Oksidacijski stres - aktivator stresnih signalnih putova u dijabetesu tipa 2

Žanić Grubišić, Tihana; Rumora, Lada; Barišić, Karmela

Source / Izvornik: **Biochemia Medica, 2003, 13, 83 - 92**

Journal article, Published version
Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:064561

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Pregledni članak
Review

OKSIDACIJSKI STRES - AKTIVATOR STRESNIH SIGNALNIH PUTOVA U DIJABETESU TIPA 2

Tihana Žanić Grubišić, Lada Rumora i Karmela Barišić

Zavod za medicinsku biokemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

SAŽETAK – Molekularni mehanizmi razvoja patoloških promjena i komplikacija koje prate dijabetes su mnogostruki i još uvijek nedovoljno razjašnjeni. U mnogim tkivima kronična hiperglikemija izaziva komplikacije koje zahvaćaju periferno živčano tkivo i endotel krvnih žila u bubregu i drugim organima. Razvoju komplikacija doprinose i drugi metaboliti koji se pojavljuju u povišenim koncentracijama, a posebno slobodne masne kiseline koje izazivaju stvaranje reaktivnih kisikovih (ROS) i reaktivnih dušikovih spojeva (RNS). U slučaju kada su staničnі antioksidacijski mehanizmi nedovoljni za njihovu neutralizaciju razvija se oksidacijska neravnoteža i dolazi do pojave oksidacijskoga stresa. Ovo ima za posljedicu aktivaciju singalnih putova povezanih sa stresom, prvenstveno faktora NF-kB, stresnih kinaza, p38 MAPK, JNK, PKC, sinteze kasnih produkata glikozilacije, njihovih receptora, sorbitola, heksozamina i drugih. Kao posljedica toga aktivira se ekspresija različitih proteina koji izravno uzrokuju oštećenje stanica i razvoj komplikacija. S druge strane, oksidacijski stres uzrokovan hiperglikemijom i visokom koncentracijom masnih kiselina dovodi do razvoja inzulinske rezistencije i poremećenog izlučivanja inzulina aktivirajući ove iste, ili slične signalne putove. Zbog toga je primjena antioksidansa u sprječavanju komplikacija vrlo važna, a dobro poznavanje mehanizma razvoja patoloških promjena može ukazati na farmakološke mete koje mogu biti prikladne za nove terapije usmjerene da spriječe, poprave ili odlože razvoj komplikacija u dijabetesu.

Ključne riječi: *šećerna bolest, tip II, oksidacijski stres, MAP kinaze, antioksidansi, prijenos signala*

Povezanost visoke koncentracija glukoze i povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) te razvoja oksidacijskoga stresa opisana je u mnogim stanicama i tkivima. Ako se takvim promjenama ne suprostave tkivni antioksidacijski sustavi dolazi do oksidacijske neravnoteže i do aktivacije staničnih signalnih putova koji su posrednici u odgovoru na stres. Jedna od glavnih posljedica ovog stanja je sinteza proteina koji dovode do oštećenja stanice i do promjena koje se očituju kao karakteristične kasne komplikacije dijabetesa.

Brojni podatci iz literature govore da aktivacija signalnih putova odgovornih za kasne dijabetičke komplikacije igra važnu ulogu u posredovanju inzulinske rezistencije i poremećenog lučenja inzulina. Mogućnost zaštitnog djelovanja određenih antioksidansa protiv učinaka hiperglikemije *in vitro* te opisani povoljni klinički učinci antioksidacijske terapije, podupiru pretpostavku o uzročnoj povezanosti oksidacijskoga stresa i razvoja patoloških promjena.

U ovom pregledu pokušat ćemo povezati različite karakteristične promjene koje se javljaju u dijabetesu tipa 2 i utvrditi uzročno-posljedične veze među njima te ih pokušati protumačiti kao izravne ili neizravne posljedice visoke koncentracije glukoze. Temeljna pretpostavka od koje polazimo je da kronična hiperglikemija i kronična povišena koncentracija slobodnih masnih kiselina (SMK) izaziva pojačano stvaranje ROS-a i dovodi do stanja oksidacijskoga stresa. Sve osnovne karakteristike dijabetesa tipa 2 kao što je ***inzulinska rezistencija, neodgovarajuća funkcija ß-stanica gušterače i kasne dijabetičke komplikacije*** mogu se povezati s poremećenim oksidacijskim statusom organizma.

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. Tihana Žanić Grubišić, Zavod za medicinsku biokemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, telefon 46 12 606, fax: 46 12 716, e-mail: tihana_zanic@yahoo.co.uk

Dijabetes tipa 2 je karakteriziran smanjenim ili nedovoljnim lučenjem inzulina, inzulinskom rezistencijom te pojačanom sintezom glukoze u jetri. Pokazano je da postoje nasljedni elementi u razvoju inzulinske rezistencije, a nasljeđivanje bi moglo biti kodominantnim načinom (1-4). S druge strane, dobro je poznato da se inzulinska rezistencija razvija pod utjecajem stečenih faktora kao što je pretjerana težina, loše životne navike povezane s nedovoljnom količinom fizičke aktivnosti, trudnoća i suvišak drugih hormona. U početnim stadijima ovi se problemi mogu kompenzirati hiperinzulinemijom te je moguće održati normoglikemiju. Neki su autori pokazali da približno 25% normalne, nedijabetičke populacije pokazuje sličan stupanj inzulinske rezistencije kao što je to opisano kod dijabetesa tipa 2 (5). Klinički vidljivi simptomi nastali zbog izloženosti visokim koncentracijama glukoze javljaju se tek ako ovo stanje duže traje. Povišene koncentracije glukoze dovode do oksidacijskoga stresa koji je posljedica povećanog stvaranja ROS i reaktivnih dušikovih spojeva (RNS) u mitohondrijama, neenzimske glikacije proteina i autooksidacije glukoze (6-7). S druge strane povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina također dovodi do stvaranja ROS i oksidacijskoga stresa (8). U ovom slučaju ROS nastaju zbog povećane dinamike mitohondrijske razgradnje MK procesom ß-oksidacije te zbog poremećaja u odvijanju mitohondrijskih procesa staničnog disanja i oksidacijske fosforilacije. Razvoj oksidacijskoga stresa dovodi do aktivacije nespecifičnih obrambenih mehanizama i aktivacije signalnih putova povezanih s reakcijom na stres. Ovi procesi dodatno utječu na smanjenje lučenja inzulina i smanjenje receptorske osjetljivosti na hormon, što doprinosi razvoju dijabetesa tipa 2. Rezistencija na inzulin dodatno povećava rizik od razvoja komplikacija kao što je pojava metaboličkog sindroma, kardiovaskularnih promjena, povećanoga krvnog tlaka i dislipidemije. Kako je u temeljima svih ovih promjena ***oksidacijski stres*** i posljedično tome aktivacija staničnih signalnih putova povezanih sa stresom, terapija koja bi smanjila ***oksidacijski stres*** mogla bi biti od odlučujuće važnosti za sprječavanje razvoja komplikacija.

U literaturi postoji veliki broj podataka koji govore da je hiperglikemija uzrok nefropatije, retinopatije, neuropatije i makro- i mikro-žilnih oštećenja u dijabetesu tipa 2 (6, 9). Glavni krivac ovih komplikacija najvjerojatnije je ***oksidacijski stres*** koji nastaje zbog neodgovarajućeg uklanjanja ROS. Potvrda činjenice da stanični sustavi nisu u stanju ukloniti ove štetne čestice vidi se u tome što je kod nekontroliranog dijabetesa aktivnost enzima odgovornih za uklanjanje ROS, poput superoksid- dismutaze (SOD) i katalaze, smanjena jednako kao i razina drugih staničnih antioksidansa kao što su vitamin E i liponska kiselina (10-13). Podatci koji govore u prilog teoriji o ***oksidacijskom stresu*** uzrokovanom hiperglikemijom koji dovodi do oštećenja tkiva sve se više gomilaju, iako još uvijek ne postoji učinkovita terapijska strategija kojom bi se mogao spriječiti ili usporiti nastanak patoloških promjena (6,14).

OKSIDACIJSKI STRES I RAZVOJ KOMPLIKACIJA U DIJABETESU

Brojne studije *in vivo* su pokazale pojavu oksidacijskoga stresa prije nego su se klinički očitovale kasne dijabetičke komplikacije i tako pokazale da ***oksidacijski stre***s igra važnu ulogu u patogenezi komplikacija (15, 16). Nishikawa i sur. su pokazali da se normalizacijom aktivnosti mitohondrijske SOD mogu zaustaviti tri različita puta nastanka oštećenja stanice izazvana hiperglikemijom (17).

a) Poremećaji mitohondrijske oksidacijske fosforilacije i sinteza ROS

Oksidacijska fosforilacija i respiracijski lanac u mitohondrijima su procesi kojima završava metabolička oksidacija glukoze i drugih molekula goriva i u njima se stvaraju najveće količine staničnog ATP. Tijekom tih procesa u kojima izravno sudjeluje molekularni kisik kao krajnji oksidans nastaje H_2O, ali određena relativno mala (između 0.4 i 4%) količina O_2, se pretvara u slobodni superoksidni radikal $\cdot O_2^-$ (18). Ova vrlo reaktivna molekula može se dalje pretvarati u druge ROS ili RNS. Radikal $\cdot O_2^-$ se normalno odstranjuje djelovanjem stanične antioksidacijske obrane i pretvara u manje reaktivni H_2O_2 djelovanjem mitohondrijske SOD. Daljnja detoksikacija H_2O_2 odvija se djelovanjem mitohondrijske ***glutation-peroksidaze*** koja katalizira nastajanje H_2O i O_2 , ili nastali H_2O_2 može biti razgrađen u peroksisomima djelovanjem **katalaze**. S druge strane u prisutnosti reduciranih prelaznih metala Cu i Fe nastali H_2O_2 može biti pretvoren u visoko reaktivni $\cdot OH$ radikal tijekom Fentonove reakcije (19).

Izravna oštećenja staničnih strukturnih elemenata, proteina, lipida i nukleinskih kiselina koja izazivaju ROS uspješno se sprječavaju djelovanjem glavnog staničnog antioksidansa -

reduciranog glutationa GSH (20,21). Održavanje normalne količine GSH u stanici kontrolirano je katalitičkim djelovanjem enzima ***glutation-reduktaze,*** ili ciklusom koji uključuje sudjelovanje liponske kiseline (LA), ili drugih staničnih antioksidansa (22). Opasnost od nastanka visoke stanične razine ROS pojavljuje se onda kada stanično antioksidacijsko djelovanje nije dostatno za održavanje primjerene količine GSH i kada oksidacijsko djelovanje nadjača. Tada nastaje ***oksidacijski stres.*** Nastali ROS izazivaju izravno oštećenje staničnih struktura na što stanica reagira aktivacijom stresnih signalnih putova i ekspresijom gena povezanih s nastankom staničnih oštećenja.

b) Oksidacijski stres izazvan hiperglikemijom dovodi do aktivacije NF-κB i do pojačanog lučenja upalnih citokina

Jedna od prvih signalnih molekula koja se aktivira zbog hiperglikemije i oksidacijskoga stresa je ***transkripcijski faktor NF-κB.*** Njegova aktivacija može nastati zbog niza endogenih i egzogenih uzroka. Oštećenje DNA, virusne infekcije, UV zračenje, povišena koncentracija ROS, produžena hiperglikemija, porast koncentracije slobodnih masnih kiselina, porast koncentracije TNF-α, IL-1β, i drugih proupalnih citokina, vezanja kasnih produkata glikozilacije (AGE) na njihove receptore te aktivacija stresnih kinaza kao što su p38 MAPK i JNK, sve će to dovesti do aktivacije jezgrinog faktora NF-κB. Ova molekula igra odlučujuću ulogu u posredovanju imunog i upalnog odgovora te u nastanku apoptoze, tj. programirane smrti stanice. Pokazano je da je poremećena funkcija NF-κB povezana s razvojem mnogih kroničnih bolesti, između ostalih dijabetesa i ateroskleroze (19).

Aktivacija NF-κB se provodi kroz standardni fosforilacijski put koji uključuje uklanjanje i razgradnju njegove ***inhibicijske podjedinice I-κB.*** Inaktivni heterodimer koji se normalno može naći u citoplazmi sastoji se od podjedinica p50 i p65 vezanih u kompleksu s inhibitorom podjedinicom I-κB. Nakon stimulacije odvaja se inhibicijska podjedinica i slobodni NF-κB prodire u jezgru gdje dovodi do aktivacije mnogih gena, među njima faktora rasta, citokina, receptora za AGE i adhezijskih molekula. Mehanizmom pozitivne povratne sprege ovi faktori mogu dodatno aktivirati NF-κB (23).

Ključni korak u aktivaciji NF-κB je *fosforilacija* inhibicijske podjedinice I-κB te njezino obilježavanje ubikvitinom i posljedična razgradnja. Za razgradnju su odgovorni konstitutivni stanični enzimi koji se nalaze u proteasomima. Kako se radi o konstitutivno reguliranim enzimima to znači da je razina ekspresije razgradnih enzima u stanici konstantna. Zbog toga se može reći da je ključni regulacijski korak *fosforilacija* inhibicijske podjedinice koju katalizira ***kinaza za I-κB (IKK).*** Ovaj je enzim sastavljen od tri podjedinice čija je aktivacija također regulirana *fosforilacijom.* Njega *fosforilira* posebna ***serinska kinaza IKKK*** koja je na taj posredni način odgovorna za indukciju krajnjeg člana ovog niza - jezgrinog faktora NF-κB (24). Zanimljivo je primijetiti da se aktivnost IKKK, a to znači i aktivacija NF-κB, može inhibirati djelovanjem aspirina i salicilata, te nekih drugih derivata prostaglandina za koje je pokazano da povećavaju osjetljivost i reaktivnost na inzulin (25). Važnost i uloga NF-κB u razvoju komplikacija kod pacijenata s dijabetesom melitusom pokazana je i postojanjem dobre korelacije između aktivacije NF-κB i slabe kontrole glikemije te razvoja albuminurije i razvoja bubrežnih komplikacija (26,27). Podatci govore da je kod pacijenata s dijabetesom melitusom utvrđeno pojačano stvaranje ROS te smanjeni kapaciteti stanične antioksidacijske obrane, prvenstveno redoks-sustava glutationa i ciklusa vitamina C, vitamina E i liponske kiseline (28-30).

Jedan od rezultata aktivacije signalnog puta NF-κB je i aktivacija ***faktora rasta endotela krvnih žila (VEGF),*** specifičnog mitogena koji sudjeluje u procesu formiranja krvnih žila. Djelovanje VEGF je vidljivo nakon njegovog vezanja za receptor koji ima tirozin-kinaznu aktivnost i zbog toga fosforilira ciljne proteine. VEGF sudjeluje u različitim fiziološkim procesima gdje je zbog prirodnog rasta nužna povećana opskrbljenost krvlju. Međutim, povišene koncentracije VEGF se pojavljuju u razvoju metastaza tumora čvrstih tkiva, retinopatiji, u inicijaciji proliferativne dijabetičke retinopatije, nefropatije i neuropatije. Njegovo je stvaranje stimulirano hipoksijom, hiperglikemijom, AGE, aktivacijom signalnih putova aktiviranih stresom, a antioksidansi su uspješno smanjivali aktivaciju VEGF-a. Visoke razine VEGF su povezane sa stvaranjem ROS, i aktivacijom NF-κB i mogu se smanjiti raznim sredstvima koja smanjuju stvaranje ROS. Povišene vrijednosti VEGF u serumu mogu se koristiti kao pokazatelj razvoja komplikacija u dijabetesu (31).

Terapija antioksidansima, kao što su ***vitamin E, vitamin C i liponska kiselina,*** dovela je do smanjenja aktivacije NF-κB i smanjenja intenziteta lipidne peroksidacije (28, 29). Posebno je pokazano da LA uklanja slobodne radikale, sprječava oštećenje DNA uzrokovano kisi-

kom, povećava unutarstaničnu razinu glutationa, sprječava glikaciju serumskog albumina i aktivaciju NF-κB i inhibira signalne putove koje on aktivira te povećava reaktivnost na inzulin u dijabetesu tipa 2 (30). Također je opaženo da primijenjena terapija ima učinka na normalizaciju hemodinamike u mrežnici i normalizaciju bubrežne funkcije u ranim fazama bolesti (44).

Aktivaciju NF-κB je moguće spriječiti korištenjem antioksidansa koji sadrže tiolnu skupinu kao što je N-acetil-l-cistein (NAC) (32). Posebnu pažnju zaslužuju i drugi antioksidansi koji se sustavno ispituju poput resveratrola kojeg ima u crnom vinu, pitrogenola, kurkumina - začina koji se pojavljuje u kariju, te određenih sintetskih spojeva koji se pojavljuju kao hvatači radikala (33, 34).

c) Hiperglikemija, ROS i upalni citokini dovode do aktivacije stresnih MAP- kinaza

Aktiviranje signalnog puta ***mitogenima aktiviranih protein-kinaza*** (MAP-kinaza) dovodi do promjena u razini transkripcije različitih proteina koji mogu aktivirati druge signalne putove čiji je konačni rezultat razvoj dijabetičkih komplikacija, inzulinska rezistencija i pojačano stvaranje VEGF (35). Aktivacija ***MAP-kinaza*** dovodi do fosforilacije ***aktivacijsko-transkripcijskog faktora 2*** (ATF-2) čiji je krajnji učinak aktivacija apoptotičnog programa (36). U mnogim je pokusima pokazano da je aktivacija p38 MAPK povezana s hiperglikemijom i pojačanim stvaranjem ROS i razvojem oksidacijskoga stresa. Posrednik u ovom procesu je primarna obrana stanice od stresa, a to je ***fosforilacija proteina toplinskog šoka HSP-25.***

Produženo preživljenje stanica može se postići korištenjem tiolnih antioksidansa i regulatora redoks-potencijala kao što je vitamin C.

Osim aktivacije stresnih signalnih putova hiperglikemija aktivira i druge biokemijske reakcije koje doprinose razvoju dijabetičkih komplikacija.

1. Stvaranje kasnih glikozilacijskih produkata i aktiviranje njihovih receptora.

Hiperglikemija uzrokuje nastanak produkata glikozilacije lipida, proteina i nukleinskih kiselina ***(AGE)*** koji nastaju u neenzimskim reakcijama glikozilacije, a njihovim vezivanjem na odgovarajuće membranske receptore ***(RAGE)*** stimulira se stvaranje staničnih ROS i aktivacija ekspresije gena za VEGF i druge medijatore dijabetičkih komplikacija i kroničnih krvožilnih bolesti (37).

2. Aktivacija signalnog puta protein-kinaze C

U tkivima u kojima se javljaju dijabetičke komplikacije nađena je visoka koncentracija diacilglicerola alosteričkog aktivatora ***protein-kinaze C (PKC),*** posebno izoenzima PKC-β koji je prisutan u krvnožilnom sustavu, bubrezima i mrežnici. Povećana aktivnost PKC je povezana s hiperglikemijom, a odgovorna je za promjene propusnosti membrane u žilama, dinamiku protoka krvi i neovaskularizacije. Aktivacija PKC je povezana s aktivacijom drugih kinaza, posebno MAPK i učincima koje one izazivaju (36).

3. Poliolski metabolički put

Porastom koncentracije glukoze u stanici aktivira se ***aldoza-reduktaza,*** enzim koji katalizira redukciju glukoze u sorbitol koji dalje može biti oksidiran u fruktozu djelovanjem ***sorbitol-dehidrogenaze.*** Nakupljanje sorbitola u stanicama dovodi do aktivacije stresnih protein-kinaza p38 MAPK i JNK i do staničnog oštećenja. Izravna povezanost aktivacije sinteze sorbitola i dijabetičnih komplikacija pokazana je na modelu transgeničnog miša kod kojega je inhibicija aldoza-reduktaze spriječila razvoj neuropatije, nefropatije i retinopatije, te stvaranja katarakti (38,39).

4. Heksozaminski put

Brojni podatci iz literature pokazuju da visoka koncentracija glukoze i slobodnih MK u stanici dovodi do aktivacije biosinteze heksozaminida, a da su oni povezani s razvojem inzulinske rezistencije i razvoja kasnih dijabetičkih promjena. Enzim koji je odgovoran za ovu sintezu je ***glutamin: fruktoza-6-fosfat-amidotransferaza (GFAT).*** Snažna aktivacija ovog enzima dovodi do pojačanog stvaranja energijskih zaliha u jezgri, hiperlipidemije i pretjerane težine. Izgleda da heksozaminski put djeluje kao stanični senzor energijskih kapaciteta i da povezuje učinke visoke koncentracije glukoze i ekspresiju različitih genskih produkata kao što je leptin i stvaranje ROS (40, 41).

5. Stvaranje ROS u enzimskim reakcijama s arahidonskom i linolenskom kiselinom

Sinteza ROS nije samo posljedica hiperglikemije već je i normalni produkt određenih

enzima koji kataliziraju reakcije u kojima sudjeluje molekularni kisik. Tu su uključene reakcije ***ciklooksigenaze i lipooksigenaze*** koje su aktivirane faktorima rasta, citokinima i hiperglikemijom. Neki od njihovih produkata aktiviraju stresne proteine kinaze (PKC) koje dovode do promjena na žilama, hipertrofije žilnih glatkih mišića, bolesti bubrega, povećane sinteze molekula matriksa i aktivacije onkogena (14).

I u ovom slučaju dolazi do aktivacije NF-kB i povećane ekspresije VEGF. Nadalje, superoksidni radikal reagira s NO i dovodi do stvaranja *peroksinitrita.* RNS ometaju regulaciju krvožilnoga tonusa i mogu pojačati aterosklerotske procese. Ovi učinci mogu se umanjiti uzimanjem antioksidansa.

OKSIDACIJSKI STRES DOPRINOSI RAZVOJU INZULINSKE REZISTENCIJE

Utvrđeno je da ***oksidacijski stres*** djeluje i na razvoj inzulinske rezistencije aktivacijom ***signalnog puta serinskih kinaza.*** Posebno je to pokazano u pokusima u kojima je davanjem određenih antioksidansa, a posebno liponske kiseline, vitamina C, vitamina E i glutationa smanjena hiperglikemija uz istu razinu cirkulirajućeg inzulina. Mehanizam potenciranja inzulinske rezistencije koji je povezan s aktivacijom signalnog puta serinskih kinaza dovodi do pojačanog fosforiliranja brojnih proteinskih faktora koji sudjeluju u inzulinskom signalnom putu (42, 43). Fosforilacija serina ili treonina u molekuli inzulinskog receptora, ili njegovih supstrata smanjuje mogućnost normalne fosforilacije na tirozinu. U normalnim uvjetima aktivirani inzulinski receptor djeluje kao ***tirozin-kinaza*** koja katalizira *fosforilaciju* proteina na tirozinu. U procesu aktivacije inzulinski receptor najprije *fosforilira* vlastitu molekulu, i tako aktiviran *fosforilira* druge proteine koji se zovu supstratima inzulinskog receptora. Neki od tih proteina izravno reguliraju funkciju β stanica. Proteini koji su fosforilirani na "krivoj" aminokiselini, tj. na serinu, ne reagiraju normalno s ciljnim molekulama, što dovodi do smanjenog djelovanja inzulina. Posebno se to odnosi na aktivaciju protein-kinaze B i transport glukoze. "Kriva" fosforilacija na serinu ili treoninu dovodi do aktivacije stresnih kinaza i njihovog signalnog puta koji uključuje NF-κB, p38 MAPK, JNK, PKC, što ima za posljedicu poremećenu funkciju β stanica. Ustanovljeno je da antioksidansi, posebno LA, mogu spriječiti poremećaje funkcije transportera glukoze GLUT 4 izazvane oksidacijskim stresom i aktivacijom signalnih putova NF-κB i stresne kinaze p38 MAPK (44). Učinak LA odnosi se i na stimulaciju metaboličke razgradnje glukoze, što kod pacijenata s dijabetesom tipa 2 dodatno doprinosi normalizaciji koncentracije glukoze u krvi.

Uloga NF-κB i njegovih aktivatora (IKKβ) u razvoju inzulinske rezistencije može se spriječiti ako se djelovanjem salicilata inhibira aktivnost IKKβ, tj. fosforilacija serinskih ostataka u ciljnim proteinima, a poveća fosforilacija tirozinskih ostataka (45, 46). Ovakve rezultate su potvrdili i pokusi gdje su visoke doze aspirina smanjile razinu glukoze i povećale inzulinsku osjetljivost. Veza je uspostavljena i preko adiponektina, proteina koje luče adipociti, a koji povećava osjetljivost inzulinskih receptora, inhibirajući aktivnost NF-κB.

Tirozinske fosfataze i inzulinska rezistencija

Aktivacija signalnih molekula je najčešće povezana s djelovanjem kinaza koje *fosforiliraju* svoje supstrate - signalne proteine na tirozinu, ili pak na serinu i treoninu. Jednako tako važnu ulogu treba dati i enzimima koji su odgovorni za *defosforilaciju,* tj. *hidrolizu fosfata* (47). U tu skupinu spadaju ***proteinske tirozin-fosfataze i fosfataze s dvostrukom specifičnošću prema tirozinu i prema Thre/Ser (PTPaze).*** Pokazano je da je fosforilacija i defosforilacija tirozina posebno važna za transport glukoze stimuliran inzulinom u adipocitima i mišićima. Zbog toga i fosfoprotein-fosfataze predstavljaju potencijalno važan faktor za terapijsku regulaciju inzulinskog djelovanja.

Povezanost aktivacije stresnih signalnih putova s razvojem inzulinske rezistencije s jedne strane i s razvojem kasnih komplikacija dijabetesa tipa 2 s druge strane govori o mogućnosti postavljanja hipoteze o oksidacijskom stresu uzrokovanom hiperglikemijom kao jedinstvenom uzročniku inzulinske rezistencije i kasnih dijabetičkih komplikacija koji se međusobno dodatno potenciraju i produbljuju.

Pretilost i visoka koncentracija slobodnih masnih kiselina kao uzročnik inzulinske rezistencije

Inzulinska rezistencija je dokazana u osoba s prekomjernom težinom i to je vidljivo puno prije nego što se pojavljuje hiperglikemija. Iz toga se može zaključiti da se uzrok inzulinske rezistencije ne može povezati s oksidacijskim stresom koji se razvija zbog hiperglikemije. Ipak, povezanost ovih stanja govori da bi neki faktor

koji luče ***adipociti*** mogao aktivirati signalni put koji je identičan onome kojega aktivira oksidacijski stres. Razni su spojevi bili kandidati za ovu ulogu, a posebno ***TNFα, leptin, SMK i rezistin.*** Po svemu sudeći, cirkulirajuće SMK su najvjerojatnija veza između pretilosti i inzulinske rezistencije. Poznato je da postoji uzročno-posljedična povezanost između visoke koncentracije SMK u plazmi, nakupljanja triglicerida u mišičnim stanicama i inzulinske rezistencije. Posrednik u ovom procesu bi mogao biti ***malonil CoA,*** ključni metabolit, ali i regulator sinteze i razgradnje MK (48,49).

Visoka koncentracija malonil CoA mogla bi spriječiti normalnu oksidaciju SMK i povećati nakupljanje masti u staničnim zalihama te dovesti do razvoja inzulinske rezistencije, poremećene funkcije β stanica i razvoja dijabetesa tipa 2. Najnovija istraživanja pokazuju da ***visoke razine triglicerida*** smanjuju transport glukoze u stanicu i tako izazivaju prividnu rezistenciju na inzulin kod pretilih osoba. Pokazano je da su visoke koncentracije SMK u plazmi povezane sa smanjenim učinkom inzulinskih receptora i aktivacijom PKC, NF-kB, p38 MAPK, JNK i drugih serinskih i treoninskih kinaza koje ometaju normalnu tirozinsku fosforilaciju i posljedično tome normalnu funkciju inzulinskog receptora.

Slobodne masne kiseline, redoks ravnoteža i aktivacija stresnih signalnih putova

Uloga SMK u razvoju inzulinske rezistencije i razvoju komplikacija očituje se posebno u ometanju funkcije inzulinskih receptora i u izazivanju poremećaja funkcije mitohondrija. SMK djeluju tako da dovode do razdvajanja reakcija respiracijskog lanca i oksidacijske fosforilacije te pojačanog stvaranja ROS i radikala $\cdot O_2^-$. Učinak radikala dodatno je pogoršan jer SMK djeluju na smanjenje staničnih antioksidacijskih potencijala, posebno reduciranog glutationa. Na taj način SMK dovode do razvoja oksidacijskoga stresa i aktivacije stresnih kinaza koje su već opisani uzročnici komplikacija kod dijabetesa. Štetno djelovanje SMK može se umanjiti ili spriječiti uzimanjem antioksidansa, posebno vitamina E i glutationa čime se postiže povećana osjetljivost na inzulin i popravlja funkcija β stanica (50).

OKSIDACIJSKI STRES I POREMEĆAJI FUNKCIJE β STANICA

β stanice su posebno osjetljive na oštećenja izazvana ***oksidacijskim stresom.*** Njihova je osnovna funkcija lučenje potrebne količine inzulina nakon stimulacije povećanom koncentracijom glukoze u krvi. Neposredni sudionici u povezivanju stimulacije lučenja inzulina i koncentracije glukoze u krvi su niskoafinitetni transporter glukoze GLUT2 i glukokinaza, enzim koji katalizira fosforilaciju glukoze u stanici te enzimi koji odražavaju intenzitet glukoznog metabolizma (51, 52). U cijelom slijedu događaja koji dovode do lučenja odgovarajuće koncentracije inzulina može se reći da mitohondrijski metabolizam ima ključnu ulogu. Mitohondriji su istovremeno mjesta stvaranja ROS i RNS i njihove najosjetljivije mete pa se funkcija mitohondrija najtjesnije povezuje s razvojem ***oksidacijskoga stresa*** i posredno utjecaja na lučenje inzulina (53). Mnoge su studije pokazale da je neprimjerena funkcija β-stanice rezultat:

1) kronične izloženosti hiperglikemiji,

2) kronične izloženosti visokim koncentracijama SMK

3) međusobne kombinacije ovih štetnih utjecaja.

U biti se svi štetni učinci mogu povezati s ***oksidacijskim stresom,*** aktivacijom NF-κB signalnog puta kao i s aktivacijom kaskade stresnih kinaza, što ima za posljedicu usmjeravanje β-stanica u propadanje apoptozom.

Oštećenje β-stanice uzrokovano glukozom

U mnogim je pokusima pokazano da se nakon regulacije hiperglikemije koja je postignuta dijetom, primjenom inzulina, ili sulfonilureje može javiti endogeno popravljanje lučenja inzulina. Ovo je vrlo složen proces koji uključuje utjecaj na razini ekspresije gena i na razini mRNA za inzulin i inzulinski receptor.

Spontano smanjenje lučenja inzulina zbog visoke koncentracije glukoze nastaje kao rezultat postupnoga smanjenja endogenih stimulirajućih faktora nakon produžene stimulacije β-stanica. S druge strane, hiperglikemija s vremenom dovodi do iscrpljivanja β-stanica. Inzulin je pohranjen u granulama koje se nalaze u odjeljcima koji mogu biti bolje ili slabije dostupni stimulaciji i izlučivanju. Može se reći da je smanjena razina izlučivanja inzulina nakon opterećenja glukozom rezultat hipersenzitizacije i iscrpljenja zaliha, a nije rezultat patološke promjene beta stanica (56).

Toksičnost visoke koncentracije glukoze može se značajno smanjiti istovremenom primjenom antioksidansa NAC ili aminogvanidina. U pokusima *in vitro* antioksidansi su djelomično sprječavali smanjenje razine mRNA i smanjenje lučenja inzulina (59).

Toksične promjene β stanica uzrokovane lipidima

Učinci lipida na funkciju β-stanica su složeni. Povišene koncentracije SMK dovode do povećanog lučenja inzulina, najvjerojatnije zbog nakupljanja dugolančanih MK u citoplazmi stanice. Učinak lipida različito se očituje na normalne i na patološki promijenjene β-stanice. Kod kronične izloženosti povišenim koncentracijama SMK u normalnim β-stanicama dolazi do smanjenja mRNA za inzulin, ali se povećava osjetljivost na niske koncentracije glukoze. S druge strane, produžena izloženost povećanoj koncentraciji SMK izaziva promjene funkcioniranja mitohondrija. Mijenja se membranski potencijal i dinamika otvaranja K^+ kanala, te dolazi do poremećaja lučenja inzulina koje regulira glukoza. Poremećaj lučenja inzulina i u ovom je slučaju povezan s nastajanjem ROS (57).

Kod patološki promijenjenih β-stanica visoke koncentracije SMK uzrokuju poremećeno lučenje inzulina i izazivaju druge smetnje poput povećanog odlaganja triacilglicerola u stanice, promjena u funkciji mitohondrija, poremećaja lučenja inzulina, aktivacije signalnih putova stresnih kinaza - posebno JNK, povećane sinteze NO i povećanog stupnja apoptoze β-stanica. Zasićene dugolančane MK pokazale su se posebno toksičnima u ovom modelu (58).

Kombinirani toksični učinci glukoze i lipida na β-stanice

Hiperglikemija i visoke koncentracije lipida djeluju sinergistički i kada su prisutne u kombinaciji njihovi su učinci posebno opasni. Oni dovode do potpunoga poremećaja izlučivanja inzulina usprkos stimulaciji visokom koncentracijom glukoze.

U literaturi postoje brojni podatci koji govore o ***oksidacijskom stresu*** kao uzročniku poremećene funkcije β-stanica, a kao neposredni se čimbenici spominju autoimune promjene, citokini, ili toksični spojevi poput aloksana. No, kod dijabetesa tipa 2 treba voditi računa i o starenju stanica, gomilanju produkata glikacije, te o toksičnosti koja proizlazi iz izloženosti visokim koncentracijama glukoze i SMK. Potrebno je također uzeti u obzir visoku koncentraciju ROS i RNS koji imaju negativne učinke na nuklearnu i mitohondrijsku DNA u β-stanicama kao i na razinu reduciranog oblika glutationa GSH. β-stanice su posebno osjetljive na ROS i RNS jer one imaju nisku razinu antioksidacijskih enzima kao što su SOD, glutation-peroksidaza GPx i katalaza, ili tioredoksina staničnog proteina uključenoga u antioksidacijsku obranu. Tijekom kronične hiperglikemije intenzivira se ekspresija antioksidacijskih i antiapoptotičkih gena kao kompenzacijski mehanizam. Sam ***oksidacijski stres*** dovodi do smanjenja inzulinske mRNA, citosolnog ATP i protoka Ca^{2+} u citoplazmi i mitohondrijima te razvoja apoptoze. Mitohondriji su posebno osjetljivi na ***oksidacijski stres.*** Lipidna peroksidacija dovodi do inhibicije metaboličkog oksidiranja glukoze. Zbog toga je primjena antioksidacijskih sredstava kao što su NAC, AG i drugi spojevi koji hvataju radikale učinkovita u sprječavanju toksičnosti β-stanice, stvaranja produkata neenzimske glikozilacije i aktivacije signalnog puta NF-κB (32).

Pokazano je da je inhibicija heksozaminskog puta znatno popravila razvoj poremećaja u izlučivanju inzulina koje je uzrokovao ***oksidacijski stres.*** Postoje određeni rezultati koji govore da bi izravna meta ROS u beta stanicama mogao biti specifični enzim ***glukokinaza*** koja djeluje kao senzor u stimulaciji lučenja inzulina. Kako se u aktivnom središtu enzima nalazi cistein koji je ključan za katalizu, onda bi oksidacija njegove -SH skupine mogla biti uzrokom inhibicije enzimske aktivnosti. Povoljan učinak antioksidansa (NAC i aminogvanidina) bio bi rezultat ponovne redukcije tog cisteina (59-61).

U zaključku se može reći da su molekularni mehanizmi razvoja patoloških promjena i komplikacija koje prate dijabetes mnogostruki i još uvijek nedovoljno razjašnjeni. U mnogim tkivima hiperglikemija i povišene koncentracije SMK dovode do stvaranja ROS i RNS. U slučaju kada su stanični antioksidacijski mehanizmi nedovoljni za njihovu neutralizaciju razvija se oksidacijska neravnoteža i dolazi do pojave ***oksidacijskoga stresa.*** To ima za posljedicu aktivaciju signalnih putova povezanih sa stresom, prvenstveno faktora NF-κB, stresnih kinaza, p38 MAPK, JNK, PKC, sinteze kasnih produkata glikozilacije, njihovih receptora, sorbitola, heksozamina i drugih. Kao posljedica toga aktivira se ekspresija različitih proteina koji izravno uzrokuju oštećenje stanica i razvoj komplikacija. S druge strane, ***oksidacijski stres*** dovodi i do razvoja inzulinske rezistencije aktivirajući te ili slične signalne putove. Zbog toga je primjena antioksidansa u sprječavanju komplikacija vrlo važna, a dobro poznavanje mehanizma razvoja patoloških promjena može ukazati na farmakološke mete koje mogu biti prikladne za nove terapije usmjerene da spriječe, poprave ili odlože razvoj komplikacija u dijabetesu.

OXIDATIVE STRESS - AN IMPORTANT SIGNAL FOR STRESS-ACTIVATED SIGNALING PATHWAYS IN TYPE 2 DIABETES

ABSTRACT – The molecular mechanisms for the development of late diabetic complications are still not clear. In a variety of tissues chronic hyperglycemia results in development of complications mainly in the nerve tissue, vascular endothelium in kidney and other organs. Increased concentrations of other metabolites and in particular free fatty acids that cause generation of reactive oxygen species ROS and reactive nitrogen species RNS might also be responsible for the development of diabetic complications. If the cellular antioxidant capacities could not neutralize oxidative production, oxidative stress develops and activation of stress-sensitive signalling pathways, such as NF-κB, stress kinases, p38 MAPK, JNK, PKC, synthesis of advanced glycosylation end-products, their receptors, sorbitol and hexosamines, is produced. The immediate consequence is expression of factors that cause cellular damage and are responsible for long-term complications. On the other hand, oxidative stress that is caused by hyperglycemia and elevated fatty acid concentration mediates insulin resistance and impaired insulin secretion through similar signalling pathways. Thus, the use of antioxidants may be very important in preventing complications, and identification of the molecular basis for development of complications might lead to discovery of pharmacological targets for novel therapies to prevent, reverse or delay the onset of the complications in diabetes.

Key words: *Diabetes Mellitus, Type II, Oxidative Stress, Mitogen-Activated Protein Kinase, Antioxidants, Signal Transduction*

LITERATURA

1. *Kahn CR.* Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes 1994;43:1066-1084.
2. *Porte Jr D.* Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications. Diabetes Metab Res Rev 2001;17:181-188.
3. *Grodsky GM.* Kinetics of insulin secretion: Underlying metabolic events in diabetes mellitus. In: Le Roith D, Taylor SI, Olefsky ????; 2000.
4. *Bogardus C, Lillioja S, Nyomba BL, Zurlo F, Swinburn B, Esposito-Del Puente A, Knowler WC, Ravussin E, Mott DM, Bennett PH.* Distribution of in vivo insulin action in Pima Indians as mixture of three normal distributions. Diabetes 1989;38:1423-1432.
5. *Reaven GM, Hollenbeck CB, Chen ID.* Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. Diabetologia 1989;32:52-55.
6. *Brownlee M.* Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 2001;414:813-820.
7. *Wolff SP, Dean RT.* Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. Biochem J 1987;245:243-250.
8. *Wojtczak L, Schonfeld P.* Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. Biochim Biophys Acta 1993;1183:41-57.
9. *Brownlee M.* Negative consequences of glycation. Metabolism 2000;49:9-13.
10. *Culotta VC.* Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. Curr Top Cell Regul 2000;36:117-132.
11. *Hartnett ME, Stratton RD, Browne RW, Rosner BA, Lanham RJ, Armstrong D.* Serum markers for oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. Diabetes Care 2000;23:234-240.
12. *Salonen JT, Nyyssonen K, Tuomainen TP, Maenpaa PH, Korpela H, Kaplan GA, Lynch J, Helmrich SP, Salonen R.* Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. BMJ 1995;311:1124-1127.
13. *Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S.* Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. Metabolism 1999;48:1414-1417.
14. *Nadler JL, Natarajan R.* Oxidative stress, inflammation, and diabetic complications. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000;1008-1016.
15. *Tesfamariam B.* Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. Free Radic Biol Med 1994;16:383-391.
16. *Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP.* The role of oxidative stress and NF-κB activation in late diabetic complications. Biofactors 1999;10:157-167.
17. *Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 2000;404:787-790.
18. *Cadenas E, Davies KJ.* Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic Biol Med 2000;29:222-230.
19. *Mercurio F, Manning AM.* NF- κ B as a primary regulator of the stress response. Oncogene 1999;18:6163-6171.
20. *Melov S.* Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. Ann NY Acad Sci 2000;908:219-225.
21. *Lu SC.* Regulation of glutathione synthesis. Curr Top Cell Regul 2000;36:95-116.
22. *Biewenga GP, Haenen GR, Bast A.* The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. Gen Pharmacol 1997;29:315-331.
23. *Karin M, Ben Neriah Y.* Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. Annu Rev Immunol 2000;18:621-663.
24. *DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M.* A cytokine -responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. Nature 1997;388:548-554.
25. *Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB.* The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase Nature 1998;396:77-80.

26. *Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz M, Klevesath MS, Joswig M, Lee V, Morcos M, Tritschler H, Ziegler R, Wahl P, Bierhaus A, Nawroth PP.* Insufficient glycemic control increases nuclear factor- κ B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. Diabetes Care 1998;21:1310-1316.
27. *Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel Khalek AK, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP.* Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B. Diabetologia 1999;42:222-232.
28. *Bursell SE, King GL.* Can protein kinase C inhibition and vitamin E prevent the development of diabetic vascular complications? Diabetes Res Clin Pract 1999;45:169-182.
29. *Packer L, Rosen P, Tritschler H, King GL, Azzi A.* Antioxidants and diabetes management. ed 1. New York: Marcel Dekker, 2000.
30. *Zhang WJ, Frei B.* α-Lipoic acid inhibits TNF-α-induced NF- κB activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. FASEB J 2001;15:2423-2432.
31. *Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000;407:242-248.
32. *Oka S, Kamata H, Kamata K, Yagisawa H, Hirata H.* N-acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B kinases. FEBS Lett 2000;472:196-202.
33. *Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB.* Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. J Immunol 2000;164:6509-6519.
34. *Pan M, Lin-Shiau S, Lin J.* Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of I κ B kinase and NF κ B activation in macrophages. Biochem Pharmacol 2000;60:1665-1676.
35. *Tibbles LA, Woodgett JR.* The stress-activated protein kinase pathways. Cell Mol Life Sci 1999;55:1230-1254.
36. *Basu S, Kolesnick R.* Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. Oncogene 1998;17:3277-3285.
37. *Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP.* AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. Cardiovasc Res 1998;37:586-600.
38. *Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL, Greene DA.* The sorbitol-osmotic and sorbitol-redox hypothesis. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000;972-983.
39. *Singh SB, Malamas MS, Hohman TC, Nilakantan R, Carper DA, Kitchen D.* Molecular modeling of the aldose reductaseinhibitor complex based on the X-ray crystal structure and studies with single-site-directed mutants. J Med Chem 2000;43:1062-1070.
40. *Schleicher ED, WeigertC.* Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. Kidney Int 2000;58(Suppl 77):S13-S18.
41. *Veerababu G, Tang J, Hoffman RT, Daniels MC, Hebert Jr LF, Crook ED, Cooksey RC, McClain DA.* Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. Diabetes 2000;49:2070-2078.
42. *Cohen P.* Dissection of protein kinase cascades that mediate cellular response to cytokines and cellular stress. Adv Pharmacol 1996;36:15-27.
43. *Kyriakis JM, Avruch J.* Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. J Biol Chem 1996;271:24313-24316.
44. *Evans Jl, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.* Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. End. Review 2002;23:599-622.
45. *Yuan M, Lee J, Konstantopoulos N, Hansen L, Shoelson SE.* Salicylate inhibition of IKKß(IκB kinase) reverses insulin resistance in Zucker (fa/fa) rats. Diabetes 2000;49(Suppl 1):A292.
46. *Hundal RS, Mayerson AB, Petersen KF, Rife FS, Randhawa PS, Inzucchi SE, Shoelson SE, Shulman GI.* Potential for a novel class of insulin sensitizing agents by inhibition of IKKßactivity. Diabetes 2001;50(Suppl 2):A117.
47. *Heffetz D, Bushkin I, Dror R, Zick Y.* The insulinomimetic agents H2O2 and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. J Biol Chem 1990;265:2896-2902.
48. *McGarry JD, Dobbins RL.* Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. Diabetologia 1999;42:128-138.
49. *Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA.* Malonyl- CoA, fuel sensing, and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab 1999;39:E1-E18.
50. Ro*den M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI.* Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. J Clin Invest 1996;97:2859-2865.
51. *Seatter MJ, Gould GW.* The mammalian facilitative glucose transporter (GLUT) family. Pharm Biotechnol 1999;12:201-228.
52. *Bedoya FJ, Wilson JM, Ghosh AK, Finegold D, Matschinsky FM.* The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islet tissue. Diabetes 1986;35:61-67.
53. *Wollheim CB.* ß-Cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes. Diabetologia 2000;43:265-277.
54. *Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A.* ß-Cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. Diabetes 2001;50(Suppl 1):S154-S159.
55. *Kajimoto Y, Matsuoka T, Kaneto H, Watada H, Fujitani Y, Kishimoto M, Sakamoto K, Matsuhisa M, Kawamori R, Yamasaki Y, Hori M.* Induction of glycation suppresses glucokinase gene expression in HIT-T15 cells. Diabetologia 1999;42:1417-1424.
56. *Poitout V, Robertson RP.* Minireview: secondary ß-cell failure in type 2 diabetes-a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. Endocrinology 2002;143:339-342.
57. *Zhou YP, Grill V.* Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits ß-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:1584-1590.
58. *Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, Assimacopoulos-Jeannet F.* Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? Diabetes 2001;50:803- 809.

59. *Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M.* Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic ß-cells against glucose toxicity. Diabetes 1999;48:2398 -2406.

60. *Tajiri Y, Moller C, Grill V.* Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits ß-cell function. Endocrinology 1997;138:273-280.

61. *Ho E, Quan N, Tsai YH, Lai W, Bray TM.* Dietary zinc supplementation inhibits NFκB activation and protects against chemically induced diabetes in CD1 mice. Exp Biol Med 2001;226:103-111.