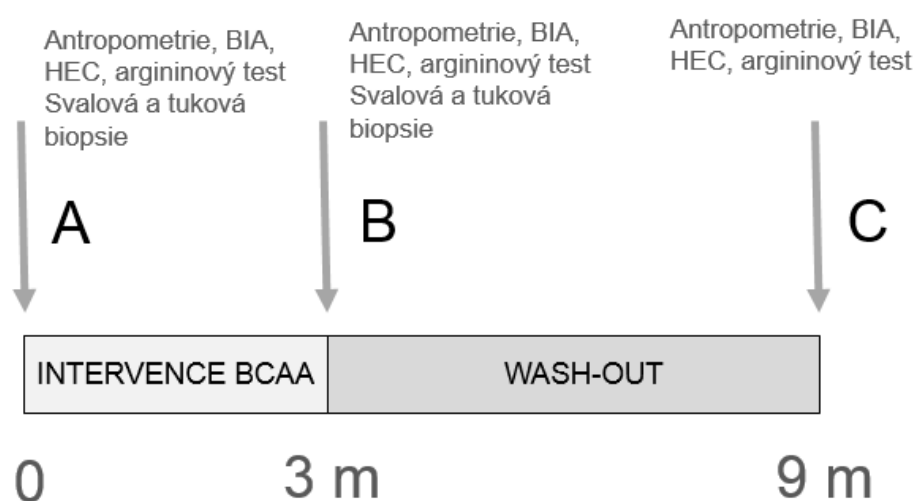
---

obezitou, tyreopatiemi, chorobami nadledvin apod.) či užívající chronickou medikaci se známým vlivem na energetický metabolismus. Vyloučeny byly také subjekty s rodinnou zátěží T2DM (T2DM v příbuzenstvu první linie), kouřením a pravidelnou konzumací alkoholu. Zařazeny také nebyly subjekty, u kterých byl kontraindikován odběr svalové tkáně (poruchy srážlivosti krevní či užívání antikoagulancií).

### 3.2. *Design intervenční studie a subjekty*

Do intervenční studie bylo rekrutováno 8 veganů (déle než 3 roky na exkluzivní veganské dietě) a 8 kontrolních omnivorních subjektů. Kritéria pro výběr omnivorních kontrol odpovídala kritériím užitým v observační studii. Intervence představovala suplementaci BCAA v dávce 15 gramů (ženy) či 20 gramů (muži). Použit byl komerčně dostupný preparát, který je vyroben bez živočišných produktů (BCAA 4:1:1 Fair Power<sup>®</sup>, Survival Nutrition Supplements, Czech Rep.) a svým složením vhodný pro vegany. Compliance k intervenci byla u každého jednoho dobrovolníka kontrolována telefonickými konzultacemi s týdenní frekvencí po celou dobu experimentu a osobní konzultací po šesti týdnech intervence.

**Obrázek 6:** Design intervenční studie



---

### 3.3. *Autorizace a etická komise*

Každý subjekt splňující kritéria pro zařazení do projektu byl informován o povaze protokolu a podepsal informovaný souhlas. Design studie, jakož i informovaný souhlas byl schválen etickými komisemi 3. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a byl realizován v souladu s pravidly dobré klinické praxe. Intervenční studie byla registrována na veřejném registru [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), identifikátor: NTC02684929. Veškerá práce s dobrovolníky probíhala na Oddělení klinické fyziologie 2. interní kliniky Fakultní Nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

### 3.4. *Metody*

***Klinické vyšetření a antropometrie.*** Každý zařazený dobrovolník podstoupil úvodní lékařské vyšetření s odběrem anamnézy a základním fyzikálním vyšetřením se zaměřením na exkluzivní kritéria (viz výše). Dále byl zaznamenán typ diety a u veganů doba veganského stravování. U každého subjektu byla provedena základní antropometrická vyšetření: výška (m), hmotnost (kg) a BMI ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ), měřen obvod pasu (cm), poměr obvodu pasu a boků (waist-hip ratio, WHR), obvody paže, stehna a lýtka ke kalkulaci obvodů svaloviny končetin. Dále pomocí graduovaného kaliperu byly změřeny tloušťky kožních řas na devíti standardních místech těla (faciální, submentální, horní a dolní pektorální, subskapulární, abdominální, suprailická, femorální a krurální). Složení tělesných kompartmentů bylo měřeno pomocí bioimpedanční analýzy za použití multifrekvenční BIA (Nutriguard-M, Data Input GmbH, Frankfurt, Germany). Množství viscerálního tuku bylo stanoveno pomocí sonografického vyšetření (přístroj Philips iU22) jako tloušťka tukové omentální vrstvy mezi vnitřní břišní fascií a aortou na úrovni pupku. Krevní tlak byl měřen standardní auskultační metodou za použití kalibrovaného rtuťového tonometru, tepová frekvence ručně počítáním hmatných pulsů nad a. radialis. Každé z výše uvedených měření bylo provedeno třikrát a zapsána byla průměrná hodnota.

---

**Hodnocení dietního příjmu.** Od každého participanta byl získán vyplněný prospektivní dotazník 3-denního příjmu (2 všední dny, 1 víkendový den). K hodnocení nutričního příjmu bylo použito programu Nutridan. Vzhledem k tomu, že v databázi nejsou dostupná data pro část speciálních veganských produktů, byly od veganů získány obaly takovýchto potravin a byly použity výrobcem deklarované hodnoty obsahu nutrientů. Zvlášť byl vypočítán průměrný příjem energie, příjem sacharidů (mono a disacharidů, polysacharidů), množství proteinů a lipidů. Data z dotazníků byla dále využita k odhadu podílu BCAA (Souci et al. 2000).

**Hodnocení fyzické aktivity.** Fyzická aktivita byla hodnocena za pomoci Baeckeho dotazníku fyzické aktivity (Baecke et al. 1982), jehož skóre koreluje dobře s  $VO_2\max$  (Florindo et al. 2006). V dotazníku se hodnotí zvlášť fyzická aktivita v zaměstnání, sportu a volném čase. Maximální zátěžový test byl proveden u každého ze subjektů zařazených do intervenční studie. Bylo užito bicyklového ergometru (Ergoline 800, Bitz, Germany). Iniciální zátěž 50 W byla zvyšována o 25 W každou minutu do plného vyčerpání subjektu. Analýza plynů ve vydechované směsi byla měřena za pomoci Vmax, Sensor Medics (Yorba Linda, CA).

**Analýzy ze séra.** Ráno po 12-ti hodinovém lačnění byl vyšetřovaným subjektům proveden odběr venózní krve. Stanoveny byly následující laboratorní parametry (stanoveno v certifikovaných laboratořích Ústavu laboratorní diagnostiky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady). Základní biochemické a hematologické vyšetření: krevní obraz a diferenciální rozpočet leukocytů, koagulační vyšetření (APTT, Quickův čas, INR, fibrinogen), sérové hladiny minerálů, kreatinin, urea, kyselina močová. Ukazatele glukózové homeostázy: sérové hladiny glukózy, C-peptidu, HbA1c, inzulínu. Parametry metabolismu vápníku: sérové hladiny Ca, P, PTH. Parametry metabolismu železa: sérové hladiny Fe, ferritin, transferrin, V<sub>k</sub>Fe. Lipidové spektrum: sérové hodnoty celkového cholesterolu, triglyceridů, apo A1, apo B, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol byl kalkulován standardní Friedewaldovou rovnicí.

**Sérové hladiny BCAA.** V rámci řešení projektu byla vyvinuta a do experimentální praxe zavedena metoda stanovení BCAA pomocí bezkontaktní vodivostní kapilární elektroforózy (CE). Tato technologie představuje při analýze neabsorbujících látek, kterými AA jsou, řadu výhod. Umožňuje rychlou analýzu velkého množství vzorků, dobrou separaci komplexních

---

zdrojových matric jako je sérum, relativně vysokou detekční citlivost vyžadující pouze minimální množství vzorku pro analýzu a také tedy nižší náklady na chemikálie. Pro detailní popis vývoje a zavádění metody odkazujeme na příložený autorský článek. K samotné metodice zpracování vzorků BCAA v rámci humánních studií. Veškerá elektroforetická měření byla provedena na elektroforetickém přístroji HP 3DCE systém (Agilent Technologies, Waldbronn Germany) vybaveným bezkontaktním vodivostním detektorem (C 4D), který je zabudován do elektroforetické kazety a termostatován na 25°C. C 4D, se dvěma 2,5 mm dlouhými tubulárními elektrodami od sebe vzdálenými 1,2 mm, pracuje se střídavým sinusovým signálem o frekvenci 1,8 MHz a efektivní hodnotou napětí 50 V. Separace aminokyselin s větveným postranním řetězcem byly provedeny v křemenné kapiláře o délce 31,5 cm, délka k C 4D 14,7 cm, vnitřní průměr 25 µm, vnější průměr 360 µm; vnitřní stěna kapiláry byla před prvním použitím pokryta INST pokrývacím roztokem (Biotaq, U.S.A.) pro potlačení elektroosmotického toku (EOF) (Tůma et al. 2010). Separace aminokyselin byly provedeny v optimalizovaném základním elektrolytu se složením 3,2M kyselina octová v 20% v/v metanolu, pH 2,0. Vzorky krevní plasmy získané od zdravých dobrovolníků byly před CE stanovením upraveny přídavkem acetonitrilu; 250 µl vzorku plasmy bylo deproteinizováno přídavkem 750 µl acetonitrilu, po 30 s protřepání byl vzorek centrifugován silou 4 G po dobu 45 s a supernatant byl následně použit k CE analýze. Vzorek byl dávkován do kapiláry tlakem 50 mbar po dobu 16 s.

**Parametry oxidativního stresu.** Z parametrů oxidativního stresu byly stanoveny pomocí oxLDL (komerční ELISA kit, Mercodia, Sweden), oxLDL-β<sub>2</sub>GPI (komerční ELISA kit, Corgenics, USA) a hladina malondialdehydu. Hladina celkového malondialdehydu ve vzorcích krevní plazmy byla měřena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) s UV detekcí po derivatizaci 2,4-dinitrofenylhydrazinem, která byla popsána (Matejckova et al. 2011). Ke 100 µl krevní plazmy bylo přidáno 100 µl inertního standardu methylmalondialdehydu a směs byla hydrolyzována ve 400 µl 1,5M NaOH při 60 °C po dobu 60 minut. Po vychladnutí bylo ke směsi přidáno 200 µl 35% HClO<sub>4</sub>. Následně byl vzorek derivatizován přídavkem 50 µl 2,4-dinitrofenylhydrazinem při teplotě 60°C po dobu 30 minut. K vychladlému vzorku byly přidány 2 µl hexanu a směs byla protřepávána po dobu 8 minut. Poté byl vzorek centrifugován 3 minuty. Extrakce do hexanu byla opakována dvakrát. Veškerý supernatant byl vysušen proudem dusíku do sucha při teplotě



---

40°C. Získaný odparek byl rozpuštěn ve 250 µl mobilní fáze (acetonitril:voda, 40:60, v/v). Chromatografická měření byla provedena na přístroji HPLC (Shimadzu, Japonsko) v sestavě: pumpa LC-10ADvp, autosampler SIL-10ADvp, UV/VIS detektor SPD-10Avp. K separaci derivatizovaného vzorku byla použita kolona Ascentis Express C18, 100 x 3 mm s velikostí částic 2,7 µm (Sigma-Aldrich), která byla termostatována po celou dobu analýzy na 30°C. Separace probíhala izokraticky s mobilní fází o složení acetonitril:voda s přidavkem kyseliny octové (40:60 v/v). Průtoková rychlost byla 0,4 ml.min<sup>-1</sup>. K dávkování vzorku byla použita dávkovací smyčka o objemu 5 µl. Odezva detektoru byla sledována při 307 nm. Pro ovládání přístroje byl použit program LC Solution verze 1.11SP (Shimadzu, Japonsko).

Z parametrů **endoteliální funkce** byly stanoveny I-CAM1 a E-selektin (komerční ELISA kit, Qiagen, Germany). Pro stanovení **hladiny sérového hepcidinu a prohepcidinu** byly použity komerční ELISA kity (DRG Instruments GmbH, Germany).

**Tloušťka intimy-medie karotických tepen.** Každý subjekt podstoupil B-mode sonografické (přístroj Philips iU22) měření tloušťky intimy-medie arteria carotis communis (IMT, intima-media thickness). Všechna měření prováděl jeden sonografista. Vyšetřovaná osoba byla vyšetřena v poloze na zádech, krk v mírném záklonu. IMT byla definována jako vzdálenost rozhraní intima-lumen a media-adventicie. Měření bylo prováděno automaticky v 10 mm úsecích za použití programu QLAB 10-15 mm distálně od bifurkace společné karotické tepny, a to vždy 10-krát. Zaznamenaná hodnota IMT byla pak průměrem všech 10 měření na každé jednotlivé straně. Zvlášť byla zaznamenávána přítomnost plátu, který byl definován jako lokální ztluštění intimy-medie  $\geq 1,00$  mm, popřípadě nález stenózy.

**Inzulínová citlivost.** Citlivost na inzulín byla stanovována pomocí 2-hodinového hyperinzulinemického euglykemického zámku, neboli clampu. Tato metoda je považována za zlatý standard ve vyšetření periferní IR a byla detailně popsána (DeFronzo et al. 1979). Principem je zhodnocení citlivosti na základě odsunu glukózy při intravenózním podání definovaného množství inzulínu. Dávka inzulínu (1 mIU.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) byla empiricky stanovena tak, abychom dosáhli konstantní hyperinzulinémie, která odpovídá přibližně postprandiálním koncentracím inzulínu (hyperinzulinemický clamp). Tato inzulinémie je za ideálních podmínek dostatečující k inhibici hepatální produkce glukózy a k inhibici endogenní sekrece inzulínu. Souběž-

---

ně s infúzí inzulínu je podáván intravenózně roztok glukózy ve stoupající rychlosti perfúze tak, aby byla udržena euglykemie (euglykemický clamp). Obvykle po 60-90 minutách zvyšující se potřeby glukózy již tato dále nestoupá a celý zpětnovazebný systém se dostává do rovnovážného stavu (tzv. steady-state či vrchol clampu). Množství glukózy (resp. rychlost infúze roztoku glukózy o známé koncentraci) v této fázi, potřebná pro udržení euglykemie, je ekvivalentní odsunu glukózy z extracelulárního prostředí do buněk. Vyjadřujeme ho obvykle jako tzv. M-hodnotu („metabolized“ glucose). M-hodnota je kalkulována z rychlostí průtoku roztoku glukózy během posledních pěti konsekutivních měření v rovnovážné fázi clampu. Clamp byl v rámci projektu prováděn s modifikacemi. U pacientů s T2DM je známo, že hepatální produkce glukózy nemusí být inhibována ani při vysokých inzulinémiích. Avšak vzhledem k tomu, že u všech vyšetřovaných subjektů jsme předpokládali dobrou inzulinovou citlivost (do studie nebyli zařazeni obézní ani T2DM či jejich příbuzní) jaterní produkci glukózy jsme nestanovovali. Navíc byla ke stanovování glykémie použita venózní místo arterializované krve.

Samotný test probíhal po 12-ti hodinovém lačnění, kdy byla každému subjektu zakanalována antekubitální žíla na každé horní končetině. Po relaxaci a odběru bazálních vzorků (glykemie, inzulín, C-peptid), byla zahájena infúze inzulínu (Humulin R, Eli Lilly, ČR) vypočtenou standardní dávkou  $1 \text{ mIU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , s úvodní 10-ti minutovou „prime“ sekvencí dvojnásobnou rychlostí. Ve 4. minutě byla zahájena infúze 15% roztoku glukózy, jejíž rychlost byla upravována tak, aby byla udržena euglykemie. Glykemie byla stanovována každých 5 minut přístrojem Precision PCx (Abbott Laboratories, Německo). V posledních 30 minutách byly provedeny celkem tři odběry na stanovení inzulinémie, ve 120. minutě byla navíc stanovena hladina C-peptidu. Ke kalkulacím byla použita průměrná rychlost perfúze roztoku glukózy z pěti konsekutivních měření po dobu 30 minut na vrcholu clampu. Výpočet inzulinové senzitivity na dané hladině inzulínu byl potom dán množstvím infundované glukózy za jednotku času vztahované na tělesnou hmotnost (M-hodnota,  $\text{g}/\text{min}/\text{kg}$ ) po korekcích na změnu poolu glukózy v extracelulární tekutině (space correction). Každý jednotlivý test byl ex post validován dostatečným vzestupem inzulinémie a dostatečnou supresí C-peptidu na vrcholu clampu oproti bazálnímu stavu. Skupiny byly vždy porovnány také v hodnotách průměrných rovnovážných glykemiích a inzulinémiích.

---

**Sekrece inzulínu.** Sekrece inzulínu byla hodnocena pomocí IV argininového testu za použití již popsaného protokolu (Palmer et al. 1976). Stručně: po 12-ti hodinovém lačnění byl subjekt uložen na lůžko, zakanylován a relaxován; následně bylo aplikováno 5 g argininu v 50 ml 0.9% fyziologického roztoku (Arginin chlorid 21% 80ml, Ardeapharma, Ševětín, Czech Republic) jako IV bolus během 45 s. Následně byly prováděny odběry periferní krve v čase 0, 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30 minut. Byly stanovovány hladiny inzulínu a C-peptidu. Akutní inzulínová odpověď byla vyjádřena jako inkrementální plocha pod křivkou (iAUC), kalkulována za pomoci trapezoidálního modelu. Všechny plochy pod výchozí hodnotou nebyly do výpočtů zařazeny. Test byl prováděn v minimálně sedmidenním odstupu od glukózového clampu.

**Biopsie kosterního svalu.** Studium metabolismu kosterního svalu vyžaduje snadnou metodu pro získání vzorků tkáně, kterou představuje perkutánní punkční biopsie. Punkční přístup má oproti otevřenému přístupu řadu výhod. Především zachovává maximálně fyziologické podmínky. Jedná se o rychlý a minimálně invazivní výkon, který je možné provádět ambulantně v lokální anestezii. Navíc osvojení této techniky nevyžaduje hlubší chirurgickou přípravu. Vzhledem k tomu, že je obvykle velmi dobře snášena, je možné jí provádět opakovaně během intervenčních studií, fyzické zátěže, dokonce také mimo klinické zázemí. V rámci řešení tématu disertace byla technika punkční biopsie m. vastus lateralis zavedena na našem pracovišti. Na detaily metody a protokolu odkazujeme na autorský článek „Postavení perkutánní svalové biopsie v diabetologickém výzkumu“, který je součástí přílohy.

Každý subjekt v observační studii a ve studii intervenční (před a po intervenci) podstoupil punkční svalovou biopsii m. vastus lateralis. Ve stručnosti uvádím metodologii. Byla použita standardní metoda odběru Bergströmovou jehlou (Bergstrom 1975; Vondra 1988; Gojda et al. 2015). V rámci protokolu byla technika odběru následující. Dobrovolník se dostavil v den odběru ráno na lačno na operační sálek. Byl informován o povaze výkonu a byl získán informovaný souhlas. Následně byl dobrovolník uložen na zákrovové lůžko a byla připravena operační plocha na rozhraní dolní a střední třetiny stehna. Samotný výkon byl prováděn za přísně sterilních kautel. Po dezinfekci a zarouškování byla provedena infiltrační anestezie v místě plánovaného odběru, anestezie byla vedena tak, aby nedošlo k aplikaci anestetika do samotné svalové tkáně. Následně byla provedena drobná incize kůže skalpelem a případné drobné krvácení bylo stavěno kompresí. Následně bylo preparováno podkoží až na fascii, která byla protnuta. Následně do takto připraveného kanálu byla

---

zasunuta bioptická jehla a sukčným podtlakem bylo do jehly nasáto malé množství tkáně, které bylo následně odděleno vnitřním kráječem jehly. Z jednorázového odběru bylo obvykle možné vytěžit cca 70-80 mg svalu. Odběr byl opakován ze stejného místa, dokud nebylo dosaženo požadovaného množství 200 mg svalové tkáně. Rána byla následně komprimována, okraje rány byly sblíženy a dle potřeby byl naložen náplastový steh (Steristrip). Následně byla rána sterilně kryta a stehno bylo obvázáno elastickým obinadlem a ledováno.

Odebraný vzorek byl hned na místě druhou osobou podroben mikrodisekci pod binokulárním mikroskopem, zvážen, rozdělen pro příslušné analýzy, zamrazen v tekutém dusíku na teplotu  $-80^{\circ}\text{C}$  či transportován k další analýze na suchém ledu.

**Biopsie podkožní tukové tkáně.** Biopsie SAAT byla provedena u každého subjektu zařazeného do intervenční studie spolu s biopsií kosterního svalu. Bylo užito Bergströmovy metody (Alderete et al. 2015). V rámci protokolu byla technika odběru následující. Po desinfekci a zarouškování byla provedena infiltrační anestezie v místě plánovaného odběru, cca 5 cm paraumbilikálně. Následně byla provedena drobná incize kůže skalpelem a případné drobné krvácení bylo stavěno kompresí. Následně byla do podkoží zasunuta bioptická jehla a podtlakem bylo do jehly nasáto malé množství tukové tkáně, které bylo následně odděleno vnitřním kráječem jehly. Z jednorázového odběru bylo obvykle možné vytěžit cca 50-100 mg tuku. Odběr byl opakován ze stejného místa, dokud nebylo dosaženo požadovaného množství 300 mg tukové tkáně. Rána byla následně komprimována, okraje rány byly sblíženy, v případě potřeby byl naložen náplastový steh (Steristrip) a rána byla sterilně kryta.

Odebraný vzorek byl na místě druhou osobou preparován, rozdělen na příslušné analýzy a transportován na suchém ledu.

**Mitochondriální denzita kosterního svalu.** Aktivita CS byla stanovena podle standardního protokolu s využitím komerčně dostupného kitu (Sigma, CS0720). Část vzorku svalu (cca 30 mg) byla naředěna 20 $\times$  v lyzačním pufru (Sigma, C3228) s proteázovým inhibitorem (Sigma, P8340) a zhomogenizována v Dounce homogenizátoru. Homogenát byl zcentrifugován na 14000 $\times$ g, 10 min. při  $4^{\circ}\text{C}$  pro odstranění pevných částí a supernatant dále udržován na ledě. Aktivita CS byla měřena spektrofotometricky při  $25^{\circ}\text{C}$ . Vzorky byly připraveny v triplikátech. Nejprve byla změřena endogenní deacetylázová aktivita a po přidání substrá-

---

tu celková aktivita CS. Absorbance byla zaznamenávána v 10s intervalech po dobu 1.5 min. při 412 nm. Hodnoty absorbance byly vyneseny v čase a ověřena jejich linearita (indikující dostatek substrátu). Z výnosu byla odečtena aktivita CS za minutu a po odečtení endogenní aktivity vypočítána aktivita CS v mikromolech za minutu na gram vlhké tkáně. Jednotlivé vzorky byly analyzovány v náhodném pořadí.

*Relativní množství mtDNA* ve vzorku bylo stanoveno pomocí kvantitativní PCR. Z části svalové biopsie (cca 20 mg) byla izolována celková DNA pomocí komerčního kitu (Qiagen). Pro kvantifikaci mtDNA byl amplifikován 221 nukleotidů dlouhý fragment mtDNA. Pro normalizaci výsledků byl amplifikován 142 nukleotidů dlouhý fragment jaderného genu pro  $\beta$ -globin. Reakční směs pro PCR, o celkovém objemu 20  $\mu$ l, obsahovala 15 ng templátové DNA, 200  $\mu$ M směs nukleotidů, 1.25 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 20 pmol sense primeru, 20 pmol antisense primeru, 1U rTth DNA polymerázy XL (Applied Biosystems) a 2  $\mu$ g BSA. Sekvence použitých primerů viz níže. Pro PCR byl použit termocykler Bio-Rad C1000TM. Mitochondriální fragment byl amplifikován na 15 a jaderný fragment na 26 cyklů. Počet cyklů byl empiricky stanoven tak, aby se nacházel v exponenciální fázi, tedy aby nebylo dosaženo plateau reakce. PCR produkt byl kvantifikován fluorometricky pomocí Qubit fluorometru (Invitrogen). Výsledný poměr amplifikace (množství produktu) mitochondriálního a jaderného fragmentu vyjadřuje potom relativní množství mtDNA v buňce.

#### PRIMERY

Jaderný fragment, 142 nukleotidů (Sigma)

Sense: 5'-CGAGTAAGAGACCATTGTGGCAG-3'

Antisense: 5'-GGGGCTTGTAGGCATTTGCT-3'

Mitochondriální fragment, 221 nukleotidů (Metabion)

Sense: 5'-TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG-3'

Antisense: 5'-CCCCACAAACCCCATTAATAACCCA-3'

***Aktivita komplexů dýchacího řetězce.*** Enzymatické aktivity jednotlivých komplexů dýchacího řetězce (I-IV) a citrát syntázy (CS) byly měřeny spektrofotometricky ve svalových homogenátech. Homogenáty byly připraveny podle publikovaného protokolu (Spinazzi et al. 2012). Vzorek kosterního svalu (přibližně 50 mg) byl skalpelem nařezán na drobné kousky, 20x naředěn v homogenizačním pufru (250 mM sacharóza, 20 mM Tris, 40 mM KCl, 2 mM

---

EGTA, inhibitor proteáz, pH 7.4) a zhomogenizován ve skleněném 1 ml Dounce homogenizátoru. Všechny kroky byly prováděné na ledě. Homogenát byl zcentrifugován (10 min, 600 g, 4°C) a supernatant okamžitě použit k analýze. V alikvotu supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů pomocí bicinchoninic acid (BCA) assay (Sigma).

Aktivita komplexů I-IV a CS byla stanovena podle publikovaných protokolů (Spinazzi et al. 2012; Janssen et al. 2007; Cooperstein a Lazarow 1951), které byly modifikovány pro měření v destičkovém spektrofotometru (Infinite M200 PRO, Tecan) v objemu 200  $\mu$ l. Všechna měření byla prováděna v tetraplikátech. Aktivita respiračních komplexů a CS byla vyjádřena jako nmol/min/mg celkového proteinu, s výjimkou komplexu IV, jehož aktivita byla vyjádřena jako  $\Delta \log (A550)/\text{min/mg}$  celkového proteinu. Aktivita respiračních komplexů byla také normalizována na aktivitu CS, která je považována za marker množství mitochondrií ve tkáni.

***Kvantitativní real time PCR (RT-qPCR).*** Celková RNA ze tkáně (AT, SM) byla izolována za použití komerčně dostupných kitů Lipid Tissue and Fibrous Tissue RNeasy Mini Kits (Qiagen, Germany). Koncentrace RNA byla měřena pomocí Nanodrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). RNA byla ošetřena DNazou I (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) tak, aby byla odstraněna veškerá genomická DNA. cDNA byla připravena z 200–600 ng RNA za využití High Capacity cDNA archivačního kitu (Applied Biosystems, Carlsbad CA, USA). Ekvivalent 5 ng RNA byl použit k real time PCR reakci za využití kitu Fast Advanced master mix and Gene expression assay (IRS1, GLUT4, BCKDHA, BCKDHB, ACOX, CPT1b, PLIN1, PLIN2, PLIN5, FASN, SCD1, DGAT2, PPAR- $\gamma$ ; Applied Biosystems). Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech. Genová exprese cílových genů byla normalizována na expresi RPS12 (Ribosomal Protein S13) a relativní změny byly kalkulovány pomocí  $\Delta\Delta\text{Ct}$  metody.

***Lipidologické analýzy.*** *Mastné kyseliny v kosterním svalu a tukové tkáni.* Předem zvážený a zamražený vzorek tukové tkáně o hmotnosti 25-50 mg byl přenesen do třecí misky společně se 100 ml roztoku interního standardu (C13 a C17) a 1 ml směsi chloroform:methanol (2:1). Po desintegraci tkáně byl vzniklý extrakt zfiltrován. Extrakce byla opakována celkem 4 $\times$  1 ml směsi chloroform:methanol. Vzniklý extrakt byl odpařen pod proudem dusíku do sucha a po uzavření uskladněn při -20 °C až do esterifikace a analýzy na plynovém chromatografu (GC).

---

*Esterifikace/transesterifikace lipidových extraktů.* Pro analýzu na plynovém chromatografu (GC) jsou veškeré mastné kyseliny obsažené v získaných lipidových extraktech převedeny na jejich methylestery (FAME). Tato derivatizace je prováděna metodou kterou popsali Lepage a Roy (Lepage a Roy 1986) s následnou modifikací Rodríguez-Palmera a kolektivu (Rodríguez-Palmero et al. 1998). K lipidovému extraktu je přidána esterifikační směs obsahující 3,2 ml metanolu, 0,8 ml toluenu a 0,2 ml acetylchloridu. Po krátkém protřepání je uzavřená zkumavka umístěna do vodní lázně při 100 °C na 1 h. Následně je po zchlazení přidáno 6 ml 12% roztoku uhličitanu draselného. Směs je 15 minut třepána na horizontální třepačce a centrifugována. Vrchní organická fáze obsahující toluen a vzniklé FAME je odebrána do vialky pro analýzu na GC.

*Plazmatické volné mastné kyseliny.* Volné mastné kyseliny (FFA) byly extrahovány a esterifikovány metodou kterou popsali Hušek, Šimek a Tvrzická (Hušek a Šimek 2002). Vytvoří se směs 100 µl isooktanu obsahujícího interní standard (C13 a C17), 200 µl plazmy, 250 µl srážecího roztoku (acetonitril:voda, 2:1 + 5 g.l<sup>-1</sup> kyseliny šťavelové) a 400 µl isooktanu. Směs se protřepe na vortexu a centrifuguje. Vrchní frakce se přepipetuje do vialky obsahující 150 µl reextrakčního roztoku (acetonitril:vodný roztok hydroxidu sodného 10 g.l<sup>-1</sup>, 9:1). Směs se znovu promíchá a centrifuguje. Horní frakce se odsaje do odpadu. Do vialky se přidá 100 µl isooktanu a opět se promíchá na vortexu a centrifuguje. Horní frakce se opět odsaje do odpadu. K takto vyextrahovaným a přečištěným FFA se přidá 100 µl katalyzačního roztoku. Ten se připraví rozpuštěním 1 g dimethylaminopyridinu v 1,5 ml směsi methanol:dichlormethan (1:1) v 10 ml baňce doplněné následně isooktanem. Dále se přidá 50 ml esterifikačního roztoku (isooktan:methylchloroformát, 9:1). Směs se promíchá na vortexu a zhruba po 1 min se přidá 100 µl čistícího roztoku (1 M HCl). Po krátkém promíchání je horní organická fáze obsahující methylestery mastných kyselin připravena k analýze na GC.

*Analýza na plynovém chromatografu (GC).* Připravené FAME byly analyzovány na přístroji GC-17A verze 3 (Shimadzu, Japan) s FID detektorem. Byla použita kolona Stabilwax 15 m × 0,25 mm (Restek, USA) s tloušťkou stacionární fáze 0,1 mm. Teplotní program začínal na 120°C s teplotním gradientem 10°C/min na 190°C a poté s gradientem 90°C/min na 250°C. Na této teplotě byla kolona držena při analýze FFA 3,6 min a při analýze FA tuko-

---

vé tkáně a fosfolipidů erytrocytů 15,6 minut. Doba analýzy FFA byla 11,5 minut a 23 minut pro ostatní analýzy. Teplota nástřikového portu byla 250°C a teplota detektoru 280°C. Jako nosný plyn bylo použito helium o průtoku 1,2 ml.min<sup>-1</sup>. Split byl nastaven na hodnotu 1:10 pro analýzu FFA a 1:100 pro analýzu mastných kyselin tukové tkáně. K ovládání a vyhodnocování sloužil software Class-VP verze 4.3 s převodem dat do MS Excel 97.

**Statistické analýzy.** Data jsou vyjádřena jako průměry ± směrodatná odchylka (SD) a jako rozdíly průměrů s 95% konfidenčním intervalem pro rozdíl. Hladina významnosti  $p < 0.05$  byla považována za signifikantní.

*Observační studie.* Data byla testována na normalitu rozložení. Pro normálně distribuovaná data bylo pro testování signifikance mezi nezávislými skupinami užito Studentova t-testu, pro data, která nebyla distribuována normálně pak Wilcoxonova testu. Vztahy mezi proměnnými a změnami proměnných byly vyjádřeny za použití výpočtu Personova korelačního koeficientu, resp. Spearmanova koeficientu pro nenormálně rozložená data. K analýzám byl použit software Statistica 9.0, StatSoft, Inc. USA.

Longitudinální data *intervenční studie* byla analyzována pomocí mixed-effect (multilevel) regresního modelu. Fixní část modelu je vždy tvořena interakcí mezi skupinou a vizitou. Pro random part bylo pro každý parametr testováno několik modelů: lineární regrese (bez random part), random intercept, random slope bez a s covariance s random intercept bez a s covariance mezi rezidui. Nejlepší model byl vybrán dle Bayesian information criterion (BIC) a dle likelihood ratio testu. Pro většinu parametrů byl nejlepším modelem random intercept model. U několika parametrů genové exprese nebyl random intercept model signifikantně odlišný od lineární regrese dle likelihood ratio testu a tyto parametry byly analyzovány lineární regresí. Většina parametrů splňovala kritéria normálního rozložení dle Shapiro-Wilkova testu. Výstup z regresního modelu je u těchto parametrů prezentován jako rozdíl průměrů podskupin s 95% confidence interval (CI). Některé parametry (zobrazeno v textu) jsou lognormálně rozložené. U těchto parametrů jsme provedli regresi na zlogaritmovaných hodnotách a rozdíl průměrů jsme zpětně exponenciovali. Tím jsme získali poměr geometrických průměrů, který je opět prezentován s 95% CI. Pokud byla variabilita parametru statisticky signifikantně odlišná mezi skupinami (variance-comparison test), modelovali jsme random part modelu izolovaně pro obě skupiny. Vztahy mezi proměnnými a změnami proměnných byly vyjádřeny za použití výpočtu Personova korelačního



---

koeficientu, resp. Spearmanova koeficientu pro nenormálně rozložená data. Pro analýzy intervenční studie byl použit software Stata 14.2, StataCorp, LP, Texas, USA.

## 4. Výsledky

### 4.1. *Observační studie*

#### 4.1.1. **Základní charakteristiky souboru**

Tabulka číslo 2 shrnuje základní charakteristiky obou skupin. Obě skupiny se signifikantně nelišily v zastoupeném pohlaví, antropometrických parametrech (BMI, WHR), BIA charakteristikách, tedy tukové a netukové tělesné hmotě. Ve skupině veganů je patrný trend k vyššímu množství viscerálního tuku (vegani  $4.11 \pm 2.28$  vs. kontroly  $2.96 \pm 1.1$  cm, 95% CI: -0.587 až 2.875,  $p = 0.181$ ) a nižšímu množství tuku podkožního (vegani  $1.33 \pm 0.63$  vs. kontroly  $2.09 \pm 1.32$  cm, 95% CI: -1.779 až 0.258,  $p = 0.134$ ) a trend k vyšší míře fyzické aktivity (vegani  $9.89 \pm 1.42$  vs. kontroly  $8.88 \pm 1.12$ , 95% CI: -0.172 až 2.180,  $p = 0.09$ ). Signifikantní rozdíl byl zaznamenán u věku, skupina veganů je v průměru starší (vegani  $30.30 \pm 3.93$  vs. kontroly  $27.12 \pm 1.10$  let, 95% CI: -5.881 až -0.483,  $p < 0.05$ ). Skupiny se nelišily v celkovém příjmu energie (karbohydráty a lipidy) ani v příjmu proteinů. Vegani se stravovali čistě rostlinnou dietou v průměru  $8,05 \pm 3,831$  let.

---

**Tabulka 2** Charakteristiky observačního souboru

	<b>Vegan (n=11)</b> průměr ± SD	<b>Omnivor (n=10)</b> průměr ± SD	<b>P-hodnota</b>
Věk (v letech)	30.30 ± 3.93	27.12 ± 1.10	0.023
Výška (m)	1.75 ± 0.09	1.77 ± 0.07	0.665
Váha (kg)	68.63 ± 14.02	73.15 ± 12.82	0.451
BMI (kg.m <sup>-2</sup> )	22.15 ± 3.02	23.24 ± 2.89	0.412
WHR	0.86 ± 0.10	0.89 ± 0.14	0.583
Délka veganské diety (v letech)	8.05 ± 3.83		
<b>Bioimpedance</b>			
Tuková hmota (kg)	9.22 ± 6.03	11.98 ± 8.39	0.419
Netuková hmota (kg)	57.56 ± 13.38	62.01 ± 11.12	0.443
Viscerální tuk – US (cm)	4.11 ± 2.28	2.96 ± 1.1	0.181
Podkožní tuk – US (cm)	1.33 ± 0.63	2.09 ± 1.32	0.134
<b>Fyzická aktivita</b>			
Baecke score	9.89 ± 1.42	8.88 ± 1.12	0.090
<b>Příjem makronutrientů</b>			
Celková energie (kcal)	2097.67 ± 531.2	2023.00 ± 563	0.771
Lipidy (%)	36.13 ± 7.65	42.31 ± 8.49	0.116
Sacharidy (%)	48.90 ± 10.57	40.39 ± 7.51	0.057
Proteiny (g)	74.78 ± 22.96	81.10 ± 19.63	0.526
Proteiny (%)	14.96 ± 5.08	17.31 ± 5.23	0.336

Porovnání rozdílů průměrných hodnot ± SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. \* p<0.05, hranice statistické signifikance. BMI, body mass index; WHR, waist hip ratio, poměr obvodu pasu a boků; US, ultrazvuk.

#### 4.1.2. Profil parametrů z periferní krve

Lačný sérový profil parametrů z periferní krve shrnuje tabulka 3. Vegani měli nižší hladiny celkového cholesterolu (p<0.05). Ostatní parametry (hladiny triglyceridů, LDL a HDL-cholesterolu) se signifikantně mezi skupinami nelišily. Dále měli vegani nižší hladinu Apo A1 v porovnání s kontrolami (p<0.05). Ve spektru FFA měli vegani signifikantně vyšší

hladiny celkových PUFA ( $p < 0.001$ ) a nesignifikantně, ale s jasným trendem vyšší celkové hladiny FFA. Dále byly patrné vyšší hladiny omega-3 alfa-linolenové kyseliny (ALA,  $p < 0.001$ ) a omega 6 linolové kyseliny (LA,  $p < 0.01$ ), eicosadienové kyseliny (EDA,  $p < 0.01$ ) a dihomo-gamma-linolenové kyseliny (DGLA,  $p < 0.05$ ) u veganů. Vegani měli dále signifikantně nižší hladinu celkového vitamínu B12 ( $p < 0.05$ ) a vyšší hladinu folátu ( $p < 0.05$ ).

**Tabulka 3** Profil parametrů séra

	<b>Vegan (n=11)</b>	<b>Omnivor (n=10)</b>	<b>P-hodnota</b>
	průměr ± SD	průměr ± SD	
<b>Lipidové spektrum</b>			
Cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	3.48 ± 0.58	4.20 ± 0.88	0.038 *
HDL-cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	1.38 ± 0.37	1.66 ± 0.40	0.114
LDL-cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	1.81 ± 0.64	2.22 ± 0.68	0.167
Triglyceridy (mmol.l <sup>-1</sup> )	0.65 ± 0.26	0.72 ± 0.26	0.527
<b>Volné mastné kyseliny (μg.ml<sup>-1</sup> plazmy)</b>			
LA (C18:2n6cc)	40.57 ± 14.29	16.76 ± 8.08	0.001 *
ALA (C18:3n3)	2.18 ± 1.14	0.98 ± 0.64	0.009 *
EDA (C20:2n6)	1.67 ± 0.13	1.52 ± 0.10	0.009 *
DGLA (C20:3n6)	1.39 ± 0.13	1.24 ± 0.17	0.038 *
Celkové FFA	172.63 ± 78.43	119.58 ± 53.59	0.089
SFA	40.62 ± 18.97	39.18 ± 15.60	0.852
MUFA	85.08 ± 45.70	58.85 ± 30.81	0.144
PUFA	46.94 ± 15.67	21.85 ± 9.03	0.001 *
<b>Metabolismus vitamínu B12</b>			
Transkobalamin (ng.l <sup>-1</sup> )	186.6 ± 39.5	342.6 ± 172.9	0.012 *
Folát (μg.l <sup>-1</sup> )	10.23 ± 5.28	5.79 ± 2.28	0.02 *
Homocystein (μmol.l <sup>-1</sup> )	19.8 ± 7.87	13.7 ± 5.35	0.135
<b>Kalcio-fosfátový metabolismus</b>			
Vápník (mmol.l <sup>-1</sup> )	2.30 ± 0.16	2.27 ± 0.10	0.706
Fosfát (mmol.l <sup>-1</sup> )	0.99 ± 0.23	0.94 ± 0.20	0.724
Parathormon (pmol.l <sup>-1</sup> )	5.96 ± 2.31	6.47 ± 2.09	0.687
<b>Metabolismus železa</b>			
Železo (μmol.l <sup>-1</sup> )	21.8 ± 3.97	19.4 ± 8.62	0.546
VkFe (μmol.l <sup>-1</sup> )	59.3 ± 5.43	60.3 ± 7.99	0.809
Transferin (g.l <sup>-1</sup> )	2.58 ± 0.46	2.53 ± 0.32	0.849

Ferritin ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	68.42 $\pm$ 41.59	53.7 $\pm$ 82.25	0.605
Hepcidin ( $\text{ng.ml}^{-1}$ )	104.4 $\pm$ 19.1	122.4 $\pm$ 9.5	0.014 *
Prohepcidin ( $\text{ng.ml}^{-1}$ )	495.7 $\pm$ 261.4	858.2 $\pm$ 689.6	0.121

Porovnání rozdílů průměrných hodnot  $\pm$  SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. \*  $p < 0.05$ , hranice statistické signifikance. FA, mastné kyseliny; LA, linolová FA; ALA, alfa-linolenová FA; EDA, eikosadienová FA; DGLA, dihomogama-linolenová FA; FFA, free fatty acids, volné mastné kyseliny; SFA, saturevané FA; PUFA, polynenasycené FA; MUFA, mononenasycené FA. V<sub>k</sub>Fe, vazebná kapacita pro železo.

#### 4.1.3. Parametry glukózové homeostázy

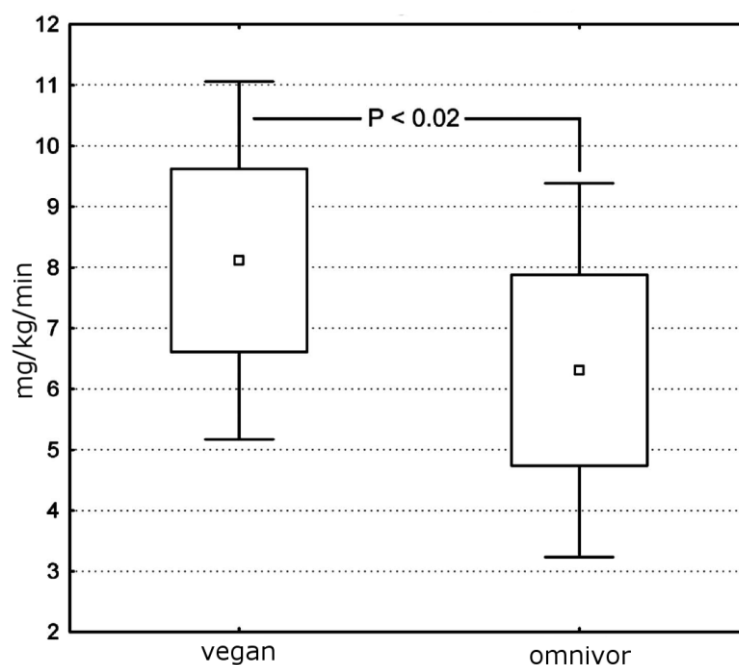
Výsledky parametrů glukózové homeostázy shrnuje tabulka 4. Vegani měli nižší lačné plazmatické glykemie a inzulinémie ( $p < 0.05$ ), glykovaný hemoglobin však nevykazoval mezi soubory rozdíl. Konsumpce glukózy během steady-state HEC je názorně zobrazena na obrázku 7. Vegani měli vyšší korigovanou M-hodnotu ( $p < 0.05$ ), signifikance je ještě výraznější, pokud je M-hodnota adjustovaná na celkové množství kosterního svalstva kalkulované pomocí obvodu paže, stehna a lýtka ( $p < 0.01$ ). V obou skupinách bylo dosaženo srovnatelných inzulinémií na vrcholu clampu a tyto byly postačující k supresi endogenní produkce inzulinu (data nezobrazena).

**Tabulka 4** Parametry glukózové homeostázy observačního souboru

	<b>Vegan (n=11) průměr ± SD</b>	<b>Omnivor (n=10) průměr ± SD</b>	<b>P-hodnota</b>
Lačná glykémie (mmol.l <sup>-1</sup> )	4.82 ± 0.65	5.46 ± 0.69	0.040 *
Lačná inzulínémie (mU.l <sup>-1</sup> )	2.39 ± 1.01	4.07 ± 2.29	0.039 *
HbA1c (%)	3.5 ± 0.31	3.45 ± 0.32	0.722
M-hodnota (mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	8.18 ± 1.62	6.36 ± 1.74	0.023 *
M-hodnota <sub>korigovaná</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	8.11 ± 1.51	6.31 ± 1.57	0.014 *
MSM (mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	3.51 ± 0.65	2.44 ± 0.90	0.006 *
Rovnovážné inzulínémie (mU.l <sup>-1</sup> )	31.98 ± 7.86	34.45 ± 8.46	0.497

Porovnání rozdílů průměrných hodnot ± SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. \* p<0.05, hranice statistické signifikance. Odsun glukózy je vyjádřen jako M-hodnota; MSM, M-hodnota adjustovaná na celkové množství svalové hmoty hodnocené bioimpedancí.

**Obrázek 7** Inzulínem stimulovaný odsun glukózy (M-hodnota, mg.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).



Porovnání rozdílů průměrných hodnot + SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. \* p<0.05, hranice statistické signifikance.

#### 4.1.4. Mitochondriální denzita a množství intramyocelulárních lipidů

Výsledky shrnuje tabulka 5. Ukazatele mitochondriální denzity ve svalu (aktivita CS a relativní množství mtDNA) nevykazovaly signifikantní rozdíl, i když je patrný trend k vyššímu množství mtDNA a nižšímu obsahu IMCL u veganů. Vegani měli nižší koncentrace penta-dekanové kyseliny (PDA,  $p < 0.01$ ) a dokosahexaenové kyseliny (DHA,  $p < 0.01$ ) ve svalu.

Tabulka 5 Mitochondriální denzita a intramyocelulární lipidy

	Vegan (n=11) průměr ± SD	Omnivor (n=10) průměr ± SD	P-hodnota
<b>Mitochondriální denzita</b>			
Aktivita CS ( $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )	18.43 ± 5.05	18.16 ± 5.41	0.906
mtDNA	1.36 ± 0.31	1.13 ± 0.36	0.135
<b>Svalové lipidy (mg FA.g svalu<sup>-1</sup>)</b>			
Celkové IMCL	19.33 ± 11.53	27.81 ± 22.46	0.283
SFA	5.27 ± 2.32	8.07 ± 6.03	0.169
MUFA	7.04 ± 6.30	12.80 ± 13.95	0.231
PUFA	7.02 ± 3.22	6.94 ± 2.60	0.952
PDA (C15:0)	0.01 ± 0.02	0.06 ± 0.05	0.009 *
DHA (C22:6n3)	0.09 ± 0.05	0.17 ± 0.05	0.003 *

Porovnání rozdílů průměrných hodnot ± SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. \*  $p < 0.05$ , hranice statistické signifikance. CS, citrát syntáza; mtDNA, relativní copy number mitochondriální DNA; IMCL, intramyocelulárně deponované lipidy; FA, mastné kyseliny; SFA, satureované FA; MUFA, mononenasyčené FA; PUFA, polynenasycené FA; PDA, pentadekanová FA; DHA, dokosahexaenová FA.

---

#### 4.1.5. Markery oxidativního stresu a endoteliální funkce

Tabulka 6 shrnuje nálezy ukazatelů oxidativního stresu a endoteliální funkce, včetně sonograficky stanovené tloušťky rozhraní intima-medie vnitřních karotid.

**Tabulka 6** Parametry endoteliální funkce a oxidativního stresu

	<b>Vegan (n=11)</b>	<b>Omnivor (n=10)</b>	<b>P-hodnota</b>
	průměr ± SD	průměr ± SD	
Malonyldialdehyd ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	4.97 ± 0.83	6.05 ± 0.95	0.012 *
oxLDL ( $\text{U.l}^{-1}$ )	26.46 ± 7.63	30.92 ± 9.09	0.236
oxLDL- $\beta_2$ GPI ( $\text{U.ml}^{-1}$ )	9.06 ± 5.88	12.85 ± 6.92	0.191
ICAM-1 ( $\text{ng.ml}^{-1}$ )	111.6 ± 20.1	122.58 ± 57.24	0.555
E-selectin ( $\text{ng.ml}^{-1}$ )	20.9 ± 13.3	19.97 ± 5.23	0.831
<b>Tloušťka rozhraní intima-media karotické tepny</b>			
IMT dx. (mm)	0.42 ± 0.07	0.46 ± 0.05	0.115
IMT sin. (mm)	0.40 ± 0.07	0.46 ± 0.05	0.041 *

Porovnání rozdílů průměrných hodnot ± SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. \*  $p < 0.05$ , hranice statistické signifikance. IMT, tloušťka rozhraní intima-media karotidy, intima media thickness.

#### 4.1.6. Hladiny a spektrum sérových aminokyselin

Tabulka 7 shrnuje hodnoty hladin sérových aminokyselin. V porovnání mezi soubory byly zachyceny pouze trendy ke statistické signifikanci mezi hladinami valinu ( $p=0,09$ ) a tryptofanu ( $p=0,07$ ).

**Tabulka 7** Hladiny sérových aminokyselin

	<b>Vegan (n=11)</b> průměr ± SD	<b>Omnivor (n=10)</b> průměr ± SD	<b>P-hodnota</b>
Leucin (μg.ml <sup>-1</sup> )	5.8 ± 1.5	5.8 ± 1.1	0.98
Izoleucin (μg.ml <sup>-1</sup> )	2.8 ± 1.2	3.3 ± 0.5	0.21
Valin (μg.ml <sup>-1</sup> )	8.9 ± 3.9	11.1 ± 1.4	0.09
Serin (μg.ml <sup>-1</sup> )	3.5 ± 0.8	3.6 ± 0.8	0.87
Lysin (μg.ml <sup>-1</sup> )	4.2 ± 1.1	4.7 ± 0.9	0.26
Arginin (μg.ml <sup>-1</sup> )	3.0 ± 0.8	3.3 ± 0.5	0.25
Histidin (μg.ml <sup>-1</sup> )	3.2 ± 0.5	3.4 ± 0.3	0.26
Glycin (μg.ml <sup>-1</sup> )	6.9 ± 1.8	7.0 ± 1.9	0.82
Alanin (μg.ml <sup>-1</sup> )	10.8 ± 0.5	11.7 ± 2.2	0.3
Threonin (μg.ml <sup>-1</sup> )	4.6 ± 1.3	4.8 ± 0.8	0.77
Metionin (μg.ml <sup>-1</sup> )	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.3	0.24
Glutamin (μg.ml <sup>-1</sup> )	23.3 ± 1.5	24.4 ± 5.4	0.6
Glutamát (μg.ml <sup>-1</sup> )	2.5 ± 1.0	2.4 ± 0.6	0.79
Fenylalanin (μg.ml <sup>-1</sup> )	2.7 ± 0.6	3.1 ± 0.5	0.12
Prolin (μg.ml <sup>-1</sup> )	5.5 ± 3.0	7.8 ± 2.3	0.06
Tryptofan (μg.ml <sup>-1</sup> )	18.9 ± 5.3	22.1 ± 2.5	0.07
Tyrosin (μg.ml <sup>-1</sup> )	6.1 ± 1.8	6.6 ± 1.4	0.46

Porovnání rozdílů průměrných hodnot ± SD u souboru 11 veganů a 10 omnivorních kontrol. Studentův t-test pro nezávislé výběry byl použit k posouzení signifikancí. \* p<0.05, hranice statistické signifikance.

#### 4.1.7. Korelace

Mnohočetné korelace souhrnných dat obou skupin ukázaly, že plazmatické hladiny inzulinu negativně korelují s množstvím mtDNA ve svalu (R=0.55, p<0.05). Byl patrný trend k signifikanci v negativní korelaci mezi glykemií a mtDNA (R=0.30, p=0.180), pozitivní korelaci M-hodnoty a mtDNA (R=0.30, p=0.191), pozitivní korelaci Baecke skóre a mtDNA (R=0.34, p=0.07) a pozitivní korelaci CS a mtDNA (R=0.33, p=0.15). V souboru veganů byla M-hodnota překvapivě pozitivně korelována s IMCL obsahem (R=0.85, p<0.001).



---

## 4.2. *Intervenční studie*

### 4.2.1. **Subjekty**

Osm veganů a osm omnivorů (5 mužů a 3 ženy v každé skupině) bylo zařazeno do studie intervenční. Charakteristiky souboru a jejich změny během intervence jsou shrnuty v tabulce 8. Omnivoři měli vyšší vstupní dietní příjem AA a BCAA (BCAA: vegan  $10.33 \pm 2.3$  vs. omnivor  $16.5 \pm 3.2$  g,  $p=0.03$ ). Vegani byli na výlučně veganské dietě  $7.7 \pm 3.8$  let. Compliance s intervencí byla 100% a nevyskytly se žádné nežádoucí efekty. Vegani se od omnivorních kontrol nelišili ve vstupních hodnotách příjmu proteinů/energie, míry fyzické aktivity (Beackeho skóre: vegan  $9.6 \pm 0.4$  vs. omnivor  $9.8 \pm 0.3$ ,  $p=0.8$ ) a v celotělové aerobní kapacitě ( $VO_2\max$  vegan  $40.6 \pm 2.2$  vs. omnivor  $37.8 \pm 2.8$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p=0.5$ ). Nebyly také zachyceny rozdíly ve vstupní hodnotě hladiny holotranskobalaminu: vegan  $38.7 \pm 23.0$  vs. omnivor  $49.8 \pm 19.3$  pmol.l<sup>-1</sup>,  $p=0.17$ .

**Tabulka 8** Charakteristiky intervenčního souboru a jejich vývoj během intervence

Parametr	Rozdíly mezi skupinami s 95% CI				Změny v rámci skupiny s 95% CI		
	Vizita	Vegan	Omnivor	Rozdíl [95% CI]	Vizita	Vegan	Omnivor
Váha (kg)	0 m	72.3 ± 13.2	75.3 ± 16.4	-3.0 [-16.2;10.3]			
	3 m	71.9 ± 12.8	74.9 ± 16.0	-3.0 [-16.3;10.3]	3-0 m	-0.48 [-2.0;1.1]	-0.45 [-2.0;1.2]
	9 m	71.7 ± 12.7	75.7 ± 15.3	-4.0 [17.2;10.3]	9-3 m	-0.1 [-1.6;1.4]	0.8 [-0.7;2.3]
WHR	0 m	0.9 ± 0.09	0.87 ± 0.05	0.03 [-0.04;1.0]			
	3 m	0.89 ± 0.08	0.92 ± 0.08	0.03 [-0.1;0.04]	3-0 m	0.0 [-0.06;0.05]	0.06 [-0.01;0.1]
	9 m	0.87 ± 0.1	0.9 ± 0.05	0.02 [-0.1;0.05]	9-3 m	0.02 [-0.07;0.03]	0.03 [-0.08;0.03]
BMI (kg.m <sup>-2</sup> )	0 m	23.5 ± 2.2	24.5 ± 4.9	-1.0 [-4.4;2.3]			
	3 m	23.5 ± 2.0	24.4 ± 4.8	-1.0 [-4.3;2.4]	3-0 m	0.03 [-0.6;0.6]	-0.1 [-0.7;0.5]
	9 m	23.4 ± 2.0	24.8 ± 4.6	-1.4 [-4.8;2.0]	9-3 m	0.04 [-0.6;0.6]	0.4 [-0.2;1.0]
Tuková hmota (%)	0 m	17.3 ± 7.8	16.6 ± 12.2	-1.7 [-11.3;8.0]			
	3 m	16.7 ± 7.5	17.0 ± 12.3	-2.6 [-12.1;6.9]	3-0 m	-0.7 [-2.2;0.8]	0.2 [-1.2;1.6]
	9 m	15.1 ± 6.9	17.2 ± 12.0	-3.7 [-12.9;5.5]	9-3 m	0.9 [-2.5;0.6]	0.2 [-1.2;1.6]
Celkový příjem kalorií (kcal.den <sup>-1</sup> )	0 m	1 715 ± 162	1 882 ± 682	-167 [-568;234]			
	3 m	1 721 ± 177	1 881 ± 507	-160 [-561;241]	3-0 m	6 [-94;106]	-1 [-101;99]
	9 m	1 769 ± 136	1 910 ± 593	-141 [-542;260]	9-3 m	48 [-52;148]	29 [-70;129]
Příjem proteinů (g.den <sup>-1</sup> )	0 m	62 ± 6	74 ± 14	-13[-30;5]			
	3 m	64 ± 13	78 ± 19	-14 [-31;4]	3-0 m	2 [-2;6]	3 [-1;7]
	9 m	65 ± 18	79 ± 21	-14[-31;4]	9-3 m	1.5 [-2;5]	1.0 [-3;5]

Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. Signifikance rozdílů jsou vyjádřeny jako 95% konfidenční interval (CI). BMI, body mass index; WHR, poměr obvodu pasu a boků.

#### 4.2.2. Sérové hladiny BCAA

Skupiny se nelišily ve vstupních hladinách celkových sérových BCAA (vegan  $343.1 \pm 28$  vs. omnivor  $397.3 \pm 16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 95% CI [-122;13.8]). Intervence BCAA vedla k mírnému vzestupu hladin leucinu, statisticky signifikantně pouze u veganů a k signifikantnímu poklesu v hladinách valinu u omnivorů. Hladiny izoleucinu byly během intervence beze změny v obou skupinách (Tabulka 9).

**Tabulka 9** Hladiny větvených aminokyselin v séru a jejich vývoj během intervence

Parametr	Rozdíly mezi skupinami s 95% CI				Změny v rámci skupiny s 95% CI		
	Vizita	Vegan	Omnivor	Rozdíl [95% CI]	Vizita	Vegan	Omnivor
Leucin ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	0 m	$108.1 \pm 25.6$	$122.9 \pm 13.8$	-14.8 [-35.2;5.7]			
	3 m	$125.5 \pm 28.8$	$129.4 \pm 31.3$	-3.9 [-24.4;16.6]	3-0 m	<b>17.4 [4.6;30.1] *</b>	6.5 [-6.2;19.2]
	9 m	$104.4 \pm 16.0$	$113.0 \pm 9.4$	-8.6 [-29.1;11.9]	9-3 m	<b>-21.1 [-33.9;-8.4] *</b>	<b>-16.4 [-29.1;-3.6] *</b>
Izoleucin ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	0 m	$53.5 \pm 14.7$	$57.6 \pm 7.7$	-4.1 [-14.7;6.4]			
	3 m	$50.1 \pm 14.2$	$52.3 \pm 14.4$	-2.1 [-12.7;8.4]	3-0 m	-3.4 [-9.4;2.7]	-5.4 [-11.4;0.7]
	9 m	$52.1 \pm 8.1$	$55.0 \pm 6.91$	-2.9 [-13.4;7.7]	9-3 m	2.0 [-4.0;8.0]	2.8 [-3.3;8.8]
Valin ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	0 m	$181.5 \pm 39.3$	$216.8 \pm 26.2$	-35.3 [-65.0;5.5]			
	3 m	$180.8 \pm 26.9$	$197.3 \pm 46$	-16.5 [-46.2;13.2]	3-0 m	-0.8 [-18.1;16.6]	<b>-19.5 [-36.9;-2.1] *</b>
	9 m	$179.9 \pm 28.9$	$194.8 \pm 20.3$	-14.9 [-44.6;14.9]	9-3 m	-0.9 [-19.9;14.9]	-2.5 [-19.9;14.9]

Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. Signifikance rozdílů jsou vyjádřeny jako 95% konfidenční interval (CI).

#### 4.2.3. Glukózová homeostáza

Výsledky jsou přehledně zobrazeny v tabulce 10. Intervence BCAA vedla u veganů k významnému poklesu odsunu glukózy (M-hodnota). M-hodnota se po wash-out periodě navrátila zpět ke vstupním hodnotám. Žádnou takovou změnu jsme nezaznamenali u omnivorních kontrol ( $p < 0.001$  pro signifikanci interakce čas vs. skupina M-hodnoty). M-hodnota v celém vzorku nekorelovala s hladinami rovnovážných inzulinémií ( $R=0.05$ ,  $p=0.73$ ). Akutní odpověď inzulinu (AIR) byla po intervenci zvýšena, signifikantně pouze u omnivorů.

Tabulka 10 Parametry glukózové homeostázy a jejich vývoj během intervence

Parametr	Rozdíly mezi skupinami s 95% CI				Změny v rámci skupiny s 95% CI		
	Vizita	Vegan	Omnivor	Rozdíl [95% CI]	Vizita	Vegan	Omnivor
Glykémie (mmol.l <sup>-1</sup> )	0 m	4.29 ± 0.2	4.31 ± 0.3	-0.03 [-0.31;0.26]			
	3 m	4.48 ± 0.4	4.65 ± 0.3	-0.2 [-0.48;0.14]	3-0 m	<b>0.19 [0.0;0.38] *</b>	<b>0.33 [0.15;0.52] *</b>
	9 m	4.79 ± 0.3	4.62 ± 0.4	0.2[-0.18;0.51]	9-3 m	<b>0.31 [0.12;0.5] *</b>	-0.03 [-0.21;0.16]
Inzulinémie (mU.l <sup>-1</sup> )	0 m	5.05 ± 2.53	4.36 ± 1.01	0.15 [-0.35;0.64] †			
	3 m	4.24 ± 1.49	5.69 ± 4.01	-0.18 [-0.67;0.31] †	3-0 m	-0.14 [-0.48;0.2]†	0.19 [-0.15;0.53] †
	9 m	4.58 ± 2.79	6.16 ± 3.94	-0.25 [-0.74;0.24] †	9-3 m	0.01 [-0.33;0.36] †	0.09 [-0.26;0.43] †
C-peptid (pmol.l <sup>-1</sup> )	0 m	316.6 ± 67.6	289.1 ± 76.5	27.5[-71.4;126.4]			
	3 m	285.8 ± 70.3	337.8 ± 139.9	-52.0 [-150.9;46.9]	3-0 m	-30.9 [-99.0;37.2]	48.6 [-19.6;116.7]
	9 m	307.6 ± 99.4	348.4 ± 158	-40.8 [-139.6;58.1]	9-3 m	21.9 [-46.2;90.0]	10.6 [-57.5;78.7]
HbA1c (mmol.mol <sup>-1</sup> )	0 m	32.75 ± 2.49	32.37 ± 4.75	0.38 [-2.97;3.72]			
	3 m	34.0 ± 1.93	32.13 ± 4.39	1.88 [-1.47;5.2]	3-0 m	1.25 [-0.07;2.57]	-0.25 [-1.57;1.07]
	9 m	33.25 ± 1.83	32.13 ± 5.0	1.13 [-2.22;4.47]	9-3 m	-0.75 [-2.07;0.57]	0 [-2.07;0.57]
M-hodnota (mg.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	0 m	9.6 ± 2.4	7.1 ± 2.4	<b>2.5 [0.25; 5.0] *</b>			
	3 m	8.0 ± 3.1	7.9 ± 2.6	0.1 [-2.4; 2.6]	3-0 m	<b>-1.64 [-2.5; -0.75] *</b>	0.77 [-0.12;1.66]
	9 m	9.6 ± 2.5	8.1 ± 3.1	1.5 [-0.9; 4.0]	9-3 m	<b>1.65 [0.75; 2.54] *</b>	0.2 [-0.68;1.1]
MCR (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	0 m	11.22 ± 3.07	8.04 ± 2.7	<b>3.19 [0.55;5.82] *</b>			
	3 m	8.04 ± 3.30	9.23 ± 2.63	-1.19 [-3.98;1.6]	3-0 m	<b>-3.18 [-4.27;-2.1]*</b>	<b>1.19 [0.1;2.28] *</b>
	9 m	10.62 ± 3.29	8.69 ± 4.00	1.95 [-1.38;5.28]	9-3 m	<b>2.58 [1.32;3.85] *</b>	-0.56 [-1.82;0.71]
MCR/I (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> /mU.l <sup>-1</sup> )	0 m	0.151 ± 0.06	0.138 ± 0.06	0.13 [-0.06; 0.08]			
	3 m	0.117 ± 0.03	0.127 ± 0.05	0.01 [-0.08; 0.06]	3-0 m	-0.03 [-0.08;0.1]	0.01 [-0.06;0.03]
	9 m	0.218 ± 0.11	0.190 ± 0.11	0.03 [-0.04; 0.1]	9-3 m	<b>0.1 [0.04;0.16] *</b>	<b>0.06 [0.01;0.12] *</b>
Rovnovážné inzulinémie (mU l <sup>-1</sup> )	0 m	78.1 ± 19.6	64.5 ± 20.8	13.6 [-3.55;30.7]			
	3 m	68.4 ± 16.1	77.6 ± 19.1	-9.24 [-26.4;7.9]	3-0 m	-9.7 [-26.9;7.43]	13.1 [-4.0;30.3]
	9 m	54.4 ± 16.8	53.3 ± 19.4	1.14 [-16.0;18.3]	9-3 m	-14.0 [-31.1;3.2]	<b>-24.3 [-41.5;-7.2] *</b>
AIR (mIU.l <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	0 m	214.9 ± 73.6	171.0 ± 81.0	43.0 [-56.4;144.3]			
	3 m	240.9 ± 89.3	281.3 ± 201.9	-40.5 [-140.8;59.9]	3-0 m	25.9[-55.7;107.6]	<b>110.3 [28.7;192.0]*</b>
	9 m	236.5 ± 34.4	251.9 ± 99.8	-15.4 [-115.7;84.9]	9-3 m	-4.4 [-86.0;77.3]	-29.4 [-111.1;52.2]

---

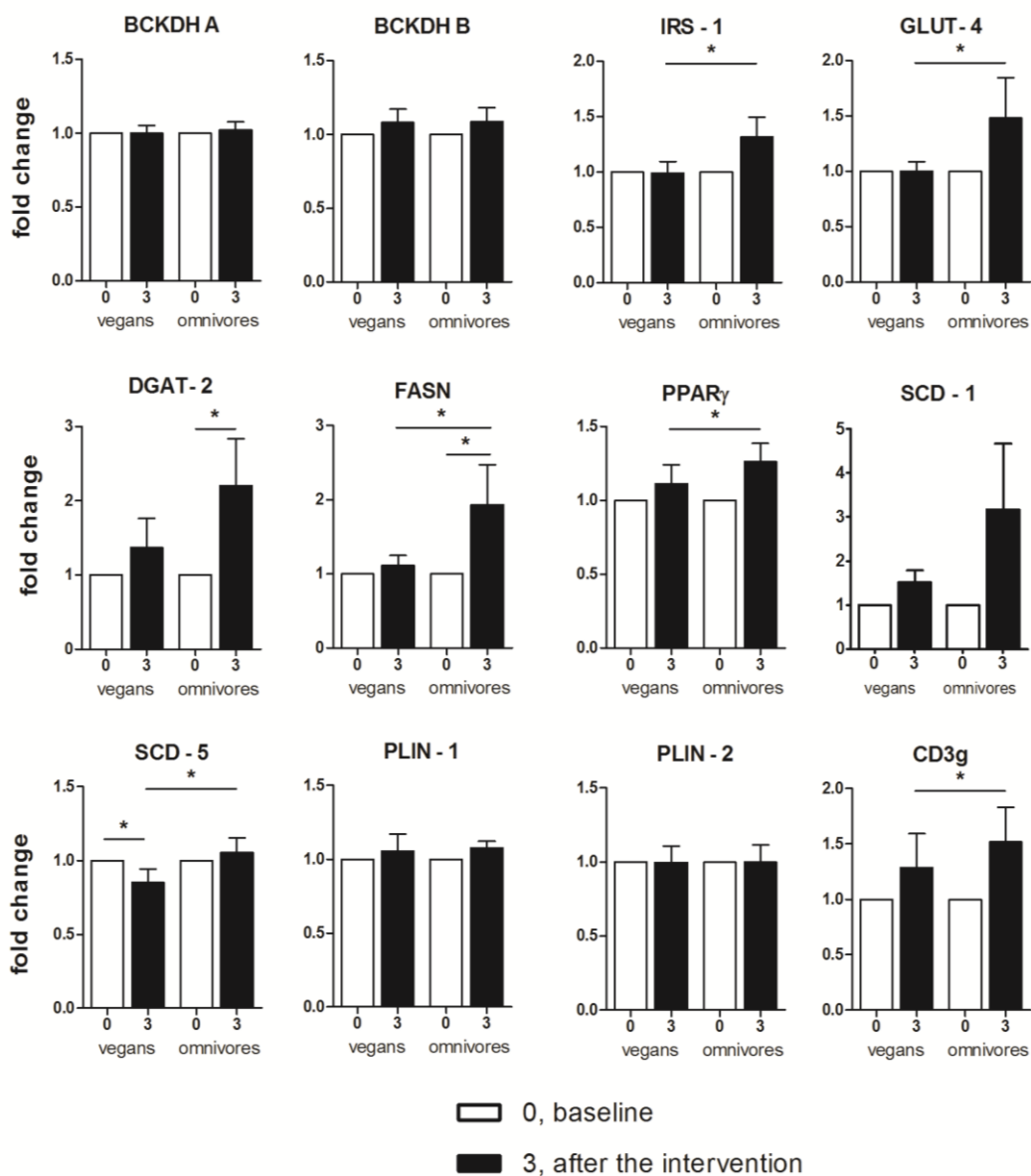
Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. Signifikance rozdílů jsou vyjádřeny jako 95% konfidenční interval (CI). Odsun glukózy je vyjádřen jako M-hodnota; MCR, metabolic clearance rate, M-hodnota adjustovaná na rovnovážné glykemie; MCR/I, MCR adjustovaná na rovnovážné inzulinémie; AIR, acute insulin response, AUC pro 30-min inzulinémie během argininového testu. † Log-normálně rozložená data, k analýzám byl použit geometrický průměr.

#### **4.2.4. Charakteristika podkožní tukové tkáně**

Pro srovnání metabolických charakteristik SAAT byla měřena mRNA exprese řady genů specifických metabolických drah: odsun glukózy (insulin receptor substrate: IRS-1, glucose transporter 4: GLUT-4), BCAA metabolismus (branched chain keto acid dehydrogenáza A a B: BCKDH A, BCKDH B) a lipogeneze (peroxisom proliferator activated receptor gamma: PPAR- $\gamma$ , fatty acid syntáza: FASN, stearoyl CoA desaturázy: SCD-1, SCD-5, diglycerol acyl transferáza: DGAT-2, perilipiny: PLIN-1, PLIN-2) a CD3g.

Efekty intervence na mRNA expresi jednotlivých genů v SAAT jsou shrnuty na obrázku 8. Signifikantní změny v expresi bylo dosaženo pouze u DGAT-2 a FASN genu, který byl po intervenci zvýšeně exprimován u omnivorů. Změna v expresi DGAT-2 genu pozitivně korelovala se změnami ve FASN ( $R=0.91$ ,  $p=0.002$ ), SCD-1 ( $R=0.85$ ,  $p=0.008$ ) a PPAR- $\gamma$  ( $R=0.76$ ,  $p=0.03$ ). Žádné obdobné změny u veganů nebyly pozorovány, naopak došlo k patrnému signifikantnímu poklesu v expresi SCD-5 po intervenci.

Obrázek 8 mRNA exprese v podkožní tukové tkáni v reakci na intervenci.



Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. \*  $p < 0.05$ .

Ve spektru plazmatických lipidů a celkových FFA nebyly mezi soubory zachyceny žádné rozdíly, ani intervence nevedla k signifikantním změnám: celkové FFA, vegan vstupní  $162.6 \pm 54$  vs. intervence  $170.5 \pm 41.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $p=0.7$ ; omnivor vstupní  $210 \pm 62.4$  vs. intervence  $173.3 \pm 54.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $p=0.2$ . Žádných signifikancí nebylo také dosaženo v hladinách triglyceridů a celkového cholesterolu ani vstupně, ani během intervence (data nezobrazena).

#### 4.2.5. Charakteristiky kosterního svalu, genová exprese, aktivita komplexů respiračního řetězce

*Mitochondriální funkce.* V analýze efektu intervence na mitochondriální funkce byl zaznamenán signifikantní vzestup komplexu II dýchacího řetězce v obou skupinách, u omnivorů byl vzestup vyjádřenější (Tabulka 11). Zvýšení aktivity komplexu II korelovalo v celém souboru se změnami v komplexu III ( $R=0.75$ ,  $p=0.0008$ ) a CS ( $R=0.55$ ,  $p=0.03$ ).

**Tabulka 11** Parametry mitochondriální funkce kosterního svalu

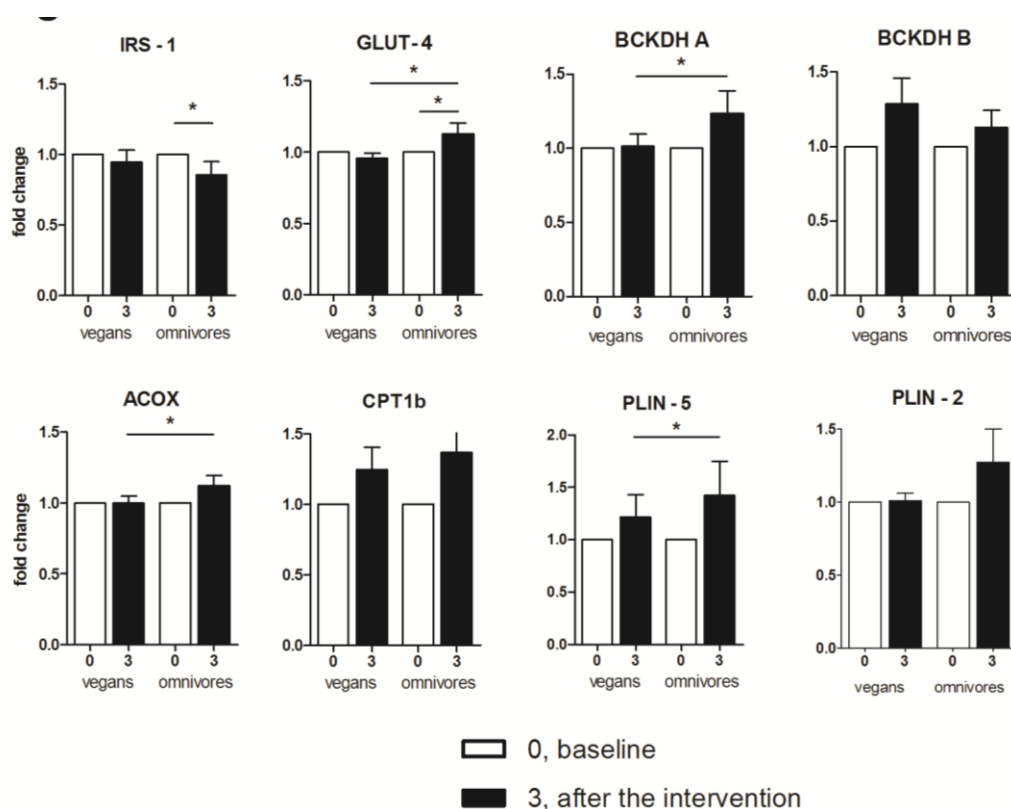
Parametr	Rozdíly mezi skupinami s 95% CI				Změny v rámci skupiny s 95% CI	
	Vizita	Vegan		Vizita	Vegan	Vizita
CS ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	0 m	210.3 ± 68.8	204.7 ± 49.3	5.6 [-44.9;56.1]	-	-
	3 m	207.8 ± 43.7	215.4 ± 54.4	-7.6 [-58.2;42.9]	3-0 m -2.5 [-41.3;36.2]	10.7 [-28.1;49.5]
Komplex I (nmol.min <sup>-1</sup> .mg protein <sup>-1</sup> )	0 m	29.6 ± 18.9	37.6 ± 7.4	-8.0 [-21.1;5.0]	-	-
	3 m	41.7 ± 14.3	41.2 ± 13.7	0.5 [-12.5;13.6]	3-0 m 12.2 [-0.8;25.2]	3.6 [-9.4;16.6]
Komplex II (nmol.min <sup>-1</sup> .mg protein <sup>-1</sup> )	0 m	6.9 ± 1.4	7.1 ± 0.7	-0.2 [-1.4;1.0]	-	-
	3 m	8.1 ± 1.4	9.2 ± 1.6	-1.1 [-2.3;0.1]	3-0 m <b>1.2 [0.3;2.4]*</b>	<b>2.1 [0.9;3.3] *</b>
Komplex III (nmol.min <sup>-1</sup> .mg protein <sup>-1</sup> )	0 m	109.6 ± 20.5	120.3 ± 25.8	-10.1 [-36.7;15.1]	-	-
	3 m	113.7 ± 20.6	130.7 ± 41.1	-17.0 [-43.0;8.9]	3-0 m 4.1 [-21.8;30.0]	10.4 [-15.5;36.3]
Komplex IV ( $\Delta\log$ (A550).min <sup>-1</sup> .mg protein <sup>-1</sup> )	0 m	5.2 ± 2.1	4.7 ± 1.3	0.4 [-1.1;2.0]	-	-
	3 m	4.8 ± 1.2	4.6 ± 1.8	0.15 [-1.4;1.7]	3-0 m -0.4 [-1.9;1.2]	-0.1 [-1.6;1.4]

Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. Signifikance rozdílů jsou vyjádřeny jako 95% konfidenční interval (CI). CS, aktivita citrát syntázy.

*Genová exprese.* Pro srovnání metabolických vlastností kosterního svalu byla stanovena exprese mRNA klíčových genů pro odsun glukózy (IRS-1, GLUT-4), BCAA metabolismus (BCKDHA, BCKDHB) a metabolismus mastných kyselin (acyl CoA oxidáza: ACOX, creatin-

palmitoyl transferáza: CPT1b, PLIN-1, PLIN-2). Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 9. Statisticky významných změn po intervenci bylo dosaženo pouze ve skupině omnivorů, kde došlo k poklesu IRS-1 a naopak vzestupu GLUT-4 mRNA exprese (mezi parametry nebyla žádná korelace,  $R=0.08$ ,  $p=0.84$ ).

**Obrázek 9** mRNA exprese v kosterním svalu v reakci na intervenci.



Osm veganů a osm omnivorních kontrol podstoupilo 3-měsíční intervenci per os BCAA suplementy. K posouzení signifikancí rozdílů mezi návštěvami a mezi skupinami byla použita multilevel regresní analýza. \*  $p < 0.05$ .



---

## 5. Diskuze

Předmětem dizertační práce byl vliv vybraných nutričních faktorů na rozvoj inzulínové rezistence (IR). Syndrom IR je řazen mezi nejvýznamnější rizikové faktory rozvoje kardiovaskulárních chorob a přispívá značnou měrou k morbiditě a mortalitě v celosvětovém měřítku. Skladba stravy se přitom řadí mezi významné environmentální faktory rozvoje metabolických chorob, diabetes nevyjímaje. Proto také nutriční intervence patří do portfolia tvůrců léčebně-preventivních opatření pro obecnou populaci. Lze předpokládat, že vhodně zvoleným dietním přístupem, spolu s dalšími životosprávnými intervencemi, bychom byli schopni bránit rozvoji diabetu, mírnit rychlost progresu diabetických komplikací či eventuálně v časných stádiích diabetes i revertovat.

Dizertace se věnuje specifické populaci veganů, tedy lidí, kteří se stravují dlouhodobě čistě rostlinnou stravou. Opakovaně bylo prokázáno, že tato skupina lidí má významně nižší prevalenci obezity a diabetu. Naším cílem bylo tuto populaci přesněji fenotypizovat s ohledem na funkci inzulínu na celotělové úrovni a na úrovni hlavních glukoregulačních tkání. Toto bylo předmětem řešení observační studie.

Existuje řada definovaných rizikových složek stravy, které mohou spoluzodpovídat za rozdílné metabolické charakteristiky veganů a omnivorů. S ohledem na recentní vědecký zájem a výsledky předešlých studií jsme naši pozornost zaměřili na aminokyseliny s větveným řetězcem (BCAA). V intervenční studii jsme suplementovali srovnatelnou skupinu veganů a omnivorů orálními BCAA po dobu tří měsíců a opět sledovali změny ve funkci inzulínu na úrovni celotělové a na úrovni jednotlivých tkání.

V následujících kapitolách diskutujeme výsledky observační a intervenční studie.

### 5.1. Observační studie

Populace lidí stravujících se čistě rostlinnou stravou má nižší incidenci onemocnění asociovaných s inzulínovou rezistencí (IR). Podkladem tohoto je jejich větší citlivost na inzulín, nižší bazální inzulinémie a vyšší inzulínem stimulovaný odsun glukózy. Tato unikátní populace by tedy mohla posloužit jako vhodný model ke studiu iničiálních stádií zhoršování

---

IS. Pokud by se podařilo popsat funkční rozdíly, které jsou asociovány s touto extrémní životosprávou, mohli bychom se přiblížit poznání mechanismů rozvoje IR a posloupnosti jednotlivých patofyziologických změn na úrovni tkání. Dále by tato populace mohla představovat vhodný model pro další nutriční intervence.

Kosterní sval je orgánem s největším podílem na celotělovém, inzulínem stimulovaném odsunu glukózy, a proto je jeho metabolická homeostáza klíčová v udržení IS. O jeho funkci u veganů však není doposud mnoho známo. Citlivost k inzulínu na úrovni kosterního svalu je dána zejména jeho kapacitou oxidativního a neoxidativního odsunu a metabolismu glukózy. Je známo, že u IR koreluje pozitivně s ektopickou depozicí IMCL ve svaly.

Doposud však nebyla prokázána žádná kauzalita mezi jevy IR na celotělové úrovni, poruchou mitochondriální biogeneze a depozicí IMCL v kosterním svaly. Biologicky plausibilní hypotéza je, že chronicky nadměrný přívod energetických substrátů do buňky a nízká fyzická aktivita představují prooxidační stav s tvorbou reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS), který dosahuje limitů intracelulárních anti-oxidačních systémů. Myocyt ve snaze redukovat produkci dalších ROS snižuje oxidativní metabolismus. Toto vede k neúplné degradaci lipidů, které jsou za normálních okolností energetickým substrátem pro sval, a vznikají intermediární produkty (ceramidy a diacylglyceroly), které interferují s inzulínovou signalizací a snižují účinek inzulínu na kosterní sval. Pokud v progresi IR jsou výše popsané jevy konsektivní a přicházejí v průběhu rozvoje patologického stavu v definované posloupnosti, bylo by tuto posloupnost možné popsat právě za použití modelové populace veganů.

V observační studii jsme zkoumali vliv veganské diety na IS a fenomény asociované s IS v kosterním svaly, zejména vliv na mitochondriální funkce s cílem validovat model „vegan vs. omnivor“ pro intervenční studii. Prokázali jsme, že vegani mají vyšší inzulínem stimulovaný odsun glukózy v clampovém vyšetření a srovnatelný obsah IMCL a mitochondriální denzitu v kosterním svaly.

### 5.1.1. Glukózová homeostáza

Ukázali jsme, že vegani mají nižší lačné glykemie a inzulinémie, a že mají vyšší inzulínem stimulovaný odsun glukózy v clampovém vyšetření. Toto je pravděpodobně podkladem nižší incidence IR-asociovaných onemocnění v této populaci. Obdobná data již byla

---

publikována (Hua et al. 2001; Goff et al. 2005). Byli jsme však první, kdo použil k posouzení inzulínové senzitivity metodu HEC, která je zlatým standardem pro posouzení periferní IR.

### 5.1.2. Profil cirkulujících lipidů a FFA

V minulosti již bylo popsáno, že vegani mají příznivější lipidový profil, nižší koncentrace celkového a LDL cholesterolu a triglyceridů (Yang et al. 2012; Kim et al. 2012). Naše nálezy jsou podobné, vegani měli signifikantně nižší hladinu celkového cholesterolu. V profilu FFA jsme ukázali, že vegani mají vyšší hladiny PUFA a vyšší množství omega 6 mastných kyselin LA, EDA a DGLA. Zachytili jsme také vyšší hladiny omega 3 mastných kyselin u veganů, což nebylo doposud popsáno. Naopak podle literatury by měli vegani mít nižší hladiny EPA a DHA (Rosell et al. 2005). Dietní příjem EPA a DHA je u veganů velmi nízký, protože prakticky všechny potravní zdroje těchto FA, mají původ v rybím oleji. Vegani jsou tedy závislí na jejich endogenní syntéze z ALA. Bohužel nejsme schopni na základě vlastních dat komentovat hladiny cirkulujících EPA a DHA, protože jejich koncentrace byly v obou souborech pod detekčním limitem použité metody (EPA=1 µg/ml a DHA=2,2 µg/ml). Na druhou stranu jsme našli nižší obsah DHA v kosterním svalu veganů (viz níže).

### 5.1.3. Obsah intramyocelulárních lipidů

Předchozí studie prokázaly, že obsah IMCL koreluje pozitivně s IR u zdravých ne-diabetických subjektů (Roden et al. 1996), a že vegani mají nižší obsah IMCL v porovnání s omnivory (Goff et al. 2005). Nižší obsah IMCL byl nicméně zachycen pouze ve svalu s převahou oxidativních vláken (m. soleus) a nikoli ve svalu s vlákny převážně glykolytickými (m. tibialis anterior). V naší studii jsme zkoumání podrobili m. vastus lateralis, tedy sval převážně glykolytický a v souladu s předchozí prací jsme nenalezli mezi skupinami statisticky signifikantní rozdíl, ač je patrný trend k nižšímu IMCL obsahu u veganů a trend k pozitivní korelaci mezi IMCL a M-hodnotou. Biochemické metody stanovující IMCL jsou zatíženy potenciální kontaminací podkožní a extramyocelulární tukovou tkání. Proto byly vzorky před analýzami podrobeny mikrodisekci, abychom toto riziko minimalizovali. Naopak výhodou biochemických metod je možnost stanovení zastoupení jednotlivých FA v extraktu intramyocelulárních lipidů. Nalezli jsme, že vegani mají nižší množství DHA a srovnatelné

---

množství ALA a EPA. Toto je podle našich znalostí první potvrzení nižšího tkáňového obsahu DHA u veganů. Potenciální klinické dopady tohoto nálezu zasluhují jistě další pozornost.

#### 5.1.4. Mitochondriální denzita

Mitochondriální aerobní kapacita kosterního svalu je hlavním kontributorem celotělové IS, kosterní sval je zodpovědný za prakticky 85 % inzulinem zprostředkovaného odsunu glukózy (Brehm & Roden, 2007). Je známo, že IR subjekty mají nižší mitochondriální oxidativní kapacitu (Ritov et al. 2010; He et al. 2001) a nižší mitochondriální obsah (Ritov et al. 2010; Boushel et al. 2007). Doposud však u veganů nebyla žádná data o mitochondriální funkci publikována. V předkládané práci jsme hodnotili mitochondriální denzitu pomocí měření aktivity CS (mitochondriální enzym kódovaný v jádru buňky) a relativní množství mitochondriální DNA v kosterním svalu. V našem souboru jsme však nezachytili žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami. Nicméně byl patrný trend k vyššímu množství mtDNA u veganů a korelaci mezi mtDNA a CS. V celém souboru byl dále zachycen trend k pozitivní korelaci mezi mtDNA a M-hodnotou. To by mohlo naznačovat, že pokles IS a s ním asociovaná vyšší hladina inzulinu koreluje s poklesem mtDNA a ztrátou mitochondriální oxidativní kapacity.

#### 5.1.5. Limitace studie

Hlavním omezením observační studie je relativně malý vzorek. S ohledem na přísná inkluzní kritéria jsme nebyli schopni do studie zařadit více subjektů. Záměrem bylo postavit skupiny tak, aby si odpovídali v hlavních parametrech asociovaných s IR. I přes tento záměr jsou v charakteristikách souborů patrné trendy k rozdílům zejména v podkožním/viscerálním tuku a věku. Nemůžeme vyloučit, že tyto rozdíly ovlivnily naše výsledky. Vegani byly v našem vzorku asi o tři roky starší než omnivoři, avšak zde se nedomníváme, vzhledem k nízkému věku celého souboru, že by tento rozdíl výsledky ovlivnil. Fyzická aktivita a VO<sub>2</sub>max hrají významnou roli v udržení IS organismu, stejně jako v akumulaci IMCL a mitochondriální biogenezi. Co se týče účinků nutričních faktorů na rozvoj IR, fyzická aktivita představuje potenciálně významný confounder. Proto jsme skupiny veganů a omnivorů srovnali podle míry fyzické aktivity. Nestanovovali jsme však VO<sub>2</sub>max, ale Baeckeho dotazník

---

habituální fyzické aktivity. Ač je  $VO_2\text{max}$  přesnějším parametrem k popsání fyziologických změn indukovaných fyzickou aktivitou, v minulosti bylo prokázáno, že koreluje dobře právě se skóre Baeckeho dotazníku (Florindo et al. 2006).

#### 5.1.6. Shrnutí observační studie

Prokázali jsme, že vegani mají vyšší inzulinem stimulovaný odsun glukózy do svalu a srovnatelné množství IMCL, množství mitochondriální DNA a aktivitu CS ve porovnání s jejich omnivorními kontrolami. Tyto nálezy poukazují na to, že pokles IS na celotělové úrovni předchází akumulaci lipidů v kosterním svalstvu a bioenergetické selhání mitochondrií v průběhu rozvoje syndromu IR. Akumulace IMCL a mitochondriální dysfunkce jsou, na základě našich dat, tedy spíše konsekvencí či epifenomenem asociovaným s IR a mohou hrát roli v její perpetuaci či progresi. Mimo to jsme prokázali, že vegani mají příznivější parametry glukózové homeostázy a lipidového profilu, což je v souladu s předchozí literaturou. Dále vegani mají vyšší hladiny PUFA, přesně LA, ALA, EDA, DGLA a nižší obsah DHA ve svalu.

Rozdílná metabolická kondice mezi skupinami, zejména rozdílná citlivost na inzulin, umožňuje použití modelu „vegan vs. omnivor“ pro navazující dietní intervence.

## 5.2. Intervenční studie

V minulosti již bylo prokázáno, že cirkulující hladiny BCAA korelují s IR a rizikem rozvoje T2DM (Wang et al. 2011). Avšak kauzalita mezi těmito jevy je stále předmětem debat. Cílem intervenční studie bylo na modelu „vegan vs. omnivor“ prokázat možnou kauzální souvislost mezi dietním přívodem BCAA a deteriorací IS. Prokázali jsme, že suplementace BCAA vedla k poklesu odsunu glukózy u veganů, nikoli však u omnivorů. U omnivorů jsme prokázali změny naznačující zvýšenou lipogenezi v AT a zvýšenou aktivitu enzymů dýchacího řetězce mitochondrií v SM.

---

### 5.2.1. Hladiny BCAA, IR a sekrece inzulínu

BCAA patří mezi AA, které nejsou primárně metabolizovány v játrech, a proto postprandiálně jejich periferní hladiny odrážejí jejich podanou a vstřebanou dávku (van Loon et al. 2000). Naše hypotéza tedy byla, že dojde v průběhu intervence ke zvýšení hladin BCAA, a že tato změna bude korelovat s poklesem IS a se zvýšením sekrece inzulínu. I přes významné navýšení (více než dvojnásobek bazálního dietního příjmu BCAA) podílu BCAA v dietě jsme prokázali pouze mírný, leč statisticky signifikantní vzestup v hladině leucinu. Naše pozorování je v rozporu se staršími daty (van Loon et al. 2000; Wahren et al. 1976), která však byla získána během akutních intervencí. Data z dlouhodobých intervencí jsou nemnohá. Jedna skupina dosáhla po dvanáctiměsíční intervenci BCAA u pacientů s hepatitidou obdobných výsledků jako my, tedy zvýšení sérového leucinu bez korespondujícího vzestupu valinu a izoleucinu (Takeshita et al. 2012). Naše data tedy neimplikují, že by dlouhodobý dietní přívod BCAA byl zodpovědný za jejich vyšší cirkulující hladiny, které byly u pacientů s T2DM popsány. Zdá se tedy, že cirkulující BCAA jsou odrazem selhání inzulínem zprostředkované suprese proteolýzy či poruchy oxidace BCAA, jak již bylo navrženo (Lynch a Adams 2014). Recentně se objevila ještě jedna lákavá hypotéza. Bylo popsáno, že cirkulující hladiny řady metabolitů, včetně BCAA, moduluje střevní mikrobiota. Byly identifikovány bakteriální kmeny, které interferují s transportem BCAA a mají vyšší kapacitu pro syntézu BCAA z jiných prekurzorů (Pedersen et al. 2016).

I přes relativně malý vliv suplementace na cirkulující BCAA, intervence vedla k významnému poklesu inzulínové citlivosti u veganů. Zajímavé je, že pokles odsunu glukózy u veganů dosáhl vstupních hodnot omnivorní kontrolní skupiny, a že po wash-out periodě došlo ve skupině k návratu zpět na vstupní hodnoty. Toto pozorování podporuje hypotézu, že BCAA mohou mít přímý negativní dopad na IS u zdravých lidí. Obdobě byl pokles IS pozorován v již publikovaných výsledcích intervenčních studií, kdy bylo použito IV infúze AA roztoku obsahujícího BCAA (Tremblay et al. 2005; Robinson et al. 2014). Žádné negativní změny IS jsme však nepozorovali v omnivorní skupině. Taková skupinově specifická odpověď na dlouhodobou intervenci BCAA u dvou kohort, které se liší ve svých nutričních zvyklostech, by mohla vysvětlovat předchozí konfliktní výsledky animálních studií (Newgard et al. 2009; Macotela et al. 2011). V rozporu s našimi výsledky, které byly získány na skupině metabolicky zdravých a mladých jedincích, jsou výsledky intervenčních studií, které byly

---

naopak prováděny na IR dobrovolnících, a které prokázaly zlepšení odsunu glukózy po navýšení příjmu stravy s vysokým obsahem BCAA (Ouellet et al. 2007; Jakubowicz et al. 2014). Zdá se tedy, že jen IR subjekty mohou profitovat z BCAA suplementace. Tento efekt může být podmíněn inzulinotropními účinky BCAA (van Loon et al. 2003). BCAA stimulují sekreci inzulínu z  $\beta$ -buňky jak přímo, tak cestou inkretinů (Yang et al. 2010; Jakubowicz et al. 2014). V tomto smyslu také suplementace BCAA u pacientů s T2DM zvýšila AIR a vedla ke zlepšení kompenzace postprandiálních glykemií (Jakubowicz et al. 2014). U zdravých jedinců však nemusejí být tyto inzulinotropní efekty nutně pozitivní, protože hyperinzulinémie sama o sobě zhoršuje inzulinovou signalizaci v játrech a v SM (Ueno et al. 2005). V souladu s těmito úvahami jsme také my prokázali zvýšení AIR po intervenci pouze ve skupině omnivorů, kteří jsou méně senzitivní než vegani.

### 5.2.2. Mitochondriální kapacita a genová exprese v kosterním svalu

Naše hypotéza byla, že změny v IS, které detekujeme na celotělové úrovni po intervenci, budou se odrážet ve změnách v mitochondriální respiraci kosterního svalu a/nebo v expresi klíčových genů pro inzulinovou signalizaci a metabolismus BCAA. Je známo, že změny v mitochondriální respiraci SM jsou asociovány s IR (Tumova et al. 2015). Navíc BCAA patří mezi hlavní substráty oxidované v SM. Po intervenci jsme neshledali žádné rozdíly mezi skupinami v mitochondriální denzitě (aktivitě CS) ani u jedné ze skupin. Zvýšení aktivity komplexů RC byly naopak zachyceny u obou skupin, ač více vyjádřeny byly ve skupině omnivorů. Statisticky signifikantní zvýšení bylo zachyceno v aktivitě komplexu II, u omnivorů tato změna navíc korelovala se změnami v komplexu III a CS. U omnivorů tedy zvýšení aktivity komplexů RC po intervenci koresponduje se vzestupem odsunu glukózy do SM. Navíc intervence vedla u omnivorů ke zvýšení exprese GLUT-4 v SM, což může ke zlepšení IS přispívat. Na druhou stranu naše výsledky nepoukazují na to, že by pokles IS u veganů byl asociován s odpovídajícími změnami v mitochondriální respiraci v SM. Ve srovnání se skupinou omnivorů měli vegani méně vyjádřeny změny v BCKDH A, což může naznačovat, že po intervenci neindukují BCAA katabolismus v SM.

---

### 5.2.3. Genová exprese v tukové tkáni

V minulosti bylo prokázáno *in vitro*, že BCAA slouží jako významný prekurzor pro *de novo* lipogenezu v adipocytech (Green et al. 2016). Na druhou stranu stavy charakterizované poruchou glukózové homeostázy jsou charakterizovány down-regulací klíčových enzymů v katabolizmu BCAA v AT (Lackey et al. 2013). Naše hypotéza tedy byla, že intervence BCAA bude modulovat expresi genů pro metabolismus BCAA a lipogenezu v AT. V rozporu s touto hypotézou jsme nepozorovali žádné signifikantní změny v expresi genů pro metabolismus BCAA, které by odráželo pokles IS po intervenci u veganů. Nicméně nemůžeme vyloučit, že zvýšená nabídka BCAA v SM mohla mít dopad na translaci těchto genů či přímo ovlivnila aktivitu příslušného enzymu.

Na druhou stranu suplementace BCAA vedla ve skupině omnivorů ke zvýšení exprese genů pro lipogenezu: syntézu mastných kyselin (FASN) a syntézu triglyceridů (DGAT-2). Změny v expresi DGAT-2 navíc korelovaly se změnami v genech dalších lipolytických enzymů, PPAR $\gamma$  a SCD-1. Tato pozorování podporují hypotézu, že exces exogenních BCAA je využíván v AT a slouží jako substrát pro *de novo* lipogenezu. Vyšší lipogenní kapacita AT byla v minulosti prokázána také v souvislosti s vyšší IS (Obata et al. 2016). Zvýšení exprese lipogenních genů u omnivorů tedy může představovat adaptivní mechanismus na zvýšený přívod BCAA, které by jinak negativně ovlivnily IS v SM.

Naše data nám neposkytují vysvětlení pro rozdílnou metabolickou odpověď na suplementaci BCAA u veganů a omnivorů. Jedna z hypotéz může záležet v rozdílném vstupním přívodu AA a BCAA mezi skupinami. U BCAA nízkopříjmové skupiny (tedy u veganů) mohou být BCAA přijaté stravou směřovány primárně do SM, kde jsou použity jako substrát pro proteosyntézu. Toto může vysvětlovat pokles IS po intervenci u veganů, protože bylo již v minulosti prokázáno, že leucin snižuje inzulínovou signalizaci cestou stimulace mTORC1-SK61 komplexu a zpětnovazebnou inhibicí IRS-1 a IRS-2 v SM (Krebs et al. 2007). V BCAA vysokopříjmové skupině (omnivoři) je exces BCAA pufrován tukovou tkání, kde jsou BCAA deaminovány a uhlíkatý skelet je použit pro lipogenezu. Jelikož jsme však ve studii nestanovovali ani míru proteosyntézy v SM, ani aktivitu mTORC1 nemůžeme dát v této hypotéze konkluzivní závěr.

Další hypotézou vysvětlující rozdílnou metabolickou odpověď na intervenci BCAA je rozdíl v příjmu a zásobách kobalaminu (vitamínu B12). Je známo, že veganská dieta je chu-



---

dá na kobalamin, a zásoby kobalaminu jsou u veganů významně sníženy (Pawlak et al. 2014), což jsme prokázali i my v observační studii (Gojda et al. 2013). Naproti tomu de novo lipogeneza a diferenciacie adipocytů v AT je dependentní na dostupnosti právě kobalaminu-4 (Green et al. 2016). Nižší dostupnost kobalaminu u veganů tedy může být příčinou horší lipogenní kapacity AT, což vede k přetékání excessu BCAA do kosterního svalstva, kde BCAA interferují s glukózovým metabolismem. V intervenční studii jsme však zachytili ve vstupních hladinách kobalaminu pouze trend k nižším hodnotám u veganů.

#### 5.2.4. Limitace

Hlavní limitací předkládané intervenční studie je malá velikost souborů, která je v těchto typech intervencí běžným omezením. Determinace velikosti vzorku (sample size determination) před samotnou studií byla založena na očekávané směrodatné odchylce v distribuci M-hodnoty podle observační studie (Gojda et al. 2013). V intervenční studii však byly zjištěny vyšší směrodatné odchylky M-hodnot a zejména MCR/I, kde byla navíc distribuce hodnot ovlivněna vysokou variabilitou rovnovážných inzulinémií. Statistická síla (power) experimentu ukázat rozdíl mezi soubory v parametru MCR/I byla pouze 7%. Přesto jsme nenalezli žádnou korelaci mezi M-hodnotou či MCR a rovnovážnými inzulinémiemi, což vylučuje možnost ovlivnění výsledku clampových studií signifikantně rozdílnými rovnovážnými inzulinémiemi mezi skupinami a vizitami.

#### 5.2.5. Souhrn intervenční studie

Chronické navýšení BCAA v dietě vedlo k poklesu IS pouze u veganů. U omnivorů suplementace BCAA vedla k indukci lipogenní aktivity AT a mitochondriální respirace SM. Prokázali jsme tedy negativní dopad suplementace BCAA pouze u subjektů s vysokou IS a nízkým bazálním příjmem AA/BCAA. Efekt suplementace BCAA na IS u veganů může být částečně vysvětlen jejich neschopností zvýšit katabolismus BCAA v AT a SM.

---

## Implikace pro dietologii

Skutečnost, že některé aminokyseliny mají také jiné než jen strukturální funkce na syntézu proteinů je známa již desítky let. Větvené aminokyseliny mají v tomto ohledu mezi ostatními esenciálními AA exkluzivní postavení. Po absorpci BCAA ve střevě nepodléhají primárnímu metabolismu ani v enterocyty, ani v hepatocyty, ale jsou z portálního řečiště v nezměněné koncentraci uvolňovány do systémové cirkulace. Slouží proto jako významné nutriční signály v řadě tkání. Leucin působí přímo na  $\beta$ -buňku, kde stimuluje sekreci inzulínu (Yang et al. 2010), v kosterním svalu aktivuje mTOR a proteosyntézu (Gran a Cameron-Smith 2011) svalových vláken, a bylo navrženo, že může ovlivňovat příjem stravy cestou signalizace v anorexigenních centrech hypotalamu (Zampieri et al. 2013).

BCAA jsou významně zastoupeny v syrovátkovém proteinu (Layman 2003). Přitom v minulosti již bylo prokázáno, že pokud je u pacientů s diabetem před jídly podána syrovátka, je dosaženo lepší postprandiální kompenzace glykemií (Nilsson et al. 2004; Frid et al. 2005). Suplementace směsí AA (obsahující také BCAA) vede u pacientů s T2DM v dlouhodobém horizontu ke zlepšení HbA1c (Solerte et al. 2008).

Prokázali jsme, že BCAA mohou protektivně působit hned na několika úrovních metabolismu. U obecné populace s normálním příjmem AA/BCAA a horší bazální citlivostí k inzulínu, BCAA zlepšují postprandiální odsun glukózy a stimulují lipogenní aktivitu v tukové tkáni. Za významné však považujeme, že BCAA také vykazují při dlouhodobé suplementaci inzulinotropní účinky. Skutečnost, že AA mají inzulinotropní vlastnosti je známa již desítky let (Berger a Vongaraya 1966; Floyd JC et al. 1966). Existuje řada prací dokladující efekt intravenózně i orálně podané směsi AA či proteinů na sekreci inzulínu (Gannon a Nuttall 2010).

Selhání  $\beta$ -buněk v kompenzaci IR je přitom ústředním rozvojem manifestace a progresu diabetu. Proto dietní manipulace s cílem zvýšit sekreci inzulínu představují potenciálně lákavý mechanismus k překonání IR a kompenzaci glykemií u pacientů s diabetem.

Ač jsme v současné době ještě daleko od možnosti formulace jednoznačných dietních doporučení, je zřejmé, že naše výsledky podporují obecný trend v dietoterapii diabetu, který spočívá v redukci příjmu sacharidů na úkor proteinů a tuků (Jirkovská et al. 2012; American Diabetes Association 2017). Suplementace BCAA či jejich zdroji se zdá být výhodná až u stavů, kdy dochází k poklesu v sekreci inzulínu a manifestaci diabetu. Naopak

---

u skupin obyvatelstva s vysokou citlivostí na inzulín mohou BCAA představovat potenciální riziko.

Obdobně také naše výsledky podporují protektivní efekt diet založených na rostlinných zdrojích. Vegetariánská dieta je dnes považována za vědecky podloženou alternativu diety diabetické, což se promítlo také v posledním doporučení České diabetologické společnosti pro diabetickou dietu (Jirkovská et al. 2012; Kahleova a Pelikanova 2015).

## **Závěr**

Diabetes 2. typu a jeho kardiovaskulární komplikace patří celosvětově v současnosti mezi nejvýznamnější příčiny mortality. Podstatnou měrou k tomu přispívá také skladba stravy. Existuje vztah mezi IR a vyšší hladinou plazmatických BCAA. Dosud však není zřejmé, zda jsou tyto dva jevy v kauzální souvislosti, a zda je zdroj cirkulujících BCAA exogenní (dieta či produkce ve střevě) nebo se jedná o tělesný protein. Cílem naší práce bylo prokázat vztah mezi těmito jevy v intervenční studii.

Před samotnou intervencí, jsme vyvinuli unikátní model „vegan vs. omnivor“. Předpokládali jsme, že populace veganů má dlouhodobě nižší dietní přívod BCAA a zároveň lepší parametry funkce inzulínu. Tento model byl validován v první observační studii. Následně byl model použit k intervenci perorálními preparáty BCAA po dobu tří měsíců. Zjistili jsme, že navýšení BCAA v dietě vedlo k poklesu IS pouze u veganů. U omnivorů suplementace BCAA vedla k indukci lipogenní aktivity AT a mitochondriální respirace SM. Prokázali jsme tedy negativní dopad suplementace BCAA pouze u subjektů s vysokou IS a nízkým bazálním příjmem AA/BCAA. Efekt suplementace BCAA na IS u veganů může být částečně vysvětlen jejich neschopností zvýšit katabolismus BCAA v AT a SM. Zároveň suplementace BCAA neměla významný efekt na zvýšení cirkulujících BCAA, ani na jejich tkáňový metabolismus, což zřejmě vylučuje kauzální vliv dietních BCAA v progresi diabetu. Dietní BCAA by však mohly mít vliv v iniciálních fázích zhoršování IS.

---

## Souhrn

Dizertace se zabývá aktuálním tématem vlivu nutričních faktorů na rozvoj syndromu inzulínové rezistence (IR). Teoretická část práce se věnuje fyziologii glukoregulace a jejímu postavení v intermediárním metabolismu, aktuálnímu pohledu na patogenezi IR, vlivu diet s restrikcí živočišné stravy na parametry asociované s IR a specifickému postavení aminokyselin s větveným řetězcem (BCAA). Část praktická pak představuje hlavní východiska a hypotézy dizertace. Dále popis jednotlivých realizovaných studií: metodologických (praktické zavedení biopsie kosterního svalu, analýzu BCAA pomocí bezvodivostní elektroforézy a observační studii k validaci modelu „vegan vs. omnivor“) a studie s chronickou intervencí BCAA.

Diabetes 2. typu (T2DM) je významným rizikovým faktorem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění a podílí se tak vysokou měrou na mortalitě a morbiditě v celosvětovém měřítku. V patogenezi rozvoje T2DM hrají klíčovou úlohu dva konsektivní kroky a to rozvoj inzulínové rezistence a selhání  $\beta$ -buněk v její kompenzaci. Inzulínová rezistence (IR) je definována jako snížená odpověď hlavních glukoregulačních orgánů na inzulín. Během inzulínem stimulovaného stavu dochází v kosterním svalu (SM) k poklesu odsunu glukózy, v tukové tkáni (AT) dochází k poklesu suprese lipolýzy a v játrech k poklesu suprese produkce glukózy. To rezultuje ve zvýšení cirkulující glukózy a volných mastných kyselin.  $\beta$ -buňky dlouhou dobu kompenzují rezistenci vyšší sekrecí inzulínu a jeho vyšší nabídkou na periférii a glykemie zůstává v normálním rozmezí. S další progresí stavu však dochází k jejich selhávání, a poklesne-li jejich rezervní sekreční kapacita pod 50 %, manifestuje se hyperglykemie. Syndrom IR jeví vysokou míru asociace s viscerální obezitou, dyslipidemií, arteriální hypertenzí a vyšším kardiovaskulárním rizikem. Etiologie rozvoje IR je multifaktoriální a podílejí se na ní jak vlivy genetické, tak vlivy environmentální. Mezi významné faktory lze zařadit také skladbu stravy. Z tohoto hlediska představují zřetele hodný výzkumný podklad lidé s extrémními stravovacími návyky. V minulosti bylo prokázáno, že vegani, lidé stravující se exkluzivně rostlinnou stravou, mají významně nižší prevalenci chorob asociovaných s IR, obezitou a diabetem. Veganská strava přitom jeví značně rozličnou skladbu nutrientů v porovnání se stravou omnivorní a definovat konkrétní faktor zodpovědný za protektivní vliv této životosprávy nelze. Recentně se však objevila řada prací hodnotící možný vliv BCAA na rozvoj IR. Bylo prokázáno, že vyšší hladina BCAA je asociována s IR a dokonce predikuje

---

---

rozvoj diabetu. Zároveň po životospřávné či léčebné intervenci dochází k normalizaci hladin BCAA. Vyšší dostupnost BCAA v buňkách glukoregulačních orgánů působí IR zřejmě cestou anaplerotického stresu, tedy vyšší nabídky intermediátů citrátového cyklu, na který jsou jejich uhlíkaté skelety metabolizovány. Intervenční studie s BCAA však přinesly rozporuplné výsledky a data z dlouhodobých intervencí u zdravých lidí nejsou k dispozici vůbec. Doposud tedy není zřejmé, zda jsou vyšší hladiny BCAA u diabetiků odrazem jejich vyššího exogenního příjmu či vyšší endogenní produkce odrážející akcelerovanou proteolýzu. Právě veganská strava je považována za nízko bílkovinnou a je prosta hlavních dietních zdrojů BCAA, což může být jeden z faktorů jejího protektivního vlivu.

Byly provedeny dvě humánní studie. První, observační, měla za cíl porovnat skupinu veganů a odpovídajících omnivorních kontrol v parametrech inzulínové senzitivity, ukazatelích mitochondriální biogeneze kosterního svalu a intramyocelulárně deponovaných lipidů (IMCL). Naší hypotézou bylo, že se vegani budou od omnivorů lišit vyšší mírou inzulínem stimulovaného odsunu glukózy do svalu, což bude na tkáňové úrovni odpovídat vyšší mitochondriální biogenezi a nižší depozici IMCL. Do studie bylo zařazeno 11 veganů a 10 kontrol (soubory byly srovnány dle věku, pohlaví, BMI, fyzické aktivity a proteino-energetického příjmu). Subjekty byly podrobeny následujícím vyšetřením: antropometrie, bioimpedance, ultrazvukové hodnocení vrstvy podkožního a viscerálního tuku, bazálním odběrem venózní krve k analýze statických parametrů glukózové a lipidové homeostázy, hyperinzulinemický euglykemický clamp (HEC) a svalová biopsie. Ve vzorku svalu bylo analyzováno množství IMCL (plynová chromatografie), množství mtDNA (PCR) a aktivita citrát syntázy (CS; spektrofotometrie). Podařilo se nám prokázat, že vegani mají signifikantně vyšší odsun glukózy v HEC (M-hodnota, vegan  $8.11 \pm 1.51$  vs. omnivor  $6.31 \pm 1.57$   $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 95% konfidenční interval: 0.402 - 3.212,  $p=0.014$ ). Obsah IMCL (vegan 13.91 (7.8 - 44.0) vs. omnivor 17.36 (12.4 - 78.5)  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  svalu, 95% konfidenční interval: -7.594 to 24.550,  $p=0.193$ ), mtDNA (vegan  $1.36 \pm 0.31$  vs. omnivor  $1.13 \pm 0.36$ , 95% konfidenční interval: -0.078 to 0.537,  $P=0.135$ ) a CS (vegan  $18.43 \pm 5.05$  vs. omnivor  $18.16 \pm 5.41$   $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 95% konfidenční interval: -4.503 to 5.050,  $P=0.906$ ). Potvrdili jsme, že vegani mají vyšší inzulínovou senzitivitu, která však nekoreluje se změnami na úrovni kosterního svalu. To může naznačovat, že časné změny celotělové senzitivity v rozvoji IR předcházejí změnám v kosterním svalu.

---

Intervenční studie vycházela z předpokladu, že vegani a omnivoři mají rozdílný příjem BCAA, a že dietní intervence těmito aminokyselinami u nich může indukovat IR na úrovni celotělové a na úrovni AT a SM. Naše hypotéza byla, že intervence BCAA povede u BCAA-nízko příjmové skupiny (vegani) ke zhoršení IR na úroveň omnivorních kontrol, a že tyto změny budou korelovat se změnami ve funkci inzulínu v AT a SM. Byla provedena kontrolovaná cross-over studie. Do studie bylo zařazeno celkem 8 veganů a 8 odpovídajících (věk, BMI, BIA, antropometrie, proteino-energetická bilance,  $VO_2\max$ ) omnivorních kontrol. Intervence byla prováděna 15, resp. 20 g BCAA denně po dobu 3 měsíců. Vyšetření bylo provedeno vstupně (baseline), následně po intervenci (intervence) a po 6 měsíční vymývací periodě (wash-out): antropometrie, BIA, hyperinzulinemický euglykemický clamp, arginino-vý test, svalová biopsie (aktivita citrát-syntázy (CS), aktivity jednotlivých komplexů dýchacího řetězce, genové exprese IRS1, GLUT4, BCKDHA, ACOX, CPT1b, PLIN2, PLIN5) a tuková biopsie (genová exprese adiponectin, CD3, BCKDHA, BCKDHB, GLUT4, IRS1, FASN, SCD1, DGAT2, PLIN1, PPAR $\gamma$ ). Obě skupiny byly před intervencí srovnatelné ve svém proteino-energetickém příjmu,  $VO_2\max$  a antropometrických charakteristikách. Vegani měli vstupně vyšší inzulínem stimulovaný odsun glukózy (M-hodnota: vegan 9.63 vs. omnivor 7.13  $mg.kg^{-1}.min^{-1}$   $p = 0.057$ , MCR vegan 9.63 vs. omnivor 7.13  $ml.kg^{-1}.min^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ). Ve skupině veganů intervence vedla k signifikantnímu zhoršení odsunu glukózy, který se normalizoval po wash-out periodě (M-hodnota: baseline 9.63 vs. intervence 7.99 vs. wash-out 9.64  $mg.kg^{-1}.min^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ). V omnivorní skupině tento efekt pozorován nebyl. V obou dvou skupinách došlo ke zvýšení sekrece inzulínu. Intervence nevedla k signifikantním změnám v genové expresi SM, v aktivitě CS ani v aktivitě komplexů respiračního řetězce, vyjma zvýšení aktivity komplexu II v obou skupinách, signifikantně pouze u kontrol, kde změna korelovala také se změnami v dalších komplexech. V AT po intervenci došlo ke zvýšení exprese lipogenních genů (DGAT-2, FASN) pouze u omnivorů.

Dlouhodobé navýšení obsahu BCAA ve veganské dietě vede ke zhoršení citlivosti na inzulín. U omnivorů navýšení BCAA nemělo na citlivost k inzulínu negativní efekt, ale bylo spojeno se zvýšením lipogenní aktivity tukové tkáně. Proto lze předpokládat, že navýšování BCAA nad úroveň běžnou pro omnivorní dietu již k negativním posunům v celotělovém odsunu glukózy nevede, a to pravděpodobně díky kompenzačním změnám metabolismu tukové tkáně. Tyto výsledky zasluhují další vědeckou pozornost.

---

V rámci řešení dizertace jsme před samotnými humánními studii do klinicko-experimentální praxe zavedli na našem pracovišti metodu biopsie kosterního svalstva Bergströmovou technikou. Tato metoda umožňuje nízce traumatický a reprodukovatelný přístup ke svalové tkáni. Dále byla vyvinuta metoda k analýze BCAA využívající bezkontaktní vodivostní elektroforézy, která umožňuje snadnou a rychlou analýzu většího množství vzorků.

## Summary

The thesis deals with an actual subject of nutritional factors that influence on insulin resistance (IR) development. The theoretical part of the thesis focuses on a physiology of gluco-regulation and its role in an intermediary metabolism, a current view of the pathogenesis of IR, the influence of a diet with restriction of animal food on the parameters associated with IR and specifically on the role of dietary branched chain amino acids (BCAA). The practical part presents the main assumptions and hypotheses of the thesis. Detailed description of completed studies follows: methodological studies (practical implementation biopsy of skeletal muscle, BCAA analysis using contactless electrophoresis and observational study to validate “vegan vs. omnivore” model) and long-term interventional study with BCAA supplementation.

Type 2 diabetes (T2DM) is a major risk factor for cardiovascular diseases and therefore contributes highly to mortality and morbidity in economically developed countries. In the pathogenesis of the development of T2DM, two consecutive steps play a key role: development of insulin resistance (IR) and  $\beta$ -cell failure in its compensation. IR is defined as a reduced response of the major gluco-regulatory tissues to insulin. There is a decrease in skeletal muscle (SM) glucose disposal, adipose tissue (AT) suppression of lipolysis and a suppression in hepatic glucose production in an insulin-stimulated state. This results in an increase in circulating glucose and free fatty acids.  $\beta$ -cells compensate for higher resistance with an increase in insulin secretion and higher insulin availability in the peripheral tissues so that glucose remains in the normal range. With further progression of the status, however,  $\beta$ -cells start to fail and decrease its reserve secretory capacity.

---

When it drops below 50 %, hyperglycemia manifests. Syndrome of IR shows tight association with visceral obesity, dyslipidemia, hypertension and cardiovascular risk. Aetiology of IR development is multifactorial and both genetic and environmental influences are proposed. Diet composition ranks among the important etiological factors. From this perspective, groups of people with extreme eating habits could be viewed as an important research substrate. It was shown in the past that vegans, people consuming exclusively plant-based diet have significantly lower prevalence of diseases associated with IR, obesity and diabetes. Vegan diet yet shows quite a different composition of nutrients compared to omnivorous diet and to define a specific factor responsible for a protective effect of this diet is not possible. Recently a number of studies evaluate a possible impact of BCAA on the development IR. It was demonstrated that higher circulating levels of BCAA is associated with IR and even predict the development of diabetes. At the same time, after lifestyle or medical interventions BCAA levels normalize. Increased availability of BCAA in cells of gluoregulatory tissues could cause IR by inducing anaplerotic stress, i.e. causing high availability of tricarboxylic acid cycle intermediates from degraded carbon skeletons of BCAA that interfere with Ac CoA entry to the cycle. Interventional studies with BCAA, however, showed conflicting results, and long-term data from healthy human studies are missing. It is not clear so far whether the higher levels of BCAA in diabetics reflect their higher exogenous intake or increased endogenous production reflecting the accelerated proteolysis.

Explicitly vegan diet is considered as a low protein and is free of the major sources of dietary BCAA, which could be one of the factors of its protective effect. Two human studies were conducted. First, observational study was designed to compare a group of vegans and corresponding omnivorous controls in parameters of insulin sensitivity, markers of mitochondrial biogenesis of SM and intramyocelullar lipids (IMCL). Our hypothesis was that vegans will differ from omnivores in higher insulin-stimulated glucose disposal, which will correspond to the increased mitochondrial biogenesis and lower deposition of IMCL in SM. Eleven vegans and ten omnivorous controls (compared by age, sex, BMI, physical activity and protein-energy intake) were recruited. Following examinations were performed: anthropometry, bioimpedance, ultrasound evaluation of subcutaneous and visceral fat, basal venous blood sampling for analysis of static parameters of glucose and lipid homeostasis, hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC)



---

and muscle biopsy. In the sample of SM the amount of IMCL (gas chromatography), mtDNA (PCR) and the activity of citrate synthase (CS; spectrophotometry) was analysed. We proved that vegans have a significantly higher glucose disposal in HEC (M-value vegan  $8.11 \pm 1.51$  vs. omnivores  $6.31 \pm 1.57$  mg.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, 95% CI: 0.402 to 3.212,  $p = 0.014$ ). IMCL content (vegan 13.91 (7.8 to 44.0) vs. omnivore 17.36 (12.4 to 78.5) mg.g<sup>-1</sup> muscle, 95% CI: -7.594 to 24.550,  $p = 0.193$ ), mtDNA (vegan  $1.36 \pm 0.31$  vs.  $1.13 \pm$  omnivore  $0.36$ , 95% CI: -0.078 to 0.537,  $P = 0.135$ ) and CS (vegan  $18.43 \pm 5.05$  vs.  $18.16 \pm$  omnivore  $5.41$  mmol.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, 95% CI: -4.503 to 5.050,  $P = 0.906$ ). We confirmed that vegans have higher insulin sensitivity, which, however, did not correlate with changes at the level of SM. This may indicate that the early changes in the development of whole body sensitivity IR precede changes in skeletal muscle.

Interventional study was based on the assumption that the vegans and omnivores have different BCAA intake and stores, and that dietary intervention with these amino acids could induce IR at the whole body level and at the level of AT and SM. Our hypothesis was that the intervention with BCAA supplements would result in a deterioration of insulin measures in BCAA-low-intake groups to the level of omnivorous controls, and that these changes would be correlated with changes in insulin function in AT and SM. Controlled cross-over study was performed. Eight vegans and eight matched (age, BMI, BIA, anthropometry, protein-energy balance, VO<sub>2</sub>max) omnivores were recruited. The intervention comprised of a daily supplementation with 15 or 20 g of BCAA respectively. The examination was performed at the baseline (baseline), after the intervention (intervention) and after 6 months wash out period (washout): anthropometry, BIA, hyperinsulinemic euglycemic clamp, the arginine test, muscle biopsy (activity of citrate synthase (CS) activity of individual respiratory chain complexes, gene expression IRS1, GLUT4, BCKDH, ACOX, CPT1b, PLIN2, PLIN5) and fat biopsy (gene expression of adiponectin, CD3, BCKDH, BCKDHB, GLUT4, IRS1, FASN, SCD1, DGAT2, PLIN1, PPAR-γ) was performed. Both groups were comparable at baseline in their anthropometry, protein-caloric intake, physical activity and VO<sub>2</sub>max. Vegans have higher insulin stimulated glucose disposal at baseline (M-value: vegan 9.63 vs. omnivore 7.13 mg.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p = 0.057$ , MCR vegan 9.63 vs. omnivore 7.13 ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p < 0.05$ ). In vegans interventions resulted in a significant deterioration in the glucose disposal, that normalized after the wash-out period (M-value: baseline 9.63 vs intervention 7.99 vs. washout 9.64 mg.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p < 0.05$ ). In

---

---

omnivores, this effect was not observed. In both groups, there was an increase in insulin secretion. The intervention did not lead to significant changes in the gene expression in SM, in the activity of CS, or in the activity of the complexes of the respiratory chain except in the complex II, that increased activity in both groups significantly only in controls, where the change correlated also with changes in other complexes. We observed an increase in the expression of lipogenic genes (DGAT-2, FASN) after the intervention only in omnivores. To conclude, long-term supplementation with BCAA leads to a deterioration in insulin sensitivity in vegans. In omnivores the effect was not observed, but the intervention was associated with increased lipogenic activity of AT. Therefore it can be assumed that increasing the BCAA intake over the average omnivorous intake does not have a negative impact on whole-body glucose disposal, probably due to compensatory changes in the metabolism of AT. These results merit further scientific attention.

Within the framework of thesis two methodological works were performed. Barnstorm technique of skeletal muscle sampling was introduced to our experimental clinical practice. This method enables low-traumatic and reproducible approach to obtain muscle tissue. Further, a sampling method was introduced for analyzing serum BCAA using contactless conductivity electrophoresis, which enables easy and rapid analysis of large numbers of samples.

## Reference:

1. ABDULLAH, Noraidatulakma, John ATTIA, Christopher OLDMEADOW, Rodney J SCOTT a Elizabeth G HOLLIDAY, 2014. The architecture of risk for type 2 diabetes: understanding Asia in the context of global findings. *International journal of endocrinology* [online]. B.m.: Hindawi Publishing Corporation, 2014, 593982 [vid. 2016-11-29]. ISSN 1687-8337. Dostupné z: doi:10.1155/2014/593982
2. AGRAWAL, Sutapa, Christopher J MILLETT, Preet K DHILLON, SV SUBRAMANIAN a Shah EBRAHIM, 2014. Type of vegetarian diet, obesity and diabetes in adult Indian population. *Nutrition Journal* [online]. 5. 12., 13(1), 89 [vid. 2017-03-15]. ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2891-13-89
3. AHREN, B. a G. PACINI, 2005. Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for intervention. *Diabetes, Obesity and Metabolism* [online]. 1., 7(1), 2–8 [vid. 2017-01-19]. ISSN 1462-8902. Dostupné z: doi:10.1111/j.1463-1326.2004.00361.x

- 
4. AHRÉN, Bo a Giovanni PACINI, 2004. Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta cell function in clinical studies. *European journal of endocrinology* [online]. 2., **150**(2), 97–104 [vid. 2017-01-19]. ISSN 0804-4643. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14763905>
  5. ALDERETE, T L, F R SATTler, X SHENG, J TUCCI, S D MITTELMAN, E G GRANT a M I GORAN, 2015. A novel biopsy method to increase yield of subcutaneous abdominal adipose tissue. *International journal of obesity (2005)* [online]. B.m.: Macmillan Publishers Limited, 1., **39**(1), 183–6 [vid. 2016-01-21]. ISSN 1476-5497. Dostupné z: doi:10.1038/ijo.2014.90
  6. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017. 4. Lifestyle Management. *Diabetes Care* [online]. 15. 1., **40**(Supplement 1), S33–S43 [vid. 2017-03-16]. Dostupné z: doi:10.2337/dc17-S007
  7. ANDEL, Michal, Vlasta NEMCOVA, Nela PAVLIKOVA, Jana URBANOVA, Marie CECHAKOVA, Andrea HAVLOVA, Radka STRAKOVA, Livia VECEROVA, Vaclav MANDYS, Jan KOVAR, Petr HENE BERG, Jan TRNKA a Jan POLAK, 2014. [Factors causing damage and destruction of beta-cells of the islets of Langerhans in the pancreas]. *Vnitřní lékařství*. 9., **60**(9), 684–690. ISSN 0042-773X (Print).
  8. ANON., nedatováno. WHO Technical Report Series PROTEIN AND AMINO ACID REQUIREMENTS IN HUMAN NUTRITION Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation.
  9. AUNE, D, G URSIN a M B VEIER?D, 2009. Meat consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia* [online]. **52**(11), 2277–2287. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-009-1481-x>
  10. BAECKE, J A, J BUREMA a J E FRIJTERS, 1982. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr*. **36**(5), 936–942.
  11. BARNARD, Neal D, Joshua COHEN, David J A JENKINS, Gabrielle TURNER-MCGRIEVEY, Lise GLOEDE, Amber GREEN a Hope FERDOWSIAN, 2009. A low-fat vegan diet and a conventional diabetes diet in the treatment of type 2 diabetes: a randomized, controlled, 74-wk clinical trial. *Am J Clin Nutr* [online]. 5., **89**(5), 1588S–1596S. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736H>
  12. BARNARD, Neal D, Anthony R SCIALLI, Gabrielle TURNER-MCGRIEVEY, Amy J LANOU a Jolie GLASS, 2005. The effects of a low-fat, plant-based dietary intervention on body weight, metabolism, and insulin sensitivity. *Am J Med* [online]. 10., **118**(9), 991–997. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.03.039>
  13. BAYS, Harold E, J Michael GONZÁLEZ-CAMPOY, George A BRAY, Abbas E KITABCHI, Donald A BERGMAN, Alan Bruce SCHORR, Helena W RODBARD a Robert R HENRY, 2008. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* [online]. 10. 3., **6**(3), 343–368 [vid. 2016-11-29]. ISSN 1477-9072. Dostupné z: doi:10.1586/14779072.6.3.343
-

- 
14. BERGER, S a N VONGARAYA, 1966. Insulin response to ingested protein in diabetes. *Diabetes*. 5., **15**(5), 303–306.
  15. BERGSTROM, J, 1975. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Lab Invest*. **35**(7), 609–616.
  16. BODEN, G, X CHEN, J RUIZ, J V WHITE a L ROSSETTI, 1994. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *The Journal of clinical investigation* [online]. B.m.: American Society for Clinical Investigation, 6., **93**(6), 2438–46 [vid. 2016-11-29]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI117252
  17. BONADONNA, R C, M P SACCOMANI, C COBELLI a R A DEFRONZO, 1993. Effect of insulin on system A amino acid transport in human skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation* [online]. B.m.: American Society for Clinical Investigation, 2., **91**(2), 514–21 [vid. 2017-01-19]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI116230
  18. BOUSHEL, R, E GNAIGER, P SCHJERLING, M SKOVBRO, R KRAUNSPERGER a F DELA, 2007. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* [online]. 4., **50**(4), 790–796. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-007-0594-3>
  19. BREHM, Attila a Michael RODEN, 2007. Glucose Clamp Techniques. In: *Clinical Diabetes Research* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, s. 43–76 [vid. 2016-11-29]. ISBN 9780470513095. Dostupné z: doi:10.1002/9780470513095.ch4
  20. CAHOVÁ, M, H VAVRÍNKOVÁ a L KAZDOVÁ, 2007. Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance. *Physiological research* [online]. **56**(1), 1–15 [vid. 2016-11-29]. ISSN 0862-8408. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497094>
  21. CALBET, Jose A L a Dave A MACLEAN, 2002. Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. *J Nutr*. 8., **132**(8), 2174–2182.
  22. CANCELLO, Raffaella, Corneliu HENEGAR, Nathalie VIGUERIE, Soraya TALEB, Christine POITOU, Christine ROUAULT, Muriel COUPAYE, Veronique PELLOUX, Danielle HUGOL, Jean-Luc BOUILLLOT, Anne BOULOUMIÉ, Giorgio BARBATELLI, Saverio CINTI, Per-Arne SVENSSON, Gregory S BARSH, Jean-Daniel ZUCKER, Arnaud BASDEVANT, Dominique LANGIN a Karine CLÉMENT, 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* [online]. 8., **54**(8), 2277–86 [vid. 2016-11-29]. ISSN 0012-1797. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046292>
  23. CLARYS, Peter, Tom DELIENS, Inge HUYBRECHTS, Peter DERIEMAEKER, Barbara VANAELEST, Willem DE KEYZER, Marcel HEBBELINCK a Patrick MULLIE, 2014. Comparison of nutritional quality of the vegan, vegetarian, semi-vegetarian, pesco-vegetarian and omnivorous diet. *Nutrients* [online]. 1., **6**(3), 1318–32 [vid. 2015-08-03]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu6031318
-

- 
24. COLE, Jeffrey T., 2015. Metabolism of BCAAs. In: *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 13–24 [vid. 2017-02-23]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-1923-9\_2
  25. COOPERSTEIN, S J a A LAZAROW, 1951. A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *The Journal of biological chemistry* [online]. 4., **189**(2), 665–70 [vid. 2016-01-20]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14832284>
  26. D’ALESSIO, D., 2011. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* [online]. 10., **13**, 126–132 [vid. 2016-11-29]. ISSN 14628902. Dostupné z: doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01449.x
  27. DE CAMPOS-FERRAZ, Patrícia Lopes, Isabel ANDRADE, Willian DAS NEVES, Isabela HANGAI, Christiano Robles Rodrigues ALVES a Antonio Herbert LANCHI, 2014. An overview of amines as nutritional supplements to counteract cancer cachexia. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* [online]. B.m.: Wiley-Blackwell, 6., **5**(2), 105–110 [vid. 2017-02-02]. ISSN 2190-5991. Dostupné z: doi:10.1007/s13539-014-0138-x
  28. DEFRONZO, R A, J D TOBIN a R ANDRES, 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 10., **237**(3), E214–E223.
  29. DEFRONZO, Ralph A, 2009. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* [online]. B.m.: American Diabetes Association, 4., **58**(4), 773–95 [vid. 2016-11-29]. ISSN 1939-327X. Dostupné z: doi:10.2337/db09-9028
  30. DEFRONZO, Ralph A, Eleuterio FERRANNINI, Rosa HENDLER, Philip FELIG a John WAHREN, 1983. Regulation of Splanchnic and Peripheral Glucose Uptake by Insulin and Hyperglycemia in Man. *Diabetes.* **32**(1).
  31. DELA, Flemming a Jørn Wulff HELGE, 2013. Insulin resistance and mitochondrial function in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* [online]. 1., **45**(1), 11–15. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.09.019>
  32. DJIOGUE, Sefirin, Armel Hervé NWABO KAMDJE, Lorella VECCHIO, Maulilio John KIPANYULA, Mohammed FARAHNA, Yousef ALDEBASI a Paul Faustin SEKE ETET, 2013. Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs. *Endocrine-related cancer* [online]. B.m.: BioScientifica, 2., **20**(1), R1–R17 [vid. 2017-01-17]. ISSN 1479-6821. Dostupné z: doi:10.1530/ERC-12-0324
  33. DRUMMOND, Micah J a Blake B RASMUSSEN, 2008. Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signalling and human skeletal muscle protein synthesis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* [online]. B.m.: NIH Public Access, 5., **11**(3), 222–6 [vid. 2017-02-28]. ISSN 1363-1950. Dostupné z: doi:10.1097/MCO.0b013e3282fa17fb
-

- 
34. DUBÉ, John J., Francesca AMATI, Maja STEFANOVIC-RACIC, Frederico G. S. TOLEDO, Sarah E. SAUERS a Bret H. GOODPASTER, 2008. Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. **294**(5).
  35. EVERMAN, Sarah, Lawrence J MANDARINO, Chad C CARROLL a Christos S KATSANOS, 2015. Effects of acute exposure to increased plasma branched-chain amino acid concentrations on insulin-mediated plasma glucose turnover in healthy young subjects. *PLoS one* [online]. 1., **10**(3), e0120049 [vid. 2016-01-22]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0120049
  36. FARFARI, Salah, Vera SCHULZ, Barbara CORKEY a Marc PRENTKI, 2000. Glucose-Regulated Anaplerosis and Cataplerosis in Pancreatic Beta-Cells Possible Implication of a Pyruvate/Citrate Shuttle in Insulin Secretion. *DIABETES*. **49**.
  37. FELIG, P, E MARLISS a Jr CAHILL GF, 1969. Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *N Engl J Med* [online]. **281**(15), 811–816. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM196910092811503>
  38. FERRANNINI, E, E J BARRETT, S BEVILACQUA a R A DEFRONZO, 1983. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *The Journal of clinical investigation* [online]. 1. 11., **72**(5), 1737–47 [vid. 2017-01-24]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI111133
  39. FLORINDO, Alex Antonio, Maria do Rosário Dias de Oliveira LATORRE, Elisabete Cristina Morandi dos SANTOS, Carlos Eduardo NEGRÃO, Luciene Ferreira AZEVEDO a Aluisio Augusto Cotrim SEGURADO, 2006. Validity and reliability of the Baecke questionnaire for the evaluation of habitual physical activity among people living with HIV/AIDS. *Cad Saude Publica* [online]. 3., **22**(3), 535–541. Dostupné z: <http://dx.doi.org/S0102-311X2006000300008>
  40. FLOYD JC, Jr, S S FAJANS, J W CONN, R F KNOPF a J RULL, 1966. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* [online]. 10., **45**(9), 1487–1502. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI105456>
  41. FRID, Anders H, Mikael NILSSON, Jens Juul HOLST a Inger M E BJÖRCK, 2005. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr*. 7., **82**(1), 69–75.
  42. GANNON, Mary C a Frank Q NUTTALL, 2010. Amino acid ingestion and glucose metabolism—a review. *IUBMB Life* [online]. 10., **62**(9), 660–668. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/iub.375>
  43. GIACCA, Adria, Changting XIAO, Andrei I OPRESCU, Andre C CARPENTIER a Gary F LEWIS, 2011. Lipid-induced pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction: focus on in vivo studies. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* [online]. 2., **300**(2), E255-62 [vid. 2016-11-29]. ISSN 1522-1555. Dostupné z: doi:10.1152/ajpendo.00416.2010
-

- 
44. GODSLAND, Ian F, Kamalini LECAMWASAM a Desmond G JOHNSTON, 2011. A systematic evaluation of the insulin resistance syndrome as an independent risk factor for cardiovascular disease mortality and derivation of a clinical index. *Metabolism* [online]. **60**(10), 1442–1448. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2011.02.012>
45. GOFF, L M, J D BELL, P-W. SO, A DORNHORST a G S FROST, 2005. Veganism and its relationship with insulin resistance and intramyocellular lipid. *Eur J Clin Nutr* [online]. 2., **59**(2), 291–298. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602076>
46. GOJDA, Jan, L ROSSMEISSLOVÁ, Jana TŮMOVÁ, Adéla KRAJČOVÁ, Moustafa ELKALAF, Jakub ŽIAK, Martin JAČEK, Kamila BALUŠÍKOVÁ, František DUŠKA, Jan TRNKA a Michal ANDĚL, 2015. Postavení perkutánní biopsie kosterního svalu v diabetologickém výzkumu. Metodologický přehled. *Diabetologie - Metabolismus - Endokrinologie - Výživa : časopis pro postgraduální vzdělávání* [online]. **18**(4), 167–176. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/bmc16002650>
47. GOJDA, J, J PATKOVÁ, M JAČEK, J POTOČKOVÁ, J TRNKA, P KRAML a M ANDĚL, 2013. Higher insulin sensitivity in vegans is not associated with higher mitochondrial density. *European journal of clinical nutrition* [online]. (September), 1–6. ISSN 1476-5640. Dostupné z: [doi:10.1038/ejcn.2013.202](https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.202)
48. GOJDA, J, L ROSSMEISLOVÁ, R STRAKOVÁ, J TŮMOVÁ, M ELKALAF, M JAČEK, P TŮMA, J POTOČKOVÁ, E KRAUZOVÁ, P WALDAUF, J TRNKA, V ŠTICH a M ANDĚL, 2017. Chronic dietary exposure to branched chain amino acids impairs glucose disposal in vegans but not in omnivores. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 1. 2. [vid. 2017-03-21]. ISSN 0954-3007. Dostupné z: [doi:10.1038/ejcn.2016.274](https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.274)
49. GOODPASTER, B H, J HE, S WATKINS a D E KELLEY, 2001. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* 12., **86**(12), 5755–5761.
50. GRAN, Petra a David CAMERON-SMITH, 2011. The actions of exogenous leucine on mTOR signalling and amino acid transporters in human myotubes. *BMC Physiology* [online]. 25. 6., **11**(1), 10 [vid. 2017-01-15]. ISSN 1472-6793. Dostupné z: [doi:10.1186/1472-6793-11-10](https://doi.org/10.1186/1472-6793-11-10)
51. GREEN, Courtney R, Martina WALLACE, Ajit S DIVAKARUNI, Susan A PHILLIPS, Anne N MURPHY, Theodore P CIARALDI a Christian M METALLO, 2016. Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nature chemical biology* [online]. 1., **12**(1), 15–21 [vid. 2016-05-27]. ISSN 1552-4469. Dostupné z: [doi:10.1038/nchembio.1961](https://doi.org/10.1038/nchembio.1961)
52. GROOP, L C, C SALORANTA, M SHANK, R C BONADONNA, E FERRANNINI a R A DEFRONZO, 1991. The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [online]. 1., **72**(1), 96–107 [vid. 2016-11-29]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: [doi:10.1210/jcem-72-1-96](https://doi.org/10.1210/jcem-72-1-96)
-

- 
53. HALBAN, Philippe A., Kenneth S. POLONSKY, Donald W. BOWDEN, Meredith A. HAWKINS, Charlotte LING, Kieren J. MATHER, Alvin C. POWERS, Christopher J. RHODES, Lori SUSSEL a Gordon C. WEIR, 2014.  $\beta$ -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *Diabetes Care*. **37**(6).
54. HE, J, S WATKINS a D E KELLEY, 2001. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* [online]. 4., **50**(4), 817–23 [vid. 2016-01-22]. ISSN 0012-1797. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289047>
55. HERMAN, Mark A, Pengxiang SHE, Odile D PERONI, Christopher J LYNCH a Barbara B KAHN, 2010. Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. *J Biol Chem* [online]. 4., **285**(15), 11348–11356. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.075184>
56. HUA, N W, R A STOOHS a F S FACCHINI, 2001. Low iron status and enhanced insulin sensitivity in lacto-ovo vegetarians. *Br J Nutr*. **86**(4), 515–519.
57. HUANG, Ru-Yi, Chuan-Chin HUANG, Frank B. HU a Jorge E. CHAVARRO, 2016. Vegetarian Diets and Weight Reduction: a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of General Internal Medicine* [online]. 3. 1., **31**(1), 109–116 [vid. 2017-03-15]. ISSN 0884-8734. Dostupné z: [doi:10.1007/s11606-015-3390-7](https://doi.org/10.1007/s11606-015-3390-7)
58. HUŠEK P., ŠIMEK P., Tvrzická E., 2002. Simple and rapid procedure for the determination of individual free fatty acids in serum. *anal. chim. acta*. **465**, 433–439.
59. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015. IDF Diabetes Atlas, 7th edn. *Brussels, Belgium: International Diabetes Federation* [online] [vid. 2017-01-03]. Dostupné z: <http://www.diabetesatlas.org/resources/how-to-cite.html>
60. IOZZO, Patricia, 2009. Viewpoints on the way to the consensus session: where does insulin resistance start? The adipose tissue. *Diabetes Care* [online]. **32 Suppl 2**, S168–S173. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2337/dc09-S304>
61. JAKUBOWICZ, Daniela, Oren FROY, Bo AHRÉN, Mona BOAZ, Zohar LANDAU, Yosefa BAR-DAYAN, Tali GANZ, Maayan BARNEA a Julio WAINSTEIN, 2014. Incretin, insulinotropic and glucose-lowering effects of whey protein pre-load in type 2 diabetes: a randomised clinical trial. *Diabetologia* [online]. 10., **57**(9), 1807–1811. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-014-3305-x>
62. JALLUT, D, A GOLAY, R MUNGER, P FRASCAROLO, Y SCHUTZ, E JÉQUIER a J P FELBER, 1990. Impaired glucose tolerance and diabetes in obesity: a 6-year follow-up study of glucose metabolism. *Metabolism: clinical and experimental* [online]. 10., **39**(10), 1068–75 [vid. 2016-11-29]. ISSN 0026-0495. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2215253>
-



- 
63. JANSSEN, Antoon J M, Frans J M TRIJBELS, Rob C A SENGERS, Jan A M SMEITINK, Lambert P VAN DEN HEUVEL, Liesbeth T M WINTJES, Berendien J M STOLTENBORG-HOGENKAMP a Richard J T RODENBURG, 2007. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clinical chemistry* [online]. 4., **53**(4), 729–34 [vid. 2016-01-20]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2006.078873
64. JIRKOVSKÁ, Alexndra, Terezie PELIKÁNOVÁ a Michal ANDĚL, 2012. Doporučený postup dietní léčby pacientů s diabetem. *Standard péče* [online]. [vid. 2017-01-15]. Dostupné z: [http://www.diab.cz/dokumenty/Standardy\\_dieta2012\\_def\\_2013.pdf](http://www.diab.cz/dokumenty/Standardy_dieta2012_def_2013.pdf)
65. KAHLEOVA, H, M MATOULEK, H MALINSKA, O OLIYARNIK, L KAZDOVA, T NESKUDLA, A SKOCH, M HAJEK, M HILL, M KAHLE a T PELIKANOVA, 2011. Vegetarian diet improves insulin resistance and oxidative stress markers more than conventional diet in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med* [online]. 5., **28**(5), 549–559. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.03209.x>
66. KAHLEOVA, Hana a Terezie PELIKANOVA, 2015. Vegetarian Diets in the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition* [online]. 3. 9., **34**(5), 448–458 [vid. 2017-03-16]. ISSN 0731-5724. Dostupné z: doi:10.1080/07315724.2014.976890
67. KAHN, C R a A B GOLDFINE, 1993. Molecular determinants of insulin action. *Journal of diabetes and its complications* [online]. **7**(2), 92–105 [vid. 2017-01-17]. ISSN 1056-8727. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8518461>
68. KAHN, C R, R.S. YALOW, S.A. BERSON, R.A. KREISBERG, B.R. BOSHELL, J. DIPLACIDO, et AL., A.J. WARING, K. LASLOW, V. TAPPAN, F. ALBRIGHT, C.H. BURNETT, P.H. SMITH, et AL., Z. LARON, A. PERTZELAN, S. MANNHEIMER, C.R. KAHN, K. MEGYESI, R.S. BAR, et AL., D. RABINOWITZ, S.A. BERSON, R.S. YALOW, O.B. CROFFORD, T. KONO, F.W. BARHAM, C.R. KAHN, D. RABINOWITZ, K.L. ZIERLER, R.S. SHERWIN, K.J. KRAMER, J.D. TOBIN, et AL., P.A. INSEL, J.E. LILJENQUIST, J.D. TOBIN a et AL., 1978. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism: clinical and experimental* [online]. B.m.: Elsevier, 12., **27**(12 Suppl 2), 1893–902 [vid. 2017-01-21]. ISSN 0026-0495. Dostupné z: doi:10.1016/S0026-0495(78)80007-9
69. 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 a J P PALMER, 1993. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes*. **42**(11), 1663–1672.
70. KAMAURA, Mitsumasa, Kiyoko NISHIJIMA, Mitsuo TAKAHASHI, Toshihiko ANDO, Shunsaku MIZUSHIMA a Osamu TOCHIKUBO, 2010. Lifestyle modification in metabolic syndrome and associated changes in plasma amino acid profiles. *Circ J*. **74**(11), 2434–2440.
71. KAZANTZIS, Melissa a Andreas STAHL, 2012. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of*
-

- 
- Lipids* [online]. 5., **1821**(5), 852–857 [vid. 2017-01-27]. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2011.09.010
72. KELLEY, D E a L J MANDARINO, 2000. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*. 5., **49**(5), 677–683.
73. KEY, T J, G E FRASER, M THOROGOOD, P N APPLEBY, V BERAL, G REEVES, M L BURR, J CHANG-CLAUDE, R FRENTZEL-BEYME, J W KUZMA, J MANN a K MCPHERSON, 1998. Mortality in vegetarians and non-vegetarians: a collaborative analysis of 8300 deaths among 76,000 men and women in five prospective studies. *Public Health Nutr*. 3., **1**(1), 33–41.
74. KIM, Mi Kyung, Sang Woon CHO a Yoo Kyoung PARK, 2012. Long-term vegetarians have low oxidative stress, body fat, and cholesterol levels. *Nutr Res Pract* [online]. 4., **6**(2), 155–161. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4162/nrp.2012.6.2.155>
75. KITESSA, Soressa a Mahinda ABEYWARDENA, 2016. Lipid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle: The Chase for the Culprit Goes from Total Intramuscular Fat to Lipid Intermediates, and Finally to Species of Lipid Intermediates. *Nutrients* [online]. 29. 7., **8**(8), 466 [vid. 2017-01-31]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu8080466
76. KOHLMEIER, Martin., 2015. *Nutrient Metabolism*. B.m.: Academic Press. ISBN 9780123877840.
77. KREBS, Michael, Barbara BRUNMAIR, Attila BREHM, Michaela ARTWOHL, Julia SZENDROEDI, Peter NOWOTNY, Erich ROTH, Clemens FÜRNSINN, Miriam PROMINTZER, Christian ANDERWALD, Martin BISCHOF a Michael RODEN, 2007. The Mammalian target of rapamycin pathway regulates nutrient-sensitive glucose uptake in man. *Diabetes* [online]. 6., **56**(6), 1600–1607. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1016>
78. KREBS, Michael, Martin KRSSAK, Elisabeth BERNROIDER, Christian ANDERWALD, Attila BREHM, Martin MEYERSPEER, Peter NOWOTNY, Erich ROTH, Werner WALDHÄUSL a Michael RODEN, 2002. Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes*. 3., **51**(3), 599–605.
79. KRSSAK, M, K FALK PETERSEN, A DRESNER, L DIPIETRO, S M VOGEL, D L ROTHMAN, M RODEN a G I SHULMAN, 1999. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* [online]. 1., **42**(1), 113–116. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s001250051123>
80. KUO, C-S., N-S. LAI, L-T. HO a C-L. LIN, 2004. Insulin sensitivity in Chinese ovo-lactovegetarians compared with omnivores. *Eur J Clin Nutr* [online]. 2., **58**(2), 312–316. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601783>
81. LACKEY, Denise E, Christopher J LYNCH, Kristine C OLSON, Rouzbeh MOSTAEDI, Mohamed ALI, William H SMITH, Fredrik KARPE, Sandy HUMPHREYS, Daniel H BEDINGER, Tamara N DUNN, Anthony P THOMAS, Pieter J OORT, Dorothy A KIEFFER, Rajesh AMIN, Ahmed
-

- 
- BETTAIEB, Fawaz G HAJ, Paska PERMANA, Tracy G ANTHONY a Sean H ADAMS, 2013. Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* [online]. 1. 6., **304**(11), E1175-87 [vid. 2016-01-22]. ISSN 1522-1555. Dostupné z: doi:10.1152/ajpendo.00630.2012
82. LARA-CASTRO, Cristina, Bradley R NEWCOMER, Jennifer ROWELL, Penny WALLACE, Sara M SHAUGHNESSY, A Julian MUNOZ, Alanna M SHIFLETT, Dana Y RIGSBY, Jeannine C LAWRENCE, Daryl E BOHNING, Steven BUCHTHAL a W Timothy GARVEY, 2008. Effects of short-term very low-calorie diet on intramyocellular lipid and insulin sensitivity in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Metabolism* [online]. 1., **57**(1), 1–8. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2007.05.008>
83. LAWRENCE, Jeannine C, Barbara A GOWER, W Timothy GARVEY, A Julian MU?OZ, Betty E DARNELL, Robert A OSTER, Steven D BUCHTHAL, Michael I GORAN a Bradley R NEWCOMER, 2010. Relationship between Insulin Sensitivity and Muscle Lipids may Differ with Muscle Group and Ethnicity. *Open Obes J* [online]. **2**, 137–144. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2174/1876823701002010137>
84. LAYMAN, Donald K, 2003. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr.* 1., **133**(1), 261S–267S.
85. LEAL, Jose, Alastair M GRAY a Philip M CLARKE, 2009. Development of life-expectancy tables for people with type 2 diabetes. *European heart journal* [online]. B.m.: Oxford University Press, 4., **30**(7), 834–9 [vid. 2017-01-10]. ISSN 1522-9645. Dostupné z: doi:10.1093/eurheartj/ehn567
86. LEPAGE, G a C C ROY, 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res.* 1., **27**(1), 114–120.
87. LU, Jingyi, Guoxiang XIE, Weiping JIA a Wei JIA, 2013. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids. *Front Med* [online]. 3., **7**(1), 53–59. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s11684-013-0255-5>
88. LYNCH, Christopher J a Sean H ADAMS, 2014. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature reviews. Endocrinology* [online]. B.m.: NIH Public Access, 12., **10**(12), 723–36 [vid. 2017-02-02]. ISSN 1759-5037. Dostupné z: doi:10.1038/nrendo.2014.171
89. MACOTELO, Yazmin, Brice EMANUELLI, Anneli M BÂNG, Daniel O ESPINOZA, Jeremie BOUCHER, Kirk BEEBE, Walter GALL a C Ronald KAHN, 2011. Dietary leucine--an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PLoS One* [online]. **6**(6), e21187–e21187. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021187>
90. MALENFANT, P, D R JOANISSE, R THÉRIAULT, B H GOODPASTER, D E KELLEY a J A SIMONEAU, 2001. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int J*
-

- 
- Obes Relat Metab Disord* [online]. 10., **25**(9), 1316–1321. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijo.0801733>
91. MATEJCKOVA, J, M SAMEC, M JACEK a Tuma P., 2011. HPLC Monitoring of Malondialdehyde in Patients with Endometrial and Ovarial Cancer. *Chemické Listy*. **105**, 375–380.
92. MISRA, A, S SINHA, M KUMAR, N R JAGANNATHAN a R M PANDEY, 2003. Proton magnetic resonance spectroscopy study of soleus muscle in non-obese healthy and Type 2 diabetic Asian Northern Indian males: high intramyocellular lipid content correlates with excess body fat and abdominal obesity. *Diabet Med*. 5., **20**(5), 361–367.
93. MONTGOMERY, Magdalene K a Nigel TURNER, 2015. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine connections* [online]. B.m.: European Society of Endocrinology, 3., **4**(1), R1–R15 [vid. 2017-01-26]. ISSN 2049-3614. Dostupné z: [doi:10.1530/EC-14-0092](https://doi.org/10.1530/EC-14-0092)
94. MURRAY, Robert K. (Robert Kincaid), 2012. *Harper's illustrated biochemistry*. B.m.: McGraw-Hill Medical. ISBN 007176576X.
95. NAIR, K S, P D WOOLF, S L WELLE a D E MATTHEWS, 1987. Leucine, glucose, and energy metabolism after 3 days of fasting in healthy human subjects. *The American journal of clinical nutrition* [online]. B.m.: American Society for Nutrition, 10., **46**(4), 557–62 [vid. 2017-02-28]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3661473>
96. NEIS, Evelien P J G, Cornelis H C DEJONG a Sander S RENSEN, 2015. The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients* [online]. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 16. 4., **7**(4), 2930–46 [vid. 2016-11-18]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: [doi:10.3390/nu7042930](https://doi.org/10.3390/nu7042930)
97. NEWGARD, Christopher B, Jie AN, James R BAIN, Michael J MUEHLBAUER, Robert D STEVENS, Lillian F LIEN, Andrea M HAQQ, Svati H SHAH, Michelle ARLOTTO, Cris A SLENTZ, James ROCHON, Dianne GALLUP, Olga ILKAYEVA, Brett R WENNER, Jr YANCY WILLIAM S, Howard EISENSON, Gerald MUSANTE, Richard S SURWIT, David S MILLINGTON, Mark D BUTLER a Laura P SVETKEY, 2009. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* [online]. 4., **9**(4), 311–326. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002>
98. NILSSON, Mikael, Marianne STENBERG, Anders H FRID, Jens J HOLST a Inger M E BJÖRCK, 2004. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr*. **80**(5), 1246–1253.
99. OBATA, Atsushi, Naoto KUBOTA, Tetsuya KUBOTA, Masahiko IWAMOTO, Hiroyuki SATO, Yoshitaka SAKURAI, Iseki TAKAMOTO, Hisayuki KATSUYAMA, Yoshiyuki SUZUKI, Masanori FUKAZAWA, Sachiya IKEDA, Kaito IWAYAMA, Kumpei TOKUYAMA, Kohjiro UEKI a Takashi
-

- 
- KADOWAKI, 2016. Tofogliflozin Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Accelerates Lipolysis in Adipose Tissue in Male Mice. *Endocrinology* [online]. 3., **157**(3), 1029–42 [vid. 2016-05-27]. ISSN 1945-7170. Dostupné z: doi:10.1210/en.2015-1588
100. OUELLET, Véronique, Julie MAROIS, S John WEISNAGEL a Hélène JACQUES, 2007. Dietary cod protein improves insulin sensitivity in insulin-resistant men and women: a randomized controlled trial. *Diabetes care* [online]. 11., **30**(11), 2816–21 [vid. 2016-01-22]. ISSN 1935-5548. Dostupné z: doi:10.2337/dc07-0273
101. PACINI, Giovanni a Andrea MARI, 2003. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and beta-cell function. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* [online]. 9., **17**(3), 305–22 [vid. 2016-11-29]. ISSN 1521-690X. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12962688>
102. PALMER, J P, J W BENSON, R M WALTER a J W ENSINCK, 1976. Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagon secretion in diabetic subjects. *The Journal of clinical investigation* [online]. 9., **58**(3), 565–70 [vid. 2015-12-10]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI108502
103. PATTI, Mary-Elizabeth a Silvia CORVERA, 2010. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* [online]. 6., **31**(3), 364–395. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1210/er.2009-0027>
104. PAWLAK, R, S E LESTER a T BABATUNDE, 2014. The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: a review of literature. *European journal of clinical nutrition* [online]. 5., **68**(5), 541–8 [vid. 2016-06-02]. ISSN 1476-5640. Dostupné z: doi:10.1038/ejcn.2014.46
105. PEDERSEN, Helle Krogh, Valborg GUDMUNDSDOTTIR, Henrik Bjørn NIELSEN, Tuulia HYOTYLAINEN, Trine NIELSEN, Benjamin A. H. JENSEN, Kristoffer FORSLUND, Falk HILDEBRAND, Edi PRIFTI, Gwen FALONY, Emmanuelle LE CHATELIER, Florence LEVENEZ, Joel DORÉ, Ismo MATTILA, Damian R. PLICHTA, Päivi PÖHÖ, Lars I. HELLGREN, Manimozhiyan ARUMUGAM, Shinichi SUNAGAWA, Sara VIEIRA-SILVA, Torben JØRGENSEN, Jacob Bak HOLM, Kajetan TROŠT, MetaHIT CONSORTIUM, Karsten KRISTIANSEN, Susanne BRIX, Jeroen RAES, Jun WANG, Torben HANSEN, Peer BORK, Søren BRUNAK, Matej ORESIC, S. Dusko EHRLICH a Oluf PEDERSEN, 2016. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* [online]. B.m.: Nature Research, 13. 7., **535**(7612), 376–381 [vid. 2017-02-02]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature18646
106. PEDROSO, João A B, Thais T ZAMPIERI a Jose DONATO, 2015. Reviewing the Effects of l-Leucine Supplementation in the Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Glucose Homeostasis. *Nutrients* [online]. **7**(5), 3914–3937. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.3390/nu7053914>
-

- 
107. PSALTOPOULOU, Theodora, Ioannis ILIAS a Maria ALEVIZAKI, 2010. The role of diet and lifestyle in primary, secondary, and tertiary diabetes prevention: a review of meta-analyses. *Rev Diabet Stud* [online]. 7(1), 26–35. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1900/RDS.2010.7.26>
108. RANDLE, P J, 1998. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes/metabolism reviews* [online]. 12., 14(4), 263–83 [vid. 2017-01-24]. ISSN 0742-4221. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10095997>
109. RHODES, C. J., M. F. WHITE, J. L. LEAHY a S. E. KAHN, 2013a. Direct Autocrine Action of Insulin on  $\beta$ -Cells: Does It Make Physiological Sense? *Diabetes* [online]. 1. 7., 62(7), 2157–2163 [vid. 2017-03-13]. ISSN 0012-1797. Dostupné z: [doi:10.2337/db13-0246](https://doi.org/10.2337/db13-0246)
110. RHODES, C. J., M. F. WHITE, J. L. LEAHY a S. E. KAHN, 2013b. Direct Autocrine Action of Insulin on  $\beta$ -Cells: Does It Make Physiological Sense? *Diabetes* [online]. 1. 7., 62(7), 2157–2163 [vid. 2017-03-03]. ISSN 0012-1797. Dostupné z: [doi:10.2337/db13-0246](https://doi.org/10.2337/db13-0246)
111. RITOV, Vladimir B, Elizabeth V MENSHIKOVA, Koichiro AZUMA, Richard WOOD, Frederico G S TOLEDO, Bret H GOODPASTER, Neil B RUDERMAN a David E KELLEY, 2010. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [online]. 1., 298(1), E49–E58. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00317.2009>
112. RIZZA, Robert A, 2010. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes* [online]. B.m.: American Diabetes Association, 11., 59(11), 2697–707 [vid. 2016-11-29]. ISSN 1939-327X. Dostupné z: [doi:10.2337/db10-1032](https://doi.org/10.2337/db10-1032)
113. RIZZO, Nico S, Karen JACELDO-SIEGL, Joan SABATE a Gary E FRASER, 2013. Nutrient profiles of vegetarian and nonvegetarian dietary patterns. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* [online]. 12., 113(12), 1610–9 [vid. 2016-01-16]. ISSN 2212-2672. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jand.2013.06.349](https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.06.349)
114. ROBINSON, Matthew M, Mattias SOOP, Tae Seo SOHN, Dawn M MORSE, Jill M SCHIMKE, Katherine A KLAUS a K Sreekumaran NAIR, 2014. High insulin combined with essential amino acids stimulates skeletal muscle mitochondrial protein synthesis while decreasing insulin sensitivity in healthy humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [online]. 12., 99(12), E2574-83 [vid. 2016-05-27]. ISSN 1945-7197. Dostupné z: [doi:10.1210/jc.2014-2736](https://doi.org/10.1210/jc.2014-2736)
115. RODEN, M, T B PRICE, G PERSEGHIN, K F PETERSEN, D L ROTHMAN, G W CLINE a G I SHULMAN, 1996. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *The Journal of clinical investigation* [online]. B.m.: American Society for Clinical Investigation, 15. 6., 97(12), 2859–65 [vid. 2016-11-29]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: [doi:10.1172/JCI118742](https://doi.org/10.1172/JCI118742)
-

- 
116. RODRÍGUEZ-PALMERO, M, M C LOPEZ-SABATER, A I CASTELLOTE-BARGALLO, M C DE LA TORRE-BORONAT a M RIVERO-URGELL, 1998. Comparison of two methods for the determination of fatty acid profiles in plasma and erythrocytes. *J Chromatogr A*. 1., **793**(2), 435–440.
117. ROSELL, Magdalena S, Zouë LLOYD-WRIGHT, Paul N APPLEBY, Thomas A B SANDERS, Naomi E ALLEN a Timothy J KEY, 2005. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in plasma in British meat-eating, vegetarian, and vegan men. *The American journal of clinical nutrition* [online]. 8., **82**(2), 327–34 [vid. 2016-12-08]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087975>
118. SAMOCHA-BONET, Dorit, Lesley V. CAMPBELL, Trevor A. MORI, Kevin D. CROFT, Jerry R. GREENFIELD, Nigel TURNER a Leonie K. HEILBRONN, 2012. Overfeeding Reduces Insulin Sensitivity and Increases Oxidative Stress, without Altering Markers of Mitochondrial Content and Function in Humans. *PLoS ONE* [online]. 7. 5., **7**(5), e36320 [vid. 2017-01-31]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0036320](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036320)
119. SARPARANTA, Jaakko, Marina GARCÍA-MACIA a Rajat SINGH, 2016. Autophagy and mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Current diabetes reviews* [online]. 17. 2. [vid. 2017-01-31]. ISSN 1875-6417. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26900135>
120. SHIMOMURA, Yoshiharu, Taro MURAKAMI, Naoya NAKAI, Masaru NAGASAKI a Robert A HARRIS, 2004. Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J Nutr*. 6., **134**(6 Suppl), 1583S–1587S.
121. SHULMAN, G I, 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* [online]. 7., **106**(2), 171–176. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI10583>
122. SINHA, Ranjana, Sylvie DUFOUR, Kitt Falk PETERSEN, Vincent LEBON, Staffan ENOKSSON, Yong-Zhan MA, Mary SAVOYE, Douglas L ROTHMAN, Gerald I SHULMAN a Sonia CAPRIO, 2002. Assessment of skeletal muscle triglyceride content by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes*. 4., **51**(4), 1022–1027.
123. SOLERTE, Sebastiano B, Marisa FIORAVANTI, Eleonora LOCATELLI, Roberto BONACASA, Mauro ZAMBONI, Cristina BASSO, Anna MAZZOLENI, Valeria MANSI, Nikolas GEROUTIS a Carmine GAZZARUSO, 2008. Improvement of blood glucose control and insulin sensitivity during a long-term (60 weeks) randomized study with amino acid dietary supplements in elderly subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* [online]. 6., **101**(11A), 82E–88E. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.03.006>
124. SOUCI, S. W., W. FACHMANN a H. KRAUT, 2000. Food composition and nutrition tables. [online]. B.m.: Medpharm GmbH Scientific Publishers, (Ed.6) [vid. 2016-01-20]. Dostupné z: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20001418574.html;jsessionid=46277F47F16A2E0B8F137D24E5143C20>
-

- 
125. SPENCER, E A, P N APPLEBY, G K DAVEY a T J KEY, 2003. Diet and body mass index in 38000 EPIC-Oxford meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* [online]. 6., **27**(6), 728–34 [vid. 2015-12-24]. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ijo.0802300
126. SPENCER, Elizabeth A, Paul N APPLEBY, Gwyneth K DAVEY a Timothy J KEY, 2002. Validity of self-reported height and weight in 4808 EPIC-Oxford participants. *Public health nutrition* [online]. 8., **5**(4), 561–5 [vid. 2016-01-22]. ISSN 1368-9800. Dostupné z: doi:10.1079/PHN2001322
127. SPINAZZI, Marco, Alberto CASARIN, Vanessa PERTEGATO, Leonardo SALVIATI a Corrado ANGELINI, 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature protocols* [online]. 6., **7**(6), 1235–46 [vid. 2016-01-19]. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2012.058
128. STEINBRECHER, A, E ERBER, A GRANDINETTI, L N KOLONEL a G MASKARINEC, 2011. Meat consumption and risk of type 2 diabetes: the Multiethnic Cohort. *Public Health Nutr* [online]. 4., **14**(4), 568–574. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1017/S1368980010002004>
129. TAKESHITA, Yumie, Toshinari TAKAMURA, Yuki KITA, Hitoshi ANDO, Teruyuki UEDA, Kenichiro KATO, Hirofumi MISU, Hajime SUNAGOZAKA, Yoshio SAKAI, Tatsuya YAMASHITA, Eishiro MIZUKOSHI, Masao HONDA a Shuichi KANEKO, 2012. Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. *Metabolism: clinical and experimental* [online]. 10., **61**(10), 1388–94 [vid. 2016-01-22]. ISSN 1532-8600. Dostupné z: doi:10.1016/j.metabol.2012.03.011
130. THAMER, Claus, Jürgen MACHANN, Oliver BACHMANN, Michael HAAP, Dominik DAHL, Beate WIETEK, Otto TSCHRITTER, Andreas NIESS, Klaus BRECHTEL, Andreas FRITSCHKE, Claus CLAUSSEN, Stephan JACOB, Fritz SCHICK, Hans-Ulrich HÄRING a Michael STUMVOLL, 2003. Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 4., **88**(4), 1785–1791.
131. THORENS, Bernard a Mike MUECKLER, 2010. Glucose transporters in the 21st Century. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* [online]. B.m.: American Physiological Society, 2., **298**(2), E141-5 [vid. 2017-01-19]. ISSN 1522-1555. Dostupné z: doi:10.1152/ajpendo.00712.2009
132. TIMMERMAN, Kyle L., Jessica L. LEE, Hans C. DREYER, Shaheen DHANANI, Erin L. GLYNN, Christopher S. FRY, Micah J. DRUMMOND, Melinda SHEFFIELD-MOORE, Blake B. RASMUSSEN a Elena VOLPI, 2010. Insulin Stimulates Human Skeletal Muscle Protein Synthesis via an Indirect Mechanism Involving Endothelial-Dependent Vasodilation and Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Signaling. *The Journal of Clinical Endocrinology*
-



- 
- & *Metabolism* [online]. 8., **95**(8), 3848–3857 [vid. 2017-01-19]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2009-2696
133. TONSTAD, S, K STEWART, K ODA, M BATECH, R P HERRING a G E FRASER, 2011. Vegetarian diets and incidence of diabetes in the Adventist Health Study-2. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [online]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2011.07.004>
134. TONSTAD, Serena, Terry BUTLER, Ru YAN a Gary E FRASER, 2009. Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* [online]. 5., **32**(5), 791–796. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2337/dc08-1886>
135. TRAPP, Caroline B a Neal D BARNARD, 2010. Usefulness of vegetarian and vegan diets for treating type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* [online]. 4., **10**(2), 152–158. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-010-0093-7>
136. TREMBLAY, Frédéric, Michael KREBS, Luce DOMBROWSKI, Attila BREHM, Elisabeth BERNROIDER, Erich ROTH, Peter NOWOTNY, Werner WALDHÄUSL, André MARETTE a Michael RODEN, 2005. Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Diabetes* [online]. 9., **54**(9), 2674–84 [vid. 2016-05-27]. ISSN 0012-1797. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123357>
137. TŮMA, Petr, Klára MÁLKOVÁ, Eva SAMCOVÁ a Karel STULÍK, 2010. Rapid monitoring of arrays of amino acids in clinical samples using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Sep Sci* [online]. 8., **33**(16), 2394–2401. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000137>
138. TUMOVA, J, M ANDEL a J TRNKA, 2015. Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* [online]. 8. 10. [vid. 2016-05-27]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26447514>
139. TURNER, N., G. J. COONEY, E. W. KRAEGER a C. R. BRUCE, 2014. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *Journal of Endocrinology* [online]. 15. 1., **220**(2), T61–T79 [vid. 2017-01-27]. ISSN 0022-0795. Dostupné z: doi:10.1530/JOE-13-0397
140. TURNER, Nigel, 2013. Mitochondrial Metabolism and Insulin Action. In: *Type 2 Diabetes* [online]. B.m.: InTech [vid. 2017-01-18]. Dostupné z: doi:10.5772/56449
141. UENO, M, J B C CARVALHEIRA, R C TAMBASCIA, R M N BEZERRA, M E AMARAL, E M CARNEIRO, F FOLLI, K G FRANCHINI a M J A SAAD, 2005. Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia* [online]. 3., **48**(3), 506–518. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-004-1662-6>
142. UNGER, Roger H, 1971. Glucagon and the Insulin:Glucagon Ratio in Diabetes and Other Catabolic Illnesses. *Diabetes*. **20**(12).
-

- 
143. VALACHOVICOVÁ, Martina, Marica KRAJCOVICOVÁ-KUDLÁCKOVÁ, Pavel BLAŽÍČEK a Katarína BABINSKÁ, 2006. No evidence of insulin resistance in normal weight vegetarians. A case control study. *Eur J Nutr* [online]. 2., **45**(1), 52–54. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-005-0563-x>
144. VAN DER VUSSE, Ger J. a Robert S. RENEMAN, 2011. Lipid Metabolism in Muscle. In: *Comprehensive Physiology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. [vid. 2017-01-19]. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.cp120121
145. VAN LOON, L J, W H SARIS, H VERHAGEN a A J WAGENMAKERS, 2000. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr.* 7., **72**(1), 96–105.
146. VAN LOON, Luc J. C., René KOOPMAN, Ralph MANDERS, Walter VAN DER WEEGEN, Gerrit P. VAN KRANENBURG a Hans A. KEIZER, 2004. Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.* **287**(3).
147. VAN LOON, Luc J C, Margriet KRUIJSHOOP, Paul P C A MENHEERE, Anton J M WAGENMAKERS, Wim H M SARIS a Hans A KEIZER, 2003. Amino acid ingestion strongly enhances insulin secretion in patients with long-term type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 3., **26**(3), 625–630.
148. VESSBY, B, M UUSITUPA, K HERMANSEN, G RICCARDI, A A RIVELLESE, L C TAPSELL, C NÄLSÉN, L BERGLUND, A LOUHERANTA, B M RASMUSSEN, G D CALVERT, A MAFFETONE, E PEDERSEN, I B GUSTAFSSON a L H STORLIEN, 2001. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia.* 3., **44**(3), 312–319.
149. VONDRA, Karel, 1988. Možnosti využití svalové biopie v metabolickém výkumu. *Vnitřní lékařství* 34. **7**, 714–719.
150. WAHREN, J, P FELIG a L HAGENFELDT, 1976. Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and in patients with diabetes mellitus. *J Clin Invest* [online]. 4., **57**(4), 987–999. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI108375>
151. WANG, Thomas J, Martin G LARSON, Ramachandran S VASAN, Susan CHENG, Eugene P RHEE, Elizabeth MCCABE, Gregory D LEWIS, Caroline S FOX, Paul F JACQUES, Céline FERNANDEZ, Christopher J O'DONNELL, Stephen A CARR, Vamsi K MOOTHA, Jose C FLOREZ, Amanda SOUZA, Olle MELANDER, Clary B CLISH a Robert E GERSZTEN, 2011. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* [online]. 4., **17**(4), 448–453. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2307>
152. WEISS, Ram, Sylvie DUFOUR, Aida GROSZMANN, Kitt PETERSEN, James DZIURA, Sara E TAKSALI, Gerald SHULMAN a Sonia CAPRIO, 2003. Low adiponectin levels in adolescent obesity: a marker of increased intramyocellular lipid accumulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 5., **88**(5), 2014–2018.
-

- 
153. WEYER, C, C BOGARDUS, D M MOTT a R E PRATLEY, 1999. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* [online]. B.m.: American Society for Clinical Investigation, 9., **104**(6), 787–94 [vid. 2017-01-18]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI7231
154. WHITE, Morris F., Dominic J. WITHERS, Julio Sanchez GUTIERREZ, Heather TOWERLY, Deborah J. BURKS, Jian-Ming REN, Stephen PREVIS, Yitao ZHANG, Dolores BERNAL, Sebastian PONS, Gerald I. SHULMAN a Susan BONNER-WEIR, 1998. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* [online]. 26. 2., **391**(6670), 900–904 [vid. 2017-03-03]. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/36116
155. WILLIAMSON, J R a H A KREBS, 1961. Acetoacetate as fuel of respiration in the perfused rat heart. *The Biochemical journal* [online]. B.m.: Portland Press Ltd, 9., **80**(3), 540–7 [vid. 2017-01-24]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13785549>
156. YAMADA, T, T IDA, Y YAMAOKA, K OZAWA, H TAKASAN a I HONJO, 1975. Two distinct patterns of glucose intolerance in icteric rats and rabbits. Relationship to impaired liver mitochondria function. *The Journal of laboratory and clinical medicine* [online]. 7., **86**(1), 38–45 [vid. 2017-01-26]. ISSN 0022-2143. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1151141>
157. YANG, Jichun, Yujing CHI, Brant R BURKHARDT, Youfei GUAN a Bryan A WOLF, 2010. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev* [online]. 5., **68**(5), 270–279. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00282.x>
158. YANG, Jichun, Ryan K WONG, MieJung PARK, Jianmei WU, Joshua R COOK, David A YORK, Shaoping DENG, James MARKMANN, Ali NAJI, Bryan A WOLF a Zhiyong GAO, 2006. Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 1., **55**(1), 193–201.
159. YANG, Shu-Yu, Xue-Jun LI, Wei ZHANG, Chang-Qin LIU, Hui-Jie ZHANG, Jin-Rong LIN, Bing YAN, Ya-Xin YU, Xiu-Lin SHI, Can-Dong LI a Wei-Hua LI, 2012. Chinese lacto-vegetarian diet exerts favorable effects on metabolic parameters, intima-media thickness, and cardiovascular risks in healthy men. *Nutr Clin Pract* [online]. 6., **27**(3), 392–398. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1177/0884533611436173>
160. ZAMPIERI, Thais T., João A. B. PEDROSO, Isadora C. FURIGO, Julio TIRAPÉGUI, Jose DONATO, MG Myers JR., et al., 2013. Oral Leucine Supplementation Is Sensed by the Brain but neither Reduces Food Intake nor Induces an Anorectic Pattern of Gene Expression in the Hypothalamus. *PLoS ONE* [online]. B.m.: Public Library of Science, 13. 12., **8**(12), e84094 [vid. 2017-01-15]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0084094
-

- 
161. ZIMMET, P, K G ALBERTI a J SHAW, 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* [online]. 12., **414**(6865), 782–787. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/414782a>
162. ZVOLSKY, Miroslav, 2015. Činnost oboru diabetologie, péče o diabetiky v roce 2013. *ÚZIS* [online] [vid. 2017-01-03]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/cinnost-oboru-diabetologie-pece-diabetiky-roce-2013>

---

## Publikace, prezentace a vědecká ocenění výstupů řešení disertace

### Originální články s faktorem impaktu

1. GOJDA, J, L ROSSMEISLOVÁ, R STRAKOVÁ, J TŮMOVÁ, M ELKALAF, M JAČEK, P TŮMA, J POTOČKOVÁ, E KRAUZOVÁ, P WALDAUF, J TRNKA, V ŠTICH a M ANDĚL, 2017. Chronic dietary exposure to branched chain amino acids impairs glucose disposal in vegans but not in omnivores. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 1. 2. [vid. 2017-03-21]. ISSN 0954-3007. Dostupné z: doi:10.1038/ejcn.2016.274. Impact Factor 2.935 = *Příloha 1*
2. GOJDA, J, J PATKOVÁ, M JAČEK, J POTOČKOVÁ, J TRNKA, P KRAML a M ANDĚL, 2013. Higher insulin sensitivity in vegans is not associated with higher mitochondrial density. *European journal of clinical nutrition* [online]. (September), 1–6. ISSN 1476-5640. Dostupné z: doi:10.1038/ejcn.2013.202. Impact Factor 2.935 = *Příloha 2*
3. TUMA, P. a J. GOJDA, 2015. Rapid determination of branched chain amino acids in human blood plasma by pressure-assisted capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* [online]. **36**(16). ISSN 15222683 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201400585. Impact factor 3.028 = *Příloha 3*

### Originální články v periodících bez faktoru impaktu

1. GOJDA, J., L. ROSSMEISSLOVÁ, J. TŮMOVÁ, A. KRAJČOVÁ, M. ELKALAF, J. ŽIAK, M. JAČEK, K. BALUŠÍKOVÁ, F. DUŠKA, J. TRNKA a M. ANDĚL, 2015. Role of percutaneous biopsy of skeletal muscle in diabetes research. Methodological summary | Postavení perkutánní biopsie kosterního svalu v diabetologickém výzkumu. Metodologický přehled. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Vyziva*. **18**(4). ISSN 12126853 12119326. = *Příloha 4*
2. GOJDA, J., J. TRNKA a M. ANDĚL, 2011. Cellular mechanisms of muscle atrophy | Buněčné mechanizmy svalové atrofie. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Vyziva*. **14**(3). ISSN 12119326 12126853. = *Příloha 5*

---

**Prezentace výsledků na mezinárodních konferencích s uvedením abstraktu v recenzovaných sbornících:**

1. GOJDA, J., R. STRAKOVA, L. ROSSMEISLOVA, J. TUMOVA, M. ELKALAF, M. JACEK, P. TUMA, J. POTOCKOVA, J. TRNKA, V. STICH a M. ANDEL, 2015b. OR013: Chronic Dietary Exposure to Branched Chain AMINO ACIDS Causes Impaired Glucose Disposal and Higher Adipose Tissue Lipogenesis. *Clinical Nutrition* [online]. B.m.: Elsevier, 9., **34**, S5 [vid. 2017-03-24]. ISSN 02615614. Dostupné z: doi:10.1016/S0261-5614(15)30110-2

**Prezentace výsledků na národních konferencích s uvedením abstraktu v nerecenzovaném sborníku:**

1. GOJDA, J., J. PATKOVÁ, M. JAČEK, J. MATĚJKOVÁ, P. TŮMA, J. TRNKA, M. ANDĚL, 2013. Vegani mají vyšší citlivost na inzulín a srovnatelné množství intramyocelulárních lipidů a mitochondriální aerobní kapacity než omnivoři. 49. Diabetologické dny, Luhačovice. Ústní sdělení.
2. GOJDA J., K. BALUŠÍKOVÁ, J. POTOČKOVÁ, J. KOVÁŘ, M. ANDĚL, 2014: Vegani mají nižší hladiny hepcidinu a prohepcidinu než omnivoři. 50. Diabetologické dny, Luhačovice. Ústní sdělení.
3. TŮMA, P. and j. GOJDA, J. 2015. On-line Sample Manipulation in Capillary During Electrophoretic Separation. XXXV. Moderní elektrochemické Metody. Jetřichovice.

**Vědecká ocenění výsledků řešení**

Travel Grant ESPEN, ústní sdělení na kongresu ESPEN 2015:

GOJDA, J., R. STRAKOVA, L. ROSSMEISLOVA, J. TUMOVA, M. ELKALAF, M. JACEK, P. TUMA, J. POTOCKOVA, J. TRNKA, V. STICH a M. ANDEL, 2015b. OR013: Chronic Dietary Exposure to Branched Chain AMINO ACIDS Causes Impaired Glucose Disposal and Higher Adipose Tissue Lipogenesis. *Clinical Nutrition* [online]. B.m.: Elsevier, 9., **34**, S5 [vid. 2017-03-24]. ISSN 02615614. Dostupné z: doi:10.1016/S0261-5614(15)30110-2

---

## Publikační aktivita autora bez vztahu k tématu disertace

### Originální články s faktorem impaktu

1. GOJDA, Jan a Jan BARTONÍČEK, 2012. The retinacula of Weitbrecht in the adult hip. *Surgical and radiologic anatomy : SRA* [online]. **34**(1), 31–8. ISSN 1279-8517. Dostupné z: doi:10.1007/s00276-011-0829-3. Impact factor=1,195
2. JIROUTKOVÁ, K., A. KRAJČOVÁ, J. ZIAK, M. FRIC, P. WALDAUF, V. DŽUPA, J. GOJDA, V. NĚMCOVA-FÜRSTOVÁ, J. KOVÁŘ, M. ELKALAF, J. TRNKA a F. DUŠKA, 2015. Mitochondrial function in skeletal muscle of patients with protracted critical illness and ICU-acquired weakness. *Critical Care* [online]. **19**(1). ISSN 1466609X 13648535. Dostupné z: doi:10.1186/s13054-015-1160-x. Impact factor = 7,44
3. JIROUTKOVÁ, Kateřina, Adéla KRAJČOVÁ, Jakub ŽIAK, Michal FRIC, Jan GOJDA, Valér DŽUPA, Martin KALOUS, Jana TŮMOVÁ, Jan TRNKA a František DUŠKA, 2016. Mitochondrial Function in an In Vitro Model of Skeletal Muscle of Patients With Protracted Critical Illness and Intensive Care Unit–Acquired Weakness. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* [online]. B.m.: SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 29. 6., 14860711665764 [vid. 2017-03-24]. ISSN 0148-6071. Dostupné z: doi:10.1177/0148607116657649. Impact factor = 3,151

### Originální články v periodících bez faktoru impaktu

1. GOJDA, J.: Úbytek svalové hmoty - kachexie vs. sarkopenie: komentovaný překlad. DMEV, 2011, ann. 14 (2), p. 97-98.
2. GOJDA, J., J. ŠVANDA, P., TĚŠÍNSKÝ, M. ANDĚL: Hypoglykemie asociovaná s léčbou Olanzapinem u nediabetického pacienta. DMEV, 2014, ann. 17 (1): 22-23.
3. STRAKOVÁ, R.; L. VEČEŘOVÁ; J. GOJDA; P. KRAML; M. ANDĚL: Steatóza pankreatu a její vztah k diabetu. DMEV, 2016, ann. 18 (4): 178-186.

---

**Prezentace výsledků na mezinárodních konferencích s uvedením abstraktu v recenzovaných sbornících:**

1. GOJDA, J.; R. STRAKOVÁ; A. HAVLOVÁ, J. POTOČKOVÁ; P. TŮMA; M. ANDĚL, 2015. Incretin effects of branched-chain amino acids. EASD 2015 congress in Stockholm. Oral presentation.
2. PÁV, M., M. HOLLÝ, M. CENDELÍNOVÁ, J. GOJDA a J. POLÁK, 2016. SOMA Score, cardiovascular risk screening tool for psychiatric patients. *European Psychiatry* [online]. 3., **33**, S284–S285 [vid. 2017-03-24]. ISSN 09249338. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpsy.2016.01.763

**Prezentace výsledků na národních konferencích s uvedením abstraktu v nerecenzovaném sborníku:**

1. GOJDA, J.; A. JIRKA. 2012. Influence of psychiatric medication on nutritional status. Congress of Czech Society for clinical nutrition and intensive metabolic care. Ústní sdělení.
2. GOJDA, J., V. ŠMEJKALOVÁ, J. STRENKOVÁ, A. JIRKA, P. TĚŠÍNSKÝ. 2013. Home parenteral nutrition registry. Congress of Czech Society for clinical nutrition and intensive metabolic care. Ústní sdělení.
3. GOJDA, J., V. ŠMEJKALOVÁ, 2013. Nutritional intervention in diabetic foot syndrome. Congress of Czech Society for clinical nutrition and intensive metabolic care, 2013. Ústní sdělení.
4. GOJDA, J., J. STRENKOVÁ, P. TĚŠÍNSKÝ, J. ŠVANDA. 2014. Palliative home parenteral nutrition, data from national registry. Congress of Czech Society for clinical nutrition and intensive metabolic care, 2014. Ústní sdělení.
5. GOJDA, J., J. STRENKOVÁ, P. TĚŠÍNSKÝ, 2014. Palliative domestic parenteral nutrition in the Czech Republic. Congress of Czech Society for clinical nutrition and intensive metabolic care. Ústní sdělení.



---

## Seznam příloh

Příloha 1: Originální článek Eur J Clin Nutr

Příloha 2: Originální článek Eur J Clin Nutr

Příloha 3: Originální článek Electrophoresis

Příloha 4. Originální článek DMEV

Příloha 5. Originální článek DMEV