

INSULINOOPORNOŚĆ KOMÓRKI WĄTROBOWEJ

Człowiek i Zdrowie Nr 1 (V) 2011, s. 113-119

^{1,2}Jadwiga Daniluk, ^{1,2}Agnieszka Zwolak, ¹Iwona Jastrzębska, ¹Katarzyna Sawicka,
¹Michał Szczurek

¹ Uniwersytet Medyczny w Lublinie

² Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej

Streszczenie: Insulinooporność oznacza upośledzoną wrażliwość tkanek na insulinę, najczęściej związaną z defektem insulinowego szlaku przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego. Insulinooporność hepatocytów manifestuje się przede wszystkim niekontrolowaną produkcją i uwalnianiem glukozy z wątroby, czego skutkiem jest hiperglikemia. Prowadzi do zaburzeń metabolicznych, zwłaszcza dotyczących gospodarki węglowodanowej, jak również lipidowej prowadząc do nadmiernej akumulacji lipidów w wątrobie. Wewnątrzkomórkowy nadmiar lipidów estyfikowany jest przede wszystkim do triacylogliceroli (TAG), diacylogliceroli (DAG) i ceramidów (CER), które w sposób bezpośredni interferują z insulinowym szlakiem przekazywania sygnału, nasilając insulinooporność hepatocytów. Wzrost zawartości diacylogliceroli wewnątrz hepatocytów powoduje wzmożenie aktywności kinazy białkowej C (PKC), a nadmierna akumulacja ceramidów może być przyczyną inaktywacji kinazy białkowej B (PKB), czego skutkiem jest fosforylacja i dezaktywacja substratu receptora insulinowego (IRS-1), co prowadzi do zmniejszenia translokacji transporterów dla glukozy do błony komórkowej (GLUT-2). Znaczenie insulinooporności hepatocytów przede wszystkim objawia się rozwojem zespołu metabolicznego, wzrostem ryzyka sercowo-naczyniowego i przewlekłym procesem zapalnym i nowotworzeniem.

Słowa kluczowe: insulinooporność, hepatocyty, NAFLD (niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby) wolne kwasy tłuszczowe, ceramidy, diacyloglicerole, triacyloglicerole

Pojęcie insulinooporności

Insulina jest głównym hormonem pełniącym funkcje anaboliczne w organizmie człowieka, syntetyzowanym i wydzielanym przez komórki beta wysp trzustkowych. Jej rola polega również na utrzymaniu homeostazy gospodarki węglowodanowej, lipidowej i białkowej organizmu. Podstawowym jej zadaniem jest indukcja przemieszczania przekaźników glukozy do błony komórkowej, zwiększona błonowa ekspresja białkowych przekaźników glukozy oraz pobudzanie transportu glukozy do wnętrza komórki, co zmniejsza jej stężenie we krwi. Oprócz wpływu na dokomórkowy transport glukozy insulina nasila także jej wewnątrzkomórkowy metabolizm, zwiększając aktywność enzymów biorących udział w glikolizie i glikogenogenezie. Insulina wywiera również wpływ na gospodarkę lipidową organizmu, która wyraża się nasileniem lipogenezy i hamowaniem lipolizy, głównie poprzez zmniejszenie aktywności wrażliwej na insulinę lipazy (HSL - hormone sensitive lipase) w tkance tłuszczowej. Jako hormon anaboliczny insulina pobudza syntezę i hamuje degradację białek oraz zwiększa wychwyt aminokwasów przez mięśnie (Itani i in., 2002). Tym nie mniej, działanie insuliny, która spełnia tak wiele istotnych funkcji w organizmie, jest często zaburzone. Najczęściej defekt dotyczy zaburzenia jej działania, ale może także dochodzić do spadku sekrecji insuliny lub nieprawidłowej jej budowy. Upośledzenie działania insuliny najczęściej związane jest z uszkodzeniem jej receptora komórkowego i następczą niewrażliwością tkanek obwodowych na insulinę i jest określane mianem insulinooporności. Zaburzenie to ma miejsce, gdy prawidłowo zbudowana insulina i prawidłowe jej ilości nie aktywują poprawnie szlaku wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału (Eckel i in., 2005). Konsekwencje insulinooporności zależą od lokalizacji tkankowej defektu działania insuliny. W przypadku insulinooporności obwodowej dotyczącej mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego i tkanki tłuszczowej transport glukozy z krwi do mięśni szkieletowych zostaje zredukowany, prowadząc do hiperglikemii. Natomiast głównym efektem insulinooporności hepatocytów jest niekontrolowana produkcja i uwalnianie glukozy z wątroby, co w efekcie także prowadzi do hiperglikemii. Podstawowe metody oceny insulinooporności polegają na równoczesnych pomiarach stężeń glukozy i insuliny w surowicy. Za "złoty standard" oceny insulinooporności uważa się klamrę metaboliczną (euglikemiczną). Metoda ta, mimo iż jest stosunkowo precyzyjna, jest droga, pracochłonna i obciążająca chorego długotrwałymi dożylnymi wlewami glukozy i insuliny, dlatego też przydatność tej metody w praktyce klinicznej jest ograniczona. Najczęściej stosowany, zarówno w praktyce klinicznej jak i w badaniach epidemiologicznych, jest

matematyczny model oceny insulinooporności (HOMA- homeostatic model assessment). W modelu tym na podstawie stężeń glukozy i insuliny na czczo, w warunkach podstawowych oblicza się współczynnik insulinooporności. Wartość tego współczynnika w warunkach fizjologicznych wynosi 1, natomiast wyższe wartości przemawiają za insulinoopornością. HOMA jest indeksem, który znalazł zastosowanie w ocenie insulinooporności tkanek obwodowych (McAuley i in., 2001). Z kolei pomiar insulinooporności wątrobowej wymaga zastosowania glukozy znakowanej izotopem promieniotwórczym i nie jest stosowany w praktyce klinicznej (Belfort i in., 2006). W badaniu tym zostaje zobrazony wątrobowy wychwyt glukozy w odpowiedzi na podanie insuliny. U osób z insulinoopornością, stymulowany insuliną wychwyt glukozy przez hepatocyty jest zmniejszony w porównaniu z osobami zdrowymi. Natomiast w badaniach prowadzonych na modelach zwierzęcych, insulinooporność mięśni szkieletowych niejednokrotnie oceniana jest na podstawie stymulowanej insuliną translokacji GLUT-4 (białkowych transporterów glukozy) do błony komórkowej. W stanach insulinooporności następuje hamowanie translokacji transporterów glukozy do błony komórkowej, powodując tym samym spadek stymulowanego insuliną transportu dokomórkowego glukozy (Govers i in., 2004).

Insulinooporność hepatocytów

Znaczącą rolę w regulacji gospodarki energetycznej organizmu odgrywa wątroba, która jest narządem wrażliwym na działanie insuliny. Do rozwoju insulinooporności wątrobowej prowadzą zaburzenia w funkcjonowaniu ścieżki sygnałowej insuliny, co w następstwie wiąże się z uszkodzeniem czynności metaboliczno-detoksykacyjnej tego narządu (Sanyal 2003). Głównym i najważniejszym powikłaniem insulinooporności hepatocytów jest stłuszczenie wątroby, określane mianem niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD- nonalcoholic fatty liver disease). Stłuszczenie niealkoholowe wątroby to nagromadzenie substancji tłuszczowych w cytoplazmie ponad 5% hepatocytów, lub w ilości przekraczającej 5-10% masy narządu u osób, które nie nadużywają alkoholu. Istnieją dowody, iż NAFLD może prowadzić do niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH-nonalcoholic steatohepatitis), marskości i raka wątroby (Day 2002). Wciąż niejasny jest patomechanizm insulinooporności hepatocytów (Diraison i in., 2003). Niektóre badania wskazują, iż insulinooporność może być czynnikiem inicjującym akumulację lipidów i rozwój zmian stłuszczeniowych w przebiegu NAFLD. Insulinooporność jest niejednokrotnie przyczyną nadmiernego gromadzenia lipidów nie tylko w wątrobie, ale również w mięśniach szkieletowych i kardiomiocytach (Unger 2003). W stanach insulinooporności następuje zmniejszone hamowanie przez insulinę hormonowrażliwej lipazy lipoproteinowej (HSL), co powoduje zwiększone uwalnianie WKT z tkanki tłuszczowej do krwi i ich zwiększony napływ do wątroby. Z kolei w wątrobie wzrasta również lipogeneza de novo kwasów tłuszczowych. W efekcie rośnie napływ WKT do hepatocytów, co powoduje przewagę estryfikacji lipidów nad ich oksydacją. Doprowadza to do wzrostu wytwarzania i gromadzenia triacylogliceroli (TAG) w wątrobie, które są zużywane do syntezy lipoprotein (głównie VLDL). Ostatecznie następuje wzrost stężenia TAG w osoczu (Gibbons i in., 2002). Nagromadzone wewnątrzkomórkowe lipidy u chorych z NAFLD, ulegając peroksydacji, nasilają stres oksydacyjny, co doprowadza do martwicy hepatocytów. Uwolnione z uszkodzonych hepatocytów peroksydowane lipidy, indukują stan zapalny i uszkodzenia żył wątrobowych.

Insulinooporność ściśle wiąże się ze stłuszczeniem wątroby, określanym mianem niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD, ang. nonalcoholic fatty liver disease). Stłuszczenie wątroby to nagromadzenie substancji tłuszczowych w cytoplazmie ponad 5% hepatocytów, lub w ilości przekraczającej 5-10% masy narządu u osób, które nie spożywają znaczących ilości alkoholu (140 g etanolu/tydzień w przypadku mężczyzn i 70 g etanolu/tydzień w przypadku kobiet). W NAFLD, podobnie jak w NASH (niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby) ma ono charakter wielokropelkowy, a zasadniczym składnikiem gromadzonym w cytoplazmie hepatocytów są TG. Patogeneza stłuszczenia wciąż nie jest do końca jasna. Aktualny stan wiedzy wskazuje, że do kluczową rolę odgrywają: stres oksydacyjny, obwodowa insulinooporność hiperinsulinemia, nadmierna lipoliza obwodowa, wzmożony dowątrobowy transport lipidów oraz upośledzona beta-oksydacja lipidów w mitochondriach i gromadzenie TG w cytoplazmie komórek. Szczególną uwagę zwraca się na zwiększenie ekspresji cytochromu P450 2E1 (CYP E1), co jest przyczyną powstawania reaktywnych metabolitów tlenu uszkadzających błony komórkowe i prowadzących do rozwoju reakcji zapalnej (Marchesini i in., 2001). Wolne rodniki tlenowe powodują peroksydację lipidów, co najprawdopodobniej stanowi podstawowy mechanizm powstawania NASH, z konsekwencjami w postaci stanu zapalnego oraz włóknienia. Ostatnie badania wskazują, że to właśnie insulinooporność stanowi jeden z kluczowych czynników patogenetycznych NASH, a hiperinsulinemia w tym zespole wynika nie z upośledzenia degradacji insuliny, a z jej zwiększonej sekrecji (Chitturi i in., 2002).

Patogeneza insulinooporności hepatocytów

Poznanie molekularnego mechanizmu zaburzeń w ścieżce sygnałowej insuliny prowadzących do rozwoju insulinooporności jest niezbędne do zrozumienia i wyjaśnienia etiopatogenezy opisanych wcześniej chorób wątroby. Receptor insulinowy jest glikoproteiną, składającą się z dwóch podjednostek α i dwóch podjednostek β i należy do rodziny receptorów posiadających aktywność kinazy tyrozynowej. Obie podjednostki α występują na zewnątrz błony komórkowej i połączone są ze sobą mostkami dwusiarczkowymi oraz łączą się w ten sam sposób z zewnątrz błonową częścią podjednostek β (White, Kahn 1994). Insulina wiążąc się ze specyficznym regionem podjednostki α prowadzi do zmian w konfiguracji receptora i powoduje autofosforylację reszt tyrozyny w wewnątrzkomórkowej części podjednostki β (Lee i in., 1997). Zmiany te powodują aktywację receptora insuliny i fosforylację reszt tyrozyny w białkach substratowych, biorących udział w dalszym przekazywaniu sygnału insuliny. Białek substratowych receptora insulinowego jest około 10, a należą do nich między innymi proteiny określane jako substraty receptora insuliny (IRS 1-4 - insulin receptor substrate) z których najważniejsze są IRS-1 i IRS-2 (Virkamaki i in., 1999). Aktywacja IRS poprzez fosforylację reszt tyrozyny pobudza dwa najważniejsze szlaki sygnalizacji insuliny związane z 3-kinazą fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz białkową kinazę aktywowaną mitogenami (MAPK). Kaskada MAPK pośredniczy w przekazywaniu sygnału mitogenowego do jądra komórkowego (procesy wzrostu, różnicowania i proliferacji komórek), natomiast w metaboliczną odpowiedź na insulinę zaangażowana jest PI3K (Antonetti i in., 1996; Skolnik i in., 1993; Virkamaki i in., 1999). Tym nie mniej, prawdopodobnie oba te szlaki mogą być wzajemnie powiązane (Kuper i in., 2000). W skład PI3K wchodzi podjednostka regulacyjna, odpowiedzialna za połączenie PI3K z cząstkami IRS, oraz podjednostka katalityczna, aktywująca fosforylację fosfatydyloinozytolu błon komórkowych. Reakcja ta prowadzi do fosforylacji i aktywacji białkowej kinazy B (PKB), określanej również jako białko Akt (Li i in., 2005). Aktywność PKB reguluje translokację insulino-wrażliwego transportera glukozy (GLUT-2) z cytoplazmy do błony komórkowej hepatocytów, który odgrywa kluczową rolę w transporcie glukozy do wnętrza komórek wątroby. Do pobudzenia translokacji GLUT-2 może również dojść za pośrednictwem aktywowanych przez PI3K izoform białkowej kinazy C (PKC) (Etgan i in., 1999; Klip, Paquet 1990). Mechanizm wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału insulinowego jest bardzo skomplikowany i podlega precyzyjnej regulacji, zaś upośledzenie jednego z elementów w całym szlaku transmisji sygnału komórkowego może stanowić molekularne podłoże insulinooporności. Ogniwnem patogenetycznym może więc być nieprawidłowa produkcja insuliny, zmiany w receptorach insulinowych i ich substratach, a szczególnie defekty w sygnalizacji postreceptorowej (Chang i in., 2004; Le Roith, Zick 2001). Proteiny które biorą udział w ścieżce sygnałowej insuliny mogą ulec potranslacyjnym modyfikacjom w wyniku czego zmieniona jest ich aktywność. Najczęściej zmiany obejmują zmniejszenie stymulowanej przez insulinę fosforylacji tyrozyny w IRS-1 oraz zaburzenie łączenia IRS-1 z PI3K (Krook i in., 2000). Fosforylacja reszt seryny w IRS-1 upośledza stymulowaną przez insulinę fosforylację tyrozyny w IRS-1 (Paz i in., 1997). Nieaktywny IRS-1 nie jest w stanie uczestniczyć w dalszych mechanizmach sygnalizacyjnych insuliny w komórkach (Kanety i in., 1995). Jednym z czynników powodujących fosforylację seryny/treoniny w IRS-1 i w ten sposób hamujących aktywność kinaz tyrozynowych receptora insulinowego jest TNF- α (Hotamisligil i in., 1996). Czynniki martwicy nowotworów (TNF- α - tumor necrosis factor alpha) hamuje ścieżkę sygnałową insuliny w wątrobie również poprzez aktywację kinaz serynowych takich jak JNK-1 (Jun N-Terminal Kinase-1) (Kanety i in., 1995). TNF- α powoduje także utrzymanie kinaz białkowych B w nieaktywnym, defosforylowanym stanie oraz prowadzi do zwiększenia stężenia triacylogliceroli w hepatocytach poprzez wywieranie wpływu zarówno na adipocyty jak i na komórki wątrobowe (Teruel i in., 2001). TNF- α hamując lipazę stymuluje lipolizę w tkance tłuszczowej, w efekcie czego wzrasta stężenie osoczowych wolnych kwasów tłuszczowych, co ostatecznie powoduje wzrost napływu kwasów tłuszczowych do wątroby i rozwój insulinooporności hepatocytów (Griffin i in., 1999). W badaniach dotyczących wpływu WKT na hepatocyty wykazano, że długołańcuchowe kwasy tłuszczowe hamują translokację i aktywność glukokinazy, która odgrywa kluczową, regulatorową rolę w utrzymaniu odpowiedniego gradientu stężeniowego dla glukozy (Tappy, Minehira 2001). Spadek aktywności glukokinazy prowadzi do wzrostu wolnej glukozy w hepatocytach i w konsekwencji do zmniejszenia wychwytu glukozy przez te komórki (Hue i in., 1988). Ponadto akumulacja WKT w wątrobie indukuje insulino-oporność związaną ze wzrostem translokacji PKC- δ z cytozolu do błony komórkowej hepatocytów, gdyż to w niej obecny jest IRS wykazujący bliskość substratową z PKC. PKC- δ ma zdolność fosforylacji reszt seryny i treoniny w IRS-1, doprowadzając do jego inaktywacji. Tak więc stanom insulinooporności hepatocytów towarzyszy zmniejszenie stymulowanej przez insulinę fosforylacji tyrozyny w IRS-1, spadek aktywności PI3K związanej z IRS-1 a także równoczesny wzrost aktywności PKC- δ (Chin i in., 1993; De Fea, Roth 1997).

Wątrobową insulinooporność jest związana z nadmierną akumulacją nie tylko WKT, ale także długołańcuchowych estrów kwasów tłuszczowych (LCFA-CoA), diacylogliceroli (DAG), triacylogliceroli (TAG) i

ceramidów (CER) (Holland i in., 2007). LCFA-CoA są metabolicznie aktywnymi formami wewnątrzkomórkowych kwasów tłuszczowych, a ich powstawanie katalizowane jest przez syntetazę acylo-CoA. Część LCFA-CoA jest transportowana do mitochondriów, gdzie jest utleniana w procesie β -oksydacji, zaś reszta stanowi substraty do powstawania różnych frakcji lipidowych. Zwiększony napływ WKT do wątroby może prowadzić do zwiększonego stężenia LCFA-CoA wewnątrz hepatocytów. Dotychczas prowadzone badania wykazały, iż zwiększona ilość wewnątrzkomórkowego LCFA-CoA niejednokrotnie jest związana z występowaniem insulinooporności hepatocytów (Chen i in., 1992; Oakes i in., 1997). Wpływ na to zjawisko może mieć fakt, iż w wątrobie długołańcuchowe estry kwasów tłuszczowych modulują aktywność niektórych istotnych metabolicznie enzymów takich jak: syntaza acylo-CoA, glukokinaza, glukozo-6-fosfataza czy też hormonowrażliwa lipaza lipoproteinowa. Ponadto zwiększony wewnątrzkomórkowy poziom LCFA-CoA może interferować z insulinowym szlakiem przekazywania sygnału, poprzez nadmierną aktywację PKC (Orellana i in., 1990). Akumulacja LCFA-CoA może być również pośrednim wskaźnikiem zwiększonego stężenia ceramidów lub diacylogliceroli wewnątrz hepatocytów, gdyż zwiększonemu poziomowi LCFA-CoA zazwyczaj towarzyszy podwyższony poziom CER i DAG (Orellana i in., 1990). Diacyloglicerole powstają głównie poprzez estryfikację dwóch cząsteczek długołańcuchowych estrów kwasów tłuszczowych a reakcja ta jest katalizowana przez fosfatazę fosfatydylową 1 (PAP 1) (Chavez i in., 2003). Z kolei inny enzym - acylotransferaza diacyloglicerolowa (DGAT) katalizuje reakcję formowania triacylogliceroli z diacylogliceroli, które następnie mogą być magazynowane w hepatocytach. Poza tą funkcją DAG odgrywają ważną rolę w biosyntezie glicerofosfolipidów, które są głównym komponentem błon komórkowych (Carrasco, Merida 2007). Ponadto akumulacja DAG jest odpowiedzialna w znacznej mierze za wzmoczoną aktywację PKC (szczególnie PKC- β II i PKC- δ) i następczą insulinooporność (Lam i in., 2002, Seifert i in., 1988). Ceramidy, będące metabolitami kwasów tłuszczowych, mogą wpływać na rozwój insulinooporności, gdyż pełnią rolę w przekazie sygnałów wewnątrzkomórkowych. Dane doświadczalne dotyczące ceramidów wskazują, iż nadmierna ilość CER prawdopodobnie zaburza sygnalizację insuliny głównie na poziomie kinazy białkowej B (PKB). Inaktywacja PKB może odbywać się zarówno poprzez defosforylację tego białka, jak też przez zahamowanie jego translokacji do błony komórkowej. Dalszą konsekwencją działania ceramidu jest zmniejszenie translokacji GLUT-2 do błony komórkowej z jednoczesnym spadkiem transportu glukozy do wnętrza hepatocytów (Lam i in., 2002, Seifert i in., 1988; Summers 2006). Ponadto przypuszcza się, iż ceramidy w hepatocytach mogą jednocześnie inaktywować PKB, jak również aktywować PKC- ζ , która to izoforma odpowiada za zachowanie ścieżki lipogenezy. Kolejnym mechanizmem poprzez który, ceramidy mogą upośledzać działanie insuliny jest zwiększona ekspresja cytokin prozapalnych takich jak TNF- α . Z kolei zwiększone stężenie TNF- α w hepatocytach, szczególnie w stanach otyłości, powoduje wzmocniony metabolizm sfingolipidów, jak również syntezę de novo ceramidów co w konsekwencji powoduje ich nadmierną akumulację w komórce i nasila insulinooporność hepatocytów (Holland, Summers 2008; Meyer, de Groot 2003).

Znaczenie insulinooporności hepatocytów

Metaboliczne powikłania insulinooporności mogą obejmować zarówno zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej, jak i zaburzenia krzepnięcia oraz aktywację stanu zapalnego. W warunkach insulinooporności hepatocytów dochodzi do hamowania między innymi aktywności dwóch enzymów: karboksykinazy fosfoenolopirogronianu (PEPCK) i glukozo-6-fosfatazy (G6Pase), co powoduje osłabienie hamowania wątrobowej produkcji glukozy. Narastanie wątrobowego wytwarzania glukozy prowadzi do hiperglikemii. W wyniku zmniejszonej wrażliwości hepatocytów na insulinę wzrasta także wydzielanie VLDL (very low density lipoproteins – VLDL) przez wątrobę i w efekcie wzrasta stężenie triacylogliceroli w osoczu.

Napływ dużej ilości lipidów (pochodzących z różnych źródeł) do wątroby prowadzi do posttranslacyjnej stabilizacji apolipoproteiny B, głównego składnika białkowego VLDL, której degradacja jest zależna od działania insuliny. Zjawisko to sprzyja biosyntezie VLDL. Insulinooporność wpływa także na osłabienie aktywności enzymatycznej lipazy lipoproteinowej, której działanie determinuje tempo usuwania lipoprotein bogatych w triacyloglicerole. Obserwowane zmniejszone stężenie frakcji lipoprotein HDL i LDL jest konsekwencją zmian w składzie tych lipoprotein i zaburzenia ich prawidłowego metabolizmu. Hipertrójglicerydemia i duże stężenie VLDL stymuluje wymianę estrów cholesterolu i triacylogliceroli między lipoproteinami VLDL a HDL i LDL. Na skutek tego w VLDL zwiększa się ilość estrów cholesterolu, a w HDL i LDL zwiększa się ilość triacylogliceroli. Proces ten prowadzi do powstania cząsteczek HDL i LDL bogatych w TAG (Barter 2005; Eckel i in., 2005). W związku ze zmniejszeniem hamowania aktywności lipazy wątrobowej powstające lipoproteiny, są także bardziej podatne na glikację i oksydację (Hellerstein i in., 1997). Wymienione zaburzenia lipidowe stanowią niezależny czynnik ryzyka rozwoju miażdżycy, co ściśle wiąże się ze wzrostem ryzyka chorób sercowo-

naczyniowych (Grundy i in., 2004). Innym czynnikiem rozwoju chorób serca i naczyń jest podwyższone stężenie fibrynogenu, białka ostrej fazy, syntetyzowanego w wątrobie. W badaniach wykazano, iż u pacjentów z nadmierną akumulacją lipidów w hepatocytach, zwiększona wątrobowa synteza fibrynogenu jest indukowana przez towarzyszącą insulinooporności hiperinsulinemię oraz przez cytokiny związane z toczącym się stanem zapalnym (zwłaszcza IL-6) (Barazzoni i in., 2003; Mertens, van Gaal 2002, Raynaud i in., 2000). Kolejnym czynnikiem krzepnięcia będącym przyczyną zaburzeń procesów krzepliwości krwi jest inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1 - plasminogen activator inhibitor 1). W badaniach wykazano bezpośredni wpływ wolnych kwasów tłuszczowych, insuliny i jej prekursora proinsuliny, a także hiperinsulinemii i hipertriglicydemii na zwiększenie aktywności PAI-1 (Kohler, Grant 2000). PAI-1 może mieć wpływ na rozwój insulinooporności związanej z otyłością, a przewlekłe podwyższone stężenie PAI-1 sprzyja procesowi prozakrzepowemu i progresji miażdżycy. Insulinooporność jest związana z przewlekłym stanem zapalnym, wynikającym z nieprawidłowej produkcji cytokin i innych mediatorów procesu zapalnego. IL-6 jest cytokiną, której podwyższone stężenie w surowicy stwierdza się u chorych z insulinoopornością oraz w otyłości (Olszanecka-Glinianowicz i in., 2006). Wykazano iż IL-6 uczestniczy w rozwoju insulinooporności poprzez zmniejszenie aktywności lipazy lipoproteinowej, co prowadzi do zwiększonej lipolizy i wzrostu stężenia WKT w surowicy a tym samym zwiększonego ich napływu do hepatocytów. Ponadto IL-6 nasila syntezę triacylogliceroli w wątrobie doprowadzając tym samym do ich akumulacji w hepatocytach (Nonogaki i in., 1995).

Podsumowanie

Zjawisko insulinooporności hepatocytów towarzyszy wielu stanom chorobom, w tym między innymi niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby i niealkoholowemu stłuszczeniowemu zapaleniu wątroby. Molekularny mechanizm wątrobowej insulinooporności, jak i przyczyny jej klinicznych manifestacji nie są dokładnie wyjaśnione. Wiadomo że w stanach insulinooporności dochodzi do zaburzenia insulinowego sygnału przekąźnictwa, najczęściej związanego z defektem postreceptorowym. W trakcie rozwoju insulinooporności wątrobowej dochodzi do nadmiernej akumulacji między innymi LCFA-CoA, DAG i CER. Te bioreaktywne frakcje lipidowe bezpośrednio interferują z insulinowym szlakiem przekąźnictwa sygnału, doprowadzając do insulinooporności hepatocytów.

Literatura

1. Antonetti D.A., Algenstaedt P., Kahn C.R. (1996). *Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain*. Mol Cell Biol., 16, s. 2195-2203.
2. Barazzoni R., Kiwanuka E., Zanetti M., Cristini M., Vettore M., Tessari P. (2003). *Insulin acutely increases fibrinogen production in individuals with type 2 diabetes but not in individuals without diabetes*. Diabetes., 52, s. 1851-1856.
3. Barter P. (2005). *The realities of dyslipidaemia in metabolic syndrome and diabetes*. Br J Diabetes Vasc Dis., 5(1), s. 7-11.
4. Belfort R., Harrison S.A., Brown K., Darland C., Finch J., Hardies J., Balas B., Gastaldelli A., Tio F., Pulcini J., Berria R., Ma J.Z., Dwivedi S., Havranek R., Fincke C., DeFronzo R., Bannayan G.A., Schenker S., Cusi K. (2006). *A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis*. N Engl J Med., 355, s. 2297-2307.
5. Carrasco S., Merida I. (2007). *Diacylglycerol, when simplicity becomes complex*. Trends Biochem Sci., 32, s. 27-36.
6. Chang L., Chiang S.H., Saltiel A.R. (2004). *Insulin signaling and the regulation of glucose transport*. Mol Med., 10, s. 65-71.
7. Chavez J.A., Knotts T.A., Wang L.P., Li G., Dobrowsky R.T., Florant G.L., Summers S.A. (2003). *A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids*. J Biol Chem., 278, s. 10297-10303.
8. Chen M.T., Kaufman L.N., Spennetta T., Shrago E. (1992). *Effects of high fatfeeding to rats on the interrelationship of body weight, plasma insulin, and fatty acyl-coenzyme A esters in liver and skeletal muscle*. Metabolism., 41, s. 564-569.
9. Chin J.E., Dickens M., Tavare J.M., Roth R.A. (1993). *Overexpression of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I, gamma, and epsilon in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signaling*. J Biol Chem., 268, s. 6338-6347.

10. Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. (2002). *Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity?* Hepatology, 36, s. 403-9.
11. Day C.P. (2002). *Pathogenesis of steatohepatitis*. Best. Pract.. Res. Clin. Gastroenterol., 16, s. 663-678
12. De Fea K., Roth R.A. (1997). *Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612*. Biochemistry., 36, s. 12939-12947
13. Diraison F., Moulin P., Beylot M. (2003). *Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non-esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease*. Diabetes Metab., 29, s. 478-485
14. Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z. (2005). *The metabolic syndrome*. Lancet., 365, s. 1415-1428
15. Etgan G.J., Valasek K.M., Broderick C.L. (1999). *IN vivo adenoviral delivery of recombinant human protein kinase C-zeta stimulates glucose transport activity in rat skeletal muscle*. J Biol Chem., 274, s. 22139-22142
16. Gibbons G.F., Brown A.M., Wiggins D., Pease R. (2002). *The roles of insulin and fatty acids in the regulation of hepatic very-low-density lipoprotein assembly*. J R Soc Med., 95(42), s.29-32
17. Giddings S.J., Carnaghi L.R. (1992). *Insulin receptor gene expression during development: developmental regulation of insulin receptor mRNA abundance in embryonic rat liver and yolk sac, developmental regulation of insulin gene splicing, and comparison to abundance of insulin-like growth factor 1 receptor mRNA*. Mol Endocrinol., 6(10), s. 1665-1672
18. Govers R., Coster A.C., James D.E. (2004). *Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway*. Mol Cell Biol., 24, s. 6456-6466
19. Griffin M.E., Marcucci M.J., Cline G.W., Bell K., Barucci N., Lee D., Goodyear L.J., Kraegen E.W., White M.F., Shulman G.I. (1999). *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin cascade*. Diabetes., 48, s. 1270-1274
20. Grundy S.M., Brewer B., Cleeman J.I., Smith S.C., Lenfant C. (2004). *Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to definition*. Circulation., 109, s. 433-438
21. Hellerstein M.K., Neese R.A., Schwarz J.M., Turner S., Faix D., Wu K. (1997). *Altered fluxes responsible for reduced hepatic glucose production and gluconeogenesis by exogenous glucose in rats*. Am J Physiol., 272, s. 163-172
22. Holland W.L., Knotts T.A., Chavez J.A., Wang L.P., Hoehn K.L., Summers S.A. (2007). *Lipid mediators of insulin resistance*. Nutr Rev., 65, s. 39-46
23. Holland W.L., Summers S.A. (2008). *Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism*. Endocr Rev., 29, s. 381-402
24. Hotamisligil G.S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M.F., Spiegelman B.M. (1996). *IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance*. Science., 271, s. 665-668
25. Hue L., Maisin L., Rider M.H. (1988). *Palmitate inhibits liver glycolysis; involvement of fructose 2, 6-biophosphatase in the glucose/fatty acid cycle*. Bioch J., 251, s. 541-545
26. Itani S.I., Ruderman N.B., Schmieder F., Boden G. (2002). *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha*. Diabetes., 51, s. 2005-2011
27. Kanety H., Feinstein R., Papa M.Z., Hemi R., Karasik A. (1995). *Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)*. J Biol Chem., 270, s. 23780-23784
28. Klip A., Paquet M.R. (1990). *Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation*. Diabetes Care., 13, s. 228-243
29. Kohler H.P., Grant P.J. (2000). *Plasminogen activator inhibitor type 1 and coronary artery disease*. N Engl J Med., 342, s. 1792-1801
30. Krook A., Bjornholm M., Galuska D., Jiang X.J., Fahlman R., Myers M.G., Walberg-Henriksson H., Zierath J.R. (2000). *Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients*. Diabetes., 49, s. 284-292
31. Kuper H., Tzonou A., Kaklamani E., Hsieh C.C., Lagiou P., Adami H.O., Trichopoulos D., Stuver S.O. (2000). *Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer., 85, s. 498-502
32. Lam T.K., Yoshii H., Haber C.A., Bogdanovic E., Lam L., Fantus I.G., Giacca A. (2002). *Free fatty acid induced hepatic insulin resistance: a potential role protein kinase C-delta*. Am J Physiol Endocrinol Metab., 283, s. 682-691

33. Le Roith D., Zick Y. (2001). *Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance*. Diabetes Care., 24, s. 588-597
34. Lee J., Pilch P.F., Shoelson S.E., Scarlata S.F. (1997). *Conformational changes of the IR upon insulin binding and activation as monitored fluorescence spectroscopy*. Biochemistry., 36, s. 2701-2708
35. Li X.L., Man K., Ng K.T., Sun C.K., Lo C.M., Fan S.T. (2005). *The influence of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on the ischemic injury during rat liver graft preservation*. Am J Transplant., 5, s. 1264-1275
36. Marchesini G., Brizi M., Bianchi G., Tomassetti S., Bugianesi E., Lenzi M., McCullough A.J., Natale S., Forlani G., Melchionda N. (2001). *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome*. Diabetes, 50, s. 1844-50.
37. McAuley K.A., Williams S.M., Mann J.I., Walker R.J., Lewis-Barned N.J., Temple L.A., Duncan A.W. (2001). *Diagnosing insulin resistance in the general population*. Diabetes Care., 24, s. 460-464
38. Mertens I., Van Gaal L.F. (2002). *Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system*. Obes Rev., 3, s. 85-101
39. Meyer S.G., de Groot H. (2003). *Cycloserine and threo-dihydrosphingosine inhibit TNF-alpha-induced cytotoxicity: evidence for the importance of de novo ceramide synthesis in TNF-alpha signaling*. Biochim Biophys Acta., 1643, s. 1-4
40. Nonogaki K., Fuller G.M., Fuentes N.L., Moser A.H., Stappans L., Grunfeld C., Feingold K.R. (1995). *Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats*. Endocrinology., 136, s. 2143-2148
41. Oakes N.D., Cooney G.J., Camilleri S., Chisholm D.J., Kraegen E.W. (1997). *Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding*. Diabetes., 46, s. 1768-1774
42. Olszanecka-Glinianowicz M., Zahorska-Markiewicz B., Kocelak P., Janowska J., Holecki M., Semik-Grabarczyk E. (2006). *Wpływ redukcji masy ciała na stężenie interleukiny-6 (IL-6) i insulinooporność*. Endokrynol Pol., 57, s. 131-135
43. Orellana A., Hidalgo P.C., Morales M.N., Mezzano D., Bronfman M. (1990). *Palmitoyl-CoA and the acyl-CoA thioester of the carcinogenic peroxisome-proliferator ciprofibrate potentiate diacylglycerol-activated protein kinase C by decreasing the phosphatidylserine requirement of the enzyme*. Eur J Biochem., 190, s. 57-61
44. Paz K., Hemi R., Le Roith D., Karasik A., Elhanany E., Kanety H., Zick Y. (1997). *A molecular basis for insulin resistance: elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem., 272, s. 29911-29918
45. Raynaud E., Perez-Martin A., Brun J., Aissa-Benhaddad A., Fedou C., Mercier J. (2000). *Relationships between fibrinogen and insulin resistance*. Atherosclerosis., 150, s. 365-370
46. Sanyal A.J. (2003). *Insulin resistance and tissue repair: a "fatological" phenomenon*. Gastroenterology., 125, s. 1886-1889.
47. Seifert R., Schachtele C., Rosenthal W., Schultz G. (1988). *Activation of protein kinase C by cis- and trans-fatty acids and its potentiation by diacylglycerol*. Biochem Biophys Res Commun., 154, s. 20-26
48. Skolnik E.Y., Batzer A., Li N., Lee C.H., Lowenstein E., Mohammadi M., Margolis B., Schlessinger J. (1993). *The function of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signalling pathways*. Science., 260, s. 1953-1955
49. Summers S.A. (2006). *Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity*. Prog Lipid Res., 45, s. 42-72
50. Tappy L., Minehira K. (2001). *New data and new concepts on the role of the liver in glucose homeostasis*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care., 4, s. 273-277
51. Teruel T., Hernandez R., Lorenzo M. (2001). *Ceramide mediates insulin resistance by TNF-α in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state*. Diabetes., 50, s. 2563-2571
52. Unger R.H. (2003). *Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome*. Endocrinology., 144, s. 5159-5165
53. Virkamaki A., Ueki K., Kahn C.R. (1999). *Protein-protein interaction in insulin signalling and the molecular mechanism of insulin resistance*. J Clin Invest., 103, s. 931-943
54. White M.F., Kahn C.R. (1994). *The insulin-signaling system*. J Biol Chem., 269, s.1-4

INSULIN RESISTANCE OF A LIVER CELL

Human and Health No. 1 (V), p. 120-126

^{1,2}Jadwiga Daniluk, ^{1,2}Agnieszka Zwolak, ¹Iwona Jastrzębska, ¹Katarzyna Sawicka,
¹Michał Szczyrek

¹ Medical University of Lublin

² Pope John Paul II State School of Higher Education in Biała Podlaska

Summary: Insulin resistance means impaired sensitivity of tissues to insulin, most often associated with a defect of the insulin intracellular signal transmission route. Insulin resistance of hepatocytes manifests itself mainly with uncontrolled production and release of glucose from the liver, which results in hyperglycaemia. This leads to metabolic disorders, especially concerning the carbohydrate as well as lipid metabolism, resulting in excessive accumulation of lipids in the liver. The intracellular excess of lipids is mostly esterified to triacylglycerides (TAG), diacylglycerides (DAG) and ceramides (CER), which directly interfere with the insulin signal transmission route, intensifying the insulin resistance of hepatocytes. Increase in the content of diacylglycerides inside hepatocytes causes increased activity of protein kinase C (PKC), while excessive accumulation of ceramides may cause inactivation of protein kinase B (PKB), which results in phosphorylation and deactivation of the insulin substrate receptor (IRS-1), which leads to reduction of translocation of glucose transporters (GLUT-2) to the cell membrane. The importance of insulin resistance of hepatocytes chiefly manifests itself in the development of the metabolic syndrome, growth of the heart-vascular risk and a chronic inflammatory process and carcinogenesis.

Key words: insulin resistance, hepatocytes, NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) free fatty acids, ceramides, diacylglycerides, triacylglycerides

The term insulin resistance

Insulin is the main hormone which performs anabolic functions in the human body and is synthesised and secreted by beta cells of pancreatic islets. Its role also consists in maintaining the homeostasis of the carbohydrate, lipid and protein metabolism of the organism. Its main task is induction of displacement of glucose transporters to the cell membrane, increased membrane expression of protein glucose transporters and stimulation of transport of glucose into the cells, which reduces its concentration in blood. Apart from influence on cellular transport of glucose, insulin also intensifies its intracellular metabolism by boosting the activity of enzymes which participate in glycolysis and gluconeogenesis. Insulin also influences lipid metabolism of the organism, which is expressed by intensification of lipogenesis and inhibition of lipolysis, mainly by reducing the activity of insulin sensitive lipase (HSL - hormone sensitive lipase) in the adipose tissue. As an anabolic hormone, insulin stimulates the synthesis and impedes the degradation of proteins and increases the capture of amino acids by muscles (Itani et al, 2002). Nonetheless, the action of insulin, which performs many significant functions in the organism, is often disturbed. Most often, the defect is associated with disturbances in its action, but a decrease in secretion of insulin or its incorrect structure may also occur. Impairment of the action of insulin is most often associated with damage to its cellular receptor and consecutive insensitivity of circumferential tissues to insulin and is referred to as insulin resistance. This disorder occurs when correctly built insulin and its correct quantities fail to activate the intracellular signal transmission route correctly (Eckel et al, 2005). The consequences of insulin resistance depend on the tissue location of the insulin action defect. In the case of circumferential insulin resistance associated with skeletal muscles, the cardiac muscle and the adipose tissue, transport of glucose from blood to skeletal muscles is reduced, which results in hyperglycaemia. On the other hand, the main impact of insulin resistance of hepatocytes is uncontrolled production and release of glucose from the liver, which, as a result, also leads to hyperglycaemia. Basic methods of assessment of insulin resistance consist in simultaneous measurements of concentrations of glucose and insulin in the serum. The "gold standard" of assessment of insulin resistance is known as the metabolic (euglycemic) clamp. Despite the fact that this method is relatively precise, it is expensive, labour-consuming and encumbering the patient with lengthy intravenous glucose and insulin infusions, therefore the usefulness of this method in clinical practice is limited. The most commonly used model, both in clinical practice and epidemiological research, is the mathematical insulin resistance assessment model (HOMA - homeostatic model assessment) In this model the insulin resistance coefficient is calculated on

the basis of concentrations glucose and insulin on an empty stomach in basic conditions. The value of this coefficient in physiological conditions is 1, while higher values indicate insulin resistance. HOMA is an index which has found application in assessment of the insulin resistance of circumferential tissues (McAuley et al, 2001). On the other hand, measurement of liver insulin resistance requires application of glucose marked with a radioactive isotope and is not used in clinical practice (Belfort et al, 2006). This examination pictures the liver capture of glucose in response to administration of insulin. In the case of people with insulin resistance, the capture of glucose by the hepatocytes stimulated by insulin is reduced in comparison with healthy people. On the other hand, in the course of research conducted on animal models, insulin resistance of skeletal muscles is often assessed on the basis of insulin-stimulated translocation of GLUT-4 (protein glucose transporters) to the cell membrane. Insulin resistance conditions are characterised by inhibition of translocation of glucose transporters to the cell membrane, which subsequently results in a decrease in insulin-stimulated cellulipetal transport of glucose (Govers et al, 2004).

Insulin resistance of hepatocytes

A significant role in regulation of energy metabolism of the organism is played by the liver, which is an insulin-sensitive organ. The development of liver insulin resistance is caused by disorders in functioning of the insulin signaling path, which is consequently associated with damage to metabolic and detoxificatory activities of this organ (Sanyal 2003). The main and the most important complications of insulin resistance of hepatocytes is liver steatosis, defined as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) Non-alcoholic liver steatosis is accumulation of fatty substances in the cytoplasm of more than 5% of hepatocytes, or in the amount exceeding 5-10% of the mass of the organ in persons who do not abuse alcohol. There is evidence that NAFLD can lead to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), cirrhosis and hepatic cancer (Day 2002). The pathomechanism of insulin resistance of hepatocytes is still unclear (Diraison et al, 2003). Some research indicates that insulin resistance may be a factor initiating accumulation of lipids and development steatotic changes in the course of NAFLD. Insulin resistance is often the cause of excessive accumulation of lipids not only in the liver, but also in skeletal muscles and cardiomyocytes (Unger 2003). Insulin resistance conditions are characterised by reduced inhibition hormone-sensitive lipoprotein lipase (HSL) by insulin, which results in increased release of free fatty acids from the adipose tissue to blood and their increased inflow to the liver. On the other hand, the de novo lipogenesis of fatty acids also increases in the liver. As a result the inflow of free fatty acids to the hepatocytes grows, which results in the advantage of esterification of lipids over their oxidation. This leads to an increase in production and accumulation of triacylglycerides (TAG) used for synthesis of lipoproteins (mostly VLDL) in the liver. Finally, there is a growth in concentration of TAG in plasma (Gibbons et al, 2002). In patients with NAFLD, the accumulated intracellular lipids, by undergoing peroxidation, intensify the oxidation stress, which results in necrosis of hepatocytes. Peroxidised lipids released from damaged hepatocytes induce an inflammatory condition and damage to liver veins.

Insulin resistance is strictly associated with steatohepatitis, known as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) Steatohepatitis is accumulation of fatty substances in the cytoplasm of more than 5% of hepatocytes, or in the amount exceeding 5-10% of the mass of the organ in persons who do not consume significant amounts of alcohol (140 g of ethanol/week in the case of men and 70 g of ethanol/week in the case of women) In NAFLD, like in NASH (non-alcoholic steatohepatitis), it is of macrovacuolar nature, while the primary component gathered in the cytoplasm of hepatocytes are TG. The pathogenesis of the steatosis is still not completely clear. The current condition of knowledge indicates that the crucial role is played by the following: oxidation stress, circumferential insulin resistance, hyperinsulinaemia, excessive circumferential lipolysis, increased hepatopetal transport of lipids as well as impaired beta - oxidation of lipids in mitochondria and accumulation of TG in the cellular cytoplasm. Special attention to should be paid to the increase in expression of cytochrome P450 2E1 (CYP E1), which causes formation of reactive oxygen metabolites, which damage cellular membranes and lead to development of inflammatory reactions (Marchesini et al, 2001). Free oxygen radicals cause peroxidation of lipids, which, most likely, is a basic mechanism of formation of NASH, with consequences in the form of an inflammatory condition and fibrosis. Recent research indicates that insulin resistance is one of key pathogenic factors of NASH, while hyperinsulinaemia associated with this syndrome does not stem from the impairment of insulin degradation, rather than from its increased secretion (Chitturi et al, 2002).

Pathogenesis of insulin resistance of hepatocytes

Exploring the molecular mechanism of disorders in the insulin signaling path which lead to development of insulin resistance is necessary to understand and explain the ethiopathogenesis of earlier described liver dis-

eases. An insulin receptor is a glycoprotein, consisting of two α subunits and two β subunits and belongs to a family of receptors with active tyrosine kinase. Both α subunits are located outside the cell membrane and are connected to each other with disulfide bridges and are connected to the extramembranal part of β subunits in the same manner (White, Kahn 1994). By bonding with a specific region of the α subunit, insulin causes changes in configuration of the receptor and causes autophosphorylation of tyrosine residues in the intracellular part of the β subunit (Lee et al, 1997). These changes result in activation of the insulin receptor and phosphorylation of tyrosine residues in substrate proteins, which participate in further transfer of the insulin signal. There are approximately 10 substrate proteins of the insulin receptor and they include, among others, proteins described as insulin receptor substrates (IRS 1-4), of which the most important elements are IRS-1 and IRS-2 (Virkamaki et al, 1999). Activation of IRS by means of phosphorylation of tyrosine residues stimulates the two key insulin signalling routes associated with phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and mitogen activated protein kinase (MAPK). The MAPK cascade intermediates in the transfer of the mitogen signal to the cell nucleus (processes of growth, differentiation and proliferation of cells), while PI3K is involved in the metabolic response to insulin (Antonetti et al, 1996, Skolnik et al, 1993; Virkamaki et al, 1999). Nonetheless, probably both these routes can be mutually connected (Kuper et al, 2000). PI3K consists of the regulatory subunit, responsible for connection of PI3K particles with IRS particles as well as the catalytic subunit, which activates phosphorylation of phosphatidylinositols of cellular membranes. This reaction leads to phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB), also known as the Akt protein (Li et al, 2005). The activity of PKB regulates the translocation of the insulin-sensitive glucose transporter (GLUT-2) from the cytoplasm to the cell membrane of hepatocytes, which plays a key role in the transport of glucose into the liver cells. Translocation of GLUT-2 may also be stimulated by protein kinase C (PKC) isoforms, activated by PI3K (Etgan et al, 1999; Klip, Paquet 1990). The mechanism of the intracellular insulin signal transmission route is very complicated and is subject to precise regulation, whereas impairment of one of the elements in the whole cellular signal transmission route may constitute a molecular basis of insulin resistance. The pathogenic link may thus be incorrect production of insulin, changes in the insulin receptors and their substrates and particularly defects in postreceptor signalling (Chang et al, 2004; Le Roith, Zick 2001). Proteins which take part in the insulin signalling path may undergo post-translation modifications, which will result in changes in their activity. Changes most often include reduction in phosphorylation of tyrosine in IRS-1 stimulated by insulin and disturbance in connection of IRS - 1 with PI3K (Krook et al, 2000). Phosphorylation of serine residues in IRS-1 impairs the phosphorylation of tyrosine in IRS-1 stimulated by insulin (Paz et al, 1997). Inactive IRS-1 is unable to participate in further insulin signalling mechanisms in the cells (Kanety et al, 1995). One of the factors which cause phosphorylation of serine/threonine in IRS-1 and, in this way, inhibit the activity of tyrosine kinases of the insulin receptor is TNF - α (Hotamisligil et al, 1996). The tumor necrosis factor (TNF - α - tumor necrosis factor alpha) impedes the insulin signalling path in the liver also by activating serine kinases such as JNK-1 (Jun N-Terminal Kinase-1) (Kanety et al, 1995). TNF - α also causes protein kinases B to remain in an inactive, dephosphorylated state and results in an increased concentration of triacylglycerides in hepatocytes by exerting influence both on adipocytes as well as liver cells (Teruel et al, 2001). By inhibiting the lipase, TNF - α stimulates lipolysis in the adipose tissue which results in an increased concentration of plasmic free fatty acids, which ultimately causes growth in the inflow of fatty acids to the liver and development of insulin resistance of hepatocytes (Griffin et al, 1999). Research concerning the influence of free fatty acids on hepatocytes has demonstrated that long-chain fatty acids inhibit the translocation and the activity of glucokinase, which plays a key, regulatory role in maintenance of a proper concentration gradient for glucose (Tappy, Minehira 2001). A decrease in the activity of glucokinase results in an increase in the level of free glucose in the hepatocytes and, as a consequence, reduction of capture of glucose by these cells (Hue et al, 1988). Furthermore, accumulation of free fatty acids in the liver induces insulin resistance related to the growth of translocation of PKC - δ from the cytosol to the cell membrane of hepatocytes, since it contains the IRS which shows substrate proximity to the PKC. PKC - δ is capable of phosphorylation of serine and threonine residues in IRS-1, causing it to become inactive. Therefore, states of insulin resistance of hepatocytes are accompanied by reduction in phosphorylation of tyrosine in IRS-1 stimulated by insulin, a decrease in the activity of PI3K associated with IRS-1 as well as simultaneous growth in activity of PKC - δ (Chin et al, 1993; De Fea, Roth 1997).

Hepatic insulin resistance is associated with excessive accumulation of not only free fatty acids, but also long-chain esters of fatty acids (LCFA - CoA), diacylglycerides (DAG), triacylglycerides (TAG) and ceramides (CER) (Holland et al, 2007). LCFA - CoA are metabolically active forms of intracellular fatty acids and their formation is catalysed by acyl-CoA synthetase. Part of LCFA - CoA is transported to mitochondria, where it is oxidated in the process of β -oxidisation, whereas the rest constitutes substrates for formation of various lipid fractions. An increased inflow of free fatty acids to the liver can lead to an increased concentration of LCFA - CoA inside hepatocytes. The research conducted so far has proved that the increased amount of intracellular LCFA - CoA is often related to the presence of insulin resistance of hepatocytes (Chen et al, 1992; Oakes et al, 1997). The phe-

nomenon may be influenced by the fact that long-chain esters of fatty acids modulate the activity of some metabolically significant enzymes in the liver. These enzymes include the following: acyl-CoA synthase, glucokinase, glucose-6-phosphatase or hormone-sensitive lipoprotein lipase. Furthermore, an increased intracellular level of LCFA - CoA may interfere with the insulin signal transmission route by means of excessive activation of PKC (Orellana et al, 1990). Accumulation of LCFA - CoA may also be an indirect indicator of an increased concentration of ceramides or diacylglycerides inside the hepatocytes, since an increased level of LCFA - CoA is usually accompanied by an increased level of CER and DAG (Orellana et al, 1990). Diacylglycerides are formed mainly through esterification of two molecules of long-chain esters of fatty acids and the reaction is catalysed by phosphatidate phosphatase-1 (PAP 1) (Chavez et al, 2003). On the other hand, a different enzymes - diacylglyceride acyltransferase (DGAT) catalyses the reaction of formation of triacylglycerides from diacylglycerides, which may be then stored in the hepatocytes. Apart from this function, DAG play an important role in biosynthesis of glycerophospholipids, which are a major component of cellular membranes (Carrasco, Merida 2007). Furthermore, accumulation of DAG is responsible, to a large extent, for increased activation of PKC (particularly PKC - β II and PKC - δ) and consecutive insulin resistance (Lam et al, 2002, Seifert et al, 1988). Being metabolites of fatty acids, ceramides can affect the development of insulin resistance, since they play a role in the transfer of intracellular signals. Experimental data relating to ceramides indicate that the excessive amount of CER probably disturbs insulin signalling, mainly at the level of protein kinase B (PKB). Inactivation of PKB may take place both via dephosphorylation of this protein as well as inhibition of its translocation to the cellular membrane. A further consequence of the action of a ceramide is reduction in translocation of GLUT - 2 to the cellular membrane with simultaneous reduction in the transport of glucose into the hepatocytes, (Lam et al, 2002, Seifert et al, 1988; Summers 2006). Furthermore, it is believed that ceramides in hepatocytes can simultaneously inactivate PKB as well as activate PKC - ζ - the isoform responsible for maintenance of the lipogenesis path. Another mechanism through which ceramides can impair the action of insulin is an increased expression of proinflammatory cytokines, such as TNF - α . On the other hand, an increased concentration of TNF - α in hepatocytes, in particular in obesity conditions, results in an increased sphingolipid metabolism as well as the de novo synthesis of ceramides, which, in turn, causes their excessive accumulation in the cell and intensifies the insulin resistance of hepatocytes (Holland, Summers 2008; Meyer, de Groot 2003).

Importance of insulin resistance of hepatocytes

Metabolic complications of insulin resistance may include both disorders of the carbohydrate and the lipid metabolism as well as coagulation disorders and activation of an inflammatory condition. The activity of the two following enzymes can be inhibited in the conditions of insulin resistance of hepatocytes: phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase), which results in weakening of inhibition of liver glucose production. The accretion of liver glucose production results in hyperglycaemia. As a result of reduced sensitivity of hepatocytes to insulin, secretion of VLDL (very low density lipoproteins - VLDL) by the liver also increases and, as a result, the concentration triacylglycerides in the plasma increases. The inflow of large amounts of lipids (coming from various sources) to the liver results in a post-translatory stabilisation apolipoprotein B, the main protein component of VLDL, degradation of which is dependent on the action of insulin. This phenomenon favours VLDL biosynthesis. Insulin resistance also results in weakening of the enzymatic lipoprotein lipase, the action of which determines the pace of removal of triacylglyceride-rich lipoproteins. The observed reduced concentration of the fraction of HDL and LDL lipoproteins is a consequence of changes in the composition of these lipoproteins and the disturbances in their correct metabolism. Hypertriglyceridemia and a high concentration of VLDL stimulates the exchange of the esters of cholesterol and triacylglycerides between VLDL lipoproteins and HDL and LDL. As a result, the amount of cholesterol esters increases in VLDL, and the amount of triacylglycerides increases in HDL and LDL. This process leads to emergence of HDL and LDL molecules rich in TAG (Barter 2005; Eckel et al, 2005). In association with the reduction in inhibition of the activity of the liver lipase, the generated lipoproteins are also more susceptible to glycation and oxidation (Hellerstein et al, 1997). The mentioned lipid disorders are an independent risk factor of development atherosclerosis, which is strictly associated with the growth of the risk of cardiovascular diseases (Grundy et al, 2004). Another factor of development of cardiac and vascular diseases is an increased concentration of fibrinogen, an acute-phase protein synthesised in the liver. The research has demonstrated that in patients with excessive accumulation of lipids in the hepatocytes, an increased hepatic synthesis of fibrinogen is induced by hyperinsulinaemia, which accompanies insulin resistance, and also by cytokines associated with an ongoing inflammatory condition (particularly IL-6) (Barazzoni et al, 2003; Mertens, Van Gaal 2002, Raynaud et al, 2000). Another coagulation factor which is the cause of disorders in blood coagulation processes is the plasminogen activator inhibitor (PAI-1 -

plasminogen activator inhibitor 1). The research has demonstrated the direct influence on free fatty acids, insulin and its precursor - proinsulin, as well as hyperinsulinaemia and hypertriglyceridemia on the increase in the activity of PAI-1 (Kohler, Grant 2000). PAI-1 may have influence on the development of insulin resistance associated with obesity, while a chronically increased concentration of PAI-1 favours the prothrombotic process and the progress of atherosclerosis. Insulin resistance is associated with a chronic inflammatory condition resulting from incorrect production of cytokines and other inflammatory process mediators. IL-6 is a cytokine the increased concentration of which in the serum is diagnosed in patients with insulin resistance as well as in obesity (Olszanecka-Glinianowicz et al, 2006). It has been demonstrated that IL-6 participates in the development of insulin resistance by reducing the activity of the lipoprotein lipase, which leads to an increased lipolysis and an increased concentration of free fatty acids in the serum and hence, their increased inflow to the hepatocytes. Furthermore, IL-6 intensifies synthesis of triacylglycerides in the liver, thus causing their accumulation in the hepatocytes (Nonogaki et al, 1995).

Summary

The phenomenon of insulin resistance of hepatocytes is accompanied by many disease conditions, including but not limited to non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. The molecular mechanism hepatic insulin resistance as well as the causes of its clinical manifestations have not been thoroughly explained. It is known that disorders of the insulin signal transmission, most often related to a post-receptor defect, happen in of insulin resistance conditions. In the course of development of hepatic insulin resistance it comes to an excessive accumulation of , among others LCFA - CoA, DAG and CER. These bioreactive lipid fractions directly interfere with the insulin signal transmission route, causing insulin resistance of hepatocytes.

References:

1. Antonetti D.A., Algenstaedt P., Kahn C.R. (1996). *Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain*. Mol Cell Biol., 16, p. 2195-2203.
2. Barazzoni R., Kiwanuka E., Zanetti M., Cristini M., Vettore M., Tessari P. (2003). *Insulin acutely increases fibrinogen production in individuals with type 2 diabetes but not in individuals without diabetes*. Diabetes., 52, p. 1851-1856.
3. Barter P. (2005). *The realities of dyslipidaemia in metabolic syndrome and diabetes*. Br J Diabetes Vasc Dis., 5(1), p. 7-11.
4. Belfort R., Harrison S.A., Brown K., Darland C., Finch J., Hardies J., Balas B., Gastaldelli A., Tio F., Pulcini J., Berria R., Ma J.Z., Dwivedi S., Havranek R., Fincke C., DeFronzo R., Bannayan G.A., Schenker S., Cusi K. (2006). *A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis*. N Engl J Med., 355, p. 2297-2307
5. Carrasco S., Merida I. (2007). *Diacylglycerol, when simplicity becomes complex*. Trends Biochem Sci., 32, p. 27-36.
6. Chang L., Chiang S.H., Saltiel A.R. (2004). *Insulin signaling and the regulation of glucose transport*. Mol Med., 10, p. 65-71
7. Chavez J.A., Knotts T.A., Wang L.P., Li G., Dobrowsky R.T., Florant G.L., Summers S.A. (2003). *A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids*. J Biol Chem., 278, p. 10297-10303.
8. Chen M.T., Kaufman L.N., Spennetta T., Shrago E. (1992). *Effects of high fatfeeding to rats on the interrelationship of body weight, plasma insulin, and fatty acyl-coenzyme A esters in liver and skeletal muscle*. Metabolism., 41, p. 564-569
9. Chin J.E., Dickens M., Tavaré J.M., Roth R.A. (1993). *Overexpression of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I, gamma, and epsilon in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signaling*. J Biol Chem., 268, p. 6338-6347
10. Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. (2002). *Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity?* Hepatology, 36, p. 403-9.
11. Day C.P. (2002). *Pathogenesis of steatohepatitis*. Best. Pract.. Res. Clin. Gastroenterol., 16, p. 663-678
12. De Fea K., Roth R.A. (1997). *Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine*

- phosphorylation requires serine 612. Biochemistry.*, 36, p. 12939–12947
13. Diraison F., Moulin P., Beylot M. (2003). *Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non-esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease.* Diabetes Metab., 29, p. 478-485
 14. Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z. (2005). *The metabolic syndrome. Lancet.*, 365, p. 1415-1428
 15. Etgan G.J., Valasek K.M., Broderick C.L. (1999). *IN vivo adenoviral delivery of recombinant human protein kinase C-zeta stimulates glucose transport activity in rat skeletal muscle.* J Biol Chem., 274, p. 22139-22142
 16. Gibbons G.F., Brown A.M., Wiggins D., Pease R. (2002). *The roles of insulin and fatty acids in the regulation of hepatic very-low-density lipoprotein assembly.* J R Soc Med., 95(42), p. 29-32
 17. Giddings S.J., Carnaghi L.R. (1992). *Insulin receptor gene expression during development: developmental regulation of insulin receptor mRNA abundance in embryonic rat liver and yolk sac, developmental regulation of insulin gene splicing, and comparison to abundance of insulin-like growth factor 1 receptor mRNA.* Mol Endocrinol., 6(10), p. 1665-1672
 18. Govers R., Coster A.C., James D.E. (2004). *Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway.* Mol Cell Biol., 24, p. 6456–6466
 19. Griffin M.E., Marcucci M.J., Cline G.W., Bell K., Barucci N., Lee D., Goodyear L.J., Kraegen E.W., White M.F., Shulman G.I. (1999). *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin cascade.* Diabetes., 48, p. 1270-1274
 20. Grundy S.M., Brewer B., Cleeman J.I., Smith S.C., Lenfant C. (2004). *Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to definition.* Circulation., 109, p. 433–438
 21. Hellerstein M.K., Neese R.A., Schwarz J.M., Turner S., Faix D., Wu K. (1997). *Altered fluxes responsible for reduced hepatic glucose production and gluconeogenesis by exogenous glucose in rats.* Am J Physiol., 272, p. 163-172
 22. Holland W.L., Knotts T.A., Chavez J.A., Wang L.P., Hoehn K.L., Summers S.A. (2007). *Lipid mediators of insulin resistance.* Nutr Rev., 65, p. 39–46
 23. Holland W.L., Summers S.A. (2008). *Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism.* Endocr Rev., 29, p. 381–402
 24. Hotamisligil G.S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M.F., Spiegelman B.M. (1996). *IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance.* Science., 271, p. 665-668
 25. Hue L., Maisin L., Rider M.H. (1988). *Palmitate inhibits liver glycolysis; involment of fructose 2, 6-biophosphatase in the glucose/fatty acid cycle.* Bioch J., 251, p. 541-545
 26. Itani S.I., Ruderman N.B., Schmieder F., Boden G. (2002). *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α .* Diabetes., 51, p. 2005-2011
 27. Kanety H., Feinstein R., Papa M.Z., Hemi R., Karasik A. (1995). *Tumor necrosis factor α -induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1).* J Biol Chem., 270, p. 23780-23784
 28. Klip A., Paquet M.R. (1990). *Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation.* Diabetes Care., 13, p. 228-243
 29. Kohler H.P., Grant P.J. (2000). *Plasminogen activator inhibitor type 1 and coronary artery disease.* N Engl J Med., 342, p. 1792–1801
 30. Krook A., Bjornholm M., Galuska D., Jiang X.J., Fahlman R., Myers M.G., Walberg-Henriksson H., Zierath J.R. (2000). *Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients.* Diabetes., 49, p. 284-292
 31. Kuper H., Tzonou A., Kaklamani E., Hsieh C.C., Lagiou P., Adami H.O., Trichopoulos D., Stuver S.O. (2000). *Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma.* Int J Cancer., 85, p. 498–502
 32. Lam T.K., Yoshii H., Haber C.A., Bogdanovic E., Lam L., Fantus I.G., Giacca A. (2002). *Free fatty acid induced hepatic insulin resistance: a potential role protein kinase C-delta.* Am J Physiol Endocrinol Metab., 283, p. 682-691
 33. Le Roith D., Zick Y. (2001). *Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance.* Diabetes Care., 24, p. 588-597
 34. Lee J., Pilch P.F., Shoelson S.E., Scarlata S.F. (1997). *Conformational changes of the IR upon insulin binding and activation as monitored fluorescence spectroscopy.* Biochemistry., 36, p. 2701-2708
 35. Li X.L., Man K., Ng K.T., Sun C.K., Lo C.M., Fan S.T. (2005). *The influence of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on the ischemic injury during rat liver graft preservation.* Am J Transplant., 5,

- p. 1264–1275
36. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. (2001). *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome*. Diabetes, 50, p. 1844–50.
 37. McAuley K.A., Williams S.M., Mann J.I., Walker R.J., Lewis-Barned N.J., Temple L.A., Duncan A.W. (2001). *Diagnosing insulin resistance in the general population*. Diabetes Care., 24, p. 460–464
 38. Mertens I., Van Gaal L.F. (2002). *Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system*. Obes Rev., 3, p. 85–101
 39. Meyer S.G., de Groot H. (2003). *Cycloserine and threo-dihydrosphingosine inhibit TNF-alpha-induced cytotoxicity: evidence for the importance of de novo ceramide synthesis in TNF-alpha signaling*. Biochim Biophys Acta., 1643, p. 1–4
 40. Nonogaki K., Fuller G.M., Fuentes N.L., Moser A.H., Staprans I., Grunfeld C., Feingold K.R. (1995). *Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats*. Endocrinology., 136, p. 2143–2148
 41. Oakes N.D., Cooney G.J., Camilleri S., Chisholm D.J., Kraegen E.W. (1997). *Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding*. Diabetes., 46, p. 1768–1774
 42. Olszanecka-Glinianowicz M., Zahorska-Markiewicz B., Kocęlak P., Janowska J., Holecki M., Semik-Grabarczyk E. (2006). *Wpływ redukcji masy ciała na stężenie interleukiny-6 (IL-6) i insulinooporność*. Endokrynol Pol., 57, p. 131–135
 43. Orellana A., Hidalgo P.C., Morales M.N., Mezzano D., Bronfman M. (1990). *Palmitoyl-CoA and the acyl-CoA thioester of the carcinogenic peroxisome- proliferator ciprofibrate potentiate diacylglycerol-activated protein kinase C by decreasing the phosphatidylserine requirement of the enzyme*. Eur J Biochem., 190, p. 57–61
 44. Paz K., Hemi R., Le Roith D., Karasik A., Elhanany E., Kanety H., Zick Y. (1997). *A molecular basis for insulin resistance: elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem., 272, p. 29911–29918
 45. Raynaud E., Perez-Martin A., Brun J., Aissa-Benhaddad A., Fedou C., Mercier J. (2000). *Relationships between fibrinogen and insulin resistance*. Atherosclerosis., 150, p. 365–370
 46. Sanyal A.J. (2003). *Insulin resistance and tissue repair: a "fatological" phenomenon*. Gastroenterology., 125, p. 1886–1889.
 47. Seifert R., Schachtele C., Rosenthal W., Schultz G. (1988). *Activation of protein kinase C by cis- and trans-fatty acids and its potentiation by diacylglycerol*. Biochem Biophys Res Commun., 154, p. 20–26
 48. Skolnik E.Y., Batzer A., Li N., Lee C.H., Lowenstein E., Mohammadi M., Margolis B., Schlessinger J. (1993). *The function of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signalling pathways*. Science., 260, p. 1953–1955
 49. Summers S.A. (2006). *Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity*. Prog Lipid Res., 45, p. 42–72
 50. Tappy L., Minehira K. (2001). *New data and new concepts on the role of the liver in glucose homeostasis*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care., 4, p. 273–277
 51. Teruel T., Hernandez R., Lorenzo M. (2001). *Ceramide mediates insulin resistance by TNF- α in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state*. Diabetes., 50, p. 2563–2571
 52. Unger R.H. (2003). *Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome*. Endocrinology., 144, p. 5159–5165
 53. Virkamaki A., Ueki K., Kahn C.R. (1999). *Protein-protein interaction in insulin signalling and the molecular mechanism of insulin resistance*. J Clin Invest., 103, p. 931–943
 54. White M.F., Kahn C.R. (1994). *The insulin-signaling system*. J Biol Chem., 269, p. 1–4