

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Změny ukazatelů glykemického obratu a inzulinové
rezistence uvnitř referenčního rozmezí C-peptidu u ne-
diabetických pacientů**

Bakalářská práce

Veronika Voltrová

školitel: Ing. Vladimír Kron PhD.

České Budějovice 2023

Voltrová, V.,2023:Změny ukazatelů glykemického obratu a inzulinové rezistence uvnitř referenčního rozmezí C-peptidu u ne-diabetických pacientů. [*The changes of glycemic turn and markers of insulin resistance within the C-peptide reference range in non-diabetic patients*. Bc.Thesis, in Czech]-49p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

The aim of this thesis is to summarize knowledge about the structure of C-peptide molecule and its effects on metabolic pathways. The next part reviews diagnostic methods used for measurement C-peptide level. The last segment shows the importance of the C-peptide level in relation to the markers of insulin resistance and insulin sensitivity, especially in non-diabetics.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem jí vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 30.3 2023.

.....
Veronika Voltrová

Poděkování

Děkuji svému školiteli, panu Ing. Vladimíru Kronovi PhD., za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při tvorbě této práce. Dále děkuji své rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

| | |
|--|----|
| Úvod | 1 |
| Cíle práce | 2 |
| 1. C-peptid | 3 |
| 1.1 Popis molekuly | 3 |
| 1.1.1 Struktura lidského C-peptidu..... | 5 |
| 1.1.1.1 N-konec | 5 |
| 1.1.1.2 Pozice 9-12, 15-18, 22-25..... | 6 |
| 1.1.1.3 Oblast kyseliny glutamové 27 – glycinu 31 | 6 |
| 1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti | 7 |
| 1.3 Tvorba C-peptidu..... | 7 |
| 1. 4 Metabolický efekt C-peptidu | 8 |
| 1.5 Význam C-peptidu při stanovení glycidového obratu..... | 15 |
| 1.6 Metody stanovení C-peptidu..... | 17 |
| 1.6.1 Stanovení koncentrace C-peptidu z krevního séra | 18 |
| 1.6.1.1 Další metodika stanovení C-peptidu | 18 |
| 1.6.2.1.2 C-peptid nalačno, po stimulaci glukagonem i.v. | 19 |
| 1.6.2.1.3 C-peptid nalačno a po definovaném příjmu..... | 19 |
| 1.6.2.1.4 C-peptid nalačno a v průběhu OGTT testu..... | 19 |
| 1.6.2.2 Stanovení koncentrace C-peptidu z moči | 20 |
| 2. Parametry hodnocené společně s C-peptidem..... | 20 |
| 2.1 Vztah C-peptidu a glykemických parametrů | 20 |
| 2.2.1 Možnosti stanovení inzulinoresistence a inzulínové senzitivity | 26 |
| 2.2.1.1 QUICKI | 26 |
| 2.2.1.2 Invertovaná lačná inzulínémie..... | 27 |
| 2.2.1.3 FIRI | 27 |
| 2.2.1.4 Produkt insulin-glykémie | 27 |
| 2.3 Vztah C-peptidu a BMI..... | 28 |
| 3. Stanovení C-peptidu | 28 |
| 3.1 Význam hodnocení C-peptidu v České republice | 28 |
| 3.2 Význam hodnocení C-peptidu ve světě | 29 |
| Diskuze | 30 |
| Závěr | 31 |
| Seznam zkratk | 33 |
| Literatura..... | 35 |

Úvod

Tato práce vzniká v návaznosti na studie publikované v posledních letech, zabývající se souvislostmi mezi hodnotami C-peptidu a dalšími ukazateli glykemického obratu (Kron et al., 2020). Úkolem práce je přinést ucelený soubor poznatků založený jak na primárních výzkumech struktury molekuly, tak molekulárních mechanismů studovaných na zvířecích modelech. V neposlední řadě je také využito publikací hodnotících klinická data pacientů, se zaměřením na nediabetickou populaci.

V souvislosti s vlivem C-peptidu na organismus je v práci užíváno slovní spojení glycidový obrat; jedná se o zdůraznění této části metabolismu v důsledku související s glykemickým obratem a udržením specifické hladiny glukózy v krvi.

Molekula C-peptidu byla poprvé izolována na konci šedesátých let minulého století (Brandenburg, 2008). Dlouhá léta byla považována tato molekula za inertní, bez biologické funkce a s absencí vlivu na metabolické procesy. Ačkoli ani dnes není znám zcela přesný mechanismus účinku, biologickou aktivitu C-peptidu testovalo množství studií na pokusných laboratorních modelech. V humánní diagnostice může v mnoha případech C-peptid, díky svým výhodným vlastnostem, nahradit stanovení koncentrace inzulinu. Proto se prvním odvětvím medicíny, kde se hodnocení C-peptidu začalo používat, stala diabetologie. Samostatnou problematiku představuje množství metod, použitelných pro stanovení hladin C-peptidu. Ačkoli je jich známo několik, jen zlomek z nich lze použít tak, aby hodnota byla ovlivněna co nejméně mnoha různými faktory. Ovšem s využitím důvěryhodných metod jsou dnes již známy studie zabývající se souvislostmi mezi hodnotami C-peptidu a ostatních parametrů hodnotících využití glukózy nebo lipidového metabolismu nediabetických osob. Ukazuje se, že nebezpečí mohou představovat prediabetické stavy, které ovlivňují metabolismus a v případě neřešení vedou ke mnoha komplikacím. Posuzování inzulinové rezistence, tedy prvního stadia poruchy v odpovědi organismu na inzulin často vychází z výpočtu speciálních indexů, odvozených od technicky náročných, pacienta zatěžujících vyšetření.

Cíle práce

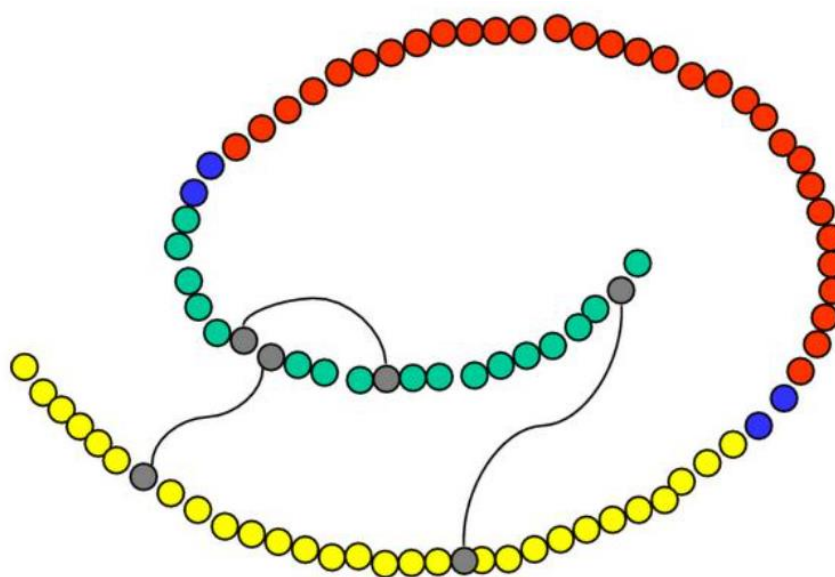
Tato práce si klade následující cíle:

- Popsat molekulu a metabolický efekt C-peptidu.
- Zhodnotit význam C-peptidu při hodnocení glykémie.
- Sumarizovat metody pro stanovení koncentrace C-peptidu.
- Posoudit vztah C-peptidu k ostatním metabolickým ukazatelům.

1. C-peptid

1.1 Popis molekuly

C-peptid (z anglického connecting-peptide, spojující peptid) je polypeptid složený z 31 aminokyselin, jehož funkcí je v molekule proinzulínu spojení A a B řetězce inzulínu. C-peptid je složen ze 35 aminokyselin, 4 aminokyseliny ztrácí v momentě rozštěpení molekuly proinzulínu (Solař, 2011).



Obrázek 1: Proinsulin. Zdroj: Brandenburg D. (2008)

Reakce před štěpením proinzulínu je znázorněna na obrázku 1. Kuličky reprezentují jednotlivé aminokyseliny: červeně je označen C-peptid s 31 aminokyselinami. Modrá barva po stranách C-peptidu charakterizuje aminokyseliny, které se v molekule po odštěpení již nevyskytují. Zeleně je A-řetězec, žlutě B-řetězec. Disulfidické můstky (šedě) formují velmi stabilní strukturu. Řetězce inzulínu v prekurzorové molekule vykazují prostorové uspořádání téměř identické s finální molekulou inzulínu (Munte et al., 2005). První spekulace o existenci C-peptidu se objevily poté, co byly laboratorně získány oba řetězce inzulínu, ovšem s velmi nízkými výtěžky. Don Steiner a Philip Oyer po svém experimentu v roce 1967 představili hypotézu

o polypeptidu mezi řetězci inzulinu. Chance et al. navrhli pojmenování C-peptid na základě charakterizace prasečího proinzulinu v roce 1968. Steiner a Clark v témže roce zjistili, že po reoxidaci inzulinu lze nalézt vysoké výtěžky této látky. Zdálo se, že proinzulin se podílí na tvorbě disulfidických můstků v inzulinu. Následující experimenty s potkany ukázaly schopnost detekce C-peptidu a přítomnost dvou řetězců inzulinu. Dále také bylo zjištěno, že C-peptid i inzulin jsou uvolňovány v ekvimolárních množstvích. V roce 1969 byl vyvinut první diferenciální imunotest umožňující detekci C-peptidu v krevním séru. Postupně se začal výzkum zaměřovat na humánní medicínu. Aby bylo možné stanovit C-peptid, došlo k vývoji metod RIA využívající ¹³¹I-Tyr-C-peptid. Připojení tyrosinu umožnilo značení jodem a využití radioimunologických metod. S rozšířením metody RIA začal být C-peptid posuzován nejen u diabetiků, ale i při výskytech stavů hypoglykémie a během OGTT testu, při stavech ketoacidóz a ve výzkumu jaterního metabolismu. Konformaci C-peptidu pak nastínily monoklonální protilátky, které také pomohly identifikovat antigenní determinanty pro lidský inzulin (Brandenburg, 2008).

| | | | | | | | |
|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|----|----|----|----|
| | 1 | 6 | 11 | 16 | 21 | 26 | 31 |
| <i>human</i> | E A E D L Q V G Q V | E L G G G P G A G S | L Q P L A L E G S L | Q | | | |
| <i>monkey</i> | E A E D P Q V G Q V | E L G G G P G A G S | L Q P L A L E G S L | Q | | | |
| <i>guinea pig</i> | E L E D P Q V E Q T | E L G M G L G A G G | L Q P L A L E M A L | Q | | | |
| <i>dog</i> | E V E D L Q V R D V | E L A G A P G E G G | L Q P L A L E G A L | Q | | | |
| <i>rat-I</i> | E V E D P Q V P Q L | E L G G G P E A G D | L Q T L A L E V A R | Q | | | |
| <i>rat-II</i> | E V E D P Q V A Q L | E L G G G P G A G D | L Q T L A L E V A R | Q | | | |
| <i>sheep</i> | E V E G P Q V G A L | E L A G G P G A G G | L E G P P | Q | | | |
| <i>ox</i> | E V E G P Q V G A L | E L A G G P G A G G | L E G P P | Q | | | |
| <i>pig</i> | E A E N P Q A G A V | E L G G G L G | G L Q A L A L E G P P | Q | | | |

Obrázek 2: Srovnání sekvence aminokyselin C-peptidu u různých druhů. Zdroj: (Munte et al., 2005).

Z obrázku 2 je zřejmé, že aminokyseliny na určitých pozicích jsou evolučně konzervované napříč druhy. Zejména kyselina glutamová na pozicích 1 a 5 je pro vazbu C-peptidu významná (Hills et al., 2008). Nicméně existují pozice, na kterých jsou přítomné různé aminokyseliny v závislosti na živočišném druhu (Munte et al., 2005). Lze si rovněž všimnout neobsazenosti určitých pozic (u ovcí, skotu a prasat), neboť délka C-peptidu se (stejně jako zastoupení aminokyselin) liší napříč druhy.

1.1.1 Struktura lidského C-peptidu

Jeden z prvních modelů studující konformaci C-peptidu pracuje s infračervenou spektroskopií a Fourierovou transformací. Experiment naznačil jako nejpravděpodobnější strukturu randomcoil tj. náhodného klubka (Xie et al., 1993). Další práce využívající 2,2,2-trifluorethanol popisují sklon ke tvorbě šroubovice (Henriksson et al., 2005). Střední segment polypeptidu obsahuje zejména prolin a glycin. Tyto aminokyseliny dovolují tvorbu různých struktur. Výpočetní studie ovšem představila helix-turn-helix model C-peptidu, tedy potvrdila existenci šroubovic (Ido Y et al., 1997). Tento model byl potvrzen substitucí prolinu na určitých pozicích N-terminálního segmentu. Nahrazení znamenalo nižší ochotu ke tvorbě šroubovice. Přítomnost alaninu na pozicích 4,7,8 a 10 na N-terminálním konci naopak podpořila helikální konformaci (Henriksson et al., 2005). V bílkovinách právě hydrofobní rezidua alaninu přispívají ke tvorbě α -helixu.

Detailní popis lze zejména nalézt ve studii Munte et al. (2005), která využila metody 2D NMR spektroskopie, umožňující velmi vysoké rozlišení. Pro lepší viditelnost struktur byla analýza prováděna vodným roztokem s přídavkem 2,2,2-trifluoroethanolu. Vlastnosti fyziologického prostředí se sice mohou měnit a určité popsané struktury odlišovat, ovšem závěry byly porovnány i s předchozími provedenými studiemi. Experiment potvrdil existenci velmi dobře organizované oblasti 27. kyseliny glutamové a glycinu 31. Právě tento terminální pentapeptid byl již v devadesátých letech navržen jako aktivní místo C-peptidu (Weiss et al., 1990).

1.1.1.1 N-konec

Část skládající se z alaninu na pozici 2 až leucinu v pozici 5 obsahuje vodíkové vazby. Úhly mezi rezidui na pozicích 3 a 4 ukazují na přítomnost otočky β -turn typu I. Pravděpodobně jde o druhou nejuspořádanější strukturu C-peptidu hned po terminálním pentapeptidu, který bude popsán níže (Munte et al., 2005). Kyselé pH směřuje k preferenci sekundární struktury β -listu v oblasti terminálního N-konce, zatímco ostatní segmenty C-peptidu zůstávají ve struktuře random coil (Unnerställe, 2012). Landreh et al. (2014) ve své práci

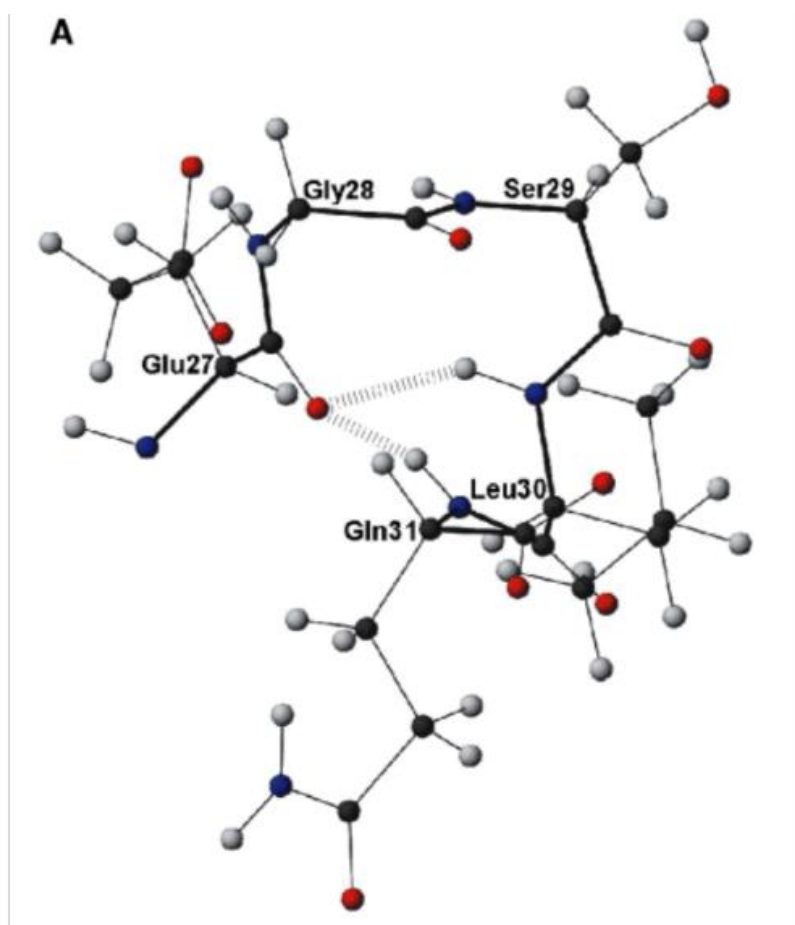
ovšem upozorňují, že není k dispozici studie těchto struktur za vysokého rozlišení.

1.1.1.2 Pozice 9-12, 15-18, 22-25

Jedná se o tři oblasti, definované glutaminem na pozici 9 až leucinem na pozici 12, glycinem na pozici 15 až alaninem v pozici 18 a glutaminem na pozici 22 až alaninem v pozici 25. Pro každé reziduum ve vymezeném regionu existuje velké množství možných konformací, které může reziduum zaujímat (znázorněno Rachamandrovým plotem). Naměřené délky vazeb také neodpovídají přítomnosti vodíkových vazeb.

1.1.1.3 Oblast kyseliny glutamové 27 – glycinu 31

Jedná se o již výše zmíněný pentapeptid, reprezentující nejspíše nejuspořádanější strukturu C-peptidu. Existuje pouze omezené množství možných konformací, definovat dobře lze také orientaci postranních řetězců, zejména u leucinu.



Obrázek 3: Konformace terminálního pentapeptidu. Zdroj: Munte et al., 2005

Na obrázku 3 vidíme prostorovou konformaci terminálního pentapeptidu. Možnou, ale méně preferovanou konformaci vykazuje leucin v pozici 30. Přítomnost otočky β -turn typu III značí úhly mezi glycinem 28 a serinem 29. Tento typ je v bílkovinách poměrně vzácný, nicméně velmi jasně definovaný (Munte et al., 2005).

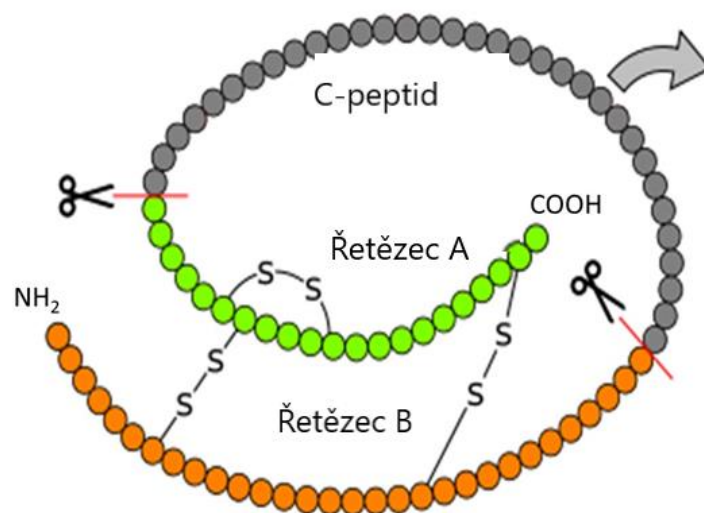
1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

C-peptid napříč savčími druhy neobsahuje aromatické aminokyseliny, hydrofobní rezidua jsou taktéž málo zastoupena. Tyto vlastnosti ukazují na dobrou rozpustnost ve vodných roztocích. Izoelektrický bod humánního C-peptidu je 3,45. Tuto hodnotu ovlivňují hojně zastoupené kyselé aminokyseliny. N-terminální konec má vliv na správnou formaci proinzulínu. Experimentálně provedená delece či substituce reziduí v oblasti 3-6 snížila schopnost tvorby požadované struktury proinzulínu o 60-80 % (Chen et al., 2002). Analýzy sekvencí inzulínu a C-peptidu odhalily specifický vývoj obou řetězců a N-terminálního konce C-peptidu tak, aby bylo zajištěno správné složení inzulínových řetězců (Wang et al., 2012). Při skladování v sekrečních granulích vykazuje inzulín tvorbu oligomerů. Právě C-peptid přispívá ke správnému vytvoření řetězců neutralizací náboje mezi C-peptidem a inzulínem za granulárního pH 5,5 (Landreh et al., 2012, Nettleton et al., 2000). Hlavní podíl na neutralizaci mají nabitě zbytky Glu 1, Glu 3 a Glu 11 (Nerelius et al., 2010). Proces neutralizace je reverzibilní, ke změně dochází v krevní plazmě zvýšením hodnoty pH na 7,5. Tento mechanismus podporuje hypotézu o roli C-peptidu v udržování rovnováhy mezi různými stavy inzulínu v sekrečních granulích (Landreh et al., 2013). Největší stabilitu vykazuje C-peptid za pH 7,4 a teplotě 37°C. Naopak k degradaci dochází při vychýlení pH oběma směry (Li et al., 2003). Je patrné, že podmínky pro stabilitu C-peptidu se shodují s fyziologickým prostředím organismu.

1.3 Tvorba C-peptidu

Inzulin byl popsán v roce 1967, ve stejné práci byl také charakterizován jeho prekurzor, proinzulin (Steiner et al., 1967). Právě štěpením této molekuly

dochází ke vzniku inzulinu a C-peptidu. K tomu dochází pomocí endopeptidáz, přičemž endopeptidáza typu I štěpí proinzulin mezi C-peptidem a B řetězcem, zatímco endopeptidáza typu II působí na straně A řetězce. Dvojice bazických aminokyselin na obou stranách C-peptidu jsou odstraněny karboxypeptidázou H (Munte et al., 2005). Tento enzym, známý také jako karboxypeptidáza E (EC 3.4.17.10) umožňuje odštěpení argininu nebo lysinu z polypeptidů (databáze BRENDA, 2022). Následně jsou obě chemické látky skladovány v sekrečních granulích β -buněk pankreatu a uvolněny v ekvimolárním množství (Yosten et al., 2014).



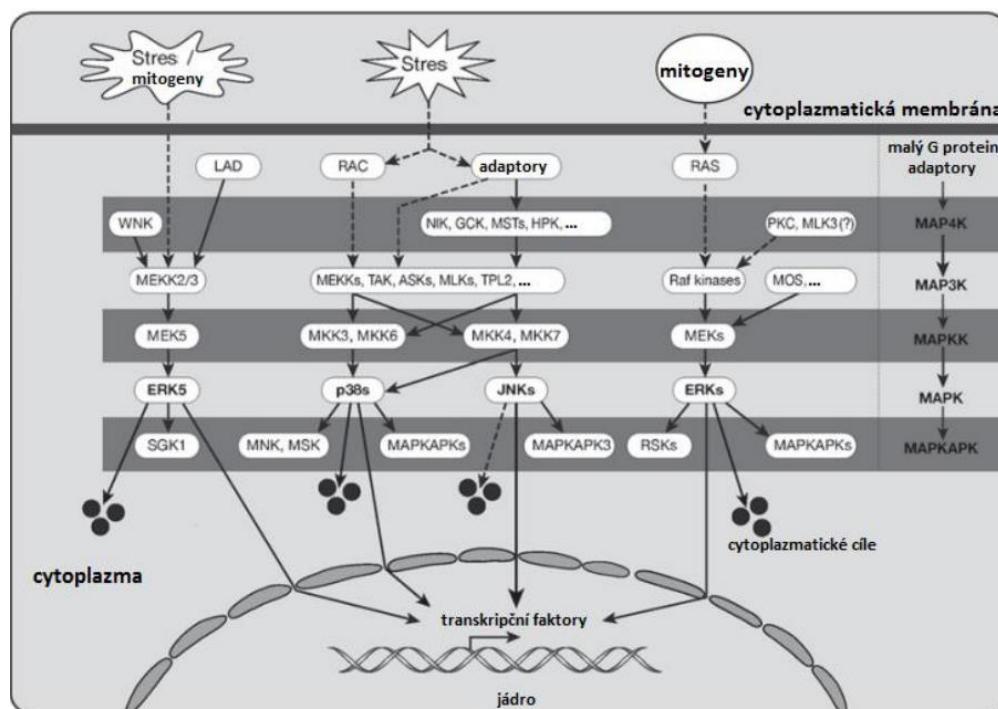
Obrázek 4: Molekula proinsulinu. Zdroj: proteopedia.org/wiki/images/d/db/Proinsulin.jpg (upraveno).

1. 4 Metabolický efekt C-peptidu

Z chemické povahy C-peptidu a podobnosti s peptidickými hormony byla předpokládána existence specifického receptoru (Hills et al., 2008). Kandidátními se staly receptory spřažené s G-proteinem, nacházejících se na cytoplazmatické membráně (Rigler et al., 1999). Za jeden z hlavních receptorů byl považován GPR146, nicméně studie z posledních let tuto domněnku nepotvrdily (Lindfors et al., 2020). C-peptid ovlivňuje dráhy závislé na Ca^{2+} ,

Na⁺/K⁺ ATPázu, endoteliální NO syntázu. Právě studie C-peptidu a Na⁺/K⁺ ATPázy poukázaly na možnost ovlivnění intracelulárních enzymů C-peptidem (Hills et al., 2008). V ledvinných tubulech kryš C-peptid v dávkách 10⁻¹¹ -10⁻⁸ mol/l stimuloval aktivitu Na⁺/K⁺ ATPázy. Tato studie je přitom zásadní pro další provedené experimenty zabývající se stimulačním účinkem C-peptidu na Na⁺/K⁺ ATPázu, zároveň byla zjištěna synergie mezi C-peptidem a taktéž přítomným neuropeptidem Y (Ohtomo et al., 1996). Jedná se o pankreatický polypeptid, u člověka jej lze najít v centrální i periferní nervové soustavě (Tatemoto et al., 1982). NPY je produkován sympatickými neurony a dření nadledvin. Podílí se na regulaci homeostázy kardiovaskulárního systému. Další regulace jsou zajišťovány na úrovni imunitního systému, v souvislosti s C-peptidem je namístě zmínit podíl na regulaci příjmu potravy (Batterham and Bloom, 2003). NPY působí jako stimulant chuti k jídlu, podání do hypotalamu způsobilo přejídání a obezitu. Receptory pro NPY ovlivňující příjem potravy jsou receptory Y₁ a Y₅. V případě vyřazení Y₁ došlo jen k nízkému omezení příjmu potravy a později se rozvinula obezita. Knock-out myši pro Y₅ trpěly obezitou a konzumovaly vyšší množství potravy. Myši s deficitem obou receptorů snížily příjem potravy, ale v pozdějším stadiu vykazovaly zvýšenou adipozitu (Nguyen et al., 2012). Právě tyto receptory se řadí k receptorům spřažených s G-proteinem (Batterham and Bloom, 2003). Tento typ receptorů obsahuje po jedné extracelulární a intracelulární doméně, dále sedm domén transmembránových. Jejich funkcí je převod signálu z vnějšího prostředí na fyziologickou odpověď buňky (Fredriksson, 2003). Stimulační účinek C-peptidu na Na⁺/K⁺ ATPázu nebyl pozorován v buňkách s přítomností pertusového toxinu. Stejný účinek vyvolala přítomnost FK-506, inhibitoru proteinové fosfatázy regulované kalmodulinem a Ca²⁺ ionty, která se účastní přenosu vápníkových iontů v Ca²⁺ dependentních signalizačních drahách (Azzi et al., 2013). Studie z devadesátých let zjistily zlepšení funkce ledvin při podávání C-peptidu společně s inzulinem u diabetických pacientů (Johansson et al., 1993), dále také zlepšení funkce autonomního nervstva (Johansson et al., 1999). Kunt et al. (1999) dospívají k závěru, že C-peptid snižuje množství deformovaných červených krvinek u diabetických pacientů. Tyto závěry by mohly vycházet právě z účinku C-peptidu na Na⁺/K⁺ ATPázu (Hills et al., 2008). Již zmíněný NPY má schopnost aktivovat MAP kinázu. Na základě

předchozí studie C-peptidu a NPY byla pro další experiment zvolena buněčná linie Swiss 3T3, dále buněčné klony 3T3-L1 a 3T3-F442A, schopny diferenciaci v adipocyty například po ošetření dexametazonem, dále svalové buňky potkana L₆E₉, buňky odvozené od lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2, gliomové buňky C6, dále NG108.15, hybridom mezi C6BU-1 a buňkami neuroblastomu N18TG-2; potkaní somatomamotrofní (placentární) buňky GH₄C₁. Byly použity tři typy C-peptidu: lidský a dva typy potkaních. Bylo zjištěno, že všechny typy C-peptidu aktivovaly fosforylaci MAPK u 3T3 a 3T3-F442A buněk, u všech dalších typů buněk nikoli. U 3T3-L1 buněk byla zvýšena bazální fosforylace, proto byl u těchto buněk testován stimulační účinek inzulinu. Zatímco inzulin v těchto buňkách fosforylaci MAPK zvýšil, na C-peptid tyto buňky nezareagovaly. Fosforylace vyvolaná C-peptidem byla závislá na čase a koncentraci. Maximální hodnoty bylo dosaženo v 1. minutě a dávce 1 nM C-peptidu. Koncentrace 100 nM již nebyla účinná. Dále byly buňky 3T3 ošetřeny NPY a fosforylace p44 a p42 MAPK se zvýšila 2-6krát. Účinky C-peptidu byly blokovány pertusovým toxinem a dále inhibátorem PD 88059. Tento závěr se shoduje s výsledky předchozích experimentů, znovu tedy byla vyslovena domněnka o existenci receptoru pro C-peptid patřící do rodiny GPCR receptorů (Kitamura et al., 2001). MAPK jsou evolučně konzervované enzymy, které lze rozdělit do tří rodin: ERK (extracelulárním signálem regulované kinázy), JNK (c-Jun N-terminální kinázy) a p38 MAPK. Aktivaci ERK vyvolávají nejčastěji růstové faktory, JNK a p38 ovlivňuje působení stresu nebo prozánětlivých cytokinů (Dent et al., 2003). Kaskády MAPK kinázy vysvětluje obrázek níže.



Obrázek 5: Kaskády ERK5, p38, JNK, ERK1 / 2. (Keshet and Sheget, 2010. upraveno).

Další působení C-peptidu na Na^+/K^+ ATPázu bylo studováno na ovlivnění vazopresinového receptoru VCAM-1. V lidských fibroblastech a mezangiálních buňkách způsobil C-peptid expresi tohoto receptoru na úrovni RNA i proteinu. Upregulace VCAM-1 a následné zvýšení účinku vazopresinu vede ke zvýšení aktivity Na^+/K^+ ATPázy (Maestroni et al., 2005). Ve studiích s terapeutickým podáváním C-peptidu pacientům s diabetem typu 1 je opakovaně prezentováno zlepšení průtoku krve ke tkáním a orgánům. Vazodilatační účinky C-peptidu objasnili studie pracující s endoteliálními buňkami aorty krav. Postprandiální koncentrace C-peptidu 6,6 nM způsobila intracelulární zvýšení úrovně Ca^{2+} iontů a následné uvolnění NO. C-peptid by mohl pozitivně působit na Ca^{2+} senzitivní endoteliální NO syntázy tím, že způsobí zvýšení intracelulární koncentrace vápníkových iontů (Wallerath et al., 2003). Dále byla pozorována upregulace genu pro eNOS po stimulaci C-peptidem (Kitamura et al., 2003). Na transkripci tohoto genu se podílí výše zmíněná ERK MAPK. Proto byla na endoteliálních buňkách plicních kapilár myši (LEII) zkoumána schopnost C-peptidu aktivovat transkripční faktory. C-peptid aktivoval ERK MAPK a p38, zatímco inzulin pouze ERK (Kitamura et al., 2002). V kontrastu s touto studií bylo na humánních buňkách proximálních

tubulů ledviny zjištěno, že C-peptid nemá na p38 aktivační účinek. V přítomnosti C-peptidu došlo k fosforylaci JNK, ERK 1 a 2, dále translokaci PKC delta a epsilon. Právě tento jev se zdá být klíčový pro aktivaci ERK1/2 a JNK. Aby mohla být aktivována samotná PKC, je zapotřebí diacylglycerolu vznikajícího hydrolýzou membránových fosfolipidů umožněnou fosfolipázou C. Pokud došlo k inhibici fosfolipázy C, byl inhibován účinek C-peptidu na fosforylaci ERK1/2 a JNK, translokaci PKC delta. Opět také došlo k inhibici efektu C-peptidu pertusovým toxinem. Vysoké koncentrace C-peptidu, tj. nad fyziologickou hladinou, měly pouze minimální efekt ve srovnání s fyziologickými hladinami (Zhong et al., 2004). Dle této studie taktéž C-peptid umožňuje translokaci RhoA z cytoplazmy do membrány. RhoA je GTPáza s aktivačním účinkem (Loirand and Pacaud, 2010). Právě tyto malé GTPázy mohou představovat určitý mezikrok v aktivaci MAPK, závislé na PKC. Translokace RhoA je klíčová pro aktivaci Akt, enzymu, jehož aktivace je popsána níže. Zhong et al. (2004) ve své práci poukázali na rozdílné výsledky pozorovaných efektů C-peptidu v závislosti na zvoleném modelu: lze vidět rozdíly jak mezi druhy, tak buněčnými typy.

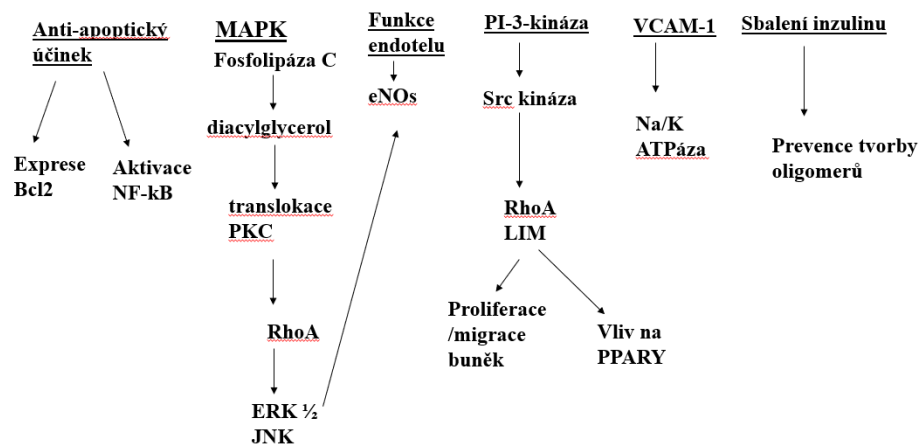
Přibližně byla popsána aktivace MAPK prostřednictvím C-peptidu následovně: C-peptid se váže na receptor spřažený s G-proteinem, dojde k aktivaci fosfolipázy C. Dojde k vzrůstu intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů, následkem čehož jsou stimulovány určité izoformy protein kinázy C. Proběhne aktivace a translokace RhoA závislá na PKC. Následně dojde k aktivaci MAPK (Hills and Brunskill, 2009). Mezi další enzymy, které C-peptid ovlivňuje, jsou PI-3-kinázy. Jelikož se jedná o látky klíčové v signálních drahách inzulínu, ve výzkumu diabetu jsou intenzivně studovány. Jejich funkcí je fosforylace hydroxylové skupiny inositolu v molekule fosfatidylinositolu. Podílí se na regulaci rozmanitých buněčných procesů – růst, proliferace, diferenciace a intracelulární přenos. Právě PI-3-kinázy aktivují jednu z proteinkináz, proteinkinázu B, známou pod zkratkou Akt (Vanhaesebroeck et al., 2001). V CD^{4+} lymfocytech Src kinázy aktivují PI-3-kinázy, ty následně aktivují Rho GTPázy, dochází ke stimulaci Rho kinázy a LIM kinázy. Tyto enzymy působí na řetězec myozinu a kofilin, čímž je usnadněna kontrakce a migrace buněk (Aleksic et al., 2009). Obecně přijímané přímé důsledky působení C-peptidu na

PI-3-kinázu jsou: zvýšení proliferace tubulárních buněk ledvin a neuronů (Al-Rasheed et al.,2004), (Li et al., 2003). Dále zvýšená migrace T buněk (Walcher et al.,2004). PI-3-kináza také figuruje ve studii prezentující účinky C-peptidu a inzulinu na receptory γ aktivované proliferátorem peroxizomu (PPAR γ), kde obě látky způsobily fosforylaci PI-3-kinázy a tím aktivaci PPAR γ dráhou nezávislou na přítomnosti ligandu (Al-Rasheed et al., 2004). Tyto receptory představují cíl perorálních antidiabetik, thiazolidindionů, využívaných při léčbě diabetu typu II a ovlivňujících metabolismus lipidů a sacharidů prostřednictvím regulace genů řídících homeostázu těchto živin přes PPAR γ receptory. Ve srovnání C-peptidu a inzulinu na PPAR γ byl C-peptid účinnější (EC₅₀ 4 nM), než inzulin s EC₅₀ 10 nM. Účinek C-peptidu byl opětovně rušen pertusovým toxinem. (Al-Rasheed et al., 2004). Dimer PPAR/RXR tvoří vazbu s „hormon responsivním elementem“ označovaným jako PPRE. Tento element lze nalézt v oblasti promotoru genu pro lipoproteinovou lipázu. Právě tento enzym se uplatňuje v regulaci metabolismu lipidů (Chinetti et al., 1998). C-peptid také vykazoval schopnost indukovat expresi genů regulovaných PPAR γ . Mezi takové se řadí gen pro scavenger receptor CD 36. Tento receptor hraje důležitou roli v preventivním působení proti inzulinové rezistenci (Al-Rasheed et al.,2004). Tento transmembránový receptor se nachází na krevních destičkách, erytrocytech, makrofázích, monocytech a endotelových buňkách (Bordessoule et al.,1993).

Ačkoli určité účinky C-peptidu mohou být podobné působení inzulinu, jeho receptorový a signalizační systém je odlišný (Hills and Brunskill, 2008). Posledním účinkem je pak upregulace syntézy glykogenu ve svalových buňkách (Grunberger et al., 2001). Další studie se zaměřily na potenciální protektivní účinek C-peptidu u diabetické nefropatie, častou komplikací spojenou s diabetem. Pro experiment byly použity buňky proximálních tubulů ledvin vačice, byl aplikován TNF- α v dávce 300 ng/ml (Al-Rasheed et al., 2006). Právě tento cytokin peptidové povahy se považuje za původce atrofie a apoptózy buněk tubulů ledvin často přítomných u postižení ledvin způsobeného diabetem. TNF- α může vyvolat diferenciaci, proliferaci, zánět a buněčnou smrt interakcí s TNF R1 a TNF R2 (Wajant et al., 2003a). Dojde-li k vazbě TNF- α na TNF R1, jsou aktivovány dráhy zahrnující kaspázy a vedoucí k apoptóze.

TNF R2 patří k receptorům interagujícím s proteiny TRAF. Jedná se o domény schopné aktivace kaskád vedoucích k expresi genů (Wajant et al., 2003b). Právě TRAF 2 a NF-κB se podílí na regulaci antiapoptotických faktorů. NF-κB působí jako hlavní molekula určující, zda buňka projde apoptózou (Hills and Brunskill, 2008). Experiment ukázal, že v buňkách ošetřených C-peptidem nebo inzulinem, byla úroveň apoptózy vyvolané TNF-α snížena. Obě testované látky aktivovaly NF-κB, koncentrace a křivky aktivace byly odlišné. Inzulin s maximální koncentrací 100 nM vykazoval sigmoidální křivku, zatímco C-peptid v maximální koncentraci 5 nM tvořil křivku ve tvaru zvonu. Opět byl potvrzen inhibiční účinek pertusového toxinu na C-peptid. Dalším jevem ukazujícím na existenci specifického receptoru spáženým s G-proteinem, byla schopnost C-peptidu stimulovat vazbu GTPγS (analog GTP aktivující G-protein), na G_{ai} (podjednotka G-proteinu inhibující tvorbu cAMP). Efekt C-peptidu dle této práce spočívá ve schopnosti aktivace exprese genů pro látky zabraňující apoptóze, jako je TRAF 2 (Al-Rasheed et al., 2006). I další studie zkoumající vliv C-peptidu na izolovaných lidských buňkách pankreatu

Efekty C-peptidu



Obrázek 6: Metabolické efekty C-peptidu (Voltrová, 2023).

potvrzuje, že C-peptid snižuje úroveň apoptózy buněk. Následkem je zvýšená exprese mRNA pro protein Bcl2, který danému procesu zabraňuje (Bugliani et al., 2007). Efekty C-peptidy jsou schematicky znázorněny na obrázku 6.

Bylo zjištěno, že C-peptid také aktivuje alfa-enolázu. Interakce probíhá mezi kyselinou glutamovou na pozici 27 C-peptidu a lysinem K₄₃₄ enzymu. Na základě tohoto poznatku byla vyslovena domněnka o alfa-enoláze coby receptoru pro C-peptid. (Ishii et al., 2012) Alfa-enoláza je enzym katalyzující přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. Vyskytuje se na povrchu monocytů, T a B lymfocytů, buněk nervové soustavy, endoteliálních buněk, kde představuje receptor pro plazminogen (Díaz-Ramos et al., 2012). Mohla by tedy existovat jistá souvislost mezi plazminogenem a C-peptidem, ať už kompetice o receptor, či jiná specifická vlastnost ovlivňující aktivaci enzymů glycidového metabolismu.

1.5 Význam C-peptidu při stanovení glycidového obratu

Vyšetření C-peptidu zatím nepatří k rutinně předepisovaným vyšetřením u nediabetických pacientů. Při hodnocení glycidové dynamiky je však indikace tohoto vyšetření namístě. C-peptid totiž reflektuje velmi dobře produkci inzulínu, protože není játry tak rychle metabolizován. Výhodou také představuje delší čas v cirkulaci na rozdíl od samotného inzulínu. Biologický poločas inzulínu v krvi je 3-5 minut, C-peptidu 20-30 minut (Leighton et al. 2017). Cirkulující množství C-peptidu je proto zhruba pětikrát vyšší. Nelze opomenout fakt, že koncentrace C-peptidu není rovněž ovlivněna exogenním inzulínem (Jones et al., 2013). Vyšetření C-peptidu může pomoci při rozhodování, zda indikovat léčbu inzulínem (Friedecký et al., 2015).

Existují i studie zaměřující se na hladiny C-peptidu v těhotenství. Jejich výsledky jsou ovšem rozporuplné. Jedna ze studií zjistila zvýšené hladiny C-peptidu v těhotenství u žen s diagnostikovaným diabetem typu I. Studie přikládá tento závěr zvýšení funkce β -buněk pankreatu, což je spojováno s vyšší regulací glykémie během těhotenství (Nielsen et al., 2009). Zvýšené koncentrace C-peptidu prezentovala i studie zabývající se mechanismy přispívajícími ke zlepšení funkce β -buněk u gravidních žen s diagnostikovaným diabetem typu I (Nalla et al., 2020). Studie provedená o tři roky později s cílem ověřit často uváděné zvyšování hladin C-peptidu u rodiček s diabetem typu I, ovšem tyto výsledky nepotvrdila. Autoři ve studii vyzvali ke

standardizaci postupu měření hladin C-peptidu u těhotných diabetiček (Murphy et al., 2012).

V současnosti lze najít studie hodnotící C-peptid spolu s dalšími glykemickými parametry, jak u diabetických, tak zdravých jedinců. Výsledky těchto studií rozebírá kapitola 2. Vyšetření C-peptidu však bude s velkou pravděpodobností nabývat ještě většího významu. V polovině roku 2021 byla publikována studie zabývající se souvislostí mezi hladinami C-peptidu a subklinickým poškozením myokardu, která tuto závislost potvrdila (Chen et al., 2021). Zajímavým vědeckým problémem v budoucnu může být výzkum souvislosti mezi poruchami metabolismu glukózy a stresovými událostmi (Thota et al., 2017).

Proč je vyšetření C-peptidu zatím spíše opomíjeným? Důvodem může být fakt, že C-peptid byl dlouho považován za inertní molekulu bez fyziologického významu (Wahren et al., 2000). Dalším z možných důvodů může být také malá informovanost běžné populace, neboť samotný diabetes je prezentován spíše ve spojitosti s měřením glykémie, úpravou stravy, léčbou inzulínem. Co se týká předpisu vyšetření C-peptidu samotnými lékaři, mohou zde hrát roli ověřené stereotypy používané při diagnostice diabetes mellitus, kdy rozhodující jsou parametry glykémie, dále pak přítomnost klinických příznaků, případně výsledky OGTT testu. Indikace vyšetření C-peptidu u nediabetických pacientů by však mohla odhalit počínající inzulínovou rezistenci, která může vést až k metabolickému syndromu. A ačkoli je dnes patrna snaha o více personalizovanou, konkrétní „na míru ušitou“ léčbu, praktický lékař má jen výjimečně dostatek času obsáhnout komplexitu obtíží, s nimiž pacient přichází, natož odhalit doposud nevýrazné symptomy. Problematické je také zanedbávání preventivních prohlídek a řešení až vzniklých problémů. Přitom řešení samotné inzulínové rezistence je méně nákladné, než léčba komplikací metabolického syndromu.

Další problematikou je dostupnost samotného stanovení hladiny C-peptidu: metoda RIA vyžaduje finančně náročnější přístrojové vybavení, které nemusí být dostupné zejména ve zdravotnických zařízeních menších měst a obcí.

1.6 Metody stanovení C-peptidu

C-peptid lze stanovit metodami RIA nebo ELISA (Solař, 2011). K jejich výhodám patří schopnost detekce již $\text{pg}\cdot\text{l}^{-1}$ látky. Pracuje se s gama zářiči, jejichž výhodami jsou absence speciální přípravy vzorku a dobrá pronikavost stěnou zkumavky. Značení radioaktivním izotopem ovšem mění hmotnost a vlastnosti molekuly. Metoda RIA funguje na principu kompetice značeného a neznačeného antigenu o malé množství neznačené protilátky. Detekovat lze hormony, léčiva, biomarkery, protilátky, vitamíny a koagulační faktory. Ačkoli patří RIA k jedné z prvních radioimunologických metod využívajících gama záření, dnes její popularita klesá. Důvodem je vývoj citlivějších metod, dále vysoká cena a nestálost radioizotopů. Nelze opomenout ani radiační zátěž (Cibiček and Vacek, 2014).

ELISA se řadí k heterogenním metodám, tzn. reaktant se váže na pevnou fázi. Provedení může být kompetitivní, kdy o imobilizovanou monoklonální protilátku soupeří značený antigen a neznačený analyt. Po přidání substrátu je měřena intenzita signálu nepřímo úměrná koncentraci analytu. Od charakteru analytu se odvíjí nekompetitivní uspořádání: pro stanovení antigenu se užívá sendvičového testu, protilátka je ukotvena k pevné fázi. Detekce protilátky vyžaduje naopak ukotvení antigenu. Intenzita zbarvení je koncentraci úměrná přímo. ELISA má velmi podobné využití jako RIA, nezastupitelnou roli hraje při měření proteinů (Cibiček and Vacek, 2014). Pro zdravotnická zařízení jsou dostupné plně automatizované analyzátoři umožňující zpracování velkého množství vzorků.

Problémem při stanovení C-peptidu je doposud neexistující jednotný a standardizovaný protokol pro detekci a referenční rozmezí. Lze vidět poměrně velké rozdíly mezi názory na optimální rozmezí hodnot C-peptidu. Nejen odborné studie, ale i produkty určené pro diagnostiku nemají jednotný design a detekce pak probíhá v různých rozmezích (Kron et al., 2020). MZ ČR považuje za fyziologické hodnoty v rozmezí 210-930 pmol/l , je možný také interval 300-1300 pmol/l (MZ ČR, 2022). Zde tedy vyvstává otázka, co znamená nedetekovatelná hodnota C-peptidu; tento závěr se může zakládat na skutečné absenci vlastní tvorby inzulínu, nicméně příčinou může být i analýza v užším referenčním rozmezí a typ použitého analyzátoři. Jednou z možných

metod pro stanovení C-peptidu by mohla být v dalších desetiletích detekce C-peptidu z vlasů. Autoři vycházejí z poznatků o detekci zejména steroidních hormonů právě z tohoto biologického materiálu. Výhodou této metody by mohlo být zjištění dlouhodobého stavu sekrece inzulínu bez nepříjemných vedlejších účinků provokačních testů, dále snadný odběr vzorku pro analýzu. Byla také zjištěna závislost mezi hodnotami glykovaného hemoglobinu a glukózy, korelující se závěry předchozích studií využívajících doposud používané metody pro stanovení C-peptidu. Autoři vyzvali k dalším studiím s větším množstvím vzorků a se zaměřením na vlivy potenciálně ovlivňující interpretaci výsledků (Abdulateef et al., 2020). Ačkoli by navržený způsob mohl mít určité výhody, momentálně se jedná o další metodu bez jasně validovaného protokolu pro měření. Nicméně existuje navazující studie zabývající se možností detekce C-peptidu v nehtech a vlasech, dále přítomnosti C-peptidu v těchto strukturách u pacientů s diabetem typem I, pro které jsou typické nízké až neměřitelné hodnoty. Výsledky ukázaly přítomnost C-peptidu ve vlasech i nehtech jak zdravých, tak diabetických osob, přičemž nižší hladiny se vyskytovaly u diabetiků, ke stejnému výsledku dospělo mnoho dalších studií. Byl tedy navržen další způsob, jeho zásadní mezerou, stejně jako v případě měření C-peptidu z vlasů, je nesoulad mezi hodnotami v krevním séru a vlasy/nehty. To bylo vysvětleno možným zjištěním nejen bazální, ale i prandiální sekrece, na rozdíl od detekce v séru (Salih et al., 2020). Kromě toho je nutno vzít v potaz, zda je možné srovnávat peptidickou molekulu C-peptidu s chemicky odlišnou strukturou steroidních hormonů.

1.6.1 Stanovení koncentrace C-peptidu z krevního séra

Vyžaduje pouze krátkodobou spolupráci pacienta při odběru venózní krve. Referenční interval se pohybuje mezi 260-1730 pmol/l (Methodology of C-peptide, 2021). Vyšetření nelze provádět v režimu statim. Pro optimální výsledek se doporučuje nemrazit sérum opakovaně.

1.6.1.1 Další metodika stanovení C-peptidu

Existují další tři definované stavy, kdy lze C-peptid stanovit (Solař, 2011).

1.6.2.1.2 C-peptid nalačno, po stimulaci glukagonem i.v.

Pacient přichází nalačno, je mu podáno intravenózně 1 mg glukagonu. Odběr krve je proveden po 6 minutách. Naměřená hodnota by se měla u nediabetických pacientů pohybovat okolo 1200 pmol/l. Diabetický pacient na stimulaci nezareaguje, hodnota C-peptidu se bude nacházet pod dolní hranicí referenčního rozmezí, tj. pod 260 pmol/l (Methodology of C-peptide, 2021).

1.6.2.1.3 C-peptid nalačno a po definovaném příjmu

První odběr je proveden nalačno. Dále pacient pozře definovanou porci: 100 g chleba, 1 žervé/sýr typu Lučina, nebo 125 g nízkotučného tvarohu, 1 vejce. Dovoleno je hořký čaj. Po 60 minutách je odběr opakován.

1.6.2.1.4 C-peptid nalačno a v průběhu OGTT testu

Tři dny před provedením pacient neomezuje příjem sacharidů, lačnění před provedením testu by mělo trvat 10-14 hod. První odběr proveden nalačno, následuje OGTT test, tj. je podáno 75 g glukózy, standardně odběry opakovány v 60. a 120. minutě. Nicméně mohou být přidány další odběry po 30, 45 a 180 minutách (Solař, 2011). Během sledovaného období se vyšetřovaná osoba musí vyvarovat zvýšené fyzické námahy.

Tabulka I.: Změny koncentrace C-peptidu v průběhu OGTT testu (podle Solař, 2011).

| <i>Čas</i> <i>(minuty)</i> | <i>Koncentrace</i> <i>(pmol/l)</i> |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| 0 | 300-1200 |
| 30 | do 1800 |
| 45 | do 2500 |
| 60 | do 2800 |
| 90 | do 2000 |
| 120 | do 1600 |
| 180 | do 1200 |

V průběhu OGTT testu se koncentrace C-peptidu mění (Tab. I.). Nejvyšší by měla být hodinu po příslunu glukózy, poté by měla klesat – stejně jako hladina inzulínu v krvi. I zde je tedy možné vidět schopnost C-peptidu určit fyziologickou či naopak patologickou odpověď organismu. OGTT dnes představuje pravděpodobně nejlepší způsob, jak zhodnotit hospodaření těla se sacharidy. Pacient může trpět určitým diskomfortem, způsobeným ať už nutností vypít roztok glukózy v krátkém časovém intervalu, nebo omezením pohybu po relativně dlouhou dobu.

1.6.2.2 Stanovení koncentrace C-peptidu z moči

C-peptid je možno detekovat v moči. Koncentrace C-peptidu v moči odpovídá 5-10 % celkové sekrece této molekuly pankreatem. Tato metoda vyžaduje řádnou spolupráci pacienta: hladina C-peptidu je stanovována ze vzorku moči sbírané 24 hodin. Tuto metodu není vhodné používat u pacientů s renální insuficiencí (Leighton et al., 2017). Existuje zde také rozdíl mezi hodnotami zjištěnými u žen a mužů. Hodnota UCPCR (Urinary C-peptide creatinine ratio) byla u žen 1,48krát vyšší. Tento rozdíl je přikládán menšímu objemu svalové hmoty u žen v porovnání s muži (Thomas et al., 2012).

2. Parametry hodnocené společně s C-peptidem

2.1 Vztah C-peptidu a glykemických parametrů

Glykémie (hladina cukru v krvi), patří na rozdíl od C-peptidu k rutinně předepisovaným vyšetřením. Referenční rozmezí se pohybuje mezi 3,9-5,6 mmol/l u odběru nalačno (Methodology of glucose, 2022). Zvýšení lačné glykémie nad 7,0 mmol/l může naznačovat onemocnění diabetem. Nutností pro vyslovení diagnózy je proto opakovaný odběr akreditovaným pracovištěm, nikoli glukometrem, nebo přítomnost typických klinických příznaků. Lze také provést OGTT, toto vyšetření je běžně indikováno těhotným ženám, dále u osob s podezřením na diabetes mellitus. Zvýšené riziko diabetu, prediabetes, označuje stav, kdy se hladina glukózy v krvi pohybuje mezi 5,6-6,9 mmol/l

(Friedecký et al., 2019). Při hodnocení C-peptidu společně s glykemií, inzulinem, HOMA IR a BMI se hodnoty glykémie v rámci referenčního

Tabulka II: Hodnoty glycidového obratu často hodnoceny s C-peptidem (Vltrová, 2023).

| Ukazatel | Hodnota | C-peptid (260-1730 pmol/l) | Proč? |
|-----------------------------|----------------|---------------------------------------|--|
| Glykémie | cca stálá | Celé ref. rozmezí | Zhodnocení pomocí indexů vycházejících z glykemických clampů. |
| HDL cholesterol | Nižší | u vyšší hranice ref. rozmezí | Mnoho studií se shoduje, že mezi hodnotami existuje vztah. Porucha metabolismu lipidů. |
| Triacylglyceroly | Vyšší | u vyšší hranice ref. rozmezí | Kritérium metabolického syndromu. |
| Glykovaný hemoglobin | Vyšší | spíše u vyšší hranice ref. rozmezí | Dlouhodobý režim pacienta, dieta. |

rozmezí (260-1730 pmol/l) hodnot C-peptidu pohybují u nediabetických pacientů mezi 5,3-5,6 mmol/l (Kron et al., 2020). Lze si všimnout relativně úzkého rozmezí; vysvětlením může být snaha organismu o zachování stálé hodnoty glykémie a tím o udržení homeostázy. Dalším parametrem, který lze smysluplně hodnotit společně s C-peptidem, patří hodnoty HDL cholesterolu. Jedná se o lipoproteiny zajišťující transport cholesterolu z tkáňových buněk do jater, kde je cholesterol dále metabolizován. Nižší hodnoty HDL cholesterolu byly naměřeny u osob s vyššími hodnotami C-peptidu (Banu et al., 2011). Přehled markerů často hodnocených s C-peptidem podává Tabulka II.

Právě stav inzulinové rezistence podporuje patologické změny lipidového metabolismu. Zásadním faktorem je porucha funkce inzulinu v hepatocytech a enterocytech, buňkách zajišťujících tvorbu a odbourávání lipoproteinů. Signálem pro zvýšenou tvorbu VLDL částic bohatých na triglyceridy je pro hepatocyt zvýšení koncentrace volných mastných kyselin v portální krvi. Z VLDL částic vznikají v krevním řečišti sérií reakcí LDL, lipoproteiny s vysokým aterogenním potenciálem. Snížení koncentrace HDL cholesterolu se děje v důsledku působení cholesterol-ester-transferázového proteinu. Dochází ke zmenšení těchto částic a jejich odstranění ledvinami. (Vrablík, 2016). Trend snížené koncentrace HDL cholesterolu potvrdilo několik dalších studií (Kron et al., 2021, Li et al., 2015). Samostatný rizikový faktor pro rozvoj onemocnění koronárních cév představuje zvýšení hodnot Lp (a) (Boffa et al., 2013). Lipoprotein (a) je tvořen apolipoproteinem a (APO-A), vysoce glykosylovaným, hydrofilním peptidem s nízkou afinitou k lipidům. Apolipoprotein a tvoří tzv. kringly, struktury přítomné například v plazminogenu, protrombinu a dalších proteázách podílejících se na fibrinolýze a koagulaci. Právě struktura kringlu umožňuje vazbu apolipoproteinu a na stejné substráty, jako plazminogen. Další strukturou přítomnou v apolipoproteinu a je serin-proteázová doména. Lipoprotein a dále tvoří apolipoprotein B₁₀₀. Koncentrace lipoproteinu a v krvi je dána individuální mírou produkce, rychlost degradace ovlivňuje hodnoty méně. Snížené hodnoty APO-A se pak považují za samostatný aterogenní faktor (podle Klener, 1994). Lipoprotein a také aktivuje AMPK. Enzym hrající roli v regulaci hladiny glukózy, AMP-protein kináza (AMPK), v kosterních svalech zvyšuje frekvenci beta-oxidace mastných kyselin, tvorbu ATP a vylučování glukózy (Drew et al., 2009). Činnost AMPK lze ovlivnit stravou, cvičením a adipokiny (Kahn et al., 2005). Vyšší hodnoty C-peptidu a inzulinu jsou dále spojovány s vyšší hladinou triacylglycerolů (Koskova et al., 2009). Triacylglyceroly jsou estery glycerolu s mastnými kyselinami. Tvoří energetickou zásobu, syntéza a odbourávání podléhá hormonálnímu řízení. V krvi by měla jejich hodnota být mezi 0,45 a 1,70 mmol/l (Methodology of triglycerides, 2022).

2.2 Vztah mezi C-peptidem a insulinem při hodnocení glykémie

Referenční interval koncentrace inzulínu v séru je 2,5-24,0 mU/l (Methodology of inzulín, 2022). Jednorázové stanovení inzulínu nemá klinický význam. Může být indikováno v diabetologii, je ovšem nutno přihlížet k hodnotám glykémie (Hainer, 2004). U nediabetických pacientů stav endogenní produkce inzulínu lze posoudit na základě hodnot C-peptidu (Masopust, 1998). Při podezření na poruchu glukózového metabolismu je důležitější zjištění vztahu mezi hodnotami glykémie a inzulínu, tyto informace poskytuje OGTT test. Inzulínová rezistence je známá od 30. let minulého století. Již tehdy se často vyskytovala společně s hypertenzí, obezitou a diabetem. Snížená senzitivita vůči inzulínu dále předznamenává metabolický syndrom. Diagnóza syndromu inzulínové rezistence může být vyslovena, splňuje-li pacient nejméně tři z následujících pěti kritérií (podle Klener, 1994):

- obvod pasu u žen > 88 cm, mužů > 102 cm
- krevní tlak > 130/85 mm Hg
- glykémie > 6,0 mmol/l
- HDL cholesterol: < 1,25 mmol/l u žen
< 1,0 mmol/l u mužů
- triacylglyceroly > 1,7 mmol/l

Z hodnocení více parametrů je patrné, že ani jedno z kritérií nevyžaduje samostatné zhodnocení hladiny inzulínu. Diagnostickým nástrojem vhodným pro zjištění rizika inzulínové rezistence je HOMA IR index, Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance. Jestliže hodnoty inzulínu a glukózy jsou uvedeny v mmol/l, pro výpočet je užit (podle Matthews et al., 1985) vzorec:

$$HOMA\ IR = \frac{Glukóza \times Inzulín}{22,5}$$

Přičemž rozhodnutí o stavu inzulínové rezistence se provádí na základě cut-off hodnoty. Jde o mez HOMA IR, jejíž překročení znamená vyšší riziko rozvoje diabetu. Pro českou populaci stanovila v roce 2019 Horáková et al. tuto hodnotu

na 3,63. Jednotný konsenzus, jaká hodnota by byla adekvátní pro jednoznačné určení poruchy citlivosti na inzulín v širší populaci, neexistuje.



Hodnoty HOMA indexu ve vybraných zemích

Obrázek 7: Hodnoty HOMA IR ve vybraných státech severní polokoule.

Zdroj: cz.123rf.com/photo (upraveno).

V Evropě cut-off hodnoty často přesahují 2,0 – Francie stanovila mezním bodem hodnotu 3,8, Portugalsko 2,33, Švédsko 2,0 (Tang et al. 2015). Je zajímavé, že v geograficky bližších zemích se srovnatelným podnebím, kde by mohlo být obdobné složení stravy, se hodnoty poměrně liší. V porovnání s evropskými zeměmi se hranice 1,7 pro japonskou populaci jeví jako velmi striktní (Yamada et al. 2012). Česká populace vykazuje tedy hodnotu cut-off poměrně vysokou.

Jestliže jsou patrné vyšší hodnoty indexu HOMA IR u jedinců s vyššími hladinami inzulínu a zároveň C-peptidu za normální glykémie (Kron et al.,

2020), lze usuzovat, že pro udržení stabilní hladiny cukru v krvi je zapotřebí většího množství inzulínu. Jedním z důvodů může být necitlivost inzulínových receptorů, nebo nadměrný příjem sacharidů, balancovaný právě vyšší sekrecí inzulínu. Vyšší hodnoty inzulínu a C-peptidu byly pozorovány u obézních adolescentů ve srovnání s neobézními kontrolami (Thota et al., 2017). Japonská studie zjišťující spojitost inzulínu, C-peptidu a glukózy v krvi a rakovinou žaludku ukázala, že vyšší hodnoty C-peptidu a inzulínu, znamenající inzulínovou rezistenci, mohou zvyšovat riziko tohoto typu rakoviny. Hodnoty glykémie žádnou spojitost nepotvrdily (Hidaka et al., 2014). K rozvoji inzulínové rezistence mohou přispívat traumata prožítá v dětství, ale i dlouhodobý stres v dospělosti. Právě osoby s těmito zkušenostmi vykazovali vyšší hladiny inzulínu a C-peptidu (Thota et al., 2017). Odůvodněním by mohl být způsob reakce na stres ve formě tzv. emočního jedení. Může dojít k postupné absenci v rozlišování mezi hladem jakožto fyziologickou potřebou a emocionální touze po nasycení (Macht and Simons, 2010). Ukojení emočně náročných situací jídlem je velmi snadné, dostupné, obecně dobře přijímané – pověstné „obalit si nervy.“ Pokud k tomuto chování dochází dlouhodobě, dochází k nadměrné stimulaci produkce inzulínu, vyčerpání inzulínových receptorů vedoucím až ke vzniku inzulínové rezistence. Závažnost jevu porušené inzulínové rezistence ukazují výsledky studie hodnotící C-peptid, inzulín, hladinu glykémie a lipidový profil (triglyceridy, HDL a LDL cholesterol, glykovaný hemoglobin) mezi osobami s normální glukózovou tolerancí, porušenou glukózovou tolerancí a diagnostikovanými diabetiky typu II. Byly posuzovány také hodnoty BMI a poměr pas/boky (WHR ratio), obvod pasu. Byl proveden tříhodinový OGTT test a dále byl vypočten HOMA IR index. Nejvyšší hodnoty C-peptidu byly pozorovány u skupiny s porušenou glukózovou tolerancí. U těchto osob byly vyšší také všechny ostatní měřené parametry. V průběhu OGTT testu dosáhl jak inzulín, tak C-peptid nejvyšší hodnoty ve 30. minutě u osob bez poruchy glukózové tolerance, u diabetiků pak ve 120. minutě, u osob s porušenou tolerancí v 60. minutě, nicméně inzulín dosáhl maximální hodnoty v této skupině až ve druhé hodině testu, což je rozdíl oproti diabetické skupině, kde se maximální hodnoty C-peptidu a inzulínu objevují ve stejném okamžiku. Tento nepoměr u osob s porušenou glukózovou tolerancí pravděpodobně souvisí s produkcí inzulínu β buňkami pankreatu, ale

zároveň neschopností ostatních buněk na stimul inzulinem reagovat. Co se týká hladiny glykémie, odlišovala se skupina diabetiků od ostatních dvou skupin, mezi kterými byly hodnoty glukózy v krvi podobné. Triglyceridy byly zvýšené u obou skupin s poruchou glukózové tolerance, naopak hodnoty HDL cholesterolu byly naopak sniženy ve srovnání se zdravými jedinci. Nejvyšší hodnoty LDL cholesterolu vykazovala skupina s porušenou glukózovou tolerancí. Hodnoty glykovaného hemoglobinu u této skupiny nesplňovaly limit Americké asociace pro diabetes pro klasifikaci diabetu, nicméně se pohybovaly v rozmezí představujícím vyšší riziko rozvoje této choroby (Wang et al., 2019).

2.2.1 Možnosti stanovení inzulinorezistence a inzulinové senzitivity

První metody posuzující velmi přesně účinky inzulínu (hyperinzulinemický euglykemický clamp) a zároveň citlivost β -buněk ke glukóze (hyperglykemický clamp) byly představeny v práci De Fronza v roce 1979. Obě metody jsou technicky velmi náročné na provedení a využívají se zejména pro vědecké účely (Pavlíková et al., 2020).

Existuje několik dalších indexů využívajících naměřených hodnot lačné glykémie, inzulinémie a lačné inzulinémie sloužících k posouzení inzulinorezistence a inzulinové senzitivity (Chen et al., 2005).

2.2.1.1 QUICKI

Pochází z anglického Quantitative insuline sensitivity check index. Díky tomuto indexu lze posoudit inzulinovou senzitivitu, čím vyšší hodnota indexu QUICKI, tím vyšší inzulinová senzitivita. Index vykazuje velmi dobrou korelaci s indexem glukózového clampu, přičemž index QUICKI je podstatně snáze proveditelný a aplikovatelný na rozsáhlé epidemiologické studie (Chen et al., 2005).

Výpočet je proveden dle vzorce:

$$QUICKI = \frac{1}{\log INSL + \log GLCL}$$

kde INSL je lačná insulinémie, GLCL je lačná glykémie.

Katz udává INSL v $\mu\text{IUI/ml}$ a GLCL v mg/dl (Katz, 2000).

Index QUICKI tedy představuje matematickou transformaci glykémie a insulinémie nalačno (Chen et al., 2005). Pastucha definuje insulinovou rezistenci jako hodnotu nižší nebo rovnu 0,34 (Pastucha, 2007).

2.2.1.2 Invertovaná lačná insulinémie

Dochází-li k nárůstu lačné insulinémie, zvyšuje se také insulinorezistence. Naopak invertovaná lačná insulinémie klesá stejně jako insulinosenzitivita. Invertovaná insulinémie na lačno tedy odráží stav insulinové senzitivity (Singh et al., 2010).

Výpočet je proveden ze vzorce:

$$\text{Invertovaná insulinémie} = \frac{1}{\text{INSL}}$$

kde INSL je insulinémie na lačno.

2.2.1.3 FIRI

Z anglického Fasting insulin resistance index, představuje parametr udávající insulinovou rezistenci.

Výpočet je proveden ze vzorce:

$$\text{FIRI} = \frac{\text{INSL} \times \text{GLCL}}{25}$$

kde INSL je lačná insulinémie, GLCL je lačná glykémie (Singh et al., 2010).

2.2.1.4 Produkt insulin-glykémie

Jedná se parametr ukazující senzitivitu na insulin všech tělesných tkání.

Výpočet je proveden ze vzorce:

$$\text{Produkt} = \text{INSL} \times \text{GLCL}$$

INSL je lačná insulinémie, GLCL je lačná glykémie (Singh et al.,2010). Citlivost tkání na inzulin je tím vyšší, čím nižší je hodnota produktu. Bylo zjištěno, že tento parametr vykazuje velmi dobrou korelaci s euglykemickým clampem (Singh et al., 2010).

2.3 Vztah C-peptidu a BMI

Body mass index neboli BMI je široké veřejnosti známý, velmi dostupný „ukazatel kategorie tělesné hmotnosti,“ pro jehož měření existují nesčetné online aplikace, tuto funkci lze najít i v mobilních zařízeních. Není třeba drahého přístrojového vybavení, zhodnocení je často dostupné okamžitě. To dělá z BMI nebezpečný prostředek k naordinování si i velmi radikální diety bez konzultace s odborníky a změření dalších parametrů, jakými jsou biochemické markery a poměr tkání v těle. Stav vždy nežádoucí je úbytek svalové hmoty, ke kterému může dojít právě v důsledku razantního snížení příjmu potravy. Svalová hmota je také tím, co dělá z BMI nevypovídající ukazatel u sportovců.

Výpočet se provádí ze vzorce:

$$BMI = \frac{m}{v^2}$$

kde m je hmotnost v kilogramech a v je výška v metrech umocněná na druhou. Zda převládá tuková tkáň či svalová hmota, z tohoto indexu nelze zjistit. Přitom právě to lépe odráží celkovou fyzickou kondici jedince. U osob trpících diabetem a zároveň nadváhou byla nalačno zjištěna zvýšená hladina C-peptidu, nasvědčující inzulinové rezistenci (Válek et al., 1990).

3. Stanovení C-peptidu

3.1 Význam hodnocení C-peptidu v České republice

C-peptid jako hodnocený marker u diabetiků lze nalézt již ve studiích z devadesátých let minulého století (Válek et al.,1990). V první dekádě nového tisíciletí byl publikován výzkum hodnotící C-peptid ve vztahu k syndromu polycystických ovarii. Zde se ukázal pravděpodobný vliv genetického faktoru: nosičky T alely pro lowdensity lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5)

vykazovaly vyšší hladiny C-peptidu jak nalačno, tak ve 180. minutě OGTT, ovšem nebyl zde patrný vliv na inzulinovou rezistenci (Bendlová et al., 2008). Protein LRP5 je exprimován mimo jiné na buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu a pokud byla exprese genu pro receptor u myši potlačena, docházelo k poruchám glycidového a lipidového metabolismu (T.Fujino et al., 2003). Ucelenější soubor poznatků o nápomocnosti C-peptidu v diagnostice pak přinesl v roce 2011 MUDr. Solař. První studie ne-diabetických jedinců hodnotící C-peptid a další glykemické a lipidové parametry se objevily až v posledních letech (Kron et al., 2020, 2021). Podaří-li se povědomí o C-peptidu rozšířit jak mezi lékaře, tak mezi širokou veřejnost, mohl by se fenomén inzulinové rezistence stát méně podceňovaným.

3.2 Význam hodnocení C-peptidu ve světě

V Číně se u osob s normální glukózovou tolerancí ukázal trend vyšších hodnot C-peptidu a inzulinu u žen, ovšem při nižším BMI se ukázala tato závislost méně signifikantní (Chen et al., 1999). Data získaná studií havajské populace ukazují na spojitost C-peptidu a inzulinu s vyšší hladinou triglyceridů a nižší hodnotou HDL cholesterolu. (Mau et al., 1997). U Mexičanů s potvrzeným metabolickým syndromem byly zvýšené hodnoty jak C-peptidu, tak inzulinu (Gonzalez-Mejia et al., 2016). Pravděpodobně také existuje rozdíl mezi funkcí β -buněk mezi etniky. Afričané vykazovali nižší sekreci inzulinu v reakci na příjem potravy v porovnání s evropskými muži (Ladwa et al., 2021).

Diskuze

Ačkoli porozumění metabolickým efektům C-peptidu se stává jasnějším, je třeba obezřetnosti při interpretaci výsledků studií: ukazuje se, že minimálně některé efekty jsou druhově specifické a nelze je považovat za univerzálně platné. Dle autorky této práce také může docházet k ovlivnění aktivity C-peptidu dalšími substancemi přítomnými v komplexním organismu. V humánní medicíně lze tuto možnost zkoumat na základě hodnocení biochemických markerů metabolismu společně s C-peptidem.

Snížené, či dokonce nedetekovatelné hodnoty C-peptidu nalzáme u pacientů trpících diabetem typu I, nebo diabetem typu LADA (Pippitt, 2016). Podle České diabetologické společnosti a České společnosti klinické biochemie nemá význam sledování C-peptidu u dlouhodobě léčených diabetických pacientů (Friedecký et al., 2015). V současných letech jsou možnosti diagnostického využití C-peptidu intenzivně studovány zejména v Japonsku (Pavlíková et al., 2020).

Bude zajímavé sledovat vývoj poznatků o C-peptidu, stejně jako jeho rozšíření v diagnostice. V průběhu padesáti let došlo k obratu a posunu od názoru, že řetězce inzulinu spojuje biologicky inertní molekula, k zařazení C-peptidu mezi faktory předpovídající riziko rozvoje diabetu a kardiovaskulárních chorob. Zatímco dříve se předpis vyšetření omezoval pouze na diabetické pacienty, dnes lze vidět jeho roli u širší populace. Dojde-li k objevu specifického receptoru pro C-peptid, může být lépe pochopena přesná biologická funkce C-peptidu v organismu. Vyšetření C-peptidu by poté mohlo nastínit konkrétní patologii/skupinu patologií, bez nutnosti indikovat v určitém procentu případů jiná další, dražší a zatěžující vyšetření.

Závěr

V první části práce byly shrnuty závěry vědeckých prací zabývajících se strukturou C-peptidu. Nejspolečnější oblastí v molekule C-peptidu je terminální pentapeptid, tedy aminokyseliny na pozicích 27-31. Právě tato oblast zajišťuje interakce s dalšími chemickými látkami. Nejedná se tedy o biologicky inertní molekulu.

Další kapitoly práce se zabývají metabolickým zásahem C-peptidu do procesů spojených s onemocněním diabetes mellitus, jeho užitím v diagnostice, kde pomáhá zhodnotit míru vlastní produkce inzulínu. Na rozdíl od inzulínu samotného disponuje delším biologickým poločasem. K nesporným výhodám dále patří minimální ovlivnění exogenním inzulínem. Ačkoli přesné mechanismy působení na buňky nejsou známy, je úloha C-peptidu v metabolismu nezanedbatelná. Receptor pro C-peptid dosud nebyl objeven, ale studie konzistentně ukazují, že se jedná o receptor citlivý na pertusový toxin. Pravděpodobně tedy jde o receptor spážený s G-proteinem. Stejně jako inzulín, aktivuje C-peptid PI-3-kinázu, nicméně signalizační dráhy se v určitém místě nutně odlišují. Na molekulární úrovni pak dochází prostřednictvím C-peptidu k aktivaci MAPK, přičemž enzymy této rodiny se podílí na regulaci endoteliálních NO syntáz. Zdá se, že protektivní účinek C-peptidu spočívá v působení na transkripční faktory, ovlivňující další buněčné procesy.

Následující část práce poukazuje na zásadní problém diagnostiky, kterým je absence standardizovaného protokolu pro měření C-peptidu, ztěžující co nejlepší možnou interpretaci. Lze si pomoci cut-off hodnotou HOMA IR indexu, která je ale vždy validována pro konkrétní populaci a světově se mezní hodnoty velmi liší. Jedná se ovšem o nástroj posuzující míru inzulínové rezistence, která patří k zanedbávaným fenoménům, nicméně může předznamenávat metabolický syndrom, jehož komplikace jsou podstatně hůře léčitelné. V současnosti je z diagnostického hlediska nejlepší metoda pro posouzení rizika inzulínové rezistence OGTT testu, jelikož umožňuje zjistit, jak tělo reaguje na přísun sacharidů jak z hlediska glykémie, tak sekrece inzulínu. Nevýhodou tohoto testu je možné nepohodlí pacienta a úzké spektrum

osob, kterým může být vyšetření indikováno. Další, inovativní metoda navrhuje pro detekci C-peptidu použití lidských vlasů. Prozatím nemá význam v diagnostice, jedná se o metodu, která taktéž nemá validovaný protokol, navíc je nutno odhalit působení mnoha faktorů potenciálně ovlivňujících výsledky. Zavedení tohoto postupu do praxe bude pravděpodobně problematické. Další alternativu představuje měření C-peptidu v nehtech. Opět se jedná o metodu s mnoha nejasnostmi.

Závěrečné kapitoly se věnují hodnocení C-peptidu spolu s dalšími ukazateli glycidového obratu u osob bez diagnostikovaného diabetu. Nediabetičtí pacienti s vyššími hodnotami C-peptidu mívají vyšší BMI, tento ukazatel by měl však být vždy posuzován v kontextu. Lze často nalézt snížené hodnoty HDL cholesterolu při vyšších hodnotách C-peptidu. Pro komplexnější zhodnocení dlouhodobého stavu glycidového metabolismu je výhodné vycházet jak z hodnot glykémie, tak glykovaného hemoglobinu. V této práci byla představena hypotéza o možné souvislosti mezi odlišným působením C-peptidu a plazminogenu na alfa-enolázu, která je oběma látkami aktivována, nicméně působení na další dráhy zapojené v glycidovém metabolismu bude odlišné a případně patologické.

Seznam zkratek

EC₅₀ koncentrace způsobující 50% efekt

ELISA z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay

ERK MAPK Extracellular signal-regulated kinase

FN HK fakultní nemocnice Hradec Králové

HDL high density lipoproteins, proteiny vysoké hustoty

HOMA IR z angl. Homeostatic Model Assessmentfor Insulin Resistance

OGTT orální glukózo-toleranční test

RIA radioimunoanalýza

ÚKBD ústav klinické biochemie a diagnostiky

Lp(a) apolipoprotein a

GPR 146 G protein-coupled receptor 146, receptor spřažený s G-proteinem 146

NPY neuropeptid Y

VCAM-1 vasopressin activated calcium mobilizing protein

eNOS endoteliální NO syntáza

MAPK z angl. mitogen-activated protein kinases, MAP kináza

PKC protein kináza C

PPRE Peroxisome Proliferator Response Element „hormon responsivní element“,

RXR retinoid X receptor

TNF- α tumor necrosisfactor alfa

TNF R1 tumor necrosisfactor receptor 1

TNF R2 tumor necrosisfactor receptor 2

TRAF Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor

NF- κ B nuclear factor κ B

nM nanomol

NO syntázasyntáza oxidu dusnatého

NPY neuropeptid Y

GTP γ S guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate

GPCR G-protein coupled receptor

WHR waist to hip ratio

Literatura

Abdulateef DS, Salih JM. *Detection of C-Peptide in Scalp Hair of Healthy Adults*. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Feb;13:227-236. doi: 10.2147/DMSO.S240785.

Aleksic M, Walcher D, Giehl K, Bach H, Grüb M, Durst R, Hombach V, Marx N. *Signalling processes involved in C-peptide-induced chemotaxis of CD4-positive lymphocytes*. *Cell Mol LifeSci*. 2009 Jun;66(11-12):1974-84. doi: 10.1007/s00018-009-9057-y.

Alhajj M, Farhana A. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. 2021 Feb 6. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearlsPublishing; 2022 Jan. PMID: 32310382.

Al-Rasheed NM, Chana RS, Baines RJ, Willars GB, Brunskill NJ. *Ligand-independent activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by insulin and C-peptide in kidney proximal tubular cells: dependent on phosphatidylinositol3-kinase activity*. *J BiolChem*. 2004 Nov 26;279(48):49747-54. doi: 10.1074/jbc.M408268200. Epub 2004 Sep 16.

Al-Rasheed NM, Meakin F, Royal EL, Lewington AJ, Brown J, Willars GB, Brunskill NJ. *Potent activation of multiple signalling pathways by C-peptide in opossum kidney proximal tubular cells*. *Diabetologia*. 2004 Jun;47(6):987-97. doi: 10.1007/s00125-004-1404-9. Epub 2004 May 26.

Al-Rasheed NM, Willars GB, Brunskill NJ. *C-peptide signals via Galpha i to protect against TNF-alpha-mediated apoptosis of opossum kidney proximal tubular cells*. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Apr;17(4):986-95. doi: 10.1681/ASN.2005080797.

Anonym, *mapa světa*. Dostupné z: cz.123rf.com/photo_4316397-there-is-a-map-of-world.html [cit.2022-10-08].

Anonym, *proinzulin*. Dostupné z: proteopedia.org/wiki/images/d/db/Proinsulin.jpg [cit.2022-10-08]

Azzi JR, Sayegh MH, Mallat SG. Calcineurininhibitors: 40 years later, can't live without.... J Immunol. 2013 Dec 15;191(12):5785-91. doi: 10.4049/jimmunol.1390055. PMID: 24319282.

Banu S, Jabir NR, Manjunath CN, Shakil S, Kamal MA. *C-peptide and its correlation to parameters of insulin resistance in the metabolic syndrome*. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2011 Dec;10(8):921-7. doi: 10.2174/187152711799219271.

Batterham R. L., Bloom S. R..*The Gut Hormone Peptide YY Regulates Appetite*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003, 994 (1): 162–168. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb03176.x.

Bendlova Bela, Marketa Vankova, Katerina Zajickova, Martin Hill, Adela Zemanova, David Cibula, Daniela Vejrazkova, Petra Lukasova, Josef Vcelak, Karel Vondra, Jana Vrbikova. *Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 C/T polymorphism in exon 18 is associated with C peptide and proinsulin levels in contro lwomen and patients with polycystic ovary syndrome, Fertility and Sterility*. Volume 90, Issue 3,2008, Pages 699-708 ,<https://doi.org/10.1016>.

Boffa MB, Koschinsky ML. *Update on lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor and mediator*. *CurrAtherosclerRep*. 2013;(15)360-66.

Bordessoule D, Jones M, Gatter KC, Mason DY. *Immunohistological patterns of myeloid antigens: tissue distribution of CD13, CD14, CD16, CD31, CD36, CD65, CD66 and CD67*. *Br J Haematol*. 1993 Mar;83(3):370-83. doi: 10.1111/j.1365-2141.1993.tb04659.x.

Brandenburg D. (2008). *History and diagnostic signifkance of C-peptide*. *Experimental diabetes research*, 2008, 576862. Dostupné z:doi.org/10.1155/2008/576862

Bugliani M, Torri S, Lupi R, DelGuerra S, Grupillo M, Del Chiaro M, Mosca F, Boggi U, DelPrato S, Marchetti P. *Effectsof C-peptide on isolated human*

pancreatic islet cells. Diabetes Metab Res Rev. 2007 Mar;23(3):215-9. doi: 10.1002/dmrr.674.

Cibiček, Norbert a Jan Vacek. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*.str.60-61. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.

Databáze BRENDA, *Karboxypeptidáza H*. Dostupné z www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.17.10, online. [cit. 2022-04-24]

Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. *MAPK pathways in radiation responses*. Oncogene, 2003, vol. 22, no. 37, p. 5885–5896.

Díaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, García-Melero A, López-Aleman R. *α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations*. J Biomed Biotechnol. 2012; doi: 10.1155/2012/156795. Epub 2012 Oct 14.

Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, Natoli AK, Henstridge DC, Penfold SA, Thomas WG, Mukhamedova N, de Courten B, Forbes JM, Yap FY, Kaye DM, van Hall G, Febbraio MA, Kemp BE, Sviridov D, Steinberg GR, Kingwell BA. *High-density lipoprotein modulate sglucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus*.Circulation. 2009 Apr 21;119(15):2103-11. doi: 10.1161.

Fredriksson R. *The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralagon Groups, and Fingerprints*. Molecular Pharmacology. 2003, 63 (6): 1256–1272. doi:10.1124/mol.63.6.1256.

Friedecký Bedřich, Josef Kratochvíla, Drahomíra Springer, Martin Prázný, Tomáš Zima. *Diabetes mellitus-laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů*. 2015, online. Dostupné z:DM_dop_201601.docx (cskb.cz)[cit.2021-10-29].

Friedecký Bedřich, Josef Kratochvíla, Drahomíra Springer, Martin Prázný, Terezie Pelikánová, Tomáš Zima, Jaroslav Racek: *Diabetes mellitus – laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů*. 2019. Dostupné z www.diab.cz/dokumenty/standard_labor_2019.pdf,[cit. 2022-01-16].

Gonzalez-Mejia ME, Porchia LM, Torres-Rasgado E, Ruiz-Vivanco G, Pulido-Pérez P, Báez-Duarte BG, Pérez-Fuentes R. *C-Peptide Is a Sensitive Indicator for the Diagnosis of Metabolic Syndrome in Subjects from Central Mexico*. *Metab Syndr Relat Disord*. 2016 May;14(4):210-6. doi: 10.1089.

Grunberger G, Qiang X, Li Z, Mathews ST, Sbrissa D, Shisheva A, Sima AA. *Molecular basis for the insulinomimetic effects of C-peptide*. *Diabetologia*. 2001 Oct;44(10):1247-57. doi: 10.1007/s001250100632.

Hainer, Vojtěch. *Základy klinické obezitologie*. str. 60-61 Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0233-9.

Henriksson M, Nordling E, Melles E, Shafqat J, Ståhlberg M, Ekberg K, Persson B, Bergman T, Wahren J, Johansson J, Jörnvall H. *Separate functional features of proinsulin C-peptide*. *Cell Mol LifeSci* 2005; 62: 1772–8. doi: 10.1007/s00018-005-5180-6.

Hidaka A, Sasazuki S, Goto A, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Inoue M, Noda M, Tajiri H, Tsugane S; JPHC Study Group. *Plasma insulin, C-peptide and blood glucose and the risk of gastric cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study*. *Int J Cancer*. 2015 Mar 15;136(6):1402-10. doi: 10.1002/ijc.29098. Epub 2014 Aug 6.

Hills CE, Brunskill NJ. *Intracellular signalling by C-peptide*. *Exp Diabetes Res*. 2008;2008:635158. doi: 10.1155/2008/635158.

Hills CE, Brunskill NJ. *C-Peptide and its intracellular signaling*. *RevDiabet Stud*. 2009 Fall;6(3):138-47. doi: 10.1900/RDS.2009.6.138. Epub 2009 Nov 10.

Horáková D, Štěpánek L, Janout V, Janoutová J, Pastucha D, Kollárová H, Petráková A, Štěpánek L, Husár R, Martiník K. *Optimal Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) Cut-Offs: A Cross-Sectional Study in the Czech Population*. *Medicina (Kaunas)*. 2019 May 17;55(5):158. doi: 10.3390.

Chen H, Sullivan G, Quon MJ. *Assessing the predictive accuracy of QUICKI as a surrogate index for insulin sensitivity using a calibration model*. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):1914-25. doi: 10.2337/diabetes.54.7.1914.

Chen CH, Tsai ST, Chou P. *Correlation of fasting serum C-peptide and insulin with markers of metabolic syndrome-X in a homogenous Chinese population with normal glucose tolerance*. Int J Cardiol. 1999 Feb 28;68(2):179-86. doi: 10.1016/s0167-5273(98)00366-0.

Chen LM, Yang XW, Tang JG. *Acidic residues on the N-terminus of proinsulin C-peptide are important for the folding of insulin precursor*. J Biochem 2002; 131: 855–9. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003175.

Chen Z, He J, Ma Q, Xiao M. *Association Between C-Peptide Level and Subclinical Myocardial Injury*. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Aug 12;12:680501. doi: 10.3389/fendo.2021.680501.

Chinetti G., Griglio S., Antonucci M., Torra I.P., Delerive P., Majd Z., Fruchart J.C., Chapman J., Najib J., Staels B. *Activation of proliferator activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages*. J Biol Chem 273, 1998: 25573-80 .

Ido Y, Vindigni A, Chang K, Stramm L, Chance R, Heath WF, DiMarchi RD, Di Cera E, Williamson JR. *Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide*. Science 1997; 277: 563–6. doi: 10.1126/science.277.5325.563.

Ishii T, Fukano K, Shimada K, Kamikawa A, Okamatsu-Ogura Y, Terao A, Yoshida T, Saito M, Kimura K. *Proinsulin C-peptide activates α -enolase: implications for C-peptide--cell membrane interaction*. J Biochem. 2012 Jul;152(1):53-62. doi: 10.1093/jb/mvs052. Epub 2012 May 9.

Johansson BL, Kernell A, Sjöberg S, Wahren J. *Influence of combined C-peptide and insulin administration on renal function and metabolic control in diabetes type 1*. J Clin Endocrinol Metab. 1993 Oct;77(4):976-81. doi: 10.1210/jcem.77.4.8408474.

Johansson, B.-L., Borg, K., Ferngqvist-Forbes, E., Kernell, A., Odergren, T. and Wahren, J. (1999) Diabet. Med., in press.

Jones AG, Hattersley AT. *The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes*. *Diabet Med*. 2013 Jul;30(7):803-17. doi: 10.1111/dme.12159.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. *AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism*. *Cell Metab*. 2005 Jan;1(1):15-25. doi: 10.1016/j.cmet.2004.12.003.

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. *Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Jul;85(7):2402-10. doi: 10.1210/jcem.85.7.6661.

Keshet Y., Seger R. *The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions*. *Methods Mol. Biol*. 2020; 661: 3- 38.

Kitamura T, Kimura K, Jung BD, Makondo K, Sakane N, Yoshida T, Saito M. *Proinsulin C-peptide activates cAMP response element-binding proteins through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in mouse lung capillary endothelial cells*. *Biochemical Journal*. 2002;366(3):737–744.

Kitamura T, Kimura K, Jung BD, Makondo K, Okamoto S, Cañas X, Sakane N, Yoshida T, Saito M. *Proinsulin C-peptide rapidly stimulates mitogen-activated protein kinases in Swiss 3T3 fibroblasts: requirement of protein kinase C, phosphoinositide 3-kinase and pertussis toxin-sensitive G-protein*. *Biochem J*. 2001 Apr 1;355(Pt 1):123-9. doi: 10.1042/0264-6021:3550123.

Kitamura T, Kimura K, Makondo K, Furuya DT, Suzuki M, Yoshida T, Saito M. *Proinsulin C-peptide increases nitric oxide production by enhancing mitogen-activated protein-kinase-dependent transcription of endothelial nitric oxide synthase in aortic endothelial cells of Wistar rats*. *Diabetologia*. 2003 Dec;46(12):1698-705. doi: 10.1007/s00125-003-1232-3. Epub 2003 Oct 30.

Klener, Pavel. str. 868 *Vnitřní lékařství*. Praha: Galén, 1999, 2001, 2006. ISBN 80-7262-430-X.

Koskova I, Petrasek R, Vondra K, Duszkova M, Starka L. *Metabolic profile and sex hormone binding globulin (SHBG) in different reproductive phases of Czech women and their relations to weight, body composition and fat distribution.* *Physiol Res.* 2009;58(3):393-402. doi: 10.33549/physiolres.931364.

Kron V, Verner M, Smetana P, Janoutova J, Janout V, Martinik K. *Alterations of glycaemia, insulin resistance and body mass index within the C-peptide optimal range in non-diabetic patients.* *J ApplBiomed.* 2020 Dec;18(4):136-142. doi: 10.32725/jab.2020.018. Epub 2020 Dec 8.

Kron V, Verner M, Pesl L, Smetana P, Kadlec J, Martinik D. *Cholesterol and glucose profiles according to different fasting C-peptide levels: a cross-sectional analysis in a healthy cohort from the Czech Republic.* *J ApplBiomed.* 2021 Dec;19(4):220-227. doi: 10.32725.

Kunt T, Schneider S, Pfützner A, Goitum K, Engelbach M, Schauf B, Beyer J, Forst T. *The effect of human proinsulin C-peptide on erythrocyte deformability in patients with Type I diabetes mellitus.* *Diabetologia.* 1999 Apr;42(4):465-71. doi: 10.1007/s001250051180.

Ladwa M, Bello O, Hakim O, Shojaee-Moradie F, Boselli ML, Charles-Edwards G, Peacock J, Umpleby AM, Amiel SA, Bonadonna RC, Goff LM. *Ethnic differences in beta cell function occur independently of insulin sensitivity and pancreatic fat in black and whitemen.* *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2021 Mar;9(1):e002034. doi: 10.1136/bmjdr-2020-002034.

Landreh M, Alvelius G, Willander H, Stukenborg JB, Söder O, Johansson J, Jörnvall H. *Insulin solubility transitions by pH-dependent interactions with proinsulin C-peptide.* *FEBS J* 2012; 279: 4589–97. doi: 10.1111/febs.12045. Epub 2012 Nov 21.

Landreh M, Johansson J, Jörnvall H. *C-peptide: a molecule balancing insulin states in secretion and diabetes-associated depository conditions.* *Horm Metab Res* 2013; 45: 769–73. doi: 10.1055/s-0033-1347208. Epub 2013 Jun 18.

Landreh, Michael, Johansson, Jan, Wahren, John and Jörnwall, Hans. *The structure, molecular interactions and bioactivities of proinsulin C-peptide*

correlate with a tripartite molecule. *Biomolecular Concepts*, vol. 5, no. 2, 2014, pp 109-118. doi: 10.1515/bmc-2014-0005.

Leighton, Emma, Christopher Ar sainsbury a Gregory C. Jones. *A Practica lReview of C-Peptide Testing in Diabetes.* *Diabetes Therapy* [online]. 2017, 8(3), 475-487. ISSN 1869-6953. Dostupné z: doi:10.1007/s13300-017-0265-4 [cit. 2021-10-29].

Li SX, Tian LP, Liu HF, Zhang YJ, Hu XB, Gong Y, Yuan QS. *Expression of C-peptide multiple gene copies in Escherichia coli and stabilities of C-peptide in aqueous solution.* *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* (Shanghai). 2003 Nov;35(11):986-92.

Li Y, Li Y, Meng L, Zheng L. *Association between serum C-peptide as a risk factor for cardiovascular disease and high-density lipoprotein cholesterol levels in non diabetic individuals.* *PLoSOne*. 2015 Jan 5;10(1):e112281. doi: 10.1371.

Li ZG, Zhang W, Sima AA. *C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells.* *Diabetes Metab Res Rev*. 2003 Sep-Oct;19(5):375-85. doi: 10.1002/dmrr.389.

Lindfors L, Sundström L, Fröderberg Roth L, Meuller J, Andersson S, Kihlberg J. *Is GPR146 really the receptor for proinsulin C-peptide?* *Bioorg Med ChemLett*. 2020 Jul 1;30(13):127208. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127208. Epub 2020 Apr 20.

Loirand, G., Guerin, P. & Pacaud, P. *Rhokinases in cardiovascular physiology and pathophysiology.* *Circulation Research*, 2006. 98, 322-334.

Maestroni A, Ruggieri D, Dell'Antonio G, Luzi L, Zerbini G. *C-peptide increases the expression of vasopressin-activated calcium-mobilizing receptor gene through a G protein-dependent pathway.* *European Journal of Endocrinology*. 2005;152(1):135–141.

Macht, M., Simons, G. *Emotional Eating.* (str. 281-296) In Nyklíček I., Vingerhoets A., Zeelenberg M. *Emotion Regulation and Well-Being.* New York: Springer (2010).

Masopust, Jaroslav. *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Praha: Karolinum, 1998.str. 385-386. ISBN 80-7184-650-3.

Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C. *Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*. 1985, 28: 412-419. doi: 10.1007/BF00280883.

Mau MK, Grandinetti A, Arakaki RF, Chang HK, Kinney EK, Curb JD. *The insulin resistance syndrome in native Hawaiians. Native Hawaiian Health Research (NHHR) Project*. *Diabetes Care*. 1997 Sep;20(9):1376-80. doi: 10.2337.

Methodology of C-peptide. Department of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital Hradec Králové Online. Dostupné z: ukbd.fnhk.cz/metoda-c-peptid.html. [cit.2021-11-10].

Methodology of glucose. Department of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital Hradec Králové Online. Dostupné z: ukbd.fnhk.cz/metoda-c-peptid.html. [cit. 2022-01-16].

Methodology of inzulin. Department of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital Hradec Králové Online. Dostupné z: ukbd.fnhk.cz/metoda-inzulin.html. [cit.2021-11-10].

Methodology of triglycerides. Department of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital Hradec Králové Online. Dostupné z: ukbd.fnhk.cz/metoda-triacylglyceroly.html. [cit.2021-11-10].

Ministerstvo zdravotnictví České Republiky, *C-peptid*. 2022: dostupné online z: ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/AJCGR.htm. [cit. 2022-04-23].

Munte CE, Vilela L, Kalbitzer HR, Garratt RC. *Solution structure of human proinsulin C-peptide*. *FEBS J*. 2005 Aug;272(16):4284-93. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04843.x.

Murphy HR, Elleri D, Allen JM, Simmons D, Nodale M, Hovorka R. *Plasma C-peptide concentration in women with Type 1 diabetes during early and late pregnancy.* Diabet Med. 2012 Oct;29(10):e361-4. doi: 10.1111/j.1464-5491.2012.03747.x.

Nalla A, Ringholm L, Sørensen SN, Damm P, Mathiesen ER, Nielsen JH. *Possible mechanisms involved in improved beta cell function in pregnant women with type 1 diabetes.* Heliyon. 2020 Aug 19;6(8):e04569. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04569.

Nerelius C, Alvelius G, Jörnvall H. *N-terminal segment of proinsulin C-peptide active in insulin interaction/desaggregation.* Biochem Biophys Res Commun 2010; 403: 462–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.058. Epub 2010 Nov 19.

Nettleton EJ, Tito P, Sunde M, Bouchard M, Dobson CM, Robinson CV. *Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by massspectrometry.* Biophys J 2000; 79: 1053–65. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76359-4.

Nguyen A. D., Mitchell N. F., Lin S., Macia L., Yulyaningsih E., Baldock P. A., Enriquez R. F., Zhang L., Shi Y.-C., Zolotukhin S., Herzog H., Sainsbury A. 2012. *Y1 and Y5 Receptors Are Both Required for the Regulation of Food Intake and Energy Homeostasis in Mice.* PLoS ONE. 7 (6): e40191. doi:10.1371/journal.pone.0040191.

Nielsen LR, Rehfeld JF, Pedersen-Bjergaard U, Damm P, Mathiesen ER. *Pregnancy-induced rise in serum C-peptide concentrations in women with type 1 diabetes.* Diabetes Care. 2009 Jun;32(6):1052-7. doi: 10.2337/dc08-1832. Epub 2009 Feb 24.

Ohtomo Y., Aperia A., Sahlgren B., Johansson B.-L., and J. Wahren J., *C-peptide stimulates rat renal tubular Na⁺, K⁺-ATPase activity in synergism with neuropeptide Y.* Diabetologia, 1996 vol. 39, no. 2, pp. 199–205.

Pastucha D., Hyjánek J., Malinčíková J., Horáková D., Čížek L., Janoutová G., Janout V. *Hypertenze dětského věku a její vztah k inzulinové rezistenci*. *Pediatric pro Praxi*. 2007, 8(4), 237-239. ISSN 1803-5264.

Pavlíková P., Vodičková M., Česák V., Krčma M., Rušavý Z. *Diabetes mellitus 2. typu v praxi-balancování mezi rezistencí a sekrecí*. *Vnitřní lékařství*, 2020; 66(1): 21-27.

Pippitt K, Li M, Gurgle HE. *Diabetes Mellitus: Screening and Diagnosis*. *Am Fam Physician*. 2016 Jan 15;93(2):103-9. Erratum in: *Am Fam Physician*. 2016 Oct 1;94(7):533. PMID: 26926406.

Rigler R, Pramanik A, Jonasson P, Kratz G, Jansson OT, Nygren P, Ståhl S, Ekberg K, Johansson B, Uhlén S, Uhlén M, Jörnvall H, Wahren J. *Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 9;96(23):13318-23. doi: 10.1073/pnas.96.23.13318.

Salih JM, Abdulateef DS. *Detection of C-peptide in human hair and nail: a comparison between healthy persons and persons with type 1 diabetes*. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020 Jul;8(1):e001297. doi: 10.1136/bmjdr-2020-001297.

Shafqat J, Melles E, Sigmundsson K, Johansson BL, Ekberg K, Alvelius G, Henriksson M, Johansson J, Wahren J, Jörnvall H. *Proinsulin C-peptide elicits disaggregation of insulin resulting in enhanced physiological insulin effects*. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1805–11. doi: 10.1007/s00018-006-6204-6.

Singh B, Saxena A. *Surrogate markers of insulin resistance: A review*. *World J Diabetes*. 2010 May 15;1(2):36-47. doi: 10.4239/wjd.v1.i2.36.

Solař, Svatopluk. *C-peptid-od diagnózy ke klinice*. *Interní medicína (online)*. 2011, str. 481. Dostupné z: www.solen.cz/artkey/int-201112-0005_C-peptid_8211_od_diagnozy_ke_klinice. [cit.2021-10-29]

Steiner DF, Cunningham D, Spigelman L, Aten B. *Insulin biosynthesis: evidence for a precursor*. *Science* 157: 697-700, 196.

Steiner DF, Oyer PE. *The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma.* ProcNatlAcadSci U S A. 1967 Feb;57(2):473-80. doi: 10.1073/pnas.57.2.473.

Fujino T, Asaba H, Kang MJ, Ikeda Y, Sone H, Takada S, Kim DH, Ioka RX, Ono M, Tomoyori H, Okubo M, Murase T, Kamataki A, Yamamoto J, Magoori K, Takahashi S, Miyamoto Y, Oishi H, Nose M, Okazaki M, Usui S, Imaizumi K, Yanagisawa M, Sakai J, Yamamoto TT. *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion.* ProcNatlAcadSci U S A. 2003 Jan 7;100(1):229-34. doi: 10.1073/pnas.0133792100. Epub 2002 Dec 30. PMID: 12509515; PMCID: PMC140935.

Tang, Q.; Li, X.; Song, P.; Xu, L. *Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: Developments in research and prospects for the future.* DrugDiscov. Ther. 2015, 9, 380–385.

Tatemoto K., Carlquist M., Mutt V. *Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide.* Nature. 1982, 296 (5858): 659–660. doi:10.1038/296659a0.

Thomas NJ, Shields BM, Besser REJ, et al. *The impact of gender on urine C-peptide creatinine ratio interpretation.* Ann ClinBiochem. 2012;49:363–368. doi: 10.1258/acb.2011.011164.

Thota P, Perez-Lopez FR, Benites-Zapata VA, Pasupuleti V, Hernandez AV. *Obesity-related insulin resistance in adolescents: a systematic review and meta-analysis of observational studies.* GynecolEndocrinol. 2017 Mar;33(3):179-184. doi: 10.1080/09513590.2016.1273897.

Tosato S, Bonetto C, Lopizzo N, Cattane N, Barcella M, Turco G, Ruggeri M, Provasi S, Tomassi S, Dazzan P, Cattaneo A. *Childhood and Adulthood Severe Stressful Experiences and Biomarkers Related to Glucose Metabolism: A*

Possible Association? Front Psychiatry. 2021 May 14;12:629137. doi: 10.3389/fpsyt.2021.629137.

Unnerståle S, Mäler L. *pH-Dependent interaction between C-peptide and phospholipid bicelles*. J Biophys 2012: 185–907. doi: 10.1155/2012/185907. Epub 2012 Jul 16.

Válek J, Vlasáková Z, Pelikánová J, Karasová I, Jirkovská A, Grafnetter D. *The effect of elevated blood glucose levels and body weight on the metabolic profile in type 2 diabetes after long-term therapy*. Vnitřní lékařství. 1990, 36 (2): 154-162.

Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. *Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids*. Annu RevBiochem. 2001;70:535-602. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.535.

Vrablík, Michal. *Evropský konzensus k otázkám aterogenní dyslipidemie a kombinální léčbě statinem a fibrátem*. Kardiologická Revue. 2016; 18 (1), 61-66.

Wahren J, Ekberg K, Johansson J, Henriksson M, Pramanik A, Johansson BL, Rigler R, Jörnvall H. *Role of C-peptide in human physiology*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000 May;278(5):E759-68. doi: 10.1152/ajpendo.2000.278.5.E759.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ. 2003a Jan;10(1):45-65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. *Tumor necrosis factor signaling*. Cell death and differentiation2003b; 10: 45–65.

Walcher D, Aleksic M, Jerg V, Hombach V, Zieske A, Homma S, Strong J, Marx N. *C-peptide induceschemotaxisofhuman CD4-positive cells: involvementofpertussis toxin-sensitive G-proteins and phosphoinositide3-kinase*. Diabetes. 2004 Jul;53(7):1664-70. doi: 10.2337/diabetes.53.7.1664.

Wallerath T, Kunt T, Forst T, Closs EI, Lehmann R, Flohr T, Gabriel M, Schäfer D, Göpfert A, Pfützner A, Beyer J, Förstermann U. *Stimulation of endothelial nitric oxide synthase by proinsulin C-peptide*. Nitric Oxide. 2003 Sep;9(2):95-102. doi: 10.1016/j.niox.2003.08.004.

Wang S, Li G, Zuo H, Yang H, Ma L, Feng J, Niu Y, Ma L, Liu S, Qi T, Liu X. *Association of insulin, C-peptide and blood lipid patterns in patients with impaired glucose regulation*. BMC Endocr Disord. 2019 Jul 15;19(1):75. doi: 10.1186/s12902-019-0400-5.

Wang S, Wei W, Zheng Y, Hou J, Dou Y, Zhang S, Luo X, Cai X. *The role of insulin C-peptide in the coevolution analyses of the insulin signaling pathway: a hint for its functions*. Plos ONE 2012; 7: e528–47. 10.1371/journal.pone.0052847. Epub 2012 Dec 27.

Weiss MA, Frank BH, Khait I, Pekar A, Heiney R, Shoelson S and Neuriger LJ. *NMR and photo-CIDNP studies of human proinsulin and prohormone processing intermediates with application to endopeptidase recognition*. Biochemistry 29, 8389-8401, 1990. doi: 10.1021/bi00488a028.

Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships*. 2014 Feb 1. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, McGee EA, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Sahay R, Singer F, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. SouthDartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–. 2014 Feb 1. PMID: 25905258.

Xie L, Tsou CL. *Comparison of secondary structures of insulin and proinsulin by FTIR*. J ProtChem 1993; 12: 483–7. doi: 10.1007/BF01025049.

Yamada C, Moriyama K, Takahashi E. *Optimal cut-off point for homeostasis model assessment of insulin resistance to discriminate metabolic syndrome in non-diabetic Japanese subjects*. J Diabetes Investig. 2012 Aug 20;3(4):384-7. doi: 10.1111.

Yosten GL, Maric-Bilkan C, Luppi P, Wahren J. *Physiological effects and therapeutic potential of proinsulin C-peptide*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014 Dec 1;307(11):E955-68. doi: 10.1152/ajpendo.00130.2014. Epub 2014 Sep 23.

Zhong Z, Davidescu A, Ehrén I, Ekberg K, Jörnvall H, Wahren J, Chibalin AV. *C-peptide stimulates ERK1/2 and JNK MAP kinases via activation of protein kinase C in human renal tubular cells*. Diabetologia. 2005 Jan;48(1):187-97. doi: 10.1007/s00125-004-1602-5. Epub 2004 Dec 29.

Zlatohlávek L., Zídková K., Vrablík M. *Lipoprotein (a)*. Vnitřní lékařství, 2007;53(4): 434-440. online. Dostupné z: www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2007/04/21.pdf [cit.2022-08-10].