

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Studium vlivu antidiabetika Empagliflozinu na urinární
metabolom experimentálního potkana s diabetes mellitus
2. typu**

Diplomová práce

**Bc. Jana Ludvíková
Výživa a potraviny**

Doc. Ing. Petr Kačer Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Studium vlivu antidiabetika Empagliflozinu na urinární metabolom experimentálního potkana s diabetes mellitus 2. typu " jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Doc. Ing. Petru Kačerovi Ph.D.za odborné vedení, cenné rady, ochotu a vstřícnost při psaní této práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu během celého studia.

Studium vlivu antidiabetika Empagliflozinu na urinární metabolom experimentálního potkana s diabetes mellitus 2. typu

Souhrn

Diplomová práce je zaměřena na urinární metabolom u potkanů, kterým bylo podáván antidiabetikum empagliflozin, pozornost byla také věnována urinárním biomarkerům oxidačního stresu. Metabolom moči byl pozorován na laboratorních neobězních potkanech, kteří se rodí již s metabolickým syndromem. Tento druh potkanů, který je označen jako HHTg potkani, byly vyvinuti z potkanů rodu Wistar v Institutu klinické a experimentální medicíny. HHTg potkanům a potkanům rodu Wistar byl podáván Empagliflozin 1,5 měsíce, kdy jim byla následně odebrána moč v metabolických klecích.

Praktická část se zabývala vývojem analytické necílené metody pro stanovení urinárního metabolomu a cílené metody pro stanovení biomarkerů oxidačního stresu. Cílem bylo posouzení, zda má významný vliv použité farmakoterapie na hladiny urinárních biomarkerů, které souvisí s diabetem mellitem. Necílená analýza urinárního metabolomu byla stanovována na GC/MS. Byla vyvinuta vlastní metoda na stanovení urinární metabolomiky u potkanů, kterým byl podáván empagliflozin. Cílená analýza urinárních biomarkerů analyzovala oxidační stres na UHPLC-QqQ-MS.

Bylo zjištěno, že empagliflozin má schopnost snižovat hladiny jednotlivých urinárních biomarkerů vzhledem k hladinám biomarkerů u potkanů, kterým nebyl podáván empagliflozin. Další vlivy empagliflozinu byly pozorovány na snižování hladin biomarkerů oxidačního stresu u vzorků moči potkanů. Tyto urinární biomarkery oxidačního stresu souvisí s renálním a kardiovaskulárním poškozením, díky empagliflozinu se toto riziko mírně snižuje. Bylo zjištěno, že empagliflozin napomáhá redukovat hmotnost.

Klíčová slova: biomarker, diabetes mellitus 2. typu, GC/MS, metabolomika, oxidační stres, zánět, ceramidy, sfingolipidy

Study of the effect of the antidiabetic Empagliflozin on the urinal metabolome of an experimental rat with type 2 diabetes mellitus

Summary

The master thesis focuses on the urinary metabolome in Empagliflozin-treated rats and also focuses on urinary biomarkers of oxidative stress. The urinary metabolome was observed in laboratory non-obese rats already born with metabolic syndrome. This species of rats, designated as HHTg rats, were developed from Wistar rats at the Institute of Clinical and Experimental Medicine. The HHTg rats and Wistar rats were administered Empagliflozin for 1.5 months, at which time their urine was subsequently collected in metabolic cages.

The practical part was concerned with the development of an analytical non-targeted method for the determination of the urinary metabolome and a targeted method for the determination of biomarkers of oxidative stress. The aim was to assess whether the pharmacotherapy used has a significant effect on urinary biomarker levels associated with diabetes mellitus. Untargeted urinary metabolome analysis was determined by GC/MS. A proprietary method was developed to determine urinary metabolomics in Empagliflozin-treated rats. Targeted urinary biomarker analysis oxidative stress were on UHPLC-QqQ-MS.

Empagliflozin was found to have the ability to reduce the levels of individual urinary biomarkers relative to the levels of biomarkers in rats not treated with Empagliflozin. Additional effects of Empagliflozin were observed on reducing the levels of oxidative stress biomarkers in rat urine samples. These urinary biomarkers of oxidative stress are associated with renal and cardiovascular damage, and empagliflozin slightly reduces this risk. Empagliflozin has been found to help reduce weight.

Keywords: biomarker, type 2 diabetes mellitus, GC/MS, metabolomic, oxidative stress, inflammation, ceramides, sfingolipids

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše.....	10
3.1	Diabetes mellitus	10
3.1.1	Klasifikace diabetu mellitu	10
3.1.1.1	Diabetes mellitus 1. typu	10
3.1.1.2	Diabetes mellitus 2. typu	11
3.1.1.3	Getační diabetes mellitus	11
3.1.1.4	Jiné specifické typy diabetu.....	11
3.1.2	Patofyziologie diabetu	12
3.1.3	Prevence a léčba diabetu mellitu	12
3.2	Inzulin	12
3.2.1	Biosyntéza inzulinu	13
3.3	Antidiabetika	13
3.3.1	Metformin	13
3.3.2	Antidiabetika typu sulfonylmočoviny	14
3.3.3	Inkretinová mimetika.....	14
3.3.4	Glitazony.....	15
3.3.5	SGLT2 inhibitory.....	15
3.3.5.1	Empagliflozin	15
3.4	Metabolický syndrom	17
3.4.1	Hypertenze	18
3.4.2	Inzulinová rezistence	18
3.4.3	Viscerální obezita	18
3.4.4	Dyslipidémie.....	19
3.4.5	Hyperglykémie	19
3.5	Oxidační stres	20
3.5.1	Mechanismus vzniku isoprostanu.....	21
3.5.2	Malondialdehyd	21
3.5.3	Leukotrieny.....	22
3.5.4	Antioxidační ochranný systém	22
3.5.5	Oxidační stres a diabetes mellitus.....	22
4	Metodika	23
4.1	Analyzované vzorky	23
4.1.1	HHTg potkani	23
4.1.2	Wistar potkani.....	23
4.2	Odběr vzorků.....	24

4.3	Použité chemikálie, přístroje a vybavení	24
4.3.1	Použité chemikálie	24
4.3.2	Přístroje a vybavení	25
4.3.3	Lyofilizátor Lyovac GT 2	25
4.3.4	Příprava vzorků pro stanovení urinárních biomarkerů	25
4.4	Stanovení biomarkerů v moči pomocí analytické metody na GC/MS	25
4.5	Stanovení biomarkerů oxidačního stresu.....	25
4.6	Statistické zhodnocení naměřených dat	26
5	Výsledky	27
5.1	Stanovení urinárních biomarkerů u W a HHTg potkanů.....	27
5.2	Chromatografické znázornění urinární metabolomiky	29
5.3	Stanovení biomarkerů oxidačního stresu ve vzorcích moči potkanů	32
5.4	Závěr statistického šetření.....	33
6	Diskuze.....	34
7	Závěr	37
8	Literatura	38
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	45
10	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Oxidační stres hraje významnou roli v rozvoji diabetes mellitus. Je to dáno zvýšeným množstvím reaktivních forem kyslíku (ROS), které mají schopnost poškodit expresi genu inzulinu a jeho sekreci.

Empagliflozin je lék, který je používán ke snížení glykémie u pacientů s diabetem 2. typu. Řadíme ho do třídy moderních perorálních antidiabetik zvaných gliflozinu neboli SGLT2 inhibitory. Toto antidiabetikum má schopnost zabránit zpětnému vstřebávání glukózy prostřednictvím inhibice sodíko-glukózového transportéru SGLT2, která způsobuje terapeutickou glykosurii, při které dochází ke ztrátám 70 g glukózy denně.

V současné době jsou intenzivně studovány jeho další metabolické a hemodynamické účinky, které nemusí mít antidiabetický efekt. V rámci zkoumání tohoto léku bylo laboratorně ověřeno, že má příznivý vliv i na rozvoj renálních a kardiovaskulárních poškození, ke kterým dochází ještě před nástupem diabetu.

Práce se zabývá vlivem empagliflozinu na potkanech, kteří mají metabolický syndrom bez toho, aby byly obézní. Byly sledovány urinární biomarkery, které by mohly mít vliv na diabetes mellitus. Potkani s metabolickým syndromem byly porovnávány s potkany rodu Wistar, kteří nevykazovali známky metabolického syndromu, a proto sloužili jako kontrola. Byla vyvinuta metoda na přípravu vzorků a jejich stanovení, která následně slouží k porovnávání jednotlivých biomarkerů mezi těmito dvěma skupinami potkanů.

Výsledky z cílené močové proteomiky a metaboliky by se mohly řadit mezi vhodné ukazatele metabolických změn v ledvinách, a proto by se mohly využít jako markery počátečních změn renálních dysfunkcí či jako vhodné ukazatele léčby.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézy:

1. T2DM patogeneze koresponduje s koncentračními hladinami signálních molekul – biomarkerů
2. Biomarkery reflektující patogenezi metabolického syndromu a T2DM jsou obsaženy v různých koncentracích v řadě různých biomatric (tuková tkáň, moč, plasma)
3. V průběhu patogeneze T2DM dochází ke změně v koncentraci zánětlivých biomarkerů a biomarkerů oxidačního stresu, které jsou indukovány stravou a stravovacími návyky.
4. Empagliflozin má vliv na koncentrační hladiny biomarkerů v moči.

Cíle práce:

Cílem této práce bude vyvinout analytickou metodu pro monitorování urinárního metabolomu a využít ji pro experimentální studii na laboratorních potkanech s modelovým metabolickým syndromem (=prediabetes), kterým bude podáván empagliflozin. Studie bude kontrolována placebem.

Úlohou této práce bude posoudit vliv použité farmakoterapie na hladiny urinárních biomarkerů diabetes mellitus 2. typu. Pozornost bude věnována monitorování farmakokinetické dráhy empagliflozinu, a dále řadě otázek týkajících se negativní úlohy oxidačního stresu, zánětlivých biomarkerů nebo jako funkce lipidických látek. V současné době nejsou známy příčiny oxidačního stresu při inzulínové rezistenci a diabetu. Dále není známo ani to, zda k oxidačnímu stresu dochází v důsledku zvýšené tvorby volných radikálů nebo z nedostatečného intracelulárního antioxidačního potenciálu, což má zásadní význam z hlediska možného terapeutického ovlivnění.

3 Literární rešerše

3.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je skupina metabolických onemocnění, která je charakterizována hyperglykemií v důsledku poruchy sekrece inzulínu, působení inzulínu nebo obojí. Při chronické hyperglykémii diabetu dochází k poruchám a selháváním různých orgánů, především očí, ledvin, nervů, srdce a krevních cév. Několik patogenních procesů se podílí na vzniku diabetu. Jsou to autoimunitní destrukce beta-buněk slinivky břišní, tím dochází k nedostatku inzulínu za vzniku abnormalit. Nedostatečným působením inzulínu na cílové tkáně je základem abnormalit v metabolismu sacharidů, tuků a bílkovin. Neodstatečný účinek inzulínu dále způsobuje nedostatečnou sekreci inzulínu nebo snížené tkáňové reakce na inzulín (Tiwari et al. 2013).

Počet lidí s diabetem v posledních letech stoupá v důsledku stárnutí populace, obezitou, na kterou má vliv sedavý způsob života (Tiwari et al. 2013). V dnešní době je více pacientů s diabetem 2. typu než s DM prvního typu (Cooke & Plotnick 2008).

3.1.1 Klasifikace diabetu mellitu

V dnešní době jsou identifikovány čtyři typy diabetu mellitu.:

- diabetes mellitus 1. typu
- diabetes mellitus 2. typu
- gestační diabetes
- jiné specifické typy diabetu

3.1.1.1 Diabetes mellitus 1. typu

U diabetu mellitu 1. typu dochází k poškození beta-buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Nefunkčnost beta-buněk je způsobená autoimunitním procesem, který vede k absolutnímu nedostatku inzulínu. (Baynest 2015). Při tomto procesu dochází k destrukci beta-buněk slinivky břišní, na které působí T buňky imunitního systému (Katsarou et al. 2018). Předpoklad rozvoj diabetu 1. typu je pomocí spouštěčů daného prostředí, kteří stimulují autoimunitní reakci proti beta-buňkám slinivky břišní. V těle pacienta, který má diabetes 1. typu lze stanovit protilátky, které způsobují poškození beta-buněk, které je možné stanovit několik let před rozvojem diabetu. Mezi tyto látky řadíme specifické proteiny podobné inzulínu, dekarboxylázu kyseliny glutamové a tyrosin fosfatázu. Tyto látky nemají přímou schopnost poškodit beta-buněk pankreasu. Zvýšené riziko je u osob, kteří mají v rodinné anamnéze příbuzného s diabetem 1. typu (Cooke & Plotnick 2008).

Projevy diabetu prvního typu se většinou objevují již v raném dětství či v dospívání. Příznaky onemocnění jsou zvýšené množství glukózy v krvi, častější močení a s tím spojený pocit žízně a hubnutí. Dále dochází k metabolickým změnám, především ketoacidózy. Příznaky ketoacidózy jsou především nevolnosti, zvracení a dehydratace. Dále je to zvýšená hladina glukózy v krvi po jídle, hodnota je kolem 11,1 mmol/l a nalačno se udává hodnota kolem 7 mmol/l. U tohoto typu diabetu je nutné celoživotně podávat dávky inzulínu (Katsarou

et al. 2018). U diabetu prvního stupně je nutné monitorování množství glukózy v krvi (Gregory et al. 2013). Většinou se diabetes 1. typu stanovuje pouze nalačno není ho již potřeba stanovit po 2 hodinách po jídle (Cooke & Plotnick 2008).

3.1.1.2 Diabetes mellitus 2. typu

Při diabetu mellitu 2. typu (T2DM) dochází k inzulinové rezistenci periferních buněk a k nedostatečné sekreci postprandiálně vyplaveného inzulinu. Pacienti s T2DM většinou mají viscerální obezitu, která souvisí s inzulinovou rezistencí. Kromě inzulinové rezistence diabetici 2. typu často trpí hypertenzí a dyslipidémií, která se projevuje vysokými hladinami triglyceridů a nízkými hladinami HDL-cholesterolu. Nejběžnější forma diabetu mellitu je DM 2. typu (Baynest 2015).

Příznaky DM jsou hyperglykémie, časté močení (polyurie), nadměrní žízeň (polydipsie), ztráta hmotnosti. Dále může docházet k poruše růstu a vyšší náchylnost k infekcím. Mezi dlouhodobé komplikace diabetu řadíme retinopatii se ztrátou vidění, nefropatii, která vede k selhávání ledvin a periferní neuropatii, která může vést až k syndromu diabetické nohy (American Diabetes Association 2014).

3.1.1.3 Gestační diabetes mellitus

Při gestačním diabetu mellitu (GDM) dochází k poruchám glukózové tolerance, které vznikají během těhotenství a po narození dítěte se hladina cukru v krvi vrací do normálu (Baynest 2015). GDM má podobné příznaky jako diabetes mellitus 2. typu, kdy dochází k normální nebo zvýšené sekreci inzulinu a vyznačuje se inzulinovou rezistencí (Anděl et al. 2007).

Těhotné ženy mezi 24. až 28. týdnem jsou vyšetřovány na gestační diabetes mellitus pomocí orálního glukózového tolerančního testu (oGTT), kdy pacientka musí vypít roztok, ve kterém je rozpuštěno 75 g glukózy. U těhotných žen je změřena glykémie nalačno a následně 2 hodiny po zátěžovém testu. Toto vyšetření je doporučováno klientkám, u kterých se v rodině vyskytuje diabetes mellitus nebo měly GDM v předchozích těhotenstvích. Po narození dítěte by se měl tento oGTT zopakovat do 3 měsíců od porodu (Anděl et al. 2007).

GDM je spojován s porodnickými komplikacemi, které souvisí především s vyšší porodní hmotností novorozence. GDM je rizikový faktor pro rozvoj diabetu mellitu nejen pro matky, ale i pro jejich potomky. V současné době se onemocnění GDM vyskytuje stále častěji, je to důsledkem obezity u žen v reprodukčním věku a rostoucím věku matek (Sweeting et al. 2022). GDM má nepříznivý účinek na vývoj plodu, protože může dojít k fetální nebo neonatální úmrtnosti. Bylo zjištěno, že u 10 % žen, u kterých byl zjištěn GDM, se rozvine diabetes mellitus i po těhotenství. Pokud se GDM potvrdí, je nutné dodržovat vhodnou dietu se sníženým množstvím sacharidů a pokud nedojde k upravení hladiny glukózy v krvi, je nutné nasadit vhodná antidiabetika nebo inzulin (Buchanan & Xiang 2005).

3.1.1.4 Jiné specifické typy diabetu

Do této skupiny řadíme pacienty, kteří mají genetické poruchy beta-buněk slinivky břišní nebo poruchy účinku inzulinu. Tento typ diabetu se může rozvinout u pacientů

s pankreatitidou, cystickou fibrózou nebo u osob, které mají poruchu slinivky břišní způsobenou léky nebo chemikáliemi (Baynest 2015).

Mnoho léků způsobuje narušení sekrece inzulínu, ale nemusí vyvolat diabetes mellitus. Mezi chemikálie, které poškozují beta-buňky slinivky břišní, jsou řazeny vacor, což je jed na myši nebo pentamidin. Reakce léků a chemikálií k rozvoji diabetu mellitu jsou však většinou vzácné (American Diabetes Association 2014). Specifický typ diabetu mellitu se může rozvinout u pacientů, kterým jsou podávány glukokortikoidy, neuroleptika, interferony nebo již zmíněný pentamidin (Petersmann et al. 2019)

3.1.2 Patofyziologie diabetu

Po konzumaci jídla dochází ke zvýšení hladiny glukózy v krvi, která má za následek vyloučení inzulínu, to vede ke zvýšenému přenosu, biotransformaci a ukládání glukózy do svalů a tukových tkání. Inzulín má schopnost inhibovat sekreci glukagonu a snížení hladiny mastných kyselin v krevním séru. Při nedostatku inzulínu nebo jeho rezistenci vede ke sníženému vychytávání glukózy tkání a následně nastává intracelulární hypoglykémii a extracelulární hyperglykémii. Intracelulární hypoglykémii způsobuje diabetickou ketoacidózu a snižuje tvorbu bílkovin a gamaglobulinů. Při extracelulární hyperglykémii dochází k hyperglykemickému komatu a osmotické diuréze (Asmat et al. 2016).

3.1.3 Prevence a léčba diabetu mellitu

U diabetu mellitu 1. typu není možná prevence, důležité je udržení normální hladiny glykémie a arteriálního tlaku. Hodnota arteriálního tlaku by se měla pohybovat okolo 130/80. Léčba u tohoto onemocnění spočívá v podávání inzulínu či jiného antidiabetika, aby došlo k zajištění dostatečného denního množství inzulínu ((Anděl et al. 2007).

U diabetu mellitu 1. typu se většinou používají rekombinované inzulínové analogy nebo inzulínové pumpy (Cooke & Plotnick 2008).

Diabetici s 2. typem musí dodržovat redukční dietu s nižším obsahem sacharidů, pokud daná dietoterapie nezabírá začínají se podávat antidiabetika. Kromě diety je vhodný zařadit pohyb, který zlepšuje inzulínovou citlivost. Správná strava a pohyb zajišťují prevenci proti diabetu mellitu 2. typu. U specifických typů diabetu je prevence a léčba stejná jako u TDM2 (Anděl et al. 2007).

3.2 Inzulín

Inzulín je peptidový hormon, který je vylučovaný beta-buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Jeho funkcí v těle je především udržování správné hladiny glukózy v krvi, regulace metabolismu sacharidů, lipidů a proteinů a podporuje buněčné dělení a jejich růst (Wilcox 2005).

Inzulín má příznivé účinky inzulínu na kosterní svaly, játra a bílé adipocyty, ale v těchto tkáních mají odlišný účinek. V kosterním svalu má inzulín podpůrnou funkci ve využití a transportu glukózy a syntézu glykogenu. V játrech dochází pomocí inzulínu k aktivaci syntézy glykogenu. V bílých adipocytech dochází k inhibici lipolýzy a zvyšuje přenos glukózy (Petersen & Shulman 2018).

Inzulin je využíván pro léčbu diabetu mellitu, ale není možné ho podávat peroálně, protože inzulin je nutné aplikovat do podkoží (Lüllmann et al. 2020).

3.2.1 Biosyntéza inzulinu

Syntéza inzulinu začíná v beta-buňkách v Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Na začátku máme signální peptid proinzulin, který se skládá z 24 aminokyselin. Tento signální peptid se zavádí do endoplazmatického retikula, kde dochází k odštěpení signálního peptidu a k tvorbě tří disulfidových můstků proinzulin (Koolman & Rögm 2012).

Proinzulin následně vnikne do Golgiho aparátu, kde dochází k odštěpení 35 aminokyselin pomocí prohormon-konvertázou za vzniku inzulinu a C-peptidu, který je složen z 35 aminokyselin. Proces, při kterém vzniká inzulin začíná v trans-Golgiho aparátu a dále pokračuje v kondenzačních vakuolách a následně je skladován v sekreční vezikule. Zralý inzulin se ukládá do vezikul a odtud je podle potřeby uvolňován do krevního řečiště (Steiner, 2008). Inzulin se přeměňuje z proinzulinu pomocí dvou typů proteáz. Jedna proteáza aktivuje endoproteázu podobnou trypsinu, za jejíž pomoci dochází ke štěpení po párování dvojsytných zbytků na každém konci domény C. Druhá proteáza má aktivovat exopeptidázy a je podobná s karboxypeptidázou B. Druhá proteáza má odstraňovat bazické zbytky, které zůstali po rozdělení látek podobných trypsinu (Weiss et al. 2018).

3.3 Antidiabetika

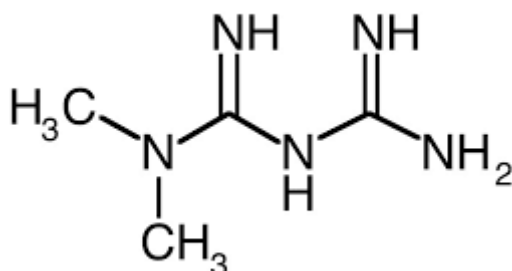
Antidiabetika jsou léčiva, která slouží k udržení správné hladiny glukózy v krvi. Většinou se jedná o léčiva, která jsou přijímané ústy. Mezi antidiabetika řadíme metformin, antidiabetika typu sulfonylmočoviny, inkretinová mimetika, glitazony a inhibitory sodno-glukózového kotrasportéru 2 (Lüllmann et al. 2020).

3.3.1 Metformin

Metformin je řazen mezi biguanidové deriváty. Toto léčivo, je nejčastěji používáno při léčbě diabetu 2. typu. Metformin se může používat samostatně či v kombinaci s jinými antidiabetiky nebo inzulinem. Účinek, při kterém dochází k udržení normální hladiny glukózy v krvi, je způsoben převážně inhibicí uvolňování glukózy z jater. Při používání tohoto antidiabetika nedochází ke zvýšené sekreci inzulinu, a proto se u pacientů neprojeví hypoglykémie. Toto léčivo je přijímáno ústy. Je vhodný především pro pacienty s diabetem 2. typu, kteří trpí nadváhou nebo obezitou s normální funkcí ledvin (Song 2016).

Mezi nežádoucí účinky při užívání metforminu jsou nechutenství, nevolnosti či průjem. Toto antidiabetikum není doporučeno lidem, kteří mají sníženou funkci ledvin nebo

u onemocnění, při kterém dochází k hypoxii, z tohoto důvodu se nedoporučuje starším lidem (Lüllmann et al. 2020).



Obr. č. 1 Strukturální vzorec metforminu (Adegbola et al. 2017)

3.3.2 Antidiabetika typu sulfonylmočoviny

Toto antidiabetikum má za účinek uvolňování inzulínu z beta-buněk pankreatu, odkud stimuluje sekreci inzulínu z beta-buněk při aktivaci receptoru sousedícího s K^+ ATP kanálem na buněčné membráně. U antidiabetika typu sulfonylmočoviny je potřeba upravit příjem potravy. Mezi antidiabetika typu sulfonylmočoviny řadíme repaglidin, nateglidin, glibenklamid a glimepirid (Lüllmann H. et al. 2020).

Antidiabetika typu sulfonylmočoviny jsou využívány především pro léčbu diabetu 2. typu. Hlavním cílem tohoto antidiabetika je ATP-senzitivní draslíkový kanál, který je důležitý v řízení beta-buněčné membrány. Inhibicí těchto kanálů pomocí glukózy nebo sulfonylmočoviny dochází k depolarizaci membrán beta-buněk. Kromě účinku na sekreci inzulínu, má vliv na kontrolu napětí hladkého svalstva cév a tím ovlivňuje i krevní tlak (Proks et al. 2002).

Repaglinid a nateglidin se na rozdíl od glibenklamidu a glimepiridu podává těsně před jídlem, protože má rychlejší účinek (Lüllmann et al. 2020).

Nevýhodou tohoto léčiva je, že při podávání antidiabetika může dojít k hypoglykémii, protože urychluje apoptózu beta-buněk a jejich vyčerpání (Del Prato & Pulizzi 2006).

3.3.3 Inkretinová mimetika

Inkretinová mimetika jsou látky s antihyperglykemickými účinky, které mají podobný účinek jako inkretinové hormony, které pocházejí ze střeva. Používají se především pro léčbu diabetu mellitu 2. typu. Účinek těchto mimetik je především zvýšená sekrece inzulínu, který je závislý na glukóze, inhibici zvýšeného glukagonu, zpomalení vyprazdňování žaludku a má schopnost snižovat chuť k jídlu (Hinnen et al. 2006).

Inkretinová mimetika můžeme rozdělit na přímá a nepřímá inkretinová mimetika. Mezi přímá inkretinová mimetika můžeme zařadit exenatid, lixisenatid a liraglutid, což jsou látky podobné inkretinu. Sitagliptin a vildagliptin jsou nepřímá inkretinová mimetika, který rozděluje peptid 1 podobný glukagonu (Lüllmann et al. 2020).

3.3.4 Glitazony

Tyto peroální antidiabetika mají antihyperglykemický účinek. Jsou využívány pro léčbu diabetu mellitu 2. typu. Jejich význam je především v tom, že dochází ke zvýšení citlivosti na inzulin v závislosti na příjmu glukózy. Mezi glitazony řadíme pioglitazon. Glitazony jsou inhibitory (Lüllmann et al. 2020).

Pioglitazon je aktivátor peroxisomového proliferátoru aktivovaného receptoru, který vede k transkripci různých proteinů, kteří regulují metabolismus glukózy a lipidů. To vede ke změnám množství syntézy proteinů. Tyto proteiny mají schopnost zesilovat post-receptorové působení inzulinu v játrech a periferních tkáních. Díky tomu dochází ke zlepšení glykemické kontroly, při které nedochází ke zvýšení endogenní sekrece inzulinu. Pioglitazon může být používán jako monoterapie či v kombinaci s metforminem, sulfonylureou nebo inzulinem. Při monoterapii docházelo k otokům a k hypoglykémii. Z tohoto důvodu je lepší využívat tato antidiabetika v kombinaci se sulfonylureou nebo inzulinem, kde nedocházelo k žádné hepatotoxicitě (Gillies & Dunn 2012). Při léčbě glitazony došlo ke zvýšení glukózových transportérů 1 a 4, snížení volných mastných kyselin, ke snížení inzulinové rezistence a k remodelaci tukové tkáně (Smith 2001).

Nevýhodou léčby glitazony je, že zvyšují tělesnou hmotnost u pacientů a vzniká riziko srdečního selhání a kostních fraktur (Kumar & Nanjan 2010).

3.3.5 SGLT2 inhibitory

SGLT2 inhibitory jsou glifloziny a mají schopnost inhibovat absorpci glukózy z ledvin bez závislosti na inzulinu. Dochází především k snížení účinnosti sodno-glukózového transportéru 2 (SGLT2). Tyto léčiva jsou podávány per os tj. ústy.

SGLT2 mají schopnost reabsorbovat glukózu v ledvinách. Pomocí SGLT2 inhibitorů, dochází k inhibici SGLT2 a tím se snižuje renální reabsorpce glukózy, následné vylučování glukózy močí a snížení koncentrace glukózy v plazmě. Inhibice SGLT2 má za následek snížení hmotnosti způsobenou omezením dostupných kalorií v důsledku vylučování glukózy močí. Díky tomu dochází k úbytku viscerálního tuku (Scheen 2014).

SGLT2 je sodno-glukózový transportér, který se vyskytuje pouze v ledvinové tkáni. Nachází se v tubulu nefronu ledviny a má schopnost reabsorbovat glukózu až z 90 % (Kalra 2014).

Mezi glifloziny řadíme empagliflozin, kanagliflozin a dapagliflozin, ipragliflozin a tofogliflozin. Dapagliflozin je vysoce účinný inhibitor SGLT2, který se po podání ústy rychle vstřebává. Tyto léčiva mohou být podávány samostatně či s jinými antidiabetiky v kombinaci s dietou a pohybovou aktivitou. Glifloziny se mohou kombinovat i s inzulinem. Jejich účinek je především ve snížení plazmatické hladiny glukózy nalačno a tělesné hmotnosti (Jung et al. 2014).

3.3.5.1 Empagliflozin

Toto antidiabetikum je řazeno mezi glifloziny. Jeho účinky jsou především v inhibici sodíko-glukózového transportéru 2. Využívá se především na léčbu dospělých s diabetem 2. typu. Empagliflozin není doporučený pro léčbu diabetu 1. typu, protože hrozí diabetická

ketoacidóza a další komplikace spojené s diabetem. Empagliflozin nebyl doporučený podávat během těhotenství a kojení (Jardiance 2020). Empagliflozin se podává per os jednou denně, a proto je při jeho podávání pouze nízké riziko hypoglykémie, a z tohoto důvodu není závislý na účinku inzulínu. Může se využívat samostatně či v kombinaci s jinými antidiabetiky. (Frampton 2018).

Inhibice SGLT2 s empagliflozinem vede ke glukosurii, tj. vylučování glukózy ledvinami a neschopnost zpětného vstřebání glukózy ledvinami. Látky, které mají schopnost podpory glukosurie, vedou ke snížení hladiny glukózy v krvi a tím předchází dlouhodobým komplikacím, které jsou spojené s diabetem (Kalra 2014).

Empagliflozin je využíván jako monoterapie u pacientů u kterých není vhodné podávat metformin, protože není možné u nich dostatečně sledovat glykémii z výživy a cvičení. Mezi nežádoucí účinky empagliflozinu jsou řazeny infekce močových cest a genitální infekce, které jsou příčinou zvýšené hladiny glukózy v moči (Scheen 2014).

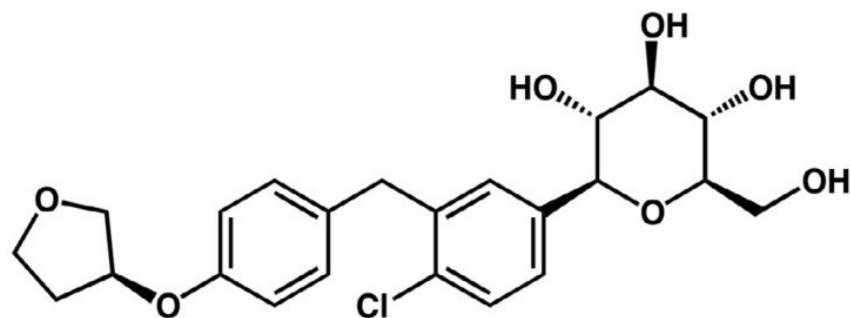
Díky empagliflozinu dochází k zamezení opětovnému vstřebávání glukózy v proximálním tubulu v ledvinách. Empagliflozin nemá vliv na ostatní sodno-glukózové transportéry, má vyšší selektivitu k SGLT2 než SGLT1 a to až 5000krát vyšší.

Další přínosy empagliflozinu jsou snížení tělesné hmotnosti a snížení krevního tlaku. Toto antidiabetikum je vhodné využít u pacientů s kardiovaskulárním rizikem, protože má kardioprotektivní a renoprotektivní účinky (Frampton 2018). Kromě těchto účinků má empagliflozin také pozitivní vliv na snižování markerů zánětu (Trnovska et al. 2021). Množství glukózy vyloučené močí se pohybovalo od 46,3 do 89,8 g. Hladiny glukózy v krvi nalačno byly empagliflozinem sníženy o 17,2 až 25,8 % (Heise et al. 2013).

Po podání empagliflozinu, došlo k rychlé absorpci, přičemž maxima plazmatických koncentrací bylo dosaženo po hodině a půl od podání tohoto antidiabetika. Vysoké tkáňové koncentrace léčiva, které byly pozorovány hodinu a půl od podání, byly převážně měřeny v trávicím traktu, moči a žluči. V klinických studiích bylo zjištěno, že není významný rozdíl mezi zdravými jedinci a pacienty s diabetem 2. typu. Klinickými studiemi bylo dále zjištěno, že jídlo neovlivňuje absorpci empagliflozinu. Po podání léčiva došlo ke zvýšení množství glukózy v moči (Heise T et al., 2013). Při distribuci perorálně podaného empagliflozinu zdravým dobrovolníkům, mělo léčivo dvakrát vyšší afinitu k plazmatickým bílkovinám než k červeným krvinkám (Macha et al. 2014).

Přeměna empagliflozinu převážně zahrnuje glukuronidaci a v menší míře oxidaci. Nejvíce zastoupené metabolity empagliflozinu jsou 3 glukuronidové konjugáty, kdy u lidí dochází ke glukuronidaci uridinu-5-difosfátu pomocí glukurinosytrasyferázami. V moči bylo možné vyhledat pouze malé množství těchto metabolitů (Riggs et al. 2013). Léčivo je většinou vyloučeno stolicí nebo močí, v obou případech došlo k vyloučení v nezměněné podobě mateřské léčivé látky. U potkanů dochází k vylučování léčiva pomocí žluče. Poločas eliminace byl stanoven na 12,4 hodiny (Scheen 2014). Nebyl zjištěn žádný významný vliv na farmakokinetiku empagliflozinu v kombinaci s metforminem (Heise et al. 2013).

Klinickými studiemi byly zjištěny 3 metabolitové skupiny, které jsou spojeny s mitochondriální funkcí, byly zvýšeny po léčbě empagliflozinem. První metabolitová skupina trikarboxylované kyseliny (TCA), která má významnou roli v mitochondriální energii. Cyklus TCA byl zvýšen jak v plazmě, tak i v moči. Dále u potkanů po léčbě empagliflozinem dochází ke snížení hladin pyruvátu, které je doprovázeno sníženým množstvím laktátu. Snížení hladin pyruvátu a laktátu závisí na výši mitochondriálním vychytávání a toku pyruvátu do TCA. Další dvě metabolitové skupiny, zahrnují metabolity alaninu, aspartátu, skupinu metabolitů glutamátu a propanoátu. Obě tyto metabolitové skupiny měly zvýšené hladiny glukózy v plazmě po podání empagliflozinu. Tyto skupiny obsahovaly metabolity, které byly produkovány pomocí enzymů mitochondrií, což vedlo ke zlepšení mitochondriálních funkcí s inhibicí SGLT2 transportéru. Při léčbě empagliflozinem došlo ke snížení potřeby dávky inzulínu a to průměrně o 16,4 % (Liu et al. 2021).



Obr. č. 2 Vzorec empagliflozinu (Jigheh et al. 2019)

3.4 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom (MetS) je odborný termín pro soubor klinických, metabolických a biochemických abnormalit. Mezi rizikové faktory metabolického syndromu řadíme hypertenzi, inzulinovou rezistenci, viscerální obezitu a dyslipidémii. Tyto rizikové faktory pak zvyšují riziko diabetes mellitus 2. typu, onemocnění koronárních tepen a mrtvici. V dnešní době se metabolický syndrom stal globálním zdravotním problémem. Mezi převládající rizikový faktor metabolickému syndromu je řazena zejména abdominální obezita (Paley & Johnson 2018).

Ve Spojených státech se MetS vyskytuje u 33 až 39 % lidské populace, v Evropě je prevalence u 18 až 30 %, vyšší podíl je u žen. Počet jedinců trpících metabolickým syndromem se liší v různých oblastech světa, a je závislý na rozdílném genotypu, etnickém původu, životním stylu, stravě a fyzické aktivitě, pohlaví a věku. Klinickými studiemi bylo například zjištěno že muži do 50 let mají vyšší riziko metabolického syndromu než ženy, ale po 50. roce je to naopak. Metabolický syndrom se častěji vyskytuje u starší věkové populace (Zafar et. al., 2018). V posledních dvou desetiletích došlo k celosvětovému nárůstu díky celosvětové epidemie cukrovky a obezity (Eckel et al., 2005). Důvodem vyššího výskytu metabolického syndromu je především nadměrný příjem živin se sedavým způsobem života (Grundy 2016).

Zmírnění metabolického syndromu je schopnost redukovat hmotnost a zvýšit fyzickou aktivitu. Pokud nedojde ke snížení hmotnosti je vhodné zařadit medikamentózní léčbu, aby došlo ke snížení rizika diabetu a kardiovaskulárních onemocnění (Eckel et al. 2005).

3.4.1 Hypertenze

Při hypertenzi dochází ke zvýšení krevního tlaku. Příčiny zvýšení krevního tlaku jsou zvýšení renální reabsorpce sodíku, aktivace renin-angiotenzin-aldosteron a sympatického nervového systému je příčinou zvýšením krevního tlaku. Zvýšený krevní tlak může být pouze systolický, diastolický nebo oba. Udává se, že zvýšený systolický tlak je při hodnotách 130 mmHg nebo vyšších a zvýšený diastolický je 85 mmHg nebo vyšších (Grundy 2016).

Dyslipidémie, obezita či inzulinová rezistence se často vyskytují s hypertenzí (Kaur J., 2014). Hypertenze je častou příčinou v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění a úmrtí na ně. Příčiny hypertenze jsou především zvýšený příjem sodíku, nízký příjem draslíku, obezita, nadměrná konzumace alkoholu, sedavý způsob života a nezdravá strava (Mills et al. 2020).

S oxidačním stresem se zvyšuje výskyt hypertenze. Oxidační stres znamená, že se zvyšuje množství reaktivních volných radikálů a snižuje se množství antioxidantů, jako je například vitamin C nebo superoxiddismutáza (Hirata & Satonaka 2001).

Pro snížení krevního tlaku se využívají blokátory renin-angiotensinového systému, beta-blokátory, blokátory kalciových kanálů či diuretik (Sallah et al. 2021).

3.4.2 Inzulinová rezistence

Při inzulinové rezistenci dochází ke sníženému účinku inzulinu, která je způsobena nedostatečným množstvím receptorů v cílových buňkách (Wilcox 2005). Tato snížená vnímavost inzulinu je příčinou nadměrné výživy, při které dochází ke zvýšenému střádání triacylglycerolů. Dalšími příčinami inzulinové rezistence jsou sedavý způsob života bez jakékoliv pohybové aktivity, nadváha nebo obezita (Lüllmann et al. 2020).

Inzulinová rezistence je prvním znakem k rozvoji vzniku diabetu. U osob s inzulinovou rezistencí dochází k porušení metabolismu glukózy, při kterém dochází ke zvýšení hladiny glukózy nalačno nebo snížený účinek inzulinu po jeho podání (Cornier et al. 2008).

Inzulinová rezistence je jeden z hlavních faktorů při rozvoji kardiovaskulárních onemocnění (Stühlinger et al. 2002).

3.4.3 Viscerální obezita

Viscerální obezita neboli abdominální obezita úzce souvisí s metabolickým onemocněním. Obezita se vyskytuje u lidí s vyššími hodnotami body mass index, který je vyšší než 30 kg/m². Tato obezita je nejrozšířenějším projevem metabolického syndromu. Abdominální obezita se zjišťuje změřením obvodu pasu v poměru obvodu k bokům (Heianza & Qi 2019). Osoby s abdominálním tukem mají větší obvod pasu než normální populace, za větší obvod pasu se u mužů je obvod pasu větší než 102 cm a u žen větší než 88 cm (Grundy 2016).

Viscerální obezita souvisí s inzulinovou rezistencí, protože dochází ke sníženému vychytávání glukózy. V tukové tkáni dochází k aktivaci reninangiotensinového systému, který vede k hypertenzi a inzulinové rezistenci (Huang 2009). Konzumace kaloricky bohatých

potravin, které jsou většinou levné, způsobuje epidemii obezity. Tuková tkáň je složena z adipocytů, stromálních preadipocytů, imunitních buněk a endotelu. Tuková tkáň má schopnost rychle a dynamicky reagovat na změny nadbytku živin prostřednictvím zvětšení a zmnožení adipocytů (Kaur 2014). Obezita je rizikový faktor pro řadu onemocnění, kam řadíme jak diabetes 2. typu, tak i kardiovaskulární onemocnění, hypertenzi, onemocnění žlučových kamenů a některé druhy rakoviny (Eckel et al. 2005). Přebytný tuk se hromadí do různých orgánů nebo tkání, svalů či jater. Tuk, který se vyskytuje v tkáních se nazývá jako ektopický tuk. Tento ektopický tuk, který se vyskytuje v játrech, souvisí s inzulinovou rezistencí. V játrech se přebytný tuk částečně přeměňuje na ketolátky a zbývající mastné kyseliny jsou rozloženy na triglyceridy, které jsou zařazeny mezi lipoproteiny s velmi nízkou hustotou a jsou vylučovány do oběhu (Grundy 2016).

Při viscerální obezitě dochází k nadměrné akumulaci intraabdominální tukové tkáně. Ukládání abdominální tukové tkáně je ovlivněno věkem, pohlavím, genetikou a etnickým původem. U obézních lidí je nutné snížit jejich kalorický denní příjem (Tchernof & Després 2013).

3.4.4 Dyslipidémie

Dyslipidémii můžeme charakterizovat jako kvalitativních lipidové abnormality, které vedou k poruchám ve strukturách metabolismu lipoproteinů a biologických aktivitách lipoproteinu s nízkou a vysokou denzitou (Kaur 2014). Dyslipidémie se projevuje zvýšeným množstvím triglyceridů s nízkými hladinami lipoproteinu s vysokou denzitou (HDL) a malými, hustými částicemi lipoproteinu s nízkou denzitou (LDL). Zvýšené množství LDL cholesterolu je hlavním faktorem pro kardiovaskulární onemocnění. Bylo zjištěno, že pokud je zvolena léčba, při které dojde ke snížení koncentrace LDL, dojde ke snížení rizika výskytu kardiovaskulárních onemocnění a následné smrti (Cornier et al. 2008).

Lipoproteiny s nižší hustotou mají účinek na zvýšení lokálního a systémového zánětu, proliferace buněk svalstva, které má za následek vzniku aterosklerotického plátu. Zatímco lipoproteiny s vyšší hustotou se snaží zmírňovat nebo zabránit ateroskleróze (Helkin et al. 2016).

3.4.5 Hyperglykémie

Při hyperglykémii dochází ke zvýšené hladině glukózy v krvi, se zhoršenou glukózovou tolerancí. Udává se, že má více než 125 mg/dl nebo 7 mmol/l nalačno a vyšší než 180 mg/dl / nebo 11,1 mmol/l za 2 hodiny po jídle. Snížené vylučování inzulínu, zhoršené využití glukózy či zvýšená produkce glukózy vede k hyperglykémii. K regulaci hladiny glukózy v krvi hraje hlavní roli inzulín (Mouri & Badireddy 2021).

Pokud není hyperglykémie léčena, hrozí různé vážné komplikace. Mezi vážné komplikace řadíme poškození oka, ledvin, nervů, srdce a periferního cévního systému. Mezi sekundární příčiny hyperglykémie mohou být poškození slinivky břišní při chronické pankreatitidě či rakovina slinivky břišní, endokrinní poruchy, které způsobují inzulinovou rezistenci. Ke snížené citlivosti na inzulín dochází také při užívání léků jako jsou estrogeny nebo glukokortikoidy a také při gestačním diabetu (McCowen et al. 2001).

Postprandiální hyperglykémie se určuje pomocí faktorů, mezi které řadíme množství a složení jídla, obsah cukrů v jídle, uvolnění inzulínu a zabránění sekrece glukagonu (Giugliano et al. 2008).

3.5 Oxidační stres

Oxidační stres je nerovnováha mezi oxidanty a antioxidační obranou. Biomarkery oxidace se vyskytovaly v tělesných tekutinách a tkáních. Významným biomarkerem oxidačního stresu je 8-isoprostan, který vzniká neenzymatickou oxidací kyseliny arachidonové. Klinickými studii bylo zjištěno, že kromě toho, že 8-isoprostan působí prostřednictvím tromboxanových receptorů. Isoprostanový receptor 8-isoprostan má za následek vazokonstrikci krevních cév a průdušek, snižuje průtok krve ledvinami a má podíl na patologii několika onemocnění. Zvýšené množství 8-isoprostanu v moči bylo zjištěno u pacientů s diabetem druhého typu, s cystickou fibrózou, astmatem a hypertenzí (Syslová et al. 2014).

Volné radikály jsou látky, které se přirozeně vyskytují v lidském těle. Na lidský organismus mohou mít jak pozitivní, tak i negativní účinky (Finaud et al. 2006).

Antioxidační systém je složen z antioxidačních enzymů a neenzymatických enzymů. Mezi antioxidační systémy jsou řazeny kataláza, glutathionperoxidáza a superperoxidáza a mezi neenzymatické antioxidanty jsou například vitamin E, vitamin A, vitamin C, glutathion a kyselina močová. Antioxidační systém zabraňuje škodlivým účinkům (Finaud et al. 2006).

Vznikem reaktivních forem kyslíku, dochází ke zdolání antioxidační obrany a tím vzniká oxidační stres. Reaktivní formy kyslíku jsou významní poslové v intracelulárních signalizačních kaskádách, které jsou zaměřené na udržení buňky v homeostáze a jejích okolím. Při vyšší úrovni může docházet k poškození biologických molekul, které vedou ke ztrátám funkce buňky nebo její smrti (Burton & Jauniaux 2011).

Mezi reaktivní formy kyslíku řadíme hydroxylový radikál, superoxidový aniontový radikál, peroxid vodíku a singletový kyslík (ROS), které mají souvislost s různými lidskými onemocněními, které souvisí se zánětem. Oxidací proteinů, lipidů a nukleových kyselin pomocí ROS, vede ke strukturálním a funkčním buněčným změnám. Vlivem nezdravého chování, které souvisí s životním stylem a z expozic z pracovního a ze životního prostředí, dochází ke zvýšení hladin biomarkerů oxidativního stresu (Graille et al. 2020). ROS mohou vznikat endogenně, nebo exogenními faktory, mezi které řadíme tabákový kouř a záření. Příkladem endogenních faktorů jsou oxidační vzplanutí během aktivace fagocytů či z mitochondrií (Czerska et al. 2016). Oxidační stres je akceptovaný jako významný znak pro akutní a chronické onemocnění, mezi které řadíme různé typy rakovin, kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní onemocnění, onemocnění plic či normální proces stárnutí (Montuschi et al. 2004).

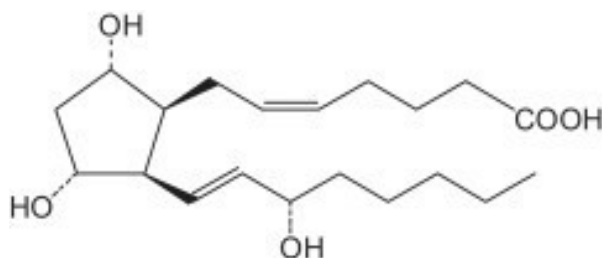
Isoprostan oproti jiným markerům oxidačního stresu jsou chemicky stabilní, specifické produkty peroxidace. Nachází se v detekovaných množstvích ve tkáních a biologických tekutinách a nemá na ně vliv obsah lipidů ze stravy (Czerska et al. 2016). Zvýšené množství isoprostanů v plazmě a moči, se vyskytovaly u několika syndromů, které mají spojitost s tvorbou volných radikálů. Řadíme mezi ně otravu paracetamolem, kouření cigaret, onemocnění jater, které je vyvolané pitím alkoholu. U asymptomatických pacientů s hypercholesteromií, dochází ke zvýšenému množství isoprostanů v moči a v aterosklerotickém plátu (Rokach et al. 1997).

3.5.1 Mechanismus vzniku isoprostanu

Peroxylový radikál vzniká po odejmutí basallylového atomu vodíku a přidání molekuly kyslíku na kyselinu arachidonovou. Následně peroxylový radikál podstoupí 5-exocyklizaci a k hlavnímu řetězci sloučeniny se připojí druhá molekula kyslíku a tím vzniká prostaglandin G2. Poté dochází k redukci nestabilních bicykloendoperoxidových meziproductů na F2-isoprostany (Musiek et al. 2005).

Tímto mechanismem vznikají čtyři isoprostan F2 regioizomery. Podle toho na který atom uhlíku je připojen postranní řetězec hydroxyly, je označujeme jako 5, 12, 8 nebo 15-řadové isoprostany (Milne et al. 2008).

Isoprostany mají prostanový kruh typu F a jsou izomerní k prostaglandinu F2 α . F2-isoprostany mají vysokou stabilitu, a proto se u nich dá nejpřesněji měřit oxidační stres (Musiek et al. 2005).



Obr. č.3 Strukturální vzorek 8-isoprostanu (Mizuno & Kataoka 2015)

3.5.2 Malondialdehyd

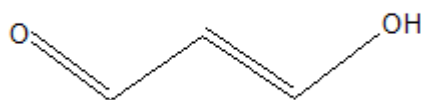
Malondialdehyd je produktem peroxidace lipidů a biosyntézy prostaglandinů. Malondialdehyd má mutagenní a karcinogenní účinky, protože reagují s DNA za vzniku deoxyguanosinu a deoxyadenosinu (Del Rio et al. 2005).

Peroxidace lipidů produkuje komplexní řadu produktů a řada z nich jsou reaktivní elektrofilové. Polynenasycené mastné kyseliny mají jednu nebo více methylenovaných skupin, které se nacházejí mezi cis dvojnými vazbami. Tyto skupiny jsou velice reaktivní k oxidačním činidlům. Na začátku vznikají peroxylové radikály, které vznikají z reakce polynenasycených mastných kyselin. Osud peroxylových radikálů závisí na místě vzniku, pokud se nachází na jednom ze dvou konců, dochází k jeho redukci na hydroperoxid. Ve fosfolipidových membránách se peroxylové radikály redukují na hydroperoxidy pomocí jiné molekuly mastné kyseliny nebo vitamínem E. Vitamin E má za následek redukce peroxylových radikálů a díky tomu zpomalují rychlost peroxidace lipidů (Draper et al. 1986).

Pokud se peroxylový radikál nachází ve vnitřní poloze v řetězci mastné kyseliny, dochází buď ke vzniku peroxylového radikálu nebo radikál se podruhé cyklizuje za vzniku bicyklického peroxidu, který po přijmutí kyslíku a redukci vznikne molekula, která je strukturně podobná endoperoxidu prostaglandinu. Tato molekula je meziproductem pro produkci isoprostanu a malondialdehydu (MDA), kdy dochází k chemické konverzi bicyklické peroxidové skupiny (Marnett. 1999).

Metabolity MDA vylučované močí, jsou významné při mechanismu buněčného poškození ve tkáních. MDA se vyskytuje v moči hladovějících zvířat nebo jsou krmeni dietou

bez MDA, to ukazuje, že se MDA může tvořit in vivo. In vivo vzniká jako produkt neenzymatické peroxidace lipidů, tak enzymaticky při peroxidaci lipidů (Draper et al. 1986).



Obr. č. 4 Strukturní vzorec malondialdehydu (DiMarco 2014).

3.5.3 Leukotrieny

Leukotrieny jako isoprostany jsou biomarkery oxidačního stresu. Leukotrieny jsou lipidové mediátory, které jsou dovozeny od kyseliny arachidonové přes 5-lipoxygenázovou dráhu a leukotrien A4 hydroxylázu (Balanzá et al. 2010). Leukotrieny mají schopnost zesílit a prodloužit záněty v tkáni (Crooks & Stockley 1998).

3.5.4 Antioxidační ochranný systém

Antioxidační ochranný systém, zahrnuje jednotlivé antioxidanty, které spolu navzájem spolupracují. Při porušení jejich rovnováhy nebo jejich nedostatku dochází ke vzniku oxidačního stresu. Složky jsou endogenního a exogenního původu, které se navzájem ovlivňují. Klinickými studiemi bylo zjištěno, že vzájemné působení glutathionu a vitamínu C zmírňují různé oxidační stesy. Beta-karoten a tokoferol spolu synergicky působí proti peroxidaci lipidů. Do antioxidačního ochranného systému řadíme vitamin C, gama-tokoferol či glutathion. Vitamin E sám reaguje s volnými radikály za vzniku tokoferylového radikálu, který musí být regenerován pomocí vitamínu C nebo glutathionu (Jacob 1995).

3.5.5 Oxidační stres a diabetes mellitus

Oxidační stres hraje významnou roli v rozvoji diabetes mellitus. Při tvorbě ROS v nadbytku a času dochází k chronickému oxidačnímu stresu, při kterém dochází k poškození expresi genu inzulinu a sekreci inzulinu (Yang H et al. 2011). Mezi biomarkery oxidačního stresu u diabetu mellitu řadíme lipidy, proteiny, poškození DNA, glutathion a superoxiddismutázu. Zdrojem oxidačního stresu u diabetu jsou mitochondrie, při které se během svého oxidačního metabolismu se kyslík přeměňuje na volný radikál. ROS negativně působí na inzulinovou signalizaci, která následně vede k inzulinové rezistenci (Asmat U et al. 2016).

Mezi komplikace DM, které vznikají působením volných radikálů a oxidačním stresem, řadíme onemocnění koronárních tepen, poškození nervového systému, poškození ledvin, poškození sítnice a mrtvici (Asmat et al. 2016).

Vitaminy A, C a E jsou významné antioxidanty, u diabetu dochází k zvýšení nebo snížení hladin vitamínu E (Asmat et al. 2016).

4 Metodika

4.1 Analyzované vzorky

Pokus byl proveden na dvou skupinách potkanů. První skupina potkanů kmenu Wistar (W) sloužila jako kontrolní skupina, druhá skupina byli HHTg potkani, kteří mají metabolický syndrom a prediabetes. Potkanům v obou skupinách byl od 2.9. - 18.10. 2019 podáván empagliflozin. Rozdělení do jednotlivých skupin je zobrazeno v tab. č. 1.

Rozdělení vzorků močí potkanů			
číslo vzorku	kmen potkanů	Datum	
1.-6.	W	27.8.	Kontrola
9.-14.	W	27.8.	před EMPA
65.-70.	W	17.10.	Kontrola
73.-78.	W	17.10.	po EMPA
17.-22.	HHTg	28.8.	Kontrola
25.-30.	HHTg	28.8.	před EMPA
81.-86.	HHTg	18.10.	Kontrola
89.-94.	HHTg	18.10.	po EMPA

Tab. č. 1 Rozdělení vzorků močí potkanů

4.1.1 HHTg potkani

HHTg potkani jsou to unikátní neobézní kmen Hereditárně Hypertriglyceridemický potkani, kteří byli používáni jako experimentální model prediabetu a metabolického syndromu. Tento kmen byl vyselektován z potkanů kmene Wistar na metabolickém pracovišti Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM).

HHTg potkani prakticky mají všechny symptomy metabolického syndromu, především dyslipidémií, inzulinovou rezistenci, hyperinsulinémií, zhoršenou glukózovou toleranci a mírně zvýšenou hypertenzi. Tento kmen potkanů nevykazuje znaky obezity ani hyperglykémie (Vrána & Kazdová, 1990). Tento kmen potkanů je významný experimentální model, který je vhodný pro studium prediabetických komplikací (Hüttl et al. 2021).

HHTg potkani jsou chováni na pracovišti Centra experimentální medicíny IKEM Praha. Skupina HHTg potkanů byla v rámci výzkumu krmena podle libosti (ad libitně, tj. bez omezení) standardní laboratorní dietou. Byla využívána „Maintenance diet for rats and mice“, Altromin, Lage z Německa. Výzkum na HHTg potkanech probíhal v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s Vyhláškou č. 311/1997 Sb. o chovu a využití zvířat, ve znění pozdějších předpisů a byla schválena etickou komisí IKEMu.

4.1.2 Wistar potkani

Wistar potkani byli vyšlechtěni Helen Dean Kingovou, které byli spojeni s metodami řízení a chovu Miliona Greenmana a Louisi Duhringové. Kmen potkanů Wistar má nízký výskyt

hydronefrózy. Potkani kmene Wistar jsou používáni pro výzkum infekčních nemocí, pro testování bezpečnosti a efektivity nebo stárnutí (Clause, 1993). V našem výzkumu byli potkani Wistar využiti jako kontrolní skupina ke skupině HHTg potkanů. Kontrolní potkani kmenu Wistar byli z chovu firmy VELAZ, Praha.

4.2 Odběr vzorků

Vzorky moči byly odebírány během 12 hodin nočního sběru v metabolických klecích. Metabolické klece jsou používány za účelem 24-hodinového sběru moči a výkalů. Tato metoda je velmi využívána, protože dochází k oddělení moči a výkalů a nedochází tak k jejich vzájemné kontaminaci. Metabolická klec je vyrobena z průhledného materiálu, která je odolná proti kousání, většinou se jedná o polykarbonát. Klec obsahuje odnímatelné větrací kryty. Klec má oddělený systém na podávání krmiva, který je umístěn mimo klec, z důvodu zamezení kontaminace krmiva výkaly. V kleci jsou lahve s vodou a sběrače rozlité vody, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků moči. Vzorky stolice a moči jsou odebírány pomocí trubek, které jsou vyrobené z polymethylpentenu. Tyto klece odpovídají současným předpisům pro ochranu zvířat. Všechny součásti, které se nachází pod podlahou jsou odnímatelné, tak aby nedošlo k rušení testovacího zvířete a k jeho změnám v chování. Velikost klece pro krysy do 300 g jsou navrženy s povrchem 320 cm² a výškou 14 cm, pro krysy s váhou nad 300 g je povrch klece 450 cm² a 18 cm (Kurien et al., 2004).



Obr. č. 5 Metabolická klec (Trigonplus)

4.3 Použité chemikálie, přístroje a vybavení

4.3.1 Použité chemikálie

- Methanol (p.a.)
- demineralizovaná voda, vlastní výroba Simplicity UV (MerckMillipore, KGaA, Darmstadt, Německo)
- acetonitril

4.3.2 Přístroje a vybavení

- pipety Socorex Acura (Švýcarsko)
- Lyofilizátor Lyovac GT 2
- Varian 240-MS with the 450-GC
- UHPLC-QqQ-MS
- skleněné vialky

4.3.3 Lyofilizátor Lyovac GT 2

Lyofilizátor je přístroj, který slouží k odstraňování kapalné fáze. Metoda lyofilizace má 3 fáze. V první fázi dochází k zmrazování základní směsi, aby došlo ke ztuhnutí. Ve druhé fázi dojde k snížení tlaku na úroveň, kdy voda začíná sublimovat. Ve třetí fázi dochází k desorpci vázané vody ve vysušeném materiálu. Při výzkumu je nutné udržet vzorky při nízkých teplotách, aby byly stabilnější. Lyofilizátor je složen ze vzduchem chlazeného kompresoru, nerezového kondenzátoru a mikroprocesorového systémového ovladače (Barley J, 2009).

4.3.4 Příprava vzorků pro stanovení urinárních biomarkerů

Po odběru byly vzorky moče potkanů pipetovány do 2 ml vialek a následně byly zamrazeny. Před lyofilizací byla sundána víčka a vialky byly přelepeny parafilmem. Do parafilmu byly udělány dírký injekční stříkačkou, aby mohl při lyofilizaci odcházet plyn. Lyofilizátor byl nastaven na -20°C . Po nachlazení lyofilizátoru byly do něho vloženy vzorky moče potkanů, které byly následně lyofilizovány po dobu 12 hodin. Po vysušení vzorků moče potkanů bylo ke vzorkům přidáno 500 μL demineralizované vody a 500 μL methanolu. Následně byly vzorky moče potkanů analyzovány na přístroji Varian GC/MS.

4.4 Stanovení biomarkerů v moči pomocí analytické metody na GC/MS

- kolona Supelcowax-10 (30 m x 0.25 mm x 0,25 μm)
- Průtok kolony: 1 ml/min při teplotě 60°C až 230°C doba analýzy 30 minut
- Stacionární fáze: polyethyleneglykol
- Mobilní fáze: Helium
- Hmotnostní rozsah: 30 – 500 m/z
- Ionizace: od 4 až 30 minuty

4.5 Stanovení biomarkerů oxidačního stresu

Močové biomarkery oxidačního stresu byly analyzovány pomocí UHPLC-QqQ-MS.

- Průtok 200 $\mu\text{L}/\text{min}$
- Mobilní fáze A- roztok hydroxidu amonného
- Mobilní fáze B- roztok metanolu/ acetonitrem v poměru (60:40)

4.6 Statistické zhodnocení naměřených dat

Data z GC/MS byly identifikovány pomocí programu MS Worstation. Naměřená data byla zpracována pomocí programů Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA. V programu Statistika (ver.12, StarSoft, Inc, Tulsa, OK, USA) bylo provedeno statistické zhodnocení metodou t-testu nezávislých, dle skupin, na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

5 Výsledky

Pro analýzu byli vybráni dvě skupiny potkanů - potkani HHTg (dále označované i jen „HHTg“) a jako kontrolní skupina potkani kmene Wistar (dále označované „W“). Potkanům v obou skupinách bylo podáváno antidiabetikum Empagliflozin. V moči potkanů z obou skupin byly při analýzách sledovány urinární biomarkery a dále byly sledovány biomarkery oxidačního stresu. Urinární biomarkery byly v rámci praktické části analyzovány pomocí analytické metody GC/MS, při které se k oddělení složek směsi využívá plynový chromatograf a k jejich následné analýze hmotnostní spektrometrie. Biomarkery oxidačního stresu byly analyzovány metodou (UHPLC-QqQ-MS), která využívá ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii

5.1 Stanovení urinárních biomarkerů u W a HHTg potkanů

Na necílené analýze bylo vybráno 5 látek, které se vyskytovaly téměř ve všech vzorcích. Byly vybrány p-hydroxyfenyl kyseliny fosforité, para-Cresol, Indol, Benzylalkohol a Toluene. Jednotlivé látky byly porovnány mezi kmene Wistar a HHTg potkany, kterým byl podáván empagliflozin, Wistar a HHTg bez empagliflozinu a následně došlo k porovnání mezi potkany Wistar s empagliflozinem a kontrolami. To stejné bylo provedeno i u HHTg potkanů.

Proměnná	t-testy; grupováno: potkani (statistika potkani Wx hHTG)							
	Průměr (W s EMPA)	Průměr (HHTg s EMPA)	Sv	P	Poč.plat (W s EM)	Poč.plat. (HHTg s EM)	F-poměr (Rozptyly)	p (Rozptyly)
Phosphonic acid, (p-hydroxyphenyl)-	582803	235858,6	12	0,000802	6	8	3,6147	0,123788
p-Cresol	1458445	578295,5	12	0,002749	6	8	4,2889	0,083530
Indole	499761	246686,0	12	0,007020	6	8	4,9637	0,096548
Benzyl alcohol	2785500	264244,9	12	0,000000	6	8	93,8267	0,000006
Toluene	923044	272239,3	12	0,002538	6	8	197,2630	0,000000

Tab. č.2 t-test porovnání W a HHTg s empagliflozinem

Z necílené analýzy bylo vybráno 5 nejdůležitějších metabolitů. Z tab. č. 2 můžeme vidět, že vyšší hladiny p- Cresolu, Indolu, benzylalkoholu, toluenu a p-hydroxyfenyl kyseliny fosforečné byly u potkanů Wistar, kterým byl podáván empagliflozin. Sattistické šetření bylo zjišťována na hladině významnosti 0,05.

Proměnná	t-testy; grupováno: potkani (statistika potkani Wx hHTG)							
	Průměr (W Kon)	Průměr (HHTg kon)	Sv	P	Poč.plat (W Kon)	Poč.plat. (HHTg kon)	F-poměr (Rozptyly)	p (Rozptyly)
Phosphonic acid, (p-hydroxyphenyl)-	501816	216864,7	9	0,004743	4	7	4,20306	0,127579
p-Cresol	1116864	908639,7	9	0,453745	4	7	1,17099	0,791808
Indole	552297	227722,1	9	0,005031	4	7	4,24484	0,125171
Benzyl alcohol	1758023	324771,6	9	0,005633	4	7	24,23079	0,001883
toluene	665091	308131,6	9	0,009104	4	7	4,97120	0,091468

Tab. č.3 t-test porovnání W a HHTg kontroly

Z necílené analýzy v tab. č. 3 můžeme vidět vyšší hladiny skoro všech metabolitů u potkanů kmene Wistar při hladině významnosti 0,05. Kromě Benzylalkoholu, který je zvýšen u HHTg potkanů.

Proměnná	t-testy; grupováno: potkani (statistika potkani Wx hHTG)							
	Průměr (W Kon)	Průměr (W s EMPA)	Sv	P	Poč.plat (W Kon)	Poč.plat. (W s EM)	F-poměr (Rozptyly)	p (Rozptyly)
Phosphonic acid, (p-hydroxyphenyl)-	501816	582803	8	0,515195	4	6	1,193316	0,943238
p-Cresol	1116864	1458445	8	0,352887	4	6	1,709570	0,699042
Indole	552297	499761	8	0,571495	4	6	6,394164	0,073095
Benzyl alcohol	1758023	2785500	8	0,093296	4	6	2,459014	0,355833
Toluene	665091	923044	8	0,365716	4	6	3,784536	0,302473

Tab. č.4 t-test porovnání W kontroly a W s empagliflozinem

V necílené analýze na urinární metabolomiku (Tab.č. 4), byly u potkanů kmene Wistar s empagliflozinem vyšší hladiny u p-hydroxyfenyl kyseliny fosforečné, p-Cresolu, benzylalkoholu a toluenu. Nižší koncentrace byla u Indolu ($p < 0,05$).

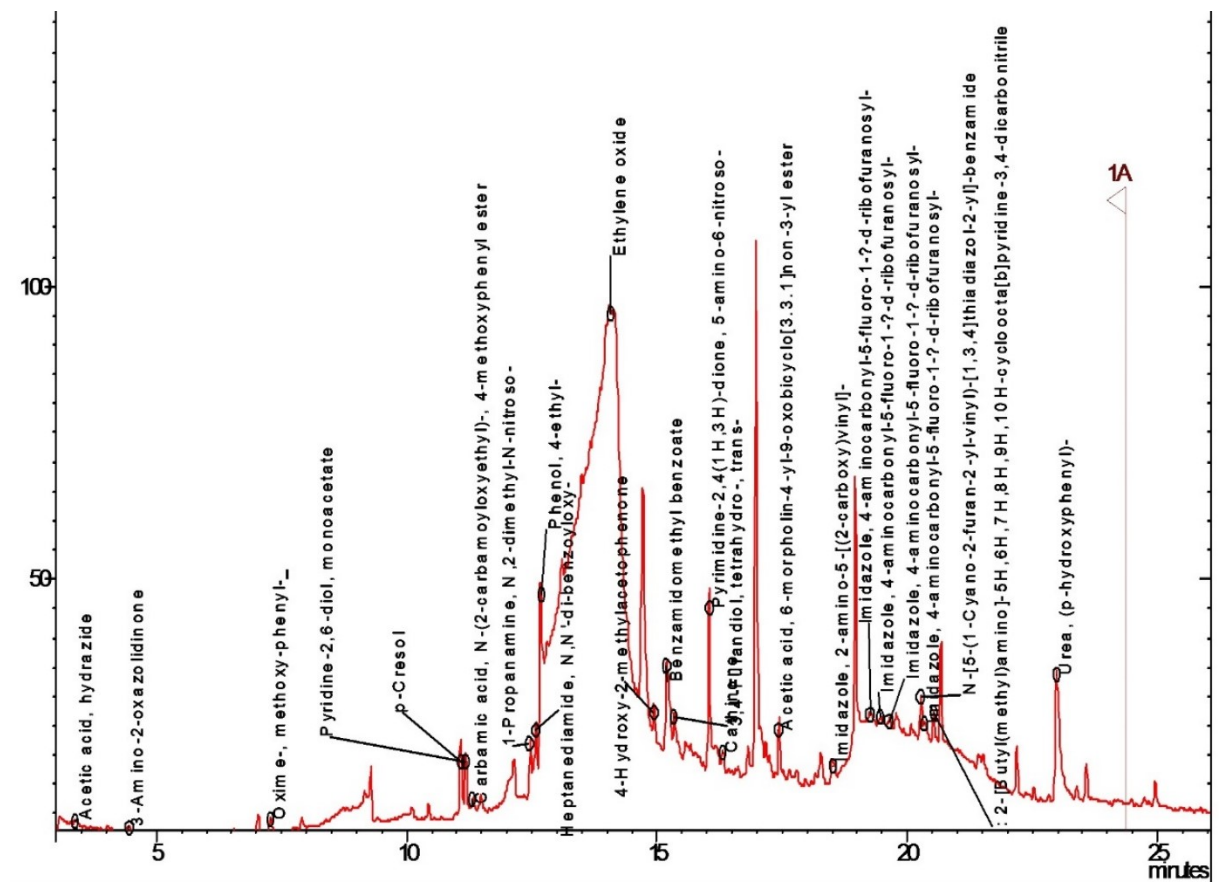
Proměnná	t-testy; grupováno: potkani (statistika potkani Wx hHTG)							
	Průměr (HHTg s EMPA)	Průměr (HHTg kon)	Sv	P	Poč.plat (HHTg s EM)	Poč.plat. (HHTg kon)	F-poměr (Rozptyly)	p (Rozptyly)
Phosphonic acid, (p-hydroxyphenyl)-	235858,6	216864,7	13	0,700565	8	7	1,38753	0,705747
p-Cresol	578295,5	908639,7	13	0,089978	8	7	2,14244	0,341764
Indole	246686,0	227722,1	13	0,805259	8	7	3,29518	0,167499
Benzyl alcohol	264244,9	324771,6	13	0,461336	8	7	9,52182	0,008909
toluene	272239,3	308131,6	13	0,406662	8	7	10,48507	0,006687

Tab. č.5 t-test HHTg kontroly a HHTg s empagliflozinem

V tabulce č.5 můžeme vidět porovnání HHTg potkanů s EMPA a bez něj. Signifikantně vyšší hladiny p-hydroxyfenyl kyseliny fosforečné, indolu a benzylalkoholu byly u HHTg potkanů s EMPA. Nižší hladiny byly u toluenu a p-Cresolu ($p < 0,05$) u stejné skupiny potkanů.

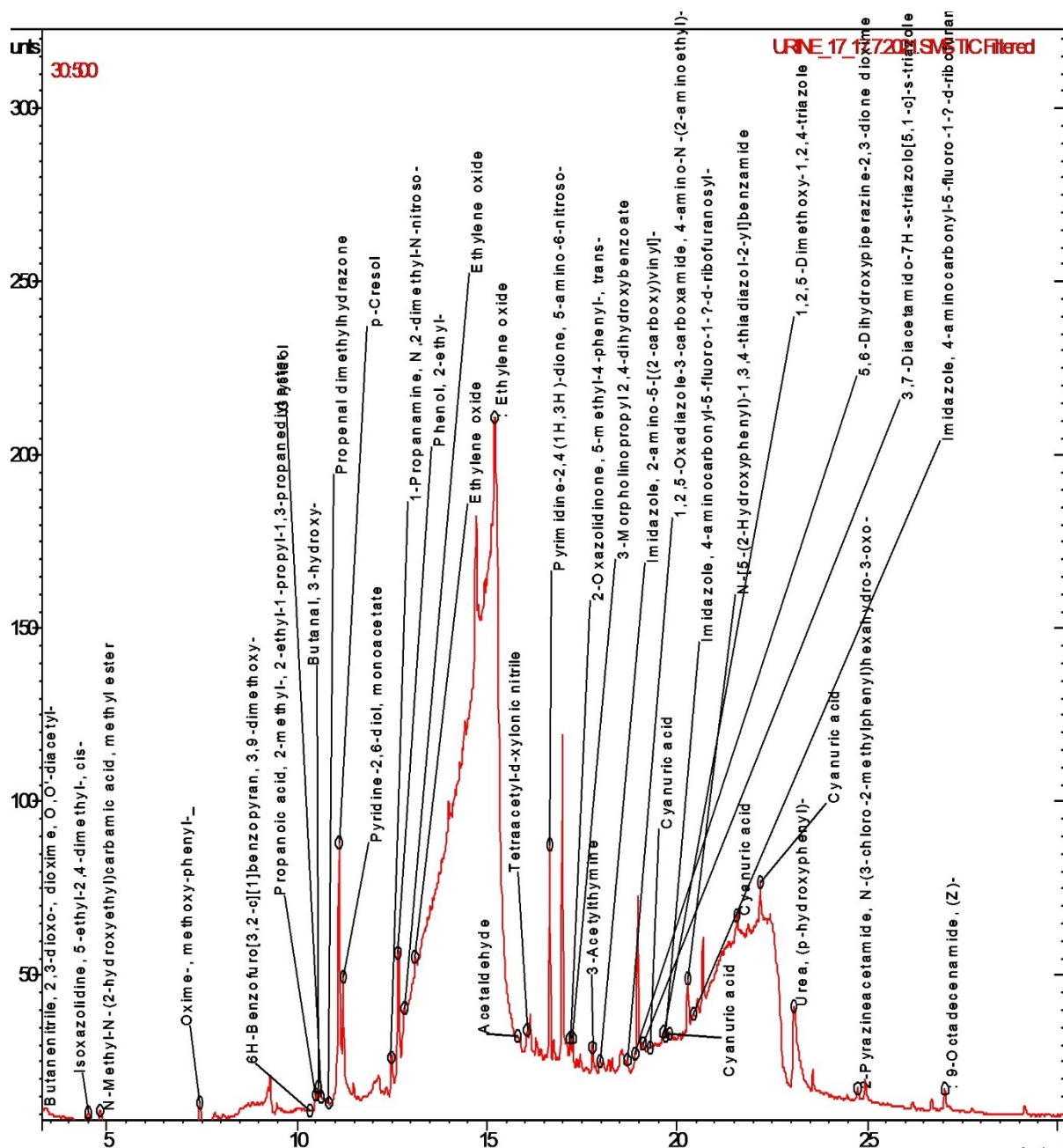
5.2 Chromatografické znázornění urinární metabolomiky

Urinární metabolomika byla vyhodnocena pomocí chromatogramu z analýzy, která byla stanovována na GC/MS na nepolární siloxánové koloně. Jednotlivé píky byly vyhodnocovány

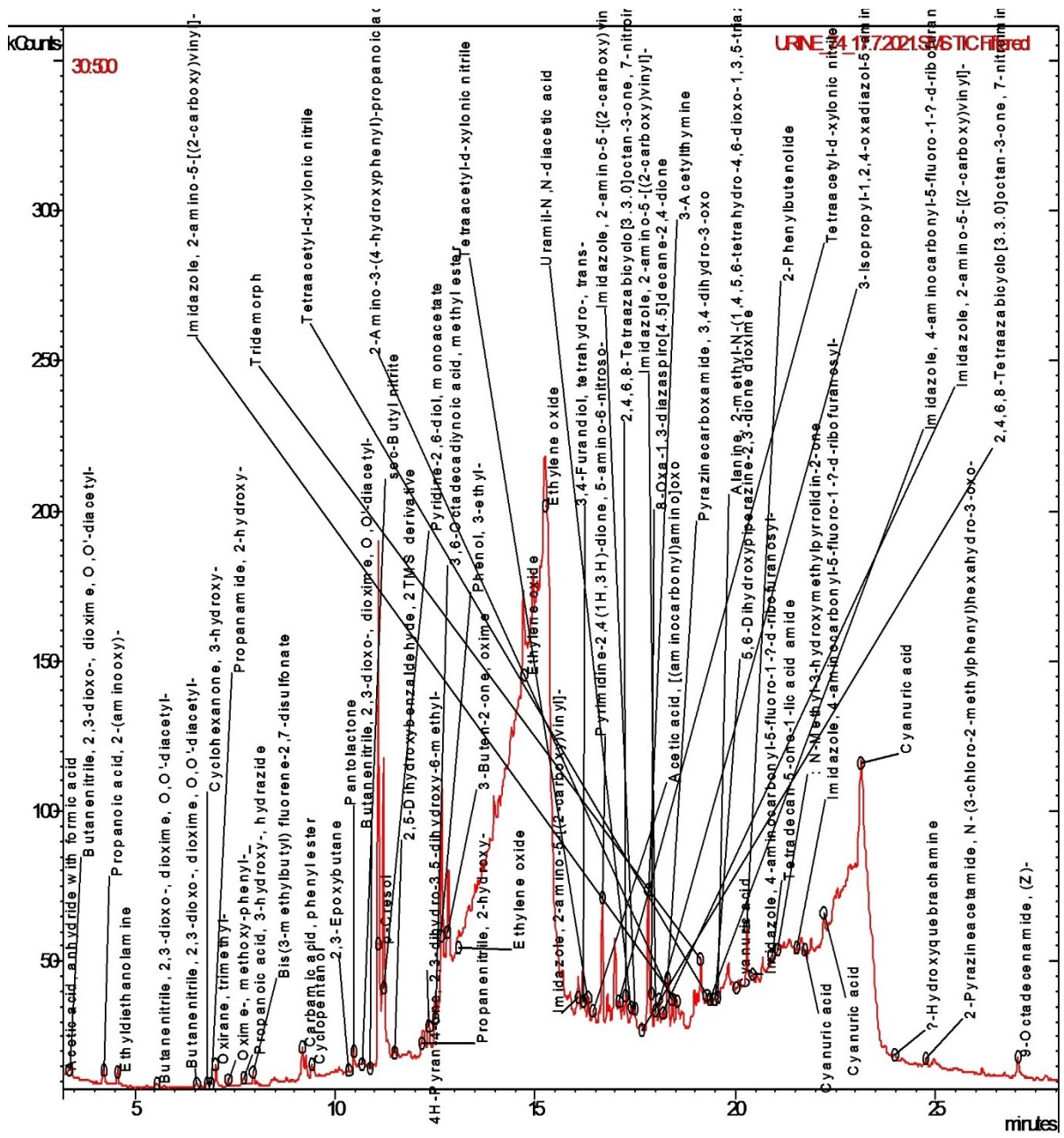


Obr. č.6 Chromatogram urinární metabolomiky u Wistar potkana bez empagliflozinu

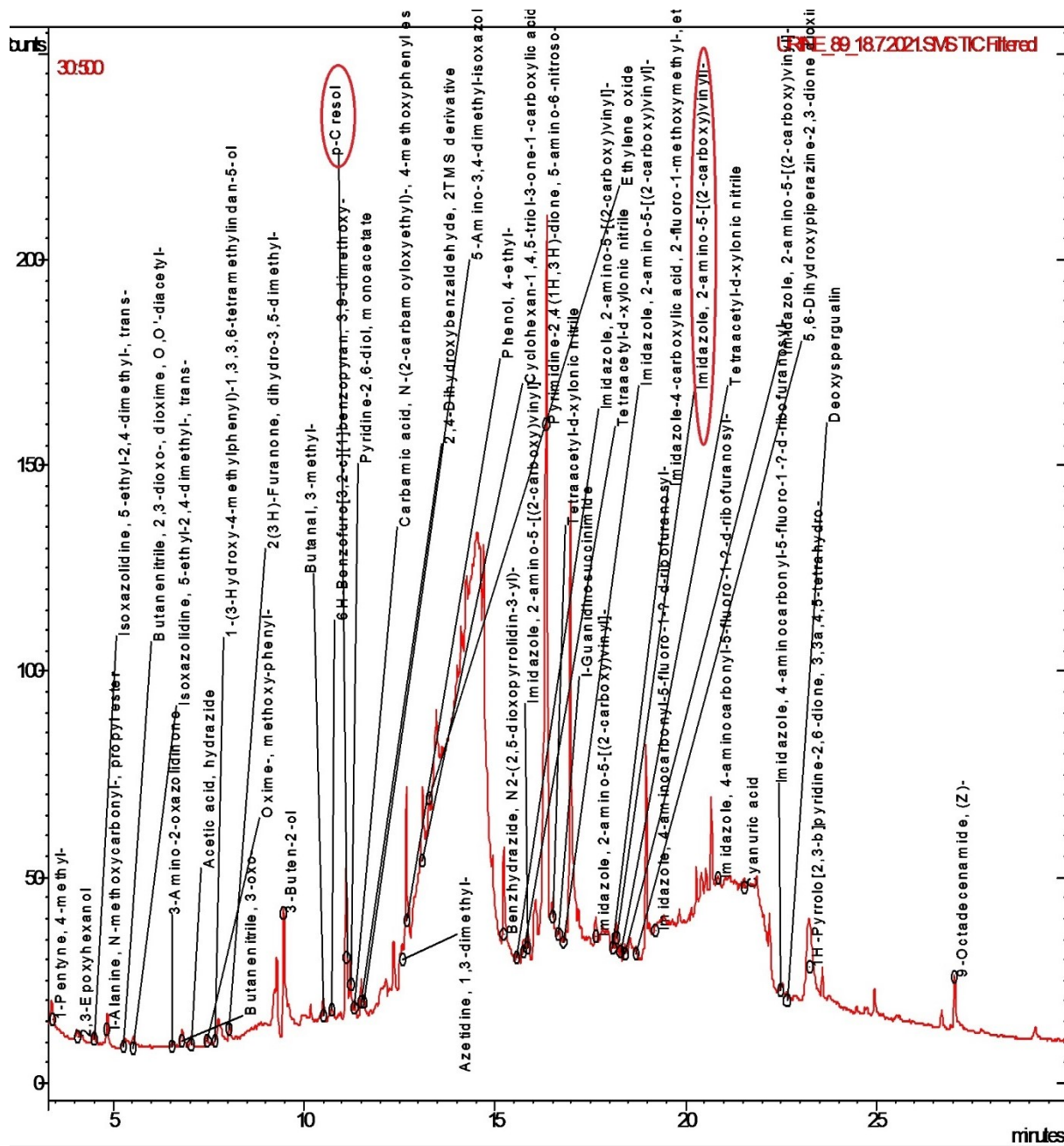
podle metabolické knihovny NIST. Do hodnocení nebyly zařazeny siloxany, které byly jako vedlejší látky z nepolární kolony. Byla vyvinuta metoda na vyhodnocení jednotlivých látek na chromatografu na GC/MS. Můžeme zde vidět celou řadu látek, které souvisí s fyziologickým metabolomem a další látky, které mají nějakou souvislost s léčivem.



Obr. č. 7 Chromatogram urinární metaboliky u HHTg potkana bez empagliflozinu



Obr. č. 8 Chromatogram urinární metabolomiky u Wistar potkana s Empagliflozinem



Obr. č. 9 Chromatogram urinární metaboliky u HHTg potkana s Empagliflozinem

5.3 Stanovení biomarkerů oxidačního stresu ve vzorcích moči potkanů

Stanovení biomarkerů oxidačního stresu bylo statisticky hodnoceno pomocí t-testu nezávislých dle skupin (Příloha č.1). Biomarkery oxidačního stresu mezi potkany Wistar a HHTg, kterým byl podáván empagliflozin mají statisticky významný rozdíl. Pouze u heptanalu, oktanalu, leukotrienu E4, epidermálního růstového faktoru a alfa-1- antritripsinu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Vyšší hodnoty vzorků moči potkanů byly u HHTg potkanů.

V příloze č. 2 jsou uvedeny hodnoty biomarkerů oxidačního stresu v moči u potkanů kmene Wistar a HHTg potkanů, kterým nebyl podáván empagliflozin. Zjištěné hodnoty biomarkerů oxidačního stresu mezi potkany kmene Wistar a HHTg potkany, kterým nebyl podáván empagliflozin, vykazují u většiny biomarkerů statisticky významný rozdíl ve prospěch hodnot zjištěných ze vzorků moči u skupiny HHTg potkanů. Pouze u proměnných označených jako hexanal, oktanal, nonanal, dekanal, dodekanal, 8- hydroxy-2-deoxyguanosinu, leukotrienu E4 a epidermálního růstového faktoru nebyl ve vzorcích moči potkanů obou skupin prokázán statisticky významný rozdíl.

5.4 Závěr statistického šetření

Z necílené analýzy lze vyvodit, že vyšších hodnot u potkanů Wistar než u HHTg potkanů, kromě některých případů, kdy vyšší hodnoty byly u HHTg potkanů. U cílené analýzy, kde byly zkoumány biomarkery oxidačního stresu, lze vyvodit, že HHTg potkani mají vyšší koncentraci jednotlivých markerů oxidačního stresu. Zvýšené hladiny jsou způsobené, protože HHTg potkani se rodí již s MetS. Po podání léčiva došlo ke snížení koncentrací biomarkerů oxidačního stresu.

6 Diskuze

Při necílené analýze byla pozornost věnována uremické metabolomice, která byla zaměřena na rozdílné hodnoty u jednotlivých metabolitů v závislosti na podávání léčiva empagliflozinu. V této experimentální studii bylo používáno placebo, abychom mohli lépe zhodnotit jednotlivé rozdíly na daných potkanech a tyto poznatky se následně daly použít pro klinickou studii na lidské populaci.

Problematikou při vyhodnocení vzorků docházelo ke zvýšení baseliny kvůli kyselinám a vodě, která byla v našich vzorcích 50:50 s methanolem. Toto ředění bylo nutné použít, protože veškeré látky, které jsme analyzovaly, nebyly schopné se vázat na methanol.

Vzorky byly analyzovány na polární a nepolární koloně. Problematika na nepolární koloně nastala při vyhodnocování jednotlivých látek. Vznikl atypický difuzní pík, na kterém není možné jednotlivé látky rozseparovat. Důvodem je, že většina látek je polární a nepolární kolona je neumí rozdělit na jednotlivé píky. Na nepolární koloně je vhodné měřit látky, které mají nepolární charakter. Metabolity z nepolární kolony nebylo možné interpretovat, protože většina metabolitů byly siloxany, které měly vyšší hodnoty než urinární metabolity. Pro danou necílenou analýzu byla zvolena polární kolona Supelcovax-10, kde se siloxany vyskytovaly v menší míře než na nepolární koloně. Na nepolární koloně byly zjištěny imidazoly, které se na chromatogramu vyskytovaly ve velké míře.

Chromatogramy, které byly vytvořené z necílené analýzy urinární metabolomiky na siloxanové nepolární koloně. Nebylo možné rozlišit přesné látky na dané koloně, protože píky nebyly rozseparované a jednotlivé látky se do chromatogramu vkládaly ručně. Nebyl zde ani významný rozdíl mezi jednotlivými látkami u potkanů, kterým byl podáván empagliflozin a bez něj. Významné látky, které zde byly zjištěné byly především imidazoly a jeho deriváty, kteří mají určitou souvislost s daným antidiabetikem. Pravděpodobně se jedná o reziduum léčiva z EMPA. Kromě imidazolů byl zde i p-Cresol, který byl objeven i na polární koloně. Z chromatografů nelze úplně vyvodit závěr, protože hodnoty mohou být zkreslené siloxany, které zde ležly v mnohem vyšších koncentracích, nejspíše se jedná o siloxany z kolony.

Bylo zjištěno, že u necílené metabolomické analýzy došlo ke zvýšené sekreci indolu a p-Cresolu v moči, což souvisí se zlepšením metabolismu aromatických aminokyselin u HHTg potkanů, kterým byl podáván empagliflozin ve srovnání s neléčenými potkany. P-Cresol můžeme zařadit mezi uremické toxiny, který má za následek renální dysfunkci a následného poškození ledvin (Syslová et al. 2014). Koncentrace toluenu, bezylalkoholu a p-hydroxyfenyl kyseliny fosforečné byly vyšší u potkanů kmene Wistar, hodnoty byly statisticky hodnoceny na hladině významnosti 0,05. V organismu kyselina fosforečná pravděpodobně vznikala z námahy ve svalech, kdy už daný sval není schopen zpracovat přijaté vysoké množství glukózy svalem. Nebo mohlo dojít k rozložení p-hydroxyfenylhydrogenfosfát, kde došlo k rozdělení na benzenové jádro a p-hydroxyfenyl fosforečné kyseliny. Přirozeně se v moči organismu fosforečná kyselina nevyskytuje.

V cílené analýze pozornost byla věnována biomarkerům oxidačního stresu, které byly analyzovány na vzorcích moči od HHTg potkanů a potkanů kmene Wistar, kterým bylo podáváno léčivo empagliflozin. HHTg potkani se již rodí s metabolickým syndromem, takže jejich hodnoty při tomto zkoumání byly relativně u všech urinárních biomarkerů vyšší než u Wistar potkanů. Metabolity oxidačního stresu příliš neoscilují a jsou si velmi podobné. Většina

těchto látek jsou součástí metabolismu. Při podávání empagliflozinu v daném období ve stejné koncentraci, dochází k ustálenému stavu, kdy látky daného léčiva měly již stále stejnou koncentraci. Některé látky směřují k léčivu a další jsou zmetabolizované látky nebo markery, které směřují k ledvinovému poškození.

Mezi skupinou potkanů léčených empagliflozinem a bez něj se hladiny malondialdehydu, 8-isoprostanu, interleukinu 6 a leukotrienů nelišili více, než o 1 %. Z toho můžeme vyvodit zásadní roli metabolického syndromu na vzniku oxidačního stresu, zatímco minimální až žádný vliv na redukcii oxidačního stresu můžeme přičíst léčivé látce empagliflozinu.

Zatímco u jiných studií byl prokázán pozitivní vliv podávání empagliflozinu na hladinu malondialdehydu v moči (Jighen et al. 2019). Významný vyšší rozdíl byl u HHTg potkanů v koncentraci 8-isoprostanu, malondialdehydu a interleukinu 6 oproti kontrolnímu kmeni potkanů Wistar. Jelikož malondialdehyd vzniká peroxidací lipidů, můžeme tento prooxidační stav přičíst geneticky fixovanému metabolickému syndromu u potkanů kmene HHTg. Jak již bylo uvedeno v teoretické části zvýšený oxidační stres je indukován jednotlivými komponenty metabolického syndromu. Zvýšené množství interleukinu vede k zánětlivým reakcím v organismu.

8-isoprostan je produktem neenzymatické reakce arachidonové kyseliny s ROS. Zvýšené hladiny 8-isoprostanu mohou poukazovat na oxidační stres a následné stárnutí organismu.

Zvýšená sekrece Interleukinu-6 v moči poukazuje na již probíhající zánět ledvin, ale změny v sekreci IL-6 mohou také souviset se změnami genové exprese v ledvinách (Syslová et al. 2014). Zánět a následné poškození je nejspíše způsobeno léčivem empagliflozinem, u dlouhodobého podávání pacienti mohou skončit na dialýze až umělé ledvině. Toto tvrzení je zkoumáno pomocí cílené analýzy na urinární metabolomice na biomarkery oxidačního stresu. Některé látky vykazují kromě oxidačního stresu i zánětlivé poškození ledvin, například Interleukin 6 či monocytární chemoprotektivní protein 1 (MCP-1).

Hladina MCP-1, epidermálního proteinu (EGF) nebyla zjištěna významná rozdílnost mezi jednotlivými skupinami. Rozdíl se pohyboval kolem 1 %. V klinické studii byla zjištěna zvýšená sekrece monocytárního chemoatraktantového proteinu- 1 a Interleukinu 6, které bylo doprovázeno se sníženou sekrecí EGF. EGF je řazen jako potencionální marker časné renální dysfunkce. MCP-1 je látka, která je významným biomarkerem glomerulárního i tubulárního poškození ledvin. Tento biomarker může včasné varovat před renálním poškozením (Syslová et al. 2014).

U HHTg potkanů s empagliflozinem došlo k významnému snížení proteomických látek v moči. Došlo ke snížení u MCP-1, IL-6, IL-8, leukotrienů třídy C4, D4 a E4 spolu sníženým profibrotického markeru-epidermálního růstu ($p < 0,05$) U léčených HHTg potkanů došlo ke snížení relativní exprese mRNA i hladiny MCP-1. Renoprotektivní mechanismus empagliflozinu může přispívat k výraznému zlepšení oxidačních parametrů kůře ledvin. Tento mechanismus se může podílet na zmírnění oxidačního stresu a zánětu.

Významně zvýšené hladiny endostatínu byly u HHTg potkanů než u kontrolních potkanů kmene Wistar. Endostatin je významný metabolit oxidačního stresu, který se účastní prozánětlivých reakcí a napomáhá zlepšovat diabetickou retinopatii (Behl & Kotwani 2015).

U HHTg potkanů bylo zvýšené hladiny EGF než u Wistar potkanů. EGF má prozánětlivý účinek, což může vést k snížení zánětlivých reakcí v těle.

Tato cílená analýza má velký přínos do oblasti zdravotnictví, protože dochází k včasné predikci urinárního selhání. Některé biomarkery oxidačního stresu jsou jejich hladiny pomocí empagliflozinu sníženy, mezi tyto látky řadíme MCP-1, IL-6, IL-8 a leuktrienu C4, D4 a E4. Řada z těchto látek má prozánětlivé účinky a tím zlepšují zdravotní stav léčených potkanů.

7 Závěr

- Cílem této práce bylo vyvinout analytickou metodu na GC/MS ke stanovení urinárního metabolomu, kterou jsme využili pro experimentální studii na laboratorních potkanech s modelovým metabolickým syndromem, kterým byl podáván empagliflozin. V této studii byla skupina HHTg potkanů kontrolována placebem. K analýze byla použita moč potkanů, které nám byly poskytnuty z IKEMu. Následně byla vyvinuta cílená metoda na biomarkery oxidačního stresu, které byly měřeny pomocí UHPLC-QqQ-MS.
- Patogeneze T2DM koresponduje s koncentračními hladinami signálních molekul. U vzorků moči HHTg potkanů, kteří nebyli léčeni empagliflozinem, byly vyšší hladiny než u potkanů kmene Wistar.
- Biomarkery reflektující patogenezi MetS a T2DM v moči byly u HHTg potkanů vyšší než u Wistar, které sloužili jako kontroly. Z výsledků bylo možné zkonstatovat, že u potkanů, které měli MetS, byly vyšší hladiny biomarkerů oxidačního stresu než u jejich kontrol. Zvýšené hladiny byly u 8-isoprostanu, všech leukotrienů, veškerých interleukinů a dalších biomarkerů oxidačního stresu.
- Hypotézu o tom, že v průběhu patogeneze T2DM byly rozdílné koncentrace zánětlivých biomarkerů a biomarkerů oxidačního stresu, které jsou indukovány stravou a stravovacími návyky, můžeme potvrdit. Vyšší hodnoty zánětlivých biomarkerů a látek oxidačního stresu, byly vyšší u HHTg potkanů, které se již rodili s MetS než u jejich kontrol či u potkanů, kterým bylo podáván empagliflozin.
- Podle naměřených hodnot můžeme potvrdit hypotézu, že má empagliflozin vliv na koncentrační hladiny biomarkerů v moči. Bylo zjištěno, že dochází v některých markrech k jejich snížení. Došlo k snížení hladin u Indolu, p-hydroxyferyl kyseliny fosforečné u potkanů, kterým byl podáván empagliflozin u necílené analýzy. Tato hypotéza byla potvrzena i u cílené metody pro stanovení urinárních biomarkerů, kdy došlo ke snížení veškerých interleukinů, leukinů a dalších. Jedinou potenciální nevýhodou tohoto antidiabetika, je možné riziko renální dysfunkce a následné poškození ledvin. Díky cílené analýze, která sledovala biomarkery oxidačního stresu, je možné včasné zjištění ledvinového poškození, kam lze zařadit urinární biomarkery Il-6 a MCP-1. Lze vyvodit, že empagliflozin je vhodným léčivem pro léčbu T2DM.

8 Literatura

- Adegbola AJ, Awobusuyi OJ, Adeagbo BA, Oladokun BS, Owolabi AR, Soyinka JO. 2017. Bioequivalence Study of Generic Metformin Hydrochloride in Healthy Nigerian Volunteers. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology* 2:75-81. Available at <http://www.xiahepublishing.com/ArticleFullText.aspx?sid=2&jid=3&id=10.14218%2fJERP.2017.00010> (accessed April 13, 2022).
- American Diabetes Association. 2014. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 37:S81-S90. Available at https://diabetesjournals.org/care/article/37/Supplement_1/S81/37753/Diagnosis-and-Classification-of-Diabetes-Mellitus (accessed April 12, 2022).
- Anděl M, Brunerová L, Novák J, Hašpicová M, Trešlová L. 2007. Diabetes mellitus: současný pohled na patogenezi, klasifikaci a léčbu. *Neurologia pre prax* 8:47-48 a 50-53.
- Asmat U, Abad K, Ismail K. 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 24:547-553. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016415000766> (accessed April 12, 2022).
- Balanzá SC, Aragonés AM, Mir JC, Ramírez JB, Iváñez RN, Soriano AN, Toledo RF, Escribano A. 2010. Leukotriene B₄ and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with episodic and persistent asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 20(3): 237-243. Available at https://www.researchgate.net/profile/Amparo-Escribano/publication/45268345_Leukotriene_B4_and_8-isoprostane_in_exhaled_breath_condensate_of_children_with_episodic_and_persistent_asthma/links/0c960519bbc07321ba000000/Leukotriene-B4-and-8-isoprostane-in-exhaled-breath-condensate-of-children-with-episodic-and-persistent-asthma.pdf
- Barley, J. (2009). Basic principles of freeze drying. SP Scientific. Available online at: <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics>.
- Baynest HW. 2015. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism* 06:1-9. Available at <https://www.omicsonline.org/open-access/classification-pathophysiology-diagnosis-and-management-of-diabetesmellitus-2155-6156-1000541.php?aid=53137> (accessed April 12, 2022).
- Behl T, Kotwani A. 2015. Possible role of endostatin in the antiangiogenic therapy of diabetic retinopathy. *Life Sciences* 135:131-137. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320515003409> (accessed April 14, 2022).
- Bletsas E, Filippas-Dekouan S, Kostara C, Dafopoulos P, Dimou A, Pappa E, Chasapi S, Spyroulias G, Katsouvasilis A, Bairaktari E, Tsimihodimos, V. 2021. Effect of Dapagliflozin on Urine Metabolome in Patients with Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 106:1269-1283. Available at <https://academic.oup.com/jcem/article/106/5/1269/6139141> (accessed April 12, 2022).
- Buchanan TA, Xiang AH. 2005. Gestational diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 115:485-491. Available at <http://www.jci.org/articles/view/24531> (accessed April 12, 2022).
- Burton GJ, Jauniaux E. 2011. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 25:287-299. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693410001392> (accessed April 12, 2022).

- Clause BT. 1993. The Wistar rat as a right choice: Establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal. *Journal of the History of Biology* 26:329-349. Available at <http://link.springer.com/10.1007/BF01061973> (accessed April 12, 2022).
- Cooke DW, Plotnick L. 2008. Type 1 Diabetes Mellitus in Pediatrics. *Pediatrics In Review* 29:374-385. Available at <https://publications.aap.org/pediatricsinreview/article/29/11/374/33950/Type-1-Diabetes-Mellitus-in-Pediatrics> (accessed April 12, 2022).
- Cornier M-A, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH. 2008. The Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews* 29:777-822. Available at <https://academic.oup.com/edrv/article/29/7/777/2354985> (accessed April 12, 2022).
- Crooks SW, Stockley RA. 1998. Leukotriene B4. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30:173-178. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272597001234> (accessed April 12, 2022).
- Czerska M, Zieliński M, Gromadzińska J. 2016. Isoprostanes – A novel major group of oxidative stress markers. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 29:179-190. Available at <http://www.journalssystem.com/ijomeh/Isoprostanes-a-novel-major-group-of-oxidative-stress-markers,58565,0,2.html> (accessed April 12, 2022).
- Del Prato S, Pulizzi N. 2006. The place of sulfonylureas in the therapy for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 55:S20-S27. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049506000321> (accessed April 12, 2022).
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15:316-328. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939475305001043> (accessed April 12, 2022).
- DiMarco DM. 2014. Reduction of Obesity-Associated Oxidative Stress by Low-Fat Yogurt Consumption. Available at https://opencommons.uconn.edu/gs_theses/668/
- Draper HH, McGirr LG, Hadley M. 1986. The metabolism of malondialdehyde. *Lipids* 21:305-307. Available at <http://doi.wiley.com/10.1007/BF02536418> (accessed April 12, 2022).
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. 2005. The metabolic syndrome. *The Lancet* 365:1415-1428. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605663787> (accessed April 12, 2022).
- Finaud J, Lac G, Filaire E. 2006. Oxidative Stress. *Sports Medicine* 36:327-358. Available at <http://link.springer.com/10.2165/00007256-200636040-00004> (accessed April 12, 2022).
- Frampton JE. 2018. Empagliflozin: A Review in Type 2 Diabetes. *Drugs* 78:1037-1048. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s40265-018-0937-z> (accessed April 12, 2022).
- Gillies PS, Dunn CJ. 2000. Pioglitazone. *Drugs* 60:333-343. Available at <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200060020-00009> (accessed April 12, 2022).
- Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. 2008. Glucose metabolism and hyperglycemia. *The American Journal of Clinical Nutrition* 87:217S-222S. Available at <https://academic.oup.com/ajcn/article/87/1/217S/4633392> (accessed April 12, 2022).
- Graille M, Wild P, Sauvain JJ, Hemmendinger M, Guseva Canu I, Hopf NB. 2020. Urinary 8-isoprostane as a biomarker for oxidative stress. A systematic review and meta-analysis. *Toxicology Letters* 328:19-27. Available at

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037842742030117X> (accessed April 12, 2022).
- Gregory JM, Moore DJ, Simmons JH. 2013. Type 1 Diabetes Mellitus. *Pediatrics In Review* 34:203-215. Available at <https://publications.aap.org/pediatricsinreview/article/34/5/203/34790/Type-1-Diabetes-Mellitus> (accessed April 12, 2022).
- Grundy SM. 2016. Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine* 26:364-373. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050173815002492> (accessed April 12, 2022).
- Heianza Y, Qi L. 2019. Genetics of Central Obesity and Body Fat. 153-174 in *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128160930000148> (accessed April 12, 2022).
- Heise T, Seman L, Macha S, Jones P, Marquart A, Pinnetti S, Woerle HJ, Dugi K. 2013. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Multiple Rising Doses of Empagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Therapy* 4:331-345. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s13300-013-0030-2> (accessed April 12, 2022).
- Helkin A, Stein JJ, Lin S, Siddiqui S, Maier KG, Gahtan V. 2016. Dyslipidemia Part 1—Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. *Vascular and Endovascular Surgery* 50:107-118. Available at <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1538574416628654> (accessed April 12, 2022).
- Hennessey PJ, Black CT, Andrassy RJ. 1990. EGF increases short-term type I collagen accumulation during wound healing in diabetic rats. *Journal of Pediatric Surgery* 25:893-897. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002234689090198I> (accessed April 14, 2022).
- Hinnen D, Nielsen LL, Waninger A, Kushner P. 2006. Incretin Mimetics and DPP-IV Inhibitors: New Paradigms for the Treatment of Type 2 Diabetes. *The Journal of the American Board of Family Medicine* 19:612-620. Available at <http://www.jabfm.org/cgi/doi/10.3122/jabfm.19.6.612> (accessed April 12, 2022).
- Hirata Y, Satonaka H. 2001. Hypertension and oxidative stress. *Japan Medical Association Journal* 44(12): 540-545. Available at <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1058.7262&rep=rep1&type=pdf>
- Hou Y-C, Zheng C-M, Yen T-H, Lu K-C. 2020. Molecular Mechanisms of SGLT2 Inhibitor on Cardiorenal Protection. *International Journal of Molecular Sciences* 21:7833. Available at <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/7833> (accessed April 12, 2022).
- Huang PL. 2009. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms* 2:231-237. Available at <https://journals.biologists.com/dmm/article/2/5-6/231/2213/A-comprehensive-definition-for-metabolic-syndrome> (accessed April 12, 2022).
- Hüttl M, Markova I, Miklankova D, Zapletalova I, Poruba M, Racova Z, Vecera R, Malinska H. 2022. The Beneficial Additive Effect of Silymarin in Metformin Therapy of Liver Steatosis in a Pre-Diabetic Model. *Pharmaceutics* 14:45. Available at <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/1/45> (accessed April 12, 2022).

- Jacob RA. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research* 15:755-766. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/027153179500041G> (accessed April 12, 2022).
- Jardiance. 2020 Jardiance- empagliflozin tablet, film coated". Available at <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=faf3dd6a-9cd0-39c2-0d2e-232cb3f67565>
- Jigheh ZA, Haghjo AG, Argani H, Roshangar L, Rashtchizadeh N, Sanajou D, Ahmad SNSA, Rashedi J, Dastmalchi S, Abbasi, MM. 2019. Empagliflozin alleviates renal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats partly by repressing HMGB1-TLR4 receptor axis. *Iranian journal of basic medical sciences* 22(4): 384. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6535193/>
- Jung CH, Jang JE, Park J-Y. 2014. A Novel Therapeutic Agent for Type 2 Diabetes Mellitus: SGLT2 Inhibitor. *Diabetes & Metabolism Journal* 38:261-273. Available at <http://e-dmj.org/journal/view.php?doi=10.4093/dmj.2014.38.4.261> (accessed April 12, 2022).
- Kalra S. 2014. Sodium Glucose Co-Transporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Review of Their Basic and Clinical Pharmacology. *Diabetes Therapy* 5:355-366. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s13300-014-0089-4> (accessed April 12, 2022).
- Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schartz DA, Lernmark Å. 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers* 3(1): 1-17. Available at <https://www.nature.com/articles/nrdp201716>
- Kaur J. 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice* 2014:1-21. Available at <http://www.hindawi.com/journals/crp/2014/943162/> (accessed April 12, 2022).
- Koolman J, Röhm K-H. 2012. *Barevný atlas biochemie*. Grada, Praha.
- Kumar BRP, Nanjan MJ. 2010. Novel glitazones: Design, synthesis, glucose uptake and structure–activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20:1953-1956. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X1000137X> (accessed April 12, 2022).
- Kurien BT, Everds NE, Scofield RH. 2004. Experimental animal urine collection: a review. *Laboratory Animals* 38:333-361. Available at <http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/0023677041958945> (accessed April 12, 2022).
- Liu H, Sridhar VS, Montemayor D, Lovblom LE, Lytvyn Y, Ye H, Kim J, Ali MT, Scarr D, Lawler PR, Perkins MD, Sharma K, Cherney DZ. 2021. Changes in plasma and urine metabolites associated with empagliflozin in patients with type 1 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 23:2466-2475. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dom.14489> (accessed April 12, 2022).
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L. 2020. *Barevný atlas farmakologie*. 5. české vydání. Grada Publishing, Praha.
- Macha S, Mattheus M, Halabi A, Pinnetti S, Woerle HJ, Broedl UC. 2014. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of empagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, in subjects with renal impairment. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 16:215-222. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dom.12182> (accessed April 12, 2022).

- Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424:83-95. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002751079900010X> (accessed April 12, 2022).
- McCowen KC, Malhotra A, Bistrrian BR. 2001. Stress-Induced Hyperglycemia. *Critical Care Clinics* 17:107-124. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749070405701548> (accessed April 12, 2022).
- Mills KT, Stefanescu A, He J. 2020. The global epidemiology of hypertension. *Nature Reviews Nephrology* 16:223-237. Available at <http://www.nature.com/articles/s41581-019-0244-2> (accessed April 12, 2022).
- Milne GL, Yin H, Morrow JD. 2008. Human Biochemistry of the Isoprostane Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 283:15533-15537. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820460843> (accessed April 12, 2022).
- Mizuno K, Kataoka H. 2015. Analysis of urinary 8-isoprostane as an oxidative stress biomarker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 112:36-42. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708515002538> (accessed April 13, 2022).
- Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB Journal* 18:1791-1800. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.04-2330rev> (accessed April 12, 2022).
- Mouri M, Badireddy M. 2021. Hyperglycemia. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430900/>
- Musiek ES, Yin H, Milne GL, Morrow JD. 2005. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids* 40:987-994. Available at <http://doi.wiley.com/10.1007/s11745-005-1460-7> (accessed April 12, 2022).
- Paley CA, Johnson MI. 2018. Abdominal obesity and metabolic syndrome: exercise as medicine?. *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation* 10:1-8. Available at <https://bmcsportsscimedrehabil.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13102-018-0097-1> (accessed April 12, 2022).
- Petersen MC, Shulman GI. 2018. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews* 98:2133-2223. Available at <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00063.2017> (accessed April 12, 2022).
- Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, Heinemann L, Schleicher E. 2019. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 127:S1-S7. Available at <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1018-9078> (accessed April 12, 2022).
- Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. 2002. Sulfonylurea Stimulation of Insulin Secretion. *Diabetes* 51:S368-S376. Available at https://diabetesjournals.org/diabetes/article/51/suppl_3/S368/13148/Sulfonylurea-Stimulation-of-Insulin-Secretion (accessed April 12, 2022).
- Riggs MM, Staab A, Seman L, MacGregor TR, Bergsma TT, Gastonguay MR, Macha S. 2013. Population pharmacokinetics of empagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Pharmacology* 53:1028-1038.

Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcph.147> (accessed April 12, 2022).

- Rokach J, Khanapure SP, Hwang S-W, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. 1997. The Isoprostanes: A Perspective. *Prostaglandins* 54:823-851. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090698097001834> (accessed April 12, 2022).
- Salah HM et al. 2021. Effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on cardiovascular and kidney outcomes—Systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *American Heart Journal* 232:10-22. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002870320303501> (accessed April 12, 2022).
- Scheen AJ. 2014. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Empagliflozin, a Sodium Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor. *Clinical Pharmacokinetics* 53:213-225. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s40262-013-0126-x> (accessed April 12, 2022).
- Smith U. 2001. Pioglitazone: mechanism of action. *International journal of clinical practice. Supplement (121)*: 13-18. Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11594239/>
- Steiner DF. 2008. The Biosynthesis of Insulin. 31-49in *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*. Springer Japan, Tokyo. Available at http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-75452-7_3 (accessed April 12, 2022).
- Stühlinger MC. 2002. Relationship Between Insulin Resistance and an Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor. *JAMA* 287:1420-1426. Available at <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.287.11.1420> (accessed April 12, 2022).
- Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kačer P. 2014. Multimarker Screening of Oxidative Stress in Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014:1-14. Available at <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/562860/> (accessed April 12, 2022).
- Tchernof A, Després J-P. 2013. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiological Reviews* 93:359-404. Available at <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00033.2011> (accessed April 12, 2022).
- Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. 2013. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *Journal of Biomarkers* 2013:1-8. Available at <https://www.hindawi.com/journals/jbm/2013/378790/> (accessed April 12, 2022).
- Trigonplus. Available at <https://www.trigonplus.cz/metabolicke-klece-84492.html>
- Trnovska J, Svoboda P, Pelantova H, Kuzma M, Kratochvilova H, Kasperova BJ, Dvořáková I, Rosolová K, Malínská H, Huttl M, Marková I, Oliyarnyk O, Melcová M, Skop V, Mráz M, Stemberková-Hubáčková S, Haluzik, M. 2021. Complex Positive Effects of SGLT-2 Inhibitor Empagliflozin in the Liver, Kidney and Adipose Tissue of Hereditary Hypertriglyceridemic Rats: Possible Contribution of Attenuation of Cell Senescence and Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 22:10606. Available at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10606> (accessed April 12, 2022).
- Vrana A, Kazdova L. 1990. The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. In *Transplantation Proceedings (Vol. 22, No. 6)*. Available from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19910184774>
- Weiss M, Steiner DF & Philipson LH. 2015. Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships. Available from <https://europepmc.org/article/nbk/nbk279029#free-full-text>

- Wilcox G. 2005. Insulin and insulin resistance. *Clinical biochemist reviews* 26(2): 19. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1204764/>
- Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan S-K. 2011. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49:1773-1782. Available at <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm.2011.250/html> (accessed April 12, 2022).
- Zafar U, Khaliq S, Ahmad HU, Manzoor S, Lone KP. 2018. Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. *Hormones* 17:299-313. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s42000-018-0051-3> (accessed April 12, 2022).

Literatura byla generována pomocí volně dostupného citačního manažeru Mendeley - <https://www.mendeley.com/download-desktop/>

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

DM- diabetes mellitus
EGF- epidermální růstový faktor
EMPA- Empagliflozin
GDM- gestační diabetes mellitus
HDL- lipoprotein o vysoké hustotě
IL-6- Interleukin 6
IL-8- Interleukin 8
MCP-1- monocytární chemoatraktantový protein- 1
MDA- malondialdehyd
MetS- metabolický syndrom
LDL- lipoprotein o vysoké hustotě
oGTT- orální glukózový toleranční test
ROS- reaktivní forma kyslíku
SGLT2- sodno-glukózový transportér
TCA- trikarboxylovaná kyselina
T2DM- diabetes mellitus 2. typu
W- potkani rodu Wistar

10 Samostatné přílohy

Příloha č. 1 t-test nezávislých skupin (W a HHTg s EMPA)

Proměnná	t-testy; grupováno: potkani (EMPA_study_Final_X)							
	Průměr (EW/EMPA)	Průměr (HHTg/EMPA)	sv	p	Poč.plat EMPA/W	Poč.plat. HHTg/EMPA	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
Malondialdehyd (ng/ml)	25,250	30,7056	22	0,007793	12	12	4	0,027870
4-hydroxyhexenal (ng/ml)	24,417	29,7083	22	0,034690	12	12	4	0,043905
4-hydroxynonenal (ng/ml)	28,842	34,0083	22	0,009062	12	12	4	0,044864
Hexanal (ng/ml)	18,892	23,3500	22	0,021270	12	12	3	0,125161
Heptanal (ng/ml)	28,658	30,2683	22	0,474072	12	12	8	0,001782
Oktanal (ng/ml)	13,583	12,2333	22	0,104048	12	12	21	0,000015
Nonanal (ng/ml)	20,592	15,6833	22	0,000390	12	12	33	0,000002
Dekanal (ng/ml)	17,383	11,7000	22	0,000003	12	12	19	0,000028
Undodekanal (ng/ml)	13,533	7,0225	22	0,000000	12	12	13	0,000175
Dodekanal (ng/ml)	9,408	7,9750	22	0,000040	12	12	12	0,000315
∑ Even carbonyles	59,267	55,2583	22	0,097109	12	12	1	0,907205
∑ Odd carbonyles	62,783	52,9742	22	0,002496	12	12	8	0,001935
∑ Carbonyles	122,050	108,2325	22	0,000476	12	12	3	0,134471
3-nitrotyrosin (pg/ml)	56,500	76,6667	22	0,000026	12	12	4	0,027459

Proměnná	Průměr (EW/EMPA)	Průměr (HHTg/EMPA)	sv	P	Poč.plat EMPA/W	Poč.plat. HHTg/EMPA	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
8-hydroxy-2'- deoxyguanosin (pg/ml)	188,917	216,9167	22	0,000195	12	12	4	0,026276
8-hydroxyguanosin (pg/ml)	173,250	237,5000	22	0,000000	12	12	2	0,408732
5-hydroxymethyluracil (pg/ml)	95,417	116,0000	22	0,002159	12	12	3	0,110357
o-tyrosin (pg/ml)	57,667	89,3333	22	0,000000	12	12	2	0,344480
3-Chlortyrosin (pg/ml)	28,250	39,3667	22	0,000094	12	12	1	0,830457
Leukotrien B4 (pg/ml)	47,917	65,9167	22	0,017456	12	12	4	0,021779
8-isoprostan (pg/ml)	23,750	46,9167	22	0,000000	12	12	3	0,107012
Leukotrien E4 (pg/ml)	116,167	121,2500	22	0,324055	12	12	1	0,882606
Leukotrien D4 (pg/ml)	60,667	68,7625	22	0,028892	12	12	5	0,012561
Leukotrien C4 (pg/ml)	64,917	81,4476	22	0,000361	12	12	2	0,160354
cysteinyl leukotrienes	241,750	271,4601	22	0,003041	12	12	3	0,055224
Interleukin 6 (pg/ml)	40,167	80,7500	22	0,000000	12	12	12	0,000277
Interleukin 8 (pg/ml)	18,833	53,6667	22	0,000000	12	12	5	0,012305
MPC1 (ng/ml)	1,533	4,1658	22	0,000000	12	12	25	0,000006
EGF (ng/ml)	4,75000	5,7000	22	0,035546	12	12	9	0,000710

Proměnná	Průměr (EW/EMPA)	Průměr (HHTg/EMPA)	sv	p	Poč.plat EMPA/W	Poč.plat. HHTg/EMPA	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
α 1-Antitrypsin (AAT) (ng/ml)	11,158	11,7750	22	0,447814	12	12	1	0,605365
Heparan sulfáte (mg/ml)	0,073	0,1775	22	0,000000	12	12	9	0,000858
Tumstatin (pg/ml)	53,000	82,9167	22	0,000000	12	12	4	0,043093
Endostatin (pg/ml)	68,750	115,4167	22	0,000000	12	12	2	0,409497

Příloha č. 2 t-test nezávislých vzorků (W a HHTg bez EMPA)

Proměnná	t-testy; grupováno: potkani (EMPA_study_Final_X)							
	Průměr (W)	Průměr (HHTg/C)	sv	p	Poč.plat (W)	Poč.plat. (hHTG/C)	F-poměr (Rozptyly)	p (Rozptyly)
Malondialdehyd (ng/ml)	25,017	31,1472	22	0,000099	12	12	1	0,593334
4-hydroxyhexenal (ng/ml)	17,117	25,1525	22	0,000002	12	12	2	0,187775
4-hydroxynonenal (ng/ml)	26,483	33,3867	22	0,000044	12	12	7	0,002435
Hexanal (ng/ml)	19,900	20,5250	22	0,673996	12	12	6	0,005333
Heptanal (ng/ml)	25,517	29,0342	22	0,013633	12	12	3	0,101654
Oktanal (ng/ml)	12,683	11,8667	22	0,392030	12	12	38	0,000001
Nonanal (ng/ml)	15,583	15,0692	22	0,628578	12	12	14	0,000109
Dekanal (ng/ml)	12,300	11,4000	22	0,378328	12	12	16	0,000063
Undodekanal (ng/ml)	8,817	6,7308	22	0,026543	12	12	58	0,000000
Dodekanal (ng/ml)	8,567	7,6417	22	0,160262	12	12	15	0,000085
Σ Even carbonyles	53,450	51,4333	22	0,568989	12	12	19	0,000028
Σ Odd carbonyles	49,917	50,8342	22	0,754952	12	12	8	0,001867
Σ Carbonyles	103,367	102,2675	22	0,858094	12	12	15	0,000091

Proměnná	Průměr (W)	Průměr (HHTg/C)	sv	P	Poč.plat (W)	Poč.plat. (hHTG/C)	F-poměr (Rozptyly)	p (Rozptyly)
3-nitrotyrosin (pg/ml)	52,417	71,4475	22	0,000000	12	12	3	0,073587
8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (pg/ml)	196,167	209,5833	22	0,053094	12	12	7	0,002938
8-hydroxyguanosin (pg/ml)	203,833	225,5461	22	0,004214	12	12	2	0,458557
5-hydroxymethyluracil (pg/ml)	95,000	115,4583	22	0,001096	12	12	5	0,011977
o-tyrosin (pg/ml)	59,500	80,4628	22	0,000000	12	12	3	0,051707
3-Chlortyrosin (pg/ml)	23,667	37,8167	22	0,000004	12	12	1	0,581103
Leukotrien B4 (pg/ml)	49,917	73,1667	22	0,009147	12	12	3	0,051394
8-isoprostan (pg/ml)	23,250	41,9333	22	0,000000	12	12	1	0,999753
Leukotrien E4 (pg/ml)	123,750	125,7912	22	0,583470	12	12	1	0,539783
Leukotrien D4 (pg/ml)	55,583	68,4167	22	0,000706	12	12	3	0,143708
Leukotrien C4 (pg/ml)	69,083	90,7500	22	0,000002	12	12	2	0,495425
cysteinyl leukotrienes	248,417	284,9578	22	0,000049	12	12	2	0,195224
Interleukin 6 (pg/ml)	49,250	97,5000	22	0,000000	12	12	5	0,010408
Interleukin 8 (pg/ml)	23,167	56,9167	22	0,000000	12	12	3	0,131996
MPC1 (ng/ml)	1,630	4,0667	22	0,000000	12	12	9	0,000876
EGF (ng/ml)	4,9833	6,4833	22	0,000010	12	12	1,20891	0,758596
α 1-Antitrypsin (AAT) (ng/ml)	14,467	11,3833	22	0,048560	12	12	2	0,313227
Heparan sulfát (mg/ml)	0,085	0,1700	22	0,000007	12	12	7	0,003267
Tumstatin (pg/ml)	54,417	74,8333	22	0,000005	12	12	10	0,000580
Endostatin (pg/ml)	56,083	96,5000	22	0,000000	12	12	1	0,524425