

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Małgorzata Kieć-Klimczak

Doustne testy tolerancji lipidów i glukozy, a wydzielanie inkretyn
(GLP-1 i GIP) u pacjentów z zespołem metabolicznym o różnym
genotypie TCF7L2.

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. med. Alicja Hubalewska-Dydejczyk, Prof. UJ

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Endokrynologii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik: Dr hab. med. Alicja Hubalewska-Dydejczyk, Prof. UJ
we współpracy z
Katedrą Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik: Prof. dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć

Kraków, rok 2011

Pragnę wyrazić podziękowania

*Mojemu Promotorowi,
Szanownej Pani Profesor dr hab. Alicji Hubalewskiej-Dydejczyk za wielką życzliwość,
mobilizację oraz okazaną pomoc merytoryczną w trakcie realizacji przewodu i dysertacji
doktorskiej.*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Biochemii Klinicznej oraz z Katedry i Kliniki
Endokrynologii UJCM za pomoc w realizacji, wsparcie i okazaną przychylność.*

1 Spis treści

1	SPIS TREŚCI	3
2	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
3	WSTĘP	8
3.1	ZESPÓŁ METABOLICZNY	8
3.1.1	<i>Historia definicji</i>	8
3.1.2	<i>Aktualnie stosowane definicje</i>	9
3.1.3	<i>Epidemiologia</i>	13
3.1.4	<i>Patofizjologia</i>	13
3.2	WYBRANE HORMONY TKANKI TŁUSZCZOWEJ BIORĄCE UDZIAŁ W REGULACJI RÓWNOWAGI ENERGETYCZNEJ	20
3.2.1	<i>Leptyna</i>	21
3.2.2	<i>Adiponektyna</i>	22
3.2.3	<i>Wisfatyna</i>	24
3.3	INKRETYNY	25
3.3.1	<i>Wstęp</i>	25
3.3.2	<i>Rys historyczny</i>	25
3.3.3	<i>Glukozozależny polipeptyd insulinotropowy</i>	27
3.3.4	<i>Glukagonopodobny peptyd typu 1</i>	33
3.4	BADANE W NINIEJSZEJ PRACY POLIMORFIZMY I ICH ZNACZENIE W ROZWOJU OTYŁOŚCI ORAZ CUKRZYCY TYPU 2.	43
3.4.1	<i>POLIMORFIZMY GENU TCF7L2</i>	45
3.4.2	<i>RECEPTORY JĄDROWE AKTYWOWANE PRZEZ PROLIFERATORY PEROKSYSOMÓW (PPAR)</i>	47
4	CELE PRACY	50
5	MATERIAŁ I METODY	51
5.1	BADANA GRUPA	51
5.2	PROTOKÓŁ BADANIA	52
5.2.1	<i>Badania antropometryczne</i>	52
5.2.2	<i>Pomiar zawartości tkanki tłuszczowej</i>	53
5.2.3	<i>Pomiar ciśnienia tętniczego</i>	53
5.2.4	<i>Testy biochemiczne</i>	53
5.3	PROCEDURY OZNACZEŃ BIOCHEMICZNYCH	55
5.4	BADANIA GENETYCZNE	61
5.4.1	<i>Badanie polimorfizmu czynnika transkrypcyjnego (transcription factor-7-like 2) rs7903146 genu TCF7L2 oraz polimorfizmu C→G w kodonie 12 w eksonie 1 (Pro12→Ala) genu PPARγ (rs 1801282).</i>	61
5.5	ANALIZA STATYSTYCZNA	65
6	WYNIKI	66
6.1	CHARAKTERYSTYKA BADANYCH GRUP	66
6.1.1	<i>Grupa badana (MS) vs grupa kontrolna (C)</i>	66
6.1.2	<i>Porównanie grup z uwzględnieniem płci (mężczyźni (M) vs kobiety (K))</i>	76

6.1.3	Porównanie wyników w obu grupach badanych – MS i C z uwzględnieniem podziału na płeć	83
6.2	KORELACJE MIĘDZY WYBRANYMI PARAMETRAMI	101
6.2.1	Charakterystyka grupy badanej – wskaźnik BMI, a pozostałe markery zespołu metabolicznego	101
6.2.2	Wartości badanych wskaźników zespołu metabolicznego, a uwalnianie GLP i GLP-1	102
6.2.3	Poziom GLP i GLP-1 na czczo, a poziom wskaźników gospodarki węglowodanowej	106
6.2.4	Poziom GLP i GLP-1 na czczo, a stężenie wskaźników gospodarki lipidowej	107
6.2.5	Próby czynnościowe – gospodarka węglowodanowa. Uwalnianie inkretyn, a poziom glukozy i insuliny w poszczególnych punktach czasowych DTTG	107
6.2.6	Próby czynnościowe – gospodarka lipidowa. Uwalnianie inkretyn, a poziom FFA i TG w poszczególnych punktach czasowych DTTL	109
6.3	PORÓWNANIE WPŁYWU GLUKOZY I FFA NA UWALNIANIE INKRETYN PODCZAS TESTÓW FUNKCJONALNYCH (DTTG A DTTL)	110
6.4	BADANIA GENETYCZNE	112
6.4.1	Częstość występowania badanych genotypów i alleli	112
6.4.2	Porównanie przebiegu obu testów – DTTG oraz DTTL, w zależności od genotypu genów TCF7L2 i PPAR γ 2.	114
6.4.3	Porównanie nosicieli tych samych genotypów dwóch badanych genów między grupami MS i C w obu funkcjonalnych testach – DTTG oraz DTTL.	124
6.5	PODSUMOWANIE OTRZYMANYCH WYNIKÓW	140
6.6	UWAGI KRYTYCZNE DOTYCZĄCE WYKONANYCH BADAŃ	147
7	DYSKUSJA I OMÓWIENIE WYNIKÓW	148
7.1	FUNKCJONALNE TESTY (DTTG VS DTTL), A UWALNIANIE INKRETYN	148
7.1.1	Dobór badanych grup i testów czynnościowych	148
7.1.2	Stężenia inkretyn na czczo	149
7.1.3	Uwalnianie inkretyn w testach czynnościowych (DTTG vs DTTL)	152
7.2	ADIPOKINY – HORMONY TKANKI TŁUSZCZOWEJ, A WYDZIELANIE INKRETYN	157
7.3	POLIMORFIZMY BADANYCH GENÓW, A WYDZIELANIE INKRETYN	158
7.3.1	Polimorfizm genu TCF7L2 rs7903146 C/T	160
7.3.2	Polimorfizm genu PPAR γ rs1801282 C/G	163
8	WNIOSKI KOŃCOWE	167
9	STRESZCZENIE	169
10	SPIS RYCIN, TABEL I WYKRESÓW	179
10.1	SPIS RYCIN	179
10.2	SPIS TABEL	180
10.3	SPIS WYKRESÓW	183
11	PIŚMIENNICTWO	184

2 Wykaz stosowanych skrótów

ADA - *America Diabetes Association* - Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego

AdipoQ - Adiponektyna

AHA/NHLBI - *American Heart Association / National Heart, Lung and Blood Institute*

ATGL - *adipose triglyceride lipase* - lipazę triglicerydów

AUC - *area under the curve* - pole pod krzywą

BAT – *brown adipose tissue* – biała tkanka tłuszczowa

BMI - *body mass index* - wskaźnik masy ciała

β -kat - β -katenina

C - grupa kontrolna

CETP - *cholesteryl ester transfer protein* – białko wymiennikowe estrów cholesterolu między lipoproteinami

CRP - *C-reactive Protein* – białko C-reaktywne

CSN – centralny system nerwowy

DPP-4 – *Dipeptidyl Peptidase-4* – dipeptydylopeptydaza 4

DTTG - doustny test tolerancji glukozy

DTTL - doustny test tolerancji lipidów

Dv1 - *Dishevelled protein*

EPIC-NL-prevalent DM - European Prospective Investigation into Cancer and nutrition NL-prevalent Diabetes Mellitus)

ER - *endoplasmic reticulum* – siateczka endoplazmatyczna

ER-stress - szok siateczki endoplazmatycznej

FFA - *free fatty acids* - wolne kwasy tłuszczowe

GIP - *glucose-dependent insulintropic polypeptide* - glukozozależny polipeptyd insulintropowy

GIPR - receptor GIP

GLP-1 - *glucagon-like peptide-1* - glukagonopodobny peptyd typu 1

GLP-2 - *glucagon-like peptide-2* - glukagonopodobny peptyd typu 2

GLP-1R – receptor GLP-1

GRPP - *glicentin-related pancreatic peptide* – glicentyno zależny polipeptyd trzustkowy

GSK-3 - *glycogen synthase kinase 3* - kinaza syntazy glikogenu 3

GWA - *genome wide association study* - badania asocjacyjne genomu ludzi

HDL - *high density lipoprotein* - lipoproteiny o wysokiej gęstości

HGO - *hepatic glucose output* - wyrzut glukozy z wątroby

HOMA-IR - *homeostasis model assessment of insulin resistance* - model oceny insulinooporności

HSL - *hormone sensitive lipase* - wrażliwa na czynniki hormonalne lipaza diglicerydów

HSP – *heat shock proteins* – białka szoku cieplnego

IDF – *International Diabetes Federation*

IDL - *Intermediate Density Lipoprotein* – lipoproteina o pośredniej gęstości

IL-6 - interleukina 6

IP-1; IP-2 - *intervening peptide-1&2* – białko pośrednie 1 & 2

IR – *insulin resistance* - insulinooporność

IRS-1, 2 - *insulin receptor substrate 1, 2* - białko składowe receptora insulinowego

JNK - kinaza N-końca białka c-Jun

K - grupa kobiet

LD - *lipid droplets*- krople lipidowe

LDL - *low density lipoprotein* - lipoproteiny o niskiej gęstości

LEF-1 - *lymphoid enhancer-binding factor*

Lep - leptyna

M - grupa mężczyzn

MAPK - *mitogen-activated protein kinase* - kinaza białkowa aktywowana mitogenami

MGL - *monoglyceride lipase* - lipaza monoglicerydów

MS – zespół metaboliczny; grupa pacjentów z zespołem metabolicznym

MUFA - *monounsaturated fatty acids* - jednonienasycone kwasy tłuszczowe

NAG - N-acetyloglukozamina

NAFLD- *non-alcoholic fatty liver disease* - niealkoholowe stłuszczenie wątroby

NCEP ATP - *National Cholesterol Education Program, the Adult Treatment Panel III* (wg. *American Heart Association*)

NF-κB - jądrowy czynnik kappa B

NO – tlenek azotu

NPY - *neuronal peptide Y* – neuropeptyd Y

NYHA - *New York Heart Association* - skala ciężkości objawów niewydolności serca wg. Amerykańskiego Towarzystwa Kardiologicznego

OGTT– *oral glucose tolerance test* – doustny test tolerancji glukozy

OLTT – *oral lipid tolerance test* – doustny test tolerancji lipidów

OXM – oksyntomodulina

OXPHOS – proces oksydatywnej fosforylacji

PAI-1 - *Plasminogen Activator Inhibitor* - inhibitor aktywatora plazminogenu

PBEF - *pre-B-cell colony enhancing factor* - czynnik wzrostu stymulujący różnicowanie się kolonii komórek pre-B

PCR - *polymerase chain reaction* - reakcja łańcuchowa polimerazy

PI-3K - *phosphoinositide 3-kinase* – 3-kinaza fosfatydoinozytolu

PKA – *protein kinase A* – kinaza białkowa A

PKB – *protein kinase B* – kinaza białkowa B

PLTP- *phospholipid transfer protein*- białko wymiennikowe fosfolipidów między lipoprotein

PPAR - *peroxisome proliferator-activated receptor* - receptory jądrowe aktywowane przez proliferatory peroksysomów

PUFA - *polyunsaturated fatty acids* - wielonienasycone kwasy tłuszczowe

pz - par zasad

RAAS - *renin-angiotensin-aldosterone system* – układ renina-angiotensyna-aldosteron

RFLP - *restricted fragment length polymorphism* - polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych

ROS - *radical oxygen species* - wolne rodniki tlenowe

SD - odchylenie standardowe

SFA - *saturated fatty acids* - nasycone kwasy tłuszczowe

SNP - *single-nucleotide polymorphism* – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SRS - *Somatostatin Receptor Scintigraphy* - somatostatynowa scyntygrafia receptorowa

Tch - *Total cholesterol* - cholesterol całkowity

TCF - *T cell factor* - czynnik limfocytów T

TCF7L2 - *(T-cell) transcription factor 7 – like 2* - czynnik transkrypcyjny 7 - like 2

TRL - *Triglyceride-Rich Lipoproteins* – lipoproteiny bogate w TG

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor* – czynnik martwicy nowotworów

UCP - *uncoupling proteins* - białka rozprzegające błonę mitochondrialną

UKPDS - *United Kingdom Prospective Diabetes Study* – Projekt: badania prospektywne w cukrzycy (Anglia)

VLDL - *Very Low Density Lipoprotein* – lipoproteina o bardzo małej gęstości

WAT - *white adipose tissue* – biała tkanka tłuszczowa

WHR - *waist-hip ratio* - wskaźnik talia-biodro

3 Wstęp

3.1 Zespół metaboliczny

3.1.1 Historia definicji

Otyłość jest coraz częściej rozpoznawanym schorzeniem, które w krajach o dużym rozwoju przemysłowym przybrało rozmiary epidemii. Zaburzenia metaboliczne i kliniczne, będące konsekwencją otyłości objęte zostały wspólną nazwą - „zespół metaboliczny”. W czasie ostatnich 30 lat pojęcie to stało się jednym z najczęściej używanych terminów w piśmiennictwie medycznym. Zespół ten zyskał znaczenie epidemiologiczne i kliniczne, od momentu przedstawienia jego definicji przez Geralda M. Reavena w 1988 roku, który określił go jako zespół X (1). Ale już wcześniej, bo w roku 1918, niemiecki lekarz Ernst Kretschmer opisał zespół zaburzeń mogący być pewnego rodzaju wstępem do dzisiejszej definicji zespołu metabolicznego. Badał on powiązania między psychiką i budową ciała. Opisał typ pykniczny budowy charakteryzujący się otyłością brzuszną i skłonnością do zachorowań na nadciśnienie tętnicze i choroby serca (2). Tuż po I wojnie światowej ukazała się publikacja dwóch internistów Karla Hitzenbergera i Martina Richtera-Quittera. Autorzy opisywali w niej swoje obserwacje pacjentów z zaburzeniami metabolicznymi, u których zauważyli współwystępowanie cukrzycy i nadciśnienia tętniczego (2). Podobnych obserwacji dokonali szwedzki lekarz Eskin Kylin i Hiszpan Gregorio Maran, którzy opublikowali w 1921 r. w czasopiśmie *Zentrallblatt fuer Innere Medizin* pracę pod tytułem „*Nadciśnienie tętnicze i cukrzyca*” (*Hipertonie und Zuckerkrankheit*) (2). Kylin prowadząc przez kolejne lata badania na tym polu stwierdził istotny znaczenie podwyższonego poziomu kwasu moczowego w diagnostyce tego zespołu. Rozpoznane przez siebie schorzenie nazwał w 1923 roku zespołem nadciśnienia, hiperglikemii i hiperurykemii (2,3).

Do dalszych zmian w zdefiniowaniu objawów zespołu metabolicznego przyczynił się polski lekarz Jakub Węgierko, który wprowadził w 1958 roku pojęcie „cukrzycy skojarzonej”. Zwrócił uwagę na wspólne występowanie cukrzycy z otyłością, nadciśnieniem tętniczym oraz chorobą niedokrwienną serca (2,3). W 1966 roku, we Francji, J. P. Camus rozpoznał zespół różniący się nieco objawami od obserwacji Kylina. Swoje rozpoznanie nazwał *trójzespołem metabolicznym* (*Trisyndrome metabolique*) obejmującym dnę, cukrzycę i

hipertriglicerydemię (2). Rok później włoscy badacze A. Avogaro i G. Crepaldi obserwując współwystępowanie otyłości brzusznej, dyslipidemii, zaburzeń gospodarki węglowodanowej oraz nadciśnienia i współistniejącego wysokiego ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca, wprowadzili pojęcie zespołu plurimetabolicznego (3). W 1968 roku naukowcy ze wschodniej części Niemiec H. Mehnert i H. Kuhlmann udowodnili związek między rozwojem wyżej wymienionych schorzeń, a stylem życia i odżywiania charakterystycznym dla kultury zachodniej. Naukowcy stworzyli pojęcie zespołu dostatniego życia (*Wohlstandsyndrome*) (2). W latach 70-tych XX wieku M. Hanefeld do tej pory wymienionych schorzeń dodał zwiększone ryzyko miażdżycy, a w 1981 roku wraz z W. Leonhardem podał nazwę i zdefiniował *zespół metaboliczny* jako współistnienie cukrzycy typu 2, nadciśnienia tętniczego, hiperinsulinemii, otyłości, hiperlipidemii, dny i zwiększonej krzepliwości krwi (2). Autorzy zwrócili również uwagę na istotę podłoża genetycznego oraz czynników środowiskowych, w tym nieprawidłowej diety na rozwój choroby.

Podejmowano jeszcze wiele prób zdefiniowania zespołu metabolicznego. Przełomowym momentem okazał się być rok 1988, kiedy Gerard M. Reaven opublikował swoje spostrzeżenia, że oporność tkanek na insulinę (insulinooporność), jak i hiperinsulinemia mogą być głównym czynnikiem wpływającym na rozwój dyslipidemii, zaburzeń gospodarki węglowodanowej, nadciśnienia tętniczego. Ze względu na brak możliwości wytłumaczenia patomechanizmów opisywanego przez siebie schorzenia, nazwał je *Zespołem X* (1, 2). Rok później Norman Kaplan zwrócił uwagę na ważną rolę otyłości centralnej. Wprowadził pojęcie „śmiertelna czwórka” (*deadly quartet*), którą zdefiniował jako zwiększone zasoby tkanki tłuszczowej trzewnej i podskórnej okolicy brzucha, współistniejący nieprawidłowy metabolizm glukozy, hipertriglicerydemia i nadciśnienie tętnicze (2). W 1991 roku DeFronzo i Ferranini oraz niezależnie Haffner sformułowali pojęcie *zespołu insulinooporności*, które sugerowało związek insulinooporności z występowaniem wcześniej opisanych zaburzeń (2). Natomiast w 1999r Camphell do wymienionych przez Kaplana objawów dodał miażdżycę i nasiloną trombogenezę.

3.1.2 Aktualnie stosowane definicje

Ostateczną wspólną nazwę dla wymienianych przez wielu naukowców schorzeń nadała w 1999 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO – *World Health Organisation*) (2). Ze względu na brak jednordnej, przyjętej na świecie definicji, stworzono tzw.

definicję roboczą zespołu metabolicznego. Podstawą rozpoznania zespołu metabolicznego jest stwierdzenie zaburzeń w gospodarce węglowodanowej (cukrzyca, stany przedcukrzycowe), insulinooporność; oraz 2 z 4 niżej wymienionych czynników: nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia, otyłość, mikroalbuminuria [Tabela 1]. Do określenia otyłości w tym schemacie użyto wskaźników: talia-biodro (WHR – *waist to hip ratio*) lub wskaźnika masy ciała (BMI – *body mass index*).

Po roku 2000 starano się ujednolicić definicję i kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego. W 2001 roku rozpoznawanie zespołu zostało ustalone na podstawie zaleceń amerykańskiego Narodowego Programu Edukacji Cholesterolowej Dorosłych (NCEP - *National Cholesterol Education Program*) zawartych w III Raporcie Zespołu Ekspertów do spraw Wykrywania, Oceny i Leczenia Hipercholesterolemii u Dorosłych (ATP III - *Adult Treatment Panel III*) (2). W porównaniu do wytycznych z 1999 roku, te wg NCEP ATP III zostały uproszczone, co ułatwiło ich stosowanie w codziennej praktyce. Zaproponowano pięć kryteriów, z których obecność trzech była niezbędna do rozpoznania zespołu metabolicznego. Są nimi: otyłość brzuszna, dyslipidemia aterogenna (podwyższone stężenie triglicerydów i lipoprotein o małej gęstości LDL – *low density lipoprotein*, oraz obniżone stężenie lipoprotein o dużej gęstości HDL – *high density lipoprotein*), podwyższone ciśnienie tętnicze, insulinooporność, upośledzona tolerancja glukozy, stan prozakrzepowy i prozapalny [Tabela 1].

W badaniach *The Insulin Resistance Artherosclerosis Study* przeprowadzonych w 2004 roku udowodniono, że największe znaczenie wśród zaburzeń metabolicznych w zespole ma otyłość trzewna wyrażona przez obwód talii. Ponadto profil aterogennych czynników ryzyka jest znacznie wyraźniejszy u osób z insulinoopornością (4). W tym samym roku obniżono również dolną granicę normy dla glukozy na czczo do 100 mg/dl (5,6 mmol/l) zgodnie z zaleceniami Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego (ADA, *America Diabetes Association*).

Wszystkie te obserwacje doprowadziły do powstania w kwietniu 2005 roku nowej definicji zespołu metabolicznego, unowocześnionych zasad klasyfikacji jak i leczenia (5). Definicja wg. Światowej Federacji do spraw Cukrzycy (IDF - *International Diabetes Federation*) uwzględnia niższy poziom glukozy na czczo, niższe stężenie HDL-cholesterolu we krwi oraz mniejszy obwód talii do rozpoznania otyłości brzusznej, w porównaniu z kryteriami przyjętymi przez Amerykański Narodowy Program Edukacji

Cholesterolowej ATP III z roku 2001. Wytyczne dotyczące poziomu triglicerydów, jak i wartości ciśnienia tętniczego, nie uległy zmianie (5,6) [Tabela 1].

Tabela 1. Aktualnie stosowane definicje zespołu metabolicznego.

WHO 1999r	NCEP/ATP III 2001r	IDF 2005r
▪ stężenie glukozy na czczo ≥ 110 mg/dl (6,1 mmol/l) lub nieprawidłowa tolerancja glukozy (glukoza w 2 godz. po 75g glukozy p.o. ≥ 140 mg/dl) ▪ oraz 2 lub więcej z następujących czynników: - otyłość – definiowana jako BMI > 30 kg/m² i/lub - WHR mężczyźni $> 0,9$; kobiety $> 0,85$ - stężenie triglicerydów > 150 mg/dl (1,7 mmol/l) - stężenie cholesterolu HDL < 40 mg/dl (1,0 mmol/l) u mężczyzn i u kobiet. - ciśnienie tętnicze skurczowe ≥ 140 mmHg lub rozkurczowe ≥ 90 mmHg - mikroalbuminuria ($>20\mu\text{g}\%$)	▪ 3 lub więcej z poniższych czynników ryzyka - otyłość – definiowana jako BMI > 30 kg/m² i/lub - obwód pasa mężczyźni > 102 cm, kobiety > 88 cm - stężenie glukozy na czczo ≥ 110 mg/dl (6,1 mmol/l) - stężenie triglicerydów > 150 mg/dl (1,7 mmol/l) - stężenie cholesterolu HDL < 40 mg/dl (1,0 mmol/l) u mężczyzn i < 50 mg/dl (1,3 mmol/l) u kobiet - ciśnienie tętnicze skurczowe ≥ 130 mmHg lub rozkurczowe ≥ 85 mmHg	▪ otyłość centralna – definiowana jako obwód talii ≥ 94 cm u Europejczyków i ≥ 80 cm u Europejki [dla innych grup etnicznych – odpowiednie wartości] ▪ oraz 2 z 4 następujących czynników: - stężenie glukozy na czczo ≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/l) lub wcześniej rozpoznana cukrzyca typu 2 - stężenie triglicerydów > 150 mg/dl (1,7 mmol/l) lub leczenie tego zaburzenia lipidowego - stężenie cholesterolu HDL < 40 mg/dl (1,0 mmol/l) u mężczyzn i < 50 mg/dl (1,3 mmol/l) u kobiet lub leczenie tego zaburzenia lipidowego - ciśnienie tętnicze skurczowe ≥ 130 mmHg lub rozkurczowe ≥ 85 mmHg, lub leczenie rozpoznanego wcześniej nadciśnienia tętniczego

Równolegle do prac IDF nad definicją zespołu metabolicznego w Stanach Zjednoczonych *American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute* (AHA/NHLBI) podała kryteria rozpoznania zespołu z uwzględnieniem charakterystyki społeczeństwa amerykańskiego (7). AHA/NHLBI nieco zmodyfikowało kryteria ATPIII,

ale nie uznało otyłości trzewnej, tak jak IDF, za główny i niezbędny punkt rozpoznania zespołu metabolicznego. Pozostałe 4 czynniki ryzyka były identyczne do tych wymienionych przez IDF. Główną różnicą między kryteriami rozpoznania otyłości trzewnej był obwód brzucha przez AHA/NHLBI określony na ≥ 102 cm u mężczyzn i ≥ 88 cm u kobiet, a w IDF odpowiednio ≥ 94 cm i ≥ 80 cm [patrz Tabela 1].

Przez ostatnie kilka lat członkowie m.in. IDF jak i AHA/NHLBI prowadzą dyskusje by uściślić i ujednolicić wspólne kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego. W tabeli 2 umieszczono kryteria niezbędne do rozpoznania zespołu metabolicznego zatwierdzone przez obie strony i opublikowane w 2009 roku (8) [Tabela 2].

Tabela 2. Kryteria klinicznego rozpoznania zespołu metabolicznego – wspólne stanowisko International Diabetes Federation; National Heart, Lung and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; oraz International Association for the Study of Obesity (8).

Kryterium	Punkt odcięcia
▪ 3 lub więcej z 5 poniższych czynników ryzyka (otyłość trzewna nie powinna być dominującym kryterium rozpoznania)	
- obwód talii *	- odpowiednie wartości specyficzne dla populacji i danego państwa
- podwyższone stężenie glukozy na czczo** lub leczenie tego zaburzenia metabolicznego	≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/l)
- hipertriglicerydemia lub leczenie tego zaburzenia lipidowego ***	≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/l)
- obniżone stężenie cholesterolu HDL lub leczenie tego zaburzenia lipidowego ***	< 40 mg/dl (1,0 mmol/l) u mężczyzn i < 50 mg/dl (1,3 mmol/l) u kobiet
- podwyższone ciśnienie tętnicze lub leczenie rozpoznanego wcześniej nadciśnienia tętniczego	skurczowe ≥ 130 mmHg i/lub rozkurczowe ≥ 85 mmHg,

*Zaleca się używanie kryteriów IDF dla nie-Europejczyków, a dla ludzi pochodzenia Europejskiego kryteriów zarówno IDF jak i AHA/NHLBI dopóki nie będzie zebrane więcej danych

**Większość pacjentów z cukrzycą typu 2 będzie spełniała w/w kryteria zespołu metabolicznego.

***Najczęściej stosowanymi lekami w leczeniu hipertriglicydemii i obniżonego stężenia HDL cholesterolu są fibraty i kwas nikotynowy. Pacjent przyjmujący jeden z tych leków może być uważany za osobę z którymś z w/w zaburzeń lipidowych. Wysoka dawka kwasów tłuszczowych ω -3 stosowanych przez pacjenta może wskazywać na występującą u niego hipertriglicydemię.

3.1.3 Epidemiologia

Ze względu na różne definicje zespołu metabolicznego, dane dotyczące częstości jego występowania różnią się znacząco. Według raportu Camerona i jego współpracowników z 2004 roku zespół rozpoznawany na podstawie zróżnicowanych kryteriów w populacji miejskiej w wieku od 20 do 25 lat wynosiła od 8% w Indiach do 24% w USA u mężczyzn, natomiast u kobiet od 7% we Francji do 43% w Iranie (2). W polskiej populacji dorosłych częstość występowania zespołu metabolicznego wynosiła w 2002 roku średnio 20% (22% u kobiet i 18% u mężczyzn) i wykazywała tendencje wzrostowe wraz z wiekiem (badania NATPOL III Plus) (9).

3.1.4 Patofizjologia

Do dziś naukowcy nie ustalili jednolitej teorii mechanizmu prowadzącego do rozwoju zespołu metabolicznego. Najbardziej powszechną jest hipoteza tzw. „wspólnego podłoża”, która zakłada, że objawy zespołu metabolicznego powstają w wyniku interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi, środowiskowymi, czynnikami wpływającymi na nieprawidłowy rozwój w życiu płodowym i wczesnym dzieciństwie (hipotrofia płodu, nadmiar spożywanego pokarmu lub niedożywienie ciężarnych) oraz po porodzie czynnikami cywilizacyjnymi powodującymi rozwój otyłości, a w konsekwencji cukrzycy, dyslipidemii, nadciśnienia (dodatni bilans energetyczny: dysproporcja między zapotrzebowaniem a podażą substratów energetycznych, bezczynność fizyczna itp.) (2). U podstaw całego układu tych zaburzeń leży insulinooporność i początkowa hiperinsulinemia wynikająca w dużej mierze z lipotoksyczności (toksyczne działanie syntetyzowanych *de novo* głównie w wątrobie /lipogeneza/ jak i uwalnianych z tkanki tłuszczowej wolnych kwasów tłuszczowych (FFA). Krążą one we krwi w postaci kompleksów z albuminą. FFA, podobnie jak glukoza, aktywują uwalnianie z komórek beta trzustki insulinę. Ponadto hamując jej rozkład w wątrobie przyczyniają się do nieregulowanej poziomu glukozy hiperinsulinemii i rozwoju obwodowej insulinooporności (zmniejszenie aktywności receptorów insuliny głównie w mięśniach i tkance tłuszczowej). Pojawiająca się glukolipotoksyczność powoduje przeciążenie metaboliczne organelli: siateczki endoplazmatycznej i mitochondriów, akumulacje FFA w postaci kropelek lipidowych (*lipid droplets*, LD) w komórkach, również i w komórkach beta trzustki doprowadzając do ich apoptozy, a w konsekwencji do rozwoju objawów cukrzycy typu 2 (10).

Zasadniczą rolę w patogenezie zespołu metabolicznego pełni **otyłość centralna**, a ściślej trzewna tkanka tłuszczowa. Od podskórnej różni ją zarówno inna podatność na regulację hormonalną, inna produkcja adipokin, jak i nasilenie przewlekłego „stanu zapalnego” charakteryzującego tkankę brzuszną (11). FFA uwalniane z trzewnej tkanki tłuszczowej są transportowane bezpośrednio do wątroby, wpływając na jej metabolizm zwiększając syntezę bogatych w triglicerydy lipoprotein (*triglyceride rich lipoprotein* - *TRL*: składających się z chylomikronów, lipoprotein o bardzo małej gęstości - *VLDL* i w konsekwencji *lipoprotein* o pośredniej gęstości – *IDL oraz LDL*). FFA wpływają również na opisany powyżej zahamowany katabolizm insuliny, zmianę ekspresji jej receptorów oraz aktywację cytokin i białek prozakrzepowych (fibrynogen, inhibitor aktywatora plazminogenu – PAI-1) (2, 12) [Rysunek 2]. W samej wątrobie dochodzi do indukcji tworzenia kropli lipidowych i rozwoju niealkoholowego stłuszczenia wątroby (*non-alcoholic fatty liver disease-NAFLD*) charakterystycznego dla zespołu metabolicznego (13). Podobna akumulacja LD obserwuje się w mięśniach i komórkach innych narządów, w tym i komórkach beta trzustki (14).

Insulina posiada wiele funkcji. Między innymi odpowiada za prawidłową dystrybucję zasobów energetycznych, tj. glukozy i kwasów tłuszczowych w postaci odpowiedniej proporcji niezbędnej dla współpracy energetycznej komórek mięśni szkieletowych z termogenną i spichrzającą kwasy tłuszczowe w postaci TG tkanką tłuszczową. Poza tym insulina jest odpowiedzialna za magazynowanie w wątrobie (głównie po posiłku) pod postacią glikogenu ważnego, zwłaszcza dla mózgu, substratu energetycznego - glukozy (15). Insulina także reguluje przemiany metaboliczne wątroby wiodące do produkcji endogennej glukozy i FFA adekwatnie do zapotrzebowania energetycznego organizmu między posiłkami. Natomiast w okresie wzmożonego zapotrzebowania energetycznego w różnego rodzaju stresie, do procesu uwalniania substratów energetycznych przyczynia się stymulacja beta-adrenergiczna oraz regulacja hormonalna (kortykosterydy, *neuronal peptyd Y* (NPY), hormony tarczycy) (15).

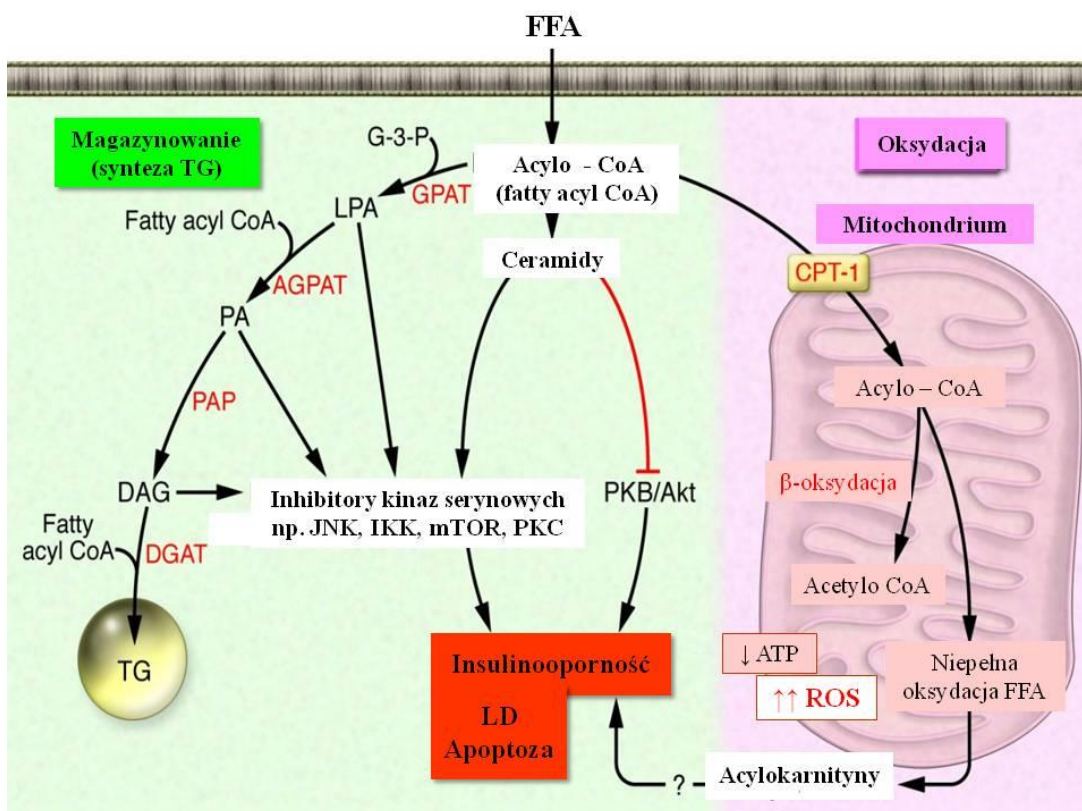
Jak już wspomniano, głównym uznanym czynnikiem w patomechanizmie zespołu metabolicznego jest **insulinooporność** tkanek obwodowych (mięśni) i wątroby związana z utrzymującym się wyższym stężeniem krążących wolnych kwasów tłuszczowych uwalnianych w głównej mierze z zapasowej puli TG tkanki tłuszczowej (zwłaszcza trzewnej) przez lipazy: lipazę triglicerydów (ang. *adipose triglyceride lipase*, ATGL), wrażliwą na czynniki hormonalne lipazę diglicerydów (ang. *hormone sensitive lipase*, HSL) oraz lipazę

monoglicerydów (ang. *monoglyceride lipase*, MGL). Innym źródłem FFA są bogate w TG lipoproteiny (TRL: chylomikrony, VLDL, IDL, LDL zwłaszcza charakterystyczne dla insulinooporności tzw. małe, gęste LDL typu B, a nawet patologiczne bogate w TG HDL), które podlegają działaniu lipazy lipoproteinowej śródbłonka naczyń zatok wątrobowych. W wątrobie FFA zwiększają lipogenezę i uwalnianie zawierających apoB VLDL zawierających patologicznie dużą ilość TG. Powstają z nich bogate w TG LDL, źródło typowych dla insulinooporności i cukrzycy zmodyfikowanych także oksydacyjnie proaterogennych LDL typu B. W porównaniu do zwykłych LDL-i, małe gęste LDL-e są bardziej toksyczne dla śródbłonka naczyń. Mają one większą zdolność przenikania przez błonę podstawną śródbłonka, posiadają zdolność adherencji do glikozaminoglikanów, są bardziej podatne na modyfikację oksydacyjną gdyż dłużej pozostają w krążeniu. Jako zmodyfikowane LDL nie są wychwytywane przez receptor dla apoB, ale są łatwiej wychwytywane przez receptory uczestniczące w fagocytozie - receptory resztkowe (*scavenger receptors*) makrofagów, fibroblastów i komórek mięśni gładkich naczyń (16). Dzięki działaniu enzymów osocza (*phospholipid transfer protein* - PLTP i *cholesteryl ester transfer protein* - CETP) dochodzi do wymiany TG na estry cholesterolu między TRL a HDL. Powstają patologiczne HDL nie mające zdolności „zwrotnego transportu estrów cholesterolu”. Procesowi temu towarzyszy obniżenie stężenia HDL, gdyż luźnie związana z patologicznymi HDL apoproteina AI ulega odszczepieniu i wydaleniu przez nerki (17).

Naukowcy znajdują coraz więcej dowodów, że indukowana FFA hyperinsulinemia powoduje spadek wrażliwości „przewodnictwa receptorowego” insuliny w mięśniach, czyli podwyższony poziom FFA hamuje zależny od insuliny dokomórkowy transport glukozy, ale również hamuje wewnątrzkomórkową generację ATP w mitochondriach przez powodowanie dysproporcji substratów dla cyklu Krebsa (czyli dysproporcji substratów dla łańcucha oddechowego w oksydatywnej fosforylacji - OXPHOS) (18). Powstające w przeładowanych substratami mitochondriach wolne rodniki modyfikują strukturalne i enzymatyczne białka komórek, co wywołuje wytworzenie białek szoku cieplnego (*heat shock proteins*, HSPs) w przebiegu szoku siateczki endoplazmatycznej (*ER-stress*) i indukuje generację kropli lipidowych w komórkach nieprzeznaczonych pierwotnie do magazynowania lipidów upośledzając ich funkcję i inicjując apoptozę [Rysunek 1] (10, 19). Jak wspomniano wyżej zwiększone stężenie krążącej glukozy i FFA stwarza warunki tzw.: „glukolipotoksyczności”, która aktywuje również nieenzymatyczną glikację białek, jak i tworzenie toksycznych lipidów (np. ceramidów) odpowiedzialnych za pogłębienie insulinooporności i apoptozy komórek.

Procesowi temu towarzyszy powstanie wolnych rodników tlenowych (ROS) tj. anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodniki hydroksylowe (19).

Rysunek 1. Odpowiedź komórkowa na wysoki poziom FFA [wg. Schenk S. et al., 2008; (22)].



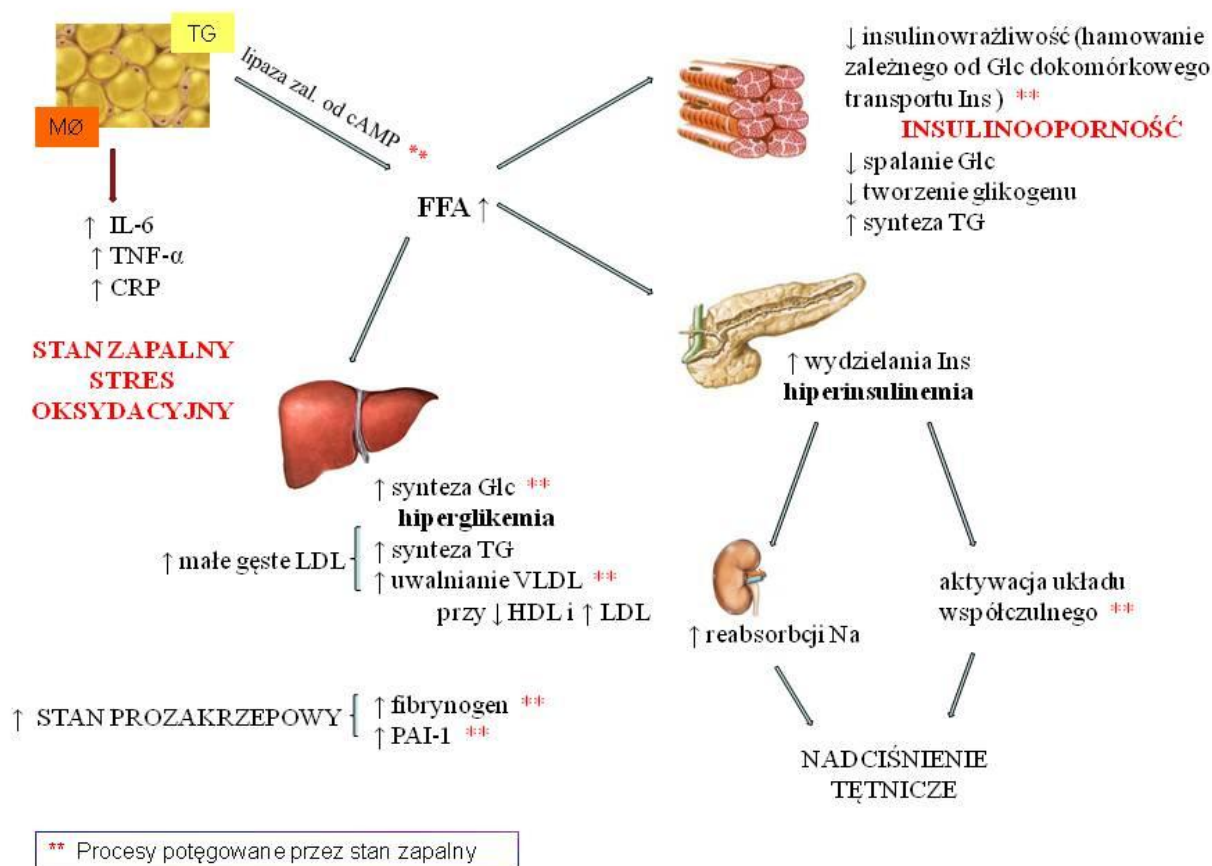
Uważa się, że w podobnym mechanizmie w miarę upływu czasu dochodzi do osłabienia siły skurczowej mięśni szkieletowych, stłuszczenia wątroby, uszkodzenia funkcji śródbłonna, jak i do wyczerpania rezerw komórek β trzustki prowadząc do hipoinsulinemii, powikłań naczyniowych i rozwoju pełnego obrazu cukrzycy.

Wysoki poziom insuliny wzmacnia reabsorpcję sodu w nerkach i stymuluje współczulny układ nerwowy (20). W warunkach insulinooporności zmniejsza się wazodylacyjny wpływ insuliny na naczynia krwionośne. Dodatkowo wysoki poziom glukozy, FFA oraz generacja ROS mogą pośrednio wpływać obkurczająco na naczynia poprzez hamowanie powstawania i biodostępności tlenku azotu (NO) (21).

Tkanka tłuszczowa stanowi źródło różnego rodzaju cytokin i autakoidów jak np. białka rodziny RAAS (*renin-angiotensin-aldosterone system*) promujących stan spastyczny naczyń.

Uwalniana z adipocytów leptyna również aktywuje układ adrenergiczny (21). Wtórnie rozwija się **nadciśnienie tętnicze**, a przebudowie/pogrubieniu ściany naczyń sprzyja proproliferacyjne działanie (czynnik wzrostu) hiperinsulinemii (2) [Rysunek 2].

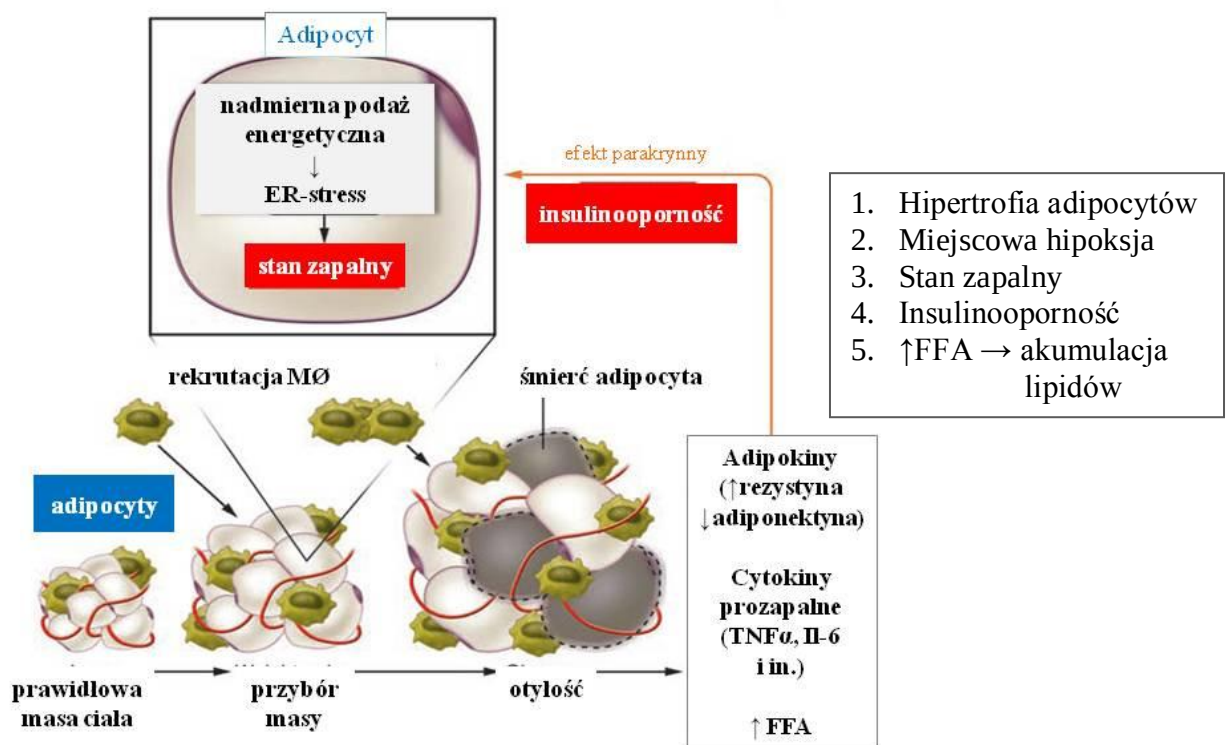
Rysunek 2. Patofizjologia insulinooporności i przewlekłego stanu zapalnego w zespole metabolicznym [wg. Szotowska M., Więcek A. (2)].



Całemu, złożonemu mechanizmowi insulinooporności i zaburzeniom lipidowym towarzyszy i nasila je przewlekły **odczyn zapalny tkanki tłuszczowej**. Adipocyty i naciekające tkankę tłuszczową makrofagi (MØ) produkują i wydzielają cytokiny zapalne (m.in. interleukinę 6 – IL-6; czynnik martwicy nowotworów – TNF-α), które nasilają insulinooporność i wzmagają lipolizę TG w tkance tłuszczowej zwiększając pulę krążących FFA [Rysunek 3]. TNF-α, którego generacja wzrasta lokalnie w tkance tłuszczowej w zespole

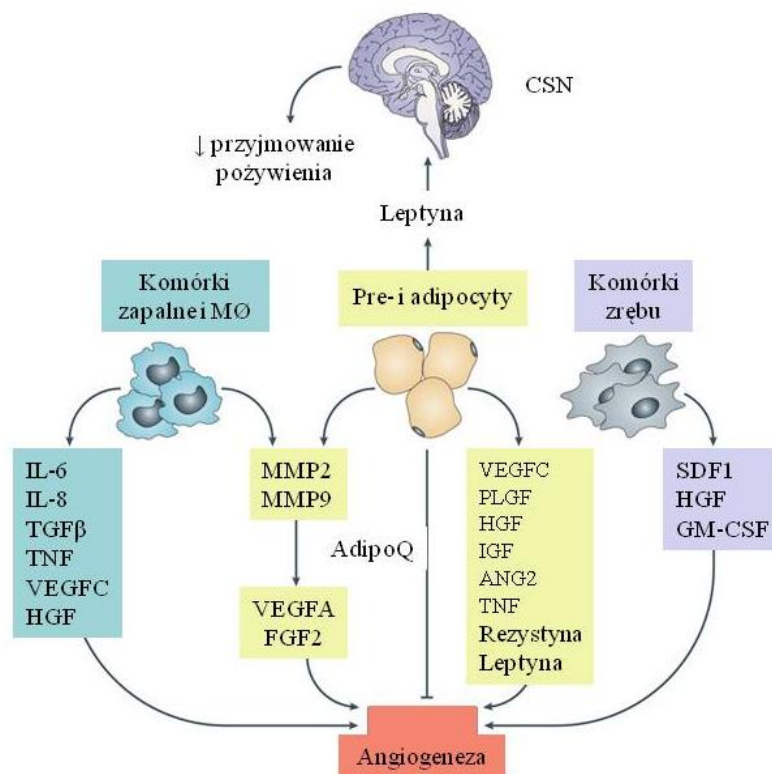
metabolicznym, nasila insulinooporność przez hamowanie przewodnictwa białek receptora insulinowego. Uwalniana IL-6, pobudza wątrobę do produkcji białek ostrej fazy w tym CRP (*C-reactive Protein*). Wzrastają również inne markery/mediatory stanu zapalnego jak interleukiny, czynniki wzrostu, poziom białych krwinek (2). Zmienia się poziom adipokin - podnosi się poziom leptyny, rezystyny, natomiast obniża się poziom adiponektyny [Rysunek 3] (2, 22).

Rysunek 3. Patomechanizm insulinooporności - miejscowy stan zapalny w tkance tłuszczowej [wg. Schenk S. et al., 2008; (22)].



Wzmóżonej adipogenezie i przebudowie (*remodelingowi*) tkanki tłuszczowej, uwalnianiu adipokin i odczynowi zapalnemu towarzyszy wzmóżona angiogeneza promowana też niedotlenieniem rosnącej tkanki (23). Sama leptyna i adiponektyna mają modulujący wpływ na ten proces [Rysunek 4].

Rysunek 4. Mechanizm angiogenezy – niektóre proangiogenne adipokiny i cytokiny produkowane przez adipocyty i komórki zrębu tkanki tłuszczowej oraz komórki związane z towarzyszącym procesem zapalnym. Równoległe uwalnianie przez adipocyty endogennych inhibitorów angiogenezy [wg. Cao Y., 2010; (23)] .



Znaczący wpływ na wyżej opisane zjawiska mają stres oksydacyjny i reakcja immunologiczno-zapalna towarzysząca każdemu podwyższeniu poziomu FFA, bogatych w TG lipoprotein, jak i glukozy we krwi, zwłaszcza w okresie zmian glikemii i lipemii poposiłkowej. Poposiłkowy stres wolnorodnikowo-zapalny jest silnie indukowany zawartością lipidów w diecie (21, 24). Okresowo nasila efekty glukolipotoksyczności. Poposiłkowy stres oksydacyjny i generacja ROS pogłębia insulinooporność i powikłania naczyniowe (21, 25).

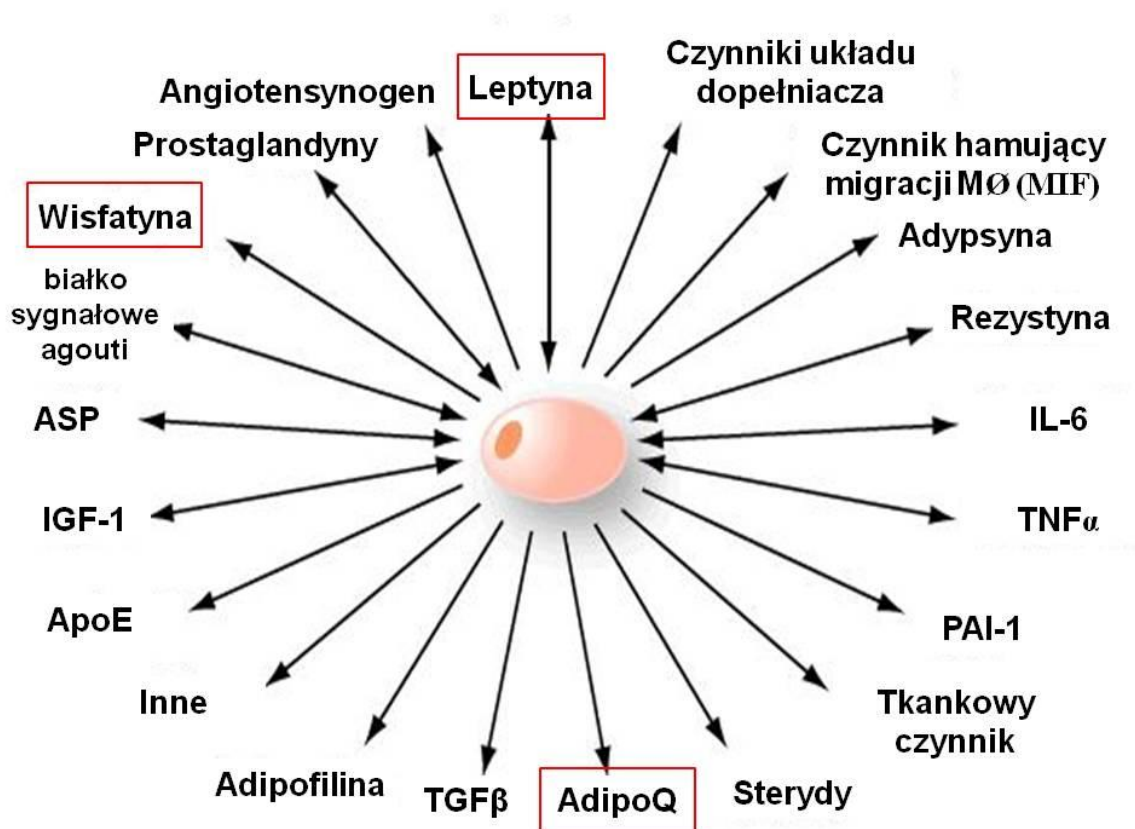
Hiperglikemia i intensywny proces glikolizy sprzyjają aktywacji szlaku heksozaminowego, w którym fruktozo-6-fosforan ulega przemianie do 6-fosforanu N-acetyloglukozaminy (NAG) – proces katalizowany przez aminotransferazę glutamino fruktozo-6-fosforanu. Przyłączanie 6-fosforanu NAG modyfikuje białka, a w przypadku czynników transkrypcyjnych, aktywuje transkrypcję genów białek odczynu zapalnego nasilając stres oksydacyjny i modyfikację różnych białek komórek upośledzając ich funkcje (26). Negatywne oddziaływanie zmodyfikowanych białek jest częściowo niwelowane przez procesy naprawcze zachodzące w siateczce endoplazmatycznej (ER - *endoplasmic reticulum*)

przy udziale tzw. chaperonów – białek opiekuńczych, które pomagają naprawić lub wyeliminować błędne struktury z komórki. Przekroczenie możliwości naprawczej chaperonów wywołuje stres siateczki endoplazmatycznej komórek (ER-stress). Towarzyszy temu także generacja wolnych rodników tlenowych, tworzenie LD. Dochodzi do aktywacji szeregu kinaz białkowych: kinazy aktywowanej przez mitogeny (MAPK), kinazy N-końca białka c-Jun (JNK) i kinaz białkowych grupy C, czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF-B), indukcji ekspresji prozapalnych cytokin, akumulacji amyloidu, aktywacji apoptozy, a nawet śmierci komórki (26) [Rysunek 1]. W komórkach β trzustki dochodzi do zmniejszenia powinowactwa do DNA czynnika transkrypcyjnego PDX, niezbędnego do prawidłowego rozwoju komórek beta wysp Langerhansa trzustki, produkcji insuliny i homeostazy glukozy (25). Również w samych komórkach docelowych dla działania insuliny (mięśnie, tkanka tłuszczowa, hepatocyty) dochodzi do zmian, w których zaktywowana JNK doprowadza do zahamowania przeniesienia sygnału insulinowego poprzez fosforylację grup serynowych receptora insulinowego, podczas gdy w prawidłowych warunkach białko to jest aktywowane przez fosforylację tyrozyny (26, 27). Tak dochodzi do obwodowego nasilenia procesu insulinooporności (27).

3.2 Wybrane hormony tkanki tłuszczowej biorące udział w regulacji równowagi energetycznej

Tkanka tłuszczowa fizjologicznie stanowi 8-18% całkowitej masy u mężczyzn i 14-28% u kobiet (28). Znane są dwa typy tkanki tłuszczowej – brunatna (BAT) i biała (WAT), których wzajemne proporcje zależą głównie od wieku, czynników dziedzicznych, środowiskowych i metabolizmu. Główną funkcją BAT jest proces termogenezy (29). WAT posiada odmienną funkcję, przede wszystkim uczestniczy w magazynowaniu energii w postaci skumulowanych triglicerydów i estrów cholesterolu oraz uwalnianiu substratów energetycznych – FFA. WAT spełnia również istotne role endokrynne, produkując szereg białek – adipokin, które biorą udział w kontroli łaknienia, regulacji równowagi energetycznej, regulacji ciśnienia tętniczego, układu krzepnięcia i fibrynolizy, czy wrażliwości na insulinę (28) [Rysunek 5].

Rysunek 5. Główne czynniki produkowane w tkance tłuszczowej, biorące udział w regulacji równowagi energetycznej (Endokrynną funkcję adipocytów – zaznaczono adipokiny omawiane w pracy).



3.2.1 Leptyna

Najlepiej poznanym i zapewne najważniejszym białkiem produkowanym przez białą tkankę tłuszczową jest leptyna (z gr. *leptos* szczupły). Gen *Ob.*, odpowiedzialny za syntezę tego peptydu, zidentyfikowano w 1994 r. Leptyna jest hormonem polipeptydowym o masie cząsteczkowej 16,7 kDa, składającym się z 167 aminokwasów (30, 31). W krwiobiegu krąży w postaci wolnej – aktywnej, oraz w formie związanej. U osób szczupłych przeważa forma związana z białkami, u otyłych zaś forma wolna. Stosunek obu frakcji leptyny znajduje się w stanie dynamicznej równowagi, która ulega wahaniom na skutek zmian równowagi energetycznej (32). Leptyna w organizmach ludzi i zwierząt jest wydzielana w rytmie dobowym. Najwyższe stężenie występuje w nocy, najniższe około południa. Stężenie leptyny we krwi jest mierzone w nanogramach i jest wprost proporcjonalne do zawartości podskórnej tkanki tłuszczowej i wskaźnika masy ciała (33). U kobiet poziom leptyny jest znacznie wyższy niż u mężczyzn (34). Jest to spowodowane większą zawartością podskórnej tkanki

tłuszczowej i działaniem żeńskich hormonów płciowych. W zespole metabolicznym („diabesity”) stężenie leptyny we krwi wzrasta oraz występuje tzw. zjawisko leptynooporności (31).

Obecność receptorów dla leptyny stwierdzono w wielu tkankach organizmu, min. w podwzgórzu, płucach, wątrobie, mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym, jajnikach, jądrach, nerkach i tkance tłuszczowej, jak również na poszczególnych komórkach (monocytach, komórkach NK, limfocytach CD4/CD8, komórkach β trzustki, enterocytach i endotelium) jak i na komórkach progenitorowych szpiku (35, 36).

Leptyna reguluje bilans energetyczny organizmu poprzez hamowanie aktywności ośrodka łaknienia w podwzgórzu (blokowanie wydzielania w podwzgórzy NPY) oraz aktywację termogenezy (30). Reguluje metabolizm tłuszczów hamując syntezę lipidów w wątrobie. Leptyna zwiększając wrażliwość tkanek na insulinę, powoduje zmniejszenie stężenia glukozy we krwi (37). Hamując wydzielanie insuliny nasila ona proces lipolizy tkanki tłuszczowej (zwiększenie podstawowej przemiany materii, wyrzut FFA – substratów w procesach energetycznych) (38). W sposób istotny wpływa na proces angiogenezy (uwalnia tlenek azotu ze śródbłónka naczyń) (39). Leptyna jest jednym z czynników regulujących proces dojrzewania płciowego, prawidłowy rozwój płodu, wpływa również na aktywność układu immunologicznego, czy funkcje gruczołów wydzielania dokrewnego (tarczycy). Zakres działania leptyny w organizmie człowieka jest jak widać bardzo szeroki.

3.2.2 *Adiponektyna*

Innym białkiem produkowanym przez tkankę tłuszczową jest adiponektyna, która została opisana w 1995 roku. Adiponektyna (AdipoQ) kodowana jest przez gen APM1, którego ekspresję wykazano wyłącznie w tkance tłuszczowej. Adiponektyna jest zbudowana z 247 aminokwasów. Jej stężenie u osób zdrowych wynosi ok. 5-30 $\mu\text{g/ml}$ (poziom rzędu 1000 razy większy od stężenia leptyny) (40). Poziom adiponektyny we krwi nie wykazuje zmienności dobowej. Spożywanie posiłków nie ma wpływu na jej aktualne stężenie, natomiast stosowanie długotrwale diety niskokalorycznej zwiększa stężenie adiponektyny w osoczu (41). W przeciwieństwie do większości adipokin, wartości stężenia adiponektyny u osób otyłych są obniżone (42), co sprzyja rozwojowi insulinooporności zwłaszcza w wątrobie i mięśniach szkieletowych. Poprawa wrażliwości na insulinę poprzez działanie adiponektyny wynika prawdopodobnie ze zwiększenia oksydacji kwasów tłuszczowych oraz ze zmniejszenia glukoneogenezy wątrobowej (zmniejszony wyrzut glukozy z wątroby -

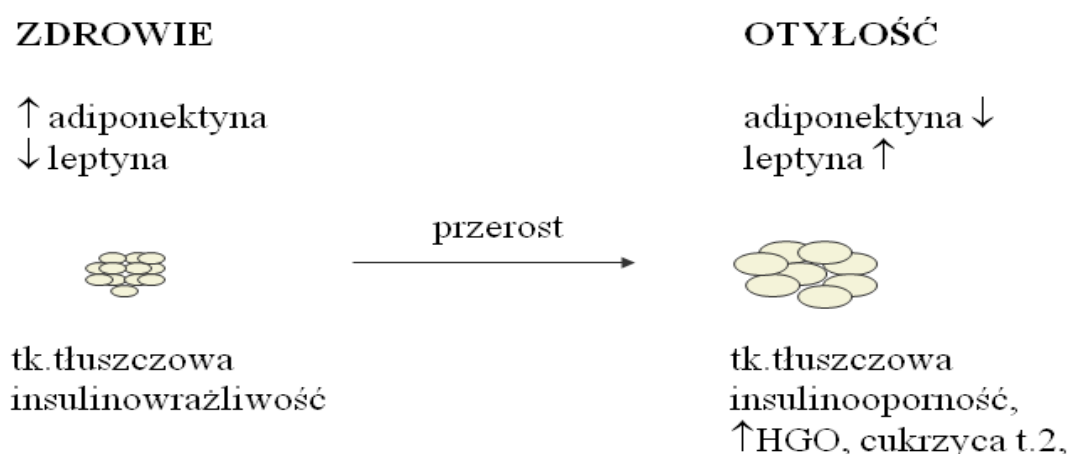
obniżenie HGO: ang. *hepatic glucose output*) (40, 43). Obniżony poziom adiponektyny we krwi jest uważany za niezależny czynnik ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2 (44). Wykazano ujemną korelację między poziomem adiponektyny a BMI, WHR oraz procentową zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie (44).

Dodatkowo adiponektyna posiada właściwości przeciwmiażdżycowe. Hamuje ona adhezję monocytów do komórek śródbłonka oraz transformację makrofagów do komórek piankowatych (41, 45). Zmniejsza syntezę białka C-reaktywnego i czynnika TNF- α . Poprzez syntezę śródbłonkowego NO (działanie naczyniorozkurczające, przeciwnadciśnieniowe, przy niskim stężeniu antyapoptotyczne), adiponektyna działa protekcyjnie na śródbłonek, hamuje proliferację komórek mięśniówki gładkiej naczyń nie dopuszczając do zwiększenia tonusu ścian naczyń (46).

Powyższe funkcje adiponektyna spełnia poprzez dwa rodzaje receptorów: AdipoR1 zlokalizowany głównie w mięśniach szkieletowych i AdipoR2 w wątrobie. Receptory dla AdipoQ także są zlokalizowane w komórkach β wysp trzustkowych, gdzie poziom ich ekspresji regulują FFA (47).

Wzrost stężenia leptyny, a spadek stężenia adiponektyny w surowicy krwi w otyłości jest związane z powstaniem szeregu objawów zespołu metabolicznego (48, 49) [Rysunek 6].

Rysunek 6. Objawy związane ze zmianą poziomów leptyny i adiponektyny we krwi w stanie zdrowia oraz w otyłości.



3.2.3 Wisfatyna

Wisfatyna jest białkiem kodowanym przez geny znajdujące się na chromosomie 7 (50). Pierwotnie została zidentyfikowana jako PBEF (*pre-B-cell colony enhancing factor*, czynnik wzrostu stymulujący różnicowanie się kolonii komórek pre-B) w komórkach szpiku, wątroby, mięśni szkieletowych i pełniących złożone funkcje immunologiczne (51). Nazwę wisfatynie nadał w 2005 roku japoński zespół badaczy, opisując nowo odkrytą adipocytokinę o genotypie odpowiadającym PBEF, syntezowaną jednak głównie w trzewnej tkance tłuszczowej (52). Istnieją doniesienia, że wisfatyna jest również wydzielana przez zaktywowane limfocyty, monocyty i neutrofile (51, 52).

Wisfatyna oddziałuje na komórki poprzez receptor insulinowy, mając jednak inne miejsce wiązania niż sama insulina. Dochodzi do fosforylacji substratów receptorowych (IRS-1, 2, *insulin receptor substrate 1, 2*), wiązania się kinazy-3-fosfatydyloinozytolu z IRS-1, 2, fosforylacji kinaz białkowych B (AKT, PKB, *protein kinase B*) i kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) (53).

Jak dotychczas biologiczna rola wisfatyny nie została do końca poznana. Udowodniono jej działanie insulinomimetyczne i hipoglikemizujące. Poprzez stymulację różnicowania się preadipocytów do dojrzałych komórek tłuszczowych pobudza adipogenezę. Wisfatyna indukuje ekspresję genów dla PPAR- γ , kompleks enzymatyczny syntazy kwasów tłuszczowych, adiponektyny i acylotransferazy diacyloglicerolu (52). Ponad to zwiększa akumulację TG i przyspiesza syntezę glukozy (51). W badaniu z rekombinowaną postacią tego białka wykazano, że aktywuje ona ludzkie leukocyty i stymuluje wydzielanie z monocytów cytokin IL-1b, IL-6, czy TNF- α . U osób leczonych z powodu przewlekłych chorób zapalnych takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, przewlekłe zapalne choroby jelit, stwierdzono istotnie wyższe stężenie wisfatyny w surowicy krwi, oraz wyższą ekspresję jej mRNA (53). W pracy zespołu Curanta sugerowano zastosowanie wisfatyny jako markera zapalnego, produkowanego zarówno przez neutrofile (PBEF), jak i przez swoiste dla białej tkanki tłuszczowej makrofagi (54), które tą drogą stymulują AKT w ludzkich hepatocytach (53).

Badania zależności między osoczymym stężeniem wisfatyny i ekspresją jej genu w adipocytach, a markerami zespołu metabolicznego (masą tkanki tłuszczowej, wskaźnikiem insulinowrażliwości, wartościami BMI, obwodu talii, stężeniem glukozy w surowicy krwi oraz wartościami ciśnienia tętniczego) nie dały jednoznacznych wyników. W niektórych badaniach przeprowadzonych u ludzi opisano pozytywną korelację stężenia wisfatyny z

ekspresją jej mRNA w adipocytach w tkance trzewnej, z wartością BMI oraz procentową zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie (53). Znacząco wyższe stężenia wisfatyny obserwowano w surowicy chorych leczonych z powodu cukrzycy typu 2.

3.3 Inkretyny

3.3.1 Wstęp

Badania ostatnich paru lat dotyczą m.in. regulującej metabolizm roli hormonów jelitowych tzw. inkretyn. Zalicza się do nich glukagonopodobny peptyd typu 1 (*GLP-1, glucagon-like peptide-1*) oraz glukozozależny polipeptyd insulinotropowy (*GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide*). Są to peptydy produkowane przez komórki błony śluzowej jelit, które pełnią istotną rolę w regulacji gospodarki węglowodanowej. Ich wydzielanie jest stymulowane głównie przez posiłek zwłaszcza węglowodanowy. Do najważniejszych efektów ich działań należy stymulacja uwalniania insuliny z komórek beta trzustki, przy czym ta aktywność insulinotropowa wg. ustalonych kanonów, jest ściśle uzależniona od aktualnej glikemii. Hormony inkretynowe działają także ochronnie, „cytoprotekcyjne” i proliferacyjne na komórki beta trzustki oraz wywierają szereg innych działań wpływających na utrzymanie prawidłowej homeostazy glukozy (55). Uważa się, że defekt insulinotropowy inkretyn odgrywa istotną rolę w patogenezie cukrzycy typu 2, zwłaszcza w jej początkowym okresie adaptacyjnego przerostu- hipertrofii wysp i zwiększonego uwalniania insuliny by utrzymać normoglikemię (55). Obecnie w leczeniu cukrzycy typu 2 wykorzystuje się nowatorskie metody terapii polegające na zastosowaniu długodziałających analogów GLP-1 oraz gliptyn hamujących rozkład GLP-1 przez dipeptydazy (56,57,58).

3.3.2 Rys historyczny

Pod koniec XX wieku, cały świat obiegrała wiadomość o inkretynach, mało znanych, a tak ważnych hormonach peptydowych produkowanych przez komórki błony śluzowej jelita cienkiego, które pełnią istotną rolę w regulacji gospodarki węglowodanowej. Jednak pierwsze publikacje dotyczące tego zagadnienia pojawiły się prawie sto lat wcześniej.

W 1902 roku William M. Bayliss i Ernest H. Starling w *Journal of Physiology* opisali czynnik produkowany przez śluzówkę jelita, który wpływa stymulująco na egzokrynną funkcję trzustki (59). Nazwali go „*Sekretyną*”, względem której po raz pierwszy w historii

została użyta nazwa HORMON. Cztery lata później Moore wraz ze współpracownikami użyli ekstraktu ze śluzówki pochodzącej z górnego odcinka jelita cienkiego świni, w celu leczenia cukrzycy. Zainspirowany poprzednio wymienioną pracą Moore wierzył, że kwaśny ekstrakt z dwunastnicy zastymuluje endokrynną funkcję trzustki, podobnie jak zewnątrzwydzielniczą (60). W latach 1921-1930 przeprowadzono wiele badań na zwierzętach, sprawdzając jaka jest odpowiedź organizmu (glikemia w surowicy krwi) w zależności od drogi podania kwaśnego ekstraktu ze śluzówki jelita cienkiego – doustnie, dożylnie, podskórną, czy *per rectum* (61,62,63). W 1932 roku La Barre nazwał niezidentyfikowaną substancję, zgodnie z aktywującym działaniem jakie wywiera na endokrynną funkcję trzustki - „**Inkretyną**” (64). W latach 1939-1940 Loew z zespołem porównał osiem metod uzyskiwania kwaśnego ekstraktu z dwunastnicy i jego wpływ na czynność trzustki u psów. Jednak już same założenia tego badania były błędne. Na przykład nie wiadomo wówczas, że jedna z inkretyn, GIP nie wywiera takiego efektu u psów, jak u szczurów czy u ludzi. Swoje obserwacje Loew podsumował więc, że istnienie inkretyn jest wątpliwe (65). Opinia tak znakomitego fizjologa sprawiła, że przez ponad 20 lat żadne badania w tym zakresie nie były prowadzone. Dopiero w 1964 roku niezależnie McIntyre w Londynie i Elrick w Denver udowodnili, że pochodna śluzówki jelita cienkiego wzmacnia sekrecję insuliny po doustnym przyjęciu glukozy (66,67). Był to wstęp do odkrycia zjawiska nazywanego obecnie **efektem inkretynowym**. Polega on na tym, że wydzielanie insulinotropowych hormonów jelitowych związane z przyjmowaniem pokarmu sprawia, iż doustne podanie glukozy silniej stymuluje sekrecję insuliny, niż glukoza podana dożylnie. W latach 1967-1973 potwierdzono ten efekt i wprowadzono nowy termin „**oś jelitowo-trzustkowa**” (68). W tym czasie zidentyfikowano pierwszą z inkretyn, którą nazwano żołądkowym polipeptydem hamującym (*GIP, gastric inhibitory polypeptide*) z uwagi na jego hamujący wpływ na wydzielanie kwasu żołądkowego psów (69). Z czasem odkryto, że efekt ten jest nikły, przeważa natomiast funkcja insulinotropowa hormonu. Zasugerowano, że dotychczasowa nazwa powinna być zmieniona na glukozozależny polipeptyd insulinotropowy (*GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) (70,71).

W 1983 roku sklonowano gen kodujący inny ludzki hormon trzustkowy - glukagon. Odkryto również strukturę jego prekursora - proglukagonu, oraz zauważono, że zawiera ona poza glukagonem dwa peptydy, które w ok. 50% były homologiczne do glukagonu (72,73). Zgodnie z powyższym nazwano je glukagonopodobnym peptydem typu 1 (*GLP-1, glucagon-like peptide-1*) oraz glukagonopodobnym peptydem typu 2 (*GLP-2, glucagon-like peptide-2*). Oba peptydy z uwagi na podobieństwo do glukagonu zostały przebadane w kierunku aktywności insulinotropowej. Stwierdzono, że tylko GLP-1 aktywuje wydzielanie insuliny

zależne od przyjęcia glukozy, natomiast GLP-2 odpowiada za wzrost i regenerację komórek jelita cienkiego (74, 75).

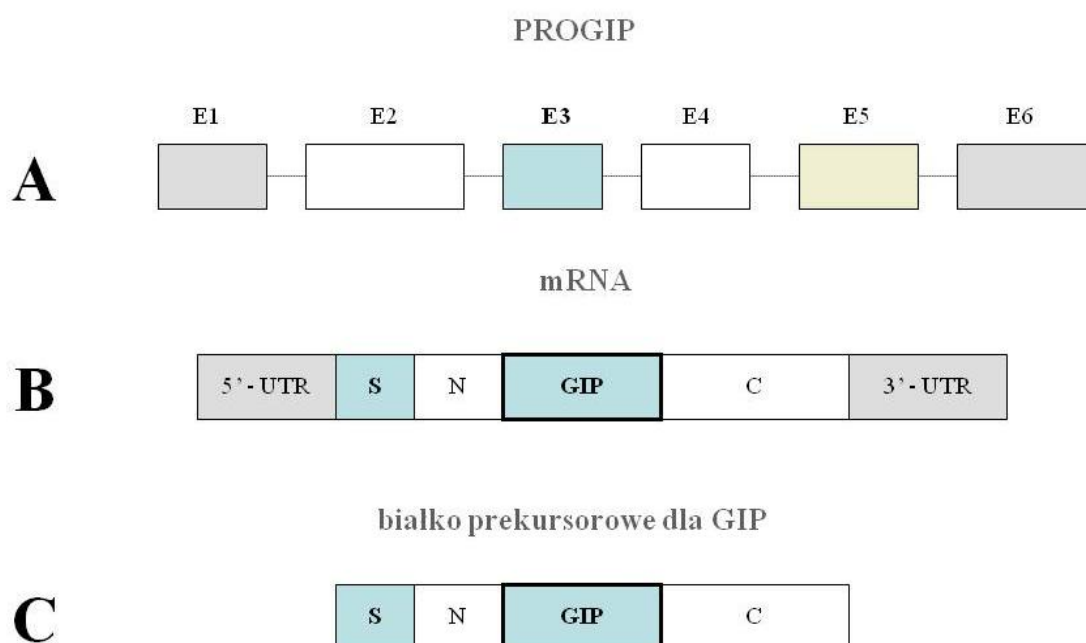
Do dziś, tylko GIP i GLP-1 spełniają kryteria hormonów inkretynowych w organizmie ludzkim. Oba peptydy są odpowiedzialne za efekt inkretynowy, przez co pełnią istotną rolę w regulacji gospodarki węglowodanowej. Ponadto poznano szereg innych właściwości tych hormonów.

3.3.3 *Glukozozależny polipeptyd insulinotropowy*

3.3.3.1 Struktura genu GIP

Ludzki gen GIP znajduje się na długim ramieniu chromosomu 17, składa się z 6 egzonów, z największą liczbą sekwencji kodujących GIP w egzonie 3 [Rysunek 7]. Ekspresja genu dla GIP została wykryta, zarówno u gryzoni jak i u ludzi, w komórkach żołądka i komórkach K jelita cienkiego. Natomiast ekspresja tego genu w śliniankach podżuchwowych została stwierdzona jedynie u szczurów (76). Poziom mRNA dla GIP w komórkach ślinianek i w dwunastnicy szczurów wzrasta po bogatowęglowodanowym i bogatolipidowym posiłku, natomiast maleje w czasie długotrwałego głodzenia (76).

Rysunek 7. Struktura genu ProGIP (A), mRNA (B) oraz białka (C) prekursorowego dla aktywnej formy GIP.



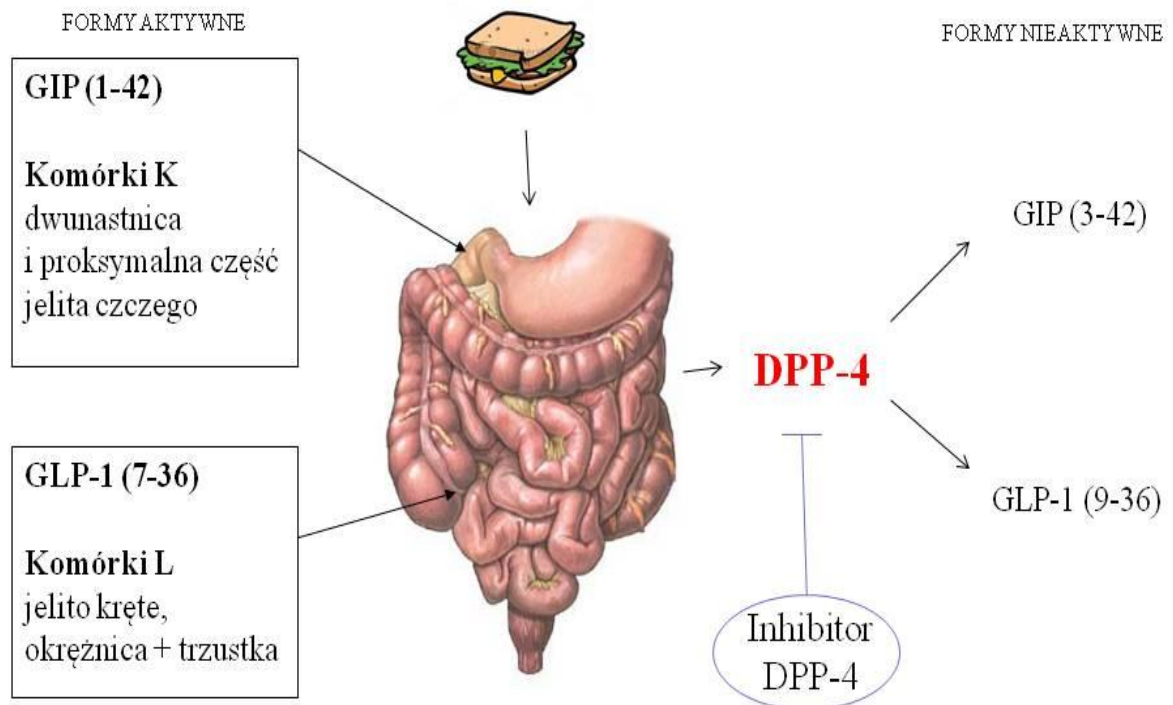
3.3.3.2 Synteza, wydzielanie i metabolizm GIP

GIP zbudowany z 42 aminokwasów powstaje z większego (153 aminokwasów) prekursorowego prohormonu proGIP [Rysunek 7 C]. GIP wydzielany jest pod wpływem przyjętego posiłku z komórek K zlokalizowanych głównie w dwunastnicy i proksymalnym odcinku jelita czczego oraz w mniejszym stopniu w ścianie całego jelita cienkiego [Rysunek 8]. Postuluje się, że wydzielanie GIP jest bardziej odpowiedzią na ilość zabiorbowanych składników odżywczych, niż na ich samą obecność w jelicie cienkim (76). Wydzielanie GIP jest mniejsze u ludzi z zaburzeniami wchłaniania, lub przyjmujących leki redukujące absorpcje składników pokarmowych w jelicie (77). Również rodzaj przyjętego pokarmu ma wpływ na ilość wydzielanego GIP – tłuszcze są największym aktywatorem sekrecji GIP u ludzi, natomiast węglowodany u gryzoni i świń (76). W badaniach in vitro na hodowlach endokrynych komórek pochodzących od królików, stwierdzono że aktywacja cyklazy adenylowej, wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, mediowana K^+ depolaryzacja błony komórkowej, glukoza oraz β -adrenergiczna stymulacja powodują wzrost sekrecji GIP (76).

U ludzi podstawowe przygodne stężenie GIP wynosi 0,06-0,1 nmol/l (w zależności od użytego zestawu). Poziom GIP wzrasta do 0,2-0,5 nmol/l po posiłku. Poziomy GIP są prawidłowe lub nieznacznie podwyższone w cukrzycy typu 2 (DMt2) (78).

Niedługo po przedostaniu się do układu krążenia, GIP ulega unieczynnieniu pod wpływem enzymu dipeptydylopeptydazy 4 (DPP-4) [Rysunek 8]. Jego aktywna forma, GIP 1-42, ma okres półtrwania ok. 2 minuty u gryzoni i około 7-8 minut u ludzi, zarówno zdrowych jak i z DMt2 (79).

Rysunek 8. Synteza aktywnych form GIP (1-42) i GLP-1 (7-36) w przewodzie pokarmowym pod wpływem pokarmu. Działanie DPP-4 w układzie krążenia i dezaktywacja inkretyn.



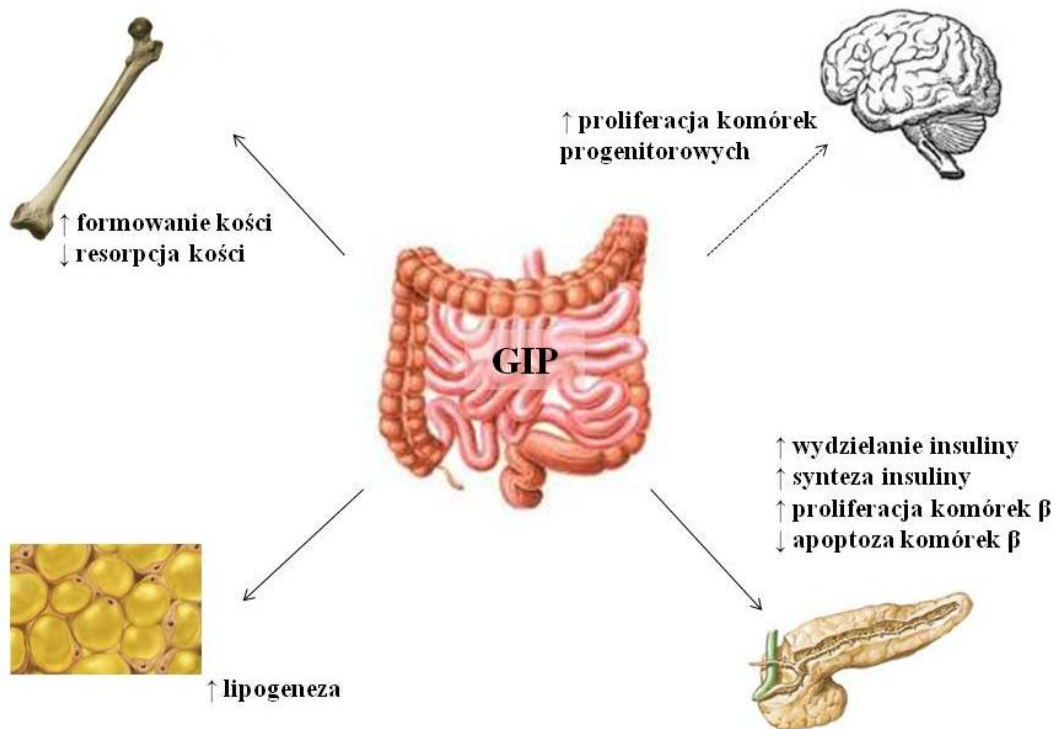
3.3.3.3 Receptor GIP (GIPR)

Ludzki gen dla receptora GIP (GIPR) składający się z 14 egzonów, jest zlokalizowany w 19 chromosomie (80). Ekspresję tego genu stwierdzono w komórkach trzustki, żołądka, jelita cienkiego, tkanki tłuszczowej, kory nadnerczy, przysadki, serca, jąder, komórkach endotelialnych, w kościach, tchawicy, śledzionie, grasicy, płucach, nerkach, tarczycy i w kilku regionach centralnego systemu nerwowego (CSN) (76, 80). Podobnie jak receptor dla GLP-1, GIPR jest siedmiohelikalnym transmembranowym receptorem, należącym do nadrodziny receptorów związanych z białkiem G. Aktywacja GIPR powoduje wzrost cAMP, wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia oraz wzrost aktywności kinaz PI-3K, PKA, PKB, MAPK i fosfolipazy A2. Koniec „N” GIPR i pierwsza przezbłonowa domena odpowiadają za przyłączanie cząsteczki GIP, aktywację receptora i sprzężanie cAMP, natomiast koniec „C” GIPR bierze udział w śródkomórkowym przekaźnictwie sygnału (76).

3.3.3.4 Funkcje biologiczne GIP

GIP ma podobne do GLP-1 oddziaływanie w komórkach β trzustki. Jednak poza tą rolą, odgrywa jeszcze wiele istotnych funkcji w innych tkankach [Rysunek 9].

Rysunek 9. Funkcje GIP w tkankach obwodowych [wg. Baggio LL & Drucker DJ 2007 (76)].



Trzustka

Główną rolą GIP jest zależna od glukozy stymulacja wydzielania insuliny z komórek β trzustki. Mechanizm tego procesu został opisany już powyżej – aktywacja GIPR w komórkach β powoduje wzrost cAMP, blok ATP-zależnych kanałów K^+ , wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} i stymulację egzocytozy. Również w regulującym wpływie GIP na błonowe kanały K^+ otwierane/zamykane napięciem, upatruje się mechanizmu modulacji wydzielania insuliny (81). Ponadto w komórkach β GIP nasila transkrypcję genu dla insuliny, zwiększając tym samym syntezę tego hormonu (76). GIP traci swój insulintropowy wpływ w warunkach przewlekłej hipoglikemii. Jego innym, o wiele słabszym efektem oddziaływania jest, również glukozozależna supresja wydzielania glukagonu z komórek α . U ludzi ten efekt jest nieistotny.

GIP stymulując proliferację i poprawiając przeżycie komórek β w warunkach niekorzystnych (działanie antyapoptotyczne), oddziałuje synergistycznie względem glukozy. W nielicznych badaniach *in vivo* na szczurach opisywano mechanizm antyapoptotyczny GIP poprzez sygnał PI-3K/PKB, dezaktywację czynnika transkrypcyjnego Foxo1 i redukcję ekspresji proapoptotycznego genu *bax* oraz zwiększenie aktywności antyapoptotycznego genu *bcl-2* (82). W badaniach *in vitro* na wyspowych liniach komórkowych, GIP redukuje biochemiczne markery związane z ER-stress (76).

Tkanka tłuszczowa

Ekspresja GIPR została stwierdzona również w tkance tłuszczowej. Rola GIP w kontroli metabolizmu lipidowego i jego udział w rozwoju otyłości jest nadal tematem badań naukowych. Przyjmowanie pokarmu bogatego w lipidy jest silnym stymulatorem sekrecji GIP u ludzi. U części otyłych osób stwierdza się podwyższony poziom tej inkretyny (83, 84). Oddziaływanie GIP w tkance tłuszczowej ma charakter anaboliczny. GIP wzmacnia syntezę i reestryfikację FFA, wzmacnia rozpoczęte przez insulinę „wbudowywanie” FFA do TG, zwiększa syntezę lipazy lipoproteinowej, natomiast redukuje zależną od glukagonu lipolizę (76). Jednak w badaniach opisywane są również lipolityczne efekty GIP. Myszy GIPR $-/-$ są odporne na dietę powodującą otyłość – rozwinęły niewielką tkankę tłuszczową mimo stosowania wysokotłuszczowej karmy przez kilka miesięcy (85).

W badaniach na otyłych myszach transgenicznym (*ob/ob*), ciągły wlew analogu GIPR (Pro3)GIP spowodował polepszenie tolerancji glukozy, wzmocnił wrażliwość na insulinę i zmniejszył nasilenie hipertrofii i hiperplazji komórek β spowodowanych otyłością (86).

Centralny system nerwowy (CSN)

W CSN ekspresja GIP została stwierdzona w hipokampie, natomiast ekspresja GIPR w niektórych regionach CSN jak kora, hipokamp, opuszka węchowa. W badaniach na szczurach *in vivo*, podaż egzogennej GIP powodowała proliferację komórek hipokampa. Podobną obserwację zanotowano w badaniach *in vitro* na hodowli komórek hipokampa pobranych od dorosłych osobników (87). Natomiast nie stwierdzono takiej odpowiedzi u GIPR $-/-$ myszy (87). Transgeniczne myszy z nadekspresją GIPR rozwijały o wiele lepszą koordynację czuciowo-ruchową w porównaniu do dzikiego szczepu. Rola GIP w CSN jest więc łączona z proliferacją komórek progenitorowych neuronów i modyfikacjami zachowania (76, 87).

Kości

Aktywacja GIPR w tkance kostnej powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego cAMP i Ca^{2+} , efektem czego jest formowania nowej kości poprzez wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej i mRNA typu 1 kolagenu (88). GIP zwiększa również gęstość mineralną kości w badaniach na modelu zwierzęcym pomenopauzalnej osteoporozy (76). Badania na szczurach i hodowlach komórkowych osteoklastów ujawniły, że GIP powoduje zahamowanie efektów resorpcji kości (89). Transgeniczne myszy GIPR -/- charakteryzują się niższymi parametrami tworzenia kości i zwiększonym poziomem Ca^{2+} w surowicy po przyjęciu posiłku. Sugeruje to, że GIP może odgrywać bezpośrednią rolę w wykorzystaniu Ca^{2+} pochodzącego z posiłku do formowania kości (76). W badaniach na ludziach krótkotrwała podaż GIP nie wywarła wpływu na markery kości otworzenia, jednak temat ten jest wciąż w trakcie badań - wpływ długotrwałego podawania GIP nie jest znany (76).

Inne tkanki

GIP hamuje wydzielanie kwasu żołądkowego, ale jedynie w dawkach przekraczających wartości fizjologiczne (90). GIP wzmacnia również transport heksoz w jelicie. W wątrobie, mimo że w tym organie nie wykryto GIPR, w sposób pośredni GIP zmniejsza zależną od glukagonu, endogenną produkcję glukozy (HGO) (76).

GIP stymuluje produkcję glikokortykoidów u szczurów, na drodze zależnego od cAMP/PKA szlaku sygnałowego. Nie wydaje się by GIP odgrywał rolę w regulacji wydzielania kortyzolu u zdrowych ludzi. Nadmierna ekspresja GIPR w gruczolakach kory nadnerczy obserwuje się również w zespole Cushinga (91).

GIP posiadając swoje receptory na komórkach endotelium, powoduje w tych komórkach wzrost stężenia Ca^{2+} . Dożylny wlew GIP powodował u psów wzrost wydzielania endoteliny-1 i wazokonstrykcję, lub nasilenie wydzielania tlenku azotu i wazodylatację – w zależności od rodzaju łożyska naczyniowego (76).

mRNA dla GIPR zostało wykryte jeszcze w innych tkankach, takich jak np. serce, płuca, jądra, ale fizjologiczna rola GIP w tych tkankach jeszcze nie została poznana. Nadal są prowadzone badania w tym kierunku, na razie głównie na zwierzętach.

3.3.4 Glukagonopodobny peptyd typu 1

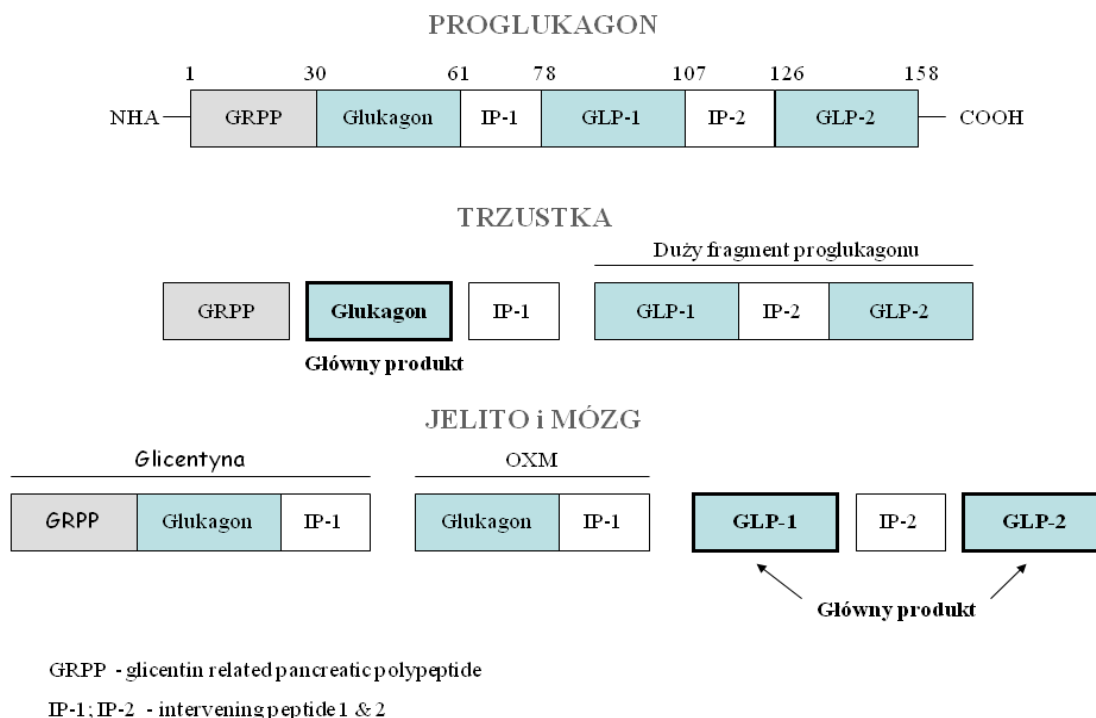
3.3.4.1 Gen proglukagonu – struktura oraz ekspresja w zależności od rodzaju tkanki

Jak opisano w podrozdziale zarysie historii badań nad inkretynami, w latach 80-tych XX wieku odkryto strukturę proglukagonu (72, 73). U ludzi gen proglukagonu jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 2, składa się z 6 egzonów i 5 intronów, przy czym egzon czwarty zawiera pełną sekwencję kodującą GLP-1 (92). Ekspresja tego genu została stwierdzona w komórkach α trzustki, w komórkach L jelita cienkiego, jak i w neuronach pnia mózgu i podwzgórza. Produkt transkrypcji i translacji genu we wszystkich wymienionych typach komórek jest identyczny (93), ale procesy potranslacyjne znacznie się w tych tkankach różnią (94).

W trzustce ekspresja genu proglukagonu jest aktywowana w warunkach hipoglikemii, a hamowana przez insulinę. W tej lokalizacji proglukagon jest rozszczepiany na glukagon oraz dwa nieaktywne biologicznie fragmenty: glicentynozależny polipeptyd trzustkowy (GRPP, *glicentin-related pancreatic peptide*) oraz główny fragment proglukagonu i dodatkowo białko pośrednie 1 (IP-1) [Rysunek 10]. Główny produkt – glukagon jest ważnym hormonem o przeciwstawnej roli do insuliny. Reguluje endogenną produkcję glukozy w wątrobie przez aktywację glikogenolizy i glukoneogenezy, równolegle z hamowaniem glikolizy. Glukagon odpowiada za utrzymanie odpowiedniego poziomu glukozy we krwi w okresie bycia na czczo.

Natomiast w komórkach L jelita cienkiego i neuronach z proglukagonu powstają glukagonopodobny peptyd typu 1 (*GLP-1, glucagon-like peptide-1*), glukagonopodobny peptyd typu 2 (*GLP-2, glucagon-like peptide-2*) oraz oksyntomodulina (OXM), glicentyna i białko pośrednie 2 (IP-2) (73, 95) [Rysunek 10]. Liczne funkcje GLP-1 związane z utrzymaniem homeostazy gospodarki węglowodanowej zostaną opisane w dalszej części tej pracy. GLP-2 aktywuje proliferację i hamuje apoptozę komórek w gruczołach jelita cienkiego (krypty jelitowe) (75). GLP-2 zwiększa transport glukozy w jelicie, zmniejsza ilość przyjmowanego pokarmu, spowalnia opróżnianie żołądka i hamuje wydzielanie kwasu solnego w żołądku (76). OXM oddziałuje anorektycznie przez hamowanie wydzielania żołądkowo-jelitowego, spowalnianie motoryki przewodu pokarmowego, przy jednoczesnym zwiększaniu wydzielania enzymów trzustkowych (95). Rola glicentyny jeszcze nie została dokładnie określona, wiadomo że działa troficznie na komórki jelita gryzoni (95).

Rysunek 10. Potranslacyjne przemiany proglukagonu w trzustce, jelicie cienkim i mózgu.



3.3.4.2 Synteza, wydzielanie, metabolizm GLP-1

O wiele silniejszy wpływ insulinotropowy niż GIP wywiera GLP-1. Prawie 70% odpowiedzi insulinowej na doustną podaż glukozy stanowi właśnie efekt inkretynowy spowodowany przez GLP-1. Polipeptyd ten syntetyzowany jest w komórkach L śluzówki jelita krętego i okrężnicy [Rysunek 8]. GLP-1 jest też produkowany, w znacznie mniejszym stopniu, przez trzustkę i podwzgórze (96). Główną aktywną frakcją, stanowiącą ok. 80% krążącej aktywnej formy tej inkretyny, jest GLP-1 (7-36) [Rysunek 8]. Inne występujące formy w organizmie to GLP-1 (7-37) oraz produkowane głównie przez trzustkę GLP-1 (1-36) oraz GLP-1 (1-37). Posiłek bogaty w węglowodany i tłuszcze jest pierwotnym, fizjologicznym aktywatorem wydzielania GLP-1. Doustna, ale nie dożylna podaż glukozy stymuluje wydzielanie GLP-1 u ludzi (97). Profil wydzielania tego hormonu po przyjęciu posiłku przebiega dwufazowo (z dwoma pikami). Pierwszy szczyt występuje po kilku minutach (max. 10-20 min) po posiłku, drugi zaś po około kolejnych 30-60 minutach (97). Świadczy to o tym, że wydzielanie GLP-1 regulowane jest zarówno przez czynniki neurohormonalne aktywowane obecnością pokarmu w przewodzie pokarmowym (pierwsza faza), jak również przez bezpośredni kontakt trawionego pokarmu z komórkami L śluzówki jelita cienkiego (druga faza). Kilka badań pokazało, że autonomiczny system nerwowy,

neurotransmitery GRP, acetylocholina, a nawet GIP (nie u ludzi) mogą mieć udział w mechanizmie szybkiego wyrzutu GLP-1 w jego pierwszej fazie wydzielania, po przyjęciu pokarmu. Rola nerwów błędnych w wydzielaniu GLP-1 została potwierdzona w badaniach na szczurach, w których po obustronnej wagotonii poniżej przepony, całkowicie zablokowano zależne od tłuszczów wydzielanie GLP-1. Następnie, u tych samych zwierząt, elektrycznie zasymulowano trzewne gałęzie nerwu błędnego, co spowodowało ponowny wzrost wydzielania GLP-1 we wcześniej odnerwionych jelitach (98). U ludzi, po zastosowaniu atropiny, niespecyficznego antagonisty receptora muskarynowego, dochodziło do zmniejszenia wydzielania GLP-1 w pierwszej fazie, po doustnej stymulacji glukozą – proces ten był niezależny od fazy opróżniania żołądka (76). Druga, późna faza wydzielania GLP-1 zachodzi po bezpośrednim kontakcie trawionego pokarmu z komórkami L śluzówki jelita cienkiego. Pod wpływem pokarmu powstają sygnały przenoszone do komórek L na drodze bezpośredniego kontaktu, ale również w sposób pośredni – przez neuronalne i endokrynne mediatory.

Leptyna, której receptory znajdują się na komórkach jelitowych L, również stymuluje wydzielanie GLP-1. Wysokotłuszczowa dieta stosowana u myszy, powodowała rozwój otyłości i związanej z nią leptynooporności, co znów zmniejszało wydzielanie wyjściowe GLP-1, jak i po stymulacji doustną glukozą (99).

Okres półtrwania GLP-1 wynosi ok. 1-2 minuty. GLP-1 jest inaktywowane w układzie krążenia, podobnie jak GIP, przez DPP-4 (100).

DPP-4, znana też jako CD26, jest proteazą serynową, która modyfikuje lub hamuje aktywność oligopeptydów lub białek posiadających alaninę lub prolinę w drugiej pozycji, odszczepiając dipeptyd od końca „N”. Zarówno GLP-1, jak i GIP zawierając alaninę w odpowiednim położeniu, są substratami dla DPP-4. Enzym ten posiada inne funkcje – wiąże kolagen i deaminazę adenozyne, odgrywa rolę w stymulacji i proliferacji limfocytów T. Ekspresja DPP-4 jest obecna w wielu tkankach, np. w płucu, nerkach, nadnerczach, wątrobie, trzustce, jelicie, śledzionie, CSN, jak i na powierzchni limfocytów i MØ. Tkanka tłuszczowa jest także miejscem powstawania i sekrecji DPP-4 rozkładającej inkretyny (101). Ponadto DPP-4 znajduje się na powierzchni komórek endotelialnych, również i tych występujących w naczyniach krwionośnych jelita cienkiego – miejsca produkcji GLP-1. W konsekwencji po przejściu przez krążenie wrotne i wątrobę, tylko 10-15% GLP-1 trafia do krążenia systemowego (102, 103). U osób zdrowych i u chorych z cukrzycą typu 2 (DMt2), dożylnie i podskórne podanie GLP-1 powoduje natychmiastowy, w przeciągu 30 minut, rozkład

metaboliczny aktywnej formy GLP-1 do nieaktywnej GLP-1(9-36)NH₂. Tak inaktywowane jest około 75% krążącej frakcji GLP-1 wykrytej w badaniu metodą immunodetekcji (104).

Główną drogą eliminacji GLP-1 są nerki. U szczurów, po obustronnej nefrektomii, obserwowano wydłużenie czasu półtrwania tego peptydu (105). U ludzi z niewydolnością nerek, stwierdzono wyższe poziomy GLP-1 niż u zdrowych osób (106). W dalszych badaniach uściślono, że tak naprawdę wyższy jest poziom metabolitów GLP-1 u ludzi z niewydolnością nerek, natomiast samo stężenie aktywnej formy GLP-1 było porównywalne do osób zdrowych (107). Powyższe badania dowiodły, że nerki są niezbędne do eliminacji GLP-1 i jego metabolitów.

U ludzi poziom GLP-1 w surowicy na czczo zwykle waha się między 5 a 10 pmol/l i wzrasta 2-3 krotnie po przyjęciu posiłku (76).

3.3.4.3 Receptor GLP-1 (GLP-1R)

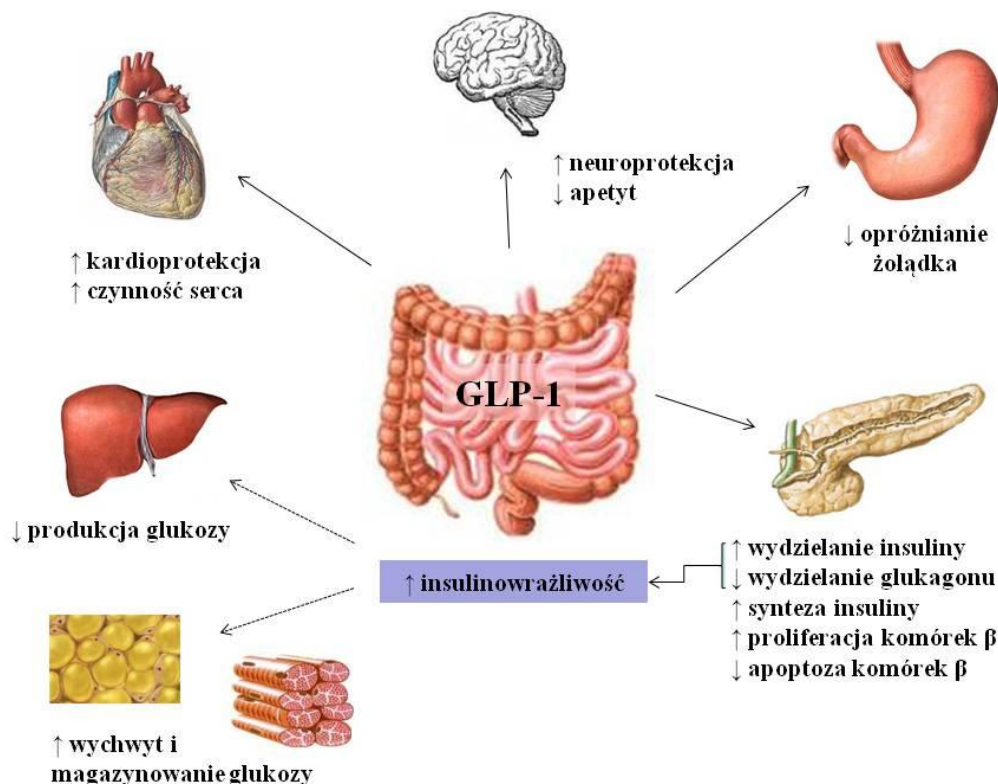
GLP-1 wywołuje efekt insulintropowy w komórce β poprzez wiązanie się ze swoistym receptorem (*GLP-1 receptor*, GLP-1R). GLP-1R jest siedmiohelikalnym transmembranowym receptorem, należącym do nadrodziny receptorów związanych z białkiem G. Gen GLP-1R znajduje się na 6 chromosomie i zawiera 7 egzonów. Po jego pobudzeniu, dochodzi do aktywacji cyklazy adenylowej A, zwiększenia stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP i wapnia. Stanowi to sygnał do egzocytozy ziarnistości zawierających insulinę. Ponadto aktywacja cyklazy A zwiększa biosyntezę insuliny oraz hamuje apoptozę, wzmacnia proliferację i działa promitotycznie na komórki β trzustki (103).

GLP-1R występuje również poza komórkami wydzielającymi insulinę (komórki α , δ trzustki, mózg, przysadka, obwodowy układ nerwowy, żołądek, jelita, nerki, płuca, serce, skóra) (108), umożliwiając szereg różnorodnych działań tego hormonu. Mimo, że ekspresja GLP-1R została stwierdzona w mięśniach i tkance tłuszczowej psa, ta lokalizacja GLP-1R u człowieka nie jest jednoznaczna, podobnie jak i w ludzkiej wątrobie (76).

3.3.4.4 Funkcje biologiczne GLP-1

GLP-1 oddziałuje w wielu tkankach obwodowych organizmu. Większość jego efektów jest wynikiem bezpośredniej interakcji z GLP-1R w odpowiednich tkankach. Natomiast w wątrobie, tkance tłuszczowej i mięśniach GLP-1 prawdopodobnie oddziałuje w sposób pośredni [Rysunek 11].

Rysunek 11. Rola GLP-1 w tkankach obwodowych [wg. Baggio LL & Drucker DJ 2007 (76)].



Trzustka

Główną rolą GLP-1 jest wspomniana już aktywność insulintropowa. Funkcja ta polega na zależnym od glukozy pobudzeniu syntezy insuliny na każdym jej etapie – od transkrypcji, po egzocytozę insuliny do krążenia systemowego. GLP-1 poprzez GLP-1R w komórkach β aktywuje cyklazę adenylową, co skutkuje zwiększeniem poziomu cAMP w komórce, będącym pierwotnym sygnałem do stymulacji sekrecji insuliny przez GLP-1 (76). Wzrost mitochondrialnej produkcji ATP prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej; zamknięcia i redukcji błonowych kanałów K^+ ATP-zależnych z następową depolaryzacją błony komórkowej komórek β i wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} poprzez napływ jego jonów z przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez zależne od napięcia kanały oraz mobilizację wewnątrzkomórkowych zapasów Ca. Wzrost wewnątrzkomórkowego ATP i poziomu Ca^{2+} stanowi główny czynnik stymulacji egzocytozy ziarnistości zawierających insulinę.

Ponadto GLP-1 działa synergistycznie z glukozą w promowaniu transkrypcji genu dla insuliny, stabilizacji mRNA, zwiększając tym samym syntezę tego hormonu (76).

Co jest ważne, do stymulacji wydzielania insuliny przez inkretyny dochodzi jedynie w warunkach hiperglikemii (nigdy na czczo i między posiłkami). Minimalne stężenie glukozy

we krwi, potrzebne do aktywowania efektu inkretynowego jest równe ok. 4,3 mmol/l (80 mg/dl). Jest to swoisty mechanizm zabezpieczający przed rozwojem hipoglikemii indukowanej inkretynami.

Poza tym GLP-1 uwrażliwia komórki β trzustki już odporne na insulinę, na działanie tego hormonu (109). GLP-1 wzmacnia ekspresję glukokinazy i transporterów glukozy oraz molekularnych komponentów sensorów dla glukozy.

Regulacja poposiłkowej gospodarki węglowodanowej przez GLP-1 polega również na glukozozależnej supresji wydzielania glukagonu z komórek α oraz stymulacji sekrecji somatostatyny. Zwiększenie produkcji somatostatyny zachodzi po bezpośredniej aktywacji GLP-1R na komórkach δ trzustki (76). Mechanizm supresji wydzielania glukagonu przez GLP-1 jest mniej jasny. Może przebiegać przez bezpośrednie oddziaływanie GLP-1 na swój receptor zlokalizowany na komórkach α , lub też w sposób pośredni – poprzez aktywację wydzielania insuliny i somatostatyny (110).

Liczne badania na zwierzętach dowodzą, że GLP-1 powoduje zwiększenie masy komórek β . Dzieje się tak poprzez stymulację ich proliferacji (111), neogenezę wysp trzustkowych z komórek prekursorowych (112) oraz poprzez hamowanie apoptozy komórek β (113). Mechanizm ten związany jest z wyżej wspomnianą aktywacją szlaku cAMP.

Centralny i obwodowy układ nerwowy.

GLP-1 oddziałuje przez swój receptor na obszary CSN odpowiedzialne za utrzymanie i regulację różnych procesów homeostatycznych, włączając w to zachowania związane z przyjmowaniem pokarmu, motorykę żołądka, czy funkcje sercowo-naczyniowe. GLP-1R zlokalizowany jest w zwojach nerwowych brzusznej części nerwów błędnych zawierających dośrodkowe włókna nerwowe prowadzące informacje do jądra pasma samotnego w pniu mózgu. Stąd informacje przekazywane są do podwzgórza i innych regionów przodomózgowia drogą drugorzędowych neuronów. Badania na gryzoniach pokazały, że centralna lub obwodowa podaż agonistów GLP-1R spowodowała krótkotrwale zmniejszenie ilości przyjmowanego pokarmu i wody, oraz redukcję masy ciała zwierząt (114). Natomiast u ludzi obwodowa podaż GLP-1R agonistów wpływała na uczucie sytości, zmniejszała ilość przyjmowanej energii i prowadziła do utraty masy ciała u zdrowych, z DMt2 i otyłych ochotników (115). GLP-1 i exendyna-4 (agonista GLP-1R) są małymi cząstkami molekularnymi, dlatego też łatwo dyfundują przez barierę krew-mózg i bezpośrednio oddziałują na CSN. Dodatkowo GLP-1 wpływa pośrednio na regulację przyjmowania

pokarmu poprzez swoją zdolność do zwalniania opróżniania żołądka – mechanizm opisany poniżej.

GLP-1 wykazuje działanie neurotroficzne i neuroprotektoryjne. Łącząc się ze swoistym receptorem GLP-1R zabezpiecza przed toksyczną dla centralnego systemu nerwowego aktywnością receptorów glutaminergicznych (116) i zmniejsza odkładanie złogów β -amyloidu (117). Otwiera to nowy kierunek w profilaktyce i terapii choroby Alzheimera. W innych badaniach wykazano neuroprotektoryjne działanie GLP-1 względem neuropatii obwodowej wywołanej pirydoksyną. Może będzie więc możliwe zastosowanie GLP-1 w leczeniu neuropatii cukrzycowej (118). W dotychczasowych badaniach odkryto jeszcze wiele innych oddziaływań inkretyn na ośrodkowy układ nerwowy jak na przykład korzystny wpływ na uczenie się i zapamiętywanie (119). Podaż GLP-1R agonistów polepszały proces uczenia się u szczurów. Mechanizm ten tłumaczony jest oddziaływaniem GLP-1 na hipokamp u tych zwierząt.

Układ pokarmowy

Agoniści GLP-1 wykazują hamujące działanie na wywołane gastryną, czy przyjęciem pokarmu produkcję kwasu żołądkowego i motorykę żołądka. GLP-1 poprzez zwolnienie opróżniania żołądka do dalszych części przewodu pokarmowego, łagodzi hiperglikemię poposiłkową. Podanie dożylnie analogów GLP-1R pacjentom z DMt2, ale też i z typem 1 tej choroby spowodowało w/w efekt (120, 121). Efekt ten wiąże się również raczej z obniżeniem, a nie wyższymi wartościami insuliny (120). Wysunięto hipotezę, że rola w hamowaniu opróżniania żołądka przez GLP-1 może być ważniejsza niż jego efekt inkretynowy w kontroli poposiłkowej glikemii.

Mechanizm hamowania opróżniania żołądka i wydzielania kwasu żołądkowego przez GLP-1 jest złożony. Ponieważ ekspresję GLP-1R stwierdzono również na komórkach okładzinowych żołądka, można przypuszczać, że GLP-1 oddziałuje bezpośrednio na te komórki. Jednakże zablokowanie sygnału z GLP-1R przez eksendynę (9-39), antagonistę dla tego receptora, albo przez uszkodzenie drogi dośrodkowej nerwu błędnego znosi całkowicie wpływ GLP-1 podanego ośrodkowo czy obwodowo, na opróżnianie żołądka (76). Muszą więc współdziałać zarówno efekty wywierane na sam żołądek, jak i te przebiegające w CSN.

Układ sercowo-naczyniowy.

Opublikowano również kilka badań dotyczących działania inkretyn, głównie GLP-1, na układ sercowo-naczyniowy. Udowodniono efekt kardioprotekcyjny tych hormonów, na

skutek poprawy metabolizmu glukozy w miocytach in vitro oraz zmniejszenie akumulacji mleczanu i pirogronianu w niedokrwionych tkankach zwierząt (122, 123). Na modelu zwierzęcym z nadciśnieniem i niewydolnością mięśnia sercowego, po zastosowaniu wlewu GLP-1, uzyskiwano wydłużenie życia spowodowane poprawą kurczliwości i frakcji wyrzutowej lewej komory. Dodatkowym czynnikiem ochronnym było zmniejszenie nasilenia apoptozy niedokrwionych kardiomiocytów przez spadek aktywności proapoptotycznej kaspazy-3 (124).

Ponadto wykryto działanie hipotensyjne inkretyn poprzez wazodylatację. Stwierdzono, że działanie naczyniorozkurczowe wywiera również produkt degradacji GLP-1, czyli GLP-1 (9-36), niezależnie od GLP-1R (125).

Mięśnie, tkanka tłuszczowa oraz wątroba

GLP-1 wzmacnia wbudowywanie glukozy do glikogenu w badaniach na hepatocytach i komórkach mięśniowych pobranych od szczurów. GLP-1 hamuje również HGO i wzmacnia wychwyt glukozy w tkance tłuszczowej i mięśniowej. W ludzkich mięśniach szkieletowych GLP-1 wzmacnia syntezę glikogenu i metabolizm glukozy. GLP-1 działa lipolityczne w tkance tłuszczowej szczurów (126), a u ludzi odgrywa obie role – lipolityczną i lipogeniczną (127).

Inne tkanki.

W badaniach na komórkach zwierzęcych stwierdzono aktywację przez GLP-1 produkcji TSH i LH. Centralne/dokomorowe podanie GLP-1 u szczurów zwiększyło osoczowe stężenie TSH, LH, kortykosteronu i wazopresyny oraz zaktywowało podwzgórzowe komórki neuroendokrynne u tych zwierząt (128). U ludzi krótkotrwały wlew dożylny spowodował wzrost jedynie ACTH i kortyzolu w surowicy (129).

U ludzi i u szczurów GLP-1R zostały odkryte również w płucach, tchawicy, mięśniówce gładkiej tętnicy płucnej, w pneumocytach typu II, gdzie aktywacja tych receptorów powoduje odpowiednio wzmożone wydzielanie śluzu, relaksację mięśniówki i wzrost produkcji surfaktantu (76). Jakkolwiek szczegóły działania GLP-1 w płucach nie są do końca poznane.

Coraz więcej prac badawczych potwierdza, że GLP-1 jest związane z regulacją gospodarki wodno-elektrolitowej. Ma działanie diuretyczne i natriuretyczne. Powoduje wzrost filtracji kłębuszkowej oraz hamowanie zwrotnej resorpcji sodu w proksymalnych cewkach nerkowych (130). U osób otyłych, u których obserwuje się hiperfiltrację, dożylny wlew GLP-1 zmniejszał hiperfiltrację kłębuszkową, wspierał wydalanie sodu i redukował sekrecję jonów

H⁺ (131, 132). Wspomniane badania potwierdzają funkcję nefroprotekcijną GLP-1. Należy pamiętać, że to właśnie nerki odpowiadają za wydalanie GLP-1 z organizmu. W momencie przewlekłej dysfunkcji nerek, dochodzi do wydłużenia czasu oddziaływania (wpływ na farmakodynamikę i farmakokinetykę) stosowanych w leczeniu cukrzycy analogów GLP-1 niepodlegających degradacji przez DPP-4 (131).

3.3.4.5 Zastosowanie inkretyn

Odkrycie i poznanie opisanych wyżej funkcji i ról GIP i GLP-1 w organizmie [podsumowanie w Tabeli 3 i Tabeli 4], pozwoliło poszukiwaniu nowych zastosowań inkretyn w medycynie.

Tabela 3. Plejotropowe działanie inkretyn.

TRZUSTKA
• Potęgowanie glukozależnego wydzielania insuliny • Uwrażliwienie komórek β trzustki na glukozę • Nasilanie transkrypcji genu dla insuliny • Nasilenie egzocytozy i wyrzutu insuliny z komórek β • Działanie cytoprotekcyjne względem komórek β (stymulacja neogenezy i proliferacji; hamowanie apoptozy komórek β) • Hamowanie wydzielania glukagonu • Pobudzanie wydzielania somatostatyny
WĄTROBA
• Hamowanie produkcji glukozy (HGO) • Wzrost syntezy i magazynowania glikogenu w warunkach hiperglikemii
PRZEWÓD POKARMOWY
• Zwolnienie opróżniania żołądka • Hamowanie wydzielania soku żołądkowego • Wzmoczenie uczucia sytości, zmniejszenie ilości przyjmowanego pokarmu
OŚRODKOWY UKŁAD NERWOWY
• Wzmoczenie uczucia sytości, zmniejszenie ilości przyjmowanego pokarmu • Zmniejszenie masy ciała • Oddziaływanie neurotroficzne i neuroprotekcyjne (↑ proliferacji kom. progenitorowych)
UKŁAD SERCOWO-NACZYNIOWY (badania przeprowadzone na zwierzętach)
• Poprawa metabolizmu kardiomiocytów • Zmniejszenie gromadzenia mleczanów i pirogronianów w tkankach niedokrwionych • Poprawa kurczliwości i zwiększenie frakcji wyrzutowej lewej komory • Zmniejszenie nasilenia apoptozy kardiomiocytów po niedokrwieniu • Poszerzenie naczyń i obniżenie ciśnienia tętniczego

Tabela 4. Porównanie siły oddziaływania GLP-1 w stosunku do GIP.

FUNKCJA	GLP-1	GIP
Efekt insulinotropowy	++	+
Glukagon	↓↓	↓
Uwalnianie glukozy z wątroby (HGO)	↓↓↓	↓
Opróżnianie żołądka	↓↓	↓
Uczucie sytości	↑	Ø
Masa ciała	↓	Ø
Regeneracja komórek β	↑↑	↑

Obecnie przeciwcukrzycowa rola inkretyn jest dobrze poznana. Ponieważ jednym z głównych mechanizmów patogenetycznych DMt2 jest zmniejszenie wydzielania insuliny na bodziec pokarmowy, skłoniło to naukowców do poszukiwania związków naśladujących działanie inkretyn jak i związków hamujących ich rozkład (133). Już od wielu lat inkretyny, ich mimetyki i inhibitory DPP-4 są wykorzystywane do leczenia cukrzycy typu 2. Ten dział klinicznej nauki, metody i same preparaty wciąż są udoskonalane.

Odkrycie wysokiej ekspresji receptorów dla GLP-1 na niektórych zmianach rozrostowych pochodzących z tkanek neuroendokrynnych i systemu nerwowego, szczególnie w przypadku insulinoma, jak również raka rdzeniastego tarczycy, gastrinoma oraz pheochromocytoma, przyniosło przełom w diagnostyce tych zmian (134). Dotychczas stosowane metody obrazowania i lokalizacji wyspiaków, wliczając w to somatostatynową scyntyografię receptorową (ang. *Somatostatin Receptor Scintigraphy*, SRS) ze znakowanymi analogami somatostatyny, były niewystarczające w 50% przypadków. Wysunięto tezę, że scyntygrafia z zastosowaniem znakowanych analogów GLP-1 może stać się w przyszłości podstawową metodą diagnostyczną dla tego rodzaju zmian (135), zastępując SRS. Innymi nowotworami odznaczającymi się nieco niższą, ale wciąż znaczącą ekspresją tychże receptorów są guzy neuroendokrynnego płuc, rak rdzeniasty tarczycy, paraganglioma, meningioma oraz astrocytoma (134).

U osób ze zmianami nowotworowymi, u których w wyniku diagnostyki SRS nie udało się uwidocznić patologicznego gromadzenia znacznika, ponieważ zmiany te nie wykazują ekspresji receptorów somatostatynowych, możliwość wykonania badania scyntygraficznego z wykorzystaniem analogów GLP-1, wiążących się do receptora tej inkretyny, może stać się dla nich jedyną alternatywą umożliwiającą ponadto przeprowadzenie celowanej terapii izotopowej.

Wykonano pierwsze bardzo udane próby zobrazowania zmian typu insulinoma na modelach zwierzęcych oraz u ludzi (136). Sugeruje się nawet, że wykorzystanie ekspresji receptora GLP-1 w przypadku insulinoma może stać się w przyszłości standardowym podejściem do obrazowania oraz terapii tego nowotworu.

3.4 Badane w niniejszej pracy polimorfizmy i ich znaczenie w rozwoju otyłości oraz cukrzycy typu 2.

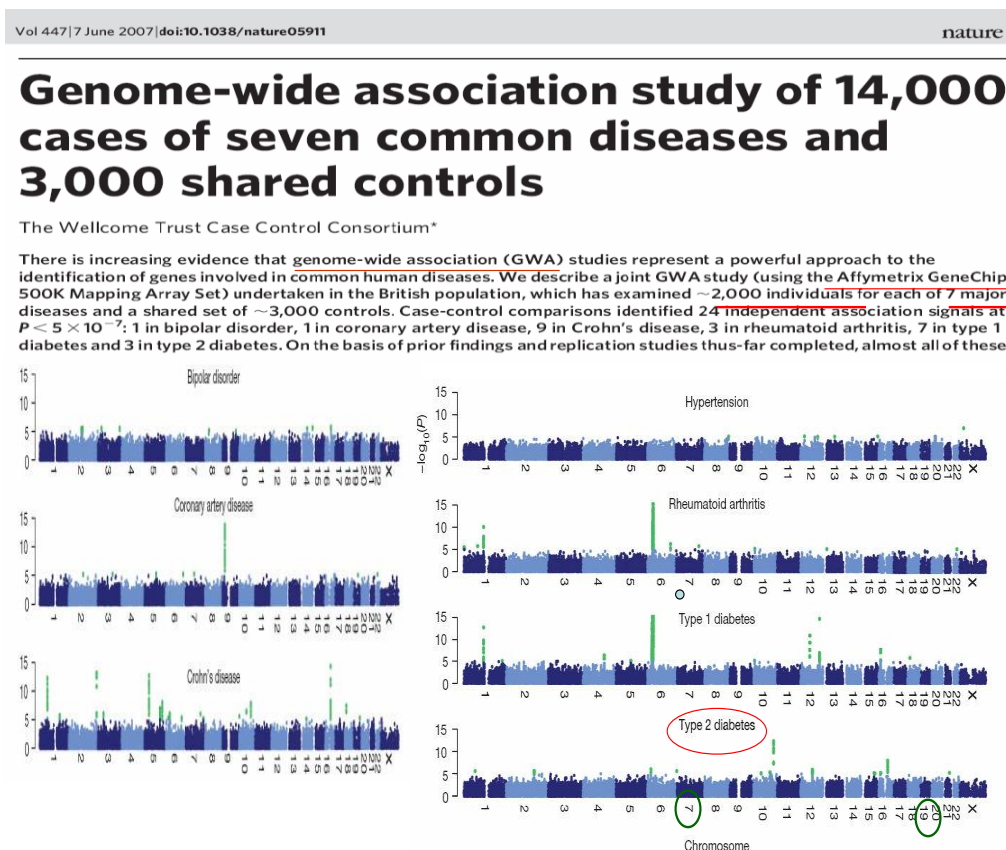
Otyłość należy do chorób o podłożu wielogenowym, w których istotną rolę odgrywają nie tylko oddziaływania typu środowisko-gen, ale także gen-gen (137). Oczywiście istnieje kilka przypadków mutacji pojedynczych genów (np. genu leptyny lub jej receptora) będących monogeniczną postacią otyłości, ale występują one niezmiernie rzadko w populacjach na świecie (138). Częstszą, choć nadal rzadką pod względem wyników badań genetycznych postacią jest otyłość towarzysząca wrodzonym zespołom chorób genetycznych czy zaburzeń hormonalnych np. Zespół Prader-Willego, policystycznych jajników, zespół Cushinga (139).

Wśród grup/ścieżek metabolicznych polimorfizmu genów białek związanych z otyłością można zaliczyć geny białek regulujących apetyt, metabolizm lipidów i węglowodanów, różnicowania się preadipocytów, ale i polimorfizm czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję tych genów (137, 138). Ponadto w ostatnich latach wykryto dodatkowy epigenetyczny mechanizm regulacji ekspresji genów będący podstawą tzw. „pamięci metabolicznej” tzn. indukowalnej, przejściowej w niektórych przypadkach zmienionej ekspresji genów (w tym także genów białek odczynu immunologiczno-zapalnego, enzymów przemian metabolicznych), mimo normalizacji poziomu substratów energetycznych, a zwłaszcza glukozy (140). Polega on na epigenetycznej modyfikacji materiału jądrowego: zarówno DNA jak i histonów, czynników transkrypcyjnych. Chodzi tu głównie o metylację i acetylację (ale i suomyłację, ubikwitynację i in.), które na długi okres zmieniają ekspresję genów, modyfikując aktywność procesów metabolicznych jak i odczynu

immunologiczno-zapalnego i w konsekwencji nasilenie powikłań zespołu metabolicznego i cukrzycy. Jest to nowa dziedzina wiedzy wymagająca dalszych badań (140).

Badania asocjacyjne genomu ludzi (GWA- *genome wide association study*) wykazały tylko parę regionów (*loci*) na chromosomach znacząco wpływających na rozwój cukrzycy typu 2 u ludzi (141) [Rysunek 12]. Znamienne, że znajdują się w nich polimorfizmy genów odpowiedzialnych m.in. za insulinowrażliwość, różnicowanie się tkanki tłuszczowej (preadipocytów), poziom FFA w krążeniu, odpowiedź immunologiczno-zapalną, a mianowicie geny *TCF7L2* (*Transcription Factor 7-like 2*) i gen czynnika proliferacji peroksysomów *PPAR-gamma* (*peroxisome proliferator-activated receptor*) (141) [Rysunek 13].

Rysunek 12. Fragment pierwszej strony raportu dotyczącego GWA - przedstawienie graficzne nowo poznanych miejsc lokacji w chromosomach SNP-ów/mutacji związanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju min. cukrzycy typu 2 (ostatnia rycina – zielone znaczniki w chromosomie 10, 12 i 16).



Rysunek 13. Wykres przedstawiający graficznie udział genów *TCF7L2* i *PPARγ* w rozwoju cukrzycy typu 2 [wg. Frayling TM 2007 (141)].

Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes etiology.

Nature Review Genetics, 2007;8:657-662

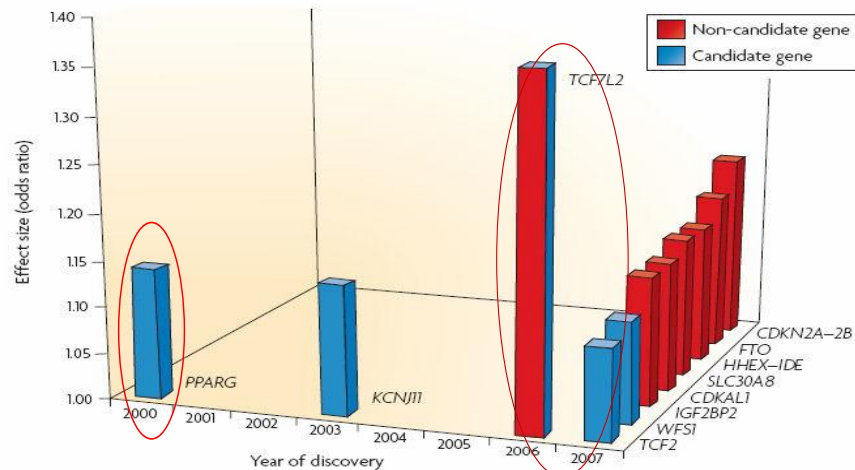


Figure 2 | Effect sizes of the 11 common variants confirmed to be involved in type 2 diabetes risk. The x axis gives the year that published evidence reached the levels of statistical confidence that are now accepted as necessary for genetic association studies. CDKAL1, CDK5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1; CDKN2, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; FTO, fat mass and obesity-associated; HHEX, haematopoietically expressed homeobox; IDE, insulin-degrading enzyme; IGF2BP2, insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2; KCNJ11, potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11; PPARC, peroxisome proliferator-activated receptor-γ gene; SLC30A8, solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8; TCF2, transcription factor 2, hepatic; TCF7L2, transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box); WFS1, Wolfram syndrome 1.

3.5 3.4.1 Polimorfizmy genu *TCF7L2*

Ścieżka sygnałowa WNT

Czynnik transkrypcyjny *TCF7L2* jest składową ścieżki sygnałowej Wnt, która hamuje różnicowanie się komórek progenitorowych do adipocytów (142, 143). Po raz pierwszy ta ścieżka sygnałowa została wykryta w czasie badań nad rakiem jelita grubego oraz rozwojem embrionalnym (144). Głównym efektem klasycznej ścieżki WNT jest dwudzielny czynnik transkrypcyjny złożony z β-kateniny (β-kat) i jednego z czterech przedstawicieli rodziny czynników limfocytów T: (ang. *T cell factor*, TCF) – TCF7 (znany też jako TCF-1), LEF-1 (ang. *lymphoid enhancer-binding factor*), TCF7L1 (znany też jako TCF-3) oraz TCF7L2 (znany też jako TCF-4) (145). Jednak to TCF7L2 jest głównym partnerem β-kat w komórkach epitelium jelita (146).

Aktywatory szlaku WNT działają poprzez receptory Frizzled (ang. *Frizzled receptors*) oraz co-receptor LRP5/6 (ang. *LDL receptor-related protein 5/6*). Sygnał jest przekazywany dalej przez białko Dv1 (ang. *Dishevelled protein*), β-kat przedostaje się do jądra

komórkowego, gdzie po połączeniu z członkiem rodziny TCF formuje kompleks, który aktywuje kolejne docelowe geny (145). Jednym z zadań szlaku Wnt jest zahamowanie różnicowania się komórek progenitorowych (w tym preadipocytów tkanki tłuszczowej) w celu zachowania w ustroju puli komórek progenitorowych niezbędnych do regeneracji tkanek dorosłego organizmu.

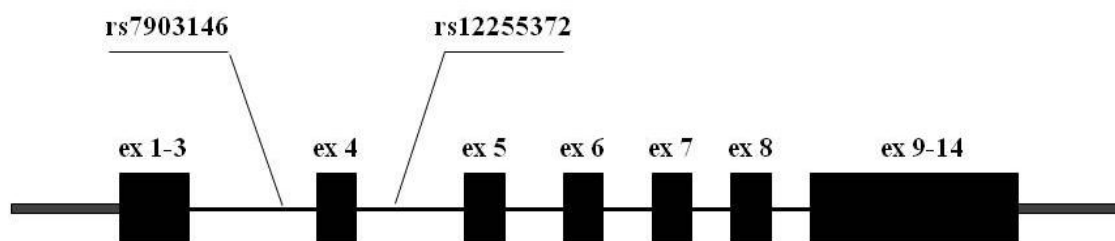
Wiele badań *in vitro* oraz *in vivo* pokazało, że niektóre komponenty szlaku WNT są związane z nasileniem proliferacji komórek beta trzustki (147, 148), normalizacją metabolizmu lipidów, zależną od poziomu glukozy sekrecją insuliny (149) oraz ze zwiększeniem generacji jednej z inkretyn - GLP-1 poprzez reguluje ekspresję genu *Gcg* w komórkach L jelita cienkiego (146, 150).

Struktura genu *TCF7L2* oraz poznane polimorfizmy

W 2006 roku na Islandii przeprowadzono badanie, w którym genotypowano 228 markerów mikrosatelitarnych w dwóch grupach pacjentów - ochotników zdrowych i z DMt2 (151). Badania ujawniły, że dziedziczenie specyficznego polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) genu *TCF7L2*, zwiększa ryzyko rozwoju DMt2. Gen *TCL7F2* leży na długim ramieniu chromosomu 10 – 10q25.3. Wykryto związek z mikrosatelitą, DG10S478, zlokalizowaną w intronie 3 tego genu, a występowaniem DMt2 (151). Później badanie było rozszerzone na inne populacje – duńską i amerykańską. Badacze wykryli, że dwa z badanych SNP genu *TCF7L2*, rs12255372 oraz rs7903146 w zakresie intronów 4 i 5, są silnie związane z DG10S478 i wykazują podobny wpływ na zwiększenie ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 (151) [Rysunek 14]. To odkrycie spowodowało, że wiele różnych ośrodków na całym świecie rozpoczęło badania nad *TCF7L2*. Oba wyżej opisane SNPy występują często u Europejczyków i Amerykanów, natomiast rzadziej u Azjatów (152). Wykryto jeszcze inne SNP tego genu związane z rozwojem DMt2 m.in. rs290487 wśród chińskiej populacji w Tajwanie, oraz rs11196218 wśród Chińczyków z Hong Kongu. Jednak dwa pierwsze SNPy wymienione wyżej, zwłaszcza rs7903146, wykazują najmocniejszy związek z DMt2 (153). W 2007 roku badanie GWA potwierdziły te zależności (141).

Wymienione polimorfizmy *TCF7L2* zwiększają ryzyko DMt2 przez upośledzenie akumulacji kwasów tłuszczowych w adipocytach. Wysoki poziom FFA we krwi upośledza funkcję komórek beta trzustki drogą opisanego powyżej mechanizmu glukolipotoksyczności i prowadzi do rozwoju cukrzycy typu 2 nawet przy niewielkiego stopnia otyłości (22, 25).

Rysunek 14. Gen TCF7L2 – zaznaczone miejsca SNP: rs7903146 oraz rs12255372.



3.4.2 Receptory jądrowe aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPAR)

Receptory jądrowe aktywowane przez proliferatory peroksysomów PPAR, są czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi przez drobnocząsteczkowe ligandy, którymi w warunkach naturalnych są wielonienasycone kwasy tłuszczowe i ich pochodne. Po związaniu z ligandem PPAR wiąże się z innym jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym – receptorem retinoidu X (*retinoid X receptor*, RXR). Dopiero tak powstały heterodimer stanowi aktywny czynnik transkrypcyjny, który wiąże się z odpowiednim miejscem docelowych promotorów genów (154).

Obecnie znane są trzy białka PPAR: PPAR- α , PPAR- β (zwany również PPAR- δ lub NUC1) oraz PPAR- γ (154). PPAR - α znajduje się przede wszystkim w brunatnej tkance tłuszczowej, nerkach oraz w mięśniu serca i mięśniach szkieletowych. PPAR- β występuje w wielu tkankach organizmu, ale najwyższa ekspresja tego białka jest odnotowywana w przelyku, nerkach i sercu. PPAR- γ zaś jest charakterystyczne głównie dla tkanki tłuszczowej, jelit, siatkówki, jak również dla wielu struktur układu immunologicznego (155). Polem oddziaływania całej rodziny białek PPAR jest gospodarka węglowodanowo-lipidowa.

Podrodzina PPAR- α o działaniu przeciwzapalnym, obniża poziom triglicerydów głównie przez hamowanie syntezy, przy równoczesnym nasileniu ich katabolizmu i zwrotnego transportu estrów cholesterolu do wątroby (154, 155). Funkcja PPAR- β nie została do tej pory jasno sprecyzowana, najprawdopodobniej również uczestniczy w procesie przemian lipidów głównie mięśni (154, 155), a także w implantacji zarodka u myszy (156). PPAR- β i PPAR- γ współuczestniczą w różnicowaniu się tkanki tłuszczowej i regulacji ekspresji genów metabolizmu energetycznego mięśni szkieletowych (154).

PPAR- γ bierze udział w procesie różnicowania i dojrzewania adipocytów, zwiększa insulinowrażliwość tkanek obwodowych, a co za tym idzie zmniejszenia pozakomórkowego stężenia glukozy (154, 155). Poza tym rodzina PPAR- γ z ich koaktywatorem transkrypcyjnym, białkiem PGC-1 alfa bierze udział w regulacji ekspresji genów związanych

z kontrolą mitochondrialnej biogenezy. Reguluje syntezę ilościową samych mitochondriów jak i białek przemian energetycznych mitochondriów, wpływając również na ich aktywność (157) Kontroluje to nie tylko ilość generowanego ATP w komórce, ale przez regulację ekspresji tzw. białek rozprzegających błony mitochondrialnej UCP (*uncoupling proteins*) reguluje termogenezę organizmu i zapobiega generacji wolnych rodników w trakcie OXPHOS przez przeciążone substratami mitochondria (158, 159) W mięśniach szkieletowych, w mniejszym stopniu w BAT indukowana jest UCP-3, gdy w tkance tłuszczowej UCP-1 i UCP-2. Aktywacja PPAR odpowiedzialna jest za zmianę metabolizmu wątroby w okresie głodzenia (glikogenoliza i glukoneogeneza) np. przez regulację ekspresji genów enzymów PEPEC, glukozy-6 fosfatazy itd. Istnieją również doniesienia o istotnej roli PPAR- γ w procesach immunoregulacji i kontroli procesu zapalnego (155).

Używane w terapii insulinooporności aktywatory PPAR-ów (np. tiazolidinediony), mogą równolegle do wzrostu insulinooporności powodować u chorego akumulację lipidów w tkance tłuszczowej i przybór masy ciała (160).

Struktura genu PPAR- γ oraz poznane polimorfizmy

Ludzki gen PPAR- γ znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 3 – 3p25. Składa się z 9 eksonów: A1, A2, B oraz 1, 2, 3, 4, 5, 6. Z uwagi na alternatywny start miejsca transkrypcji oraz zjawisko alternatywnego składania pierwotnego transkryptu powstają, pod kontrolą oddzielnych promotorów, trzy izoformy mRNA: PPAR- γ 1 (charakterystyczna dla tkanki tłuszczowej, mięśniowej, serca i wątroby), PPAR- γ 2 (głównie w tkance tłuszczowej) i PPAR- γ 3 (w tkance tłuszczowej i jelicie grubym), różniące się końcem 5' (155, 161). Ekspresja genu *PPAR- γ* zależy m.in. od insuliny i dostępności pokarmu, a zwłaszcza wolnych kwasów tłuszczowych. Mimo istnienia trzech lizoform mRNA PPAR- γ , powstają tylko dwie izoformy białka: PPAR- γ 1 oraz PPAR- γ 2. To drugie jest dłuższe o 28 aminokwasów na N-końcu, co jest rezultatem transkrypcji i translacji eksonu B. Eksony A1 i A2 nie ulegają translacji, skutkując tym, że izoformy mRNA PPAR- γ 1 i PPAR- γ 3 są matrycą do powstania tego samego białka (155, 161).

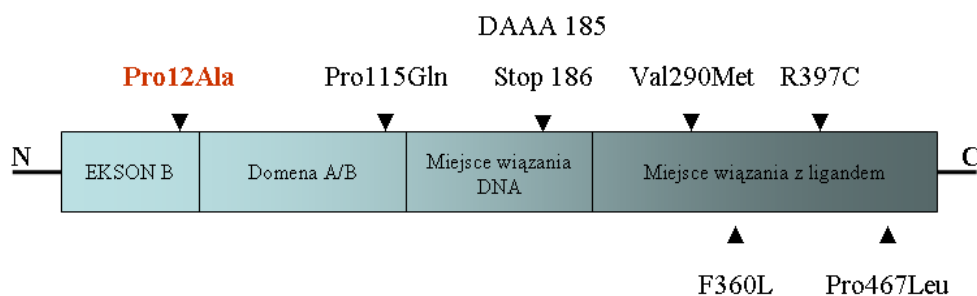
Częściej występujące u człowieka białko PPAR- γ 1 jest charakterystyczne dla hepatocytów i makrofagów, natomiast rzadsze białko PPAR- γ 2 znajduje się głównie w adipocytach (155, 161). Ogólnie najwyższe stężenie białek PPAR- γ jest w jelicie grubym, średnie w wątrobie, nerkach, jelicie cienkim i szpiku kostnym, podczas gdy w tkance mięśniowej znajdują się go jedynie śladowe ilości (155, 162). W ciągu ostatnich paru lat udowodniono również obecność PPAR- γ w komórkach układu immunologicznego - limfocytach i makrofagach (155).

W białku PPAR- γ można wyróżnić kilka domen czynnościowych. Przy N-końcu znajduje się regulowana fosforylacją domena, warunkująca niezależną od liganda aktywację transkrypcji (domena A/B). Środkowa część białka to domena odpowiedzialna za wiązanie DNA (DBD), zaś koniec C jest miejscem łączenia ligandu (LBD) oraz kofaktorów ułatwiających lub hamujących transkrypcję. Po złączeniu z ligandem i RXR, PPAR- γ przyłączają się do sekwencji wzmacniającej (PPRE, *peroxisome proliferator response element*) genów docelowych, początkując proces powstawania wielu ważnych białek biorących udział w różnicowaniu adipocytów, w metabolizmie lipidów oraz w przemianach węglowodanów. Wspomniany dodatkowy ekson B odpowiada za odcinek N-końca izoformy białka PPAR- γ 2 i jest odpowiedzialny za 5-6 krotnie większą wrażliwość tkanek na insulinę w porównaniu z izoformą PPAR- γ 1 (163).

Polimorfizm genu PPAR-gamma (Pro12Ala)

Do tej pory opisano kilka mutacji genu wpływających na funkcję PPAR- γ 2 i wykazujących silny związek z otyłością (164) [Rysunek 15]. Najczęściej występującą, (zwłaszcza a Europy), mutacją związaną z powstaniem zespołu metabolicznego i otyłości jest polimorfizm Pro12Ala genu PPAR- γ 2. Polimorfizm ten związany jest z mutacją punktową powodujący podstawienie guaniny zamiast cytozyny (C $\rightarrow$ G) w kodonie 12 (34 nukleotydy) eksonu B izoformy PPAR- γ . Powoduje to zmianę kodu aminokwasu proliny na alaninę (CCA $\rightarrow$ GCA). Klinicznie, osoby ze zmutowanym allelem mają niższą aktywność biologiczną receptora, co skutkuje mniejszym powinowactwem receptora do DNA i mniejszą transkrypcją białek zależnych od PPAR- γ . U tych osób obserwuje się również mniejszą o ok. 20-30% aktywność lipazy lipoproteinowej, a także oksydazy acylo-CoA w tkance tłuszczowej (165). Allel Ala genu PPAR γ 2 wpływając na czynność wydzielniczą tkanki tłuszczowej, zmniejsza masę ciała, poprawia insulinowrażliwość, przez co chroni przed rozwojem cukrzycy.

Rysunek 15. Wykryte dotychczas mutacje w strukturze białka PPAR- γ 2 (białko charakterystyczne dla adipocytów).



4 Cele pracy

Celem dysertacji jest przebadanie i porównanie wpływu wolnych kwasów tłuszczowych i glikemii we krwi na uwalnianie inkretyn w okresie poposiłkowym u osób zdrowych, oraz z zespołem metabolicznym zwłaszcza u nosicieli alleli wybranych genów promujących wyższe stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy (zgodnie z wynikami badania *genome association study* (GWA)).

Weryfikacji zostaną poddane następujące hipotezy badawcze:

- czy doustnie przyjęte lipidy są podobnym do glukozy aktywatorem inkretyn w okresie między posiłkami jak i w okresie poposiłkowy
- czy w zespole metabolicznym dochodzi do osłabienia uwalniania inkretyn w okresie poposiłkowym po doustnych testach funkcjonalnych - DTTL i DTTG
- czy uwalnianie inkretyn wiąże się z nosicielstwem alleli T polimorfizmu rs7903146 genu *TCF7L2* oraz alleli C polimorfizmu Pro12Ala rs1801282 genu *PPAR γ 2*, związanych wg GWA ze zmienioną zdolnością różnicowania tkanki tłuszczowej, a co za tym idzie różnym stężeniem FFA w krążeniu

Wykrycie różnic w wydzielaniu inkretyn w zależności od rodzaju przyjmowanego pokarmu może mieć wartość praktyczną, zarówno w ocenie wystąpienia zagrożenia spadku uwalniania inkretyn w okresie przedcukrzycowym (adaptacyjnej hipertrofii komórek beta wysp trzustki) i zagrożenia rozwojem cukrzycy typu 2 w przebiegu otyłości/zespołu metabolicznego. Może pozwoli to w przyszłości na rozwój badań mających na celu wczesne wprowadzenie postępowania prewencyjnego w postaci obligatoryjnego porównywania testów funkcjonalnych DTTG i DTTL w wykryciu wczesnych zmian w uwalnianiu cytoprotekcyjnych dla komórek trzustki inkretyn, jak i działań protekcyjnych: modyfikacji stylu życia, czyli wdrożenia odpowiedniej diety (procentowa zawartość węglowodanów w stosunku do lipidów- np. kwasów tłuszczowych n-3) i zwiększenia wysiłku fizycznego u osób zagrożonych ryzykiem rozwoju cukrzycy (obciążonych: wywiadem rodzinnym, otyłością, nadciśnieniem tętniczym, dyslipidemią).

5 Materiał i metody

5.1 Badana grupa

Do badań zakwalifikowano 100 osób, ale ukończyło je (wykonanie obu testów) tylko 70 osób. Do grupy badanej zakwalifikowano 50 osób, 22 kobiet i 28 mężczyzn w wieku od 25 do 73 lat (średnio $53,39 \pm 11,86$), ze wskaźnikiem masy ciała (BMI) powyżej 30 kg/m^2 , z objawami zespołu metabolicznego (5). Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników ze średnim BMI w zakresie 24 kg/m^2 , dobranych pod względem wieku i płci do grupy badanych pacjentów z zespołem metabolicznym. Ostatecznie w grupie kontrolnej pełne wyniki uzyskano u 18 osób, 11 kobiet i 7 mężczyzn w wieku od 28 do 62 lat (średnio $43,5 \pm 11,53$) - wycofanie się z badań bez podania przyczyny dwóch mężczyzn. Ochotnikami byli pacjenci Poradni Kliniki Endokrynologii UJ CM oraz Poradni Leczenia Otyłości i Zaburzeń Lipidowych działającej przy Katedrze Biochemii Klinicznej UJ CM.

Diagnostykę zespołu metabolicznego przeprowadzono w oparciu o kryteria IDF (International Diabetes Federation) z 2005 roku (5):

- otyłość brzuszna (obwód talii u pochodzących z Europy mężczyzn $\geq 94 \text{ cm}$, natomiast u kobiet $\geq 80 \text{ cm}$) i dodatkowo współistnienie co najmniej 2 z poniższych odchyleń:
 - triglicerydy $\geq 1,7 \text{ mmol/l}$ (150 mg/dl) lub leczenie dyslipidemii
 - cholesterol HDL $< 1,0 \text{ mmol/l}$ (40 mg/dl) u mężczyzn
 - $< 1,3 \text{ mmol/l}$ (50 mg/dl) u kobiet lub leczenie dyslipidemii
 - ciśnienie tętnicze $\geq 130/85 \text{ mmHg}$ lub leczenie nadciśnienia tętniczego
 - glikemia na czczo $\geq 5,6 \text{ mmol/l}$ (100 mg/dl) lub leczenie cukrzycy typu 2

Jednakże w tym projekcie cukrzyca typu 2 oraz leczenie farmakologiczne dyslipidemii stanowiło czynnik dyskwalifikujący z uczestnictwa w badaniach.

Do badania nie kwalifikowano następujących osób:

- z wcześniej zdiagnozowaną cukrzycą
- stosujących farmakoterapię, mogącą wpływać na wyniki badań biochemicznych (np. leki hipoglikemizujące, wpływające na gospodarkę lipidową)
- z poważnymi, chronicznymi chorobami narządowymi (np. niewydolność nerek, ciężką niewydolnością krążenia – III i IV stopień wg NYHA)

- z chorobami przewodu pokarmowego (w tym wątroby)
- ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową
- kobiet w ciąży i połogu
- z innymi ciężkimi chorobami (w tym zakaźnymi)

Projekt otrzymał zgodę Komisji Bioetycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (*Opinia nr KBET/136/B/2007 z dnia 20 grudnia 2007 roku*). Po otrzymaniu szczegółowych informacji dotyczących projektu badawczego, wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniu (także genetycznym).

5.2 Protokół badania

Po wstępnej kwalifikacji lekarskiej, osoby zrekrutowane pozostawały na swojej dotychczasowej diecie oraz nie zmieniały aktywności fizycznej przez okres 2 tygodni. Ponadto wszyscy byli proszeni o nieprzyjmowanie napojów zawierających alkohol, kofeinę i teinę przez 3 dni poprzedzających badania. W dniu badania ochotnicy nie mogli palić tytoniu. U każdego pacjenta zebrano wywiad lekarski przy użyciu standardowego kwestionariusza dotyczącego wagi urodzeniowej oraz obciążeń występujących u pacjenta i w rodzinie, przeprowadzono podstawowe badanie fizykalne oraz udzielono wszelkich informacji na temat prowadzonego badania.

5.2.1 Badania antropometryczne

Każdy pacjent miał wykonany pomiar wzrostu, masy ciała, obwodu pasa i bioder. Na ich podstawie wyliczono podstawowe wskaźniki antropometryczne:

- wskaźnik wielkości masy ciała (BMI) według wzoru:

$$\text{BMI} [\text{kg}/\text{m}^2] = \text{masa ciała} [\text{kg}] / \text{wzrost}^2 [\text{m}^2]$$

- wskaźnik talia-biodro (WHR) stosując formułę:

$$\text{WHR} = \text{obwód talii} [\text{cm}] / \text{obwód bioder} [\text{cm}]$$

Obwód pasa mierzony był na poziomie pępka, zaś obwód bioder na wysokości górnych kolców kości biodrowych.

5.2.2 Pomiar zawartości tkanki tłuszczowej

Pomiar zawartości tkanki tłuszczowej w całkowitej masie ciała został przeprowadzony na podstawie metody bioimpedancji (pomiar oporu elektrycznego ciała), przy użyciu aparatu Maltron Body Fat Analyzer BF-905. Badanie przeprowadzano przynajmniej po 2 godzinach od ostatnio spożytego posiłku. W tym dniu ochotnicy nie wykonywali wysiłku fizycznego, nie przyjmowali alkoholu, kawy, leków, nie palili tytoniu, kobiety nie były w trakcie miesiączki. Wyniki przedstawiono w kilogramach oraz jako procentowa zawartość tkanki tłuszczowej i masy beztłuszczowej. Oceniano je zgodnie z przyjętymi normami (166) przedstawionymi poniżej - Tabela 5.

Tabela 5. Procentowa zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie

	mała ilość tk. tłuszczowej	prawidłowa ilość tk. tłuszczowej	nadwaga	otyłość	ciężka otyłość
mężczyźni	poniżej 10%	10% - 20%	20% - 25%	25% - 30%	powyżej 30%
kobiety	poniżej 20%	20% - 30%	30% - 35%	35% - 40%	powyżej 40%

5.2.3 Pomiar ciśnienia tętniczego

W trakcie przeprowadzania badania fizykalnego u każdego pacjenta wykonywano trzykrotny pomiar ciśnienia tętniczego. Przed pierwszym oznaczeniem ochotnik przebywał przynajmniej 5 minut w pozycji siedzącej, kolejne pomiary wykonywano co około 10 minut przy użyciu sfigmomanometru rtęciowego. Nadciśnienie tętnicze było rozpoznawane przy wartościach ciśnienia skurczowego ≥ 130 mmHg, rozkurczowego ≥ 85 mmHg, oraz jeśli pacjent już przyjmował leki hipotensyjne. Do obliczeń statystycznych przyjmowano uśrednione wartości ciśnienia tętniczego.

5.2.4 Testy biochemiczne

Doustny test tolerancji glukozy (DTTG) oraz doustny test tolerancji lipidów (DTTL) przeprowadzono u wszystkich ochotników w odstępach 2-4 tygodniowych.

Doustny test tolerancji glukozy (DTTG) wg WHO (167):

Test był przeprowadzany w godzinach porannych (między 8.00 a 11.00 godziną). Pacjenci nie przyjmowali żadnych posiłków przez przynajmniej 8 godzin przed przeprowadzeniem testu. Krew do badań pobierano w 6 punktach czasowych – na czczo (0'),

a następnie po 30, 60, 90, 120 i 180 minutach po wypiciu 75g glukozy rozpuszczonych w około 300 ml wody (czas przyjmowania roztworu wynosił ok. 3 minut).

W próbkach krwi oznaczano stężenie glukozy, insuliny, inkretyn (GIP, GLP-1), triglicerydów (TG) oraz wolnych kwasów tłuszczowych (FFA).

Na podstawie uzyskanych w DTTG wyników obliczono również **wskaźnik oceny insulinooporności** (*homeostasis model assesment of insulin resistance*, HOMA-IR) (168, 169).

$$\text{HOMA-IR} = [\text{insulina na czczo } (\mu\text{IU/ml}) \times \text{glikemia na czczo (mmol/l)}] / 22,5$$

Doustny test tolerancji lipidów (DTTL) wg Couderc'a (170) :

Przez 3 dni poprzedzające test, pacjenci nie przyjmowali napojów zawierających alkohol, kofeinę lub teinę. W przeddzień testu – ostatni niskotłuszczowy posiłek spożywali około godziny 18.00. Od tego momentu ochotnicy byli proszeni o przyjmowanie tylko niesłodzonych napojów o objętości minimum 0,5 litra. W czasie trwania testu ochotnicy nie wykonywali większych wysiłków fizycznych, ani nie palili papierosów. Test był przeprowadzany w godzinach od 7.30 do 16.00 (okres obserwacji – 8 godzin).

Skład standardowego posiłku w DTTL stanowiły określone produkty (Tabela 6) przygotowywane każdorazowo przez dyplomowanego dietetyka.

Tabela 6. Skład standardowego posiłku w DTTL.

	ilość (g)	kaloryczność (kcal)	tłuszcz (g)	SFA (g)	MUFA (g)	PUFA (g)	białko (g)	węglowodany (g)
chleb pszenny	50	124,5	0,7	0,095	0,075	0,305	3,4	28
masło	20	147	16,5	10,9	4,48	0,23	0,14	0,14
ser topiony	60	178,8	16,2	9,7	5,16	0,44	8,1	0,72
schab	100	291	18,7	5,38	9,7	2,29	30,4	0,7
pieczony								
majonez	40	285,6	31,6	3,38	6,37	20,1	0,52	1,04
woda	250							
mineralna								

*SFA - *saturated fatty acids* - nasycone kwasy tłuszczowe

MUFA - *monounsaturated fatty acids* - jednonienasycone kwasy tłuszczowe

PUFA - *polyunsaturated fatty acids* - wielonienasycone kwasy tłuszczowe

Spożyty posiłek o łącznej wartości kalorycznej 1027 kcal, zawierał 83,7g tłuszczu, które stanowiły około 73% udziału kalorycznego (w tym nasycone kwasy tłuszczowe – 50%, jednonienasycone kwasy tłuszczowe – 40%, wielonienasycone - 10%), białko stanowiło 17%, a węglowodany ok. 10% wartości kalorycznej.

Przez cały okres trwania badania pacjenci mogli pić bez ograniczeń ilościowych niegazowaną wodę mineralną.

W trakcie testu zostały pobrane próbki krwi na oznaczenie stężenia glukozy, insuliny, inkretyn (GIP, GLP-1), TG oraz FFA.

W pierwszej próbce krwi, pobranej na czczo, oznaczano również stężenie cholesterolu całkowitego (TCh) oraz frakcji HDL (HDL) i LDL (LDL) oraz adipokiny - leptynę, adiponektynę oraz wisfatynę.

Po wykonaniu testów weryfikowano wstępną klasyfikację przynależności do grup w zależności od poziomu glikemii, triglicerydemii i poziomu HDL na czczo oraz wartości ciśnienia tętniczego – u pacjentów z grupy kontrolnej i z zespołem metabolicznym zgodnie z wytycznymi IDF z 2005 roku (5).

5.3 Procedury oznaczeń biochemicznych

Wszystkie badania laboratoryjne przeprowadzono w Katedrze Biochemii Klinicznej UJ CM w Krakowie, w oparciu o procedury analityczne i protokoły zapewnienia jakości obowiązujące w Katedrze. W surowicy krwi pobranej w czasie testów, w każdym punkcie czasowym, wykonano oznaczenie stężenia następujących parametrów: GLP-1, GIP, glukozy, insuliny, TG, FFA. Z próbki krwi pobranej w punkcie 0 (na czczo) wykonano również oznaczenia cholesterolu całkowitego, frakcji HDL i LDL, adipokin - leptyny, adiponektyny, wisfatyny oraz badanych polimorfizmów genów.

Oznaczenie stężenia GLP-1

Próbkę krwi pobierano do specjalnej probówki BDTMP700 zawierającej inhibitor enzymu DPP-4. Natychmiast po pobraniu ostrożnie mieszano zawartość probówki z krwią 8-10 razy, następnie transportowano ją w lodzie do laboratorium (czas 5-10 minut). Po odwirowaniu w wirówce z chłodzeniem (+4 °C, przez 10 minut przy obrotach 1000 xg) surowicę przechowywano w temperaturze -70°C do chwili rozpoczęcia analizy (nie dłużej niż

1 miesiąc). Stężenie GLP-1 oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu gotowych zestawów firmy Millipore Corporation, USA, sporządzając do każdej serii oznaczeń krzywą standardową. Zasada oznaczenia polega na wykorzystaniu dwóch przeciwciał: pierwszego monoklonalnego przeciwciała specyficznego do GLP-1 opłaszczonego na mikropłytkę i drugiego poliklonalnego przeciwciała znakowanego fosfatazą alkaliczną. Po utworzeniu kompleksu antygen-przeciwciało-drugie przeciwciało usuwano niezwiązaną frakcję drogą kilkukrotnego przemywania, a następnie wywoływano reakcję barwną przy użyciu fosforanu metylumbelliferylu. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodanie gotowego do użycia roztworu hamującego („Stop Solution”). Natężenie barw wprost proporcjonalne do badanego stężenia GLP-1 mierzono wspólnie z krzywą standardową na fluorescencyjnym czytniku płytek TECAN firmy Genios przy długości fali wzbudzenia/emisji 355/460 nm.

Czułość metody jest równa 2 pmol/l, a precyzja wyrażona jako współczynnik zmienności (CV%) wynosi ok. 7,4% w obrębie oznaczenia (intra-assay) i ok. 8% między oznaczeniami (inter-assay). Metoda wykrywa aktywne biologicznie formy GLP-1 (7-36) oraz GLP-1 (7-37), natomiast nie wchodzi w reakcję krzyżową z GLP-1 (9-36), GLP-2 oraz glukagonem.

Oznaczenie stężenia GIP

Próbkę krwi pobierano do probówek „na skrzep”. Po odwirowaniu próbki surowicy przechowywano w temperaturze -70°C nie dłużej niż 1 miesiąc. Poziom GIP był oznaczony metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu gotowych zestawów firmy Millipore Corporation, USA sporządzając do każdej serii oznaczeń krzywą standardową. Zasada oznaczenia polega na wykorzystaniu dwóch przeciwciał: pierwszego monoklonalnego przeciwciała specyficznego do GIP opłaszczonego na mikropłytkę i drugiego poliklonalnego przeciwciała znakowanego peroksydazą chrzanową ze streptawidyną. Po utworzeniu kompleksu antygen-przeciwciało-drugie przeciwciało usuwano niezwiązaną frakcję drogą kilkukrotnego przemywania, a następnie wywoływano reakcję barwną przy użyciu tetrametylobenzydyny. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodanie 0,3 M roztworu kwasu solnego HCl. Natężenie barw wprost proporcjonalne do badanego stężenia GIP mierzono wspólnie z krzywą standardową na czytniku mikropłytek MULTISKAN RS firmy Lab-Systems przy długości fali 450 nm.

Czułość metody jest równa 8,2 pg/ml, a precyzja wyrażona jako współczynnik zmienności (CV%) wynosi ok. 6,4% w obrębie oznaczenia (intra-assay) i ok. 3,4% między

oznaczeniami (inter-assay). Zestaw posiada 100% reaktywność krzyżową dla ludzkiego GIP(1-42) oraz GIP(3-42), natomiast nie wchodzi w reakcję krzyżową z glukagonem, oksyntomoduliną, GLP-1 oraz GLP-2.

Oznaczenie stężenia glukozy

Pomiar stężenia glukozy w surowicy krwi wykonywano kolorymetryczną metodą enzymatyczną, przy użyciu zestawu diagnostycznego firmy Cormay Liquick Cor-GLUCOSE 60 (P.Z.Cormay, Lublin, Polska). Intensywność zabarwienia w tym teście jest wprost proporcjonalna do stężenia glukozy. Absorbancja była odczytywana na spektrofotometrze Hitachi U 2000 przy długości fali 500 nm. Liniowość oznaczenia jest zachowana do stężenia glukozy 22 mmol/l. Czulość stosowanej metody wynosiła 0,03 mmol/l, a precyzja wyrażona jako współczynnik zmienności CV% wynosi ok. 2,6% w obrębie oznaczenia (intra-assay) i ok. 1,2% między oznaczeniami (inter-assay).

Wartości referencyjne stężenia glukozy na czczo we krwi żyłnej u osób zdrowych dla stosowanej metody nie powinny przekraczać 5,9 mmol/l. W obecnych badaniach przyjęto graniczną wartość glikemii u osób zdrowych poniżej 5,6 mmol/l, według definicji zespołu metabolicznego IDF (5).

Oznaczenie stężenia insuliny

Próbki surowicy do oznaczenia stężenia insuliny były przechowywane w temperaturze -70 °C. Stężenie insuliny zostało oznaczone metodą immunoradiometryczną, przy użyciu gotowych zestawów firmy BioSource (BioSource Europe S.A., Belgium). Radioaktywność badanych próbek mierzono na liczniku gamma firmy Packard. Czulość testu była równa 1 µIU/ml. Różnice w powtarzalności wyników oznaczenia insuliny wewnątrz zestawu wynosiły około 2%, natomiast między zestawami 6,3%. Odczynniki użyte w zestawie nie wchodziły w reakcję krzyżową z proinsuliną ludzką.

Wartości referencyjne insuliny na czczo u osób zdrowych mieszczą się w granicach 4-16 µIU/ml.

Oznaczenie stężenia FFA

Oznaczenie FFA w surowicy krwi wykonano za pomocą zoptymalizowanej kolorymetrycznej metody enzymatycznej z wykorzystaniem zestawu firmy ROCHE. Do oznaczeń używano świeżych, niezamrożonych próbek surowicy. W razie potrzeby materiał przechowywano w temperaturze + 4 °C nie dłużej niż 7 dni. Odczyt absorbancji był

wykonywany na czytniku mikropłytek MULTISKAN RS firmy Lab-Systems przy długości fali 540 nm. Liniowość tej metody jest zachowana do stężenia FFA – 1,5 mmol/l. Referencyjne wartości FFA mieszczą się w zakresie 0,3 do 0,8 mmol/l.

Oznaczenie stężenia TG

Pomiar stężenia TG w surowicy dokonywano w oparciu o kolorymetryczną metodę enzymatyczną, przy pomocy zestawu diagnostycznego firmy Cormay Liquick Cor-TG (P.Z.Cormay, Lublin, Polska). Intensywność zabarwienia w tym teście jest wprost proporcjonalna do stężenia TG. Absorbancja była odczytywana na spektrofotometrze Hitachi U 2000 przy długości fali 550 nm. Liniowość oznaczenia była zachowana do wartości stężenia TG 17 mmol/l. Czułość stosowanej metody wynosiła 0,068 mmol/l, a precyzja wyrażona jako współczynnik zmienności CV% wynosi ok. 2% w obrębie oznaczenia (intra-assay) i ok. 1,9% między oznaczeniami (inter-assay).

Wartości referencyjne stężenia TG u osób zdrowych nie powinny przekraczać 1,7 mmol/l, według IDF (5).

Oznaczenie stężenia cholesterolu (TCh, frakcji HDL oraz LDL)

Oznaczenie TCh w surowicy wykonywano kolorymetryczną metodą enzymatyczną, przy użyciu zestawu diagnostycznego firmy Cormay Liquick Cor-CHOL 60 (P.Z.Cormay, Lublin, Polska). Stężenie cholesterolu frakcji HDL (HDL) w surowicy oznaczano tą samą metodą po uprzednim strąceniu pozostałych lipoprotein mieszaniną heparyny i chlorku manganu – gotowy zestaw diagnostyczny CORMAY HDL (P.Z.Cormay, Lublin, Polska). Intensywność zabarwienia w tych testach jest wprost proporcjonalna do stężenia cholesterolu. Absorbancja była odczytywana na spektrofotometrze Hitachi U 2000 przy długości fali 500 nm. Liniowość oznaczenia jest zachowana do stężenia cholesterolu całkowitego 19,4 mmol/l. Czułość stosowanej metody dla TCh wynosiła 0,026 mmol/l, a dla HDL 0,1 mmol/l. Precyzja wyrażona jako współczynnik zmienności CV% wynosi ok. 1,4% dla TCh i dla HDL w obrębie oznaczenia (intra-assay) oraz ok. 1,5% dla TCh i 0,9% dla HDL między oznaczeniami (inter-assay).

Wartości referencyjne stężenia TCh na czczo we krwi żyłnej u osób zdrowych dla stosowanej metody nie powinny przekraczać 5,2 mmol/l (171). Zgodnie z wytycznymi IDF z 2005 roku (5) stężenie HDL cholesterolu u mężczyzn nie powinno przekraczać 1,0 mmol/l, a u kobiet 1,3 mmol/l.

Stężenie cholesterolu LDL wyliczono ze wzoru Friedewalda (172):

$$\text{LDL Cholesterol} = \text{Cholesterol całkowity} - \text{Triglicerydy} / 2,2 - \text{HDL cholesterol}$$

[wszystkie parametry w mmol/l]

Wzoru nie stosowano gdy stężenie triglicerydów we krwi przekraczało 4,6 mmol/l. W tych przypadkach stosowano ultra wirowanie metodą sekwencyjnej flotacji.

Pożądane stężenie LDL cholesterolu jest zależne od grupy ryzyka sercowo-naczyniowego wg *American Heart Association - National Cholesterol Education Program, the Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) (6).

Oznaczenie stężenia leptyny

Leptynę oznaczano w surowicy. Pobraną krew po wyrzepieniu (ok. 30 min) wirowano przez 15 min przy obrotach 1000 xg. Po odwirowaniu próbki surowicy przechowywano w temperaturze -70 °C nie dłużej niż 2 miesiące. Oznaczenia wykonywano metodą immunoradiologiczną, przy użyciu gotowych zestawów firmy Linco (Linco Research Inc., USA). Radioaktywność badanych próbek mierzono na liczniku gamma firmy Packard. Liniowość zastosowanej metody jest zachowana do stężenia leptyny 100 ng/ml.

Czułość metody była równa ok. 0,5 ng/ml przy użyciu 100 µl badanej próbki. Różnice w powtarzalności wyników oznaczenia leptyny wewnątrz zestawu wynosiły 3-5%, natomiast między zestawami 3-6%. Metoda wykrywa ludzką leptynę, natomiast nie wchodzi w reakcję krzyżową z insuliną, proinsuliną, C-peptydem, glukagonem, ani IGF-1.

Wartości referencyjne leptyny na czczo u osób zdrowych, z BMI między 18 a 25 kg/m² wynoszą 3,8±1,8 ng/ml dla mężczyzn i 7,4±3,7 ng/ml dla kobiet.

Oznaczenie stężenia adiponektyny

Adiponektynę oznaczano w surowicy. Pobraną krew po wyrzepieniu (ok. 30 min) wirowano przez 15 min przy obrotach 1000 xg. Próbkę surowicy do oznaczenia stężenia adiponektyny były przechowywane w temperaturze -70 °C nie dłużej niż 3 miesiące. Oznaczenia przeprowadzano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu gotowych zestawów firmy R&D (R&D Systems, UK) sporządzając do każdej serii oznaczeń krzywą standardową. Zasada oznaczenia polega na wykorzystaniu dwóch przeciwciał: pierwszego monoklonalnego przeciwciała specyficznego do adiponektyny opłaszczanego na mikropłytkę i drugiego poliklonalnego przeciwciała znakowanego peroksydazą chrzastą. Po utworzeniu

kompleksu antygen-przeciwciało-drugie przeciwciało usuwano niezwiązaną frakcję drogą kilkukrotnego przemywania, a następnie wywoływano reakcję barwną przy użyciu tetrametylobenzydyny w obecności nadtlenu wodoru. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodanie 2 N kwasu siarkowego H_2SO_4 . Natężenie barw wprost proporcjonalne do badanego stężenia adiponektyny mierzono wspólnie z krzywą standardową na czytniku mikropłytek MULTISKAN RS firmy Lab-Systems przy długości fali 450 nm.

Czułość testu jest zawarta między 0,079 a 0,891 ng/ml. Różnice w powtarzalności wyników oznaczenia adiponektyny wewnątrz zestawu wynosiły około 2-5%, natomiast między zestawami 5-6%. Zestaw posiada 100% reaktywność krzyżową z ludzką adiponektyną, nie wchodzi w reakcje krzyżowe z innymi adipokinami.

Zakresy stężeń adiponektyny we krwi u ludzi mieszczą się zazwyczaj w przedziale 0,9-21,4 $\mu g/ml$.

Oznaczenie stężenia wisfatyny

Wisfatynę oznaczano w surowicy. Krew pobraną na skrzep po wyrzepieniu (ok. 30 min) wirowano przez 15 min przy obrotach 1000 xg. Po odwirowaniu próbki surowicy przechowywano w temperaturze -70 °C do chwili rozpoczęcia analizy. Poziom wistatyny oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu gotowych zestawów firmy AdipoGen, sporządzając do każdej serii oznaczeń krzywą standardową. Zasada oznaczenia polega na wykorzystaniu dwóch przeciwciał: pierwszego monoklonalnego przeciwciała specyficznego do wisfatyny opłaszczzonego na mikropłytkie i drugiego poliklonalnego przeciwciała znakowanego peroksydazą chrzanową. Po utworzeniu kompleksu antygen-przeciwciało-drugie przeciwciało usuwano niezwiązaną frakcję drogą kilkukrotnego przemywania, a następnie wywoływano reakcję barwną. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodanie 1 M roztworu kwasu fosforowego H_3PO_4 . Natężenie barwy wprost proporcjonalne do badanego stężenia wisfatyny mierzono wspólnie z krzywą standardową na czytniku mikropłytek MULTISKAN RS firmy Lab-Systems przy długości fali 450 nm.

Czułość użytej metody wynosi 30 pg/ml, a precyzja wyrażona jako współczynnik zmienności CV% wynosi ok. 5% w obrębie oznaczenia (intra-assay) i ok. 6% między oznaczeniami (inter-assay). Zestaw posiada 100% reaktywność krzyżową z ludzką wisfatyną, nie wchodzi w reakcję krzyżową z innymi adipokinami.

5.4 Badania genetyczne

Wszystkie badania genetyczne potrzebne do realizacji celu pracy doktorskiej zostały przeprowadzone w Zakładzie Diagnostyki Genetycznej i Nutrigenomiki Katedry Biochemii Klinicznej UJCM.

Do oznaczeń genetycznych użyto metodę analizy długości amplifikowanych metodą PCR (ang. *polymerase chain reaction*) wybranych fragmentów DNA, poddanych działaniu enzymów restrykcyjnych (ang. *restricted fragment length polymorphism*, *RFLP*).

Badano obecność polimorfizmów (ang. *single-nucleotide polymorphisms*, SNPs): następujących genów odpowiedzialnych m.in za różnicowanie tkanki tłuszczowej (czyli pośrednio za poziom FFA we krwi) (141, 165):

- genu TCF7L2 (transcription factor-7-like 2): rs7903146
- genu PPAR γ 2 (rs1801282)

Krew pobierano jednorazowo z żyły łokciowej do probówki z antykoagulantem (wersenianem dwusodowym - EDTA) i zamrażano w -70°C . Do izolacji genomowego DNA z pełnej krwi używano zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit firmy Qiagen Inc., USA.

Izolacja DNA z krwi polegała na lizie komórek i stabilizacji kwasów nukleinowych oraz selektywnej absorpcji DNA na membranie silikonowej przy użyciu buforów i kolumn zawartych w zestawie. DNA eluowano z kolumny dejonizowaną wodą wolną od RNase/DNase i przechowywano w -70°C . Stężenie i czystość DNA oznaczano spektrofotometrycznie przy użyciu aparatu NanoDrop ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$).

Jednorazowa izolacja pozwalała na uzyskanie około 6 μg DNA używanego do badań polimorfizmów genów z 200 μl krwi.

5.4.1 Badanie polimorfizmu czynnika transkrypcyjnego (*transcription factor-7-like 2*) rs7903146 genu TCF7L2 oraz polimorfizmu C $\rightarrow$ G w kodonie 12 w eksonie 1 (Pro12 $\rightarrow$ Ala) genu PPAR γ (rs 1801282).

Do reakcji łańcuchowej (PCR) używano odczynników i buforów dostarczone przez producenta wraz z polimerazą DNA HotStar firmy Qiagen

Do reakcji używano 100 ng DNA oraz starterów o sekwencji podanej poniżej w tabeli [Tabela 7a].

Tabela 7. Sekwencje premierów i enzymy restrykcyjne dla reakcji PCR genów TCF7L2 i PPAR γ 2

		TCF7L2	PPARγ2
a)	Sekwencja primerów	F: 5'-GAGAGCTAAGCACTTTTATAGGTA-3' R: 5'-CTGACATTGACTAAGTTACTTGC-3'	F: 5'-CAAGCCCAGTCCTTTCTGTG-3' R: 5'-AGTGAAGGAATCGCTTTCCG-3'
b)	enzymy restrykcyjne i warunki ich wiązania	<i>Rsa I</i> (firmy Fermentas) 37 °C przez 16 godzin	<i>Msp I</i> (firmy Fermentas) 37 °C przez 2 godziny

Reakcję PCR prowadzono według podanego poniżej schematu – Tabela 8

Tabela 8. Schemat reakcji PCR dla genów TCF7L2 i PPAR γ 2

	TCF7L2			PPARγ2		
	temperature	czas		temperatura	czas	
aktywacja polimerazy	95 °C	15 min		95 °C	15 min	
denaturacja DNA	94 °C	30 sek	35 cykli	94 °C	30 sek	30 cykli
przyłączanie primerów	59 °C	30 sek		60 °C	45 sek	
wydłużanie produktu	72 °C	30 sek		72 °C	90 sek	
wyrównanie długości fragmentów	72 °C	10 min		72 °C	10 min	

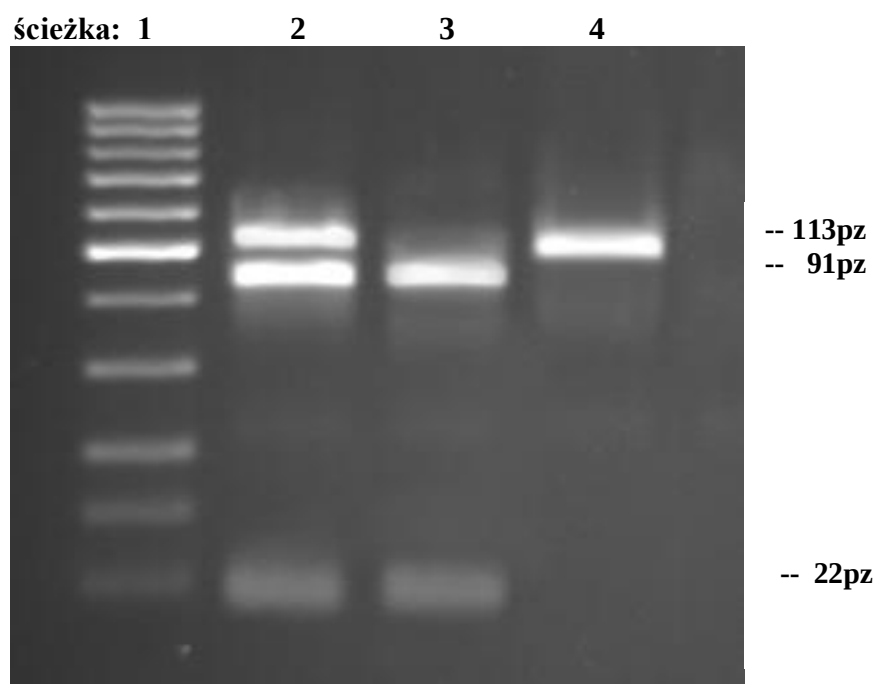
Produkty reakcji PCR poddawano trawieniu przy użyciu enzymów restrykcyjnych i w warunkach inkubacji przedstawionych w Tabela 7 [Tabela 7b]. Następnie produkty rozdzielano na 3 % żelu agarozowym w buforze TAE i uwidoczniono przez dodanie bromku etydyny. Dokumentację fotograficzną wykonano przy użyciu zestawu do wizualizacji żeli EC3 Imaging System.

Uzyskane kombinacje prążków, odpowiadały poszczególnym genotypom:

- dla **TCF7L2** obecność pojedynczego prążka długości 113 par zasad (pz) na żelu agarozowym odpowiada **homozygotie TT**, obecność trzech prążków 113, 91, i 22 pz

odpowiada **heterozygotę TC**, zaś obecność dwóch prążków o długości 91 i 22 pz **homozygotę CC**. Przykładowy obraz polimorfizmu rs7903146 alleli genu TCF7L2 przedstawiono na poniższej rycinie [Rysunek 16].

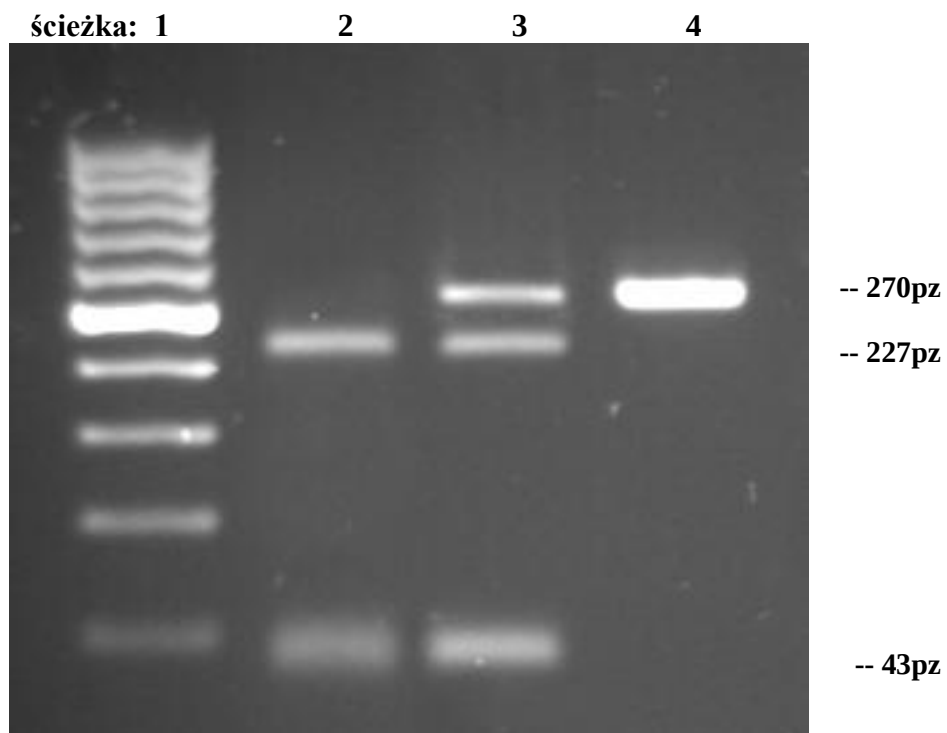
Rysunek 16. Schematyczne przedstawienie wyniku genotypowania rs7903146 dla genu TCFL2. Ścieżka 1- standard długości fragmentów DNA; ścieżka 2 heterozygoty TC (widoczne fragmenty: 113pz, 91pz, 22pz); ścieżka 3 genotyp CC (widoczny fragment: 91pz, 22pz); ścieżka 4 genotyp TT (fragment o długości 113pz).



- dla **PPAR γ 2** obecność dwóch prążków długości 227 i 43 pz na żelu agarozowym odpowiada **homozygotie CC**, obecność trzech prążków 270, 227, i 43 pz odpowiada **heterozygotie CG**, zaś obecność pojedynczego prążka o długości 270 pz **homozygotie GG**.

Przykładowy obraz polimorfizmu rs1801282 alleli genu PPAR γ metodą RFLP przedstawiono na poniższej rycinie [Rysunek 17].

Rysunek 17. Schematyczne przedstawienie wyniku genotypowania rs1801282 dla genu PPAR γ 2. Ścieżka 1- standard długości fragmentów DNA; ścieżka 2 homozygota CC (fragment 43pz i 227 pz); ścieżka 3 heterozygota CG (widoczne fragmenty: 43pz, 227pz, 270pz); ścieżka 4 homozygota GG (fragment o długości 270pz).



5.5 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietu *STATISTICA 10 PL*. Charakterystykę populacji sporządzono przy zastosowaniu statystyk opisowych. Dane ilościowe przedstawiono jako średnie arytmetyczne i odchylenie standardowe (SD), minimum i maksimum. Dla danych jakościowych wyliczono liczebność i procenty dla poszczególnych kategorii.

Do oceny normalności rozkładu zmiennych ilościowych został użyty test Shapiro-Wilka, a do weryfikacji jednorodności wariancji użyto test Levene'a.

Do porównywania dwóch grup (np. dla określenia różnic między kobietami i mężczyznami, grupą MS a C) zastosowano test t-Studenta lub w przypadku niespełnienia założeń (normalność, jednorodność wariancji) jego odpowiednik nieparametryczny test Manna-Whitneya.

Dla oceny powiązań pomiędzy zebranymi zmiennymi wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana (ponieważ zmienne nie miały rozkładu normalnego). Do wyszukania czynników wpływających na interesującą zmienną zależną (np. wpływ poziomu glukozy, czy FFA na wydzielanie inkretyn) zastosowano analizę regresji wielorakiej. Interesujące powiązania przedstawiono na wykresach rozrzutu.

Istotność powiązań między zmiennymi jakościowymi analizowano testem chi – kwadrat Pearsona.

We wszystkich analizach jako istotne przyjęto efekty, dla których poziom prawdopodobieństwa p był mniejszy od przyjętego poziomu istotności $\alpha=0,05$ ($p<0,05$).

6 Wyniki

6.1 Charakterystyka badanych grup

6.1.1 Grupa badana (MS) vs grupa kontrolna (C)

6.1.1.1 Porównanie parametrów kwalifikacyjnych i biochemicznych

Podstawowe wyniki pomiarów charakteryzujących obie badane grupy, kontrolę (C) i pacjentów z zespołem metabolicznym (grupa badana, MS), zestawiono w tabeli poniżej [Tabela 9]. Liczniejszą grupę MS stanowią osoby starsze o ok. 10 lat ($p=0,004$).

Natomiast porównanie badanych parametrów kwalifikacyjnych na podstawie definicji zespołu metabolicznego IDF z 2005 roku (5) świadczy o trafnym doborze pacjentów [Tabela 9]. Pacjenci MS charakteryzowali się w stosunku do grupy C istotnie statystycznie wyższymi parametrami otyłości: **BMI** ($33,17 \pm 5,11$ vs $24,27 \pm 2,8$; $p<0,001$), **WHR** ($0,95 \pm 0,06$ vs $0,87 \pm 0,06$; $p<0,001$), **ilościową i procentową zawartością tkanki tłuszczowej** ($33,73 \pm 9,18$ vs $19,2 \pm 5,39$; $35,47 \pm 6,95$ vs $25,99 \pm 6,77$; $p<0,001$). W wykonanych w punkcie 0' (na czczo) obu testów (DTTG oraz DTTL) oznaczeniach, stwierdzono istotnie statystycznie wyższe wartości markerów gospodarki węglowodanowej i lipidowej w grupie MS: **glukoza** ($5,6 \pm 0,64$ vs $4,96 \pm 0,35$; $p<0,001$), **insulina** ($19,57 \pm 10,02$ vs $9,84 \pm 3,26$; $p<0,001$), **wskaźnik insulinooporności HOMA** ($4,84 \pm 2,53$ vs $2,19 \pm 0,83$; $p<0,001$), **poziom wolnych kwasów tłuszczowych** ($0,64 \pm 0,21$ vs $0,42 \pm 0,14$; $p<0,001$), **cholesterolu całkowitego** ($5,32 \pm 0,96$ vs $4,82 \pm 0,76$; $p<0,05$), **triglicerydów** ($1,89 \pm 0,79$ vs $1,19 \pm 0,47$; $p<0,001$). Znaczna większość osób w grupie MS miała **nadciśnienie tętnicze** (80% vs 5,55%; $p<0,001$). Ochotnicy z grupy kontrolnej charakteryzowali się ponadto znacznie wyższymi wartościami **adiponektyny** ($7,85 \pm 2,19$ vs $4,25 \pm 1,48$; $p<0,001$) i nieznamiennie (ze względu na duży rozrzut wyników) niższymi wartościami poziomu leptyny.

Tabela 9. Charakterystyka grupy osób z zespołem metabolicznym (n=50) oraz grupy kontrolnej (n=18).

Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD) lub jako liczbę osób (n) oraz odsetek (%). Statystycznie istotne różnice: zespół metaboliczny vs kontrola wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (); $p < 0,001$ (***)**.

<i>Charakterystyka grup</i>	<i>Zespół Metaboliczny (MS)</i>	<i>Kontrola (C)</i>
Parametry antropometryczne		
Płeć (K/M)	22/28	11/7
Wiek (lata)	53,39 $\pm$ 11,86	43,5 $\pm$ 11,53**
Wzrost (cm)	167,39 $\pm$ 25,52	173,72 $\pm$ 8,8
Masa ciała (kg)	96,87 $\pm$ 17,69	73,29 $\pm$ 10,60***
BMI (kg/m ²)	33,17 $\pm$ 5,11	24,27 $\pm$ 2,8***
Obwód pasa (cm)	108,76 $\pm$ 11,51	88,39 $\pm$ 7,25***
Obwód bioder (cm)	114,65 $\pm$ 9,53	101,94 $\pm$ 5,45***
WHR	0,95 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,06***
Zawartość tkanki tłuszczowej (%) (kg)	35,47 $\pm$ 6,95 33,73 $\pm$ 9,18	25,99 $\pm$ 6,77*** 19,2 $\pm$ 5,39***
Nadciśnienie śr. ciśnienie skurczowe (mmHg) śr. ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	80% (40/50) 141,0 $\pm$ 16,62 87,07 $\pm$ 9,36	5,55% (1/18) 115,09 $\pm$ 9,31*** 74,07 $\pm$ 8,05***
Parametry gospodarki węglowodanowej		
Glukoza na czczo (mmol/l)	5,6 $\pm$ 0,64	4,96 $\pm$ 0,35***
Insulina na czczo (μ IU/ml)	19,57 $\pm$ 10,02	9,84 $\pm$ 3,26***
HOMA	4,84 $\pm$ 2,53	2,19 $\pm$ 0,83***

AUC-Glu DTTG	1129,79 ± 176,48	825,20 ± 147,27***
AUC-Ins DTTG	17023,56 ± 9578,31	7481,17 ± 4662,47***
AUC-GIP DTTG	26572,4 ± 8641,56	25518,18 ± 9408,8
AUC-GLP-1 DTTG	10852,49 ± 3228,9	11516,23 ± 3649,9
Parametry gospodarki lipidowej		
FFA na czczo (mmol/l)	0,64 ± 0,21	0,42 ± 0,14***
Cholesterol całkowity (mmol/l)	5,32 ± 0,96	4,82 ± 0,76*
HDL (mmol/l)	1,1 ± 0,27	1,22 ± 0,27
LDL (mmol/l)	3,36 ± 0,88	3,06 ± 0,77
TG (mmol/l)	1,89 ± 0,79	1,19 ± 0,47***
AUC-FFA DTTL	323,94 ± 109,98	249,25 ± 103,05*
AUC-TG DTTL	1292,03 ± 521,02	682,91 ± 325,03***
AUC-GIP DTTL	100139,03 ± 42323,64	111473,40 ± 42216,59
AUC-GLP-1 DTTL	1889,46 ± 522,30	2026,50 ± 453,95
Adipokiny		
Leptyna (ng/ml)	18,98 ± 12,83	10,65 ± 6,24
Adiponektyna (µg/ml)	4,25 ± 1,48	7,85 ± 2,19***
Visfatyna (ng/ml)	1,16 ± 0,82	1,28 ± 1,19

6.1.1.2 Porównanie przebiegu wartości biochemicznych podczas DDTG i DTTL

W grupie z MS w trakcie **DDTG** odnotowano istotnie wyższy niż w grupie C całkowity poziom stężenia glukozy i **insuliny** wyrażony polem pod krzywą (**AUC**) dla danego parametru ($p < 0,001$). Natomiast w grupie MS w **DTTL** obserwowano istotnie wyższe wartości **AUC-FFA** ($p < 0,05$) oraz **AUC-TG** ($p < 0,001$) [Tabela 9].

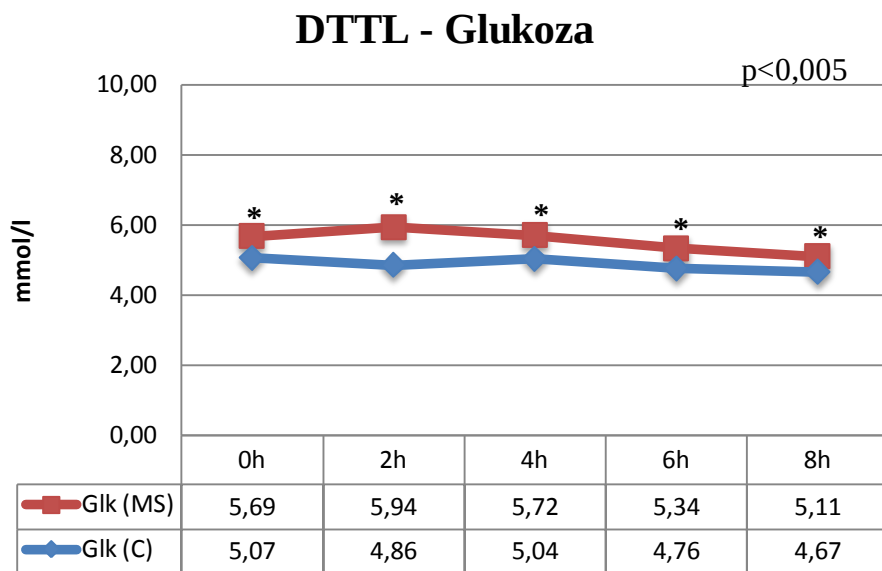
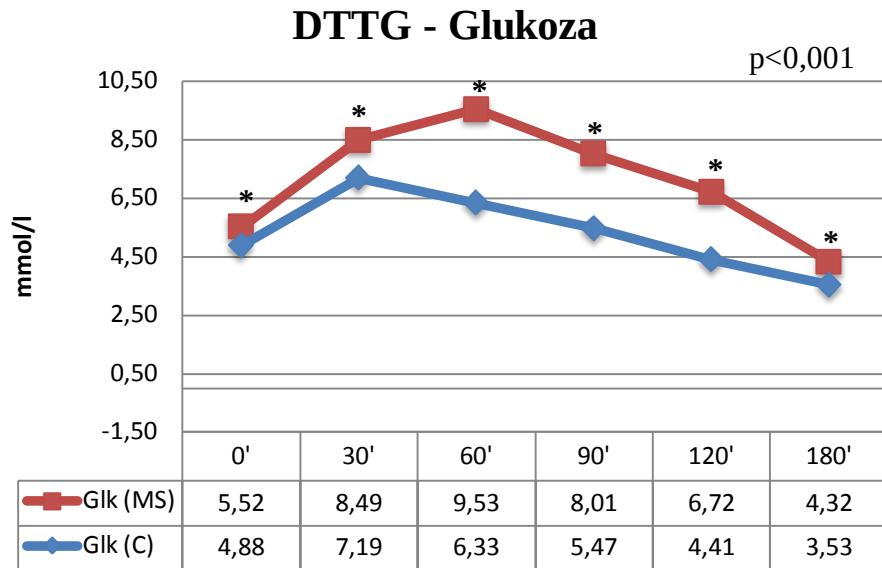
Glukoza na czczo jak również **glikemia** w trakcie DDTG i DTTL była istotnie statystycznie wyższa u pacjentów z MS ($p < 0,001$; $p < 0,005$). Bardzo ważną obserwacją świadczącą o dobrym doborze testu było stwierdzenie, że DTTL nie wpłynął znacząco na poziom glukozy w trakcie testu [Wykres 1a]. **Stężenie insuliny na czczo** było około dwa razy wyższe u pacjentów z MS ($p < 0,001$). **Wyrzut insuliny (AUC)** w czasie obu testów (DDTG i DTTL) był ponad 2 razy wyższy u pacjentów z MS. W DTTL stężenie insuliny było niższe od ilości insuliny uwolnionej w trakcie DDTG, ale w porównaniu z grupą kontrolną wciąż wyższy u pacjentów z MS [Wykres 1b].

W grupie MS stwierdzono również istotnie statystycznie wyższe wartości **TG** w trakcie całego testu – DDTG i DTTL ($p < 0,005$; $p < 0,001$) [Wykres 1c].

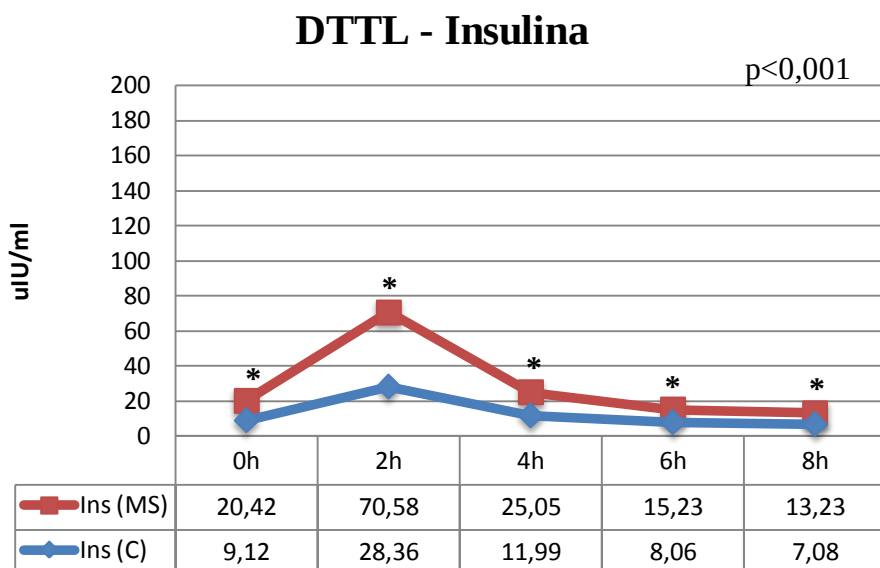
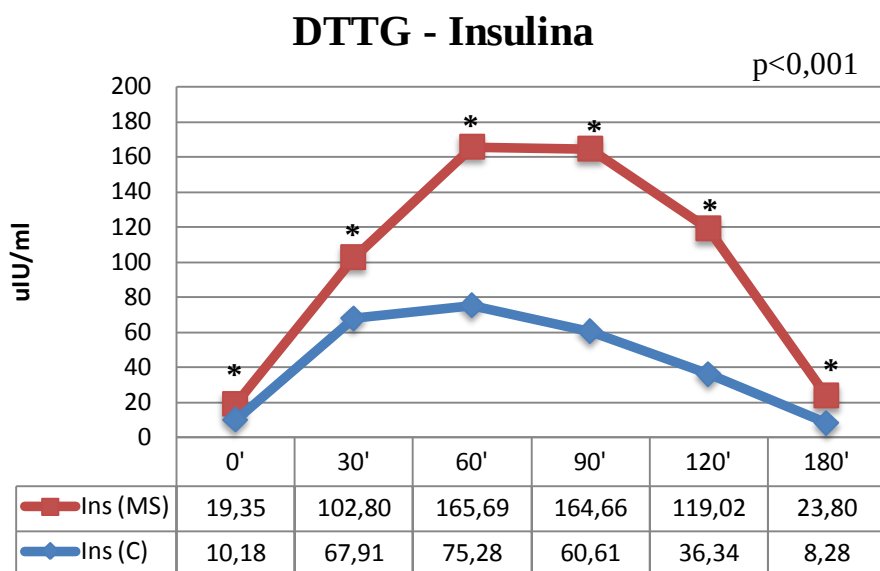
Stężenie **FFA** w obu testach było również wyższe u osób w grupie MS, jednak tylko wartości na czczo i w 30, 60, 90 i 120 minucie w DDTG oraz na czczo, w 2 i 4 godzinie DTTL różniły się statystycznie istotnie. Wartości FFA we krwi w trakcie DDTG obniżały się, gdy w czasie DTTL wzrastały w badanym okresie w obu grupach [Wykres 1d].

Wykres 1.

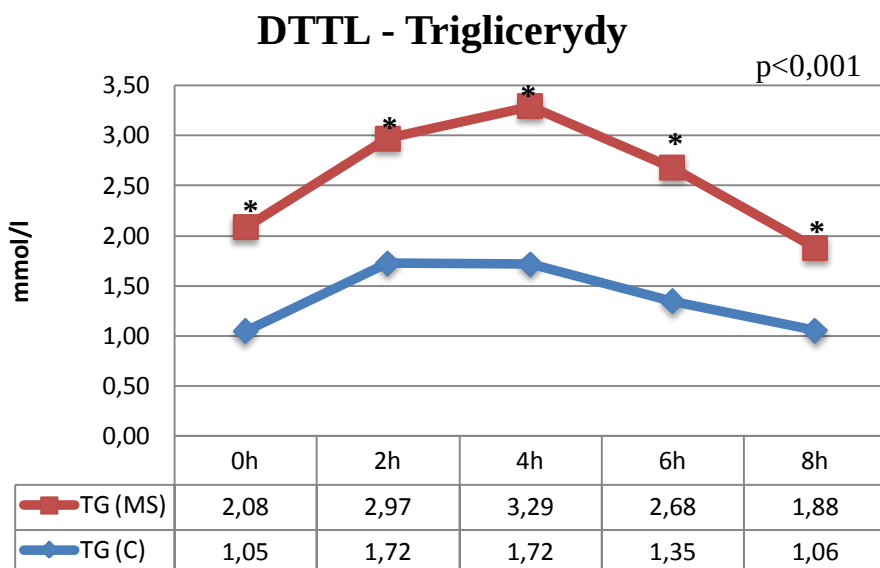
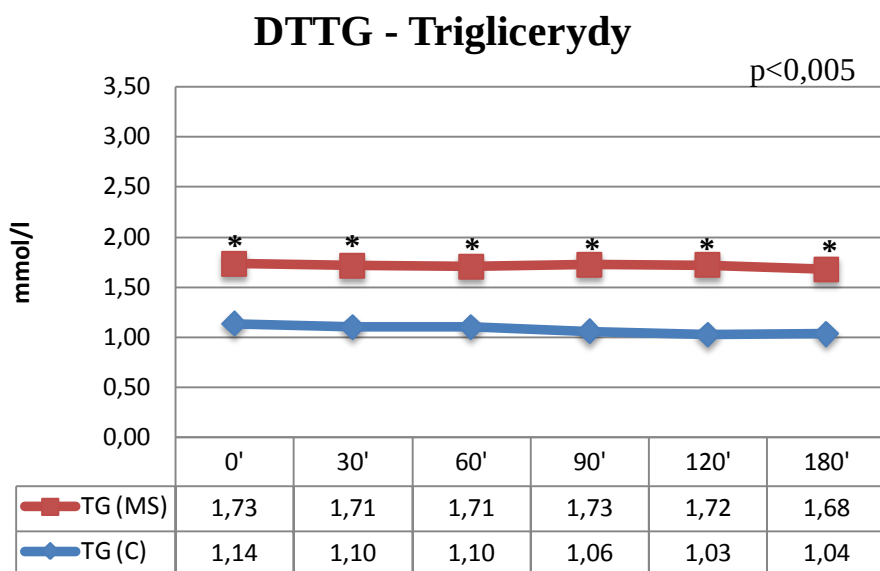
a) Przebieg krzywej glikemii podczas testów w zależności od grupy – MS vs C.



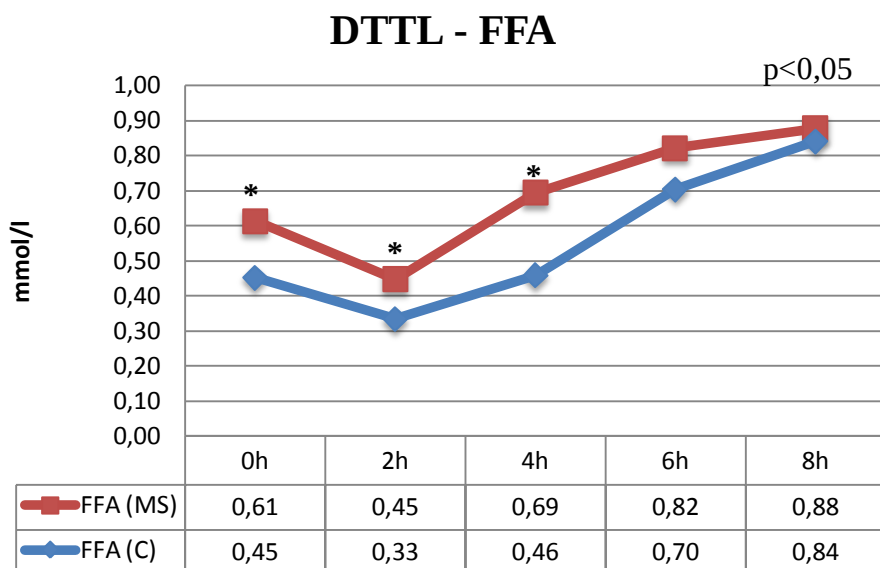
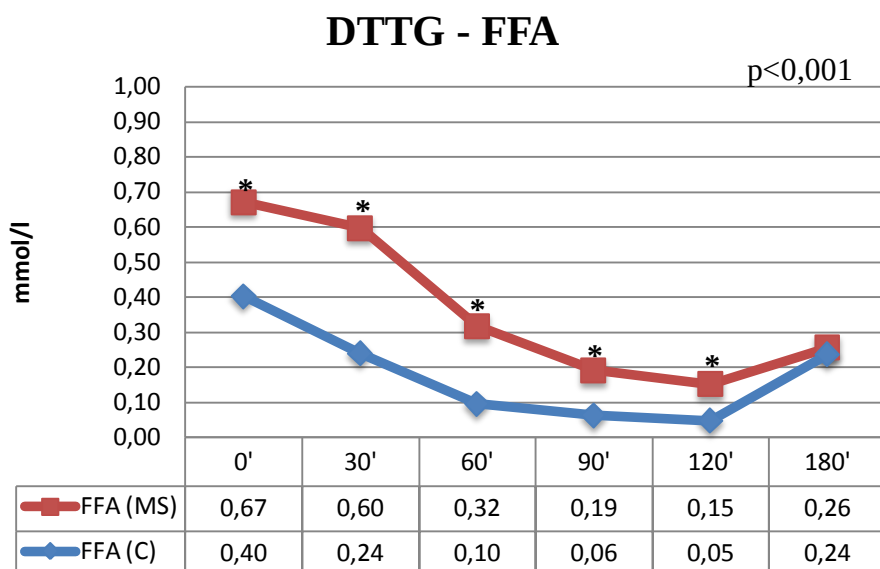
b) Przebieg krzywej insulinemii podczas testów w zależności od grupy – MS vs C.



c) Przebieg krzywej poziomu TG podczas testów w zależności od grupy – MS vs C.

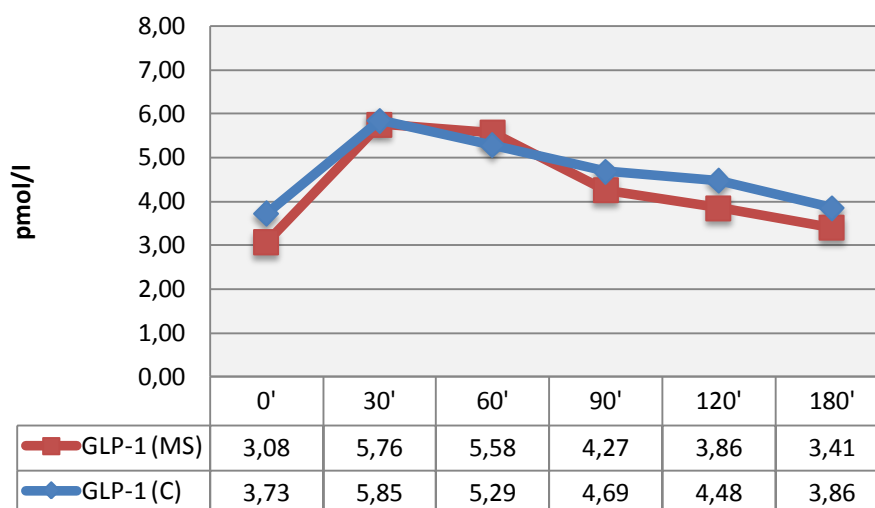


d) Przebieg krzywej stężeń FFA podczas testów w zależności od grupy – MS vs C.

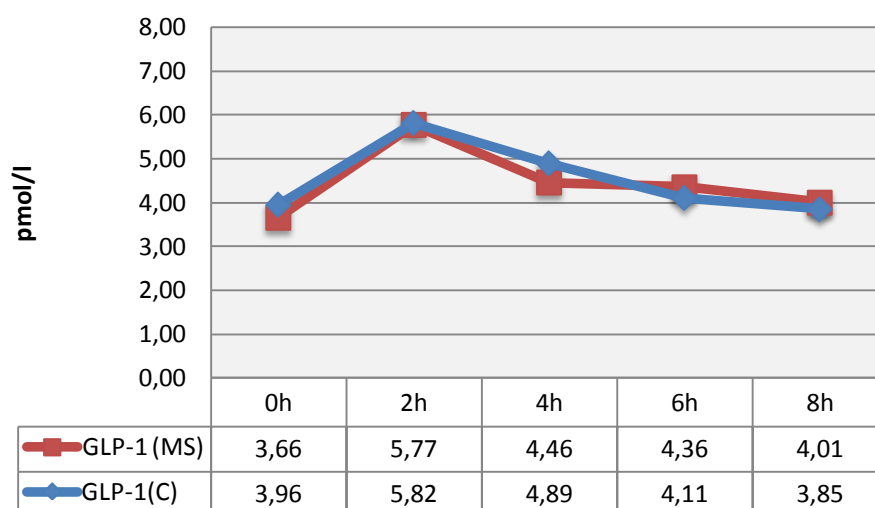


e) Przebieg krzywej stężeń GLP-1 podczas testów w zależności od grupy – MS vs C.

DTTG - GLP-1

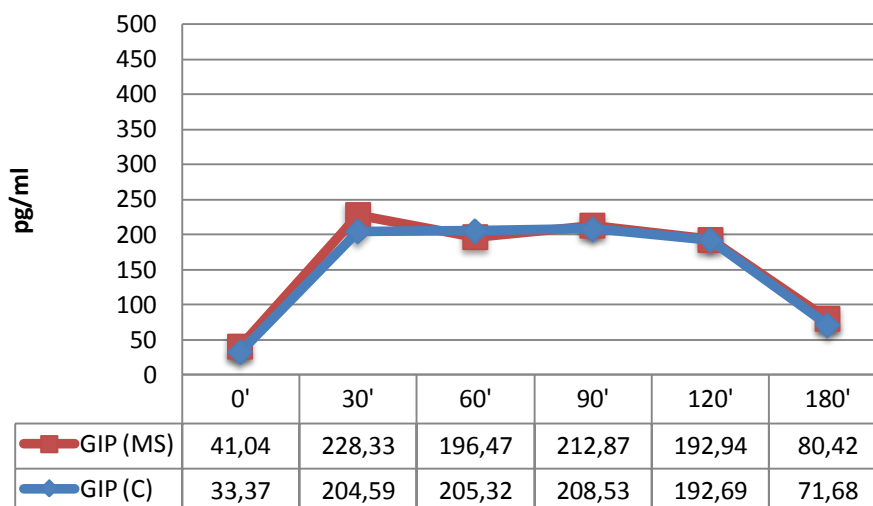


DTTL - GLP-1

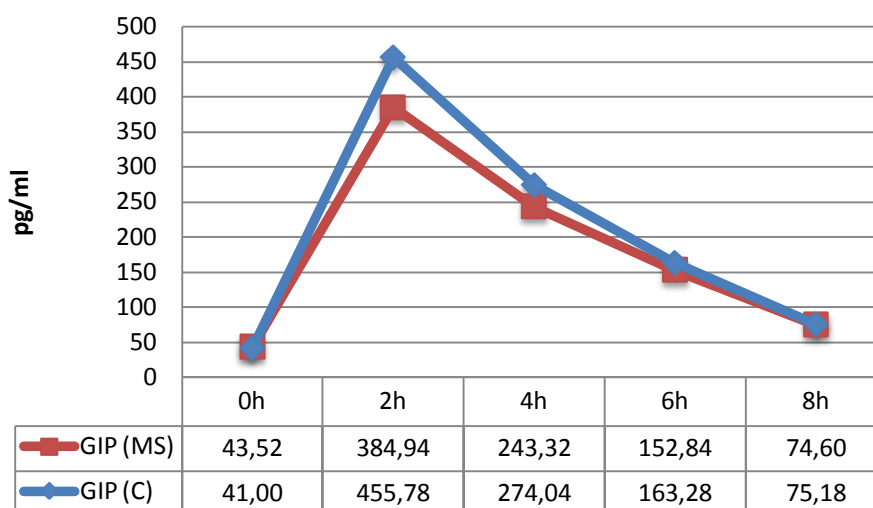


f) Przebieg krzywej stężeń GIP podczas testów w zależności od grupy – MS vs C.

DTTG - GIP



DTTL - GIP



Stężenia GLP-1 i GIP na czczo nie różnił się istotnie statystycznie w grupach MS vs C. W obu testach poziom uwolnionego **GLP-1** był w większości punktów pomiarowych niższy u pacjentów z MS (bez istotności statystycznej $p=0,105-0,458$ w DTTG oraz $p=0,544-0,964$ w DTTL dla poszczególnych punktów czasowych testów) [Wykres 1e]. W trakcie DTTL wartości GIP były około 2 razy wyższe w porównaniu z DTTG. W DTTL stężenie

uwolnionego GIP było nieznacznie niższe u pacjentów z MS, choć różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (wartość p dla poszczególnych punktów testu zawierała się w zakresie 0,281-0,774) [Wykres 1f].

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie AUC dla inkretyn - GIP i GLP-1 w obu testach dla grup MS i C.

Natomiast zwraca uwagę znamienna różnica w **zależnym od testu**: obciążenie posiłkiem węglowodanowym (DTTG) w porównaniu z bogatym w lipidy (DTTL), **wydzielaniu inkretyn** w tych samych grupach [patrz Tabela 10]. Ze względu na różną długość testów przeliczono AUC na równą jednostkę czasu - 1 godzinę. Zwraca uwagę znamienne **wyższe AUC-GIP** po przyjęciu posiłku **bogatolipidowego** w porównaniu z posiłkiem węglowodanowym u tych samych osób. Statystycznie **wyższe AUC-GLP-1** obserwowano w **DTTG** w porównaniu do DTTL u tych osób – oddzielnie w grupach C i MS [Tabela 10].

Tabela 10. Średnie wydzielanie inkretyn na godzinę, w czasie trwania testów (DTTG - 3h, DTTL – 8h) w obrębie grup MS i oddzielnie C. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Statystycznie istotne różnice: DTTG vs DTTL wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (); $p < 0,001$ (***)**.

	<i>DTTG</i>	<i>DTTL</i>
<i>AUC-GIP / 1 godz.</i> <i>MS</i>	26572,4 $\pm$ 8641,56 / 3 = 8857,47 $\pm$ 2880,52	100139,03 $\pm$ 42323,64 / 8 = 12517,38 $\pm$ 5290,45***
<i>AUC-GIP / 1 godz.</i> <i>C</i>	25518,18 $\pm$ 9408,8 / 3 = 8506,06 $\pm$ 3136,27	111473,40 $\pm$ 42216,59 / 8 = 13934,18 $\pm$ 5277,07***
<i>AUC-GLP1 / 1 godz.</i> <i>MS</i>	10852,49 $\pm$ 3228,9 / 3 = 3617,50 $\pm$ 1076,30	1889,46 $\pm$ 522,30 / 8 = 236,18 $\pm$ 65,29***
<i>AUC-GLP1 / 1 godz.</i> <i>C</i>	11516,23 $\pm$ 3649,9 / 3 = 3838,74 $\pm$ 1216,63	2026,50 $\pm$ 453,95 / 8 = 253,31 $\pm$ 56,74***

6.1.2 Porównanie grup z uwzględnieniem płci (mężczyźni (M) vs kobiety (K))

Przy podziale badanych ochotników na grupy kobiet i mężczyzn stwierdzono, że obie płcie stanowiły jednorodną pod względem wieku grupę. Nie stwierdzono istotnych różnic w

zakresie wskaźnika BMI, jednakże mężczyźni charakteryzowali się istotnie wyższym **wskaźnikiem WHR** ($0,89 \pm 0,07$ vs $0,96 \pm 0,06$; $p < 0,001$), zaś kobiety posiadały wyższą **procentową zawartość tkanki tłuszczowej** ($36,34 \pm 7,80$ vs $29,23 \pm 6,77$; $p < 0,001$). W tym przypadku istotnie wyższe wartości **leptyny** były odnotowywane w grupie kobiet ($25,05 \pm 12,45$ vs $10,98 \pm 7,68$; $p = 0,000$). Porównanie grup kobiet i mężczyzn w zakresie parametrów antropometrycznych przedstawia Tabela 11. Wartości **ciśnienia skurczowego i rozkurczowego** różniły się istotnie między grupami K i M ($128,65 \pm 16,53$ vs $139,03 \pm 19,71$, $p < 0,05$; $87,31 \pm 11,11$ vs $79,48 \pm 8,56$, $p < 0,01$).

Tabela 11. Porównanie parametrów antropometrycznych i ciśnienia tętniczego kobiet i mężczyzn w całej grupie badanej. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (); $p < 0,001$ (***)**

<i>Parametry</i>	<i>Cała grupa badana</i>	
	<i>Kobiety(n=33)</i>	<i>Mężczyźni (n= 35)</i>
Parametry antropometryczne		
Wiek (lata)	$49,70 \pm 13,16$	$51,83 \pm 11,93$
Wzrost (cm)	$160,30 \pm 29,77$	$177,06 \pm 5,89^{***}$
Masa ciała (kg)	$82,84 \pm 16,23$	$97,56 \pm 19,116^{**}$
BMI (kg/m^2)	$30,44 \pm 6,23$	$31,14 \pm 5,98$
Obwód pasa (cm)	$99,32 \pm 13,49$	$106,06 \pm 13,84$
Obwód bioder (cm)	$111,47 \pm 11,63$	$110,35 \pm 8,99$
WHR	$0,89 \pm 0,07$	$0,96 \pm 0,06^{***}$
Zawartość tkanki tłuszczowej (%) (kg)	$36,34 \pm 7,80$ $30,55 \pm 11,22$	$29,23 \pm 6,77^{***}$ $28,68 \pm 9,95$
Nadciśnienie RR skurcz.(mmHg) RR.rozkurcz.(mmHg)	$16/33$ (48,5%) $128,65 \pm 16,53$ $79,48 \pm 8,56$	$25/35$ (71,4%) $139,03 \pm 19,71^*$ $87,31 \pm 11,11^{**}$

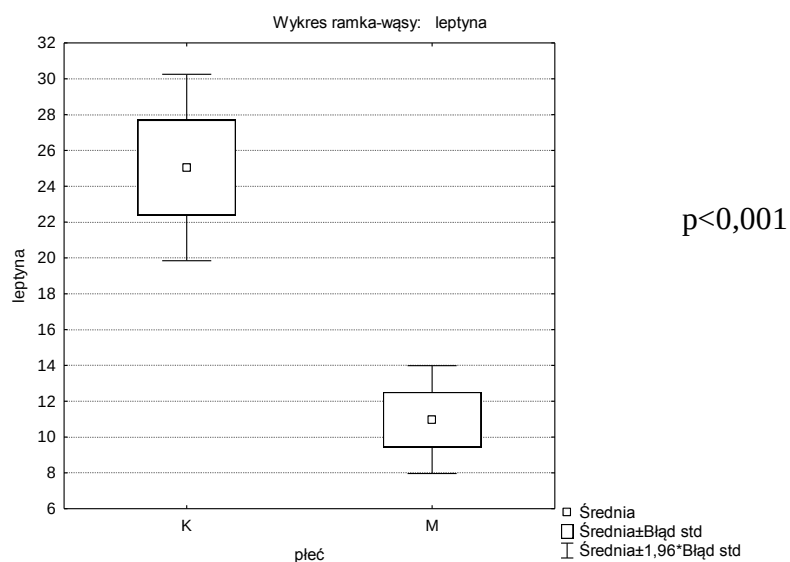
Kobiety charakteryzowały się niższymi wartościami glukozy w punkcie 0' ($5,24 \pm 0,51$ vs $5,61 \pm 0,70$; $p < 0,05$), cholesterolu LDL ($3,04 \pm 0,73$ vs $3,50 \pm 0,92$; $p < 0,05$), wyższymi HDL ($1,22 \pm 0,3$ vs $1,05 \pm 0,22$; $p < 0,01$) oraz leptyny ($25,05 \pm 12,45$ vs $10,98 \pm 7,68$; $p = 0,000$) [Wykres 2]. Charakterystyka grup K i M w zakresie parametrów biochemicznych przedstawia Tabela 12.

Tabela 12. Porównanie parametrów biochemicznych w grupie kobiet i mężczyzn całej grupy badanych. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (); $p < 0,001$ (***)**

<i>Parametry</i>	<i>Cała grupa badanych</i>	
	<i>Kobiety (n=33)</i>	<i>Mężczyźni (n=35)</i>
Parametry gospodarki węglowodanowej		
Glukoza-0' (mmol/l)	$5,24 \pm 0,51$	$5,61 \pm 0,70^*$
Insulina-0' (μ IU/ml)	$15,45 \pm 8,11$	$18,41 \pm 10,99$
HOMA	$3,61 \pm 1,90$	$4,63 \pm 2,91$
AUC-Glu DTTG	$1009,07 \pm 213,65$	$1078,61 \pm 217,49$
AUC-Ins DTTG	$12744,77 \pm 8599,53$	$15872,96 \pm 10146,94$
AUC-GIP DTTG	$27683,93 \pm 10671,76$	$24935,55 \pm 6363,00$
AUC-GLP-1 DTTG	$752,40 \pm 275,75$	$794,42 \pm 334,41$
Parametry gospodarki lipidowej		
FFA-0' (mmol/l)	$0,63 \pm 0,21$	$0,54 \pm 0,22$
Tch (mmol/l)	$5,00 \pm 0,86$	$5,35 \pm 0,97$
HDL (mmol/l)	$1,22 \pm 0,3$	$1,05 \pm 0,22^{**}$
LDL (mmol/l)	$3,04 \pm 0,73$	$3,50 \pm 0,92^*$
TG (mmol/l)	$1,62 \pm 0,77$	$1,78 \pm 0,79$

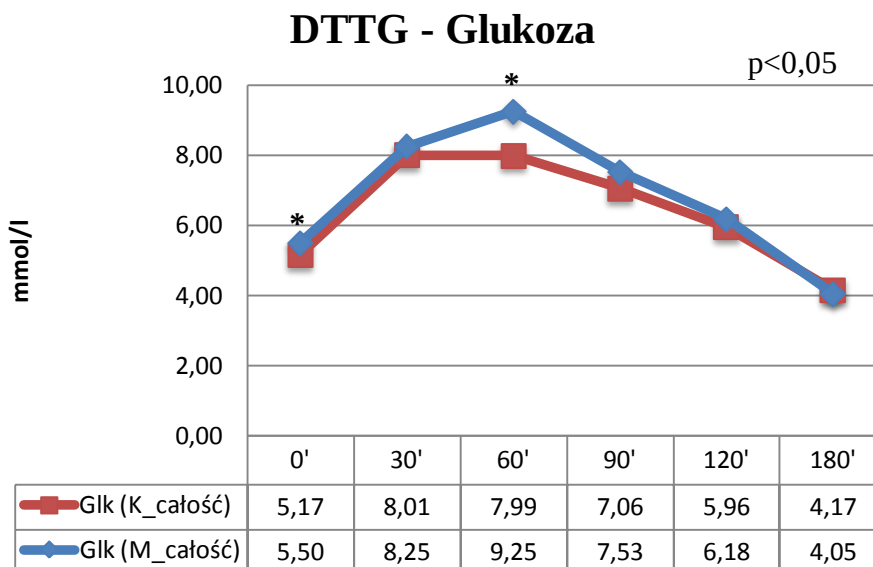
AUC-FFA DTTL	320,55 ± 104,73	288,85 ± 119,03
AUC-TG DTTL	1046,00 ± 497,33	1222,14 ± 587,17
AUC-GIP DTTL	108879,14 ± 44835,47	97693,44 ± 39530,24
AUC-GLP-1 DTTL	1974,60 ± 618,46	1920,08 ± 274,00
Adipokiny		
Leptyna (ng/ml)	25,05 ± 12,45	10,98 ± 7,68***
Adiponektyna(μg/ml)	5,32 ± 2,21	4,47 ± 1,96
Visfatyna (ng/ml)	1,18 ± 0,97	1,18 ± 0,83

Wykres 2. Stężenie leptyny w zależności od płci.



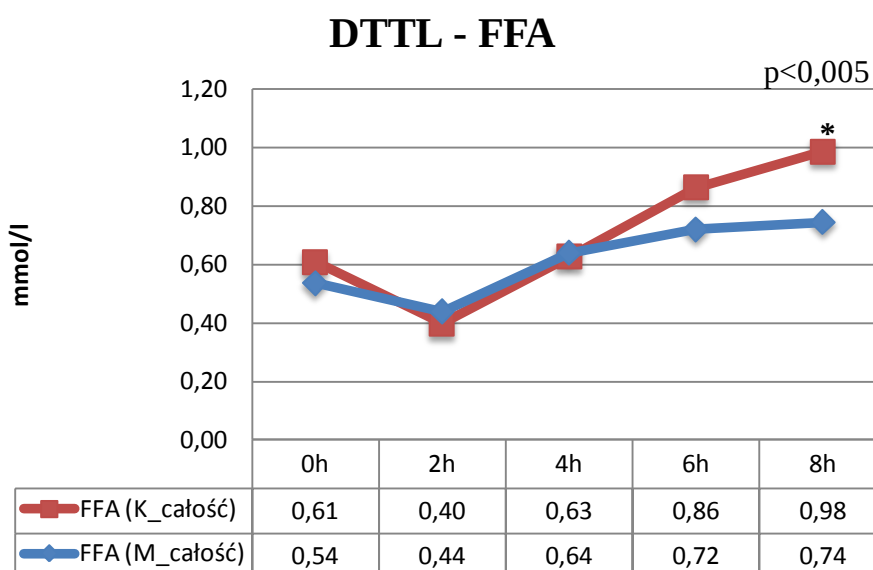
W grupie M obserwowano tendencję do wyższych wartości glukozy, insuliny i TG w czasie obu testów, jednak bez osiągnięcia istotności statystycznej. Jedynie wartości **glukozy** na czczo ($5,17 \pm 0,53$ vs $5,5 \pm 0,69$; $p < 0,05$) i w 60 minucie ($7,99 \pm 2,28$ vs $9,25 \pm 2,37$; $p < 0,05$) DTTG różniły się statystycznie istotnie między grupami K i M [Wykres 3].

Wykres 3. Przebieg krzywej glikemii w trakcie DTTG w zależności od płci.



Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu FFA w zależności od płci w całym DTTG oraz w DTTL do 6 godziny trwania testu. W ostatnim punkcie testu tolerancji lipidów stwierdzono istotnie wyższy stężenie **FFA** u kobiet ($0,98 \pm 0,36$ vs $0,74 \pm 0,27$; $p < 0,005$) [Wykres 4].

Wykres 4. Przebieg krzywej stężeń FFA w DTTL w zależności od płci.

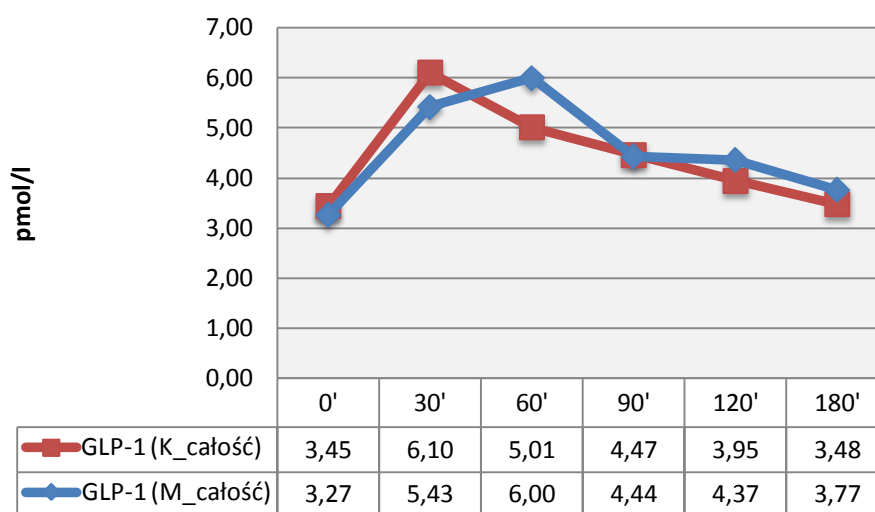


W obu testach nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach inkrety w zależności od płci. W DTTG maksymalne stężenie GLP-1 obserwowano w 30 minucie u K, natomiast u M w 60 minucie. Przebieg krzywych GLP-1 i GIP w obu testach przedstawia Wykres 5 a i b.

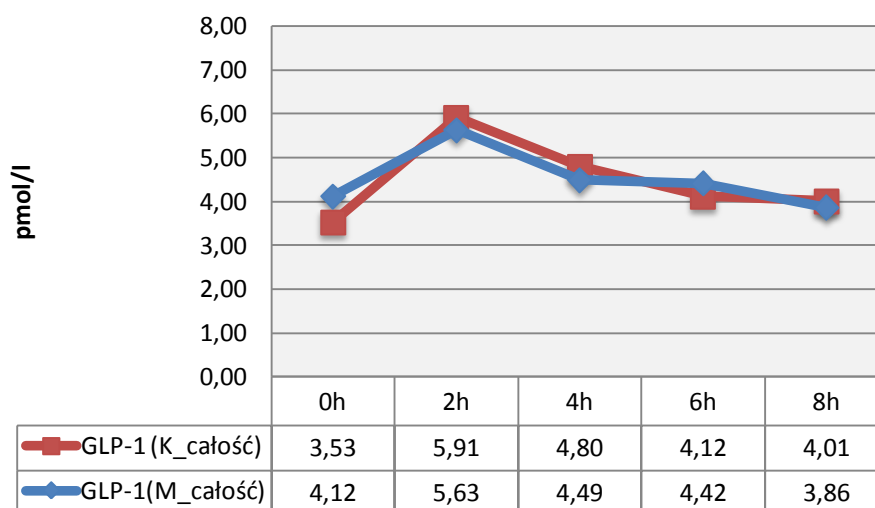
Wykres 5.

a) Przebieg krzywej wyrzutu GLP-1 podczas testów w zależności od grupy – K vs M.

DTTG - GLP-1

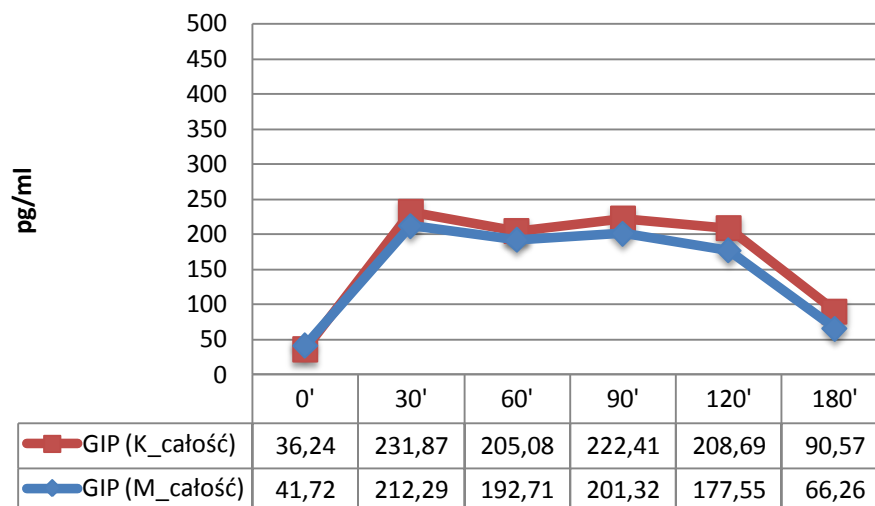


DTTL - GLP-1

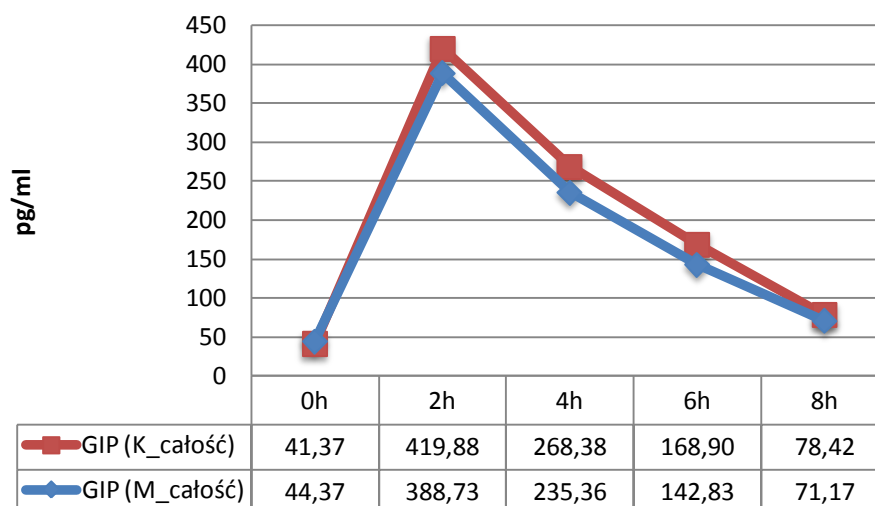


b) Przebieg krzywej wyrzutu GIP podczas testów w zależności od grupy – K vs M.

DTTG - GIP



DTTL - GIP



6.1.3 Porównanie wyników w obu grupach badanych – MS i C z uwzględnieniem podziału na płeć

Różnice w parametrach antropometrycznych i biochemicznych między K i M w grupie MS, między K i M w C oraz różnice między przedstawicielami tej samej płci, ale należącymi do różnych grup badanych – MS i C przedstawiono w Tabeli 13 i 14 (K vs M w MS => kolumna A vs kolumna B; K vs M w C => kolumna C vs kolumna D; K w MS vs K w C => kolumna A vs kolumna C; M w MS vs M w C => kolumna B vs kolumna D).

Wyniki pacjentów z MS w grupach K vs M

W grupie MS mężczyźni charakteryzowali się istotnie wyższym wskaźnikiem **WHR** ($0,91 \pm 0,06$ vs $0,98 \pm 0,05$; $p < 0,001$), natomiast kobiety wyższą **ilościową** ($36,85 \pm 8,94$ vs $31,27 \pm 8,77$; $p < 0,05$) i **procentową zawartością tkanki tłuszczowej** ($40,7 \pm 5,72$ vs $31,34 \pm 4,7$; $p < 0,001$). Istotną cechą różnicującą K i M w grupie MS były **wartości ciśnienia rozkurczowego** ($83,25 \pm 6,92$ vs $89,83 \pm 10,01$; $p < 0,05$), **masy ciała** ($90,66 \pm 14,11$ vs $101,37 \pm 18,86$; $p < 0,05$) i **wzrostu** ($156,36 \pm 35,82$ vs $175,76 \pm 5,69$; $p < 0,001$) [Tabela 13].

U mężczyzn w grupie MS stwierdzono na czczo istotnie statystycznie wyższe wartości **glukozy** ($5,37 \pm 0,51$ vs $5,77 \pm 0,68$; $p < 0,05$) i niższe **HDL** ($1,19 \pm 0,3$ vs $1,03 \pm 0,23$; $p < 0,05$). Kobiety zaś charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami **leptyny** ($29,49 \pm 11,48$ vs $11,67 \pm 7,62$; $p < 0,001$) [Tabela 14].

Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w przebiegu krzywych glukozy, insuliny, FFA, TG, czy inkretyn w DTTG i DTTL między K i M w grupie MS. Grupy te różniły się jedynie stężeniem **FFA w 8 godzinie DTTL** ($1,06 \pm 1,35$ vs $0,73 \pm 0,28$; $p < 0,001$).

Tabela 13. Porównanie parametrów antropometrycznych i ciśnienia tętniczego w grupie kobiet i mężczyzn obu grup badanych – MS i C. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (); $p < 0,001$ (***) – dla różnic między płciami.**

<i>Parametry</i>	<i>Zespół Metaboliczny (MS)</i>		<i>Kontrola (C)</i>	
	<i>Kobiety (n=22)</i> <i>A</i>	<i>Mężczyźni (n= 28)</i> <i>B</i>	<i>Kobiety (n=11)</i> <i>C</i>	<i>Mężczyźni (n=7)</i> <i>D</i>
Parametry antropometryczne				
Wiek (lata)	53,23 $\pm$ 12,68	53,52 $\pm$ 11,43	42,64 $\pm$ 11,58*vsA	44,86 $\pm$ 12,24
Wzrost (cm)	156,36 $\pm$ 35,82	175,76 $\pm$ 5,69***vs A	168,18 $\pm$ 6,27***vs A	182,43 $\pm$ 3,05**vs C **vs B
Masa ciała (kg)	90,66 $\pm$ 14,11	101,37 $\pm$ 18,86*vs A	67,92 $\pm$ 6,67	81,74 $\pm$ 10,4*vs C *vs B
BMI (kg/m ²)	33,78 $\pm$ 4,81	32,72 $\pm$ 5,36	24,04 $\pm$ 2,37***vs A	24,61 $\pm$ 3,56***vs B
Obw.pasa (cm)	106,87 $\pm$ 10,23	110,25 $\pm$ 12,44	86,27 $\pm$ 6,63***vs A	91,71 $\pm$ 7,39***vs B
Obw.bioder (cm)	117,16 $\pm$ 10,74	112,67 $\pm$ 8,13	101,64 $\pm$ 4,08*** vs A	102,43 $\pm$ 7,48*vs B
WHR	0,91 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,05***vs A	0,85 $\pm$ 0,07* vs A	0,90 $\pm$ 0,04**vs B
Tk.łuszcz. (%)	40,7 $\pm$ 5,72	31,34 $\pm$ 4,7***vs A	28,82 $\pm$ 4,4***vs A	20,8 $\pm$ 7,6*vs C ***vs B
(kg)	36,85 $\pm$ 8,94	31,27 $\pm$ 8,77*vs A	19,68 $\pm$ 4,04***vs A	18,31 $\pm$ 7,67**vs B
Nadciśnienie RRsk. (mmHg)	72,72%(16/22) 137,7 $\pm$ 12,23	85,7% (24/28) 143,39 $\pm$ 19,04	0% (0/11) 111,36 $\pm$ 6,9***vs A	14,28% (1/7) 120,95 $\pm$ 10,04*vs C **vs B
RR.rozk.	83,25 $\pm$ 6,92	89,83 $\pm$ 10,01*vs A	72,27 $\pm$ 6,64***vs A	76,9 $\pm$ 9,74**vs B

Wyniki ochotników grupy kontrolnej (C) - K vs M

W grupie C kobiety cechowały się istotnie wyższą **procentową zawartością tkanki tłuszczowej** ($28,82 \pm 4,4$ vs $20,8 \pm 7,6$; $p < 0,05$). U M odnotowano istotnie wyższe **wartości ciśnienia skurczowego** ($111,36 \pm 6,9$ vs $120,95 \pm 10,04$; $p < 0,05$), **masy ciała** ($67,92 \pm 6,67$ vs $81,74 \pm 10,4$; $p < 0,05$) i **wzrostu** ($168,18 \pm 6,27$ vs $182,43 \pm 3,05$; $p < 0,01$) [Tabela 13].

U kobiet w grupie C stwierdzono istotne statystycznie wyższe wartości **leptyny** ($13,18 \pm 4,85$ vs $3,05 \pm 0,92$; $p < 0,05$) i **FFA na czczo** ($0,48 \pm 0,13$ vs $0,34 \pm 0,12$; $p < 0,05$) oraz niższe wartości **cholesterolu całkowitego** ($4,5 \pm 0,47$ vs $5,32 \pm 0,89$; $p < 0,05$) i **LDL** ($2,69 \pm 0,47$ vs $3,65 \pm 0,81$; $p < 0,01$) w porównaniu do M z tej samej grupy [Tabela 14].

Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w przebiegu krzywych glukozy, insuliny, FFA, TG, czy inkretyn w DTTG i DTTL między K i M w grupie C. Grupy te różniły się jedynie poziomem **insuliny w 120 minucie DTTG** ($46,46 \pm 36,80$ vs $20,44 \pm 12,71$; $p < 0,05$).

Tabela 14. Porównanie parametrów biochemicznych w grupie kobiet i mężczyzn obu grup badanych – MS i C. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (); $p < 0,001$ (***) – dla różnic między płciami.**

Parametry	Zespół metaboliczny (MS)		Kontrola (C)	
	Kobiety (n=22) A	Mężczyźni (n=28) B	Kobiety (n=11) C	Mężczyźni (n=7) D
Parametry gospodarki węglowodanowej				
Glukoza-0'(mmol/l)	$5,37 \pm 0,51$	$5,77 \pm 0,68^{*}$ vs A	$4,97 \pm 0,4^{*}$ vs A	$4,94 \pm 0,26^{***}$ vs B
Insulina-0'(μ IU/ml)	$18,13 \pm 8,5$	$20,74 \pm 11,12$	$10,09 \pm 3,41^{***}$ vs A	$9,46 \pm 3,25^{***}$ vs B
HOMA	$4,29 \pm 1,91$	$5,3 \pm 2,9$	$2,27 \pm 0,96^{***}$ vs A	$2,06 \pm 0,64^{***}$ vs B
AUC-Glu DTTG	$1099,24 \pm 175,92$	$1152,42 \pm 176,74$	$845,13 \pm 179,78^{***}$ vs A	$793,89 \pm 75,56^{***}$ vs B
AUC-Ins DTTG	$15292,73 \pm 8977,12$	$18305,67 \pm 9970,61$	$8112,14 \pm 5669,73^{**}$ vs A	$6489,64 \pm 2477,81^{***}$ vs B
AUC-GIP DTTG	$28680,56 \pm 10884,91$	$24950,75 \pm 6171,05$	$25871,88 \pm 10533,11$	$24869,73 \pm 7785,18$

AUC-GLP1 DTTG	670,98 ± 142,12	696,45 ± 297,15	850,11 ± 378,11	872,79 ± 374,39
Parametry gospodarki lipidowej				
FFA-0' (mmol/l)	0,7 ± 0,2	0,59 ± 0,21	0,48 ± 0,13**vs A	0,34 ± 0,12*vs C **vs B
Tch (mmol/l)	5,26 ± 0,91	5,36 ± 1,01	4,5 ± 0,47**vs A	5,32 ± 0,89*vs C
HDL (mmol/l)	1,19 ± 0,3	1,03 ± 0,23*vs A	1,29 ± 0,30	1,11 ± 0,17
LDL (mmol/l)	3,23 ± 0,77	3,46 ± 0,96	2,69 ± 0,47*vs A	3,65 ± 0,81**vs C
TG (mmol/l)	1,87 ± 0,76	1,91 ± 0,83	1,13 ± 0,54**vs A	1,28 ± 0,33*vs B
AUC-FFA DTTL	339,38 ± 104,65	311,36 ± 114,54	282,87 ± 98,87	187,6 ± 86,09*vs B
AUC-TG DTTL	1211,84 ± 468,91	1359,88 ± 561,42	714,33 ± 384,98**vs A	625,3 ± 188,4***vs B
AUC-GIP DTTL	112155,72 ± 49467,18	90895,43 ± 34061,99	102921,71 ± 36343,40	127151,50 ± 51045,39**vs B
AUC-GLP-1 DTTL	1926,50 ± 641,05	1833,90 ± 355,82	2046,75 ± 671,55	2006,25 ± 169,61
Adipokiny				
Leptyna (ng/ml)	29,49 ± 11,48	11,67 ± 7,62***vs A	13,18 ± 4,85**vs A	3,05 ± 0,92*vs C *vs B
Adiponektyna (μg/ml)	4,4 ± 1,49	4,15 ± 1,51	7,76 ± 2,02***vs A	8,14 ± 3,61**vs B
Visfatyna (ng/ml)	1,31 ± 1,09	1,06 ± 0,6	0,87 ± 0,53	2,52 ± 2,09

Porównanie wyników kobiet (K) w grupie pacjentów z MS vs kobiety z grupy kontrolnej (C)

Kobiety w grupie MS względem kobiet grupy C były **starsze** (53,23 ± 12,68 vs 42,64 ± 11,58; p<0,05), **niższe** (156,36 ± 35,82 vs 168,18 ± 6,27; p<0,001), charakteryzowały się wyższym wskaźnikiem **BMI** (33,78 ± 4,81 vs 24,04 ± 2,37; p<0,001), **obwodem pasa** (106,87 ± 10,23 vs 86,27 ± 6,63; p<0,001) i **bioder** (117,16 ± 10,74 vs 101,64 ± 4,08; p<0,001), wyższym **WHR** (0,91 ± 0,06 vs 0,85 ± 0,07; p<0,05), **ilościową** (36,85 ± 8,94 vs

19,68 ± 4,04; p<0,001) i **procentową zawartością tkanki tłuszczowej** (40,7 ± 5,72 vs 28,82 ± 4,4; p<0,001) oraz wartościami **skurczowego** (137,7 ± 12,23 vs 111,36 ± 6,9; p<0,001) i **rozkurczowego ciśnienia tętniczego** (83,25 ± 6,92 vs 72,27 ± 6,64; p<0,001) [Tabela 13].

Kobiety w grupie MS charakteryzowały się statystycznie istotnie wyższymi parametrami gospodarki węglowodanowej w porównaniu z K z grupy C: **glukoza na czczo** (5,37 ± 0,51 vs 4,97 ± 0,4; p<0,05), **insulina** (18,13 ± 8,5 vs 10,09 ± 3,41; p<0,001), **HOMA** (4,29 ± 1,91 vs 2,27±0,96; p<0,001), **AUC-Glk** (1099,24 ± 175,92 vs 845,13 ± 179,78; p<0,001), **AUC-Ins** (15292,73 ± 8977,12 vs 8112,14 ± 5669,73; p<0,01) w **DTTG**. Obserwowano u nich również istotnie wyższe wartości **FFA** (0,7 ± 0,2 vs 0,48 ± 0,13; p<0,01), **Tch** (5,26 ± 0,91 vs 4,5 ± 0,47; p<0,01), **LDL** (3,23 ± 0,77 vs 2,69 ± 0,47; p<0,05), **TG** (1,87 ± 0,76 vs 1,13 ± 0,54; p<0,01), **AUC-TG w DTTL** (1211,84 ± 468,91 vs 714,33 ± 384,98; p<0,01), **leptyny** (29,49 ± 11,48 vs 13,18±4,85; p<0,01) oraz niższe wartości **adiponektyny** (4,4 ± 1,49 vs 7,76±2,02; p<0,001) [Tabela 14].

Glukoza na czczo jak również **glikemia** w trakcie DTTG i DTTL była istotnie statystycznie wyższa u K z MS (p<0,05; p<0,005). DTTL nie wpłynął znacząco na stężenia glukozy w trakcie testu [Błąd! Nieprawidłowy odsyłacz do zakładki: wskazuje na nią samą. a]. Poziom **insuliny** na czczo był około dwa razy wyższy u K z MS (DTTG p<0,01; DTTL p<0,005). W DTTL poziom insuliny był niższy od poziomu insuliny uwolnionej w trakcie DTTG, ale wciąż wyższy u K z MS niż w grupie kontrolnej [Wykres 6b].

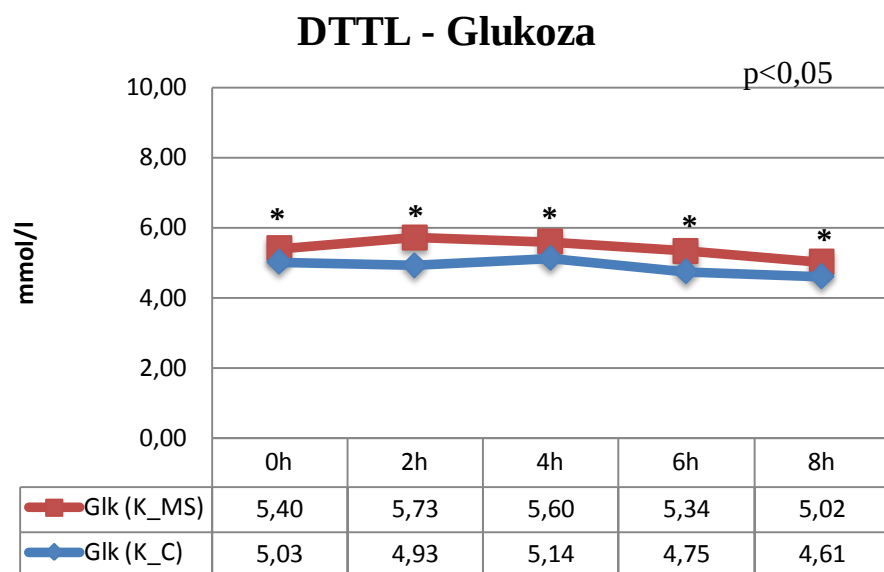
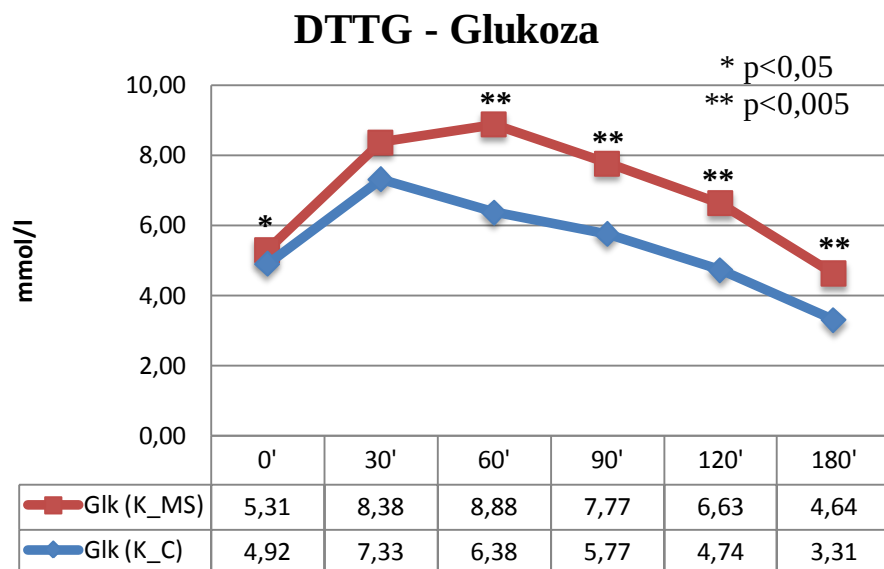
U K w grupie MS stwierdzono również istotnie statystycznie wyższe wartości **TG** w trakcie całego testu – DTTG i DTTL (p<0,01; p<0,005) [Wykres 6c].

Poziom **FFA** w obu testach był również wyższy u K w grupie MS, jednak w DTTL tylko wartości na czczo i w 4 godzinie DTTL różniły się statystycznie istotnie (p<0,05). Poziom **FFA** we krwi w trakcie DTTG obniżał się, gdy w czasie DTTL wzrastał [Błąd! Nieprawidłowy odsyłacz do zakładki: wskazuje na nią samą.d].

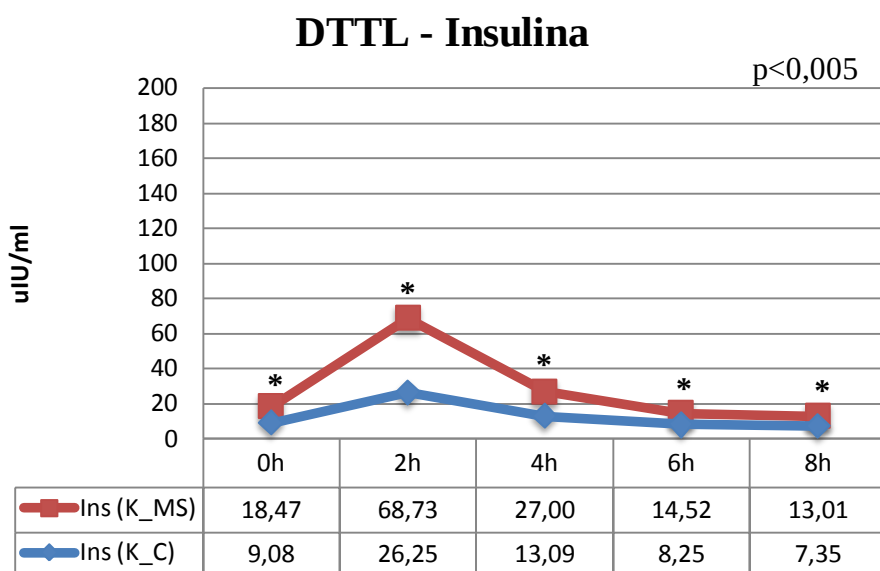
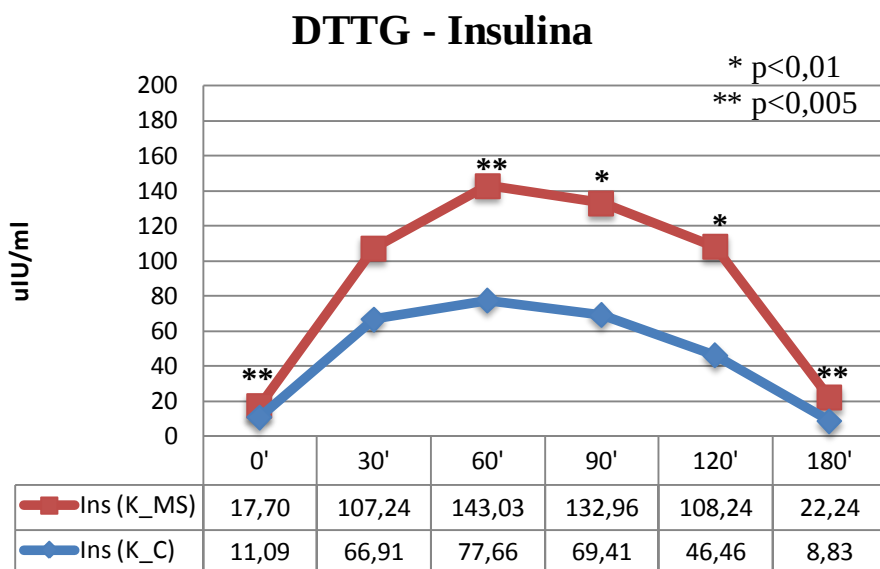
Poziom **GLP-1** i **GIP** na czczo jak i w trakcie obu testów nie różnił się istotnie statystycznie u K z grup MS vs C [Wykres 6 e i f]. W trakcie DTTL poziom **GIP** był około 2 razy wyższy w porównaniu z DTTG [Błąd! Nieprawidłowy odsyłacz do zakładki: wskazuje na nią samą. f].

Wykres 6

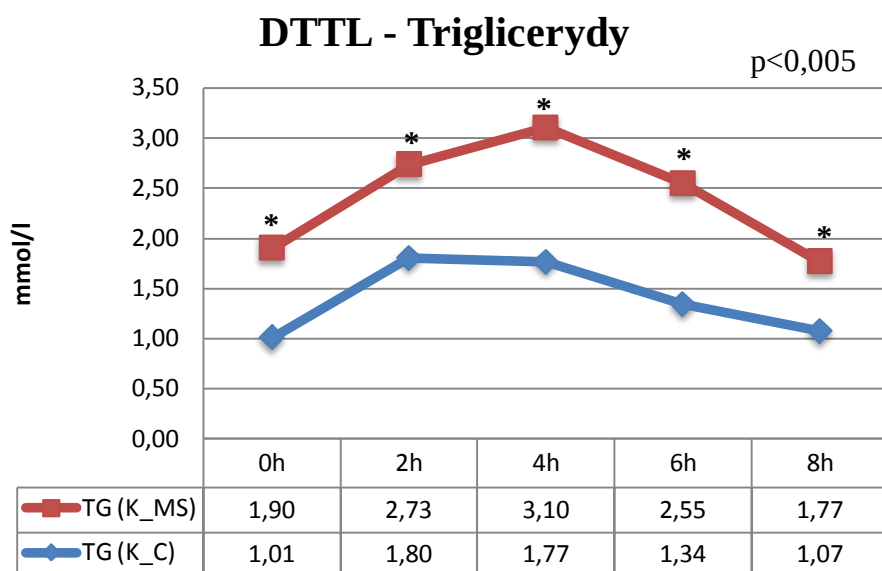
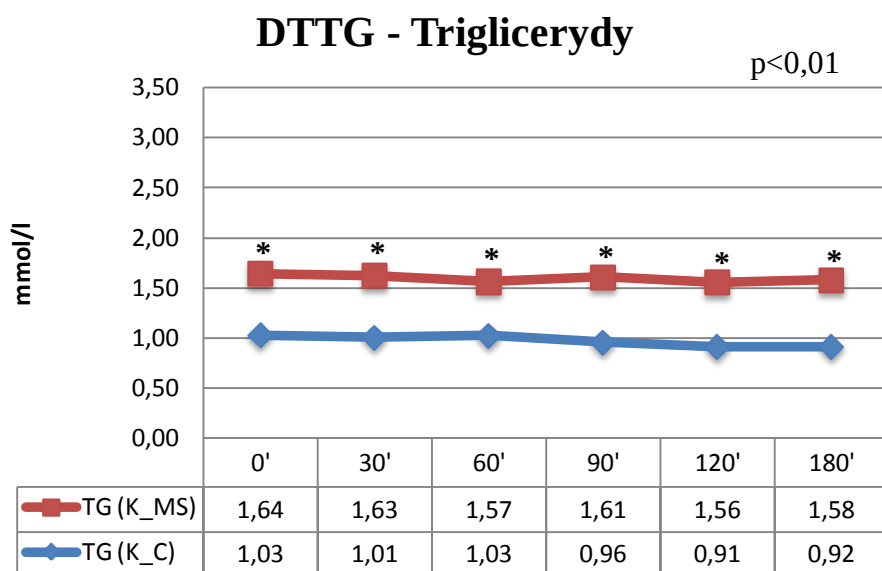
a) Przebieg krzywej glikemii podczas testów u kobiet – MS vs C.



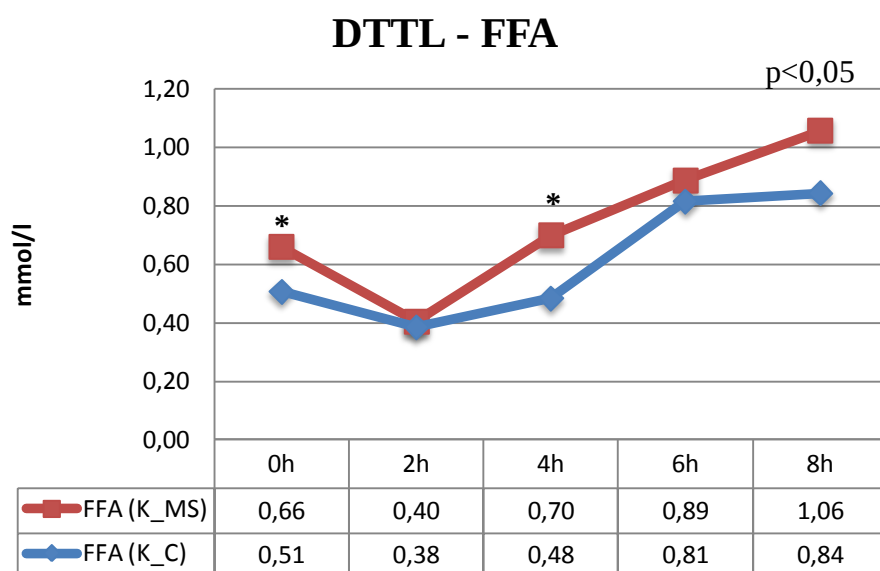
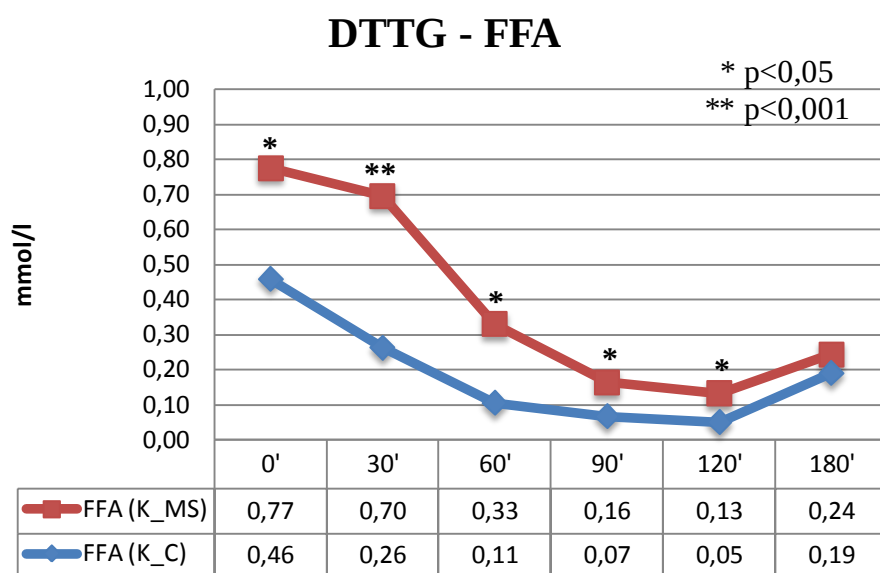
b) Przebieg krzywej insulinemii podczas testów u kobiet – MS vs C.



c) Przebieg krzywej stężeń TG podczas testów u kobiet – MS vs C.

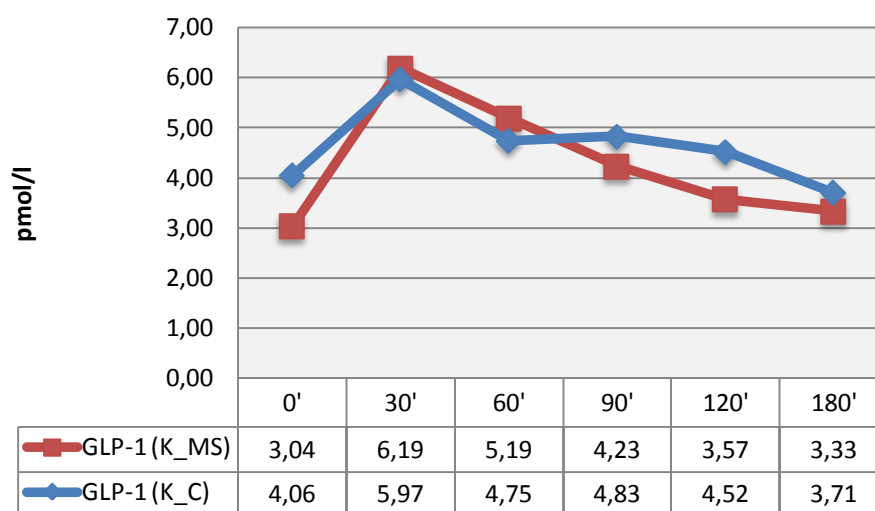


d) Przebieg krzywej stężeń FFA podczas testów u kobiet – MS vs C.

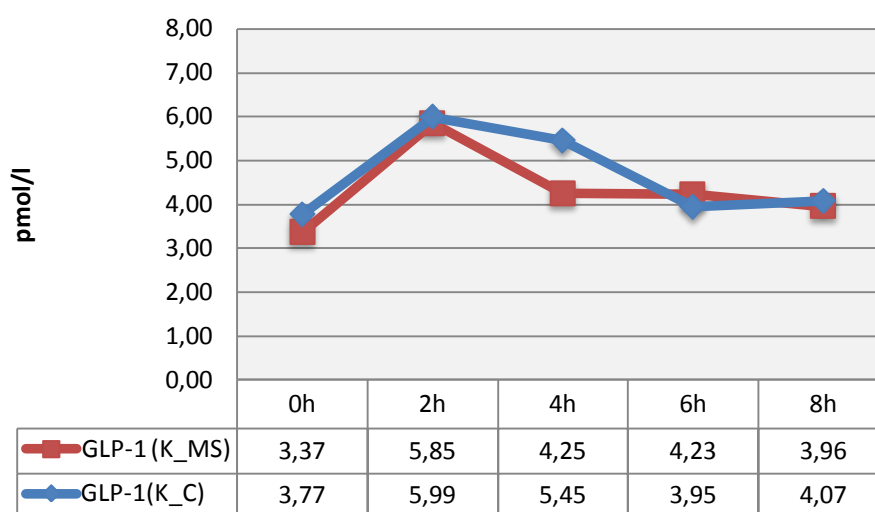


e) Przebieg krzywej stężeń GLP-1 podczas testów u kobiet – MS vs C.

DTTG - GLP-1

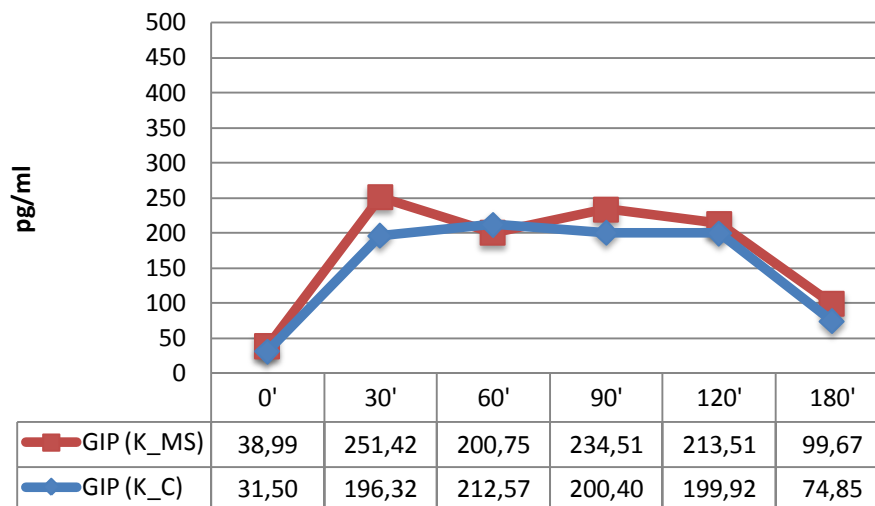


DTTL - GLP-1

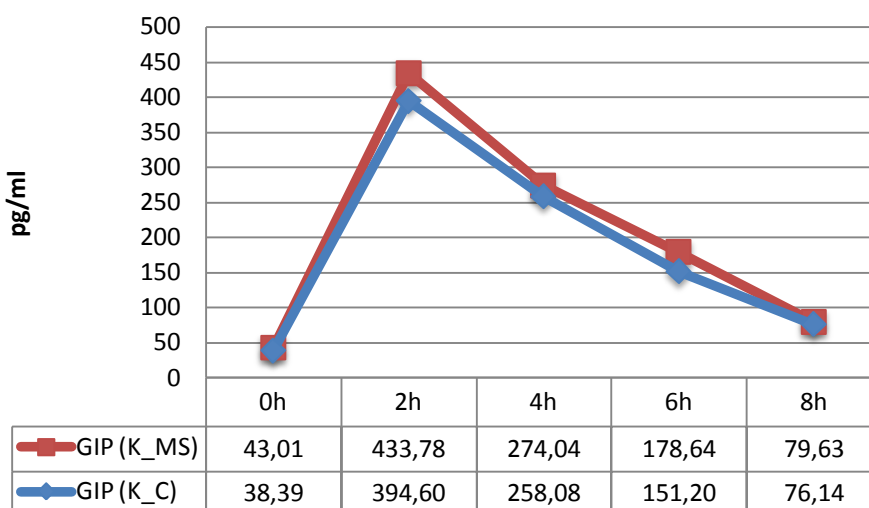


f) Przebieg krzywej stężeń GIP podczas testów u kobiet – MS vs C.

DTTG - GIP



DTTL - GIP



Porównanie wyników mężczyzn (M) w grupach MS vs C

Mężczyźni stanowiący grupę MS względem mężczyzn grupy C byli **niżsi** ($175,76 \pm 5,69$ vs $182,43 \pm 3,05$; $p < 0,01$), **ciężsi** ($101,37 \pm 18,86$ vs $81,74 \pm 10,4$; $p < 0,05$),

charakteryzowali się wyższym wskaźnikiem **BMI** ($32,72 \pm 5,36$ vs $24,61 \pm 3,56$; $p < 0,001$), **obwodem pasa** ($110,25 \pm 12,44$ vs $91,71 \pm 7,39$; $p < 0,001$) i **bioder** ($112,67 \pm 8,13$ vs $102,43 \pm 7,48$; $p < 0,05$), wyższym **WHR** ($0,98 \pm 0,05$ vs $0,90 \pm 0,04$; $p < 0,01$), **ilościową** ($31,27 \pm 8,77$ vs $18,31 \pm 7,67$; $p < 0,01$) i **procentową zawartością tkanki tłuszczowej** ($31,34 \pm 4,7$ vs $20,8 \pm 7,6$; $p < 0,001$) oraz wyższymi wartościami **skurczowego** ($143,39 \pm 19,04$ vs $120,95 \pm 10,04$; $p < 0,01$) i **rozkurczowego ciśnienia tętniczego** ($89,83 \pm 10,01$ vs $76,9 \pm 9,74$; $p < 0,01$) [Tabela 13].

Mężczyźni w grupie MS odznaczali się statystycznie istotnie wyższymi parametrami gospodarki węglowodanowej w porównaniu do M z grupy C – **glukoza na czczo** ($5,77 \pm 0,68$ vs $4,94 \pm 0,26$; $p < 0,001$), **insulina** ($20,74 \pm 11,12$ vs $9,46 \pm 3,25$; $p < 0,001$), **HOMA** ($5,3 \pm 2,9$ vs $2,06 \pm 0,64$; $p < 0,001$), **AUC-Glk** ($1152,42 \pm 176,74$ vs $793,89 \pm 75,56$; $p < 0,001$), **AUC-Ins** ($18305,67 \pm 9970,61$ vs $6489,64 \pm 2477,81$; $p < 0,001$) w **DTTG**. Obserwowano u nich również istotnie wyższe wartości **FFA** ($0,59 \pm 0,21$ vs $0,34 \pm 0,12$; $p < 0,01$), **AUC-FFA w DTTL** ($311,36 \pm 114,54$ vs $187,6 \pm 86,09$; $p < 0,05$), **TG** ($1,91 \pm 0,83$ vs $1,28 \pm 0,33$; $p < 0,05$), **AUC-TG w DTTL** ($1359,88 \pm 561,42$ vs $625,3 \pm 188,4$; $p < 0,001$), **leptyny** ($11,67 \pm 7,62$ vs $3,05 \pm 0,92$; $p < 0,05$) oraz niższymi wartościami **adiponektyny** ($4,15 \pm 1,51$ vs $8,14 \pm 3,61$; $p < 0,01$). Poza tym stwierdzono u M z MS istotnie statystycznie niższe wartości **AUC GIP w DTTL** w porównaniu do M z grupy C ($90895,43 \pm 34061,99$ vs $127151,50 \pm 51045,39$; $p < 0,01$) [Tabela 14].

Glukoza na czczo jak również **glikemia** w trakcie DTTG i DTTL była istotnie statystycznie wyższa u M z MS ($p < 0,005$). DTTL nie wpłynął znacząco na poziom glukozy w trakcie testu [Wykres 7a]. Stężenie **insuliny** na czczo było ponad dwa razy wyższe u M z MS ($p < 0,01$). W DTTL stężenie insuliny było niższe od stężenia insuliny uwolnionej w trakcie DTTG, ale wciąż wyższe u M z MS niż w grupie kontrolnej [Wykres 7b].

U M w grupie MS stwierdzono również istotnie statystycznie wyższe wartości **TG** w trakcie całego testu – DTTG i DTTL ($p < 0,05$; $p < 0,001$) [Wykres 7c].

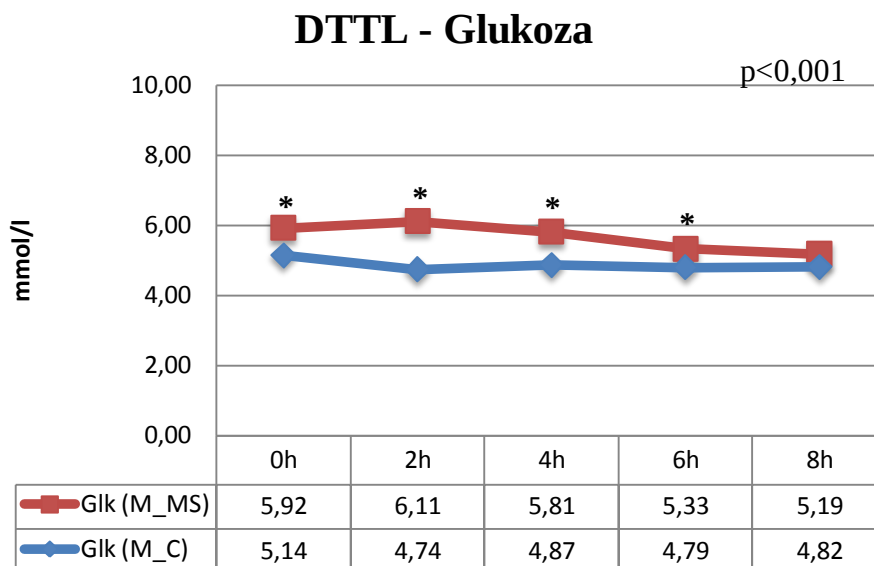
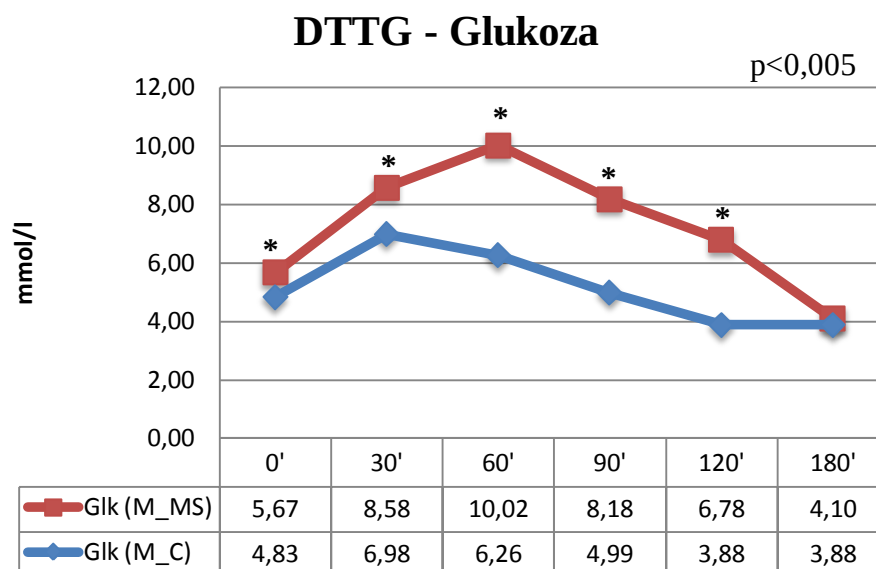
Stężenie **FFA** w obu testach był również wyższy u M w grupie MS, jednak tylko wartości w 30, 60, 90 i 120 minucie w DTTG oraz w 2 i 4 godzinie DTTL różniły się statystycznie istotnie ($p < 0,001$; $p < 0,05$). Stężenie FFA we krwi w trakcie DTTG obniżało się, gdy w czasie DTTL wzrastało [Wykres 7d].

Wartości GLP-1 i GIP na czczo jak i w trakcie obu testów nie różniły się istotnie statystycznie u M z grup MS vs C [Wykres 7 e i f]. W trakcie DTTL stężenia GIP były około 2 razy wyższe w porównaniu z DTTG. W DTTL wartości uwolnionego GIP były nieznacznie

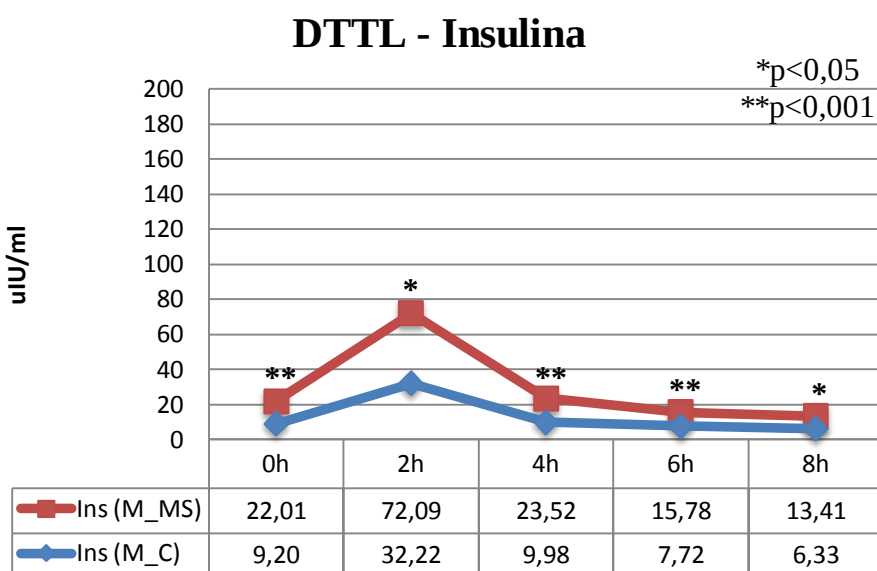
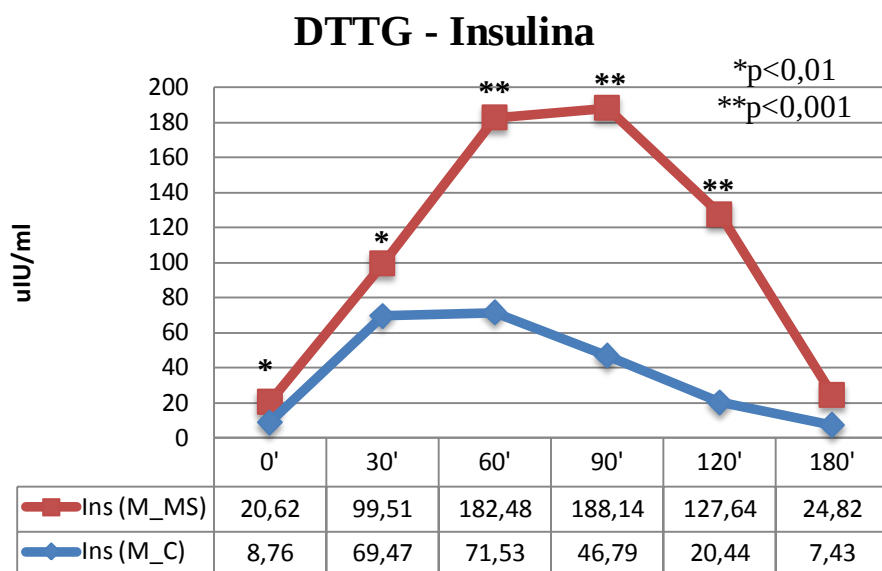
niższe u M z MS, choć różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (wartość p dla poszczególnych punktów testu zawierała się w zakresie 0,113-0,929) [Wykres 7f].

Wykres 7

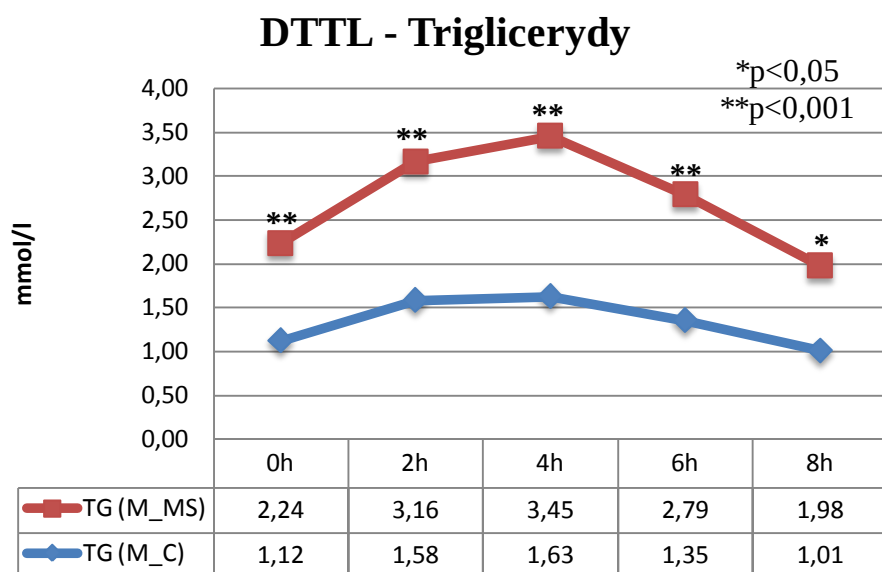
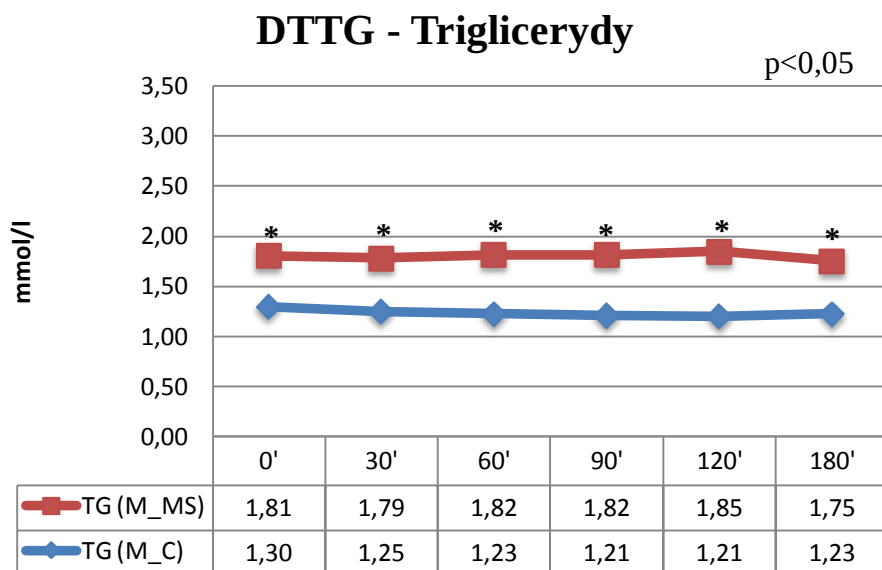
a) Przebieg krzywej glikemii podczas testów u mężczyzn – MS vs C.



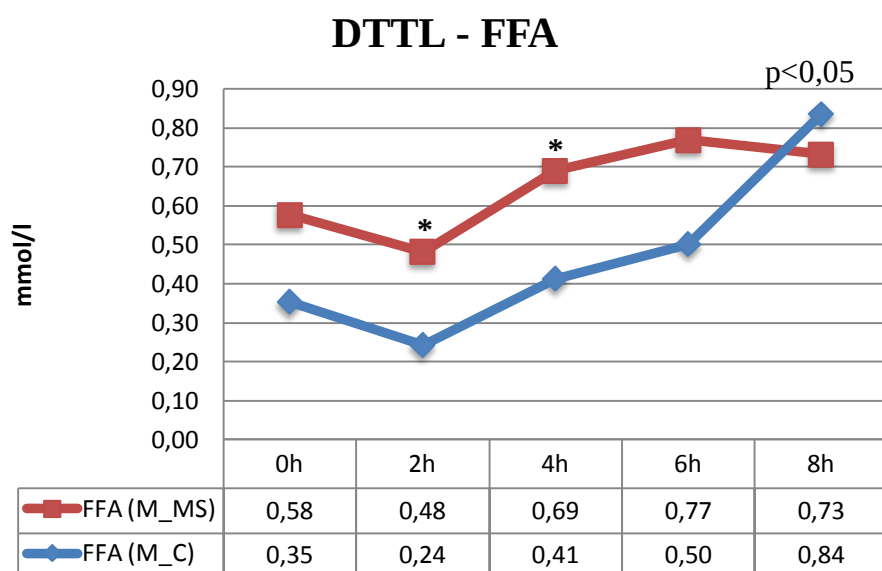
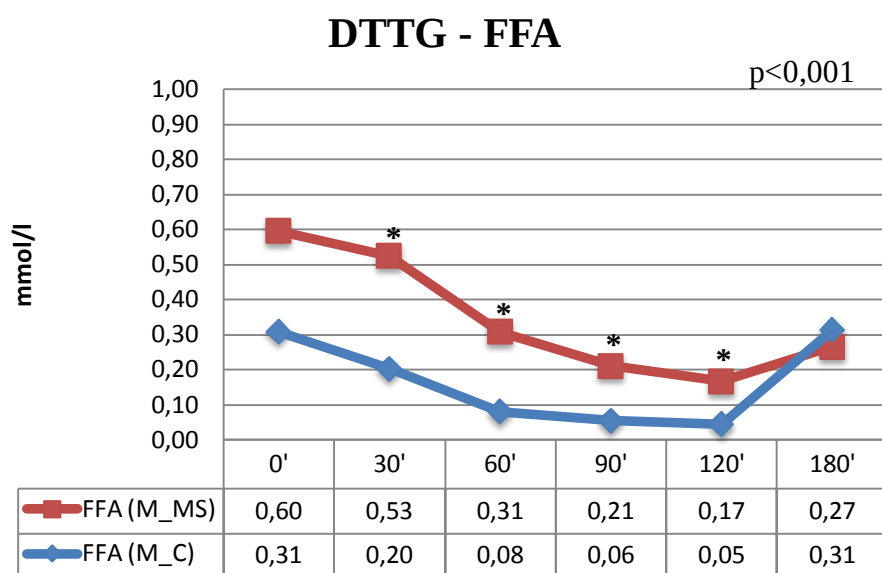
b) Przebieg krzywej insulinemii podczas testów u mężczyzn – MS vs C.



c) Przebieg krzywej poziomu TG podczas testów u mężczyzn – MS vs C.

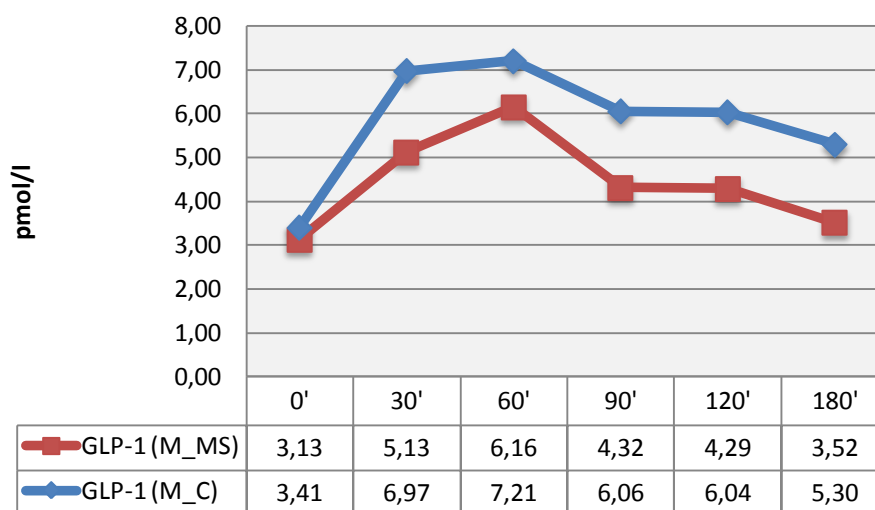


d) Przebieg krzywej stężeń FFA podczas testów u mężczyzn – MS vs C.

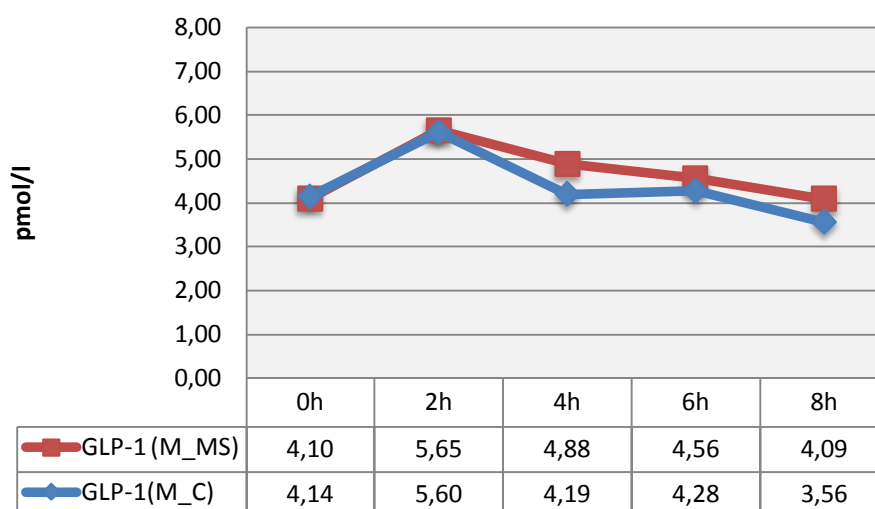


e) Przebieg krzywej stężeń GLP-1 podczas testów u mężczyzn – MS vs C.

DTTG - GLP-1

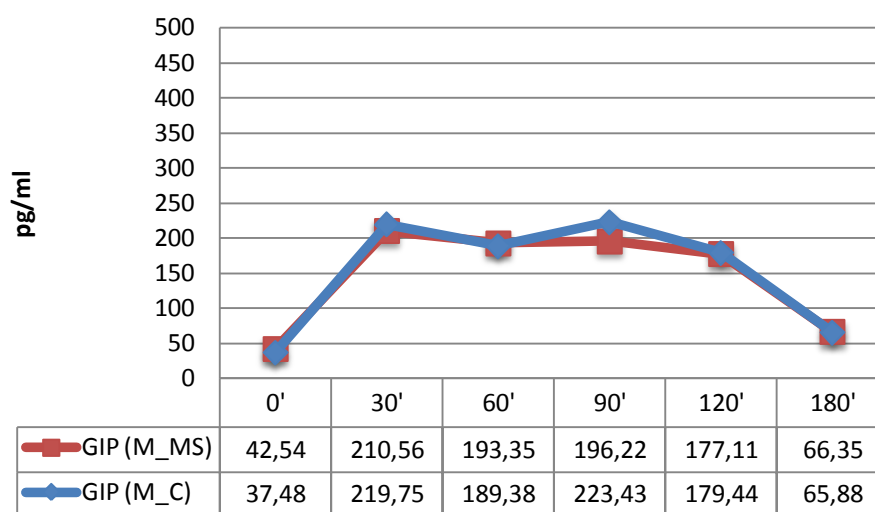


DTTL - GLP-1

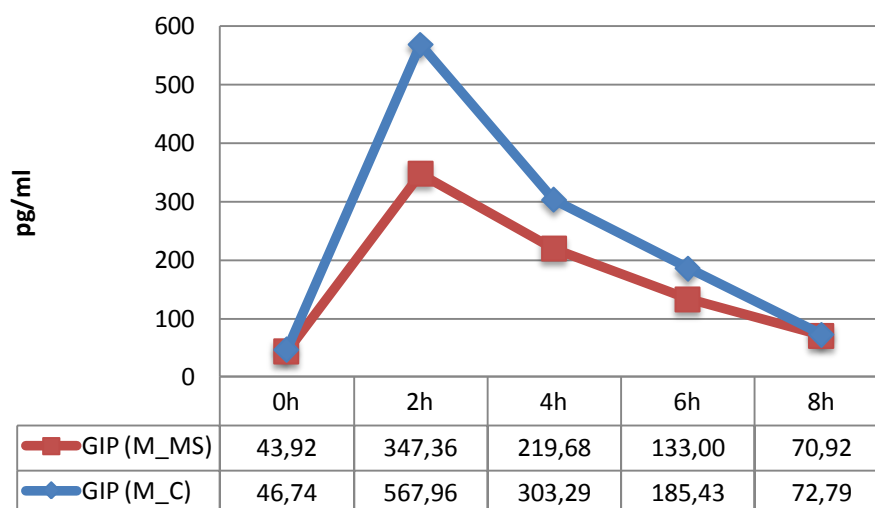


f) Przebieg krzywej stężeń GIP podczas testów u mężczyzn – MS vs C.

DTTG - GIP



DTTL - GIP



6.2 Korelacje między wybranymi parametrami

Dla otrzymanych wyników obliczono wskaźnik korelacji dla osób całej grupy badanej (C plus MS), osobno w grupach MS i C oraz u kobiet i mężczyzn należących do grup MS i C.

6.2.1 Charakterystyka grupy badanej – wskaźnik BMI, a pozostałe markery zespołu metabolicznego

Wskaźnik BMI, który jest uznanym przez wielu autorów markerem zespołu metabolicznego, zestawiono z innymi wskaźnikami charakteryzującymi ten zespół, stosując uzyskane dane oznaczane w pracy. Obliczano wskaźnik korelacji dla BMI oraz glikemii, insulinemii, poziomu FFA i TG na czczo, wyrzutu glukozy, insuliny, FFA oraz TG w czasie obu testów (DTTG, DTTL) oraz dla poziomów leptyny, adiponektyny i wisfatyny we wszystkich w/w grupach. W Tabeli 15 umieszczono współczynniki korelacji, które osiągnęły istotność statystyczną.

Tabela 15. Znamienne współczynniki korelacji dla wybranych parametrów charakteryzujących zespół metaboliczny

Grupa	Parametry korelacji	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
Cała grupa	BMI &	Glk na czczo	0,446
		Ins na czczo	0,609
		FFA na czczo	0,411
		AUC-Glk DTTG	0,544
		AUC-Ins DTTG	0,518
		AUC-FFA DTTG	0,458
		AUC-TG DTTG	0,319
		AUC-Glk DTTL	0,423
		AUC-Ins DTTL	0,550
		AUC-FFA DTTL	0,311
		AUC-TG DTTL	0,323
		leptyna	0,466
		adiponektyna	-0,393
grupa MS	BMI &	Ins na czczo	0,362
		AUC-Ins DTTL	0,313
		leptyna	0,423
		wisfatyna	0,368

K z grupy MS	BMI &	leptyna	0,582	0,023
M z grupy MS	BMI &	Ins na czczo	0,416	0,028
		AUC-Ins DTTG	0,427	0,026
		AUC-Ins DTTL	0,437	0,022
		AUC-FFA DTTL	0,422	0,028
		leptyna	0,461	0,027
grupa C	BMI &	Glk na czczo	0,480	0,044
		Ins na czczo	0,471	0,048
		AUC-FFA DTTG	0,541	0,030
K z grupy C	BMI &	Ins na czczo	0,773	0,005
		AUC-FFA DTTG	0,770	0,009
M z grupy C	BMI &	Glk na czczo	0,928	0,002

6.2.2 Wartości badanych wskaźników zespołu metabolicznego, a uwalnianie GIP i GLP-1

6.2.2.1 Charakterystyka antropometryczna pacjentów oraz ciśnienie tętnicze, a poziom inkretyn na czczo.

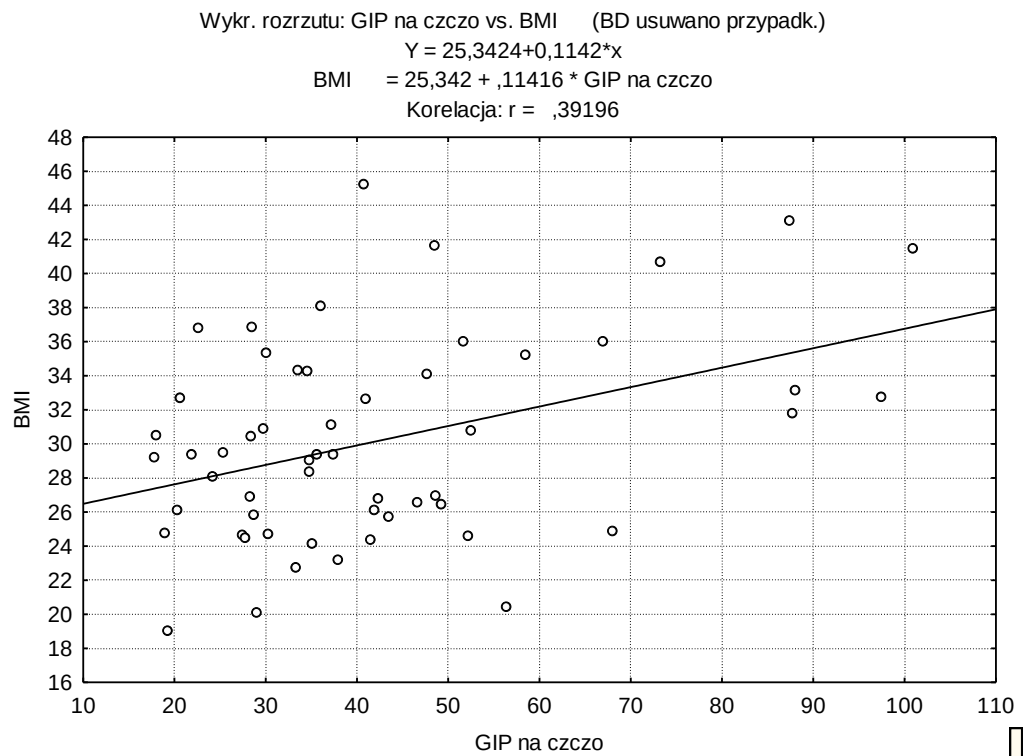
Obliczono wskaźnik korelacji dla stężenia GIP i GLP-1 na czczo (średnia arytmetyczna stężeń inkretyn w punkcie 0 w obu testach – DTTG i DTTL), a wskaźnikami charakteryzującymi grupę badaną (BMI, WHR, procentowa i ilościowa zawartość tkanki tłuszczowej, wartości ciśnienia tętniczego).

W **całej grupie** badanej poziom GIP na czczo, jak podano w Tabela 16, istotnie statystycznie dotadnio korelował jedynie ze wskaźnikiem masy ciała BMI [Wykres 8].

Tabela 16. Współczynnik korelacji dla poziomu GIP na czczo, a wybranymi parametrami charakteryzującymi całą grupę badaną.

Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < ,05$ Pomiń przypadki: 66				
Para zmiennych	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
GIP na czczo & m.urodz.	60	0,039507	0,301109	0,764409
GIP na czczo & BMI	61	0,276894	2,213408	0,030749
GIP na czczo & WHR	55	0,244598	1,836481	0,071898
GIP na czczo & tk.tł. [%]	55	0,003752	0,027317	0,978309
GIP na czczo & tk.tł. [kg]	55	0,180113	1,333040	0,188221
GIP na czczo & RR śr.sk.	61	-0,063353	-0,487604	0,627637
GIP na czczo & RR śr.rozk.	61	0,135453	1,050111	0,297949

Wykres 8. Zależność między GIP na czczo i wskaźnikiem masy ciała BMI w całej grupie badanej



Stężenie GIP na czczo korelowało dodatnio w **grupie MS** również jedynie z BMI, w grupie **M z MS** oraz **z C** z WHR, a w **grupie kontrolnej** tylko z wartościami ciśnienia rozkurczowego [Tabela 17]. Nie stwierdzono istotnych korelacji tych parametrów w grupach kobiet z MS i z C.

Tabela 17. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla GIP na czczo i wybranych parametrów w poszczególnych grupach

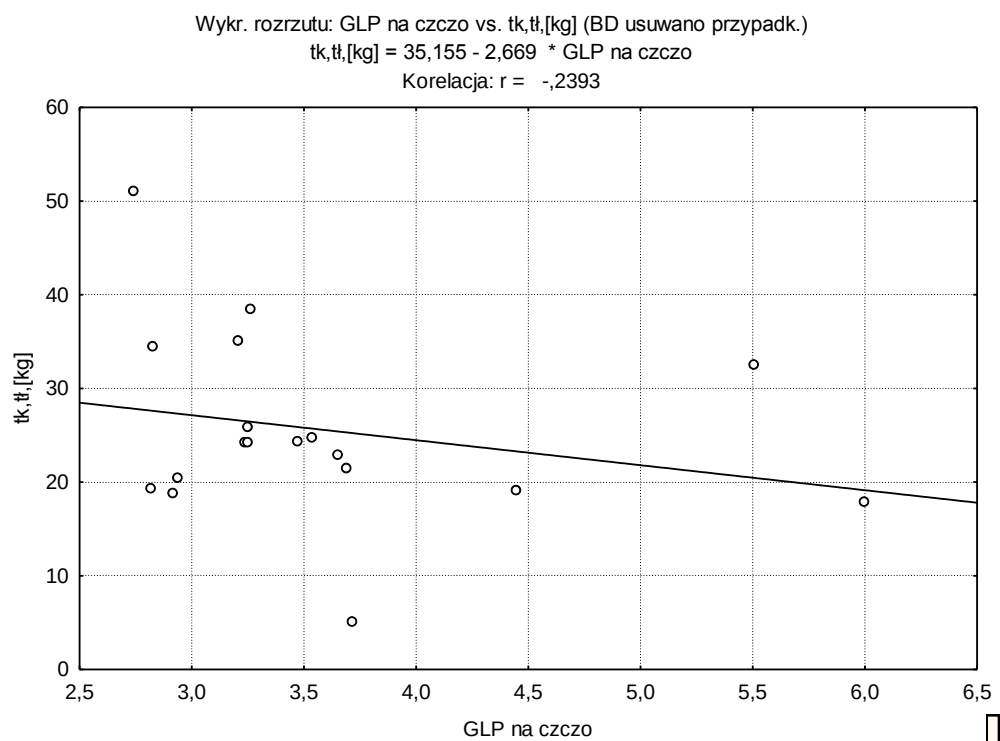
Grupa	Parametry korelacji	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
Cała grupa	GIP na czczo & BMI	0,277	0,031
grupa MS	GIP na czczo & BMI	0,296	0,048
M z grupy MS	GIP na czczo & WHR	0,430	0,046
grupa C	GIP na czczo & RR rozk	0,489	0,046
M z grupy C	GIP na czczo & WHR	0,943	0,005

W całej grupie badanej poziom GLP-1 na czczo istotnie statystycznie ujemnie korelował ze wskaźnikiem masy ciała BMI, ilościową zawartością tkanki tłuszczowej [Wykres 9] oraz średnim ciśnieniem skurczowym [Tabela 18].

Tabela 18. Współczynnik korelacji dla poziomu GLP-1 na czczo, a wybranymi parametrami antropometrycznymi i wartościami ciśnienia charakteryzującymi całą grupę badaną.

Oznaczone wsp. korelacji są istotne z $p < 0,05$ Pomiń przypadki: 36				
Para zmiennych	N Ważnych	R Spearman	t(N-2)	p
GLP na czczo & m.urodz.	20	0,301676	1,34245	0,196138
GLP na czczo & BMI	20	-0,565626	-2,90998	0,009342
GLP na czczo & WHR	20	-0,441519	-2,08772	0,051309
GLP na czczo & tk.tł.[%]	20	-0,351260	-1,59170	0,128862
GLP na czczo & tk.tł.[kg]	20	-0,507524	-2,49901	0,022354
GLP na czczo & RR śr.sk.	20	-0,478329	-2,31089	0,032894
GLP na czczo & RR śr.rozk.	20	-0,426498	-2,00056	0,060757

Wykres 9. Zależność między GLP-1 na czczo i poziomem ilościowej zawartości tkanki w całej grupie badanej



GLP-1 na czczo korelował ujemnie z BMI oraz procentową zawartością tkanki tłuszczowej u **kobiet w grupie MS**. W **całej grupie kontrolnej** zaś z BMI oraz ilościową zawartością tkanki tłuszczowej. Natomiast w grupie **M z MS** GLP-1 na czczo korelował dodatnio z ilościową i procentową zawartością tkanki tłuszczowej [Tabela 19]. Nie stwierdzono istotnych korelacji tych parametrów w grupach MS oraz kobiet i mężczyzn z C.

Tabela 19. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla GLP-1 na czczo i wybranych parametrów w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
Cała grupa	GLP-1 na czczo & BMI	-0,566	0,009
	GLP-1 na czczo & tk.łl.[kg]	-0,507	0,022
	GLP-1 na czczo & RR sk.	-0,478	0,033
K z grupy MS	GLP-1 na czczo & BMI	-0,828	0,041
	GLP-1 na czczo & tk.łl.[%]	-0,886	0,019
M z grupy MS	GLP-1 na czczo & BMI	0,900	0,037
	GLP-1 na czczo & tk.łl.[kg]	0,900	0,037
	GLP-1 na czczo & tk.łl.[%]	0,900	0,037
grupa C	GLP-1 na czczo & BMI	-0,680	0,030
	GLP-1 na czczo & tk.łl.[kg]	-0,756	0,015

6.2.2.2 Funkcja metaboliczna tkanki tłuszczowej oraz ciśnienie tętnicze, a uwalnianie GIP i GLP-1.

Nie stwierdzono znamiennych statystycznie korelacji między stężeniem GIP i GLP-1 w punkcie wyjściowym obu testów, a wartościami leptyny, adiponektyny i wisfatyny na czczo.

Aby sprawdzić zależność między metaboliczną funkcją tkanki tłuszczowej i ciśnieniem tętniczym, a stopniem uwalniania inkretyn, porównywano zależność wyrzutu (AUC) oddzielnie GIP i GLP-1 w czasie DTTG oraz DTTL z poziomami adipokin – leptyny, adiponektyny i wisfatyny, oraz wartościami ciśnienia tętniczego – skurczowego i rozkurczowego w całej grupie badanej, grupach MS, C oraz kobiet i mężczyzn z grup MS i C. Korelacje istotne statystycznie zawarto w Tabela 20 – dodatnie korelacje między AUC-GIP a stężeniem wisfatyny w **całej grupie** badanej w DTTG oraz w **całej grupie** badanej, grupie **MS i mężczyzn z MS** w DTTL. Reszta korelacji (w tym wszystkie dla AUC-GLP1 w obu testach oraz dla ciśnienia tętniczego) nie osiągnęła znamienności statystycznej.

Tabela 20. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla AUC-GIP w DTTG oraz DTTL i wybranych parametrów funkcji metabolicznej tkanki tłuszczowej w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
GIP - DTTG			
Cała grupa	AUC-GIP & wisfatyna	0,359	0,016
GIP - DTTL			
Cała grupa	AUC-GIP & wisfatyna	0,386	0,009
grupa MS	AUC-GIP & wisfatyna	0,445	0,006
K z grupy MS	AUC-GIP & wisfatyna	0,604	0,022

6.2.3 Wartości GIP i GLP-1 na czczo, a wielkość wskaźników gospodarki węglowodanowej

Wykonano obliczenia korelacji poziomu GIP i GLP-1 na czczo, a wybranymi markerami gospodarki węglowodanowej: poziomem glukozy i insuliny na czczo oraz wskaźnikiem insulinooporności HOMA.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji między **GIP na czczo**, a wymienionymi wskaźnikami w całej grupie badanej, w grupach MS, C, czy w grupach z uwzględnieniem płci. Jedyną zmienną korelacją była dodatnia korelacja między GIP a poziomem **glukozy na czczo** w grupie **mężczyzn należących do grupy kontrolnej** [Tabela 21].

GLP-1 na czczo korelował zmiennie statystycznie ujemnie jedynie z wartościami **glikemii na czczo** w całej grupie badanej, grupie MS i u **mężczyzn z grupy kontrolnej** [Tabela 21].

Tabela 21. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla GIP oraz GLP-1 na czczo i wybranych parametrów gospodarki węglowodanowej w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
M z grupy C	GIP na czczo & Glk. na czczo	0,900	0,037
Cała grupa	GLP-1 na czczo & Glk na czczo	-0,612	0,003
grupa MS	GLP-1 na czczo & Glk na czczo	-0,609	0,047
M z grupy C	GLP-1 na czczo & Glk na czczo	-0,900	0,037

6.2.4 Stężenie GIP i GLP-1 na czczo, a stężenie wskaźników gospodarki lipidowej

W wykonanych obliczeniach zależności między stężeniem GIP i GLP-1 na czczo, a wybranymi markerami gospodarki lipidowej: wielkościami FFA i TG na czczo, stwierdzono jedynie znamienne statystycznie ujemną korelację między **GIP a stężeniem FFA** na czczo u **K grupy MS**, a w przypadku **GLP-1** podobną korelację dla **całej grupy badanych osób** [Tabela 22].

Tabela 22. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla GIP oraz GLP-1 na czczo i wybranych parametrów gospodarki lipidowej (FFA) w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
K z grupy MS	GIP na czczo & FFA na czczo	-0,545	0,013
Cała grupa	GLP-1 na czczo & FFA na czczo	-0,532	0,016

6.2.5 Próby czynnościowe – gospodarka węglowodanowa. Uwalnianie inkretyn, a stężenie glukozy i insuliny w poszczególnych punktach czasowych DTTG

Podobnie jak powyżej we wszystkich przypadkach obliczano wskaźnik korelacji w całej grupie badanych osób, grupach MS i C oraz u kobiet i mężczyzn należących do grup MS i C.

W czasie DTTG stwierdzono znamienne statystycznie, dodatnie korelacje poziomu **GIP**, a **glukozy** w **całej grupie** badanej w punkcie 0', 30', 180' testu. Podobną korelację stwierdzono w grupie **MS** w punkcie 30' i 180'; a ponadto u **kobiet z grupy MS** w punkcie 30'; i u **mężczyzn w grupie MS** w punkcie 0' i 180' [Tabela 23].

Tabela 23. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GIP i glukozy w DTTG w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji w DTTG	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
Cała grupa	GIP – 0' & Glk – 0'	0,251	0,047
	GIP – 30' & Glk – 30'	0,272	0,031
	GIP – 180' & Glk – 180'	0,319	0,011

grupa MS	GIP – 30' & Glk – 30'	0,389	0,008
	GIP – 180' & Glk – 180'	0,359	0,014
K z grupy MS	GIP – 30' & Glk – 30'	0,511	0,021
M z grupy MS	GIP – 0' & Glk – 0'	0,556	0,003
	GIP – 180' & Glk – 180'	0,481	0,012

Stężenie **GIP** korelowało dodatnio z wartościami **insuliny** w odpowiednich punktach DTTG w **całej grupie** badanej (30 i 180 minuta), grupie **MS** (30 i 180 minuta), u **K z grupy MS** (0 i 180 minuta) oraz u **M w grupach MS i C** (30 minuta testu) [Tabela 24].

Tabela 24. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GIP i insuliny w DTTG w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji w DTTG	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
Cała grupa	GIP – 30' & Ins – 30'	0,404	0,001
	GIP – 180' & Ins – 180'	0,268	0,034
grupa MS	GIP – 30' & Ins – 30'	0,431	0,003
	GIP – 180' & Ins – 180'	0,337	0,022
K z grupy MS	GIP – 0' & Ins – 0'	0,453	0,045
	GIP – 180' & Ins – 180'	0,523	0,018
M z grupy MS	GIP – 30' & Ins – 30'	0,490	0,010
M z grupy C	GIP – 30' & Ins – 30'	0,886	0,019

W obliczeniach dotyczących **GLP-1**, jego stężenie korelowało znamienne statystycznie ujemnie ze stężeniem **glukozy** w czasie DTTG w **całej grupie** badanej w punkcie 0' testu; u **mężczyzn w grupie MS** w punkcie 0' i 30'; i u **kobiet z grupy C** w punkcie 180' [Tabela 25].

Tabela 25. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla stężeń GLP-1 i glukozy w DTTG w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji w DTTG	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
Cała grupa	GLP1 – 0' & Glk – 0'	-0,496	0,022
M z grupy MS	GLP1 – 0' & Glk – 0'	-0,900	0,037
	GLP1 – 30' & Glk – 30'	-0,900	0,037
K z grupy C	GLP1 – 180' & Glk – 180'	-0,900	0,037

Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji między stężeniami GLP-1 a stężeniem insuliny w odpowiednich punktach czasowych.

6.2.6 Próby czynnościowe – gospodarka lipidowa. Uwalnianie inkretyn, a stężenia FFA i TG w poszczególnych punktach czasowych DTTL

W czasie DTTL poziom **GIP** znamienne statystycznie, ujemnie korelował z wartościami **FFA** jedynie u **kobiet z grupy MS** w punkcie 0h. Natomiast ze stężeniem **TG** **GIP** korelował statystycznie znamienne również tylko w grupie **K z MS** w 4 godzinie testu - tym razem była to korelacja dodatnia [Tabela 26].

Tabela 26. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GIP i FFA oraz Tg w DTTL w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji w DTTL	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
K z grupy MS	GIP – 0h & FFA – 0h	-0,449	0,047
K z grupy MS	GIP – 4h & TG – 4h	0,444	0,049

Stężenie **GLP-1** korelowało znamienne statystycznie ujemnie z poziomem **FFA** w czasie DTTL w **grupie C** w punkcie 8h testu oraz u **kobiet z grupy C** w punkcie 6h i 8h [Tabela 27].

Tabela 27. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GLP-1 i FFA w DTTL w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji w DTTL	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
grupa C	GLP1 – 8h & FFA – 8h	-0,826	0,011
K z grupy C	GLP1 – 6h & FFA – 6h	-0,900	0,037
	GLP1 – 8h & FFA – 8h	-0,900	0,037

Dla poziomu **GLP-1** i **TG** w odpowiednich punktach czasowych DTTL stwierdzono następujące znamienne korelacje: ujemną w **całej grupie** badanej oraz w **grupie kontrolnej** w punkcie 0h, dodatnią w grupie **MS** oraz w grupie **kobiet z MS** w punktach 4h i 6h, [Tabela 28].

Tabela 28. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GLP-1 i TG w DTTL w poszczególnych grupach

Grupa	Parametry korelacji w DTTL	Współczynnik korelacji Spearmana	Wartość p
Cała grupa	GLP1 – 0h & TG – 0h	-0,473	0,041
grupa MS	GLP1 – 4h & TG – 4h	0,830	0,003
	GLP1 – 6h & TG – 6h	0,806	0,005
K z grupy MS	GLP1 – 4h & TG – 4h	0,828	0,041
	GLP1 – 6h & TG – 6h	0,943	0,005
grupa C	GLP1 – 0h & TG – 0h	-0,694	0,038

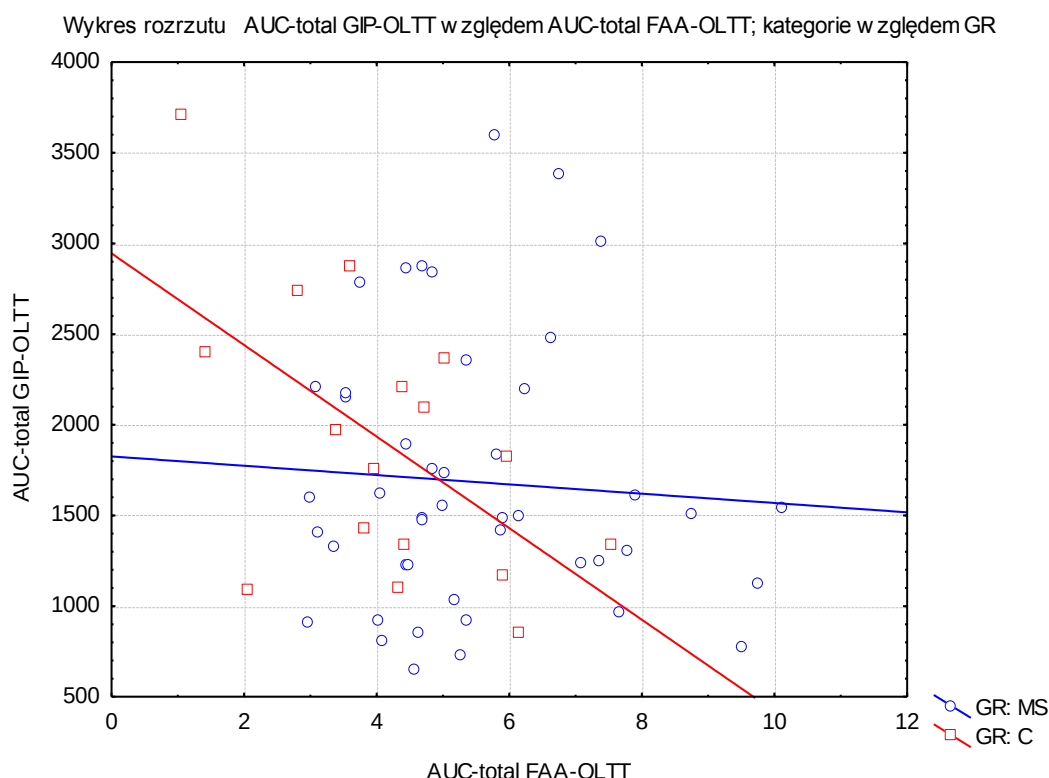
6.3 Porównanie wpływu glukozy i FFA na uwalnianie inkretyn podczas testów funkcjonalnych (DTTG a DTTL)

By sprawdzić co wywiera większy wpływ na wydzielanie inkretyn - glukoza, czy FFA, użyto metodę analizy regresji. Porównywano zależność wyrzutu (AUC) oddzielnie GIP i GLP-1 z AUC glukozy w czasie DTTG oraz podobne zależności dla FFA w czasie DTTL w grupach MS, C oraz kobiet i mężczyzn z grup MS i C.

Nie uzyskano istotności statystycznej dla wyników GLP-1.

Jedyną zależność znamioną statystycznie uzyskano dla wartości AUC-GIP a AUC-FFA w DTTL między grupami MS i C ($p = 0,035$) [Wykres 10]. Może to przemawiać za istnieniem różnej zależności uwalniania GIP od FFA w zależności od rozwoju MS. Spłaszczenie krzywej dla MS przemawia za osłabieniem tej zależności u osób z MS.

Wykres 10.



Wykonano więc analizę regresji dla inkretyn w zależności od poziomu glukozy i FFA w poszczególnych grupach, dla każdego punktu testy (DTTG i DTTL) oddzielnie.

Stwierdzono znamioną zależność GIP od stężenia glukozy w DTTG w punkcie 0', 30' i 180' testu w całej grupie badanej i grupie MS, oraz w 0 i 180 minucie testu u mężczyzn

z grupy MS [Tabela 29]. Odpowiednio istotną statystycznie zależność GLP-1 od stężenia glukozy w DTTG stwierdzono w całej grupie badanej w 0 i 180 minucie, w grupie MS 90', a u mężczyzn z MS w 30 minucie testu [Tabela 29].

Tabela 29. Znamienne statystycznie regresje inkretyn od glukozy w DTTG.

Grupa	Punkt czasowy testu	Wartość p
regresja GIP od Glk w DTTG		
Cała grupa	GIP – 0' od Glk – 0'	0,001
	GIP – 30' od Glk – 30'	0,046
	GIP – 180' od Glk – 180'	0,007
grupa MS	GIP – 0' od Glk – 0'	0,007
	GIP – 30' od Glk – 30'	0,017
	GIP – 180' od Glk – 180'	0,003
M z grupy MS	GIP – 0' od Glk – 0'	0,003
	GIP – 180' od Glk – 180'	0,008
regresja GLP-1 od Glk w DTTG		
Cała grupa	GLP1 – 0' od Glk – 0'	0,035
	GLP1 – 180' od Glk – 180'	0,036
grupa MS	GLP1 – 90' od Glk – 90'	0,025
M z grupy MS	GLP1 – 30' od Glk – 30'	0,047

Nie stwierdzono istotnych statystycznie regresji poziomu GIP od stężenia FFA w DTTL. Natomiast znamienność osiągnęły zależność wartości GLP-1 od stężenia FFA w DDTL w grupie C jedynie w punkcie 8h, a w grupie mężczyzn z C w punkcie 6h [Tabela 30].

Tabela 30. Znamienne statystycznie regresje inkretyn od FFA w DTTL.

Grupa	Punkt czasowy testu	Wartość p
regresja GIP od FFA w DTTL - Brak istotności statystycznej		
regresja GLP-1 od FFA w DTTL		
grupa C	GLP1 – 8h od FFA – 8h	0,033
M z grupy C	GLP1 – 6h od FFA – 6h	0,003

6.4 Badania genetyczne

6.4.1 Częstość występowania badanych genotypów i alleli

Rozkłady częstości genotypów genów *TCL7F2* oraz *PPAR γ 2* w całej grupie badanej nie były zgodne z prawem Hardy-Weinberga [Tabela 31 i Tabela 32]. Dobrana grupa nie była zrównoważona pod względem genotypów, dlatego wyniki poniższych analiz zostały odniesione jedynie do charakterystyki badanej grupy, nie całej populacji Małopolski.

Tabela 31. Częstość występowania genotypów i alleli genu *TCL7F2*

Grupy	Genotyp CC		Genotyp CT		Genotyp TT		Częstość alleliczna	
							Allel C	Allel T
Cała grupa (N = 46)	N	%	N	%	N	%	%	%
	26	56,5	18	39,1	2	4,4	77,1	23,9

Tabela 32. Częstość występowania genotypów i alleli genu *PPAR γ 2*

Grupy	Genotyp CC		Genotyp CG		Genotyp GG		Częstość alleliczna	
							Allel C	Allel G
Cała grupa (N = 46)	N	%	N	%	N	%	%	%
	32	69,6	10	21,7	4	8,7	80,4	19,6

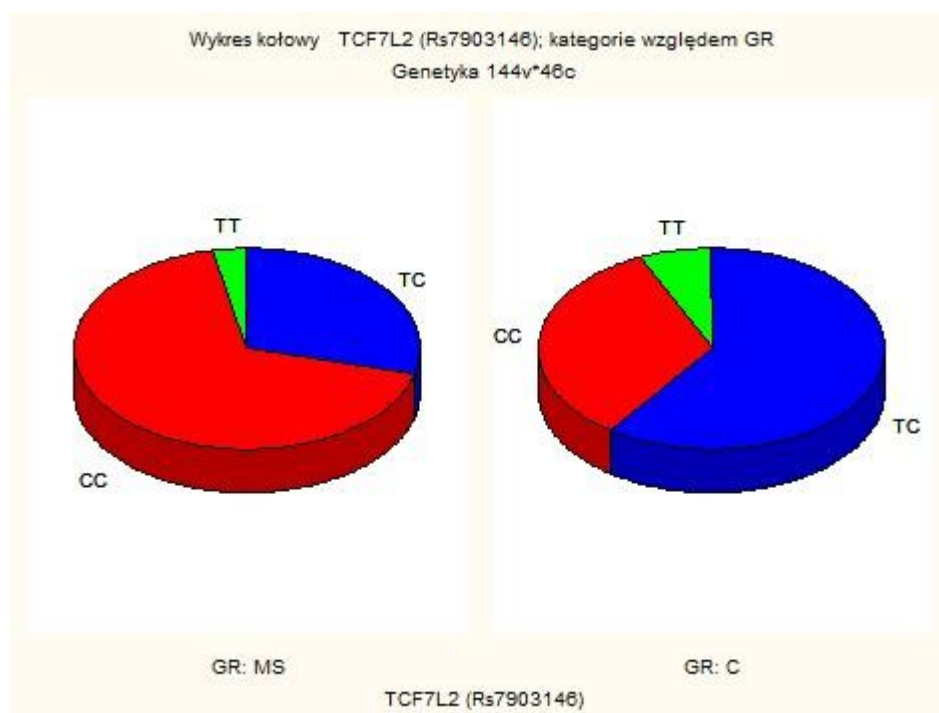
Za pomocą testu chi-kwadrat potwierdzono istnienie zależności między częstością występowania alleli C i T genu *TCF7L2*, a przynależnością do grupy osób z zespołem metabolicznym (MS), czy grupy kontrolnej (C), ($p = 0,046$). Porównano częstości alleliczne badanych polimorfizmów genetycznych w grupie MS i C [Błąd! Nieprawidłowy odsyłacz do zakładki: wskazuje na nią samą.]. U pacjentów z zespołem metabolicznym istotnie częściej występował allel C polimorfizmu genu *TCF7L2* (rs7903146), w grupie kontrolnej zaś znamienne dominował allel T dla genu *TCL7F2*. Nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie występowania poszczególnych alleli polimorfizmu rs1805192 genu *PPAR γ 2* w zależności od grupy MS i C [Tabela 33].

Różnice w procentowym rozkładzie allelów obu genów w grupach MS i C przedstawiają kołowe Wykresy 11 i 12.

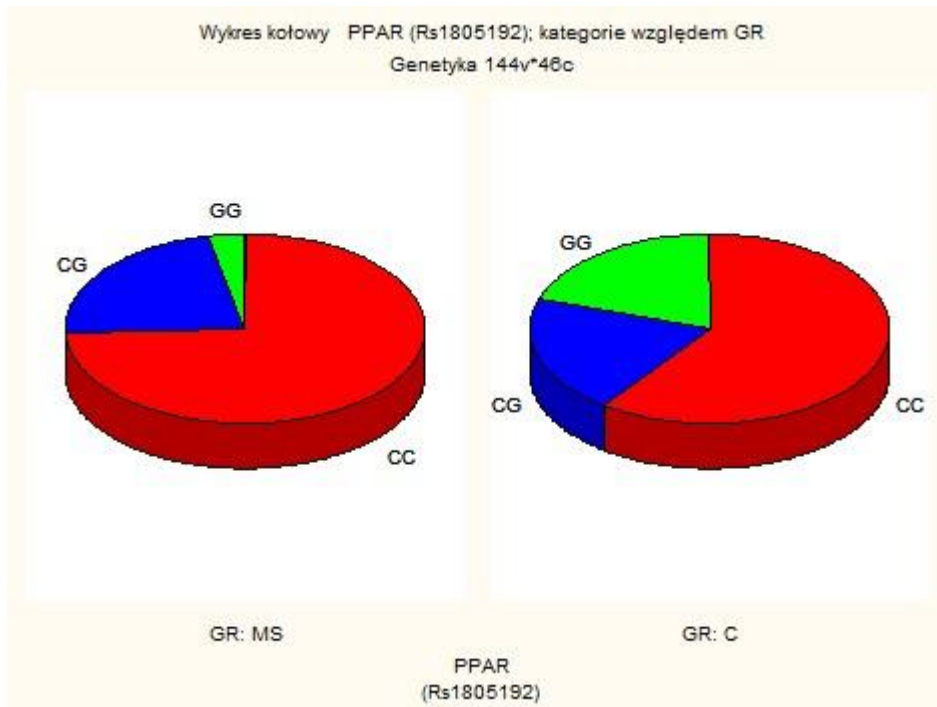
Tabela 33. Analiza częstości występowania poszczególnych alleli

Nazwa polimorfizmu genetycznego	Allel	Cała grupa		grupa z MS		grupa C		Wartość p
		N	%	N	%	N	%	
TCL7F2	C	70	76,1	51	82,3	19	63,3	p=0,045
	T	22	23,9	11	17,7	11	36,7	
PPAR γ 2	C	74	80,4	53	85,5	21	70,0	p=0,079
	G	18	19,6	9	14,5	9	30,0	

Wykres 11. Różnice procentowej częstości allelicznej genu *TCL7F2* w zależności od grupy – MS vs C



Wykres 12. Różnice procentowej częstości allelicznej genu *PPAR γ 2* w zależności od grupy – MS vs C



6.4.2 Porównanie przebiegu obu testów – DTTG oraz DTTL, w zależności od genotypu genów *TCF7L2* i *PPAR γ 2*.

Przeprowadzono porównanie wyników analizy statystycznej parametrów oznaczanych w czasie DTTG i DTTL u nosicieli poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów sprzyjających otyłości. Parametry, które użyto w analizie to przebieg glikemii, insulinemii, poziomu FFA, GIP i GLP-1 w trakcie obu testów.

Poniżej przedstawiono jedynie te wyniki, które osiągnęły istotność statystyczną. Ze względu na bardzo małą liczebność genotypowych grup TT w *TCF7L2* oraz GG w *PPAR γ* , do analizy statystycznej ich wyniki zostały włączone do odpowiednich grup heterozygotycznych TC i GC.

6.4.2.1 *TCF7L2*

W całej grupie badanej w DTTG u osób z genotypem CC genu *TCF7L2* stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA ($p = 0,011$), stężenia insuliny w 0' ($p =$

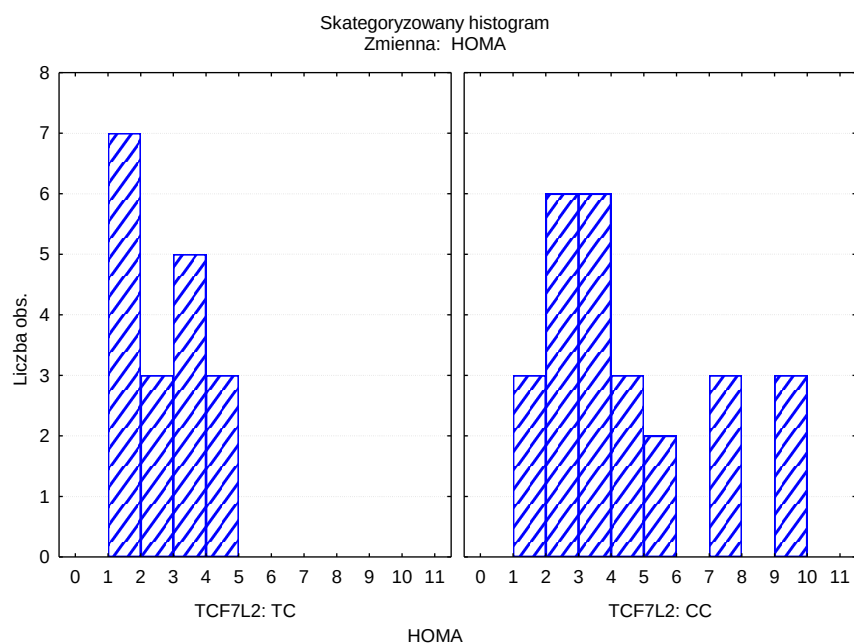
0,017) i 180' ($p = 0,042$), wartości FFA w 0' ($p = 0,002$), 30' ($p = 0,005$), 60' ($p = 0,019$) i 90' ($p = 0,033$) oraz niższe stężenia GIP w 60' ($p = 0,022$) testu [Tabela 34, Wykres 13 a-c]

Tabela 34. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupach genotypowych CC i TT+TC genu *TCL7F2* w całej grupie badanej – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

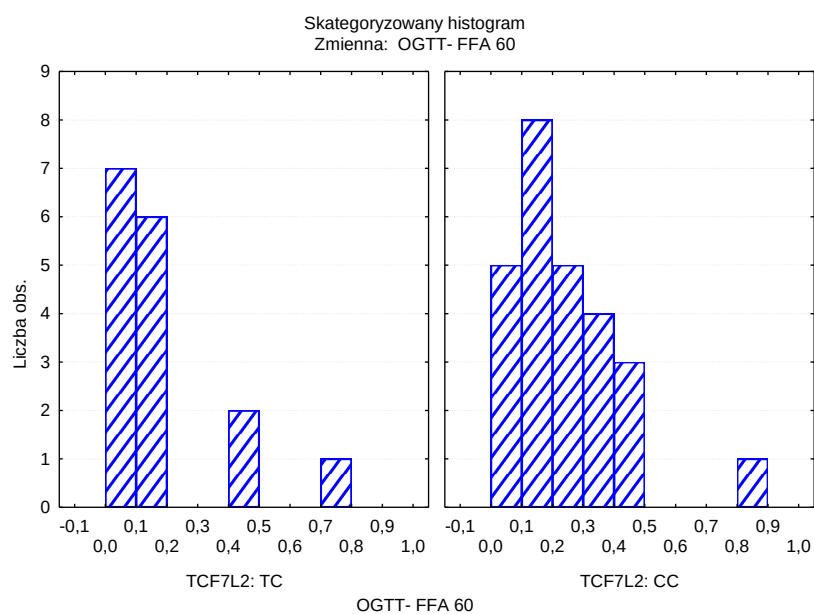
DTTG Zmienna	Suma rang CC	Suma rang TT+TC	N ważnych CC	N ważnych TC	Wartość p
HOMA	692,0 (4,45 $\pm$ 2,54)	298,0 (2,71 $\pm$ 1,13)	26	18	0,011
Ins 0'	685,5 (18,62 $\pm$ 11,63)	304,5 (11,96 $\pm$ 4,91)	26	18	0,017
Ins 180'	617,5 (20,55 $\pm$ 13,68)	285,5 (15,18 $\pm$ 15,91)	25	17	0,042
FFA 0'	676,5 (0,69 $\pm$ 0,35)	226,5 (0,42 $\pm$ 0,22)	26	16	0,002
FFA 30'	669,0 (0,54 $\pm$ 0,25)	234,0 (0,37 $\pm$ 0,34)	26	16	0,005
FFA 60'	650,0 (0,25 $\pm$ 0,17)	253,0 (0,18 $\pm$ 0,21)	26	16	0,019
FFA 90'	642,0 (0,17 $\pm$ 0,15)	261,0 (0,10 $\pm$ 0,11)	26	16	0,033
GIP 60'	średnia: 182,5 (182,51 $\pm$ 58,49)	średnia: 232,5 (232,54 $\pm$ 75,96)	24	17	0,022

Wykres 13. Wybrane parametry DTTG, a genotyp *TCF7L2* w całej grupie badanej

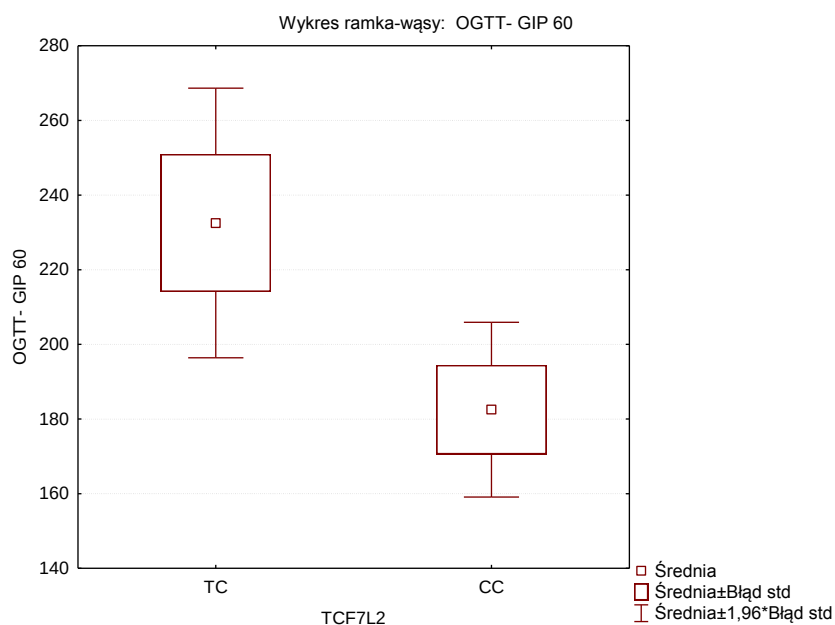
a) HOMA – porównanie wg genotypów TC (TT+TC) i CC genu *TCF7L2*



b) FFA 60' – porównanie wg genotypów TC (TT+TC) i CC genu *TCF7L2*



c) GIP 60' – porównanie wg genotypów TC (TT+TC) i CC genu *TCF7L2*



W całej **badanej grupie** (C plus MS) w **DTTL** stwierdzono u osób z genotypem **CC** genu *TCF7L2* wyższe stężenie insuliny w 0h ($p = 0,027$) oraz niższe stężenie GIP w 2h ($p = 0,046$) i 4h ($p = 0,017$) testu [Tabela 35].

Tabela 35. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupach genotypowych CC i TT+TC genu *TCL7F2* w całej grupie badanej – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe (SD).

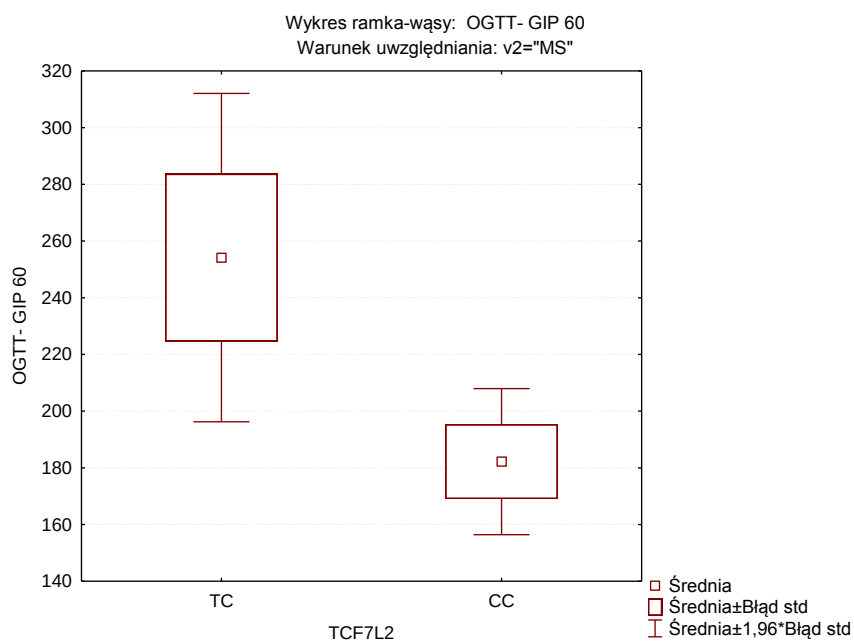
DTTL Zmienna	Suma rang CC	Suma rang TT+TC	N ważnych CC	N ważnych TT+TC	Wartość p
Ins 0h	603,5 (18,56 ± 10,47)	299,5 (12,22 ± 5,85)	24	18	0,027
GIP 2h	437,0 (65,29 ± 56,05)	466,0 (478,88 ± 199,98)	24	18	0,046
GIP 4h	422,0 (20,24 ± 9,93)	481,0 (311,48 ± 128,14)	24	18	0,017

W grupie **MS** w **DTTG** stwierdzono u osób z genotypem **CC** genu **TCF7L2** niższe stężenie GIP w 30' ($p = 0,006$) oraz w 60' ($p = 0,015$) testu [Tabela 36, Wykres 14].

Tabela 36. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupach genotypowych CC i TT+TC genu TCF7L2 w grupie MS – podane tylko wyniki istotne statystycznie.

DTTG Zmienna	Suma rang CC	Suma rang TT+TC	N ważnych CC	N ważnych TT+TC	Wartość p
GIP 30'	194,0 (209,27±94,57)	241,0 (249,16±106,18)	20	9	0,006
GIP 60'	średnia: 182,5 (182,51±58,49)	średnia: 232,5 (232,54±75,96)	24	17	0,022

Wykres 14. Stężenie GIP w 60' DTTG, a genotyp TCF7L2 w grupie MS

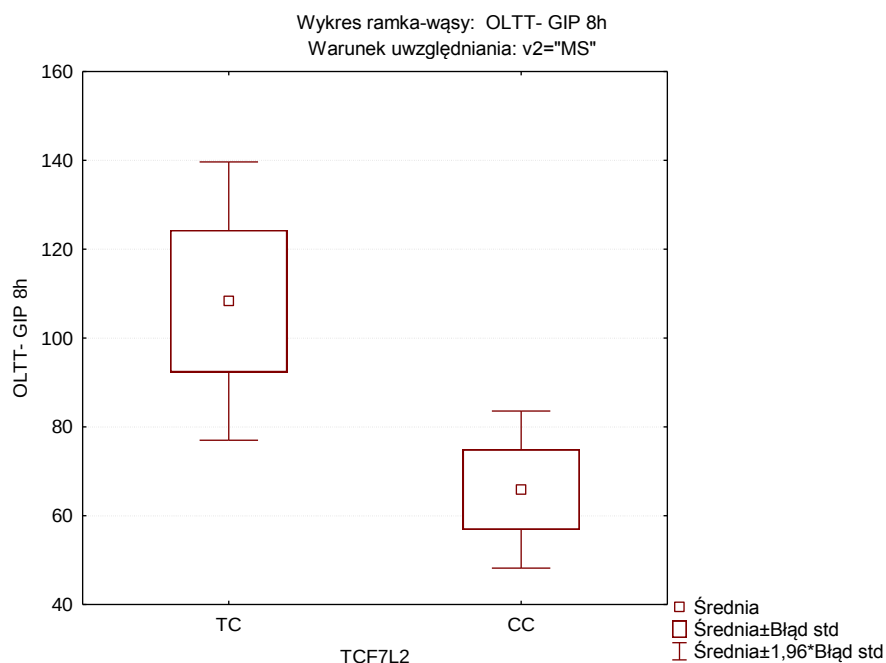


W DTTL w grupie MS stwierdzono u osób z genotypem CC genu *TCF7L2* niższe stężenie GIP w 4h ($p = 0,008$), 6h ($p = 0,034$) oraz w 8h ($p = 0,020$) testu [Tabela 37, Wykres 15].

Tabela 37. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupach genotypowych CC i TT+TC genu *TCL7F2* w grupie MS – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTL Zmienna	Suma rang CC	Suma rang TT+TC	N ważnych CC	N ważnych TT+TC	Wartość p
GIP 4h	192,0 (210,04 $\pm$ 98,15)	243,0 (361,69 $\pm$ 141,10)	20	9	0,008
GIP 6h	180,5 (182,5 $\pm$ 94,97)	254,5 (213,57 $\pm$ 84,71)	20	9	0,034
GIP 8h	średnia: 65,9 (65,84 $\pm$ 39,31)	średnia: 108,3 (108,32 $\pm$ 47,95)	19	9	0,020

Wykres 15. Wybrane parametry DTTL, a genotyp *TCF7L2* w grupie MS
GIP 8h – porównanie wg genotypów TC (TT+TC) i CC genu *TCF7L2*

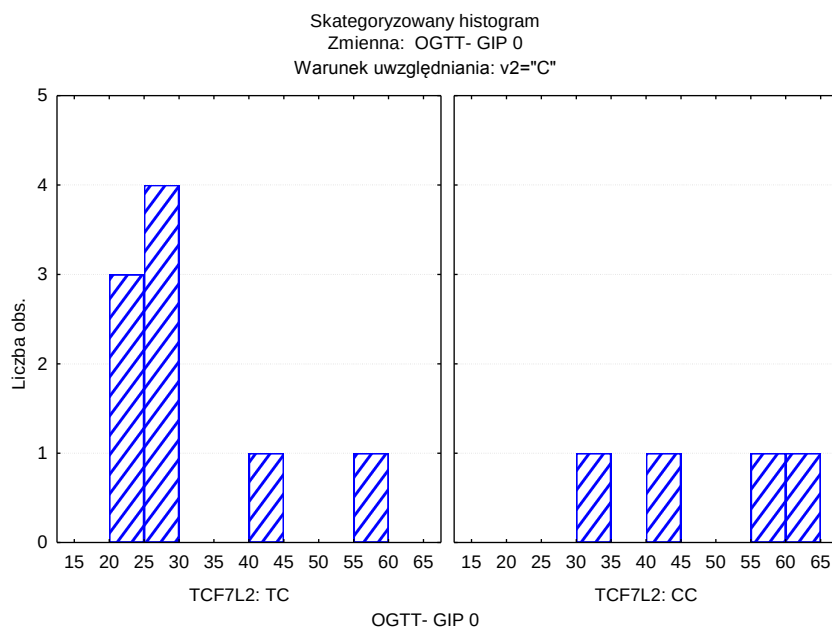


W grupie C w DTTG stwierdzono u osób z genotypem CC genu *TCF7L2* wyższe stężenie GIP w 0' ($p = 0,037$) testu [Tabela 38, Wykres 16].

Tabela 38. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupach genotypowych CC i TT+TC genu *TCL7F2* w grupie C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTG Zmienna	Suma rang CC	Suma rang TT+TC	N ważnych CC	N ważnych TT+TC	Wartość p
GIP 0'	49,0 (47,92 $\pm$ 13,22)	42,0 (30,99 $\pm$ 10,86)	4	9	0,037

Wykres 16. Stężenie GIP w 0' DTTG, a genotyp *TCF7L2* w grupie C



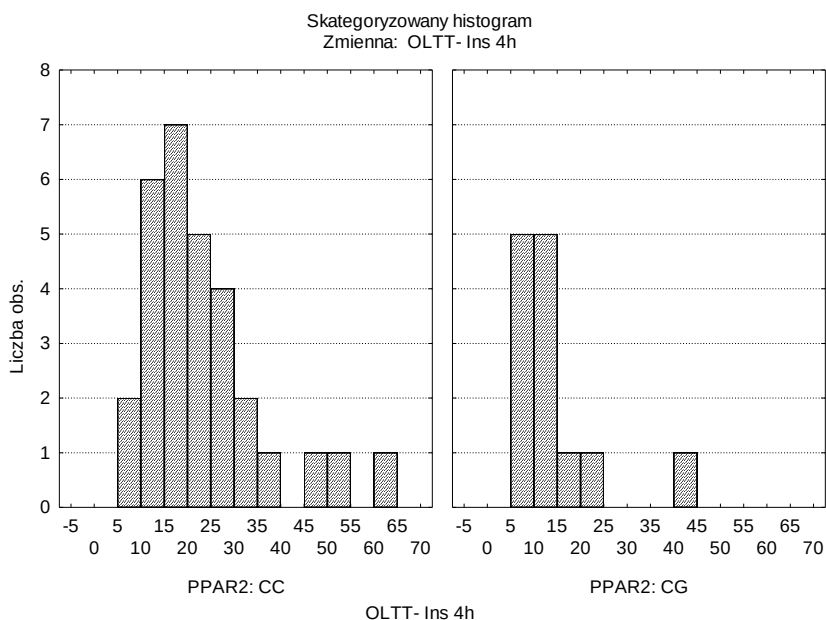
6.4.2.2 PPAR γ 2

W całej grupie badanej w DTTG nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic badanych parametrów między genotypami CG i CC. Natomiast w DTTL u osób z genotypem CC genu *PPAR γ 2* stwierdzono wyższe wartości poziomu insuliny w 4h ($p = 0,002$) i 6h ($p = 0,017$) testu [Tabela 39, Wykres 17].

Tabela 39. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupach genotypowych CC i GG+GC genu *PPAR γ 2* w całej grupie badanej – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTL Zmienna	Suma rang CC	Suma rang GG+CG	N ważnych CC	N ważnych GG+CG	Wartość p
Ins 4h	775,5 (23,44 $\pm$ 12,74)	170,5 (13,82 $\pm$ 9,19)	30	13	0,002
Ins 6h	751,0 (13,46 $\pm$ 6,65)	195,0 (8,95 $\pm$ 3,7)	30	13	0,017

**Wykres 17. Wybrane parametry DTTL, a genotyp *PPAR γ 2* w całej grupie badanej
Ins 4h – porównanie wg genotypów CC i CG (GG+CG) genu *PPAR γ 2***

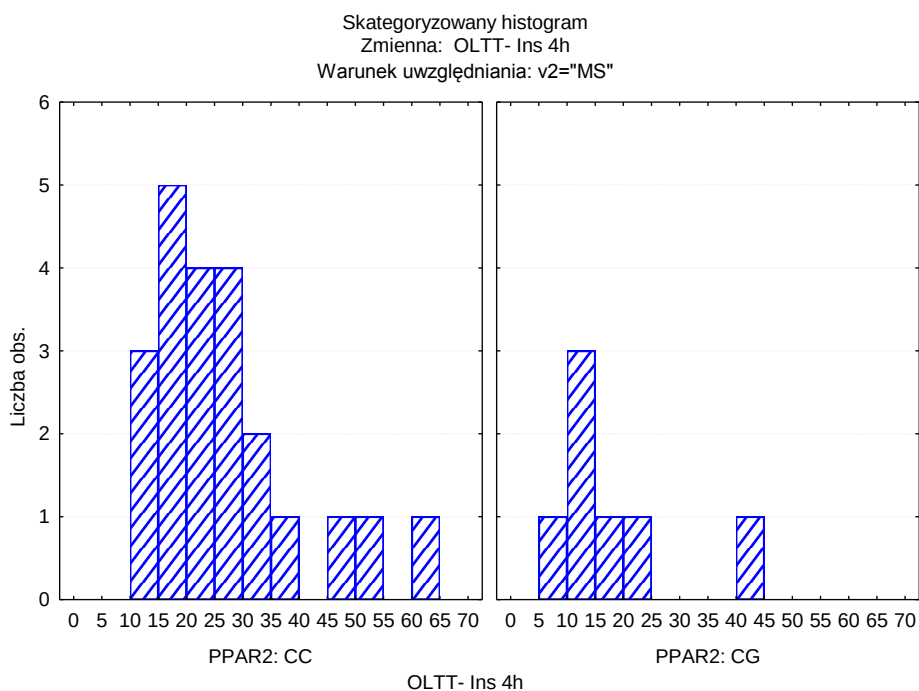


W wyodrębnionej **grupie MS** w **DTTG** nie stwierdzono znamiennej statystycznie różnicy między genotypami CG i CC. Natomiast w **DTTL** ponownie stwierdzono u osób z genotypem **CC genu *PPARγ2*** wyższe wartości insuliny w 4h ($p = 0,044$) testu [Tabela 40, Wykres 18].

Tabela 40. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupach genotypowych CC i GG+GC genu *PPARγ2* w grupie MS – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTL Zmienna	Suma rang CC	Suma rang GG+CG	N ważnych CC	N ważnych GG+CG	Wartość p
Ins 4h	370,0 (26,95 $\pm$ 13,03)	65,0 (18,14 $\pm$ 10,83)	22	7	0,044

Wykres 18. Stężenie insuliny w 4h DTTL, a genotyp *PPARγ2* w grupie MS

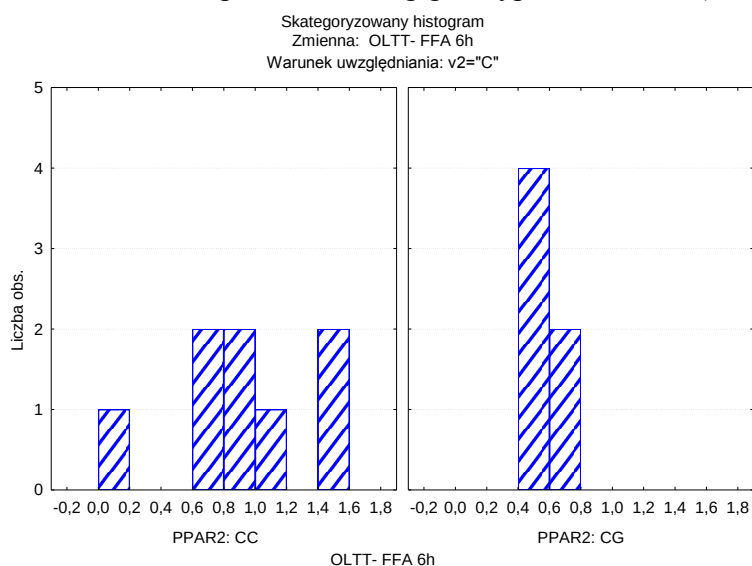


W samej **grupie C** w **DTTG** nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic badanych parametrów między genotypami CG i CC. Także w tej grupie w przebiegu **DTTL** stwierdzono wyższe wartości poziomu insuliny w 4h ($p = 0,033$) oraz stężenia FFA w 6h ($p = 0,024$) testu u osób z genotypem **CC** genu *PPAR γ 2* [Tabela 41, Wykres 19].

Tabela 41. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupach genotypowych CC i GG+GC genu *PPAR γ 2* w grupie C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTL Zmienna	Suma rang CC	Suma rang GG+CG	N ważnych CC	N ważnych GG+CG	Wartość p
Ins 4h	77,0 (13,76 $\pm$ 4,40)	28,0 (8,76 $\pm$ 2,27)	8	6	0,033
FFA 6h	78,0 (0,93 $\pm$ 0,46)	27,0 (0,57 $\pm$ 0,10)	8	6	0,024

Wykres 19. Wybrane parametry DTTL, a genotyp *PPAR γ 2* w grupie C
FFA 6h – porównanie wg genotypów CC i CG (GG+CG) genu *PPAR γ 2*



6.4.3 Porównanie nosicieli tych samych genotypów dwóch badanych genów między grupami MS i C w obu funkcjonalnych testach – DTTG oraz DTTL.

6.4.3.1 TCF7L2

U osób z genotypem **CC genu TCF7L2** w DTTG w grupie MS stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA ($p = 0,005$), stężenia glukozy w 0' ($p = 0,023$), 60' ($p = 0,019$), 90' ($p = 0,011$), 120' ($p = 0,004$), wartości iInsuliny w 0' ($p = 0,034$), 60' ($p = 0,037$), 90' ($p = 0,019$), 120' ($p = 0,023$) i 180' ($p = 0,005$), stężenia FFA w 0' ($p = 0,025$), 30' ($p = 0,002$), 60' ($p = 0,009$) i 90' ($p = 0,029$) oraz 120' ($p = 0,040$) testu [Tabela 42, Wykres 20 a-d].

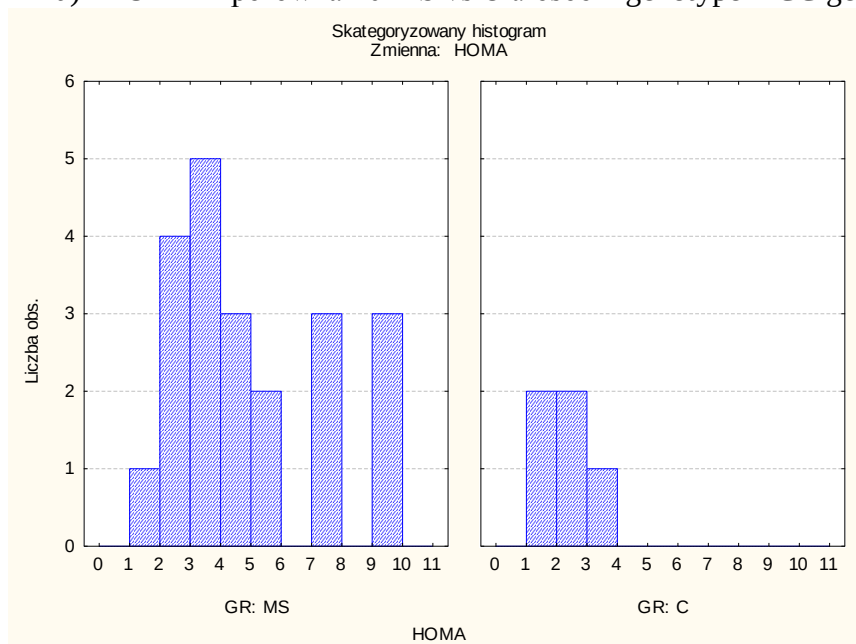
Tabela 42. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupie genotypowej CC genu TCF7L2 pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTG Zmienna	Suma rang MS	Suma rang C	N ważnych MS	N ważnych C	Wartość p
HOMA	237,0 (4,97 $\pm$ 2,55)	24,0 (2,27 $\pm$ 0,57)	21	5	0,005
Glk 0'	319,0 (5,45 $\pm$ 0,48)	32,0 (4,94 $\pm$ 0,28)	21	5	0,023
Glk 60'	średnia: 9,264 (9,26 $\pm$ 2,28)	średnia: 6,522 (6,52 $\pm$ 1,69)	21	5	0,019
Glk 90'	323,0 (7,85 $\pm$ 1,99)	28,0 (5,28 $\pm$ 1,15)	21	5	0,011
Glk 120'	średnia: 6,504 (6,50 $\pm$ 1,64)	średnia: 4,090 (4,09 $\pm$ 0,75)	21	5	0,004
Ins 0'	316,5 (20,53 $\pm$ 11,65)	34,5 (10,60 $\pm$ 3,09)	21	5	0,034
Ins 60'	316,0 (163,84 $\pm$ 104,42)	35,0 (83,28 $\pm$ 32,93)	21	5	0,037
Ins 90'	320,0 (164,20 $\pm$ 129,61)	31,0 (64,48 $\pm$ 25,15)	21	5	0,019
Ins 120'	294,0 (114,06 $\pm$ 111,35)	31,0 (38,70 $\pm$ 16,70)	20	5	0,023
Ins 180'	302,0 (23,57 $\pm$ 13,53)	23,0 (8,48 $\pm$ 5,10)	20	5	0,005
FFA 0'	318,5 (0,74 $\pm$ 0,36)	32,5 (0,45 $\pm$ 0,24)	21	5	0,025
FFA 30'	331,0 (0,60 $\pm$ 0,23)	20,0 (0,28 $\pm$ 0,09)	21	5	0,002
FFA 60'	324,0 (0,28 $\pm$ 0,17)	27,0 (0,11 $\pm$ 0,06)	21	5	0,009

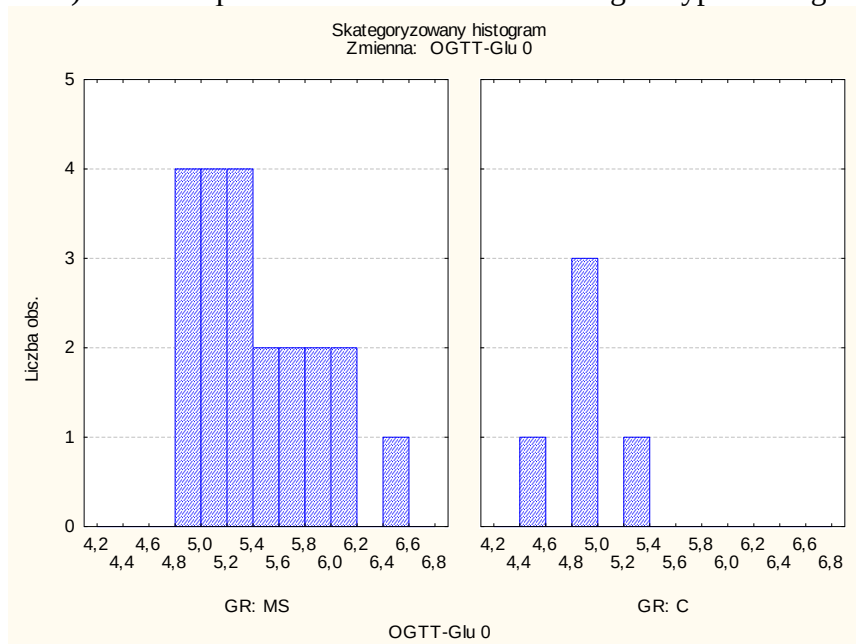
FFA 90'	317,5 (0,20 ± 0,15)	33,5 (0,07 ± 0,04)	21	5	0,029
FFA 120'	315,5 (0,15 ± 0,17)	35,5 (0,05 ± 0,02)	21	5	0,040

Wykres 20. Wybrane parametry DTTG, a występowanie MS u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*

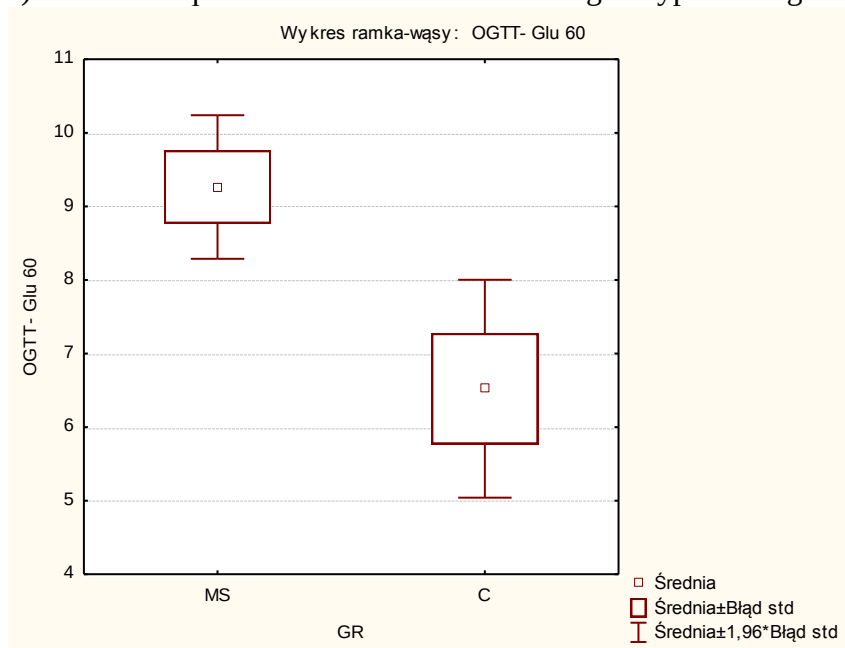
a) HOMA – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*



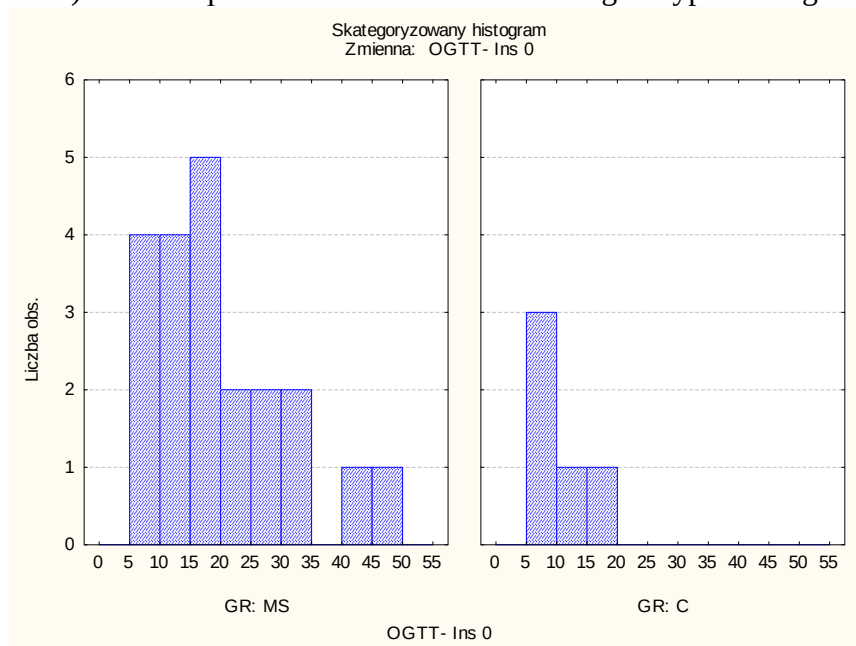
b) Glk 0' – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*



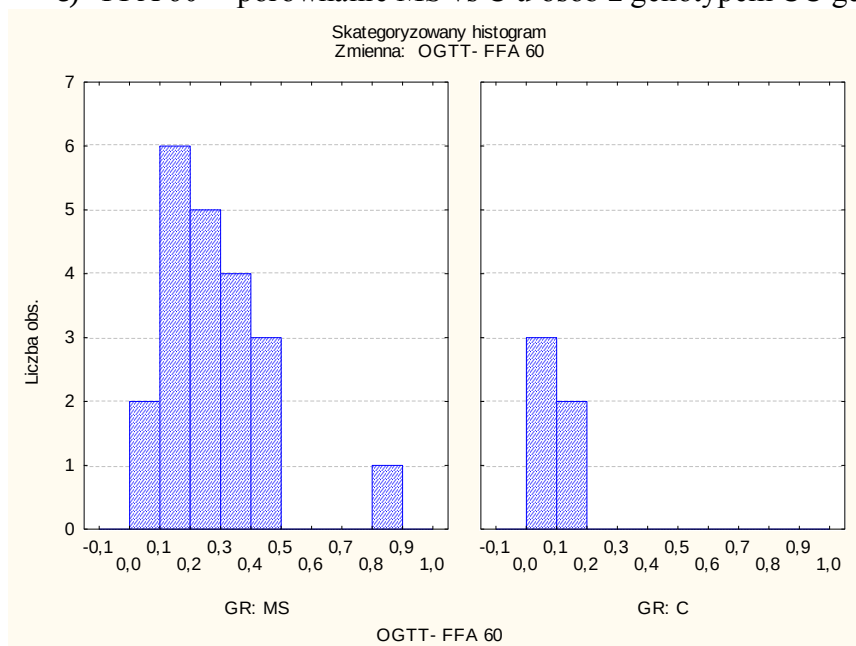
c) Glk 60' – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*



d) Ins 0' – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*



e) FFA 60' - porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*



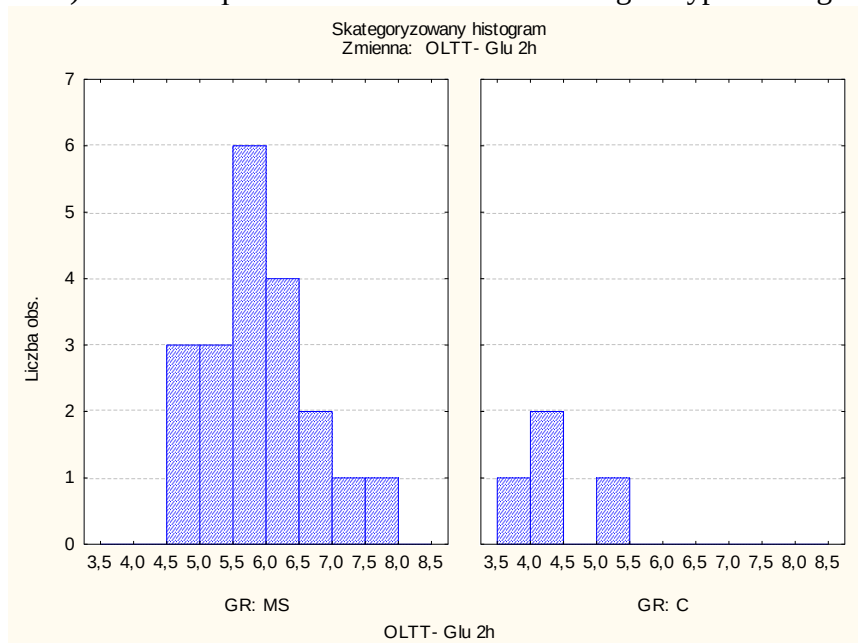
W DTTL u osób z genotypem **CC** genu *TCF7L2* w **grupie MS** stwierdzono wyższe wartości glukozy w 0h ($p = 0,006$), 2h ($p = 0,008$), 6h ($p = 0,033$), stężenia iInsuliny w trakcie całego testu – 0h ($p = 0,012$), 2h ($p = 0,033$), 4h ($p = 0,023$), 6h ($p = 0,017$) i 8h ($p = 0,012$). [Tabela 43, Wykres 21 a-b].

Tabela 43. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupie genotypowej CC genu *TCL7F2* pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

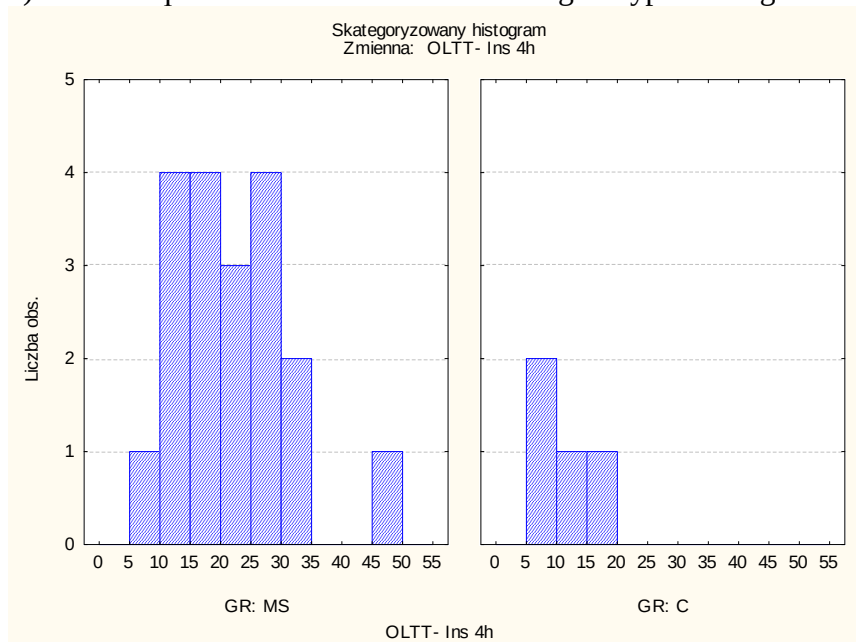
DTTL Zmienna	Suma rang MS	Suma rang C	N ważnych MS	N ważnych C	Wartość p
Glk 0h	286,0 (5,61 $\pm$ 0,52)	14,0 (5,00 $\pm$ 0,07)	20	4	0,006
Glk 2h	284,0 (5,88 $\pm$ 0,80)	15,0 (4,51 $\pm$ 0,65)	20	4	0,008
Glk 6h	278,0 (5,31 $\pm$ 0,65)	22,0 (4,73 $\pm$ 0,19)	20	4	0,033
Ins 0h	283,0 (20,49 $\pm$ 10,42)	17,0 (8,93 $\pm$ 2,20)	20	4	0,012
Ins 2h	278,0 (73,48 $\pm$ 57,94)	22,0 (24,35 $\pm$ 12,15)	20	4	0,033
Ins 4h	256,5 (22,17 $\pm$ 9,72)	19,5 (11,10 $\pm$ 4,56)	19	4	0,023
Ins 6h	258,0 (13,82 $\pm$ 6,06)	18,0 (7,53 $\pm$ 2,00)	19	4	0,017
Ins 8h	283,0 (13,59 $\pm$ 6,68)	17,0 (6,30 $\pm$ 1,17)	20	4	0,012

Wykres 21. Wybrane parametry DTTL, a występowanie MS u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*

a) Glk 2h – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*



b) Ins 4h – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*



Nie stwierdzono znamiennych różnic w stężeniach inkretyn w obu testach funkcjonalnych (DTTG oraz DTTL) pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*.

W grupie nosicieli genotypów TT+CT genu *TCF7L2* w DTTG u osób z MS stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA ($p = 0,004$), stężenia

glukozy w 60' ($p = 0,001$), 90' ($p = 0,011$), 120' ($p = 0,000$), wartości insuliny w 0' ($p = 0,007$), 60' ($p = 0,007$), 90' ($p = 0,014$), 120' ($p = 0,007$) i 180' ($p = 0,005$), stężenia FFA w 0' ($p = 0,027$), 30' ($p = 0,015$), 60' ($p = 0,019$) i 120' ($p = 0,027$) testu [Tabela 44, Wykres 22 a-b].

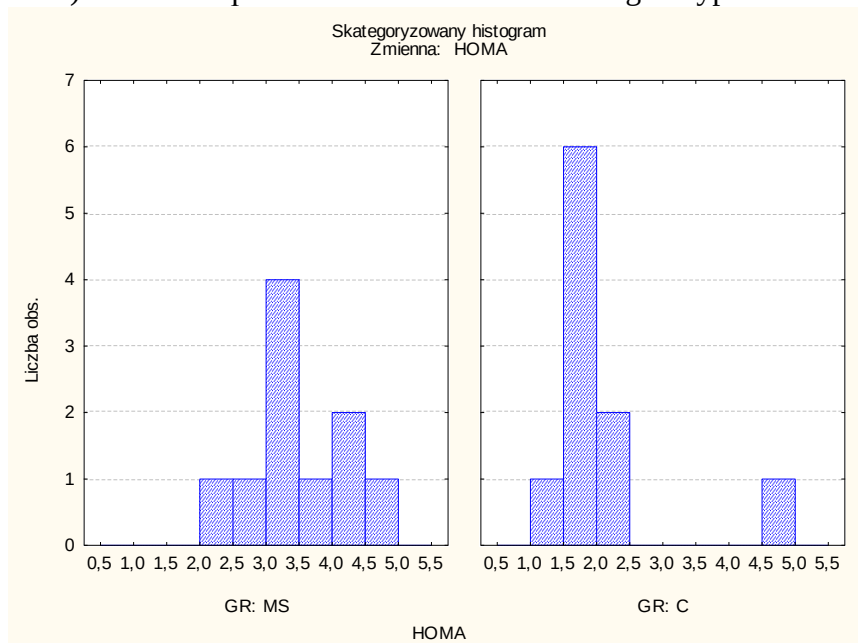
Tabela 44. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupie genotypowej TT+CT genu *TCL7F2* pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTG Zmienna	Suma rang MS	Suma rang C	N ważnych MS	N ważnych C	Wartość p
HOMA	144,0 (3,55 $\pm$ 0,83)	66,0 (2,05 $\pm$ 0,93)	10	10	0,004
Glk 60'	średnia: 9,357 (9,36 $\pm$ 1,53)	średnia: 6,439 (6,44 $\pm$ 1,67)	10	10	0,001
Glk 90'	139,0 (7,75 $\pm$ 1,94)	71,0 (5,80 $\pm$ 1,35)	10	10	0,011
Glk 120'	średnia: 6,808 (6,81 $\pm$ 1,02)	średnia: 4,702 (4,70 $\pm$ 1,00)	10	10	0,000
Ins 0'	141,0 (14,45 $\pm$ 5,07)	69,0 (9,71 $\pm$ 4,80)	10	10	0,007
Ins 60'	141,0 (139,81 $\pm$ 54,70)	69,0 (76,29 $\pm$ 68,53)	10	10	0,007
Ins 90'	138,0 (117,21 $\pm$ 47,21)	72,0 (66,09 $\pm$ 63,34)	10	10	0,014
Ins 120'	141,0 (91,06 $\pm$ 47,68)	69,0 (38,01 $\pm$ 41,18)	10	10	0,007
Ins 180'	125,0 (25,28 $\pm$ 19,18)	65,0 (8,08 $\pm$ 5,36)	9	10	0,005
FFA 0'	111,0 (0,55 $\pm$ 0,24)	60,0 (0,33 $\pm$ 0,13)	9	9	0,027
FFA 30'	113,5 (0,60 $\pm$ 0,40)	57,5 (0,20 $\pm$ 0,10)	9	9	0,015
FFA 60'	112,5 (0,29 $\pm$ 0,26)	58,5 (0,09 $\pm$ 0,06)	9	9	0,019
FFA 120'	111,0 (0,14 $\pm$ 0,13)	60,0 (0,04 $\pm$ 0,03)	9	9	0,027
GIP 0'	133,0 (43,82 $\pm$ 18,21)	77,0 (30,74 $\pm$ 10,27)	10	10	0,038
GIP 30'	137,0 (292,87 $\pm$ 90,34)	73,0 (181,80 $\pm$ 82,06)	10	10	0,017
GIP 180'	118,0 (107,30 $\pm$ 43,42)	72,0 (69,33 $\pm$ 40,86)	9	10	0,025
GLP1 180'	6,0 (2,80 $\pm$ 0,17)	49,0 (4,68 $\pm$ 2,11)	3	7	0,023

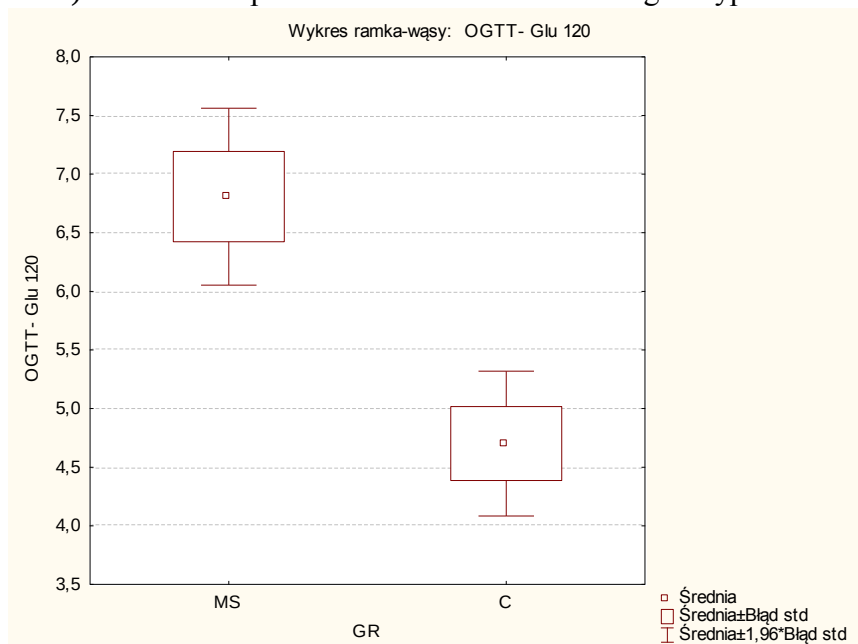
W omawianej grupie genotypowej stężenia GIP były zmiennie wyższe w u osób z MS w 0' ($p = 0,038$), 30' ($p = 0,017$) i 180' ($p = 0,025$) testu, natomiast stężenia GLP-1 w 180' zmiennie niższe ($p = 0,023$) [Tabela 44].

Wykres 22. Wybrane parametry DTTG, a występowanie MS u osób z genotypem TT+CT genu *TCF7L2*

a) HOMA – porównanie MS vs C u osób z genotypem TT+CT genu *TCF7L2*



b) Glk 120' – porównanie MS vs C u osób z genotypem TT+CT genu *TCF7L2*



W **DTTL** u osób z genotypami **TT** lub **CT** genu *TCF7L2* w grupie **MS** stwierdzono wyższe wartości glukozy w 2h ($p = 0,021$), 6h ($p = 0,019$), 8h ($p = 0,045$), stężenie insuliny w trakcie całego testu – 0h ($p = 0,002$), 2h ($p = 0,009$), 4h ($p = 0,002$), 6h ($p = 0,005$) i 8h ($p = 0,045$) oraz stężenia FFA w 4h testu ($p = 0,017$) [Tabela 43Wykres 21].

Tabela 45. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupie genotypowej TT+CT genu *TCL7F2* pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTL Zmienna	Suma rang MS	Suma rang C	N ważnych MS	N ważnych C	Wartość p
Glk 4h	136,0 (5,94 $\pm$ 1,17)	74,0 (4,99 $\pm$ 0,58)	10	10	0,021
Glk 6h	136,5 (5,46 $\pm$ 0,90)	73,5 (4,73 $\pm$ 0,36)	10	10	0,019
Glk 8h	125,0 (5,16 $\pm$ 0,74)	65,0 (4,59 $\pm$ 0,40)	10	9	0,045
Ins 0h	146,0 (15,68 $\pm$ 5,94)	64,0 (8,61 $\pm$ 1,79)	10	10	0,002
Ins 2h	140,0 (66,72 $\pm$ 55,86)	70,0 (25,23 $\pm$ 11,32)	10	10	0,009
Ins 4h	146,0 (29,88 $\pm$ 17,42)	64,0 (11,84 $\pm$ 4,50)	10	10	0,002
Ins 6h	142,5 (14,79 $\pm$ 7,34)	67,5 (7,80 $\pm$ 3,05)	10	10	0,005
Ins 8h	125,0 (10,25 $\pm$ 2,32)	65,0 (7,31 $\pm$ 2,81)	10	9	0,045
FFA 4h	137,0 (0,71 $\pm$ 0,23)	73,0 (0,42 $\pm$ 0,17)	10	10	0,017

Nie stwierdzono znamiennych różnic w poziomach obu inkretyn w DTTL pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypem TT lub CT genu *TCF7L2*.

6.4.3.2 PPAR- γ

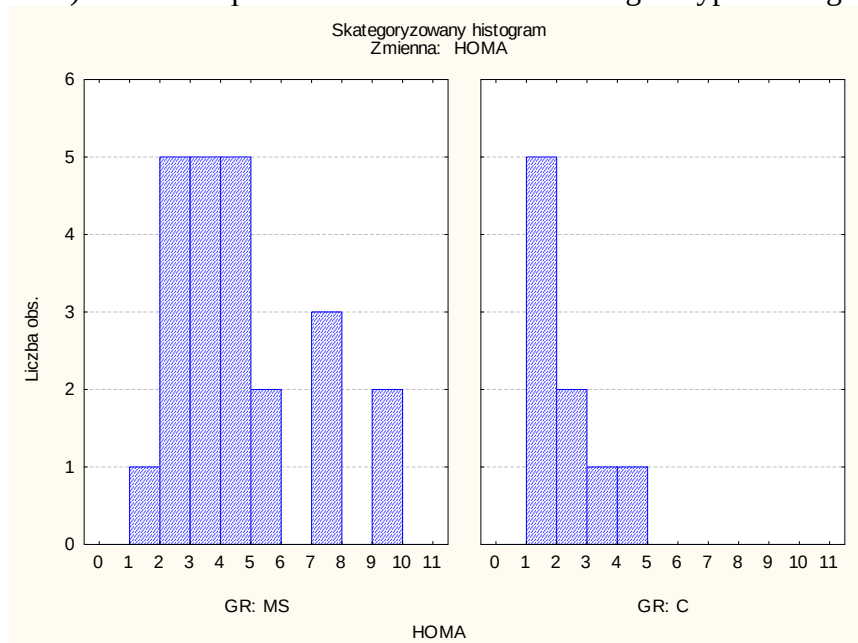
U osób z genotypem **CC genu PPAR- γ** , w **DTTG** w **grupie MS** stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA ($p = 0,001$), stężenia glukozy w 0' ($p = 0,021$), 60' ($p = 0,002$), 90' ($p = 0,021$), 120' ($p = 0,001$), 180' ($p = 0,015$), stężenia insuliny w 0' ($p = 0,017$), 60' ($p = 0,015$), 90' ($p = 0,024$), 120' ($p = 0,018$) i 180' ($p = 0,025$), wartości FFA w 0' ($p = 0,013$), 30' ($p = 0,001$), 60' ($p = 0,009$) i 90' ($p = 0,031$) oraz 120' ($p = 0,017$) testu [Tabela 46].

Tabela 46. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupie genotypowej CC genu PPAR γ pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

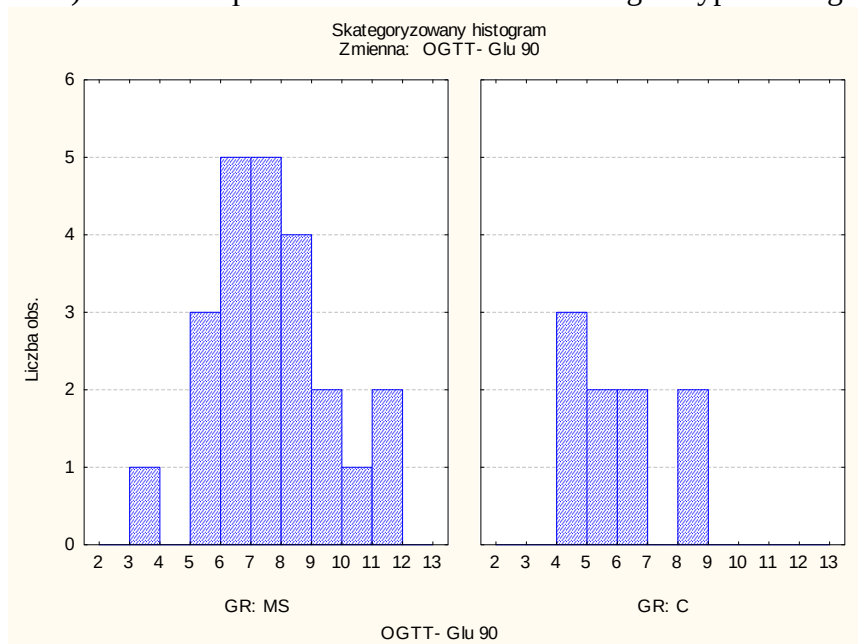
DTTG Zmienna	Suma rang MS	Suma rang C	N ważnych MS	N ważnych C	Wartość p
HOMA	459,0 (4,64 $\pm$ 2,27)	69,0 (2,30 $\pm$ 0,98)	23	9	0,001
Glk 0'	średnia: 5,406 (5,41 $\pm$ 0,61)	średnia: 4,852 (4,85 $\pm$ 0,49)	23	9	0,021
Glk 60'	średnia: 9,316 (9,32 $\pm$ 2,10)	średnia: 6,623 (6,62 $\pm$ 2,00)	23	9	0,002
Glk 90'	435,0 (7,79 $\pm$ 1,92)	93,0 (5,96 $\pm$ 1,51)	23	9	0,021
Glk 120'	średnia: 6,615 (6,61 $\pm$ 1,44)	średnia: 4,783 (4,78 $\pm$ 0,99)	23	9	0,001
Glk 180'	średnia: 4,357 (4,36 $\pm$ 1,03)	średnia: 3,397 (3,40 $\pm$ 0,70)	23	9	0,015
Ins 0'	437,0 (18,33 $\pm$ 9,77)	91,0 (11,22 $\pm$ 4,99)	23	9	0,017
Ins 60'	438,0 (162,09 $\pm$ 99,61)	90,0 (90,70 $\pm$ 71,06)	23	9	0,015
Ins 90'	434,0 (153,24 $\pm$ 125,18)	94,0 (73,42 $\pm$ 64,30)	23	9	0,024
Ins 120'	407,0 (103,21 $\pm$ 87,73)	89,0 (48,04 $\pm$ 40,97)	22	9	0,018
Ins 180'	422,0 (23,76 $\pm$ 15,53)	74,0 (9,76 $\pm$ 6,06)	22	9	0,025
FFA 0'	394,5 (0,70 $\pm$ 0,37)	70,5 (0,43 $\pm$ 0,21)	22	8	0,013
FFA 30'	409,5 (0,61 $\pm$ 0,29)	55,5 (0,26 $\pm$ 0,11)	22	8	0,001
FFA 60'	397,0 (0,28 $\pm$ 0,19)	68,0 (0,11 $\pm$ 0,07)	22	8	0,009
FFA 90'	387,5 (0,18 $\pm$ 0,716)	77,5 (0,07 $\pm$ 0,04)	22	8	0,031
FFA 120'	392,5 (0,14 $\pm$ 0,11)	72,5 (0,05 $\pm$ 0,02)	22	8	0,017

Wykres 23. Wybrane parametry DTTG, a występowanie MS u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*

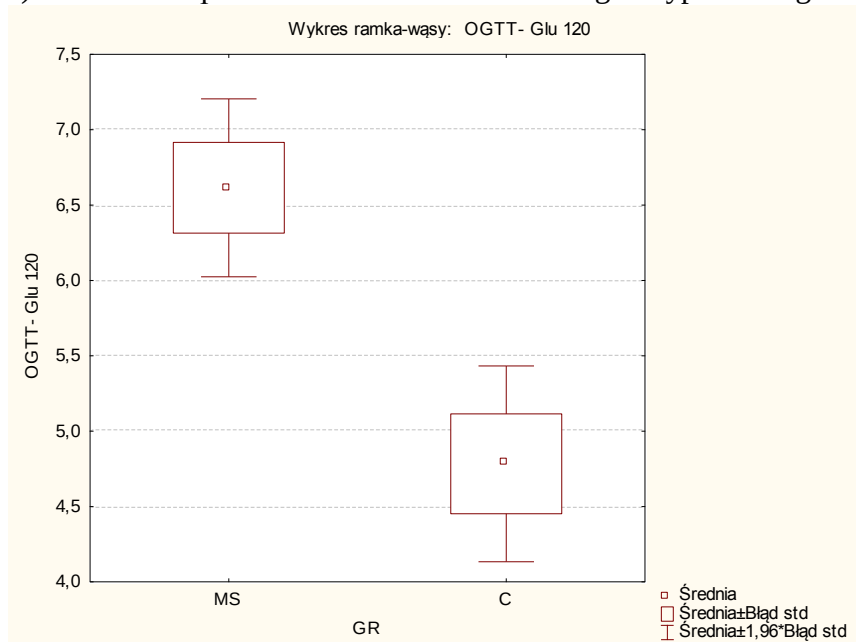
a) HOMA – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*



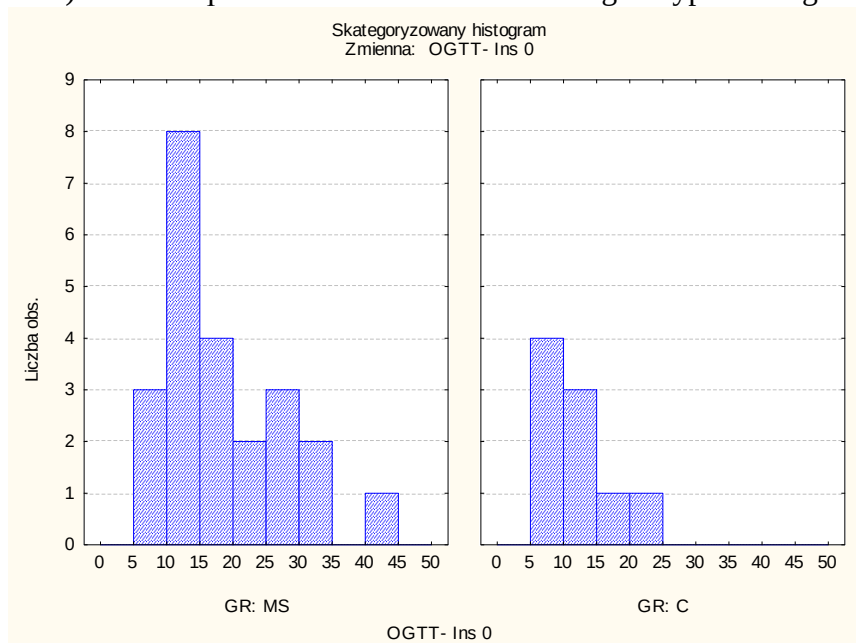
b) Glk 90' – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*



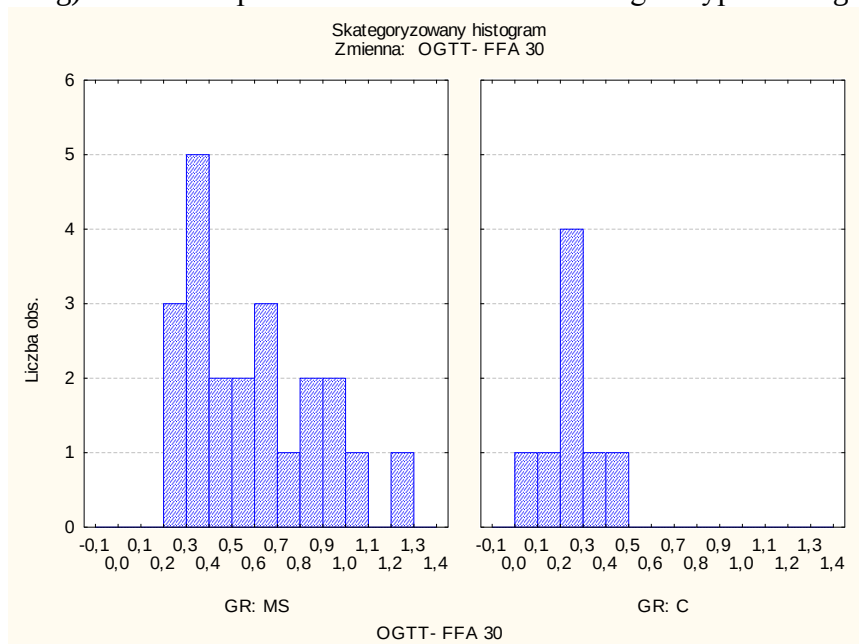
c) Glk 120' – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*



f) Ins 0' – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*



g) FFA 30' - porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*



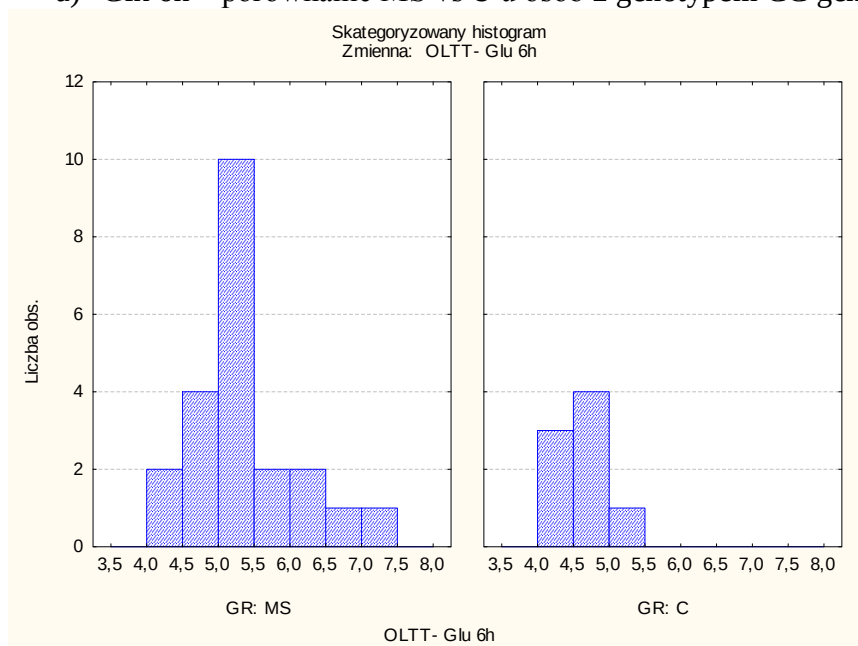
W DTTL u osób z genotypem **CC** genu *PPAR γ* w **grupie MS** stwierdzono wyższe wartości glukozy w 0h ($p = 0,026$), 6h ($p = 0,033$), 8h ($p = 0,013$), stężenia insuliny w trakcie całego testu – 0h ($p = 0,006$), 2h ($p = 0,008$), 4h ($p = 0,004$), 6h ($p = 0,006$) i 8h ($p = 0,010$) oraz wyższe wartości FFA w 4h testu ($p = 0,021$) [Tabela 47, Wykres 24 a-c].

Tabela 47. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupie genotypowej CC genu *PPAR γ* pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

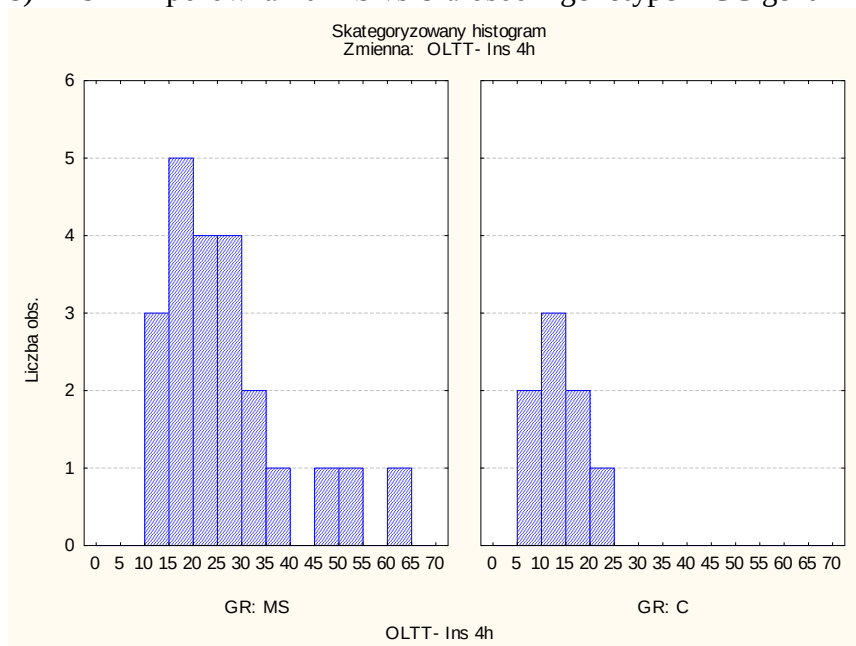
DTTL	Suma rang	Suma rang	N ważnych	N ważnych	Wartość
Zmienna	MS	C	MS	C	p
Glk 0h	389,0 (5,64 $\pm$ 0,73)	76,0 (5,02 $\pm$ 0,47)	22	8	0,026
Glk 6h	393,5 (5,39 $\pm$ 0,75)	71,5 (4,74 $\pm$ 0,38)	22	8	0,033
Glk 8h	394,5 (5,07 $\pm$ 0,53)	70,5 (4,58 $\pm$ 0,37)	22	8	0,013
Ins 0h	415,0 (20,02 $\pm$ 9,23)	50,0 (8,84 $\pm$ 1,92)	22	8	0,006
Ins 2h	398,0 (72,60 $\pm$ 53,68)	67,0 (27,63 $\pm$ 13,29)	22	8	0,008
Ins 4h	403,5 (26,95 $\pm$ 13,03)	61,5 (13,76 $\pm$ 4,40)	22	8	0,004
Ins 6h	400,5 (15,22 $\pm$ 6,73)	64,5 (8,64 $\pm$ 3,30)	22	8	0,006
Ins 8h	396,0 (12,89 $\pm$ 5,64)	69,0 (7,49 $\pm$ 2,66)	22	8	0,010
FFA 4h	średnia: 0,709 (0,71 $\pm$ 0,30)	średnia: 0,421 (0,42 $\pm$ 0,22)	22	8	0,021

Wykres 24. Wybrane parametry DTTL, a występowanie MS u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*

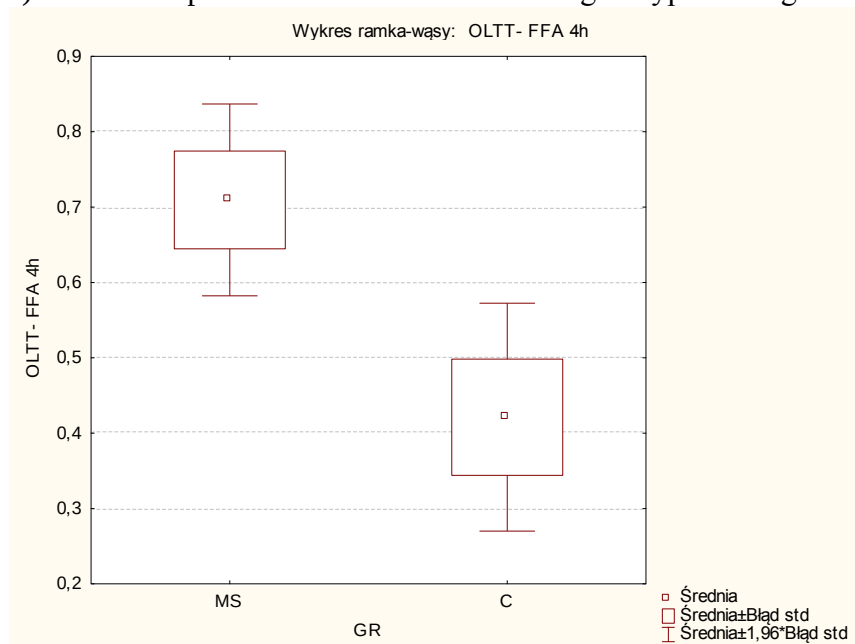
a) Glk 6h – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*



b) Ins 4h – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*



c) FFA 4h – porównanie MS vs C u osób z genotypem CC genu *PPAR γ*



Nie stwierdzono znamienych różnic w poziomach inkretyn w obu testach funkcjonalnych (DTTG oraz DTTL) pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypem CC genu *PPAR γ* .

W grupie nosicieli genotypów GG+CG genu *PPAR γ* w DTTG u osób z MS stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA ($p = 0,004$), stężenia glukozy w 0' ($p = 0,024$), 30' ($p = 0,005$), 60' ($p = 0,004$), 90' ($p = 0,008$), 120' ($p = 0,007$), stężenia insuliny w 0' ($p = 0,005$), 60' ($p = 0,012$), 90' ($p = 0,008$), 120' ($p = 0,002$) i 180' ($p = 0,003$), stężenia FFA w 0' ($p = 0,017$), 30' ($p = 0,008$), 60' ($p = 0,004$), 90' ($p = 0,017$) i 120' ($p = 0,017$) testu [Tabela 48, Wykres 25 a-b].

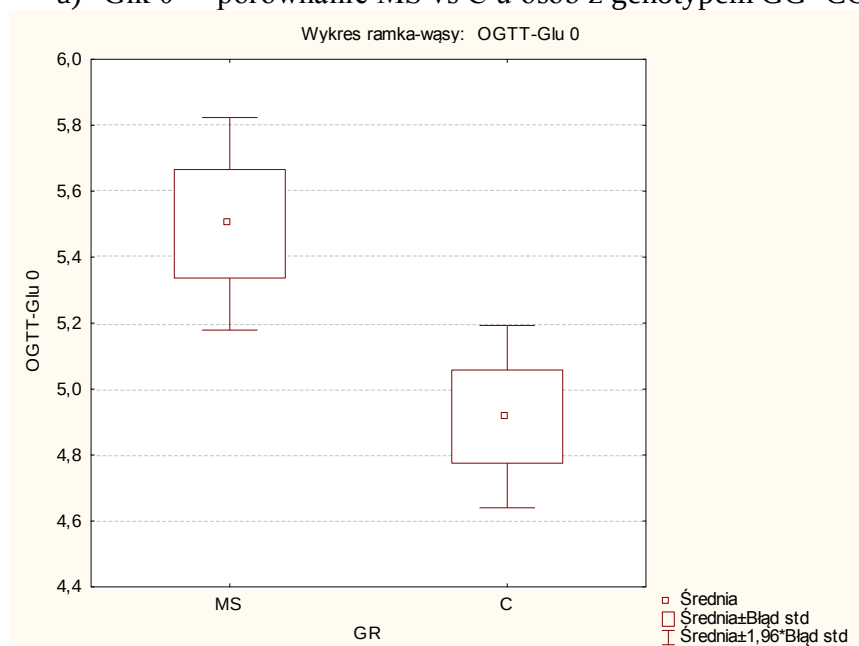
Tabela 48. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupie genotypowej GG+CG genu *PPAR γ* pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTG Zmienna	Suma rang MS	Suma rang C	N ważnych MS	N ważnych C	Wartość p
HOMA	83,0 (4,16 $\pm$ 2,23)	22,0 (1,86 $\pm$ 0,41)	8	6	0,004
Glk 0'	średnia: 5,501 (5,50 $\pm$ 0,47)	średnia: 4,917 (4,92 $\pm$ 0,35)	8	6	0,024
Glk 30'	średnia: 8,684 (8,68 $\pm$ 1,11)	średnia: 6,982 (6,98 $\pm$ 0,60)	8	6	0,005

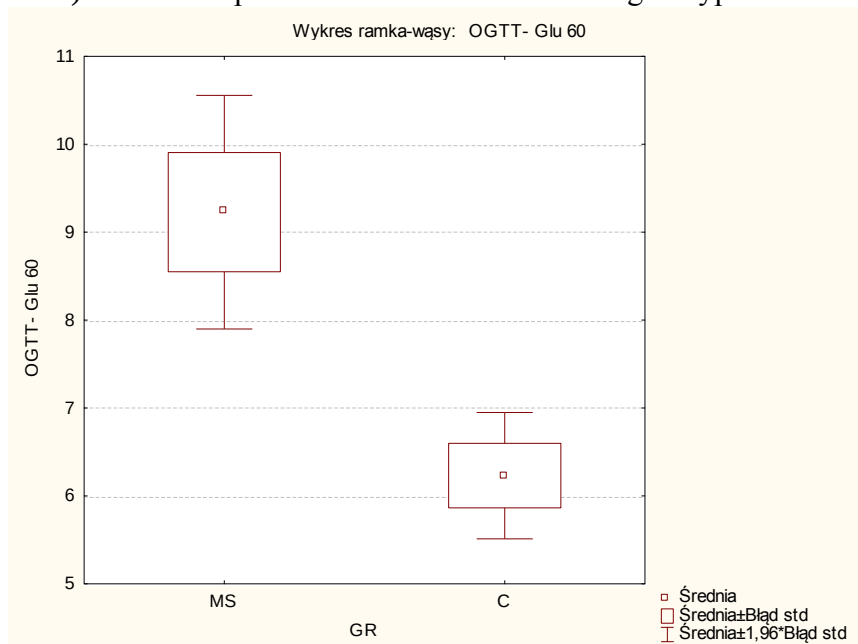
Glk 60'	średnia: 9,229 (9,23 ± 1,92)	średnia: 6,232 (6,23 ± 0,90)	8	6	0,004
Glk 90'	81,0 (7,91 ± 2,14)	24,0 (5,13 ± 0,60)	8	6	0,008
Glk 120'	średnia: 6,566 (6,57 ± 1,77)	średnia: 4,070 (4,07 ± 0,76)	8	6	0,007
Ins 0'	82,0 (19,25 ± 12,41)	23,0 (8,18 ± 1,77)	8	6	0,005
Ins 60'	80,0 (138,83 ± 63,81)	25,0 (60,50 ± 24,85)	8	6	0,012
Ins 90'	81,0 (136,95 ± 58,54)	24,0 (53,73 ± 28,89)	8	6	0,008
Ins 120'	84,0 (115,14 ± 116,70)	21,0 (23,53 ± 12,56)	8	6	0,002
Ins 180'	70,0 (25,16 ± 12,90)	21,0 (5,90 ± 1,77)	7	6	0,003
FFA 0'	79,0 (0,65 ± 0,21)	26,0 (0,29 ± 0,10)	8	6	0,017
FFA 30'	81,0 (0,57 ± 0,27)	24,0 (0,19 ± 0,09)	8	6	0,008
FFA 60'	83,0 (0,32 ± 0,20)	22,0 (0,08 ± 0,05)	8	6	0,004
FFA 90'	79,0 (0,18 ± 0,11)	26,0 (0,05 ± 0,04)	8	6	0,017
FFA 120'	79,0 (0,17 ± 0,12)	26,0 (0,04 ± 0,03)	8	6	0,017

Wykres 25. Wybrane parametry DTTG, a występowanie MS u osób z genotypem GG+CG genu *PPARγ*

a) Glk 0' – porównanie MS vs C u osób z genotypem GG+CG genu *PPARγ*



b) Glk 60' – porównanie MS vs C u osób z genotypem GG+CG genu *PPAR γ*



W DTTL u osób z genotypami **GG** lub **CG** genu *PPAR γ* w grupie **MS** stwierdzono wyższe wartości glukozy w 2h ($p = 0,005$) oraz stężenia insuliny w trakcie całego testu – 0h ($p = 0,004$), 2h ($p = 0,024$), 4h ($p = 0,008$), 6h ($p = 0,008$) i 8h ($p = 0,023$) [Tabela 43 Wykres 21].

Tabela 49. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupie genotypowej GG+CG genu *PPAR γ* pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

DTTL Zmienna	Suma rang MS	Suma rang C	N ważnych MS	N ważnych C	Wartość p
Glk 2h	82,0 (5,77 $\pm$ 0,89)	23,0 (4,33 $\pm$ 0,52)	8	6	0,005
Ins 0h	82,5 (15,78 $\pm$ 9,47)	22,5 (8,52 $\pm$ 1,87)	8	6	0,004
Ins 2h	78,0 (67,45 $\pm$ 64,27)	27,0 (21,45 $\pm$ 6,80)	8	6	0,024
Ins 4h	68,0 (18,14 $\pm$ 10,83)	23,0 (8,78 $\pm$ 2,27)	7	6	0,008
Ins 6h	68,0 (11,06 $\pm$ 3,95)	23,0 (6,50 $\pm$ 0,87)	7	6	0,008
Ins 8h	72,0 (11,34 $\pm$ 6,37)	19,0 (6,22 $\pm$ 1,98)	8	5	0,023

Nie stwierdzono znamiennych różnic w poziomach inkretyn w obu testach funkcjonalnych (DTTG oraz DTTL) pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypami GG lub CG genu *PPAR γ* .

6.5 Podsumowanie otrzymanych wyników

1. Grupa **MS** charakteryzowała się znamienne większymi wartościami wskaźników kwalifikacyjnych charakterystycznych dla tej jednostki chorobowej w stosunku do grupy kontrolnej. Stężenie **adiponektyny** w tej grupie był znamienne niższe. Znamienne wyższe stężenie **leptyny** stwierdzono jedynie u kobiet - głównie w podgrupie **kobiet z MS** względem pozostałych grup.

2. Porównanie wartości oznaczeń biochemicznych podczas DDTG i DTTL

- a. Wyrzut **glukozy** (AUC) był wyższy u pacjentów z **MS** podczas DDTG. Natomiast glikemia podczas DTTL nie ulegała znamienne statystycznym zmianom, choć poziom glikemii był zawsze wyższy u pacjentów z MS.
- b. Stężenie **FFA** w obu testach było również wyższe u osób w grupie **MS**, jednak tylko wartości na czczo i w 30, 60, 90 i 120 minucie w DDTG oraz na czczo, w 2 i 4 godzinie DTTL różniły się statystycznie istotnie.
- c. **AUC insuliny** w czasie obu testów (DDTG i DDTL) był ponad 2 razy wyższy u pacjentów z **MS**. W DTTL wartości uwalnianej insuliny były niższe od stężenia insuliny uwolnionej w trakcie DDTG, ale w porównaniu z grupą kontrolną wciąż wyższe u pacjentów z MS.
- d. W grupie **MS** odnotowano również wyższe wartości **TG** w trakcie całego testu – DDTG i DTTL ($p < 0,005$; $p < 0,001$).

3. Uwalnianie inkretyn a testy funkcjonalne DTTL vs DDTG

- a. Stężenie inkretyn na czczo było porównywalne w obu badanych grupach
- b. Także uwalnianie GIP i GLP-1 podczas obu testów było porównywalne w obu badanych grupach
- c. Natomiast stwierdzono znamienne różnicę w **zależnym od testu wydzielaniu inkretyn** w obrębie tych samych grup (zarówno C jak i MS):
 - znamienne wyższe **AUC-GIP** po przyjęciu posiłku **bogatolipidowego** w porównaniu z posiłkiem węglowodanowym
 - wyższe **AUC-GLP-1** w teście **tolerancji glukozy** w porównaniu do DTTL.

4. Porównanie parametrów biochemicznych badanych grup z uwzględnieniem płci (mężczyźni (M) vs kobiety (K))

- a. W **obrębie całych grup**, za wyjątkiem pojedynczych punktów czasowych testów dla np. FFA w DTTL, czy insuliny w DTTG, nie obserwowano znamiennych różnic w badanych parametrach przy uwzględnieniu płci
- b. Natomiast parametry biochemiczne (stężenie glukozy, insuliny, FFA, TG) na czczo i w przebiegu obu testów były wyższe u **mężczyzn i kobiet z MS** w porównaniu z kobietami i mężczyznami grupy kontrolnej

W obu testach **nie** stwierdzono istotnych różnic w **poziomach uwalnianych inkretyn** w zależności od płci. W DTTG maksymalne stężenie GLP-1 obserwowano w 30 minucie u K, natomiast u M w 60 minucie.

Stężenie GLP-1 i GIP na czczo jak i w trakcie obu testów nie różniło się istotnie statystycznie u K z grup MS vs kobiet grupy C. W trakcie DTTL stężenie GIP było około 2 razy wyższe w porównaniu z DTTG.

Stężenie GLP-1 i GIP na czczo jak i w trakcie obu testów nie różniło się istotnie statystycznie u M z grup MS vs C. W trakcie DTTL stężenie GIP było około 2 razy wyższe w porównaniu z DTTG. W DTTL wartości uwolnionego GIP były nieznacznie niższe u M z MS, choć różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (wartość p dla poszczególnych punktów testu zawierała się w zakresie 0,113-0,929).

5. Charakterystyka antropometryczna pacjentów oraz ciśnienie tętnicze, a poziom inkretyn na czczo.

W **całej grupie** badanej i **grupie MS** stężenie GIP na czczo, istotnie statystycznie dotatnio korelowało jedynie ze wskaźnikiem masy ciała BMI. Poza tym stężenie GIP na czczo korelowało dotatnio w grupie **M z MS** oraz **z C** z WHR, a w **grupie kontrolnej** tylko z wartościami ciśnienia rozkurczowego. Nie stwierdzono istotnych korelacji tych parametrów w grupach kobiet z MS i z C.

W **całej grupie** badanej stężenie GLP-1 na czczo korelowało istotnie statystycznie ujemnie ze wskaźnikiem masy ciała BMI, ilościową zawartością tkanki tłuszczowej oraz średnim ciśnieniem skurczowym. GLP-1 na czczo korelował ujemnie z BMI oraz procentową zawartością tkanki tłuszczowej u **kobiet w grupie MS**. W **całej grupie kontrolnej** zaś z BMI oraz ilościową zawartością tkanki tłuszczowej. Natomiast w grupie **M z MS** GLP-1 na czczo korelował dotatnio z ilościową i procentową zawartością tkanki tłuszczowej. Nie stwierdzono istotnych korelacji tych parametrów w grupach MS oraz kobiet i mężczyzn z C.

6. Badane adipokiny oraz ciśnienie tętnicze, a uwalnianie GIP i GLP-1.

Nie stwierdzono znamiennych statystycznie korelacji między stężeniem GIP i GLP-1 w punkcie wyjściowym obu testów, a stężeniami leptyny, adiponektyny i wisfatyny na czczo.

Stwierdzono dodatnią korelację między **AUC-GIP** a stężeniem **wisfatyny** w **całej grupie** badanej w DTTG oraz w **całej grupie** badanej, grupie **MS** i **mężczyzn z MS** w DTTL. Reszta korelacji (w tym wszystkie dla AUC-GLP1 w obu testach oraz dla ciśnienia tętniczego) nie osiągnęła znamienności statystycznej.

7. Stężenie GIP i GLP-1 na czczo, a wartości wskaźników gospodarki węglowodanowej

Stwierdzono dodatnią korelację między **GIP** a stężeniem **glukozy na czczo** w grupie **mężczyzn** należących do grupy kontrolnej

Natomiast **GLP-1 na czczo** korelował znamienne statystycznie ujemnie jedynie ze stężeniem **glikemii na czczo** w **całej grupie** badanej, grupie **MS** i u **mężczyzn z grupy kontrolnej**.

8. Stężenie GIP i GLP-1 na czczo, a stężenie wskaźników gospodarki lipidowej

Stwierdzono jedynie znamienną statystycznie ujemną korelację między **GIP** a stężeniem **FFA** na czczo u **K grupy MS**, a w przypadku **GLP-1** podobną korelację dla **całej grupy badanych osób**.

9. Próby czynnościowe – gospodarka węglowodanowa. Uwalnianie inkretyn, a stężenie glukozy i insuliny w poszczególnych punktach czasowych DTTG

W czasie **DTTG** stwierdzono znamienne statystycznie, dodatnie korelacje stężenia **GIP**, a **glukozy** w **całej grupie** badanej w punkcie 0', 30', 180' testu. Podobną korelację stwierdzono w grupie **MS** w punkcie 30' i 180'; a ponadto u **kobiet z grupy MS** w punkcie 30'; i u **mężczyzn w grupie MS** w punkcie 0' i 180'. Stężenie **GIP** korelowało dodatnio z wartościami **insuliny** w odpowiednich punktach DTTG w **całej grupie** badanej (30 i 180 minuta), grupie **MS** (30 i 180 minuta), u **K z grupy MS** (0 i 180 minuta) oraz u **M w grupach MS i C** (30 minuta testu).

Stężenie **GLP-1**, korelowało znamienne statystycznie ujemnie ze stężeniem **glukozy** w czasie DTTG w **całej grupie** badanej w punkcie 0' testu; u **mężczyzn w grupie MS** w punkcie 0' i 30'; i u **kobiet z grupy C** w punkcie 180'. Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji między stężeniem GLP-1 a stężeniem insuliny w odpowiednich punktach czasowych.

10. Próby czynnościowe – gospodarka lipidowa. Uwalnianie inkretyn, a wartości FFA i TG w poszczególnych punktach czasowych DTTL

W czasie DTTL stężenie **GIP** znamienne statystycznie, ujemnie korelowało ze stężeniem **FFA** jedynie u **kobiet z grupy MS** w punkcie 0h. Natomiast ze stężeniem **TG** wartości **GIP** korelowały statystycznie znamienne również tylko w grupie **K z MS** w 4 godzinie testu - tym razem była to korelacja dodatnia.

Stężenie GLP-1 korelowało znamienne statystycznie ujemnie z wartościami **FFA** w czasie DTTL w **grupie C** w punkcie 8h testu oraz u **kobiet z grupy C** w punkcie 6h i 8h

Dla wartości **GLP-1** i **TG** w odpowiednich punktach czasowych DTTL stwierdzono następujące znamienne korelacje: ujemną w **całej grupie** badanej oraz w **grupie kontrolnej** w punkcie 0h, dodatnią w grupie **MS** oraz w grupie **kobiet z MS** w punktach 4h i 6h.

11. Porównanie wpływu (AUC) glukozy i FFA na uwalnianie inkretyn podczas testów funkcjonalnych (DTTG a DTTL)

W obliczeniach porównujących zależność wyrzutu (AUC) oddzielnie GIP i GLP-1 z AUC glukozy w czasie DTTG oraz podobnej zależności dla FFA w czasie DTTL w grupach MS, C oraz kobiet i mężczyzn z grup MS i C, nie uzyskano istotności statystycznej dla wyników GLP-1.

Jedyną zależność znamienne statystycznie uzyskano dla wartości **AUC-GIP a AUC-FFA w DTTL** między grupami MS i C ($p = 0,035$). Może to przemawiać za istnieniem różnej zależności uwalniania GIP od FFA w zależności od rozwoju MS. Spłaszczenie krzywej wykresu regresji dla MS przemawia za osłabieniem tej zależności u osób z MS.

W wykonanej analizie regresji dla inkretyn w zależności od poziomu glukozy i FFA w poszczególnych grupach, dla każdego punktu testów (DTTG i DTTL) oddzielnie, stwierdzono znamienne zależność **GIP od stężenia glukozy w DTTG** w punkcie 0', 30' i 180' testu w **całej grupie badanej i grupie MS**, oraz w 0 i 180 minucie testu u **mężczyzn z grupy MS**. Odpowiednio istotną statystycznie zależność **GLP-1 od stężenia glukozy w DTTG** stwierdzono w **całej grupie badanej** w 0 i 180 minucie, w grupie **MS 90'**, a u **mężczyzn z MS** w 30 minucie testu.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie regresji stężenia GIP od stężenia FFA w DTTL. Natomiast znamienne osiągnęła zależność **stężenia GLP-1 od stężenia FFA w DDTL** w **grupie C** jedynie w punkcie 8h, a w grupie **mężczyzn z C** w punkcie 6h.

12. Badania zależności wartości badanych parametrów od oznaczanych polimorfizmów

a. Częstość występowania badanych genotypów i alleli

U pacjentów z zespołem metabolicznym istotnie częściej występował allel C polimorfizmu genu *TCF7L2* (rs7903146) oraz allel C dla genu *PPAR γ 2* (rs1805192).

W grupie kontrolnej istotnie statystycznie dominował allel T dla genu *TCF7L2* oraz G dla genu *PPAR γ 2*.

b. Porównanie przebiegu obu testów – DTTG oraz DTTL, w zależności od badanych genotypów

TCF7L2

W całej grupie badanej (C plus MS) w **DTTG** u osób z genotypem **CC** genu *TCF7L2* stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA stężenia insuliny w 0' i 180', stężenia FFA w 0', 30', 60' i 90' oraz niższe stężenie GIP w 60' testu.

W całej badanej grupie (C plus MS) w **DTTL** stwierdzono u osób z genotypem **CC** genu *TCF7L2* wyższe stężenie insuliny w 0h oraz niższy poziom GIP w 2h i 4h testu.

W grupie **MS** w **DTTG** stwierdzono u osób z genotypem **CC** genu *TCF7L2* niższe wartości GIP w 30' oraz w 60' testu.

W **DTTL** w grupie **MS** stwierdzono u osób z genotypem **CC** genu *TCF7L2* niższe wartości GIP w 4h, 6h oraz w 8h testu.

W grupie **C** w **DTTG** stwierdzono u osób z genotypem **CC** genu *TCF7L2* wyższe stężenie GIP w 0' testu.

PPAR γ 2

W całej badanej grupie osób (C plus MS) w **DTTG** nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic badanych parametrów między genotypami CG i CC. Natomiast w **DTTL** u osób z genotypem **CC** genu *PPAR γ 2* stwierdzono wyższe wartości stężenia insuliny w 4h i 6h testu.

W wyodrębnionej grupie **MS** w **DTTG** nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic między genotypami CG i CC. Natomiast w **DTTL** ponownie stwierdzono u osób z genotypem **CC** genu *PPAR γ 2* wyższe stężenie Insuliny w 4h testu.

W samej grupie **C** w **DTTG** nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic badanych parametrów między genotypami CG i CC. Także w tej grupie w przebiegu **DTTL** stwierdzono wyższe wartości stężenia insuliny w 4h oraz stężenia FFA w 6h testu u osób z genotypem **CC** genu *PPAR γ 2*.

c. Porównanie nosicieli tych samych genotypów dwóch badanych genów między grupami MS i C w obu funkcjonalnych testach – DTTG oraz DTTL.

TCF7L2

U osób z genotypem CC genu TCF7L2 w DTTG w grupie MS stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA, stężenia glukozy w 0', 60', 90', 120', stężenia insuliny w 0', 60', 90', 120' i 180', stężenia FFA w 0', 30', 60' i 90' oraz 120' testu.

W DTTL u osób z genotypem CC genu TCF7L2 w grupie MS stwierdzono wyższe wartości glukozy w 0h, 2h, 6h, stężenia insuliny w trakcie całego testu – od 0h do 8h testu.

Nie stwierdzono znamiennych różnic w wartościach inkretyn w obu testach funkcjonalnych (DTTG oraz DTTL) pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypem CC genu TCF7L2.

W grupie nosicieli genotypów TT+CT genu TCF7L2 w DTTG u osób z MS stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA, stężenia glukozy w 60', 90', 120', stężenia insuliny w 0', 60', 90', 120' i 180', stężenia FFA w 0', 30', 60' i 120' testu. W omawianej grupie genotypowej wartości GIP były znamienne wyższe u osób z MS w 0', 30' i 180' testu, natomiast stężenie GLP-1 w 180' znamienne niższe.

W DTTL u osób z genotypami TT lub CT genu TCF7L2 w grupie MS stwierdzono wyższe wartości glukozy w 2h, 6h, 8h, stężenie insuliny w trakcie całego testu – od 0h do 8h oraz stężenia FFA w 4h testu.

Nie stwierdzono znamiennych różnic w wartościach obu inkretyn w DTTL pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypem TT lub CT genu TCF7L2.

PPAR-γ

U osób z genotypem CC genu PPAR-γ, w DTTG w grupie MS stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA, stężenie glukozy w 0', 60', 90', 120', 180', stężenie insuliny w 0', 60', 90', 120' i 180', wartości FFA w 0', 30', 60' i 90' oraz 120' testu.

W DTTL u osób z genotypem CC genu PPAR γ w grupie MS stwierdzono wyższe wartości glukozy w 0h, 6h, 8h, stężenia insuliny w trakcie całego testu – od 0h do 8h oraz wyższe stężenie FFA w 4h testu.

Nie stwierdzono znamiennych różnic w wartościach inkretyn w obu testach funkcjonalnych (DTTG oraz DTTL) pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypem CC genu PPAR γ .

W grupie nosicieli genotypów GG+CG genu PPAR γ w DTTG u osób z MS stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA, stężenia glukozy w 0',

30', 60', 90', 120', wartości insuliny w 0', 60', 90', 120' i 180', stężenia FFA w 0', 30', 60', 90' i 120' testu.

W **DTTL** u osób z genotypami **GG** lub **CG** genu *PPAR γ* w **grupie MS** stwierdzono wyższe wartości glukozy w 2h oraz stężenia insuliny w trakcie całego testu – 0h do 8h.

Nie stwierdzono znamienych różnic w stężeniach inkretyn w obu testach funkcjonalnych (DTTG oraz DTTL) pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypami GG lub CG genu *PPAR γ* .

6.6 Uwagi krytyczne dotyczące wykonanych badań

- Grupa MS jest ok. 2,5 raza liczniejsza względem grupy C. Liczba M i K w obrębie całej grupy była porównywalna, natomiast między grupami MS i C ten stosunek był nierówny. Jednak z uwagi, że nie wykazano znamiennych różnic w działaniu inkretyn między płciami, brak równego podziału mężczyzn i kobiet w grupach MS i C nie odgrywał znaczącej roli.
- Mała liczebność grup badanych mogła wpłynąć na trudności w uzyskiwaniu znamienności statystycznej otrzymanych wyników (przy wyższej liczebności grup możliwe uzyskanie większej liczby istotnych statystycznie wyników). Dostępne środki finansowe nie zezwoliły na wykonanie większej ilości badań biochemicznych. Nie jest to badanie typu epidemiologicznego. Wszystkie wyniki, które uzyskały znamienność przy tej liczebności, posiadają dużą moc statystyczną – często $p < 0,001$.
- Mała liczebność dla GLP-1 - 10 osób z grupy MS, 10 osób z grupy C. Jest to spowodowane dużym kosztem i stopniem trudności oznaczeń tej inkretyny.
- DTTG trwający 180 minut obejmował I oraz II fazę wydzielania GLP-1. W DTTL pobierając materiał/krew co 2 godziny uwzględniono celowo jedynie II fazę wydzielania GLP-1. Oznaczania wykonywano zestawami na 40 próbek. Zdobycie środków finansowych na badania nastąpiło później w stosunku do zebranych próbek. Toteż o typie wydzielania dowiedziano się już podczas realizacji projektu. Tym niemniej badanie miało na celu sprawdzenie wpływu samych lipidów (bezpośredni kontakt pokarmu z komórkami K, wchłonięcie się części pokarmu bogatolipidowego z przewodu pokarmowego) – II faza.
- Rozkład alleli niezgodny z prawem Hardyego-Weinberga. Wyniki oznaczeń genetycznych przedstawiono jako dotyczące tylko grupy badanej
- Ze względu na bardzo małą liczebność genotypowych grup TT w *TCF7L2* oraz GG w *PPAR γ* , do analizy statystycznej ich wyniki zostały włączone do odpowiednich grup heterozygotycznych TC genu *TCF7L2* i GC genu *PPAR γ* , co jest praktykowane w opracowaniach naukowych.

7 Dyskusja i omówienie wyników

Głównym celem pracy było wykazanie wpływu rodzaju pokarmu: posiłku węglowodanowego vs lipidowego, na uwalnianie inkretyn. Dokonano tego posługując się testami funkcjonalnymi: doustnym testem tolerancji glukozy (*DTTG*) i doustnym testem tolerancji lipidów (*DTTL*, lipemii poposiłkowej), jako testów aktywujących wydzielanie inkretyn w warunkach wywołanego posiłkiem podwyższenia stężenia substratów energetycznych. Ponieważ wg wyników badań asocjacyjnych GWA genomu ludzkiego wykazano, że polimorfizmy genów *TCF7L2* i *PPAR γ* wpływają na różnicowanie (masę) tkanki tłuszczowej oraz usuwanie wolnych kwasów z krążenia, podjęto próbę wykazania związku wybranych polimorfizmów tych genów (o największym wpływie fenotypowym) ze stężeniem inkretyn w badanej grupie.

7.1 Funkcjonalne testy (*DTTG* vs *DTTL*), a uwalnianie inkretyn

7.1.1 Dobór badanych grup i testów czynnościowych

Poposiłkowy stres wolnorodnikowo-zapalny, silnie indukowany glukolipotoksycznością (24, 25, 165), uszkadza komórki organizmu (akumulacja kropelek lipidowych) w tym śródbłónka naczyń, ale także komórki beta trzustki. W konsekwencji przyczynia się to do zmniejszenia endogennej produkcji insuliny i rozwoju cukrzycy typu 2 z jej powikłaniami. Inkretyny umożliwiają przeżycie komórek β w warunkach stresu metabolicznego, hamują ich apoptozę (173). Zjawisko to zostało wykorzystane w praktyce do namnażania komórek beta trzustki *in vitro*, w hodowlach tkankowych w badaniach nad terapią komórkową cukrzycy (219, 174).

Do przedstawianego badania zostały zakwalifikowane osoby z zespołem metabolicznym (wg wytycznych *IDF* z 2005r (5), jako model, w którym już rozwinęły się znaczne zaburzenia gospodarki lipidowej i węglowodanowej, ale jeszcze nie doszło do załamania mechanizmów obronnych organizmu (w tym niewydolności samej osi inkretynowej) i rozwinięcia cukrzycy, w tzw. stanie *prediabetes*. U pacjentów z MS inkretyny mogą jeszcze ochraniać komórki β trzustki (wywołując nawet funkcjonalną hipertrofię wysp), których funkcja jest już zaburzona, ale które jeszcze nie uległy całkowitemu uszkodzeniu, czy apoptozie jak to się dzieje w cukrzycy (175).

Uwalnianie inkretyn po doustnej podaży glukozy, zostało poznane w wyniku zastosowania DTTG w porównaniu z dożylnym podaniem glukozy (176, 177). Mało natomiast jest danych w piśmiennictwie dotyczących oceny uwalniania inkretyn przy użyciu DTTL (test lipemii poposiłkowej). Znaczenie doustnego testu tolerancji lipidów w diagnostyce powikłań klinicznych zespołu metabolicznego (insulinooporność, uszkodzenie komórek beta trzustki, cukrzyca, rozwój upośledzenia funkcji śródbłonna, nadciśnienie tętnicze, miażdżyca – jako wynik glukolipotoksyczności) zyskało uznanie dopiero kilka lat temu (178).

W badanej grupie osób z MS w czasie DTTG zgodnie z przewidywaniem i dotychczas publikowanymi doniesieniami (2, 3, 4, 7, 8), stwierdzono wyższy wyrzut glukozy i insuliny po przyjęciu posiłku, niż u zdrowych ochotników. Również do 120 minuty DTTG i 4 godziny DTTL stężenie FFA był znacząco wyższy w grupie z MS. Brak wpływu DTTL na stężenie glukozy w obu grupach potwierdził trafność doboru testu, sprawdzającego wpływ lipidów na wydzielanie inkretyn. W obu testach wyższe wartości TG charakteryzowały grupę MS. Podobne wyniki i zależności uzyskano po rozbiciu grup MS i C na podgrupy pod względem płci.

7.1.2 Stężenia inkretyn na czczo

Obserwowane w obecnej pracy stężenia GLP-1 na czczo we wszystkich badanych grupach były porównywalne do opisywanych w piśmiennictwie. Zakres wartości referencyjnych dla GLP-1 u osób dorosłych wynosi zwykle 5-10 pmol/l (76), (w niniejszej pracy średnio 3,37 pmol/l u osób z MS oraz 3,84 pmol/l w grupie C). Natomiast stężenie GIP względem opisanych w publikacjach wartości referencyjnych dla GIP - 0,06-0,1 nmol/l (300-500 pg/ml) (76) były niższe (w tym badaniu stężenie GIP na czczo u osób z MS był równy 42,39 pg/ml, a w kontroli średnio 37,18 pg/ml). Różnice w stężeniach GIP na czczo w badanej grupie można wytłumaczyć innym zestawem biochemicznym wybranym do przeprowadzenia oznaczenia. Zakres wartości ludzkiego GIP dla użytego zestawu oraz przykładowa krzywa standardowa dla tej metody potwierdzają poprawność uzyskanych wyników dla celów porównawczych przy użyciu tego właśnie testu.

W obu badanych grupach – MS i C, jak również po uwzględnieniu podziału względem płci, stężenie inkretyn na czczo były porównywalne. Potwierdza to prawidłowy dobór pacjentów do badań; osoby z grupy badanej miały rozpoznany zespół metaboliczny, nie zaś cukrzycę typu 2 (177, 179). Wyniki badań dotyczących oceny stężeń inkretyn u pacjentów z

cukrzycą dowodzą, że stężenie GIP u chorych z DMt2 może być porównywalne, lub też podwyższone w stosunku do ludzi zdrowych (179), natomiast stężenie GLP-1 obniżone (177). Podobną tendencję obserwowano w niniejszej pracy - stężenie GIP na czczo było wyższe u osób z MS, natomiast GLP-1 niższe, ale różnice te nie osiągnęły znamienności statystycznej.

W omawianej pracy zaobserwowano korelacje między **stężeniem inkretyn na czczo, a niektórymi wskaźnikami/parametrami otyłości**. Zgodnie z doniesieniami, że stężenie **GIP w surowicy wzrasta wraz z otyłością** (180, 181), w badaniu wszyscy uczestnicy oraz osoby z MS o wyższych wartościach BMI, cechowali się wyższymi stężeniami podstawowego wydzielania GIP. Podobną zależność między wskaźnikiem WHR, a GIP na czczo stwierdzono u mężczyzn, zarówno z grupy MS jak i z grupy C. Natomiast zupełnie przeciwnie przedstawiały się zależności między GLP-1 na czczo, a wspomnianymi wskaźnikami. Im wszyscy uczestnicy badania i osoby w grupie C byli szczuplejsi (niższe BMI, ilościowa zawartość tkanki tłuszczowej), tym cechowali się wyższymi wartościami GLP-1 na czczo. Podobnie u kobiet z MS ujemna korelacja zachodziła między BMI i procentową zawartością tkanki tłuszczowej, a stężeniem GLP-1 na czczo. Wymienione wyżej wyniki są zbieżne z wynikami prac innych autorów. U osób otyłych i z DMt2 obserwuje się niższe wartości GLP-1 w porównaniu do osób zdrowych (177, 182).

Zaskakujące w prezentowanej pracy są jedynie wyniki obserwowane w grupie mężczyzn z MS, gdzie zawartość ilościowa i procentowa tkanki tłuszczowej wpływała dodatnio na podstawowe wydzielanie GLP-1. Może to mieć związek z wpływem hormonów (testosteronu, czy innego prekursora hormonów sterydowych – aktywatorów czynników transkrypcyjnych lub ich białkowych nośników), generowanych w tkance tłuszczowej (76, 103). Ponadto ostatnio udowodniono, że tkanka tłuszczowa uwalnia DPP-4 rozkładającą inkretyny (101). Nie badano wpływu płci na poziom tego enzymu we krwi, co mogłoby być istotnym dla wyjaśnienia obserwowanego zjawiska.

Stężenie inkretyn na czczo, a ciśnienie tętnicze. Do tej pory większość doniesień opisujących zależność między stężeniem inkretyn, a wartościami ciśnienia tętniczego dotyczy badań na zwierzętach. W doświadczeniach na szczurach udowodniono, że dożylna podaż analogu GLP-1 aktywującego receptor GLP-1R powoduje wzrost skurczowych, rozkurczowych oraz średnich wartości ciśnienia tętniczego oraz wzrost częstości akcji serca (76, 183). Oddzielne centralne oraz obwodowe podanie antagonisty GLP-1R spowodowało cofnięcie wymienionego efektu, co sugeruje, że agoniści GLP-1R wywierają swój wpływ na układ sercowo-naczyniowy poprzez mechanizmy centralne i obwodowe (183).

W przeciwieństwie do gryzoni, w badaniach na ludziach agonści GLP-1R nie wpływali istotnie na omawiane parametry w ludzkim organizmie (184). Chociaż w pojedynczym badaniu na pacjentach z DMt2 obserwowano poprawę funkcji endotelium naczyniowego w trakcie infuzji dożylniej GLP-1 (185). W omawianej pracy stężenia inkretyn nie miały znacznego wpływu na wartości ciśnienia tętniczego. Tylko w grupie kontrolnej im wyższe odnotowywano wartości GIP na czczo, tym stwierdzano wyższe wartości ciśnienia rozkurczowego. Natomiast odwrotną zależność stwierdzono u wszystkich uczestników badania w przypadku GLP-1 - im wyższe wartości GLP-1 na czczo, tym niższe wartości ciśnienia rozkurczowego. Istnieją doniesienia na temat ochronnego wpływu GLP-1 na układ sercowo-naczyniowy (185). Ocena wpływu inkretyn na funkcję ściany naczyń wymagają jednak dalszych badań. Ostatnio pojawiła się publikacja grupy badaczy z Uniwersytetu w Lund wykazująca niekorzystny wpływ GIP na przebudowę ścian naczyń (186).

Inkretyny na czczo, a wskaźniki gospodarki węglowodanowej. W podstawowym wydzielaniu GIP i glukozy stwierdzono istotną wzajemną zależność w całej grupie badanej, oraz w podgrupie mężczyzn z MS i C potwierdzającą dodatnią korelację stężenia glukozy z uwalnianiem GIP (63, 66, 76, 87). Stężenie GIP na czczo było również wyższe u kobiet z grupy MS im wyższe odnotowywano wartości insuliny na czczo. Natomiast przy analizie wyników w całej grupie badanej, wyższe wartości GLP-1 na czczo były uzależnione od niższych stężeń glukozy na czczo, podobnie w grupie MS i u mężczyzn z grupy MS i C. Wyniki te są zgodne z danymi prezentowanymi w opracowaniach dotyczących stężenia inkretyn po doustnej podaży węglowodanów (63, 66, 76, 87). GIP i GLP-1 poprzez swój dodatni wpływ na syntezę i uwalnianie z komórek beta insuliny powodują zwiększone jej stężenie z następowym obniżeniem glikemii. Jest to efekt poposiłkowy (63, 66, 76, 87). Natomiast podobne zależności między poziomami inkretyn, a poszczególnymi parametrami gospodarki węglowodanowej na czczo, mogą sugerować udział tych parametrów w uwalnianiu inkretyn i *vice versa* w warunkach podstawowych. Być może te wzajemne zależności mają wpływ na utrzymanie równowagi w podstawowym metabolizmie węglowodanów.

Odnośnie **zależności między podstawowym wydzielaniem inkretyn, a stężeniem lipidów na czczo** stwierdzono ujemne korelacje między GIP i FFA u kobiet z grupy MS oraz między GLP-1 i FFA dla całej grupy badanej i między GLP-1 i TG w całej grupie badanej oraz grupie C.

Ujemna korelacja GIP z FFA jest zgodna z dotychczasowym piśmiennictwem (76). Anaboliczny wpływ GIP w tkance tłuszczowej ujawnia się m.in. pobudzeniem przez tę inkretynę syntezy TG oraz reestryfikacji FFA, czyli poprawą zależnego od stymulacji przez insulinę wbudowywania FFA do TG (hamowanie hormono-zależnej lipazy tkanki tłuszczowej). Poza tym GIP redukuje zależną od glukagonu lipolizę (76). Działanie to może przeciwstawiać się w okresie spoczynku nocnego działaniu hormonu wzrostu, uwalniającego właśnie FFA z tkanki tłuszczowej w nocy - czyli w okresie między posiłkami.

Natomiast niższe wartości GLP-1 przy wyższym stężeniu FFA na czczo zarówno w całej grupie, grupie MS jak i C sugeruje **mniejszą stymulację przez FFA uwalniania GLP-1 w okresie między posiłkami**, oraz **na brak obronnego oddziaływania GLP-1 w warunkach podstawowych przy wyższych wartościach FFA czy TG**. Fakt, że obserwowano takie zależności również w grupie kontrolnej przemawia za istotnym znaczeniem tego mechanizmu w ich wzajemnym oddziaływaniu. Osłabienie udziału tej inkretyny w podstawowej protekcji w warunkach podwyższonych wartości FFA czy hipertriglicerydemii, na czczo może być pierwszym markerem rozprzężenia mechanizmu ochronnego komórek beta trzustki, zwłaszcza w warunkach hiperlipidemii

7.1.3 Uwalnianie inkretyn w testach czynnościowych (DTTG vs DTTL)

W omawianym badaniu krzywe uwalniania GIP i GLP-1 w obrębie poszczególnych testów były porównywalne we wszystkich badanych podgrupach pacjentów. Natomiast stwierdzono znamienne różnicę w zależnym od testu wydzielaniu inkretyn (AUC inkretyn) w obrębie tych samych grup – zarówno C jak i MS ($p < 0,001$). Te same osoby po spożyciu bogato lipidowego posiłku (DTTL) cechowały się znamienne wyższym AUC – GIP niż po posiłku bogatowęglowodanowym (DTTG). Natomiast AUC - GLP-1 było statystycznie wyższe po DTTG, w porównaniu z DTTL u osób w obrębie badanych podgrup. Może świadczyć to o tym, że **większy wpływ na poposiłkowe wydzielanie GLP-1 mają węglowodany przyjęte doustnie, natomiast głównym aktywatorem wydzielania GIP są lipidy**. Do podobnych wniosków doszli również inni autorzy, którzy uważają, że fizjologicznym aktywatorem wydzielania GLP-1 jest posiłek bogaty w węglowodany oraz lipidy (76, 187), natomiast głównym stymulatorem wydzielania GIP u ludzi są lipidy, a u gryzoni i u świń węglowodany (76, 188). Ciekawym odkryciem jest również to, że różnego typu lipidy o różnej zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych mają różny wpływ na

uwalnianie GIP. Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe bardzo mocno stymulują wydzielanie GIP, a kwasy tłuszczowe o łańcuchach o pośredniej długości nie mają tutaj żadnego wpływu. Ponadto jednonienasycone kwasy tłuszczowe wydają się mieć większy wpływ na wydzielanie GIP, niż nasycone kwasy tłuszczowe (189). **Może to wskazywać na związek uwalniania GIP z ilością i rodzajem FFA w diecie.** Wykazano dodatnią korelację uwalniania GIP z BMI, a wiadomo, że w bogatej w TG tkance tłuszczowej magazynowane są właśnie długołańcuchowe, mononienasycone kwasy tłuszczowe.

Badania ostatnich lat dotyczą głównie efektu jaki wywierają węglowodany przyjęte w posiłku na komórki K i L jelita cienkiego. Związane jest to zapewne z rolą inkretyn w utrzymaniu homeostazy gospodarki węglowodanowej w organizmie. Niewiele jest zaś prac dotyczących wpływu na oś inkretynową diety bogatolipidowej, która stanowi główny czynnik ryzyka rozwoju otyłości, cukrzycy typu 2 i w konsekwencji powikłań sercowo-naczyniowych w populacji całego świata. Rijkeljkhuizen wraz z zespołem porównał wpływ rodzaju i wielkości spożywanego posiłku na poposiłkowy poziom glukozy, insuliny i inkretyn u osób zdrowych i z DMt2 (189). W badaniu brało udział 18 pacjentów z DMt2 oraz 6 zdrowych ochotników, którzy byli poddawani trzem 4-godzinnym różnym testom tolerancji. W pierwszym teście uczestnicy spożywali niewielki posiłek bogaty w węglowodany, w drugim duży posiłek bogaty w węglowodany, a w trzecim teście przyjmowali posiłek bogaty w tłuszcze. Duży posiłek węglowodanowy i posiłek bogaty w lipidy spowodowały nieznacznie wyższy wyrzut insuliny i prowadziły do nieco krótszego okresu hipoglikemii w porównaniu do niewielkiego posiłku węglowodanowego (190, 191). W prezentowanym badaniu zależności te były obserwowane jedynie w grupie osób zdrowych. W obu grupach po posiłkach węglowodanowych stwierdzono wyższy wyrzut GLP-1 w porównaniu do jego wyrzutu po posiłku tłuszczowym. Natomiast w porównaniu z innymi rodzajami posiłków, ten bogatolipidowy powodował wyrzut GIP i utrzymywanie jego wyższych wartości jeszcze po 2 godzinie testu. To badanie, wsparte jest innymi doniesieniami (192, 193), sugeruje że glukoza powoduje dwufazowy wyrzut GIP, z punktami maksymalnego stężenia GIP w około 5 i 45 minucie po przyjęciu posiłku z pozytywną korelacją między stężeniem we krwi wchłoniętej z przewodu pokarmowego glukozy, a wzrostem stężenia GIP we krwi. Spożycie **tłuszczy powoduje wyższą i dłużej trwającą odpowiedź GIP w porównaniu do węglowodanów** (nasze obserwacje, 189). Podobnie w opisywanej pracy poziom GIP po posiłku węglowodanowym osiągał swoje maksimum w 30 minucie (porównywalnie do 45 minuty w badaniu Rijkeljkhuizen). W opisywanej pracy nie mierzono poziomu inkretyn w 5 minucie testu, koncentrując się na samym wpływie rodzaju pokarmu oddziałującego na komórki

uwalniające te hormony, a nie na pierwszej fazie wydzielania inkretyn związanej z układem nerwowo-humoralnym.

Po **pokarmie tłuszczowym maksymalny punkt wyrzutu GIP odnotowano w obecnym badaniu w 2 godzinie DTTL i był on ok. 2x wyższy niż w DTTG. Dodatkowo w DTTL poziom GIP we krwi wracał do wyjściowego stężenia w 8 godzinie po posiłku, a nie po 3 jak w DTTG.** Podobne zależności w długości okresu podwyższonego stężenia w surowicy po posiłku obserwowano między testami dla GLP-1, jednak maksymalne stężenie tej inkretyny w 30 minucie DTTG i 2 godzinie DTTL było niemalże równe.

W poszczególnych grupach punkty czasowe maksymalnego wydzielania inkretyn w czasie testu były jak już wspomniano takie same, tzn. najwyższe stężenie GLP-1 osiągał w 30 minucie DTTG i 2 godzinie DTTL zarówno w grupie MS jak i C. Tak samo w obu grupach GIP osiągał najwyższe wartości między 30 a 120 minutą DTTG (*plateau*), a w DTTL w 2 godzinie trwania testu. Takie same zależności obserwowano po podziale uczestników względem płci dla GIP w obu testach i dla GLP-1 w DTTL. Badania te wymagają jednak dalszych obserwacji na większej grupie uczestników.

Inkretyny w DTTG, a gospodarka węglowodanowa - wpływ płci. W badaniu stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem GIP a glukozą oraz GIP a insuliną w 30 i 180 minucie DTTG w całej grupie badanej i grupie MS. Zależności te potwierdziły się u kobiet z MS w 30 minucie dla glukozy i 180 minucie dla insuliny, a u mężczyzn z MS w 180 minucie dla glukozy i mężczyzn z MS i C w 30 minucie testu dla insuliny. Dodatnie korelacje między GIP a poszczególnymi wskaźnikami gospodarki węglowodanowej są zgodne z dotychczasową wiedzą (76, 78, 82, 83, 84, 188). Punkty czasowe, w których osiągnęły one znamienność statystyczną w wymienionych grupach są okresem maksymalnego wyrzutu GIP (30 minuta DTTG) i okresem normalizacji jego stężenia (180 minuta DTTG) – punkty ramowe *plateau* GIP.

Odnosnie GLP-1 w naszym badaniu stwierdzono ujemną korelację stężenia tej inkretyny ze stężeniem glukozy w 30 minucie u mężczyzn z MS i w 180 minucie DTTG u kobiet z grupy C co nie jest w zgodzie z niektórymi doniesieniami (57, 58, 63, 76). Może to wynikać z indywidualnych różnic w odpowiedzi na podany bodziec stymulujący u osób zakwalifikowanych do badania, zwłaszcza u osób z MS. W przyszłości być może należałoby uwzględnić te różnice w badaniach nad poszukiwaniem potencjalnych markerów początków niewydolności komórek beta trzustki.

Inkretyny w DTTG, a gospodarka lipidowa – wpływ płci. W badaniu stwierdzono jedynie **dodatnią korelację między stężeniem GIP a TG w 4 godzinie DTTL u kobiet z MS.** Tu wydaje się być istotna wspomniana wyżej funkcją GIP odnośnie wychwyty FFA do tkanki tłuszczowej. Inkretyna ta poprzez swą anaboliczne oddziaływanie aktywuje lipazę lipoproteinową, która hydrolizuje powstałe po przyjęciu posiłku TG z chylomikronów oraz VLDL i wzmacnia wychwyt FFA przez adipocyty (76, 188). Asmar z zespołem w swoich pracach dotyczących oceny efektu metabolicznego GIP w tkance tłuszczowej opisuje, że GIP wraz ze współistnieniem hiperinsulinemii i hiperglikemii powoduje zwiększony przepływ krwi przez tkankę tłuszczową, zwiększony wychwyt glukozy, hydrolizę TG i reestryfikację FFA, co powoduje zwiększone odkładanie TG w brzusznej i podskórnej tkance tłuszczowej (194, 195). W warunkach prawidłowych stężeń insuliny i glukozy, GIP nie wpływał znacząco na metabolizm tkanki tłuszczowej, ani na przepływ krwi w jej obrębie. Podobne wyniki uzyskano w badaniu, w którym zdrowym ochotnikom podawano dożylnie glukozę, albo emulsję tłuszczową stosowaną do żywienia pozajelitowego (Intralipid), lub oba roztwory łącznie. Sam GIP nie miał wpływu na poposiłkowe stężenia TG i FFA w surowicy, natomiast w warunkach hiperglikemii i hiperinsulinemii GIP wspomagał usuwanie poposiłkowych cząstek TG i FFA z krążenia. W warunkach zaburzeń metabolicznych – hiperglikemia i hiperinsulinemia (grupa MS w prezentowanym badaniu) opisana wyżej funkcja **GIP może pomagać w normalizacji panujących po spożyciu pokarmu warunków hipertriglicerydemii i hiperlipemii.**

Stężenie GLP-1 w opisywanym badaniu korelował ujemnie z FFA w grupie C w 8 godzinie DTTL oraz w grupie kobiet z C w 6 i 8 godzinie testu. Natomiast w grupie MS i u kobiet z MS stężenie TG korelowało dodatnio ze stężeniem GLP-1 w 4 i 6 godzinie DTTL. **Ujemne korelacje między GLP-1, a FFA w grupach kontrolnych,** mogą świadczyć o **wpływie ochronnym GLP-1 przed „stresem metabolicznym” w warunkach zdrowia.** **Dodatnia korelacja GLP-1 i TG w grupie MS może sugerować niewydolność tego mechanizmu,** gdy już doszło do zaburzeń metabolicznych związanych z MS, a zwłaszcza w otyłości. To, że w przypadku zależności obu inkretyn od poposiłkowych poziomów lipidów pojawia się grupa kobiet, może świadczyć o większym narażeniu tej płci na powikłania zaburzeń lipidowych spowodowanych niewydolnością mechanizmów ochronnych działania inkretyn w porównaniu z mężczyznami.

W obliczeniach porównujących zależność wyrzutu (AUC) oddzielnie dla GIP i GLP-1 z AUC glukozy w czasie DTTG oraz podobnej zależności dla FFA w czasie DTTL we wszystkich badanych podgrupach, nie uzyskano istotności statystycznej dla wyników GLP-1. W porównaniu z badaniami pochodzącymi z innych ośrodków odnośnie ujemnego wpływu otyłości, DMt2 na uwalnianie GLP-1 i jego wpływ insulinotropowy (76, 102, 103, 133, 176, 182, 188), brak uzyskania znamienności statystycznej w prezentowanym badaniu związany jest najpewniej z niską liczebnością grupy. Natomiast w badaniu **uzyskano znamiennej zależność dla wartości AUC-GIP a AUC-FFA w DTTL** między **grupami MS i C** ($p = 0,035$). Może to przemawiać za istnieniem różnej zależności uwalniania **GIP od FFA** w zależności od rozwoju MS. Spłaszczenie krzywej wykresu regresji dla MS przemawia za osłabieniem tej zależności u osób z MS.

W wykonanej analizie regresji dla inkretyn w zależności od stężeń glukozy i FFA w poszczególnych grupach, dla każdego punktu **funkcjonalnych testów (DTTG i DTTL)** oddzielnie, stwierdzono znamiennej zależność **GIP od stężenia glukozy w DTTG** w punkcie 0', 30' i 180' testu w **całej grupie badanej i grupie MS**, oraz w 0 i 180 minucie testu u **mężczyzn z grupy MS**. Odpowiednio istotną statystycznie zależność **GLP-1 od stężenia glukozy w DTTG** stwierdzono w **całej grupie badanej** w 0 i 180 minucie, w grupie **MS** w 90', a u **mężczyzn z MS** w 30 minucie testu.

W badaniu nie stwierdzono istotnych regresji poziomu GIP od stężenia FFA w poszczególnych punktach czasowych DTTL. Znamienność zaś osiągnęła zależność **stężenia GLP-1 od stężenia FFA w DTTL** w **grupie C** jedynie w punkcie 8h, a w grupie **mężczyzn z C** w punkcie 6h.

Może to świadczyć o **znaczeniu wykonywania testów funkcyjnych, a nie pojedynczego badania na czczo w diagnostyce ryzyka rozwoju niewydolności komórek beta** trzustki w związku z niedoborem funkcji inkretyn.

Ponadto wyniki mogą sugerować **inną zależność regulacji uwalniania inkretyn w okresie na czczo i w ważnym okresie poposiłkowym**. Nasze wyniki sugerują, że na czczo uwalnianie GIP jest regulowane głównie przez stężenia FFA (uwalniane w nocy przez działanie GH). GIP również reguluje wychwyt FFA do tkanki tłuszczowej (dodatnia korelacja GIP z BMI). Stężenie GLP-1 jest niskie na czczo, a nawet spada gdy wartości FFA są wyższe.

Natomiast w okresie poposiłkowego zapotrzebowania na insulinę i ochronnego działania na komórki beta trzustki, obie inkretyny są uwalniane przez glukozę i lipidy, z tym, że długość wydzielania inkretyn po DTTL trwa dłużej, a skrócenie czasu wydzielania

inkretyn może rzutować na utratę osłony, co jest niebezpieczne u pacjentów z wyższym poziomem FFA i glukozy (stres metaboliczny).

7.2 Adipokiny – *hormony tkanki tłuszczowej, a wydzielanie inkretyn*

Jednymi z markerów zaburzeń gospodarki metabolicznej organizmu są białka produkowane przez białą tkankę tłuszczową np. badane w tej pracy leptyna, adiponektyna oraz wisfatyna. Leptyna m.in. reguluje bilans energetyczny organizmu poprzez hamowanie aktywności ośrodką łaknienia w podwzgórzu, hamuje syntezę lipidów w wątrobie, zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę. Hamując wydzielanie insuliny, leptyna nasila proces lipolizy tkanki tłuszczowej powodując wzrost uwalniania substratów w procesach energetycznych (wyrzut wolnych kwasów tłuszczowych) (38, 39). U osób otyłych stwierdza się wysokie wartości leptyny, korelujące z zawartością tkanki tłuszczowej oraz zjawisko leptynooporności (31,37).

Adiponektyna wpływa na szereg procesów metabolicznych, szczególnie przemianę glukozy i kwasów tłuszczowych w wątrobie i mięśniach, pośrednio wpływając na wrażliwość na insulinę. Wykazuje w związku z tym działanie przeciwwzapalne, przeciwmiażdżycowe i zwiększające insulinowrażliwość (40). W przeciwieństwie do większości adipokin, stężenie adiponektyny u osób otyłych jest obniżone, co prowadzi do nasilenia insulinooporności. Obniżony poziom adiponektyny we krwi jest uważany za niezależny czynnik ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2 (40, 44, 48).

Trzecie z badanych białek, wisfatyna ma działanie insulinomimetyczne i hipoglikemizujące. Pobudza różnicowanie się preadipocytów do dojrzałych komórek tłuszczowych a przez to adipogenezę. Wisfatyna indukuje ekspresję genów indukowanych PPAR- γ : kompleks enzymatyczny syntazy kwasów tłuszczowych, adiponektyny i acylotransferazy diacyloglicerolu (52). Ponadto zwiększa akumulację TG i przyspiesza syntezę glukozy (51). W stanach przewlekłego zapalenia stwierdzono istotnie wyższe stężenie wisfatyny w surowicy krwi, oraz wyższą ekspresję jej mRNA (53). W niektórych badaniach przeprowadzonych u ludzi opisano pozytywną korelację stężenia wisfatyny z ekspresją jej mRNA w adipocytach tkanki trzewnej, z wartością BMI oraz procentową zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie (53). Znacząco wyższe stężenia wisfatyny stwierdza się w surowicy osób z zespołem metabolicznym i chorych leczonych z powodu cukrzycy typu 2.

Oznaczenia stężeń leptyny, adiponektyny i wisfatyny posłużyły jako markery uzupełniające ocenę stanu insulinowrażliwości uczestników badania (196, 197). Zgodnie z danymi z innych prac stężenie adipokiny w badanej grupie MS było znamienne niższe. Stężenie leptyny było wyższe w grupie MS, ale istotność statystyczną stwierdzono jedynie u kobiet, głównie w podgrupie kobiet z MS. Stężenia wisfatyny w obu grupach były porównywalne. Dodatkowo w niniejszej pracy potwierdzono, że wartości leptyny były istotnie wyższe w grupie kobiet. Leptyna pozytywnie korelowała z BMI w całej grupie badanej, w grupie MS oraz u kobiet i mężczyzn z grupy MS. Adiponektyna negatywnie korelowała z BMI w całej grupie badanej. Na podstawie piśmiennictwa wiadomo, że leptyna pozytywnie koreluje z BMI (198, 199), insuliną na czczo (200) oraz stopniem insulinooporności (201). Adiponektyna zaś pozytywnie korelowała z wartościami HDL-cholesterolu oraz negatywnie ze stężeniem TG (202) i BMI (42, 44). Wyniki wyżej cytowanych autorów są zbieżne z przedstawionymi w niniejszej pracy.

W badaniu nie stwierdzono znamiennej korelacji między stężeniem GIP i GLP-1 w punkcie wyjściowym obu testów, a stężeniem leptyny, adiponektyny, czy wisfatyny. Wyniki te nie są zgodne z innymi doniesieniami naukowymi. U gryzoni wykryto ekspresję receptorów dla leptyny na jelitowych komórkach L. Leptyna stymuluje wydzielanie GLP-1 z szczurzych, mysich i ludzkich komórek L w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* u szczurów i u pozbawionych leptyny przez wyciszenie genu myszy ob/ob. U gryzoni wykazano, że otyłość indukowana wysokolipidową dietą jest związana z opornością na leptynę i zmniejszeniem podstawowej i poposiłkowej (stymulowanej doustną glukozą) sekrecji GLP-1 (99).

W przedstawianym badaniu stwierdzono natomiast **dodatnią korelację między stężeniem wisfatyny, a wyrzutem GIP (AUC-GIP) w czasie trwania DTTG w całej grupie badanej oraz w trakcie DTTL w całej grupie badanej, grupie z MS i u mężczyzn z MS.** W naszej badanej grupie korelacja z AUC-GLP1 nie uzyskała znamienności statystycznej. Współdziałania adipokin i inkretyn wymagają dalszych badań.

7.3 Polimorfizmy badanych genów, a wydzielanie inkretyn

Udowodnionym jest związek odpowiedzi każdego organizmu (w tym i rozwój patologii), czyli fenotypu na zależną od indywidualnego osobniczego genotypu reakcję na zmiany środowiska (137, 163). Także większość zmian w naszym metabolizmie ma związek ze strukturą naszego genomu oraz jego funkcją (ekspresja genów-synteza białek zależna od

indywidualnego genotypu i zmian epigenetycznych). Właśnie najlepszym przykładem oddziaływania genomu ze środowiskiem jest otyłość, zespół metaboliczny i cukrzyca typu 2.

Same kwasy tłuszczowe jak i rozpuszczalne w nich witaminy (np. witamina A, źródło kwasu retinowego, czy witamina E – część układu antyoksydacyjnego), glikemia (omawiane we wstępie epigenetyczne podstawy „pamięci metabolicznej”), regulują ekspresję genów związanych z metabolizmem (43, 140, 154). Wolne kwasy tłuszczowe i ich metabolity są także aktywatorami receptorów jądrowych (czynniki transkrypcyjne) PPAR-ów, regulujących ekspresję genów związanych z metabolizmem lipidów, różnicowaniem się (akumulacją) tkanki tłuszczowej, wychwytem FFA i glukozy z krążenia, wrażliwością na insulinę, syntezą glikogenu (glukoneogenezą), ale i regulacją odpowiedzi immunologiczno-zapalnej (154, 160, 162, 165).

Znaczenie polimorfizmu wytypowanych przez badania GWA genów omówiono uprzednio. W niniejszej pracy, ze względu na bardzo małą liczebność genotypowych grup TT w *TCF7L2* oraz GG w *PPARγ* oraz w oparciu o piśmiennictwo (203) i rozkład alleli w badanych grupach MS i C, do analizy statystycznej wyniki wspomnianych genotypów zostały włączone do odpowiednich grup heterozygotycznych TC i GC SNPów badanych genów.

W opisywanym badaniu **u pacjentów z zespołem metabolicznym istotnie częściej występował allel C polimorfizmu rs7903146 genu *TCF7L2* oraz allel C dla genu *PPARγ* (rs1805192). W grupie kontrolnej istotnie statystycznie dominował allel T dla genu *TCL7F2* oraz G dla genu *PPARγ2*.** Dla *TCF7L2* są to wyniki różniące się od tych podawanych w piśmiennictwie. Autorzy wielu prac udowodnili, że to allel T w polimorfizmie rs7903146 genu *TCF7L2* odpowiada za zmniejszoną sekrecję insuliny (204, 205) czy zaburzenia w insulinotropicznej funkcji inkretyn (203, 206). Jest to zapewne związane z tym, że w niniejszej pracy rozkłady częstości genotypów genów *TCL7F2* oraz *PPARγ2* w całej grupie badanej nie były zgodne z prawem Hardy-Weinberga. Dobrana grupa nie była zrównoważona pod względem genotypów, dlatego wyniki dalszych analiz zostały odniesione jedynie do charakterystyki badanej grupy, nie zaś całej populacji Małopolski. W przypadku genu *PPARγ* wyniki badania były zgodne z piśmiennictwem. To allel proliny (allel C) jest tym związanym z wyższym ryzykiem wystąpienia cukrzycy (207).

7.3.1 Polimorfizm genu *TCF7L2* rs7903146 C/T

Polimorfizm *TCF7L2* jest związany z większym ryzykiem rozwoju DMt2 poprzez wpływ na zaburzenia w sekrecji insuliny, poprzez m.in. redukcję syntezy GLP-1. Ostatnie doniesienia sugerują również, że ten polimorfizm zwiększa ryzyko DMt2 również poprzez modyfikowanie funkcji inkretyn (188, 203).

Villareal wraz z zespołem porównywał osoby z genotypem *TCF7L2* związanym z wyższym ryzykiem rozwoju cukrzycy (TT oraz TC polimorfizmu rs7903146) z nosicielami dzikiego genotypu CC. Uczestnicy poddawani byli 5-godzinemu DTTG oraz w inny dzień mieli podawany dożylny wlew glukozy (203). Villareal stwierdził, że odpowiedź komórek β po DTTG była o 50% niższa u ludzi z genotypami niosącymi ryzyko DMt2 - TT lub TC. Również efekt inkretynowy u tych osób był zredukowany o ok. 30%. Po dożylniej podaży glukozy nie obserwowano takich zależności. Autorzy badania wyciągnęli wniosek, że *TCF7L2* zwiększa ryzyko DMt2 przynajmniej częściowo poprzez modyfikowanie wpływu inkretyn na wydzielanie insuliny, niezależnie od efektu jaki wywiera na syntezę GLP-1 i GIP (203).

W prezentowanej pracy u wszystkich osób z genotypem TT genu *TCF7L2* w **DTTG** stwierdzono **niższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA-IR**, co wiązało się z istotnie niższymi u tych osób stężeniami insuliny na czczo i w 180 minucie testu. Podobnie jak we wspomnianym wyżej badaniu Villareala, w czasie całego DTTG stężenia insuliny były wyższe (brak znamienności statystycznej) w grupie CC, mimo że odpowiedź GLP-1 na DTTG była porównywalna w obu grupach genotypowych – **niezależny od stężenia GLP-1 obniżony efekt inkretynowy u nosicieli związanego z ryzykiem rozwoju DMt2 genotypu TT lub TC polimorfizmu *TCF7L2***. Niższe stężenia FFA od punktu wyjściowego do 90 minuty trwania testu w grupie genotypowej TT+TC należałoby zaś wiązać z **wyższymi stężeniami GIP** w czasie całego testu, ze znamiennością w 60 minucie DTTG w porównaniu do grupy osób z genotypem CC. Istniejąca możliwość preferencji dietetycznej badanych osób - zmiany diety, a regulujące ekspresję genów zmiany epigenetyczne (metylacja, acetylacja materiału genetycznego jąder - DNA jak i histonów, czy czynników transkrypcyjnych (140) utrudnia interpretację obserwowanych wyników.

Podobnie w **DTTL** u osób z genotypem TT stwierdzono niższe stężenie insuliny (znamienne różnice tylko na czczo) oraz **wyższe wartości GIP**, istotne w 2 i 4 godzinie trwania testu. Wyniki te są zgodne z wynikami badania przeprowadzonego przez Musso z zespołem. Porównywał on efekt wpływu polimorfizmu *TCF7L2* rs7903146 C/T na

poposiłkową odpowiedź GIP w DTTL (208). Do grupy badanej wybrano osoby z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby, które nie były otyłe, ani nie chore na DMt2. Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy. W czasie badania zostały przeprowadzone DTTG oraz DTTL. Genotyp wyższego ryzyka TT i TC był związany z przedłużonym, wyższym stężeniem GIP po przyjęciu bogato-lipidowego posiłku, przy zmniejszonym efekcie inkretynowym po DTTG – podobnie jak w badaniach Villereal.

Po uwzględnieniu podziału na **grupy MS i C**, u osób z **zespołem metabolicznym z genotypem TT+TC** genu *TCF7L2* w DTTG stężenie GLP-1 było niższe w porównaniu do kontrolnego genotypu CC. Takich zależności nie stwierdzono ani w grupie wszystkich uczestników, ani w grupie C. Co prawda wspomniane różnice nie osiągnęły istotności statystycznej, ale ponieważ dane te są zgodne z literaturą (177, 182), można podejrzewać, a wręcz sugerować już rozpoczynającą się niewydolność syntezy GLP-1 w zespole metabolicznym, która w przyszłości rozwinie się w pełną patologię – niższe wartości GLP-1 u chorych z DMt2 (177, 182). Przy obecności genotypu TT lub TC w zespole metabolicznym stwierdzono również **wyższe stężenia GIP** z istotnością statystyczną w 30 i 60 minucie DTTG. Podobnie stężenie GIP u tych osób było wyższe głównie w 4, 6 oraz w 8 godzinie DTTL niż u osób z genotypami CC. U osób zdrowych (grupa C) stwierdzono jedynie niższe wartości GIP na czczo u ochotników z genotypem TT lub TC.

Wyższe stężenia GIP związane z genotypami *TCF7L2* odpowiedzialnymi za wyższe ryzyko DMt2 (TT+TC) mogą być wynikiem aktywacji ścieżki sygnałowej WNT (188). U nosicieli polimorfizmu *TCF7L2*, *Wnt3*, podobnie jak podawanie litu (inhibitor kinazy syntazy glikogenu 3 β – GSK 3 β) poprawia sekrecję GIP poprzez zwiększenie liczby kompleksów β -kateniny/*TCF4* do proksymalnej części promotorowego regionu GIP (209). Pod nieobecność ligandów Wnt GSK-3 β fosforyluje β -kateniny, doprowadzając w rezultacie do ich szybkiej degradacji. Natomiast, zgodnie z opisanym we wstępie szlakiem ścieżki WNT, związanie ligandu Wnt z receptorem błonowym Frizzled i koreceptorem LRP5/6, następuje aktywacja białek Dvl, co prowadzi do hamowania GSK-3 β i stabilizacji β -kateniny, która łatwo przedostaje się do jądra komórkowego, gdzie po połączeniu z *TCF4* aktywują miejsce promotorowe do transkrypcji GIP (210).

Porównując w omawianej pracy **nosicieli tych samych genotypów badanych genów między grupami MS i C** stwierdzono u osób z **genotypem CC** genu *TCF7L2* w DTTG w grupie MS wyższe wartości wskaźników charakteryzujących właśnie zespół metaboliczny – tzn. wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA, stężenia glukozy w 0', 60', 90',

120', stężenia insuliny w 0', 60', 90', 120' i 180' oraz stężenia FFA w 0', 30', 60', 90' i 120' testu. Również w DTTL u tych osób stwierdzono wyższe wartości glukozy w 0h, 2h, 6h, insuliny w trakcie całego testu – od 0h do 8h testu. Nie stwierdzono znamienych różnic w stężeniach inkretyn w obu testach funkcjonalnych (DTTG oraz DTTL) pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypem CC genu *TCF7L2*.

W grupie nosicieli genotypów **TT+TC** genu *TCF7L2* w DTTG u osób z MS również dominowały markery zespołu metabolicznego. Stwierdzono w tej grupie wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA, stężenia glukozy w 60', 90', 120', insuliny w 0', 60', 90', 120' i 180', stężenia FFA w 0', 30', 60' i 120' testu. W omawianej grupie genotypowej stężenie **GIP było wyższe u osób z MS**, znamienne w 0', 30' i 180' testu, natomiast stężenie **GLP-1 niższe**, znamienne w 180'. Powyższe dane są zgodne z literaturą światową (76, 175, 177, 188).

Podobnie w **DTTL** u osób z genotypami **TT** lub **TC** genu *TCF7L2* w **grupie MS** stwierdzono wyższe wartości glukozy (2h, 6h, 8h), insuliny w trakcie całego testu (od 0h do 8h) oraz stężeń FFA, znamienne w 4h testu.

Nie stwierdzono znamienych różnic w stężeniach obu inkretyn w DTTL pomiędzy grupami MS i C u osób z genotypem TT lub TC genu *TCF7L2*.

Wykorzystując powyższe dane porównano **krzywe odpowiedzi obu inkretyn na doustną podaż węglowodanów (DTTG) i lipidów (DTTL) pomiędzy genotypami TT+TC vs CC genu *TCF7L2* z uwzględnieniem grup MS i C**. Najwyższe stężenie GIP w DTTG w grupie genotypowej TT+TC osiągnęło 300 pg/ml, natomiast w grupie CC jedynie 200 pg/ml. W grupie genotypowej TT+TC stężenie GIP był wyższy w grupie MS w czasie całego DTTG. W grupie CC stężenia GIP między MS i C były porównywalne. W DTTL poziomy GIP między MS a C w obu grupach genotypowych były porównywalne. Natomiast maksymalne stężenie GIP u nosicieli allelu T było wyższe względem grupy genotypowej CC zarówno u osób z MS jak i zdrowych. Wyniki te mogą świadczyć o **większym wpływie węglowodanów niż lipidów na poposilkowy wyrzut GIP u osób z zespołem metabolicznym, nosicieli allelu T genu *TCF7L2***. Jest to sytuacja odwrotna niż opisywana powyżej synteza GIP w warunkach podstawowej. Na czczo, tak jak już to omówiono powyżej, to lipidy są głównym stymulatorem dla wydzielania GIP w całej grupie badanych.

Większość prac porównujących wpływ rodzaju spożytego pokarmu na wydzielanie inkretyn dotyczy albo samych warunków fizjologicznych (76) lub porównuje osoby zdrowe do już chorych na DMt2 (188), a przede wszystkim nie jest brane pod uwagę oddziaływanie genotypu na reakcję organizmu. Być może w tzw. *prediabetes*, u nosicieli allelów T genu

TCF7L2 w okresie poposiłkowej „ostrej” hiperglikemii to właśnie węglowodany, nie lipidy stymulują do wyrzutu GIP i walki z patologicznymi warunkami glukotoksyczności. Pacjenci z MS mający genotyp TT lub TC zwiększający ryzyko cukrzycy są znacznie obciążeni ryzykiem DMt2 zależnie od rodzaju pokarmu. Być może ich dieta powinna być oparta bardziej na produktach bogatych w węglowodany, które stymulują większy wyrzut ochronnego GIP u nosicieli tego allelu.

W danych dotyczących GLP-1 w DTTG w obu grupach genotypowych odnotowywano niższe stężenia GLP-1 w grupie MS względem C. U zdrowych uczestników najwyższe stężenie GLP-1 w DTTG w obu grupach genotypowych było porównywalne i osiągnęło ok. 7 pmol/l. Natomiast stężenie to w grupie MS z genotypem CC było równe ok. 6 pmol/l, a z genotypem TT+TC jedynie ok. 5 pmol/l. Widać, że w obu grupach genotypowych w MS obserwuje się niższe poposiłkowe stężenie GLP-1, natomiast u nosicieli allelu T wyrzut tej inkretyny, w odpowiedzi na węglowodany, jest najslabszy. W DTTL w grupie genotypowej CC obserwowano wyższe wartości GLP-1 w grupie MS względem C. Natomiast w genotypie TT+TC wyższe wartości GLP-1 charakteryzowały zdrowych ochotników, co jest zgodnie z piśmiennictwem (206). Świadczy to o tym, że w grupie CC organizm z MS walczy jeszcze z warunkami lipotoksyczności poposiłkowej, natomiast u nosicieli alleli T ochronny mechanizm inkretynowy jest już niewydolny.

Opierając się na powyższych danych sugerujących **większą rolę lipidów w stymulacji GLP-1 w warunkach poposiłkowych u chorych z MS z genotypem CC**, można wysunąć teorię, że dieta tych osób powinna być oparta bardziej na lipidach, które lepiej u tych osób stymulują poposiłkowy wyrzut ochronnie działającego GLP-1.

7.3.2 Polimorfizm genu *PPAR γ* rs1801282 C/G

Ze względu na szeroki zakres funkcji PPAR γ opisany we wstępie, jego mutacje mogą prowadzić do istotnych efektów klinicznych. Najczęściej występująca, zwłaszcza w Europie, mutacja izoformy PPAR- γ 2, polimorfizm Pro12Ala został wybrany jako drugi do opisywanego badania. Efektem klinicznym tej mutacji jest zmniejszenie aktywności biologicznej receptora, co prowadzi do mniej efektywnej transkrypcji białek związanych z izoformą γ . U osób z polimorfizmem Pro12Ala wykazano w tkance tłuszczowej mniejszą aktywność lipazy lipoproteinowej oraz oksydazy acetylo-koenzymu A (211). Cole i wsp.

udowodnili związek tej mutacji z BMI, większym przyrostem masy ciała, podwyższonym stężeniem leptyny i wcześniejszym ujawnianiem się otyłości, szczególnie u kobiet (212).

W innych badaniach nie obserwowano wpływu tej mutacji na wielkość BMI, co tłumaczy się możliwością zróżnicowanej odpowiedzi adipocytów na pobudzenie receptora w zależności od rodzaju czynnika pobudzającego. Początkowo w badaniach obejmujących małe grupy osób nie wykazano związku polimorfizmu Pro12Ala z ryzykiem powstania cukrzycy (164). Jednak wyniki metaanalizy (213) obejmującej 3000 chorych na cukrzycę jednoznacznie potwierdzają rzadsze występowanie zmutowanego allelu G u osób z cukrzycą, co potwierdzałoby jego prewencyjną rolę. Ostatecznie badania GWA potwierdziły silne biologiczne powiązanie białka kodowanego min. na genie *PPAR γ* z występowaniem DMt2 (141). Allel alaniny Ala (allel G) wpływając na czynność wydzielniczą tkanki tłuszczowej, zmniejsza masę ciała, poprawia insulinowrażliwość, przez co chroni przed rozwojem cukrzycy. To allel odpowiedzialny za kodowanie proliny (allel C) jest tym związanym z wyższym ryzykiem wystąpienia DMt2 (207).

Ekspresja genu *PPAR- γ* zależy między innymi od insuliny oraz dostępności pokarmu, a zwłaszcza FFA. U zwierząt głodzenie powoduje redukcję ekspresji wyłącznie *PPAR- γ 2*, co świadczy o decydującym wpływie tej izoformy na metabolizm tkanki tłuszczowej (214). U ludzi ekspresja *PPAR- γ* jest większa u ludzi otyłych, maleje zaś przy stosowaniu diety redukcyjnej (214, 215).

W całej grupie badanej u osób z **genotypem CC genu *PPAR- γ* stwierdzono wyższe wskaźniki charakteryzujące zaburzenia metaboliczne związana z MS (glukoza, insulina, HOMA, FFA)** zarówno w DTTG jak i DTTL, co jest zgodne z piśmiennictwem (216). Różnice te **nie osiągnęły jednak istotności statystycznej**, jedynie znamienne wyższe było stężenie insuliny w 4 i 6 godzinie DTTL u osób z genotypem CC w całej grupie, w 4 godzinie DTTL u osób z MS o genotypie CC, natomiast w grupie C wyższe stężenie insuliny w 4 godzinie i FFA w 6 godzinie DTTL.

W części badań dotyczących zależności między genotypami genu *PPAR γ* , a wydzielaniem inkretyn, nie stwierdzono znamiennych różnic w obu testach funkcjonalnych (DTTG oraz DTTL) w całej grupie badanej, grupie MS i C.

Porównując w omawianej pracy **nosicieli tych samych genotypów genu *PPAR γ* między grupami MS i C** w obu grupach obserwowano jedynie istotne statystycznie różnice w zakresie wskaźników zespołu metabolicznego. U osób z genotypem CC genu *PPAR- γ* , w

DTTG w grupie MS stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA, stężenia glukozy w 0', 60', 90', 120', 180', insuliny w 0', 60', 90', 120' i 180', FFA w 0', 30', 60' i 90' oraz 120' testu. Natomiast w DTTL u osób z genotypem CC genu *PPAR γ* w grupie MS stwierdzono wyższe wartości glukozy w 0h, 6h, 8h, stężenia insuliny w trakcie całego testu – od 0h do 8h oraz wyższy poziom FFA w 4h testu.

Podobnie w grupie nosicieli genotypów GG+CG genu *PPAR γ* w DTTG u osób z MS stwierdzono wyższe wartości wskaźnika insulinooporności HOMA, stężenia glukozy w 0', 30', 60', 90', 120', insuliny w 0', 60', 90', 120' i 180', poziom FFA w 0', 30', 60', 90' i 120' testu. W DTTL zaś u osób z genotypami GG lub CG genu *PPAR γ* w grupie MS stwierdzono wyższe stężenie glukozy w 2h oraz insuliny w trakcie całego testu – 0h do 8h. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie stężenia inkretyn między grupami genotypowymi CC i GG+CG genu *PPAR γ* między osobami z MS i C.

Z uwagi na brak znamienności danych dotyczących inkretyn w części projektu dotyczącego genu *PPAR- γ* , porównując **krzywe odpowiedzi obu inkretyn na doustną podaż węglowodanów (DTTG) i lipidów (DTTL) pomiędzy genotypami CC vs GG+CG genu *PPAR- γ* z uwzględnieniem grup MS i C**, można było sugerować **jedynie tendencje** w danych zależnościach. Nie stwierdzono żadnych różnic w odpowiedzi GIP na doustne obciążenie węglowodanami, czy lipidami między grupami genotypowymi genu *PPAR- γ* z uwzględnieniem podziału na MS i C. Podobnie nie było różnic między obiema grupami genotypowymi *PPAR- γ* w zakresie poposiłkowych stężeń GLP-1 w obu grupach badanych. Natomiast tylko w grupie genotypu CC genu *PPAR- γ* stwierdzono nieistotnie statystycznie, ale niższe stężenia GLP-1 w grupie MS w DTTG względem osób zdrowych. Może to sugerować już rozpoczynający się początek niewydolności osi inkretynowej i ochronnej funkcji GLP-1 w warunkach glukotoksyczności poposiłkowej u osób z MS, homozygot CC polimorfizmu genu *PPAR- γ* zwiększającym ryzyko wystąpienia otyłości, insulinooporności i rozwoju DMt2 (212).

Z powyższych danych wynika, że w mechanizmie zwiększonego ryzyka DMt2 związanego z allelem proliny polimorfizmu Pro12Ala genu *PPAR- γ* , inkretyny nie wydają się odgrywać istotnej roli.

Piśmiennictwo dotyczące oceny zależności wydzielania inkretyn, rodzaju przyjmowanego posiłku i genotypu polimorfizmu Pro12Ala genu *PPAR- γ* nie jest aż tak bogate jak dotycząca genu *TCF7L2*. Część badaczy skupia się raczej na roli tego genu nie w samej DMt2, a w otyłości i jej powikłaniach. Dieta bogatotłuszczowa sprzyja przerostowi adipocytów i rozwojowi insulinooporności. U nosicieli allelu Ala aktywacja *PPAR- γ* pod

wpływem diety bogatotłuszczowej jest o wiele mniejsza niż u nosicieli allelu dzikiego. Stąd u tych osób stwierdza się mniejszą insulinooporność (213, 216). Poza tym udowodniono, że wzrost, również po posiłku, ekspresji PPAR- γ w wątrobie i mięśniach szkieletowych znosi toksyczne działanie lipidów (ochrona w warunkach lipotoksyczności) (217).

W niedawno zarejestrowanym patencie (luty 2011r) Lanfear D. i Higgins L. przedstawili pracę nad zastosowaniem terapii stanowiącej kombinację selektywnych modulatorów PPAR γ i inkretyn w prewencji i leczeniu stanów przedcukrzycowych, otyłości, cukrzycy i powikłań tych schorzeń (218). Autorzy przekonują w niej o większej skuteczności i mniejszej ilości powikłań tak skojarzonej terapii w stosunku do stosowania każdego leku w monoterapii. Są to nowe doniesienia w zakresie modeli terapeutycznych, które potrzebują czasu by sprawdzić ich wady i skuteczność.

Leczenie cukrzycy, jak i związanych z nią zaburzeń gospodarki lipidowej nie zmienia w istotny sposób odległych powikłań naturalnego przebiegu choroby (219). Przełomowe badania prospektywne cukrzycy typ 1 i 2 UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), prowadzone w latach 1976-1996, oraz badanie EPIC-NL-prevalent DM (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition NL- prevalent Diabetes Mellitus), wykazało, że żaden ze stosowanych wówczas schematów leczenia (wczesna, czy późniejsza normalizacja glikemii) nie poprawiał znacząco długoterminowego rokowania w przebiegu tego schorzenia (219). Uwidacznia to fakt, że tzw. „pamięć metaboliczna”- wczesne zmiany epigenetyczne wynikające z zaburzeń poziomu substratów energetycznych, rzutują na ekspresję genów i odległe powikłania/śmiertelność w cukrzycy. Istnieje wielka potrzeba lepszego poznania patomechanizmów tej choroby i wdrożenia, wynikających z danych prowadzonych badań, nowych metod prewencji jak i leczenia, które działałyby zapobiegawczo i opóźniałyby postęp choroby.

8 Wnioski końcowe

1. W całej grupie, bez uwzględnienia genotypu, na czczo jak i w trakcie obu testów, stężenia inkretyn nie różniły się między grupami MS i C.
2. W całej grupie, bez uwzględnienia genotypu, głównym stymulatorem wydzielania GLP-1 są węglowodany, natomiast FFA są głównym aktywatorem uwalniania GIP.
3. W całej grupie badanej potwierdzono związek uwalniania inkretyn z badanymi markerami insulinooporności i FFA na czczo. W okresie poposiłkowym stwierdzono różnice w tej zależności między pacjentami z grupy MS i C. Stwierdzono istotne różnice między stężeniem inkretyn na czczo, a badanymi wskaźnikami otyłości: dodatnie korelacje między GIP a BMI oraz WHR; ujemne między GLP-1 a BMI oraz ilościową zawartością tkanki tłuszczowej.
4. Zarówno glukoza jak i lipidy w okresie poposiłkowym aktywują uwalnianie inkretyn. Czas uwalniania inkretyn po doustnym przyjęciu lipidów (DTTL) jest ok. 2,5 raza dłuższy niż po glukozie (DTTG), co sugeruje zależność od bezpośredniego kontaktu substratu metabolicznego ze śluzówką (okres wchłaniania). Po pokarmie tłuszczowym maksymalny wyrzut GIP był istotnie wyższy w DTTL niż w DTTG. Świadczy to, że uwalnianie GIP przez lipidy pokarmu odgrywa ważną rolę w osłonie komórek β trzustki przed glukolipotoksycznością przy spożywaniu pokarmów wysokolipidowych.
5. Niższe wartości GLP-1 przy wyższym stężeniu FFA na czczo zarówno w całej grupie, grupie MS jak i C sugeruje mniejszą stymulację przez FFA uwalniania GLP-1 w okresie między posiłkami, oraz na brak obronnego oddziaływania GLP-1 w warunkach podstawowych przy wyższych wartościach FFA czy TG. Ujemne korelacje między poposiłkowymi stężeniami GLP-1, a FFA w grupach kontrolnych, mogą świadczyć o mniejszym wpływie ochronnym GLP-1 przed „stresem metabolicznym” w warunkach zdrowia. Dodatnia korelacja GLP-1 i TG w grupie MS może sugerować aktywację mechanizmu ochronnego, gdy już doszło do zaburzeń metabolicznych związanych z MS.
6. Kobiety są bardziej narażone na powikłania zaburzeń lipidowych spowodowanych niewydolnością mechanizmów ochronnych działania inkretyn w porównaniu z mężczyznami.

7. Potwierdzono znaną zależność alleliczną badanych polimorfizmów związanych z większym ryzykiem rozwoju DMt2 ze wskaźnikami *prediabetes* (MS) tj. głównie stężeniem insuliny i FFA.
8. Stwierdzono niezależny od stężenia GLP-1 obniżony efekt inkretynowy w DTTG u nosicieli genotypu TT lub TC polimorfizmu TCF7L2, który związany jest z ryzykiem rozwoju DMt2. Stwierdzone wyższe stężenia GIP u nosicieli allelu T.
9. Porównując krzywe odpowiedzi wyrzutu inkretyn na doustną podaż węglowodanów i lipidów pomiędzy genotypami TT+TC vs CC polimorfizmu genu *TCF7L2* z uwzględnieniem grup MS i C, stwierdzono większy wpływ węglowodanów niż lipidów na poposiłkowy wyrzut GIP u osób z zespołem metabolicznym, nosicieli allelu T genu *TCF7L2*. Być może dieta u tych osób powinna być oparta bardziej na produktach bogatych w węglowodany, które właśnie u tych osób stymulują większy wyrzut ochronnego GIP.
10. Większa stymulacja GLP-1 przez lipidy w warunkach poposiłkowych u chorych z MS z genotypem CC polimorfizmu *TCL7F2*, może sugerować, że dieta u tych osób powinna być oparta bardziej na lipidach, które lepiej stymulują poposiłkowy wyrzut ochronnie działającego GLP-1 u nosicieli tego allelu.
11. Inkretyny nie wydają się odgrywać istotnej roli w patomechanizmie rozwoju DMt2 u nosicieli allelu proliny polimorfizmu Pro12Ala genu *PPAR-γ*.
12. W omawianej pracy stężenia inkretyn nie miały znacznego wpływu na wartości ciśnienia tętniczego.
13. W badaniu nie stwierdzono znamiennej korelacji między stężeniem GIP i GLP-1 na czczo, a wartościami leptyny, adiponektyny, czy wisfatyny. Stwierdzono natomiast zależność stężenia wisfatyny od wyrzutu GIP (AUC-GIP) w czasie obu testów funkcjonalnych: DTTG i DTTL. Korelacja wisfatyny z AUC-GLP1 nie uzyskała znamienności statystycznej. Współdziałania adipokin i inkretyn wymagają dalszych badań.

WNIOSEK KOŃCOWY: Powyższe wyniki sugerują możliwość ustalenia indywidualnego postępowania dietetycznego w prewencji i leczeniu uszkodzenia komórek β i rozwoju cukrzycy u pacjentów z zespołem metabolicznym, zwłaszcza u nosicieli różnych alleli polimorfizmu genu *TCF7L2*. W doborze diety pomocnym byłoby wykonywanie testów funkcjonalnych DTTG jak i DTTL z oznaczeniem stężeń obu inkretyn.

9 Streszczenie

Wstęp: Otyłość i związany z nią zespół metaboliczny lub sama cukrzyca typu 2 są jednymi z najczęściej występujących chorób na świecie. W ostatnich latach liczba osób dotkniętych tymi schorzeniami istotnie wzrasta. W niektórych krajach rozwiniętych zjawisko to przybrało charakter epidemii. Dotyczy ono także takich obszarów świata, gdzie nigdy wcześniej nie było obserwowane i obejmuje wszystkie grupy wiekowe. Dlatego też tak dużo prowadzonych jest badań mających na celu jak poznanie patomechanizmów tych schorzeń i wypracowanie nowoczesnych algorytmów prewencyjnych, diagnostycznych i leczniczych.

Wśród badań prowadzonych od ponad 100 lat, jednym z obiecujących narzędzi walki z rozwojem cukrzycy typu 2 stały się inkretyny. Są to peptydowe hormony jelitowe posiadające działanie insulinotropowe oraz wywierające cytoprotekcyjny wpływ na komórki β trzustki. Wykorzystując już poznane ochronne funkcje inkretyn, ich agoniści i inhibitory enzymu odpowiedzialnego za ich degradację (DPP-4) są obecnie nowym narzędziem terapeutycznym w leczeniu cukrzycy i otyłości. Do opisywanej grupy należą glukagonopodobny peptyd typu 1 (*GLP-1, glucagon-like peptide-1*) oraz glukozozależny polipeptyd insulinotropowy (*GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide*). Hormony te są wytwarzane i uwalniane przede wszystkim z komórek K i L jelita cienkiego pod wpływem bodźców pokarmowych. Do najważniejszych efektów ich działań należy stymulacja uwalniania insuliny z komórek beta trzustki, przy czym ta aktywność insulinotropowa wg. ustalonych kanonów, jest ściśle uzależniona od aktualnej glikemii. Hormony inkretynowe działają także ochronnie, „cytoprotekcyjne” i proproliferacyjne na komórki beta trzustki oraz wywierają szereg innych działań wpływających na utrzymanie prawidłowej homeostazy glukozy. Uważa się, że defekt insulinotropowy inkretyn odgrywa istotną rolę w patogenezie cukrzycy typu 2, zwłaszcza w jej początkowym okresie adaptacyjnego przerostu-hipertrofii wysp i zwiększonego uwalniania insuliny by utrzymać normoglikemię.

Otyłość należy do chorób o podłożu wielogenowym, w których istotną rolę odgrywają zarówno czynniki środowiskowe jak i genetyczne. Wśród grup/ścieżek metabolicznych polimorfizmu genów białek związanych z otyłością można zaliczyć geny białek regulujących apetyt, metabolizm lipidów i węglowodanów, różnicowania się preadipocytów, ale i polimorfizm czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję tych genów. Wciąż poszukiwane są geny odpowiedzialne za rozwój otyłości i związanych z nią MS i DMt2. Badania asocjacyjne genomu ludzi (GWA- *genome wide association study*) wykazały tylko parę regionów (*loci*) na chromosomach znacząco wpływających na rozwój cukrzycy typu 2 u

ludzi. Znamienne, że znajdują się w nich polimorfizmy genów odpowiedzialnych m.in. za insulinowrażliwość, różnicowanie się tkanki tłuszczowej (preadipocytów), stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w krążeniu, odpowiedź immunologiczno-zapalną, a mianowicie geny TCF7L2 (*Transcription Factor 7-like 2*) i gen czynnika proliferacji peroksisomów PPAR-gamma (*peroxisome proliferator-activated receptor*).

Celem pracy było przebadanie i porównanie wpływu wolnych kwasów tłuszczowych i glikemii we krwi na uwalnianie inkretyn na czczo i w okresie poposiłkowym u osób zdrowych oraz z zespołem metabolicznym zwłaszcza u nosicieli alleli wybranych genów promujących wyższe stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy.

Metody: Badanie objęło 70 osób. Do grupy badanej (MS) zakwalifikowano 50 osób, 22 kobiet i 28 mężczyzn w wieku od 25 do 73 lat (średnio $53,39 \pm 11,86$), ze wskaźnikiem masy ciała (BMI) powyżej 30 kg/m^2 , z objawami zespołu metabolicznego (kryteria wg. IDF z 2005 roku). Grupę kontrolną (C) stanowiło 20 zdrowych ochotników ze średnim BMI wynoszącym 24 kg/m^2 , dobranych pod względem wieku i płci do grupy badanych pacjentów z zespołem metabolicznym. Ostatecznie w grupie kontrolnej pełne wyniki uzyskano u 18 osób, 11 kobiet i 7 mężczyzn w wieku od 28 do 62 lat (średnio $43,5 \pm 11,53$). Ochotnikami byli pacjenci Poradni Kliniki Endokrynologii UJ CM oraz Poradni Leczenia Otyłości i Zaburzeń Lipidowych działającej przy Katedrze Biochemii Klinicznej UJ CM.

Po wstępnej kwalifikacji lekarskiej uczestnicy byli poddani 3-godzinnej DTTG (75g glukozy, wg WHO) oraz 8-godzinnej DTTL (wg. *Coulderc R. 1998*) zawierającemu 80g tłuszczu: 50% nasycone, 40% jednonienasycone i 10% wielonienasycone kwasy tłuszczowe. W czasie DTTG co 30 minut, w czasie DTTL co 2 godziny pobierano materiał do badań. W próbkach krwi oznaczano stężenie glukozy, insuliny, inkretyn (GIP, GLP-1), triglicerydów (TG) oraz FFA. Na podstawie uzyskanych w DTTG wyników obliczono również wskaźnik oceny insulinooporności (*homeostasis model assesment of insulin resistance*, HOMA-IR).

W pierwszej próbce krwi, pobranej na czczo, oznaczano również stężenie cholesterolu całkowitego (TCh) oraz frakcji HDL (HDL) i LDL (LDL) oraz adipokiny - leptynę, adiponektynę oraz wisfatynę.

Do oznaczeń genetycznych użyto metodę analizy długości amplifikowanych metodą PCR (ang. *polymerase chain reaction*) wybranych fragmentów DNA, poddanych działaniu odpowiednich enzymów restrykcyjnych (ang. *restricted fragment length polymorphism*, *RFLP*). Badano obecność polimorfizmów genów odpowiedzialnych m.in. za różnicowanie

tkanki tłuszczowej (czyli pośrednio za stężenie FFA we krwi) - genu *TCF7L2* (rs7903146) oraz genu *PPAR γ 2* (rs1801282).

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietu *STATISTICA 10 PL*.

Wyniki: Stężenie inkretyn na czczo nie różniło się między grupami MS i C. W całej grupie na czczo, bez uwzględnienia genotypu badanych, stężenie glukozy korelowało dodatnio z GLP-1, natomiast stężenie FFA z GIP.

W całej grupie badanej potwierdzono związek uwalniania inkretyn z badanymi markerami insulinooporności i FFA w krążeniu głównie na czczo. Natomiast w okresie poposiłkowym stwierdzono różnice w tej zależności w podgrupach badanych pacjentów: z MS i C z uwzględnieniem płci. Bez względu na podział na grupy i płeć stwierdzono istotne różnice między stężeniem inkretyn na czczo, a badanymi wskaźnikami otyłości: dodatnie korelacje między GIP a BMI oraz WHR; ujemne między GLP-1 a BMI oraz ilościową zawartością tkanki tłuszczowej.

Wykazano w badaniu, że zarówno glukoza jak i lipidy w okresie poposiłkowym aktywują uwalnianie inkretyn. Czas uwalniania obu inkretyn po doustnym przyjęciu lipidów (DTTL) jest ok. 2,5 raza dłuższy niż po glukozie (DTTG) co sugeruje zależność od bezpośredniego kontaktu substratu metabolicznego ze śluzówką (okres wchłaniania). Po pokarmie tłuszczowym maksymalny punkt wyrzutu GIP odnotowano w 2 godzinie DTTL i był on ok. 2 razy wyższy niż w DTTG. Świadczy to, że uwalnianie GIP przez lipidy pokarmu odgrywa ważną rolę w osłonie komórek β trzustki przed glukolipotoksycznością przy spożywaniu pokarmów wysokolipidowych.

Niższe wartości GLP-1 przy wyższym stężeniu FFA na czczo zarówno w całej grupie, grupie MS jak i C sugeruje mniejszą stymulację przez FFA uwalniania GLP-1 w okresie między posiłkami, oraz na brak obronnego oddziaływania GLP-1 w warunkach podstawowych przy wyższych wartościach FFA czy TG. Ujemne korelacje między poposiłkowymi stężeniem GLP-1, a FFA w grupach kontrolnych, mogą świadczyć o mniejszym wpływie ochronnym GLP-1 na „stres metaboliczny” w warunkach zdrowia. Dodatnia korelacja GLP-1 i TG w grupie MS może sugerować aktywację mechanizmu ochronnego, gdy już doszło do zaburzeń metabolicznych związanych z MS. Z otrzymanych danych wynika, że kobiety w porównaniu z mężczyznami są bardziej narażone na powikłania wynikające z zaburzeń lipidowych spowodowanych niewydolnością mechanizmów ochronnych działania inkretyn.

W badaniu potwierdzono (mimo tak małej grupy badanej) znaną zależność alleliczną badanych polimorfizmów związanych z większym ryzykiem rozwoju DMt2 ze wskaźnikami stanu przedcukrzycowego (MS) tj. głównie stężeniem insuliny i FFA. Stwierdzono niezależny od stężenia GLP-1 obniżony efekt inkretynowy u nosicieli związanego z ryzykiem rozwoju DMt2 genotypu TT lub TC polimorfizmu TCF7L2 w DTTG. Wyższe stężenia GIP u nosicieli allelu T polimorfizmu genu TCF7L2 związane z aktywacją ścieżki WNT.

Porównując krzywe obrazujące zmiany stężeń obu inkretyn w odpowiedzi na doustną podaż węglowodanów (DTTG) i lipidów (DTTL) pomiędzy genotypami TT+TC vs CC polimorfizmu genu *TCF7L2* z uwzględnieniem grup MS i C stwierdzono większy wpływ węglowodanów niż lipidów na poposiłkowy wyrzut GIP u osób z zespołem metabolicznym, nosicieli allelu T genu *TCF7L2*. Może to sugerować, że zalecenia dietetyczne dla tych osób powinny wskazywać raczej na dietę opartą raczej na produktach bogatych w węglowodany, które właśnie u tych osób stymulują większy wyrzut ochronnego GIP.

Stwierdzona w badaniu większa stymulacja GLP-1 przez lipidy w warunkach poposiłkowych u chorych z MS z genotypem CC polimorfizmu *TCF7L2*, może sugerować, że dieta u tych osób powinna być oparta bardziej na lipidach, które lepiej stymulują poposiłkowy wyrzut ochronnie działającego GLP-1 u nosicieli tego allelu.

Przy porównywaniu charakterystyki nosicieli tych samych genotypów polimorfizmu genu *PPAR γ* między grupami MS i C zaobserwowano jedynie istotne statystycznie różnice w zakresie wskaźników zespołu metabolicznego, które były wyższe u osób z genotypem CC genu *PPAR- γ* , niosącym ze sobą wyższe ryzyko rozwoju DMt2. Porównując krzywe odpowiedzi obu inkretyn na doustną podaż węglowodanów (DTTG) i lipidów (DTTL) pomiędzy genotypami CC vs GG+CG genu *PPAR- γ* z uwzględnieniem grup MS i C nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic. Z powyższych danych wynika, że w mechanizmie zwiększonego ryzyka DMt2 związanego z allelem proliny polimorfizmu Pro12Ala genu *PPAR- γ* , inkretyny nie wydają się odgrywać istotnej roli.

Istnieją liczne prace, w których wykryto zależności między wartościami inkretyn, głównie GLP-1, a ciśnieniem tętniczym. W omawianym badaniu stężenia inkretyn nie miały znacznego wpływu na wartości ciśnienia tętniczego. Tylko w grupie kontrolnej odnotowywano wyższe wartości GIP u osób z wyższymi wartościami ciśnienia rozkurczowego. Natomiast w przypadku oceny stężeń GLP-1, stwierdzono odwrotną zależność u wszystkich uczestników badania – tj. u osób z wyższymi wartościami GLP-1 na czczo, stwierdzano niższe wartości ciśnienia rozkurczowego.

W badaniu nie stwierdzono znamiennej statystycznie korelacji między stężeniem GIP i GLP-1 na czczo, a wartością leptyny, adiponektyny, czy wisfatyny. Stwierdzono natomiast dodatnią korelację między stężeniem wisfatyny, a wyrzutem GIP (AUC-GIP) w czasie trwania DTTG w całej grupie badanej oraz w trakcie DTTL również w całej grupie badanej, grupie z MS i u mężczyzn z MS. Nie znaleziono znamienności statystycznej między stężeniami wisfatyny a AUC-GLP1. Współdziałania adipokin i inkretyn wymagają dalszych badań.

Wnioski: Powyższe wyniki sugerują możliwość ustalenia indywidualnego postępowania dietetycznego w prewencji i leczeniu uszkodzenia komórek β i rozwoju cukrzycy u pacjentów z zespołem metabolicznym, zwłaszcza u nosicieli różnych alleli polimorfizmu genu TCF7L2. W doborze diety pomocnym byłoby wykonywanie testów funkcjonalnych DTTG jak i DTTL z oznaczeniem stężeń inkretyn GLP1 i GIP.

Summary

Introduction: Obesity, connecting with it metabolic syndrome and diabetes mellitus type 2 (DMt2) are nowadays one of the most common diseases in the world. The number of people treated because of these disorders is being increasing dramatically. In some industrialized countries this phenomenon has reached epidemic dimensions. It appears in world regions, where it has never been found before and concerns all age groups. That is why so many research studies about its pathomechanisms and modern prophylactic, diagnostic, therapeutic algorithms are introduced.

Among investigations which have been performed over years, one very promising tool against diabetes mellitus type 2 development are incretins. These are intestinal peptic hormones, which first of all have an insulintropic and cytoprotective influence on pancreatic β cells. Knowing their protective functions, their agonists and inhibitors of their degradation enzyme (DPP-4) are nowadays a new therapeutic tool in the treatment of DMt2 and obesity. This described group encompasses the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP). Under the influence of nutritive stimuli, incretins are produced and released first of all from K and L cells of the small intestine. Their most important effect is the activation of insulin secretion from pancreatic β cells, but this insulintropic activity is tightly dependent on the presence of glycaemia. Incretins have also a cytoprotective and proliferative effect on pancreatic β cells and many other functions indispensable for keeping proper glucose homeostasis. It is thought that the insulintropic defect of incretins plays an important role in DMt2 pathogenesis, especially during its first adaptive period of islet cells hypertrophy and increased insulin release to keep normoglycaemia.

Obesity belongs to polygenetic diseases, in which environmental and genetic factors are of great importance. Alterations in genes encoding proteins responsible for the regulation of appetite, lipid and glucose metabolism, and preadipocyte differentiation, as well as polymorphisms in transcription factors, which regulate the expression of these genes, can be listed among alterations in genes connected with obesity. Genes responsible for the development of DMt2 and connected with it MS are still under investigation. Genome-wide association studies (GWAS) have shown only few chromosome regions (*loci*) significantly connected to DMt2 in men. Importantly, specific gene polymorphisms are located in these *loci* – inter alia in genes responsible for insulin sensitivity, adipose tissue differentiation (preadipocytes), free fatty acids (FFA) metabolism, and immune-inflammatory response.

Examples of these are genes coding for Transcription Factor 7-like 2 (*TCF7L2*) and peroxisome proliferator-activated receptor (*PPAR-gamma*).

The Aim of the study was to investigate and compare the influence of lipids and glycaemia on fasting and postprandial incretin release in healthy controls and patients with metabolic syndrome, especially in carriers of selected alleles of genes responsible for higher concentrations of FFA in blood, the presence of which is connected with a higher risk of DMt2.

Patients and Methods: In this study participated 70 volunteers. Among 50 participants of the investigation group (MS) were 22 women and 28 men aged from 25 to 73 years (on average $53,39 \pm 11,86$), with body mass index (BMI) above 30 kg/m^2 , selected in accordance to IDF criteria of metabolic syndromes published in 2005. The control group (C) consisted of 20 healthy volunteers with a mean BMI of 24 kg/m^2 , adjusted in terms of age and gender to the MS group. Finally, in group C only 18 people completed all results (11 women and 7 men) aged from 28 to 62 years (average $43,5 \pm 11,53$). Volunteers were patients of Out-patients Clinics: the Clinic of Endocrinology UJ CM and the Out-patient Clinic of Obesity and Lipid Disorder Treatment at the Department of Biochemistry UJ CM.

Participants underwent a 3-hour oral glucose tolerance test - OGTT (75g glucose, WHO) and (with a two weeks distance period) an 8-hour oral lipid tolerance test - OLTT (Coulderc R. 1998), which contained 80g of fat, made up of 50% saturated, 40% monounsaturated and 10% polyunsaturated fatty acids. Every 30 minutes during OGTT and every 2 hours during OLTT blood concentration of glucose, insulin, incretins (GIP, GLP-1), triglycerides (TG) and FFA was measured. Basing on data from the OGTT homeostasis model, the assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated. In the first blood sample taken in the fasting state, the standard lipidogram (levels of total cholesterol and fractions of HDL, LDL) as well as concentrations of adipokines (leptin, adipokine and visfatin) were also measured.

For genetic measurements the RFLP method was used. DNA was harvested from venous blood cells. The presence of polymorphisms responsible inter alia for adipose tissue differentiation (indirectly for blood concentration of FFA) –polymorphisms in the genes *TCF7L2* (rs7903146) and *PPAR γ 2* (rs1801282) were investigated.

Statistical analysis was performed by the computer program STATISTICA 10 PL.

Results: In the whole investigation group the relation between the concentration of incretins with examined insulin resistance markers and fasting FFA was confirmed.

Fasting incretin concentration did not differ between MS and C groups. In the whole group, in the fasting state, without considering the genotype, GLP-1 secretion positively correlated with carbohydrates, while FFA level correlated with GIP.

In the postprandial period a gender-dependent differences in this relation in subgroups MS, and C was found. Irrespective of patients classification (MS, C, gender), in the whole group of patients a significant correlation between fasting levels of incretins and the studied parameters were observed: a positive correlation between GIP and BMI or WHR; a negative one between GLP-1 and BMI, and a quantitative amount of adipose tissue.

The study demonstrated that both glucose and lipids activate incretin secretion in the postprandial period. The time of the release of both incretins after oral lipid intake (OLTT) takes 2.5 times longer than after glucose intake (OGTT), what suggests a dependence on the direct contact of metabolic substrate with intestine mucosa (absorption time). After fatty food the maximal point of GIP output was after 2 hours of OLTT and was 2 times higher than in OGTT. This might indicate that GIP release by lipids from food can play a very important role in pancreatic β cell protection against glucolipotoxicity after high lipid food intake.

A lower concentration of GLP-1 in the case of higher fasting concentrations of FFA in the whole group of patients, as well as in MS and C subgroups, suggests a weak stimulatory effect of FFA on GLP-1 release between meals, and a lack of protective influence of GLP-1 in the fasting state, by higher concentrations of FFA and TG in blood. Negative correlations between postprandial concentrations of GLP-1 and FFA in group C also confirm the lower protective influence of GLP-1 on “metabolic stress” in healthy persons. The positive correlation between GLP-1 and TG in the MS group can suggest the activation of a protective mechanism, when metabolic disorders connected with MS have already occurred. The obtained results point that women are more vulnerable than men to complications resulting from dyslipidemia and the protective action of incretins.

In this study, despite a rather small investigated group, the correlation between the known allelic polymorphisms *rs7903146* in *TCF7L2*, as well as *rs1801282* in *PPAR- γ* , connected with higher risk of DMt2 with the prediabetes (MS) markers (insulin and FFA concentrations) was found. The decreased GLP-1 concentration was detected in carriers of the TT or TC genotype of the *TCF7L2* polymorphism in OGTT. A higher concentration of GIP in *rs7903146* T allele carriers was found.

Comparing curves showing incretins concentration changes in response to oral carbohydrates (OGTT) or lipids (OLTT) intake between genotypes TT+TC vs CC of the polymorphism in *TCF7L2* (in the MS and C group) it was found out that carbohydrates have a higher influence on postprandial GIP output than lipids in patients with MS, carriers of allele T of the *TCF7L2* gene. This suggests that the dietary recommendation for these patients should stress the carbohydrate-based diet which seems to stimulate GIP with its protective activity output in these T allele carriers.

The higher stimulation of GLP-1 by lipids in the postprandial state in patients with MS and the CC polymorphism of *TCF7L2*, observed in this study, can suggest that the dietary recommendation for these patients should be based rather on lipid-rich products, which stimulate a higher postprandial protective GLP-1 output by carriers of the C allele of this genotype.

For the investigated *PPAR* γ polymorphism genotype, only the differences in values of metabolic syndrome markers between MS and C groups were statistically significant. These values were higher in patients with the CC genotype of *PPAR* γ , which is the genotype connected with a higher risk of DMt2 development. Comparing incretin concentration changes in response to oral carbohydrates (OGTT) and lipids (OLTT) between genotypes CC vs GG+CG of the *PPAR* γ polymorphism (in MS and C group) did not reveal any statistically significant differences. From the above results it may be suggested that incretins do not play an essential role in the mechanism of higher risk of DMt2 development connected with the prolin allele of the Pro12Ala polymorphism of *PPAR* γ . There are some studies, in which a relation between concentrations of incretins, (especially GLP-1) and arterial blood pressure was discovered. In this work no significant correlation between incretin concentrations and blood pressure value was found. Only in C allele carriers higher concentrations of GIP were noticed in people with higher diastolic blood pressure values. In case of GLP-1 concentrations the opposite tendency in the whole group of volunteers was noticed. By persons with higher fasting GLP-1 concentrations a lower diastolic blood pressure was detected.

In this study no significant correlation between fasting GIP and GLP-1 vs fasting concentrations of measured adipokines: leptin, adiponectin and visfatin was found. However, a positive correlation between the concentration of visfatin and GIP output (AUC-GIP) during the functional tests: OGTT as well as in OLTT in the whole group, as well as in MS and men with MS was noticed. No statistical significance between visfatin concentrations and AUC-

GLP1 was found. Thus the co-operation between adipokines and incretins needs further studies.

Conclusions: The above results suggest the possibility of establishing rules of individual dietary recommendations in the prevention and treatment of pancreatic β cells damage leading to DMt2 development in patients with MS, especially in carriers of different alleles of the examined polymorphism of *TCF7L2*. Diet selection should be based on the results of functional tests (OGTT and OLTT) performed with a parallel measurement of concentrations of the incretins GLP-1 and GIP.

10 Spis rycin, tabel i wykresów

10.1 Spis rycin

Rysunek 1. Odpowiedź komórkowa na wysoki poziom FFA [wg. Schenk S. et al., 2008; (22)].....	16
Rysunek 2. Patofizjologia insulinooporności i przewlekłego stanu zapalnego w zespole metabolicznym [wg. Szotowska M., Więcek A. (2)].	17
Rysunek 3. Patomechanizm insulinooporności - miejscowy stan zapalny w tkance tłuszczowej [wg. Schenk S. et al., 2008; (22)].	18
Rysunek 4. Mechanizm angiogenezy – niektóre proangiogenne adipokiny i cytokiny produkowane przez adipocyty i komórki zrębu tkanki tłuszczowej oraz komórki związane z towarzyszącym procesem zapalnym. Równoległe uwalnianie przez adipocyty endogennych inhibitorów angiogenezy [wg. Cao Y., 2010; (23)]	19
Rysunek 5. Główne czynniki produkowane w tkance tłuszczowej, biorące udział w regulacji równowagi energetycznej (Endokrynną funkcją adipocytów – zaznaczono adipokiny omawiane w pracy).	21
Rysunek 6. Objawy związane ze zmianą poziomów leptyny i adiponektyny we krwi w stanie zdrowia oraz w otyłości.....	23
Rysunek 7. Struktura genu ProGIP (A), mRNA (B) oraz białka (C) prekursorowego dla aktywnej formy GIP.....	27
Rysunek 8. Synteza aktywnych form GIP (1-42) i GLP-1 (7-36) w przewodzie pokarmowym pod wpływem pokarmu. Działanie DPP-4 w układzie krążenia i dezaktywacja inkretyn.	29
Rysunek 9. Funkcje GIP w tkankach obwodowych [wg. Baggio LL & Drucker DJ 2007 (76)].	30
Rysunek 10. Potranslacyjne przemiany proglukagonu w trzustce, jelicie cienkim i mózgu.	34
Rysunek 11. Rola GLP-1 w tkankach obwodowych [wg. Baggio LL & Drucker DJ 2007 (76)].	37
Rysunek 12. Fragment pierwszej strony raportu dotyczącego GWA - przedstawienie graficzne nowo poznanych miejsc lokacji w chromosomach SNP-ów/mutacji związanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju min. cukrzycy typu 2 (ostatnia rycina – zielone znaczniki w chromosomie 10, 12 i 16).	44
Rysunek 13. Wykres przedstawiający graficznie udział genów <i>TCF7L2</i> i <i>PPARγ</i> w rozwoju cukrzycy typu 2 [wg. Frayling TM 2007 (141)].	45
Rysunek 14. Gen <i>TCF7L2</i> – zaznaczone miejsca SNP: rs7903146 oraz rs12255372.	47
Rysunek 15. Wykryte dotychczas mutacje w strukturze białka <i>PPAR-γ2</i> (białko charakterystyczne dla adipocytów).	49
Rysunek 16. Schematyczne przedstawienie wyniku genotypowania rs7903146 dla genu <i>TCF7L2</i> . Ścieżka 1- standard długości fragmentów DNA; ścieżka 2 heterozygoty TC (widoczne fragmenty: 113pz, 91pz, 22pz); ścieżka 3 genotyp CC (widoczny fragment: 91pz, 22pz); ścieżka 4 genotyp TT (fragment o długości 113pz).	63
Rysunek 17. Schematyczne przedstawienie wyniku genotypowania rs1801282 dla genu <i>PPARγ2</i> . Ścieżka 1- standard długości fragmentów DNA; ścieżka 2 homozygota CC (fragment 43pz i 227 pz); ścieżka 3 heterozygota CG (widoczne fragmenty: 43pz, 227pz, 270pz); ścieżka 4 homozygota GG (fragment o długości 270pz).	64

10.2 Spis tabel.

Tabela 1. Aktualnie stosowane definicje zespołu metabolicznego.....	11
Tabela 2. Kryteria klinicznego rozpoznania zespołu metabolicznego – wspólne stanowisko International Diabetes Federation; National Heart, Lung and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; oraz International Association for the Study of Obesity (8).....	12
Tabela 3. Plejotropowe działanie inkretyn.	41
Tabela 4. Porównanie siły oddziaływania GLP-1 w stosunku do GIP.	42
Tabela 5. Procentowa zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie	53
Tabela 6. Skład standardowego posiłku w DTTL.....	54
Tabela 7. Sekwencje premierów i enzymy restrykcyjne dla reakcji PCR genów <i>TCL7F2</i> i <i>PPARγ2</i> . 62	62
Tabela 8. Schemat reakcji PCR dla genów <i>TCL7F2</i> i <i>PPARγ2</i>	62
Tabela 9. Charakterystyka grupy osób z zespołem metabolicznym (n=50) oraz grupy kontrolnej (n=18).....	67
Tabela 10. Średnie wydzielanie inkretyn na godzinę, w czasie trwania testów (DTTG - 3h, DTTL – 8h) w obrębie grup MS i oddzielnie C. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Statystycznie istotne różnice: DTTG vs DTTL wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ ***).	76
Tabela 11. Porównanie parametrów antropometrycznych i ciśnienia tętniczego kobiet i mężczyzn w całej grupie badanej. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ ***).	77
Tabela 12. Porównanie parametrów biochemicznych w grupie kobiet i mężczyzn całej grupy badanych. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ ***).	78
Tabela 13. Porównanie parametrów antropometrycznych i ciśnienia tętniczego w grupie kobiet i mężczyzn obu grup badanych – MS i C. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ ***) – dla różnic między płciami.	84
Tabela 14. Porównanie parametrów biochemicznych w grupie kobiet i mężczyzn obu grup badanych – MS i C. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Wartości $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ ***) – dla różnic między płciami.	85
Tabela 15. Znamienne współczynniki korelacji dla wybranych parametrów charakteryzujących zespół metaboliczny	101
Tabela 16. Współczynnik korelacji dla poziomu GIP na czczo, a wybranymi parametrami charakteryzującymi całą grupę badaną.	102
Tabela 17. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla GIP na czczo i wybranych parametrów w poszczególnych grupach.....	103
Tabela 18. Współczynnik korelacji dla poziomu GLP-1 na czczo, a wybranymi parametrami antropometrycznymi i wartościami ciśnienia charakteryzującymi całą grupę badaną	104
Tabela 19. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla GLP-1 na czczo i wybranych parametrów w poszczególnych grupach.....	105
Tabela 20. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla AUC-GIP w DTTG oraz DTTL i wybranych parametrów funkcji metabolicznej tkanki tłuszczowej w poszczególnych grupach.....	106
Tabela 21. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla GIP oraz GLP-1 na czczo i wybranych parametrów gospodarki węglowodanowej w poszczególnych grupach.....	106
Tabela 22. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla GIP oraz GLP-1 na czczo i wybranych parametrów gospodarki lipidowej (FFA) w poszczególnych grupach.....	107

Tabela 23. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GIP i glukozy w DTTG w poszczególnych grupach	107
Tabela 24. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GIP i insuliny w DTTG w poszczególnych grupach	108
Tabela 25. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GLP-1 i glukozy w DTTG w poszczególnych grupach.....	108
Tabela 26. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GIP i FFA oraz Tg w DTTL w poszczególnych grupach.....	109
Tabela 27. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GLP-1 i FFA w DTTL w poszczególnych grupach	109
Tabela 28. Znamienne statystycznie współczynniki korelacji dla poziomu GLP-1 i TG w DTTL w poszczególnych grupach	109
Tabela 29. Znamienne statystycznie regresje inkretyn od glukozy w DTTG.....	111
Tabela 30. Znamienne statystycznie regresje inkretyn od FFA w DTTL.	111
Tabela 31. Częstość występowania genotypów i alleli genu <i>TCL7F2</i>	112
Tabela 32. Częstość występowania genotypów i alleli genu <i>PPARγ2</i>	112
Tabela 33. Analiza częstości występowania poszczególnych alleli.....	113
Tabela 34. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupach genotypowych CC i TT+TC genu <i>TCL7F2</i> w całej grupie badanej – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	115
Tabela 35. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupach genotypowych CC i TT+TC genu <i>TCL7F2</i> w całej grupie badanej – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	117
Tabela 36. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupach genotypowych CC i TT+TC genu <i>TCL7F2</i> w grupie MS – podane tylko wyniki istotne statystycznie.....	118
Tabela 37. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupach genotypowych CC i TT+TC genu <i>TCL7F2</i> w grupie MS – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	119
Tabela 38. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupach genotypowych CC i TT+TC genu <i>TCL7F2</i> w grupie C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	120
Tabela 39. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupach genotypowych CC i GG+GC genu <i>PPARγ2</i> w całej grupie badanej – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	121
Tabela 40. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupach genotypowych CC i GG+GC genu <i>PPARγ2</i> w grupie MS – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	122
Tabela 41. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupach genotypowych CC i GG+GC genu <i>PPARγ2</i> w grupie C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	123
Tabela 42. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupie genotypowej CC genu <i>TCL7F2</i> pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	124
Tabela 43. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupie genotypowej CC genu <i>TCL7F2</i> pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	127

Tabela 44. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupie genotypowej TT+CT genu <i>TCL7F2</i> pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	129
Tabela 45. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupie genotypowej TT+CT genu <i>TCL7F2</i> pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	131
Tabela 46. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupie genotypowej CC genu <i>PPARγ</i> pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	132
Tabela 47. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupie genotypowej CC genu <i>PPARγ</i> pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	135
Tabela 48. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTG w grupie genotypowej GG+CG genu <i>PPARγ</i> pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	137
Tabela 49. Porównanie parametrów oznaczanych w DTTL w grupie genotypowej GG+CG genu <i>PPARγ</i> pomiędzy grupami MS i C – podane tylko wyniki istotne statystycznie. W nawiasach podano średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD).	139

10.3 Spis wykresów

Wykres 1.	70
Wykres 2. Poziom leptyny w zależności od płci.	79
Wykres 3. Przebieg krzywej glikemii w trakcie DTTG w zależności od płci.	80
Wykres 4. Przebieg krzywej poziomów FFA w DTTL w zależności od płci.	80
Wykres 5.	81
Wykres 6.	88
Wykres 7.	95
Wykres 8. Zależność między GIP na czczo i wskaźnikiem masy ciała BMI w całej grupie badanej..	103
Wykres 9. Zależność między GLP-1 na czczo i poziomem ilościowej zawartości tkanki w całej grupie badanej	104
Wykres 10.	110
Wykres 11. Różnice procentowej częstości allelicznej genu <i>TCL7F2</i> w zależności od grupy – MS vs C	113
Wykres 12. Różnice procentowej częstości allelicznej genu <i>PPARγ2</i> w zależności od grupy – MS vs C	114
Wykres 13. Wybrane parametry DTTG, a genotyp <i>TCF7L2</i> w całej grupie badanej.....	116
Wykres 14. Poziom GIP w 60' DTTG, a genotyp <i>TCF7L2</i> w grupie MS	118
Wykres 15. Wybrane parametry DTTL, a genotyp <i>TCF7L2</i> w grupie MS.....	119
Wykres 16. Poziom GIP w 0' DTTG, a genotyp <i>TCF7L2</i> w grupie C.....	120
Wykres 17. Wybrane parametry DTTL, a genotyp <i>PPARγ2</i> w całej grupie badanej	121
Wykres 18. Poziom insuliny w 4h DTTL, a genotyp <i>PPARγ2</i> w grupie MS.....	122
Wykres 19. Wybrane parametry DTTL, a genotyp <i>PPARγ2</i> w grupie C.....	123
Wykres 20. Wybrane parametry DTTG, a występowanie MS u osób z genotypem CC genu <i>TCF7L2</i>	125
Wykres 21. Wybrane parametry DTTL, a występowanie MS u osób z genotypem CC genu <i>TCF7L2</i>	128
Wykres 22. Wybrane parametry DTTG, a występowanie MS u osób z genotypem TT+CT genu <i>TCF7L2</i>	130
Wykres 23. Wybrane parametry DTTG, a występowanie MS u osób z genotypem CC genu <i>PPARγ</i>	133
Wykres 24. Wybrane parametry DTTL, a występowanie MS u osób z genotypem CC genu <i>PPARγ</i>	136
Wykres 25. Wybrane parametry DTTG, a występowanie MS u osób z genotypem GG+CG genu <i>PPARγ</i>	138

11 Piśmiennictwo

1. **Reaven G.M.:** Related Articles, Links Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diab.* 1988; 37: 1595-1607.
2. **Szotowska M., Wićcek A.:** Zespół metaboliczny. *Terapia* 2006; 7/8: 27-36.
3. **Sieradzki J., Wićcek A.:** Zespół metaboliczny. *Terapia* 2006; 7/8: 27-36.
3. **Sieradzki J.:** Zespół metaboliczny – pojęcie, patofizjologia, diagnostyka i leczenie. *Diabetol. Prakt.* 2002; 3: 187-195.
4. **Kocięcki M.:** Zespół metaboliczny w roku 2006. *Przegląd Kardiometaboliczny* 2006; 1: 55-60.
5. **Alberti G., Zimmet P., Shaw J. i wsp.:** The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. www.idf.org/webdata/docs/Metac_syndrome_def.pdf
5. **Zespół metaboliczny – nowa definicja i zasady leczenia.** *Med. Prakt* 2005; 5: 45-55.
6. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421.
7. **Grundey S.M., Cleeman J.I., Daniels S.R., Donatok K.A., Eckel R.H., Franklin B.A., et al.:** Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, 2005; 112: 2735-2752.
8. **Alberti K.G.M.M., Eckel R.H., Grundey S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.I., Donato K.A., et al.:** Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 2009; 120: 1640-1645.
9. Program NATPOL PLUS. www.natpol.pl
10. **Lelliot C., Vidal-Pluig A.J.:** Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis *de novo* and fatty acid oxidation. *Int.J.Obesity*. 2004; 28; S22-S29.
11. **Nishimura S., Manabe I., Nagai R.:** Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discov. Med.* 2009; 8(41):55-60
12. **Canballero A.E.:** Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obesity Res.* 2005;11; 1278-1289.
13. **Uchil D., Pipalia D., Chawla M., et al.:** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - the hepatic component of metabolic syndrome. *J. Assoc. Physicians India.* 2009 Mar; 57: 201-204.
14. **Jabrocka A., Motyka M., Kieć-Wilk B., et al.:** Otyłość i cukrzyca. Czynniki Ryzyka 2001; 31/32: 10-31.
15. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. red. Dembińska-Kieć A., Naskalski J. Wydanie III Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2010; 303-338.
16. **Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M., et al.:** A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 1997; 386: 292-296.
17. **Schaefer E.J.:** Effects of Cholesterol Ester Transfer Protein Inhibition on HDL Metabolism. *High Density Lipoproteins, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease*, 2010: 165-171.
18. **Mohanty P., Ghanim H., Hamouda W., Aljada A., Garg R., Dandona P.:** Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr.* 2002 Apr; 75(4): 767-772.
19. **Kaneto H., Matsuoaka T., Nakatani Y., et al.:** Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type II diabetes. *J. Mol. Med.*, 2005; 83: 429-439.
20. **Anderson E.A., Hoffman R.P., Balon T.W., et al.:** Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J. Clin. Invest.* 1997, 87: 2246 – 2252.

-
21. **Gosmanov A.R., Smiley D.D., Robalino G., et al.:** Effects of oral and intravenous fat load on blood pressure, endothelial function, sympathetic activity, and oxidative stress in obese healthy subjects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2010 Dec; 299(6): E953-E958.
 22. **Schenk S., Saberi M., Olefsky J.M.:** Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *Clin. Invest.* 2008;118(9):2992–3002.
 23. **Cao Y.:** Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010; 9: 107-115.
 24. **Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P.:** Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Aug; 85(8): 2970-2973.
 25. **Evans J.L., Golfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M.:** Oxidative stress and stress-activated signaling pathways; a unifying hypothesis of type II diabetes. *Endocrine Rev.*, 2002; 23: 599-622.
 26. **Kaneto H., Xu G., Song K.-H., et al.:** Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic β -cell function by provoking oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 31099-31104.
 27. **Brownlee M.:** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001; 414: 813-820.
 28. **Trayhurn P., Beattie J.H.:** Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* 2001; 60: 329-339.
 29. **Lean M.E., James W.P.:** Brown Adipose Tissue in Men. In: *Brown Adipose Tissue*, eds P.Trayhurn & D.G.Nicolls. London, Arnold. 1986; 339-367.
 30. **Trayhurn P., Hoggard N., Mercer J.G., Rayner D.V.:** Leptin: fundamental aspects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1999, 23 (Suppl. 1), 22.
 31. **Van Gaal L.F., Wauters M.A., Mertens I.L. et al.:** Clinical endocrinology of human leptin. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1999, 23 (Suppl. 1), 29.
 32. **Landt M.:** Leptin binding and binding capacity in serum. *Clin Chem* 2000; 46: 379-384.
 33. **Falorni A., Bini V, Molinary D, Papi F, Celi F, Di Stefano G, Berlioli MG, Bacosi ML, Contessa G:** Leptin serum levels in normal weight and obese children and adolescents: relationship with age, sex, pubertal development, body mass index and insulin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21: 881-890.
 34. **Saad MF, Damani S, Gingerich RL, et al.:** Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 579-584.
 35. **Wolk R., Deb A., Caplice N.M., et al.:** Leptin receptor and functional effects of leptin in human endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*, Nov 2005; Volume 183, Issue 1 : 131-139.
 36. **Misra A., Garg A.:** Leptin, its receptor and obesity. *J. Investig. Med.* 1996, 44, 540.
 37. **Kim SK, Kim HJ, Ahn CW, Park SW, Cho YW, Lim SK, Lee HC, Cha BS:** Hyperleptinemia as a robust risk factor of a coronary artery disease and metabolic syndrome in type 2 diabetic patients. *Endocr J* 2008; 55: 1085-1092.
 38. **Reidy S.P., Weber J.:** Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 2000, 125, 285.
 39. **Bouloumie A., Drexler H.C., Lafontan M., Busse R.:** Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ. Res.* 1998, 83, 1059.
 40. **Chandran M., Phillips S.A., Ciaraldi T., Henry R.R.:** Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003, 26, 2442.
 41. **Shand B, Elder P, Scott R, Frampton C, Willis J:** Biovariability of plasma adiponectin. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1264-1268.

-
42. **Hofsø D, Ueland T, Hager H, et al.:** Inflammatory mediators in morbidly obese subjects: associations with glucose abnormalities and changes after oral glucose. *Eur J Endocrinol* 2009; 161: 451-458.
43. **Maeda N., Takahashi M., Funahashi T. et al.:** PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001, 50, 2094.
44. **Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM:** Adiponectins level and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009; 302: 179-188.
45. **Wolf G.:** Adiponectin: a regulator of energy homeostasis. *Nutr. Rev.* 2003, 61, 290.
46. **Satoh N., Naruse M., Usui T. et al.:** Leptin-to-adiponectin ratio as a potential atherogenic index in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004, 27, 2488.
47. **Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., et al.:** Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769.
48. **Duncan B.B., Schmidt M.I., Pankow J.S. et al.:** Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2004, 53, 2473.
49. **Kershaw E.E., Flier J.S.:** Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, 89, 2548.
50. **Jia SH., Li Y., Parodo J., et al.:** Pre-B colony enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 1318-1327.
51. **Samal B., Sun Y., Stearns G., Xie Ch, et al.:** Cloning and characterization of cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14 (2): 1431-1437.
52. **Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M. et al.:** Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307 (5708): 426-230.
53. **Moschen A.R., Kaser A., Enrich B. et al.:** Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J. Immunol.* 2007; 178 (3): 1748-1758.
54. **Curant C.A., Wegner V., Sengenès C. et al.:** Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 2006; 49 (4): 744-747.
55. **Nauck M.A., Baller B., Meier J.J.:** Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53 (Suppl.3): S190-S196.
56. **Egan J.M., Meneilly G.S., Elahi D.:** Effects of 1-mo bolus subcutaneous administration of exendin-4 in type 2 diabetes. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, 2003; 284: E1072-E1079.
57. **Kluz J., Adamiec R.:** Nowe perspektywy terapii chorych na cukrzycę typu 2 oparte na glukagonopodobnym peptydzie 1 (GLP-1) i żołądkowym peptydzie hamującym (GIP). *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2006; 60: 15-23.
58. **Strózik A., Bieniek-Marzec A., Okopień B.:** Efekt inkretynowy – nowe spojrzenie na leczenie cukrzycy typu 2. *Czynniki Ryzyka* 2008; 4: 45-69.
59. **Bayliss W.M., Starling E.H.:** The mechanism of pancreatic secretion. *Jurnal of Physiology* 1902, 28: 325-352.
60. **Moore B., Edie E.S., Abram J.H.:** On the treatment of diabetes mellitus by acid extracts of duodenal mucosa membrane. *Biochemical Jurnal* 1906, 1: 28-38.
61. **Oehme C., Wimmers K.:** Wirkung von Duodenalschleimhautextrakten (Secretin) auf den Blutzucker. *Z. Gesamte Exp. Med.* 1923, 38: 1-8.
62. **Zunz E., La Barre J.:** Contributions à l'étude des variations physiologiques de la sécrétion interne du pancréas: relations entre les sécrétions externe et interne du pancréas. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 1929, 31, 20-44.
63. **La Barre J., Still E.U.:** Studies on the physiology of incretin: III. Further studies on the effects of secretin on the blood sugar. *Am. J. Physiol* 1930, 91: 496-498.

-
64. **La Barre J.:** Sur les possibilites d'un traitement du diabetes par l'incréтин. Bull. Acad. R. Med. Belg. 1932, 12: 620-643.
65. **Loew E.R., Gray J.S., Ivy A.C.:** Is a duodenal hormone involved in carbohydrate metabolism? Am. J. Physiol. 1940, 129: 659-663.
66. **McIntyre N., Turner D.S., Holdsworth C.D.:** New interpretation of oral glucose tolerance. Lancet 1964, 2: 20-21.
67. **Elrik H., Stimmeler L., Hlad C.J., Aray Y.:** Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1964, 24: 1076-1082.
68. **Unger R.H., Eisentraut A.M.:** Entero-insular axis. Arch. Intern. Med. 1969, 123: 261-265.
69. **Brown J.C., Mutt V., Pederson R.A.:** Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. Journal of Physiology – London 1970, 209: 57-64.
70. **Brown J.C.:** Gastric inhibitory polypeptide. New York. Springer-Verlag. 1982.
71. **Maxwell V., Shulkes A., Bron J.C., Solomon T.E., Walsh J.H., Grossman M.I.:** Effect of gastric inhibitory polypeptide on pentagastrin stimulated amid secretion in man. Digestive diseases and sciences 1980, 25: 113-116.
72. **Bell G.I., Santerre R.F., Mullenbach G.T.:** Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. Nature 1983, 302: 716-718.
73. **Bell G.I., Sanchez P.R., Laybourn P.J., Najarian R.C.:** Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. Nature 1983, 304: 368-371.
74. **Mojsov S., Weir G.C., Habener JF:** Insulinotropin – glucagonlike peptide-I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. Journal of Clinical Investigation 1987, 79: 616-619.
75. **Drucker D.J.:** Glucagon-like peptide 2. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2001, 86: 1759-1764.
76. **Baggio L.L., Drucker D.J.:** Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology 2007; 132: 2131-2157.
77. **Besterman H.S., Cook G.C., Sarson D.L., et al.:** Gut hormones in tropical malabsorption. BMJ 1979; 2: 1252-1255.
78. **Ross S.A., Brown J.C., Dupre J.:** Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide following oral glucose in diabetes mellitus. Diabetes 1977; 26: 525—529.
79. **Deacon C.F., Nauck M.A., Meier J., et al.:** Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. J.Clin. Endocrinol. Metab. 2000; 85: 3575-3581.
80. **Yamada Y., Hayami T., Nakamura K., et al.:** Human gastrin inhibitory polypeptide receptor: cloning of the gene (GIPR) and cDNA. Genomics 1995; 29: 773-776.
81. **Kim S.J., Choh W.S., Han J.S., et al.:** A novel mechanism for suppression of a voltage-gated potassium channel by glucose-dependent insulinotropin: protein kinase A-dependent endocytosis. J. Bio. Chem. 2005; 280: 28692-28700.
82. **Kim S.J., Winter K., Nian C., et al.:** GIP stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1 and of bax expression. J. Biol. Chem. 2005; 280: 22297-22307.
83. **Creutzfeldt W., Ebert R., Willms B., et al.:** Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin in obesity: Increased response to stimulation and defective feedback control of serum levels. Diabetologia 1978; 14: 15-24.
84. **Salera M., Giacomoni P., Pironi L., et al.:** Gastric inhibitory polypeptide release after oral glucose; relationship to glucose intolerance, diabetes mellitus, and obesity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1982; 55: 329-336.

-
85. **Miyawaki K., Yamada Y., Ban N., et al.:** Inhibition of gastrin inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat. Med.* 2002; 8: 738-742.
86. **Gault V.A., Irwin N., Green B.d., et al.:** Chemical ablation of gastric inhibitory polypeptide receptor action by daily (Pro3)GIP administration improves glucose tolerance and ameliorates insulin resistance and abnormalities of islet structure in obesity-related diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 2436-2446.
87. **Nyberg J., Anderson M.F., Meister B., et al.:** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *J. Neurosci.* 2005; 25: 1816-1825.
88. **Bollag R.J., Zhong Q., Ding K.H., et al.:** Glucose-dependent insulinotropic peptide is an integrative hormone with osteotropic effects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001; 177: 35-41.
89. **Zhong Q., Itokawa T., Sridhar S., et al.:** Effects of glucose-dependent insulinotropic peptide on osteoclast function. *Am. J. Physiol.* 2007; 292: E543-E548.
90. **Nauck M.A., Bartels E., Orscov C., et al.:** Lack of effect of synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] infused at near-physiological concentrations on pentagastrin-stimulated gastric acid secretion in normal human subjects. *Digestion* 1992; 52: 214-221.
91. **Lacroix A., Bolte E., Tremblay J., et al.:** Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion – a new cause of Cushing’s syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327: 974-980.
92. **White J.W., Saunders G.F.:** Structure of the human glucagon gene. *Nucl. Acids. Res.* 1986; 14: 4719-4730.
93. **Novak U., Wilks A., Buell G., McEven S.:** Identical messenger RNA for preproglucagon in pancreas and gut. *European Journal of Biochemistry* 1987; 164: 553-558.
94. **Mojsov S., Heinrich G., Wilson I.B., Ravazzola M., Orci L., Habener J.F.:** Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of posttranslational processing. *Journal of Biological Chemistry* 1986. 261: 11880-11889.
95. **Thim L., Moody A.J.:** The primary structure of porcine glicentin (proglucagon). *Regulatory peptides* 1981, 2: 139-150.
96. **Suda K., Takahashi H., Fukase N., et al.:** Distribution and molecular forms of glucagon-like peptide in the dog. *Life Sci.* 1989, 45: 1793-1798.
97. **Hermann C., Goke R., Richter G., et al.:** Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 1995; 56: 117-126.
98. **Rocca A.S., Brubaker P.L.:** Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 1999; 140: 1687-1694.
99. **Anini Y., Brubaker P.L.:** Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* 2003; 52: 252-259.
100. **Megier J.J., Nauck M.A., Kranz D., et al.:** Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes* 2004, 53: 654-662.
101. **Lamers D., Famulla S., Wronkowitz N., et al.:** Dipeptidyl Peptidase 4 Is a Novel Adipokine Potentially Linking Obesity to the Metabolic Syndrome. *Diabetes* 2011; 60: 1917-1925.
102. **Drucker D.J., Nauck M.:** The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006, 11 (368): 1696-1705.
103. **Drucker D.J.:** The biology of incretin hormones. *Cell. Metab.* 2006, 3: 153-165.
104. **Deacon C.F., Nauck M.A., Toft-Nielsen M., et al.:** Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide-1 are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 1995; 44: 1126-1131.

-
105. **Ruiz-Grande C., Alarcon C., Alcantara A., et al.:** Renal catabolism of truncated glucagon-like peptide 1. *Horm. Metab. Res.* 1993; 25:612-616.
106. **Orscov C., Andreasen J., Holst J.J.** All products of proglukagon are elevated in plasma from uremic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992; 74: 379-384.
107. **Meier J.J., Nauck M.A., Kranz D., et al.:** Secretion, degradation and elimination of glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide on patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes* 2004; 53: 654-662.
108. **Campus R.V., Lee Y.C., Drucker D.J.:** Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 1994; 134: 2156-2164.
109. **Holz G.G.; Kuhlreiber W.M., Habener J.F.:** Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* 1993; 361: 362-365.
110. **Heller R.S., Kieffer T.J., Habener J.F.:** Insulinotropic glucagon-like peptide 1 receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes* 1997; 46: 785-791.
111. **Abraham E.J., Lech C.A., Lin J.C., et al.:** Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 2002, 143: 3152-3161.
112. **Tourell C., Bailbé D., Meile M.J., et al.:** Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes* 2001, 50: 1562-1570.
113. **Li Y., Hansotia T., Yusta B., et al.:** Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2003 Jan.3, 278: 471-478.
114. **Szayna M., Doyle M.E., Betkey J.A., et al.:** Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology* 2000; 141: 1936-1941.
115. **Turton M.D., O'Shea D., Gunn I., et al.:** A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 1996, 379: 69-72.
116. **Greig N.H.; Mattson M.P., Perry T., et al.:** New therapeutic strategies and drug candidates for neurodegenerative diseases: p53 and TNF-alpha inhibitors, and GLP-1 receptor agonists. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2004, 1035: 290-315.
117. **Perry T., Lahiri D.K., Sambamurti K., et al.:** Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron. *J. Neurosci. Res.* 2003, 72: 603-612.
118. **Perry T., Holloway H.W., Weerasuriya A., et al.:** Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory. *Exp. Neurol.* 2007, 203: 293-301.
119. **During M.J., Cao L., Zuzga D.S., et al.:** Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat. Med.* 2003, 9: 1173-1179.
120. **Meier J.J., Gallwitz B., Salmen S., et al.:** Normalisation of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 2718-2725.
121. **Dupre J., Beheme M.T., Hramiak I.M., et al.:** Glucagon-like peptide 1 reduces postprandial glycemic excursion in IDDM. *Diabetes* 1995; 44: 626-630.
122. **Kavianipour M., Ehlers M.R., Malmberg K., Ronquist G., et al.:** Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide prevents the accumulation of pyruvate and lactate in the ischemic and non-ischemic porcine myocardium. *Peptides* 2003, 24: 569-578.

-
123. **Luque M.A., González N., Márquez L., et al.:** Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes. *J. Endocrinol* 2002, 173: 465-473.
124. **Poornima I., Brown S.B., Bhashyam S., et al.:** Chronic glucagon-like peptide-1 infusion sustains left ventricular systolic function and prolongs survival in the spontaneously hypertensive, heart failure-prone rat. *Circ. Heart Fail.* 2008, 1:153-160.
125. **Ban K., Noyan-Ashraf M.H., Hoefer J., et al.:** Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* 2008, 117: 2340-2350.
126. **Ruiz-Grande C., Alarcón C., MZrida L., et al.:** Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* 1992; 13: 13-16.
127. **Villanueva-Penacarrillo M.L., Marquez L., Gonzales N., et al.:** Effect of GLP-1 on lipid metabolism in human adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 2001; 33: 73-77.
128. **Larsen P.J., Tang-Christesen M., Jessop D.S.:** Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 1997; 138: 4445-4455.
129. **Ryan A.S., Egan J.M., Habener J.F., et al.:** Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 – (7-37) appears not to augment insulin-mediated glucose uptake in young men during euglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 2399-2404.
130. **Moreno C., Mistry M., Roman R.J.:** Renal effects of glucagon-like peptide in rats. *Eur.J.Pharmacol.* 2002, 434: 163-167.
131. **Gutzwiller J.P., Tschopp S., Bock A, et al.:** Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese man. *J.Clin.Endocrinol.Metabol.* 2004, 89:3055-3061.
132. **Gutzwiller J.P., Hruz P., Huber A.R., et al.:** Glucagon-like peptide 1 is involved in sodium and water homeostasis in humans. *Digestion.* 2006, 73: 142-150.
133. **Geelhoed-Duijvestijn P.H.:** Incretins: a New treatment option for type 2 diabetes? *J. Med.* 2007, 65: 60-64.
134. **Körner M., Stöckli, Waser B., et al.:** GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. *J.Nucl.Med.* 2007, 48, 5: 736-743.
135. **Gotthardt M., Fischer M., Naeher I., et al.:** Use of the incretin hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1) for the detection of insulinomas: initial experimental results. *Eur.J.Nucl.Med.* 2002, 29: 597-606.
136. **Mäcke H., Wild D., Christ E., et al.:** Glucagon-like peptide 1 – receptor scans to localize occult insulinomas. *N.Engl.J.Med.* 2008, 359: 766-768.
137. **Schork N.J., Chakravarti A.:** A nonmathematical overview of modern gene mapping techniques applied to human disease. *Mockrin SC (red)Molecular genetics and gene therapy of cardiovascular disease.* Marcel Dekker, Inc., New York 1996; 79-109.
138. **Boutin B., Froguel P.:** Genetics of human obesity. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol Metab.* 2001; 15: 391-404.
139. **Martinez J.A.:** Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc. Nutr. Soc.* 2000; 59: 337-345.
140. **Pirola L., Balcerzyk A., Okabe J., et al.:** Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2010; 6: 665-675.
141. **Frayling T.M.:** Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nature Rev. Genetics* 2007; 8: 657-662.
142. **Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I et al.:** Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006; 38:320-32
143. **Jin T:** The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 2008; 51: 1771-1084

-
144. **Peifer M., Polakis P.:** Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis – a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287: 1606-1609.
145. **Jin T.:** The Wnt signaling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 2008; 51: 1771-1780.
146. **Ni Z., Anini Y., Fang X., et al.:** Transcriptional activation of the proglukagon gene by lithium and beta-caterin in intestinal endocrine L cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 1380-1387.
147. **Shu L., Sauter N.S., Schulthess F.T., et al.:** TCF7L2 regulates cell survival and function in human pancreatic islets. *Diabetes* 2008; 57: 645-653.
148. **Liu Z., Habener J.F.:** Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta-cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 8723-8735.
149. **Fujino T., Asaba H., Kang M.J., et al.:** Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 229-234.
150. **Yi F., Sun J., Lim G.E., et al.:** Crosstalk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* 2008; 149: 2341-2351.
151. **Grant S.F., Thorleiffson G., Reynisdottir I., et al.:** Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 2006; 38: 320-323.
152. **Hayashi T., Iwamoto Y., Kaku K., et al.:** Replication study for the association of TCF7L2 with the susceptibility to the type 2 diabetes In a Japanese population. *Diabetologia* 2007; 50: 980-984.
153. **Helgason A., Palsson S., Thorleiffson G., et al.:** Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat. Genet.* 2007; 39: 218-225.
154. **Schoonjans K., Staels B., Auwerx J.:** The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), and thair effects on lipid metabolism, and adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1302: 93-109.
155. **Sokolowska M., Kowalski L.M., Pawliczak R.:** Receptory aktywowane przez proliferatory peroksosomów- γ (PPAR- γ) oraz ich rola w immunoregulacji i kontroli reakcji zapalnej. *Postepy Hig Med. Dosw* 2005; 59: 472-484.
156. **Lim H., Gupta R.A., Ma W.G., et al.:** Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR δ . *Genes Dev* 1999; 13:1561-1574.
157. **Wu Z., Puigserver P., Andersson U., et al.:** Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the termogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999; 98: 115-124.
158. **Rosen E.D., Walkey C.J., Puigserver P., et al.:** Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes. Dev.* 2000; 345: 161-179.
159. **Sears I.B., MacGinnitie M.A., Kovacs L.G., et al.:** Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16: 3410-3419.
160. **Cho N., Momose Y.:** Peroxisome proliferator-acticated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Curr. Top. Med. Chem.* 2008; 8: 1483-1507.
161. **Fajas L., Auboeuf D., Rasspe E., et al.:** The organisation, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, 1997; 272: 18779-18789.
162. **Elbrecht A., Chen Y., Cullinan C.A., et al.:** Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proloferator activated receptors gamma-1 and gamma-2. *Biochem Biophys res Commun*, 1996; 224: 431-437.
163. **Luan J., Browne P.O., Harding A.H., et al.:** Evidence for gene-nutrient interaction at the PPAR gamma lows. *Diabetes* 2001; 50(3): 686-689
164. **Hamer O.W., Forstner D., Ottinger I., et al.:** The Pro115 Gln polymorphism within the PPAR gamma 2 gene has no epidemiological impact on morbit obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabet.* 2002; 1120(5): 230-234.

-
165. **Sanchez J.L.G., Rios M.S., Perez C.F., et al:** Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ -2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur. J. Endocrinol.*, 2000; 147: 495–501.
166. **Deurenberg P:** The assessment of obesity: methods for measuring body fat and global prevalence of obesity. *Bailliere's Clin Endocr Metab* 1999; 13:1-11.
167. **Alberti KGMM, Zimmet PZ** for the WHO Consultation: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* 1998; 15:539-53.
168. **Kanauchi M, Yamano S, Kanauchi K, Saito Y:** Homeostasis model assesment of insuline resistance, quantitative insulin sensivity check index, and oral glucose insulin sensivity index in nonobese, nondiabetic subjects with high-normal blood pressure. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3444-3446.
169. **Haffner SM, Mykkanen L, Festa A, Burke JP, Stern MP:** Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects. *Circulation* 2000; 101: 975-980.
170. **Couldrec R., Peynet J., Cambillaud M., et al.:** Effects of postprandial hyperlipemia on the vitamin E content of the lipoproteins. GERBAP section Lipoproteines. *Clin Chim Acta.* 1998 Oct; 277(2):141-152.
171. **Arderm Ch., Katzmarzyk P., Janssen I., et al.:** Revised Adult Treatment Panel III Guidelines and Cardiovascular Disease Mortality in Men Attending a Preventive Medical Clinic. *Circulation*, 2005; 112: 1478-1485.
172. **Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S.:** Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18: 499-502.
173. **Perfetti R., Zhou J., Doyle M.E., Egan J.M.:** Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*, 2000; 141: 4600-4605.
174. **Nauck M.A.:** Incretin replacement, exenatide: beta-cell-preservation through GLP-1 receptor interaction. The 1st Congress of Controversies in Obesity, Diabetes and Hypertension, Berlin Oct.26-29 2006. Abstract Book , www.codhy.com.p: 22A
175. **Prentki M., Nolan C.J.:** Islet beat cell failure In type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(7): 1802-1812.
176. **Nauck M.A., El-Ouaghlidi A., Gabrys B., et al.:** Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept.* 2004 Nov 15; 122(3): 209-217.
177. **Vilsboll T., Krarup T., Deacon C.F., et al.:** Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2001 Mar; 50(3): 609-613.
178. **Kolovou G.D., Anagnostopoulou K.K., Daskalopoulou S.S., et al.:** Clinical relevance of postprandial lipaemia. *Curr Med Chem.* 2005;12(17):1931-1945. Review.
179. **Ross S.A., Brown J.C., Dupre J.:** Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide following oral glucose in diabetes mellitus. *Diabetes* 1977; 26: 525-529.
180. **Creutzfeldt W., Ebert R., Willms B., et al.:** Gastric inhibitory polypeptide (GIP) an insulin in obesity: increased response to stymultion and defective feedback control of serum levels. *Diabetologia* 1978; 14: 15-24.

-
181. **Salera M., Giacomoni P., Pironi L., et al.:** Gastric inhibitory polypeptide release after oral glucose: relationship to glucose intolerance, diabetes mellitus, and obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982; 55: 329-336.
182. **Ranganath L., Beethy J.M., Morgan L.M., et al.:** Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut* 1996; 38: 916-919.
183. **Yamamoto H., Lee C.e., Marcus J.N., et al.:** Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation incrisis blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 43-52.
184. **Meier J.J., Nauck M.A.:** Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2005; 21: 91-117.
185. **Nystrom T., Gutniak M.K., Zhang Q., et al.:** Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am. J. Physiol.* 2004; 287: E1209-E1215.
186. **Kyssenko V., Eliasson L., Kotova O., et al.:** Pleiotropic effects of GIP on Islet function involves osteopontin. *Diabetes*, published online August 1, 2011; 1-10.
187. **Brubaker P.L.:** The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1070: 10-26.
188. **Paschetta E., Hvalryg H., Musso G.:** Glucose-dependent insulintropic polypeptide: from pathophysiology to therapeutic opportunities in obesity-associated disorders. *Obesity Rev.* 2011; 12: 813-828.
189. **Rijkkelijkhuizen J.M., McQuarrie K., Girman C.J., et al.:** Effects of meal size and composition on incretin, alpha-cell, and beta-cell responses. *Metabolism* 2010; 59: 502-511.
190. **Herrmann C., Goke R., Richter G., et al.:** Glukagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinreleasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 1995; 56: 117-126.
191. **Wachters-Hagedoorn R.E., Priebe M.G., Heimweg J.A.J., et al.:** The rate of intestinal glucose absorbtion is correlated with plasma glucose-dependent insulintropic polypeptide concentration in healthy men. *J. Nutr.* 2006;136: 1511-1516.
192. **Herrmann C., Goke R., Richter G., et al.:** Glukagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinreleasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 1995; 56: 117-126.
193. **Wachters-Hagedoorn R.E., Priebe M.G., Heimweg J.A.J., et al.:** The rate of intestinal glucose absorbtion is correlated with plasma glucose-dependent insulintropic polypeptide concentration in healthy men. *J. Nutr.* 2006;136: 1511-1516.
194. **Asmar M., Tangaa W., Madsbad S., et al.:** On the role of glucose-dependend insulintropic polypeptide in postprandial metabolism in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010; 298: E614-E621.
195. **Asmar M., Simonsen L., Madsbad S., et al.:** GIP may enhance fatty acid re-estrication in subcutaneous, abdominal adipose tissue in lean humans. *Diabetes* 2010; 59: 2160-2163.
196. **Bik W.:** Ocena zależności wydzielania adipokin i insulinooporności oraz asocjacji wybranych polimorfizmów genów adiponektyny i rezystyny w otyłości. *Borgis Postępy nauk medycznych* 12: 912-980.
197. **Szopa M., Malczewska-Malec M., Wybrańska I., et al.:** Warianty genu adiponektyny jako czynnik ryzyka zespołu metabolicznego. *Przegląd Lekarski* 2009; 66: 257-262.
198. **Considine R.V., Sinha M.K., Heinman M.L., et al.:** Serum immunoreactive-leptin concentration in normal-weight and obese humans. *N. England. J. Med.* 1996; 334: 292-295.
199. **Maffei M., Halaas J., Ravussin E., et al.:** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1995; 1: 1155-1161.

-
200. **Dagogo J.S., Fanelli C., Paramore D., et al.:** Plasma leptin and insulin relationship In obese and non-obese humans. *Diabetes* 1996; 45: 695-698.
201. **Fisher S., Hanefeld M., Haffner S.M., et al.:** Insulin-resistant patients with type 2 diabetes mellitus have higher serum leptin levels independently of body fat mass. *Acta. Diabetol.* 2002; 39: 105-110.
202. **Hotta K., Funahashi T., Arita Y., et al.:** Plasma level of a novel adipose specific protein adiponectin in type 2 diabetes patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20:1595-1599.
203. **Villareal D.T., Robertson H., Bell G.I., et al.:** TCF7L2 variant rs7903146 affects the risk of type 2 diabetes by modulating incretin action. *Diabetes* 2010; 59: 479-485.
204. **Florez J.C., Jablonsky K.A., Bayley N., et al.:** TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 241-250.
205. **Schäfer S.A., Tschritter O., Machicao F et al.:** Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia* 2007; 50: 2443-2450.
206. **Pilgaard K., Jensen C.B., Schou J.H., et al.:** The T allele of rs7903146 *TCF7L2* is associated with impaired insulinotropic action of incretin hormones, reduced 24 h profiles of plasma insulin and glucagon, and increased hepatic glucose production in young healthy men. published online, Springer-Verlag 2009; *Diabetologia* (DOI 10.1007/s00125-009-1307-x).
207. **Gacka M., Adamiec R.:** Mutacje genu receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ (PPAR γ) – implikacje kliniczne. *Postepy Hig. Med./ Dosw. (online)*, 2004; 58: 483-489.
208. **Musso G., Gambino R., Pacini G., et al.:** Prolonged saturated fat-induced, glucose-dependent insulinotropic polypeptide elevation is associated with adipokine imbalance and liver injury in nonalcoholic steatohepatitis: dysregulated enteroadipocyte axis as a novel feature of fatty liver. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 89: 1-10.
209. **Garcia-Martinez J.M., Chocarro-Calvo A., Moya C.M., et al.:** WNT/beta-catenin increases the production of incretins by entero-endocrine cells. *Diabetologia* 2009; 52: 1913-1924.
210. **Gustafson B., Smith U.:** Wnt signaling is both an inducer and effector of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia* 2008; 51: 768-770.
211. **Gonzales Sanches J.L., Serrano Rios M., Fernandez Perez C., et al.:** Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 147: 495-501.
213. **Soriguer F., Morcillo S., Cardona F., et al.:** Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. *J. of Nutr.* 2006: 2325-2330.
214. **Tsai Y.S., Maeda N:** PPARgamma: a critical determinant of body fat distribution in humans and mice. *Trends. Cardiovasc. Med.* 2005; 15: 81-85.
215. **Tontonoz P., Spiegelman B.M.:** Fat and Beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* 2008; 77: 289-312.
216. **Gurnell M.:** PPAR gamma and metabolism: insights from the study of human genetic variants. *Clin. Endocrinol.* 2003; 59(3).
217. **Medina-Gomez G., Gray S.L., Yetukuri L., et al.:** PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet.* 2007; 3: 64.
218. **Lanfear D., Higgins L.:** Combination of a selective PPAR-gamma modulator and an incretin for the treatment of diabetes and obesity. U. S. Patent Application Publication (US 2011/0034380A1); 2011

219. **Sratton I.M., Adler A.I., Neil H.A., et al.:** Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*, 2000; 321: 405-412.