

ÚČINEK ROSIGLITAZONU JE U MODELŮ INZULINOVÉ REZISTENCE A DYSLIPIDÉMIE MODULOVÁN GENETICKÝM POZADÍM

Ondřej Šeda^{1,2}, Ludmila Kazdová², Drahomíra Křenová¹, Vladimír Křen¹

¹Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN, Praha

²Oddělení metabolismu diabetu, Centrum experimentální medicíny, IKEM Praha

Thiazolidindiony (TZD), ligandy nukleárního receptoru PPAR γ , jsou v současné době hojně používány v terapii diabetu 2. typu a inzulinové rezistence. Přesný mechanismus jejich účinku však ještě nebyl objasněn. Ukazuje se, že efekt terapie TZD a výskyt nežádoucích účinků (edémy, obezita, hepatotoxicita) je závislý mj. na genetické „dispozici“ pacienta. Geneticky definované modely mohou právě v takových případech významně pomoci k identifikaci alel těch genů, které se zmíněné interakce účastní. Předmětem této studie bylo zjistit, existuje-li a případně, jak významná je farmakogenetická složka působení dnes široce používaného zástupce TZD (rosiglitazonu) na metabolické parametry a inzulinovou senzitivitu periferních tkání u dvou modelů dyslipidémie a inzulinové rezistence, polydaktylního kmene potkana PD/Cub a kongenního kmene BN.SHR4 a rovněž u „kontrolního“ kmene BN/Cub, který spontánně tyto odchylky metabolismu nevykazuje. Všechny tři kmeny vykazaly značně specifickou reakci na podání rosiglitazonu, shodný účinek byl pozorován jen u čtyřech sledovaných parametrů (snížení sérových koncentrací neesterifikovaných mastných kyselin společně s nezměněnou koncentrací celkového cholesterolu, obsahu cholesterolu v játrech a celkovou tělesnou hmotností). Kmen BN.SHR4 se od ostatních dvou modelů odlišoval v největším množství případů, z čehož je patrné, že geny v diferenciálním úseku chromozomu 4 jsou do této farmakogenetické interakce silně zapojeny, ale rozhodně nejsou jejich jedinými protagonisty. Ačkoli nelze zjištěné vztahy přímo přenášet do oblasti lidské fyziologie, je jasné, že při terapii agonisty nukleárních receptorů obecně bude nezbytné zapojit do terapeutické rozvahy i farmakogenetické aspekty.

Klíčová slova: farmakogenetika, thiazolidindiony, kongenní kmeny, Cd36/Fat.

THE EFFECT OF ROSIGLITAZONE IS MODULATED BY THE GENETIC BACKGROUND IN MODELS OF DYSLIPIDEMIA AND INSULIN RESISTANCE

Thiazolidinediones (TZD), ligands of the nuclear receptor PPAR γ , are currently widely used in therapy of type 2 diabetes and other insulin resistant conditions. The exact mechanism of their action still remains to be elucidated. It is becoming clear that the therapeutic effect of TZD and the occurrence of its side-effects (edema, obesity, hepatotoxicity) is dependent, among others, on the genetic dispositions of a patient. In such cases, the genetically defined models can significantly facilitate the identification of the alleles participating in the described interactions. The aim of this study was to determine if there is a pharmacogenetic component involved in action of a widely used TZD (rosiglitazone) on metabolic parameters and the insulin sensitivity of peripheral tissues using two models of dyslipidemia and insulin resistance, the polydactylous rat strain (PD/Cub) and a congenic rat strain BN.SHR4, as well as the “control” strain BN/Cub, which does not spontaneously show neither of the metabolic disturbances. All three strains displayed specific reactions to rosiglitazone administration, common effects were observed for four parameters only (reduction of non-esterified fatty acid levels, no change in serum and liver cholesterol levels and total body weight). The BN.SHR4 congenic strain showed most cases of unique reaction different from the other two strains, suggesting the genes present in its chromosome 4 differential segment to be substantially involved in the studied pharmacogenetic interaction, but not exclusively. Though it is not possible to translate the ascertained phenomena directly to human physiology, it is clear that pharmacogenetic aspects will have to be an integral part of any therapeutic procedures using nuclear receptor agonists in general.

Key words: pharmacogenetics, thiazolidinediones, congenic strains, Cd36/Fat.

Nesporné úspěchy molekulární biologie a genetiky v podobě identifikace kauzálních mutací u několika set převážně monogenně podmíněných nemocí (většinu lze nalézt ve veřejně přístupné databázi Online Mendelian Inheritance in Man – OMIM) kontrastují jen s mírným pokrokem, pokud jde o genetické determinanty tak prevalentních onemocnění, jakými jsou obezita, hypertenze,

ateroskleróza nebo diabetes mellitus 2. typu. Jednou z příčin tohoto stavu je zřejmě komplexní povaha těchto chorob, na jejichž patogenezi se podílí celá řada vzájemně interagujících genů, které jsou navíc silně ovlivňovány faktory negenetickými, jako jsou např. věk, stres, fyzická aktivita, dieta a v neposlední řadě také medikace. Právě dynamika nástupu pandemie obezity a dal-

ších „civilizačních“ onemocnění již nejen v průmyslově vyspělých zemích naznačuje, že dochází k interakci genetické výbavy současné lidské populace s kvalitativně novými a relativně rychle se měnícími podmínkami „prostředí“. Komplikovanost vztahů mezi jednotlivými komponentami, které se účastní patogenese komplexních metabolických onemocnění je důvodem, proč pro

jejich objasnění jsou velmi často voleny geneticky definované savčí modely, především inbrední kmeny laboratorního potkana a myši, jejichž genomy byly již sekvenovány. Metody komparativní a integrativní genomiky pak umožňují účinněji posoudit relevanci experimentálních výsledků pro patofyziologii lidských onemocnění.

Thiazolidindiony (TZD), ligandy nukleárního receptoru PPAR γ (1, 2), jsou v současné době hojně používány v terapii diabetu 2. typu a inzulínové rezistence (2). Přesný mechanismus jejich účinku však ještě nebyl objasněn. Ukazuje se, že efekt terapie TZD a výskyt nežádoucích účinků (edémy, obezita, hepatotoxicita) je závislý mj. na genetické „dispozici“ pacienta. Geneticky definované modely mohou právě v takových případech významně pomoci k identifikaci alel těch genů, které se zmíněné interakce účastní. Předmětem této studie bylo zjistit, existuje-li a případně jak významná je farmakogenetická složka působení dnes široce používaného zástupce TZD (rosiglitazonu) na dva modely dyslipidémie a inzulínové rezistence, polydaktylní kmen potkana PD/Cub (3) a kongenní kmen BN.SHR4 a rovněž „kontrolní“ kmen BN/Cub (4), který spontánně tyto odchylky metabolismu nevykazuje.

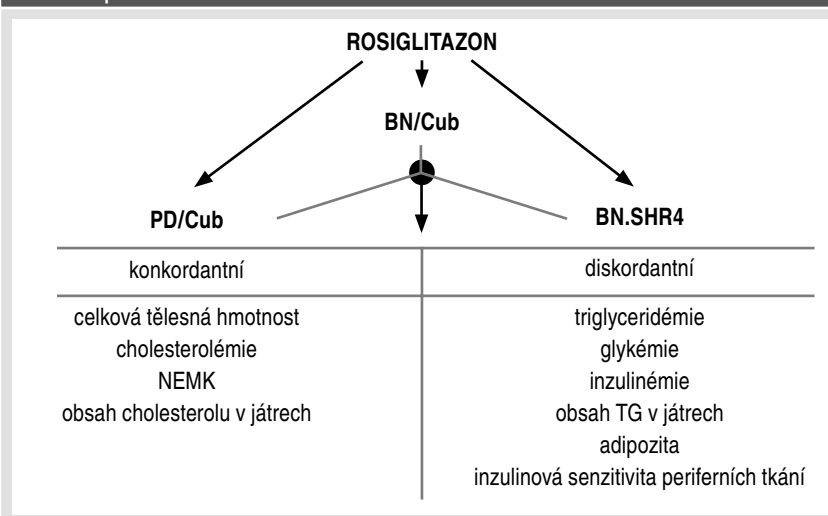
Metody

Experimentální kmeny

Vysoce **inbrední kmen polydaktylního potkana** PD/Cub (identifikační kód Rat Genome Database (RGD ID, <http://rgd.mcw.edu>): 728161) je na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN chován od roku 1969. Je využíván jako model vývoje končetin a teratogeneze (5), rovněž u něj byla zjištěna zvýšená koncentrace triacylglycerolů (6) a v nedávné době byl ustaven jako nový model syndromu inzulínové rezistence (7). Díky specifické reakci na agonisty nukleárních receptorů (fibráty, retinoidy) byl také navržen jako farmakogenetický model pro zkoumání jejich účinků (8). Kmen PD/Cub vykazuje hypertriacylglycerolémii, hyperinzulinémii, zvýšenou hmotnost epididymálního tukového tělesa (marker obezity centrálního typu), zvýšenou koncentraci nenasycených mastných kyselin a výraznou inzulínovou rezistenci; v mnohých parametrech tento kmen vykazuje výraznější odchylky metabolismu sacharidů a lipidů než kmen spontánně hypertenzního potkana (SHR), který je celosvětově nejčastěji užívaným modelem primární hypertenze a dalších atributů metabolického syndromu (7).

Inbrední kmen **Brown Norway (BN/Cub**, RGD ID: 737899). Jedná se o kmen, který je normotriacylglycerolemický a normotenzní a bývá používán jako kmen kontrolní ve stu-

Obrázek 1. Přehled parametrů, které byly kvalitativně stejně (konkordantní) a různé (diskordantní) ovlivněny rosiglitazonem u všech tří modelových kmenů. NEMK – neesterifikované mastné kyseliny, TG – triglyceridy. Adiposita – zahrnuje dva nezávislé diskordantní znaky – relativní hmotnost epididymálního a retroperitoneálního tukového tělesa. Inzulínová senzitivita periferních tkání – viz text



diích zabývajících se metabolickým syndromem. Není bez zajímavosti, že právě genom tohoto kmene byl sekvenován, jak vyplývá z velmi recentní (1. dubna 2004) publikace v Nature (9).

Kongenní kmen BN.SHR-II6/Cd36 (BN.SHR4, RGD ID:728142) byl vytvořen vnesením segmentu chromozomu 4 SHR původu na genetické pozadí kmene BN/Cub (10). Součástí tohoto segmentu je i defektní gen pro translokázu mastných kyselin Cd36/Fat, který se zásadním způsobem podílí na metabolických poruchách popsanych u kmene SHR (11, 12).

Protokol

Všechny experimenty byly prováděny v souladu s platnou legislativou o ochraně zvířat proti týrání. Dospělým samcům kmenů PD/Cub (n=15), BN.SHR4 (n=12) a kontrolního kmene BN/Cub (n=10) byla dva týdny podávána dieta s vysokým obsahem sacharózy (70% energetického obsahu). V rámci jednoho kmene byly od počátku vytvořeny dvě skupiny – kontrolní (pouze dieta) a experimentální, které byl zároveň podáván rosiglitazon (Avandia, 0,4 mg/100 g tělesné hmotnosti), jak bylo popsáno dříve (3, 4).

Metabolická stanovení

Orální glukózový toleranční test (OGTT) byl prováděn u potkanů po celonočním lačnění. Krev pro stanovení glykémie v průběhu testu byla odebírána z ocasní žíly potkanů v době podání glukózy (3 g/kg tělesné hmotnosti, 30% vodný roztok) intragastrickou sondou a poté po 30, 60 a 120 minutách od doby podání. Pro stanovení glykémie, stejně jako koncentrace sérových triacylglycerolů a cholesterolu, byly použity komerčně dostupné kity (Lachema,

Brno, ČR). Koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) v séru byla určena pomocí kolorimetrického kitu na bázi acyl-CoA oxidázy (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, SRN). Sérové koncentrace inzulínu byly stanoveny pomocí radioimunoeseje (RIA kit Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Little Chalfont, England).

Měření citlivosti periferních tkání na inzulín

Pro přímé zjištění citlivosti tkání k účinku inzulínu jsme použili následující in vitro metody: inkorporaci radioaktivně značené glukózy (14C-U glukóza) do glykogenu, resp. CO₂ v příčně pruhovaném svalu (musculus soleus) a do celkových lipidů epididymálního tukového tělesa (vždy s anebo bez přidání inzulínu do media) – metody dále v textu označované jako glykogeneze, oxidace glukózy a lipogeneze (13, 14).

Po dekapitaci byl musculus soleus připevněn k nerezovému rámečku a in situ byl separován od ostatních svalů a pojivové tkáně a okamžitě byl inkubován (v zachované in vivo délce) v Krebs-Ringerově bikarbonátovém pufru (37 °C, plynná fáze 95 % O₂ + 5% CO₂, pH=7,4), který obsahoval 5,5 mM neznačené glukózy, 0,1 μCi/ml 14C-U glukózy a 3 mg/ml BSA (Armour, Fraction V) s anebo bez 250 μU/ml inzulínu. Po dvouhodinové inkubaci bylo do centrálního kompartmentu inkubační nádoby injikováno 0,3 ml jednomolárního hydroxidu hyaminu a 0,5 ml 1M H₂SO₄ do hlavního kompartmentu, aby došlo k uvolnění CO₂. Nádoby byly inkubovány dalších 30 minut, poté byl hydroxid hyaminu kvantitativně přenesen do scintilační zkumavky, která obsahovala 10 ml scintilační tekutiny na bázi toluenu a byla provedena kvantifikace radioaktivního záření.

Tabulka 1. Srovnání metabolických a morfometrických parametrů experimentálních skupin. Výsledky dvoucestné analýzy rozptylu (hodnoty p) jsou uvedeny pro faktory KMEN (BN/Cub, PD/Cub a BN.SHR4), DIETA (sacharóza, sacharóza + rosiglitazon) a pro interakci obou faktorů. OGTT...orální glukózový toleranční test, AUC...plocha pod křivkou, NEMK...neesterifikované mastné kyseliny, n. s.... nesignifikantní. Parametry označené jako lipogeneze, glykogeneze a oxidace glukózy jsou podrobně popsány v textu

měřený parametr	faktor KMEN	faktor DIETA	interakce K * D
celková tělesná hmotnost	0,01	n. s.	n. s.
triglyceridy – syté, výchozí	< 0,0001	n. s.	n. s.
triglyceridy – nalačno	< 0,0001	0,0038	< 0,0001
triglyceridy – syté	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
cholesterol	n. s.	n. s.	n. s.
OGTT 0 min. – glukóza	0,027	0,029	n. s.
OGTT 30 min. – glukóza	0,0074	n. s.	0,016
OGTT 60 min. – glukóza	0,0015	0,0002	n. s.
OGTT 120 min. – glukóza	n. s.	0,01	n. s.
OGTT – AUC	0,0004	0,0068	0,034
inzulin	< 0 0001	0,0001	0,0004
NEMK – výchozí	0,0003	n. s.	n. s.
NEMK	< 0,0001	0,002	n. s.
epididymální tuk /100 g	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
retroperitoneální tuk /100 g	< 0,0001	n. s.	n. s.
játra /100 g	< 0,0001	n. s.	0,0003
cholesterol v játrech	n. s.	n. s.	n. s.
triglyceridy v játrech	< 0,0001	< 0,0001	0,0006
lipogeneze – inzulin 0	< 0,0001	0,0268	0,0019
lipogeneze – inzulin 250	< 0,0001	n. s.	0,0028
glykogeneze – inzulin 0	n. s.	0,0023	n. s.
glykogeneze – inzulin 250	0,042	0,0024	n. s.
oxidace glukózy – inzulin 0	0,0027	n. s.	n. s.
oxidace glukózy – inzulin 250	< 0,0001	0,038	n. s.

Tabulka 2. Efekt podání rosiglitazonu na diskordantní metabolické a morfometrické parametry experimentálních skupin jednotlivých kmenů. Vyznačena je změna parametru v procentech oproti kontrolní skupině, pokud byl mezi nimi zjištěn signifikantní rozdíl při post-hoc testu analýzy rozptylu. OGTT...orální glukózový toleranční test, AUC...plocha pod křivkou, NEMK...neesterifikované mastné kyseliny, inzulin 0 / inzulin 250...inkubace tkáně s anebo bez 250 µU/ml inzulinu; n. s.... nesignifikantní změna (= žádný efekt rosiglitazonu). Parametry označené jako lipogeneze, glykogeneze a oxidace glukózy jsou podrobně popsány v textu

měřený parametr	PD/Cub změna (%)	BN/Cub změna (%)	BN.SHR4 změna (%)
triacylglyceroly – nalačno	- 49,4	n. s.	n. s.
triacylglyceroly – syté	- 44,3	- 37,9	n. s.
glykémie – nalačno	n. s.	n. s.	+ 13,7
OGTT – AUC	n.s.	- 11,1	n. s.
inzulin	- 42,8	n. s.	n. s.
epididymální tuk /100 g	+ 44,1	+ 18,7	n. s.
retroperitoneální tuk /100 g	+ 9,4	n. s.	n. s.
játra /100 g	+ 13,9	n. s.	- 10,0
triacylglyceroly v játrech	- 46,5	n. s.	- 25,8
lipogeneze – inzulin 0	n. s.	n. s.	- 38,1
lipogeneze – inzulin 250	+ 73,7	+ 81,2	- 21,1
glykogeneze – inzulin 0	+ 96,6	n. s.	n. s.
glykogeneze – inzulin 250	+ 55,5	n. s.	n. s.
oxidace glukózy – inzulin 250	n. s.	n. s.	+ 21,4

Metoda pro stanovení lipogeneze je obdobná a je podrobně popsána v publikovaných sděleních (7).

Statistické hodnocení výsledků

Pro srovnání parametrů u třech experimentálních kmenů jsme použili dvoucestnou

analýzu rozptylu (ANOVA) s hlavními faktory KMEN a DIETA. Pro porovnávání mezi dvěma skupinami ze souboru bylo použito Tukeyho post-hoc testu. Tato metoda snižuje pravděpodobnost chyby prvního druhu oproti opakovanému porovnávání významností pomocí dvouvýběrových t-testů. Za signifikantní byl považován takový rozdíl, kde pravděpodobnost neoprávněného zamítnutí nulové hypotézy byla menší než 0,05, tedy $p < 0,05$.

Výsledky

Porovnání účinku rosiglitazonu jako zástupce thiazolidindionů u tří geneticky a fenotypicky definovaných kmenů laboratorního potkana přineslo následující výsledky: stanovené metabolické parametry bylo možné podle charakteru a statistické významnosti rozdílu mezi kontrolními skupinami a skupinami, kterým byl RSG podáván rozdělit na:

- konkordantní**, kde se pozorovaný efekt nelišil mezi kmeny
- diskordantní**, kde došlo ke kmenově specifickému působení RSG.

Tyto výsledky jsou shrnuty v tabulce 2.

Poněkud překvapivě došlo pouze u čtyř parametrů k shodné reakci na podání RSG u všech kmenů – jednalo se o snížení sérových koncentrací NEMK společně s nezměněnou koncentrací celkového cholesterolu, obsahu cholesterolu v játrech a celkovou tělesnou hmotnost. Naproti tomu např. relativní hmotnost epididymálního tukového tělesa, která je pokládána za míru viscerální obezity, došlo k jasné, kmenově specifické reakci – na jedné straně očekávané vyšší hodnoty u experimentálních skupin kmenů BN/Cub ($0,94 \pm 0,04$ vs. $1,16 \pm 0,05$) a PD/Cub ($1,28 \pm 0,03$ vs. $1,85 \pm 0,07$), na straně druhé žádný efekt u kongenního kmene BN.SHR4. Zajímavý jev bylo možné pozorovat pro triacylglyceroly, kde pouze u kmene PD/Cub došlo k výraznému snížení jejich koncentrací nalačno u skupiny, které byl podáván RSG ($3,78 \pm 0,31$ vs. $1,90 \pm 0,09$ mmol/l), ale sytá triacylglycerolemie (TG) byla po RSG nižší i u BN/Cub ($1,95 \pm 0,06$ vs. $1,21 \pm 0,05$ mmol/l) a opět pouze kmen BN.SHR4 nereagoval na tuto farmakologickou intervenci, spíše byl pozorovatelný trend k mírnému zvýšení TG (např. pro lačné TG $1,00 \pm 0,08$ vs. $1,23 \pm 0,16$ mmol/l). Výhradně u kmene PD/Cub jsme pozorovali snížení inzulinémie rosiglitazonem ($1,10 \pm 0,08$ vs. $0,63 \pm 0,02$ pmol/l, $p < 0,0001$). Kromě relativní hmotnosti jater, která se signifikantně snížila po RSG u PD/Cub ($3,41 \pm 0,08$ vs. $3,00 \pm 0,08$), nezměnila se u BN/Cub ($2,64 \pm 0,08$ vs. $2,70 \pm 0,02$) a zvýšila se u BN.SHR4 ($2,68 \pm 0,01$ vs. $2,95 \pm 0,04$), bylo

tedy možné v souboru diskordantních parametrů vždy odlišit jeden kmen, který nesdílel reakci dvou kmenů ostatních, a stanovit tak farmakogenetický profil obou modelů inzulinové rezistence a dyslipidémie ve vztahu k působení rosiglitazonu (tabulka 2).

Diskuze

Jedním z účinků látek thiazolidindionové skupiny pozorovaných u experimentálních modelů i klinických studií je úprava citlivosti tkání k účinku inzulinu a zlepšení lipidového profilu, mnohdy na úkor vzrůstající adipozity. Ukazuje se, že konkrétní účinek TZD na metabolické parametry je značně závislý na genetickém pozadí (alelické kombinaci), na kterém se realizuje. To potvrzují i zde prezentované výsledky odlišného účinku rosiglitazonu u tří geneticky definovaných modelů. Jedinečnou reakci, a to především ve smyslu chybění „klasických“ účinků podávání TZD (zlepšení tolerance glukózy, nárůst adiposity), vykázal především kongenní kmen BN.SHR4, který nese mutovaný gen **Cd36/Fat**. Tato zjištění jsou v souladu s identifikací **Cd36/Fat** jako klíčového zprostředkovatele metabolických účinků pioglitazonu (15) a rolí **Cd36/Fat** coby transportéru NEMK v tukové a svalové tkáni. Defekt **Cd36/Fat** tak pravděpodobně zapříčinil sníženou schopnost transportu NEMK do adipocytů (a jejich následnou inkorporaci do triacylglycerolů). V oxidativním příčně pružovaném svalu jsme pozorovali signifikantně vyšší absolutní objem utilizace glukózy, což odpovídá posunu k využívání tohoto energetického substrátu místo NEMK (stejně jako např. u **Cd36/Fat** „knock-out“ myši (16)). Většina NEMK byla tak zřejmě metabolizována v játrech kroky nezávislými na **Cd36/Fat**, tedy zvýšením jaterního výdeje glukózy a na triacylglyceroly bohatých částic VLDL. Výskyt defektu **CD36** je popsán u populací se zvýšenou

frekvencí diabetu 2. typu a některé mutace tohoto genu jsou asociovány s autozomálně dominantním diabetem a inzulinovou rezistencí (17). Je tedy možné (ač nelze přímo extrapolovat výsledky této studie na lidskou populaci), že u takových pacientů léčených TZD by mohlo docházet k obdobné farmakogenetické interakci.

Závěr

Výrazně odlišné působení rosiglitazonu na metabolické parametry tří geneticky definovaných experimentálních kmenů labo-

ratorního potkana ukazuje na přítomnost farmakogenetické interakce tohoto antidiabetika s jedinečným souborem genů a jejich variant (genetickým pozadím), v rámci něhož působí. Ze shrnutí dosažených výsledků je patrné, že geny v diferenciálním úseku chromozomu 4 kongenního kmene BN.SHR4 (včetně **Cd36/Fat**) jsou do této interakce silně zapojeny, ale rozhodně nejsou jejími jedinými protagonisty.

Poděkování:

Tato práce byla podpořena následujícími granty: GAČR 301/04/0248, IGA MZ NB/6961-3, GAAV ČR B5105401.

Literatura

1. Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest* 2000; 106: 467–472.
2. Šeda O, Šedová L. PPARs: molecular targets in the pharmacogenomics era. *Prague Medical Report* 2004 (v tisku).
3. Šeda O, Kazdová L, Křenová D, Křen V. Rosiglitazone improves insulin resistance, lipid profile and promotes adiposity in genetic model of metabolic syndrome X. *Folia Biol (Praha)* 2002; 48: 237–241.
4. Šeda O, Kazdová L, Křenová D, Křen V. Rosiglitazone fails to improve hypertriglyceridemia and glucose tolerance in CD36-deficient BN.SHR4 congenic rat strain. *Physiol Genomics* 2003; 12: 73–78.
5. Křen V. Genetics of the polydactyly-luxate syndrome in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Univ Carol Med Praha (Monogr.)* 1975; 68: 1–103.
6. Vrána A, Kazdová L, Dobešová Z, Kuneš J, Křen V, Bílá V, Štolba P, Klimeš I. Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains Effects of dietary carbohydrates. *Ann NY Acad Sci* 1993; 683: 57–68.
7. Šedová L, Kazdová L, Šeda O, Křenová D, Křen V. Rat inbred PD/Cub strain as a model of dyslipidemia and insulin resistance. *Folia Biol (Praha)* 2000; 46: 99–106.
8. Šedová L, Šeda O, Křenová D, Křen V, Kazdová L. Isotretinoin and fenofibrate induce adiposity with distinct effect on metabolic profile in a rat model of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 719–725.
9. Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution *Nature* 2004; 428: 493–521.
10. Šeda O, Šedová L, Kazdová L, Křenová D, Křen V. Metabolic characterization of insulin resistance syndrome feature loci in three Brown Norway-derived congenic strains. *Folia Biol (Praha)* 2002; 48: 81–88.
11. Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, StLezin E, Kurtz TW, Křen V, Pravenec M, Ibrahim A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J. Identification of Cd36 (FAT) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 1999; 21: 76–83.
12. Pravenec M, Landa V, Zidek V, Musilová A, Křen V, Kazdová L, Aitman TJ, Glazier AM, Ibrahim A, Abumrad NA, Qi N, Wang J, StLezin E, Kurtz TW. Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat Genet* 2001; 27: 156–8.
13. Vrána A, Poledne R, Fábry P, Kazdová L. Palmitate and glucose oxidation by diaphragm of rats with fructose-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism* 1978; 27: 885–888.
14. Vrána A, Kazdová L. Insulin sensitivity or rat adipose tissue and of diaphragm in vitro: Effect of the type of dietary carbohydrate. *Life Science* 1970; 9: 257–265.
15. Qi N, Kazdová L, Zidek V, Landa V, Křen V, Pershadsingh HA, Lezin ES, Abumrad NA, Pravenec M, Kurtz TW. Pharmacogenetic evidence that cd36 is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone. *J Biol Chem* 2002; 277: 48501–48507.
16. Hajri T, Han XX, Bonen A, Abumrad NA. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *J Clin Invest* 2002; 109: 1381–1389.
17. Lepretre F, Vasseur F, Vaxillaire M, Scherer PE, Ali S, Linton K, Aitman T, Froguel P. A CD36 nonsense mutation associated with insulin resistance and familial type 2 diabetes. *Hum Mutat* 2004; 24: 104.