

Vanád a experimentálny diabetes mellitus (tézy inauguračnej prednášky)

František Ništiar

Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta UPJŠ,
Trieda SNP 1, 040 66 Košice, Slovenská republika

1. Úvod

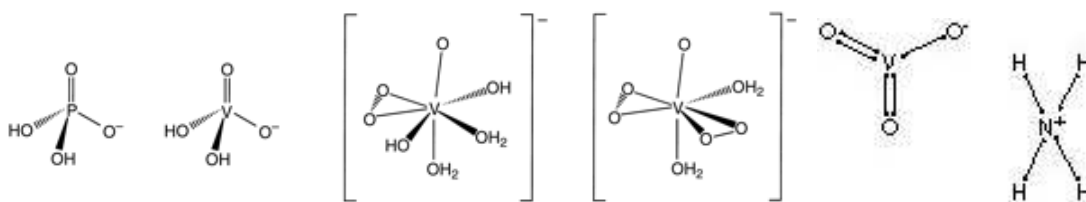
Motívy krásy a smrti už oddávna inšpirovali umelcov i vedcov. Stvorenie dvoch krajností je často sofistické a prepojené. Tak tomu je i v prípade zlúčenín vanádu, kvôli ich krásnym farbám (od brilantovej modrej až po hlboko žltú) a pre ich fatálny tanec s bunkami. Severská bohyňa Vanadis predstavovala krásu. Oproti tomu Atropos jedna z troch sudičiek v gréckej mytológii presekáva niť života, čiže je akýmsi synonymom smrti. Aj príbeh vanádu a jeho zlúčenín je úzko spojený s paradoxom krásy a smrti (lieku a jedu). Vanád bol objavený v roku 1813 španielskym mineralógom *del Rio*, ktorý ho pomenoval panchrómiom. Inšpirovaný paletou farieb, ktoré zlúčeniny tohto kovu v roztokoch poskytujú *Sefström* a *Berzelius* v roku 1830 ho pomenovali ako **vanádium** na počesť Vanadis (*Waters, 1977; Shaver a spol., 1995*). Je to prechodný kov, ocelovo sivej farby (*Bencko a spol., 1995*), ktorý môže existovať vo viacerých oxidačných stupňoch (-3, -1, 0, +1, +2, **+3**, **+4** a **+5**). Vo vodnom roztoku je zisťovaný len v oxidačnom stave +2 až +5, v biologických systémoch len v oxidačných stavoch +3, +4 a +5 (*Butler a spol., 2001*). Oxoanionické vanadičnany ($\text{HVO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{VO}_4^-$; pK_a 8,3) sú najčastejšie sa stabilne vyskytujúce druhy vo vodných roztokoch pri neutrálnom pH (*Chasteen, 1990*). Poznáme viacero rádioizotopov vanádu a to $^{23}\text{V}^{46}$, $^{23}\text{V}^{47}$, $^{23}\text{V}^{48}$, $^{23}\text{V}^{49}$, $^{23}\text{V}^{50}$, $^{23}\text{V}^{52}$, $^{23}\text{V}^{53}$, $^{23}\text{V}^{54}$ a stabilný $^{23}\text{V}^{51}$. Kovový vanád sa v prírode nevyskytuje. Tento stopový, ubikvitárny kov sa nachádza v zemskej kôre v koncentrácii približne $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (okolo 0,02%), v oceánoch je po molybdéne druhým najčastejším prechodným kovovým iónom (30-50 nmol/l). Obsahuje ho približne 65 známych minerálov, je hlavným stopovým prvkom vo fosílnych palivách (*Owusu-Yaw a spol., 1990*) [doluje sa len

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

karnatit, $K(UO_2)_2(VO_4)_2$ a vanadinit], v špecializovaných krvinkách určitých morských živočíchov (napr. Tunicata [plášťovce], rad Ascidiacea až do 0,15 mol), v peroxidázach morských rias, v niektorých nitrogenázach rodu Azobacter a v tkanivách cicavcov (*Morinville a spol.*, 1998). V tele potkanov je malé množstvo vanádu (*Ramasarma a spol.*, 1981) a jeho odstraňovanie z krvi je rýchle (*Sabbioni a Marafante*, 1978). V ľudskom tele sa nachádza v množstve 100-200 μg (*Byrne a Kosta*, 1993). Denný prívod je menší ako 50 μg (*Nielson*, 1995). Odporúčaný denný príjem doposiaľ nebol predložený v žiadnej krajine. Množstvo potrebné pre biologické účinky (inzulín-mimetický, 100-125 mg pro toto) obyčajne významne prevyšujú toto množstvo. Vanád je považovaný za esenciálny stopový prvok (*Ramasarma a Crane*, 1981), ale jeho biologické funkcie nie sú úplne známe (*Nechay*, 1984; *Pugazhenti a Khandelwal*, 1990), aj keď sa vie, že je dôležitý pre normálnu funkciu a vývoj buniek (*Badmaev a spol.*, 1999; *Thompson*, 1999). U nižších organizmov sú známe vanád-dependentné enzýmy, ako nitrogenáza u baktérií (redukuje molekulový dusík na amoniak), jodoperoxidáza a bromoperoxidáza u rias a lišajníkov (katalizujú oxidáciu halogénových iónov, čím facilitujú tvorbu väzby C-H). Haloperoxidázy, napr. tyroidálne peroxidázy zohrávajú esenciálnu úlohu u vyšších živočíchov a deprivácia vanádu u potkanov narúša odpoveď tyroidálnej peroxidázy na zmeny hladín dietetického jódu (*WHO*, 1996). Aj keď je o presných mechanizmoch účinku vanádu známe pomerne málo, je prítomný v rôznych multivitamínových prípravkoch v množstve okolo 10 μg . V rôznych prípravkoch pre kulturistov sa odporúča denný príjem okolo 7,5-10 mg síranu vanadičitého. V biologických systémoch sa vanád vyskytuje obyčajne ako vanadičnan (V^{5+} , VO_3^- , obr. 1) a vanadičitan (V^{4+} , VO^{2+}) (*Chasteen*, 1983). V plazme sa vanád vyskytuje v oboch formách. Päťmocná forma prevláda v extracelulárnej tekutine, zatiaľ čo štvormocná forma je typická pre intracelulárny priestor. Intracelulárna aktívna forma vanádu nie je precízne definovaná a miesta účinku vanádu v signálno-transdukčných dráhach nie sú známe (*Cam a spol.*, 2000). Približne 90% vanádu je viazaného na proteíny, najmä transferín (*Nechay*, 1984), čím sa predpokladá jeho možná interferencia so železom. Väčšina prijatého vanádu, je pravdepodobne neabsorbovaná (98-99,9%) a vylúčená s féces (*Nielsen*, 1988). Zbytok asi 0,1-2% je trans-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

formovaných v žalúdku na VO^{2+} a v tejto forme je absorbovaný v duodéne. Koľko percent z prijatého vanádu bude absorbovaného závisí pravdepodobne od toho v akej forme bol prijatý. Prednostne je distribuovaný do kostnej drene, gonád, obličiek a pečene po i.p. podaní. Kostná dreň je hlavným depotom vanádu (Talvite a Wagner, 1954). Z absorbovaného vanádu asi 60% sa vylúči do 1-3 dní močom (Curran a spol., 1959; Barceloux, 1999). Ďalších <10% je vylúčených s féces.



obr. 1 – Fosfát, vanadičnan, pervanadičnan a najčastejšie používaníu metavanadičnan amónny

Tkanivová koncentrácia vanádu je pomerne nízka, vyššia je len v kostiach, zuboch, pečeni, obličkách a pľúcach. Malé množstvo vanádu sa nachádza aj v placentе a semenníkoch. Vanád je prítomný v materskom mlieku a slinách, prechádza cez hematoencefalickú bariéru. Normálna koncentrácia vanádu v sére u zdravých ľudí je nižšia ako 1-2 $\mu\text{g/l}$ (Barceloux, 1999).

Atómovou absorpčnou spektrometriou (AAS) sa zistilo, že sa nachádza v nápojoch, tukoch, olejoch, čerstvom ovocí a vegetabilách približne v množstve 1 až 5 ng/g (Myron a spol., 1977). Celé obilie, morské požívatiny, mäso a mliečne výrobky obsahujú okolo 5 až 30 ng vanádu/ g požívatiny. V upravovaných požívatinách sa jeho množstvo pohybuje v rozmedzí 11-93 ng/g , ale semenách kopru a v čiernom korení ho je 431 až 987 ng/g . Len málo potravín ho obsahuje v množstvách väčších ako 100 ng/g , napr. špenát, petržlen, ústrece a huby. Obsah vanádu v rastlinných požívatinách môže byť aj vyšší v závislosti na jeho výskyte v pôde v ktorej sú rastliny pestované. Za bežných podmienok môžu semená pšenice, jačmene, ovsu a hrachu obsahovať vanád v množstve 28 až 55 ng/g . V pôdach s vysokým obsahom vanádu, môže dosiahnuť obsah vanádu v týchto vegetabilách 75 až 175 ng/g (Welch a Cary, 1975). Aj keď je v požívatinách obyčajne nízky obsah vanádu, predstavujú hlavný zdroj tohto mik-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

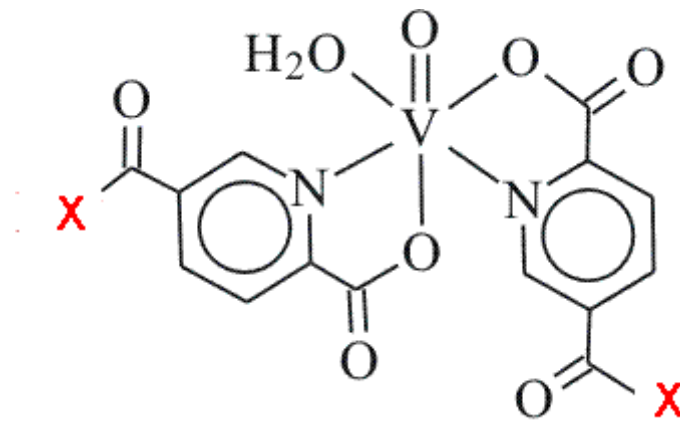
roelementu. V pitnej vode sa nachádza približne v množstve 5 µg/l (1-30 µg/l, WHO, 1988). Vo vzduchu sa nachádza obyčajne vo forme oxidov (najmä V₂O₅), uvoľňuje sa do vzduchu obzvlášť pri čistení kotlov. Tomuto oxidu sú najčastejšie vystavené aj dýchacie cesty a pľúca. V niektorých pokusoch bolo zistené, že asi 25% rozpustného vanádu je vstrebaných v pľúcach. U profesionálov vystavených vyšším koncentráciám vanádu je vyššia prevalencia astmy. Rozpustné zlúčeniny vanádu môžu do organizmu vstupovať aj cez kožu.

Výskyt špecifických príznakov **deficiencie vanádu** sú diskutabilné (Nielson, 1988). Zatiaľ len v jednej rozsiahlej epidemiologickej štúdií (Masironi, 1969) sa ukázala korelácia medzi nízkym príivodom vanádu a zvýšením výskytom kardiovaskulárnych ochorení. U zvierat, menovite u kôz bolo zistené (Anke a spol., 1986), že pri kŕmení s diétou, ktorá obsahovala len 10 ng vanádu/g diéty (oproti 2 µg/g v štandardnej diéte) sa častejšie vyskytovali spontánne potraty a produkcia mlieka bola nižšia počas laktácie. Bola aj vyššia mortalita kozliatok od matiek, ktoré mali na vanád chudobnú diétu. U týchto kôz bol zvýšený kreatinín v sére a β-lipoproteín, glukóza v sére boli znížené. Zistili sa aj deformácie skeletu vo forme zhrubnutia tarzálnych kíbov.

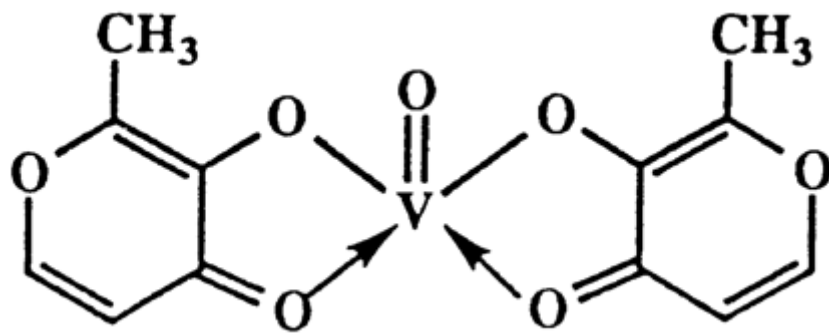
V 18-20. storočí bol vanád predpisovaný pri celom rade ochorení ako anémia, infekcie (tuberkulóza), prevencia zubného kazu, ateroskleróza, diabetes a na vylepšenie nutričného stavu (Water, 1977). Už v roku 1899 bol popísaný glykozúriu redukujúci účinok soli vanádu u diabetikov (Lyonnet a spol., 1899). Koncom 70. a začiatkom 80. rokov minulého storočia sa znova upriamila pozornosť na vanadičnany (V⁵⁺) pre ich inzulínu podobný účinok v bránici potkanov a v izolovaných adipocytoch in vitro (Tolman a spol., 1979; Dubyak a Kleinzeller, 1980; Shechter a Karlish, 1980). Potom sa preukázal aj glykémii znižujúci efekt roztokov vanadičnanu u diabetických potkanov (Heyliger a spol., 1985). Výskum sa potom začal uberať dvoma smermi:

- na štúdium organických derivátov vanadičtanov (obr. 2; V⁴⁺, McNeill a spol., 1995),
- a na štúdium peroxovanadičnanových komplexov (obr. 3; V⁵⁺, Bevan a spol., 1995a).

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

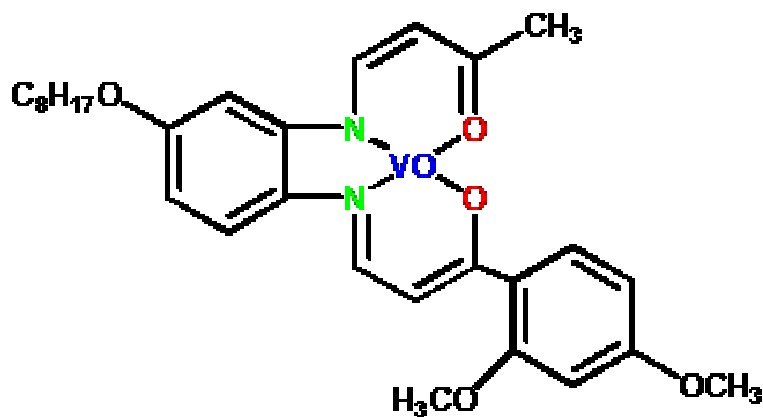


bis(picolinato)vanadium (IV) komplex



bis(maltolato)oxovanadium IV (BMOV)

obr. 2 – Organické zlúčeniny vanadičitanu



obr. 3 – Organické zlúčeniny vanadičnanu

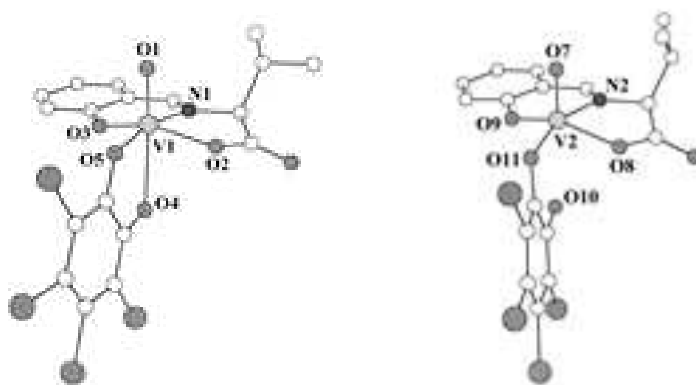
Kombinácia dvoch látok so slabým inzulínomimetickým účinkom, vanadičnanu (V^{5+}) a peroxidu vodíka vo vode, vedie k synergickému inzulínu podobnému efektu in vitro (Posner a spol., 1994; Bevan a spol., 1995b). Ale pre nízku stabilitu peroxovanadičnanov a vysokému počtu druhov v rovnovážnom kom-

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

plexe sa započalo s vývinom nových, stabilnejších a štruktúrne definovaných peroxovanadičnanových komplexov. Samozrejme tieto komplexy okrem inzulínu podobného efektu majú aj iné účinky na bunky a organizmus. Vanadičnany stimulujú transport hexózu (Dubyak a Kleinzeller, 1980), stimulujú lipogézu (Shechter a Ron, 1986), inhibujú lipolýzu (Degani a spol., 1981), stimulujú oxidáciu glukózy (Shechter a Karlsh, 1980) a stimulujú glykogén syntázu v adipocytoch (Tamura a spol., 1983).

2. Chemické vlastnosti zlúčenín vanádu

Vanadičnan podlieha polymerizačným reakciám v závislosti od jeho koncentrácie, pH, a povahy ostatných iónov v roztoku (Sigel a Sigel, 1995). V neutrálnom alebo zásaditom prostredí, peroxid vodíka koordinuje vanadičnany na tvorbu oxoperoxovanadičnanov, s jedným až štyrmi koordinovanými peroxidovými ligandmi, resp. k tvorbe peroxodivanadičnanov, v závislosti od reakčných podmienok (Crans a Tracey, 1998). Najčastejšie je geometria vanadnatých a vanaditých komplexov oktahedrálna, zatiaľ čo vanadičitanov a vanadičnanov je omnoho flexibilnejšia, môže zaujať tetrahedrálnu, trigonálnu bipyramidálnu, oktahedrálnu a pentagonálnu bipyramidálnu geometriu (obr. 4).

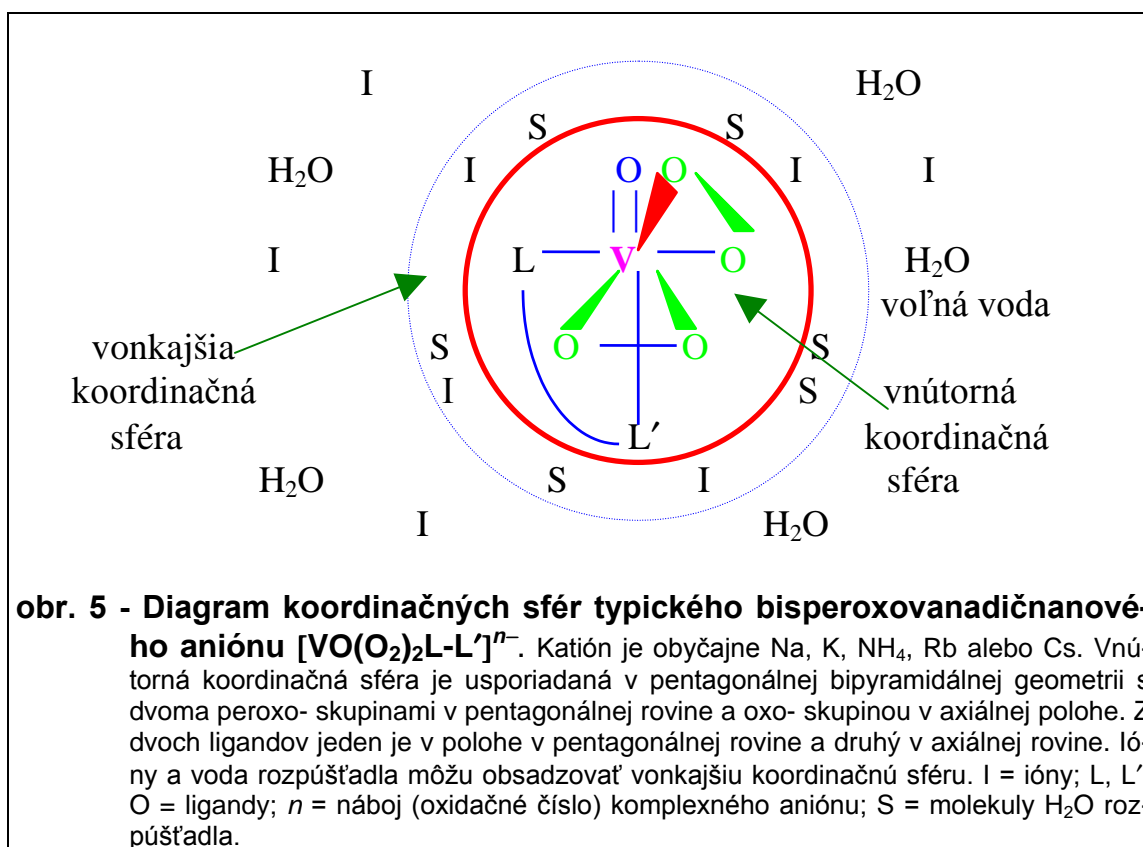


obr. 4 – Rôzne geometrie katecholátu vanadičnanov

Vnútorňá koordinačná sféra prechodných kovov typu vanádu umožňuje dobre definovanú geometriu, oproti tomu vonkajšia koordinačná sféra je ťažko

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

definovateľná. Ligandy odovzdajú dva elektróny vnútornej koordinačnej sféry kovu a výsledná väzba má kovalentný charakter. Relatívna ľahkosť s ktorými ligandy môžu vstupovať a opúšťať vnútornú koordinačnú sféru vedú k tvorbe „labilných“ komplexov, oproti tomu nedostatočná pohyblivosť charakterizuje „inertné“ komplexy. V kryštalickom stave, vnútorná koordinačná sféra peroxovanadičnanových komplexov charakterizujú také dobre definovateľné geometrie, ako pentagonálna bipyramidálna a oktahedrálna. V typickom peroxokomplexe (obr. 5) je vanádový ión situovaný v centre pentagonálnej bipyramídy, s jedným alebo dvoma peroxo skupinami v pentagonálnej rovine. Samotná oxo skupina je umiestnená kolmo na pentagonálnu rovinu (axiálne). Zbývajúce pozície môžu byť obsadené jedno- alebo viacerými ďalšími ligandmi. Tieto ligandy obyčajne obsahujú vhodné atómy, ktoré sú donormi elektrónového páru, napr. dusík alebo kyslík (Djordjevic a spol., 1995).



Dvojvázbové ligandy tvoriace päťčlenný kruh v centre s vanádom významne prispievajú k stabilite takéhoto komplexu. Pomocou X-lúčovej kryštalog-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

ráfie bola určená trojdimenzionálna štruktúra mnohých v súčasnosti syntetizovaných peroxovanádových komplexov. Mono- a bisperoxovanádové druhy sa dajú ľahko odlíšiť ^{51}V nukleárnou magnetickou rezonanciou (NMR).

Stabilita roztokov vanadičnanu v značnej miere závisí (najmä pred hydrolyzou alebo polymerizáciou) od pH a koncentrácie vanadičnanu, a od toho závisí obyčajne aj biologický účinok (*Crans a spol., 1995*). Navyše, pre labilitu vnútornej koordinačnej sféry, vanadičnan pohotovo interaguje s potencionálnymi donormi elektrónového páru, napr. dusíkatými bázami a hydroxylovú skupinu obsahujúcimi zlúčeninami, sťažujúc tak identifikáciu reaktívnych foriem zlúčenín. Vodné peroxovanadičnany, vznikajúce kombináciou vanadičnanu a peroxidu vodíka v roztoku a po odstránení nadbytku peroxidu katalázou, majú polčas života len 1-2 hodiny (*Posner a spol., 1994*). Prítomnosť prídavných ligandov zvyšuje kinetickú stabilitu peroxovanadičnanov v porovnaní s vanadičnanmi alebo akvatickými peroxovanadičnanmi. Peroxovanadičnanové zlúčeniny môžu byť uskladnené veľmi dlho pri 4°C , ak sú v suchom stave a chránené pred svetlom. Vystavenie svetlu urýchľuje rozklad týchto komplexov, najmä v roztoku (*Crans a spol., 1995*). Stabilita rôznych komplexov sa mení v závislosti na druhu heteroligandu (*Djordjevic a spol., 1995*). Peroxovanadičnanové komplexy sú stále vo vodných roztokoch počas niekoľkých dní (2-30 dní) pri neutrálnom alebo mierne zásaditom pH. Tieto údaje o stabilite ale nie sú extrapolovateľné na živý systém. Syntézou peroxovanadičnanových komplexov sa na Slovensku zaoberajú na Ústave anorganickej chémie, Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave (*Chrappová a spol., 2002*). V biologických systémoch sú potrebné na overenie a upresnenie situácie ďalšie štúdiá. V Tab. 1 sú zhrnuté charakteristiky zlúčenín vanadičnanu.

Z vanadičtanov sa najčastejšie používa v biologických pokusoch síran vanadičitý (VO_2SO_4).

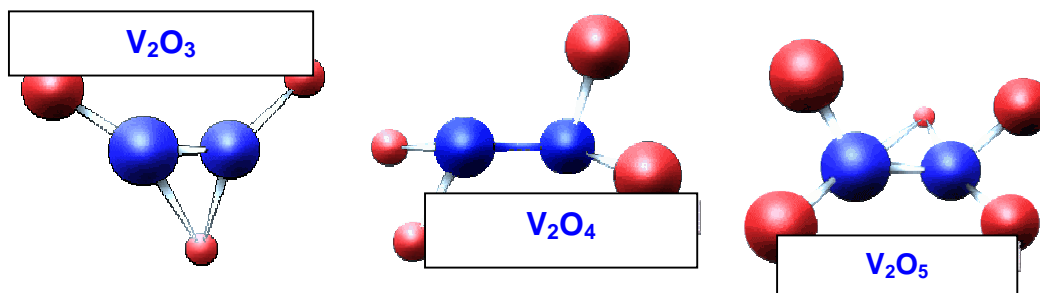
Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

Tab.1 - Klasifikácia vanadičnanov (V^{5+}): ich názvy, vzorec alebo príprava a kinetická stabilita.

Názov	vzorec/príprava	kinetická stabilita	literatúra
Vanadičnan ortovanadičnan metavanasičnan	soli VO_3^- vo vode	počet prvkov v rovnováhe, závisí na pH roztoku a koncentrácii vanadičnanu, ako aj na prítomnosti donorov elektrónového páru	<i>Crans, 1994</i> <i>Crans, 2000</i>
Pervanadičnan peroxovanadičnan vodný peroxovanadičnan [pV(aq)]	pripravený zmiešaním VO_3^- a H_2O_2 in situ	od počtu častíc v rovnovážnom komplexe, počas vo vodnom roztoku 1-2 hod, stabilita v biologickom systéme nebola charakterizovaná	<i>Posner a spol., 1994;</i> <i>Campbell a spol., 1989;</i>
peroxo- vanadičnanový komplex	bis- druh: $M[VO(O_2)_2L]^n \cdot xH_2O$ mono- druh: $M[VO(O_2)L]^n \cdot xH_2O$	neobmedzene uskladniteľné pri 4°C a v tme v neutrálnych alebo mierne zásaditých vodných roztokoch stály niekoľko dní, stabilita v biologických systémoch neznáma	<i>Shaver a spol., 1995;</i> <i>Djordjevic a spol., 1995;</i> <i>Crans a spol., 1995;</i>
<i>L = ligand; M = kation; n = náboj (oxidačné číslo) komplexu; x = počet molekúl kryštalickej viazanej vody</i>			

3. Toxicita vanádu

Toxicita vanádu závisí od povahy jeho zlúčeniny, ale môže byť toxický aj vo forme kationu aj aniónu. Vo všeobecnosti toxicita stúpa oxidačným číslom, najtoxickejší je V^{5+} . Z oxidov vanádu je pentaoxid vanádu (V_2O_5) rozpustnejší a výrazne toxickejší ako trioxid alebo dioxid vanádu (obr. 6). Letálne dávky (LD_{50}) u potkana pri parenterálnej aplikácii pre síran vanadičitý sú okolo $35-45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ živej hmotnosti, vanadičnan amónny $1-2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ živej hmotnosti a pre vanadičnan sodný $30-40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ živej hmotnosti (*National Academy of Sciences, Washington, 1974*).



obr. 6 – Zlúčeniny vanádu s kyslíkom

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

Jedným z možných mechanizmov intoxikácie, najmä v prípade vanadičitánov je generácia voľných radikálov a hydroxylačné poškodenie DNA (*Shi a spol., 1996*).

Klinický obraz je veľmi rozmanitý pri toxickom pôsobení vanádu. Prejaví sa nepriaznivými účinkami na dýchací systém, CNS, tráviaci trakt, obličky a kožu. K otravám došlo obyčajne po **inhalačnej expozícii**.

Akútna toxicita je charakterizovaná latentným obdobím, ktoré závisí od koncentrácie vanádu, senzitivity jedinca a vlastností príslušnej zlúčeniny vanádu. Vysoko rozpustné soli pentaoxidu vanádu majú podstatne rýchlejší účinok ako ostatné oxidy vanádu. Najtoxickjšími zlúčeninami vanádu sú chloridy. Príznaky sú reprezentované rinitídou s profúznym často krvavým výtokom, kýchaním, svrbivým a pálivým pocitom v hrdle, všeobecnou slabosťou a vyčerpaním. Často sa zisťuje aj konjunktivitída. Poruchy tráviaceho traktu sú reprezentované hlavne zvracaním a hnačkou. Spolu s bronchospazmom je možné tieto príznaky pripísať účinkom vanádu na hladkú svalovinu. Postihnuté osoby môžu mať aj kožné príznaky vo forme eflorescencií a ekzémov. Pri ťažších intoxikáciách sa objaví bronchitída a bronchopneumónia. Z ďalších príznakov je možné spomenúť bolesti hlavy, palpitácie a potenie. Zo strany nervového systému sú príznaky charakterizované tremorom prstov a rúk. V obličkách sa objavia dystrofické zmeny epitelu tubulov.

Chronická intoxikácia je charakterizovaná prevažne príznakmi zo strany dýchacieho traktu, alebo lokálnou iritáciou.

K intoxikáciám často dochádza aj pri **suplementačných štúdiách u ľudí** so zlúčeninami vanádu, najmä v klinických testoch terapie diabetu (obyčajne pri aplikácii síranu vanadičitého $VOSO_4$ v dávkach okolo 100-125 mg/deň). Najčastejšie sa zisťujú hnačky (*Domingo, 2000*), nauzea, hnačky a žalúdočné kŕče (*Cohen a spol., 1995*). Okrem týchto sa zisťuje aj flatulancia (*Boden a spol., 1996*), svetlá stolica (*Halberstam a spol., 1996*), zvracanie (*Goldfine a spol., 1995*), anorexia a strata na hmotnosti (*Somerville a spol., 1992*).

Zaujímavé je zistenie, že v prípade gestačného diabetu boli zistené nižšie hodnoty vanádu v placentе než u zdravých žien (*Manci a spol., 1989*), z čoho

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

vyvodili, že pri diabetes mellitus následkom nedostatku inzulínu sa vanád vychytáva tkanivom matky a nedostáva sa do placenty.

U zvierat boli popísané intoxikácie aj po inhalačnej, perorálnej i parenterálnej intoxikácii. LD₅₀ pre trioxid vanádu je okolo 130 mg/kg hmotnosti pre pentaoxid 23 mg/kg po perorálnej aplikácii u myšiek. Pri aplikácii 10 resp. 40 µg NaVO₃/ml pitnej vody u potkanov po dobu siedmich mesiacov zistili (*Boscolo a spol., 1994*), že u pokusných zvierat došlo k zvýšeniu systolického aj diastolického tlaku krvi, k poškodeniu proximálnych a distálnych tubulov ako aj Henleovej slučky v obličkách.

Pri dávkach okolo 20 mg vanadičnanu/kg/deň pažerákovou sondou v priebehu 14 dní u šiestich samcov pred pripustením so samicami, ktoré dostali rovnakú dávku počas 14 dní pred pripustením, ale aplikácia u samíc pokračovala aj počas gravidity a laktácie nemalo významný vplyv na fertilitu a pôrodnosť (počet narodených mláďat), ale boli zistené účinky na telesnú hmotnosť, veľkosť tela a dĺžku chvosta u mláďat (*Domingo a spol., 1986*). Ďalšie poznatky o reprodukčnej toxicite (predčasný pôrod, embryotoxicitu, fetotoxicitu, teratogenitu, karcinogenitu a pod.) vanádu popísali aj iní autori (*Edel a Sabioni, 1989; Paternain a spol., 1990; Gomez a spol., 1992; Llobet a spol., 1993; Ganguli a spol., 1994; Rojas a spol., 1996; Altamizano-Lozano a spol., 1999*).

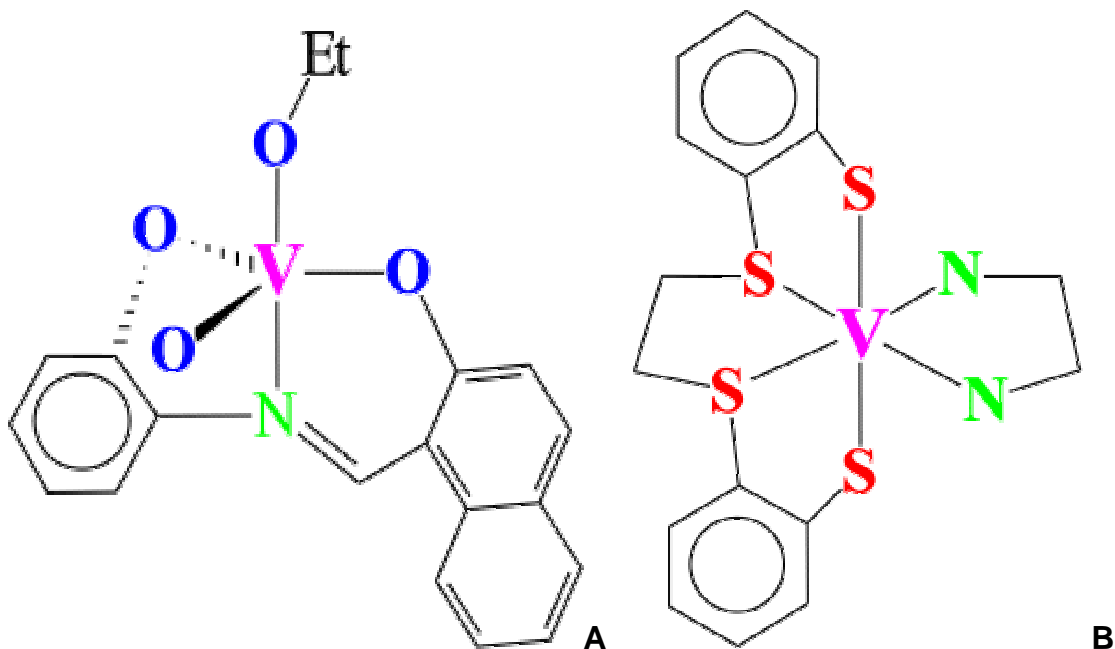
Pri porovnaní organických a anorganických zlúčenín vanádu sa zistilo (*Srivastava, 2000*), že organické zlúčeniny sú vo všeobecnosti podstatne menej toxické. Po vyradení alebo znížení dávok väčšina negatívnych vedľajších resp. toxických účinkov vymizne (*Sarubin, 2000*).

4. Biologické účinky zlúčenín vanádu a mechanizmus účinku

Mechanizmus účinku vanádu in vivo je mimoriadne zaujímavým problémom. Na jednej strane vyplýva z toho, že vanád je koenzýmom (obr. 7) takých enzýmov ako sú haloperoxidázy (morské živočíchy, kvasinky, riasy), chloroperoxidázy (*Pseudomonas pyrrocina*, plesne, huby), bromoperoxidázy (morské

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

riasy, morské živočíchy), vanádiové nitrogenázy (niektoré baktérie), myeloperoxidáza, eozinofilová peroxidáza a laktoperoxidáza (cicavce). Na druhej strane z toho, že vanadičnany (vanád) kompetitívne inhibujú fosfatázy (Léonard a Gerber, 1994; Guerrieri et al., 1999). Zistilo sa, že remetalizácia apohaloperoxidáz je inhibovaná fosfátom. To naznačuje, že kyslé fosfatázy a vanádiové haloperoxidázy by mohli mať podobnú trojdimenzionálnu štruktúru aktívneho miesta, ako aj podobnú sekvenciu aminokyselín (Butler a spol., 2001). Vanádium vplýva na metabolizmus uhľovodíkov, vrátane transportu glukózy, translokácie glukózových transportérov, glykolýzy a glykolytických enzýmov, oxidácie glukózy, príjmu glukózy a syntézy glykogénu (Shechter a Karlish, 1980; Tamura a spol., 1983, 1984; Duckworth a spol., 1988; McNeill a spol., 1994; Nakai a spol., 1995; Orvig a spol., 1995). Inzulínu podobné účinky vanádu ovplyvňujú aj cesty metabolizmu lipidov, bielkovín a mitogénzu (Jackson a spol., 1954; Hajjar a spol., 1987; Maher, 1992; Barnes a spol., 1995; Morita a spol., 1995). Novšie in vitro štúdiá popisujú zvýšenú aktiváciu signalizácie prostredníctvom Ca^{2+} cez oxidáciu tiolov proximálnych elementov v signálno-transdukčnej kaskáde (Ehring a spol., 2000).



obr. 7 – Vanádová haloperoxidáza (A) a nitrogenáza (B)

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

Inzulín mimetický účinok. Väčšina údajov o biologických účinkoch vanádu a zlúčenín vanádu sa týka ich inzulínu podobného účinku in vitro aj in vivo (Heyliger a spol., 1985; McNeill a spol., 1995; Orvig a spol., 1995; Shaver a spol., 1995). Vanadičnany (V^{5+}) a vanadičitaný (V^{4+}) vyvolávajú inzulínmimetický účinok v troch hlavných oblastiach: v pečeni, adipocytoch a v svaloch (Bevan a spol., 1995; McNeill a spol., 1995). Oba modifikujú metabolizmus glukózy v adipocytoch a svaloch in vitro, zvýšením príjmu glukózy a jej oxidácie ako aj syntézy glykogénu. Základné vplyvy na signálnu dráhu inzulínu uvádzame na Tab. 2 (Cam, 1996). Zároveň inhibujú glukoneogénu v hepatocytoch (Heffetz a spol., 1990; Bevan a spol., 1995; McNeill a spol., 1995). Schopnosť vanádu vyvolať euglykémiu bez zvýšenia hladiny inzulínu v plazme svedčí o tom, že jeho účinok bude vo zvýšení senzitivity voči inzulínu. Bolo preukázané, že vanád pôsobí proti inzulínovej rezistencii (Bhanot a spol., 1994). Meyerovitch a spol. (1987) dokázali, že chronické podávanie metavanadičnanu sodného znižuje hladinu glukózy v plazme a zvyšuje bazálny transport hexóz v pečeni a svaloch. Dávkovo závislostný vzťah pre vanadičnan preukázali Brichard a spol. (1988). Niektoré dobre popísané účinky vanádu u streptozotocín (STZ) diabetických potkanov sú uvedené v Tab. 3.

Tab. 2 – In vitro účinky vanádu na signálnu dráhu inzulínu

Stimuluje autofosforyláciu inzulínového receptora.
Zvyšuje tyrozínkinázovú aktivitu inzulínového receptora.
Stimuluje down-reguláciu inzulínových receptorov.
Zvyšuje väzbovosť inzulínového receptora.
Zvyšuje aktivitu tyrozínových proteínkináz.
Zvyšuje aktivitu Ser/Thr proteínkináz.
Inhibuje aktivitu fosfotyrozínových fosfatáz

Tieto účinky na metabolizmus glukózy in vitro sú v súlade so zistením zníženia hladín glykémie u diabetických potkanov, ktorým boli per os podané zlúčeniny vanadičnanov a vanadičitanov (Bevan a spol., 1995). Peroxid vodíka sa podobá vanadičnanu v inzulínu podobnom účinku: zvyšuje transport glukózy a jej oxidáciu a syntézu glykogénu (Heffetz a spol., 1990). Kombinácia peroxidu vodíka a vanadičnanu vedie k zvýšenému inzulínmimetickému účinku. Tento synergizmus je pripisovaný tvoriacim sa akvatickým peroxovanadičnanom. Sta-

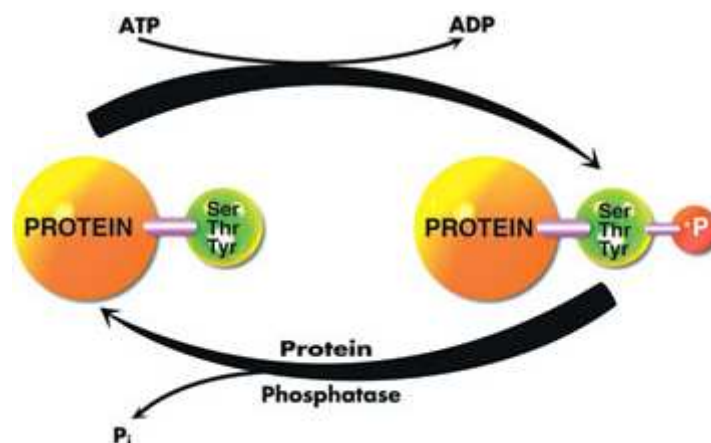
Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

bilný peroxovanadičnanový komplex obsahujúci ďalšie ligandy mal významnejší inzulínmimetický účinok ako roztoky vanadičnanu alebo peroxidu vodíka osebe.

Tab. 3 – In vivo účinky vanádu u STZ-diabetu

ÚČINOK	Literatúra
Zlepšenie inzulínovej rezistencie, výrazným znížením hladiny glukózy v krvi, zvýšením citlivosti k inzulínu	<i>Ramadhani a spol., 1990</i>
Normalizácia bazálnej a stimulovanej tvorby glukózy v pečeni po chronickej administrácii vanádu	<i>Blondel a spol., 1989</i> <i>Miralpeix a spol., 1990</i>
Zvýšená citlivosť inzulínu vanádom ošetrovaných potkanov koreluje s obnovou inzulínu stimulovaného aktiváciou MAP a S6 kináz v priečne pruhovaných svaloch	<i>Hei a spol., 1995</i>
Chronické podávanie vanádu upravuje abnormality v glykolytických enzýmoch, napr. fosfofruktokináze 2 a glukokináze	<i>Gil a spol., 1988</i>
Obnova aktivít glykogén syntázy a fosforyláz	<i>Pugazhenti a spol., 1990</i>
Odchýlky v tkanivovošpecifickej expresii dvoch izoform glukózových transportérov u STZ-diabetu sa podávaním vanádu upravia	<i>Brichard a spol., 1993</i>
Zlepšenie následkov oxidatívneho stresu	<i>Thompson a McNeill, 1993</i>

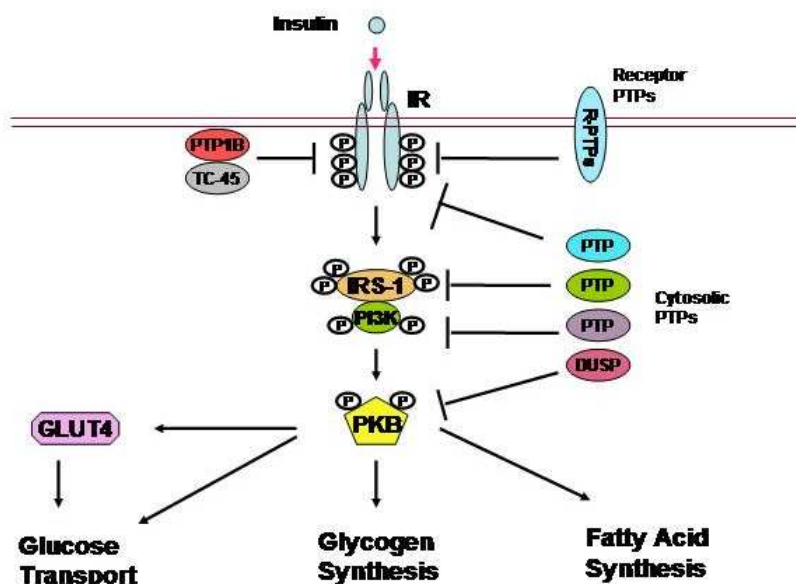
Peroxovanadičnanové komplexy sa in vitro ukázali ako 100-1 000 násobne účinnejšie inhibítory tyrozínových proteínfosfatáz (PTPs) ako ortovanadičnan sodný (*Bevan a spol., 1995*). Inhibícia PTPs má za následok zvýšenie bunkových fosforylácií (obr. 8), ktoré môže byť hlavným mechanizmom pre inzulínmimetický efekt tak, že sú dobre podmienky pre autofosforyláciu tyrozínkinázového receptora inzulínu. Ale všetky mechanizmy inzulín podobných účinkov týchto komplexov sú zatiaľ nevysvetlené (*Posner a spol., 1994; Fantus a spol., 1995; Drake a spol., 1996*).



obr. 8 – Úloha PTP (tyrozínových proteínfosfatáz) v bunkových fosforyláciách

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

Nakoľko fosfatázy defosforylujúce rozhodujúce tyrozínové zvyšky β -subjednotky inzulínového receptora sú inhibované (obr. 9), preto dochádza k aktivácii inzulín receptorovej kinázy (IRTK).



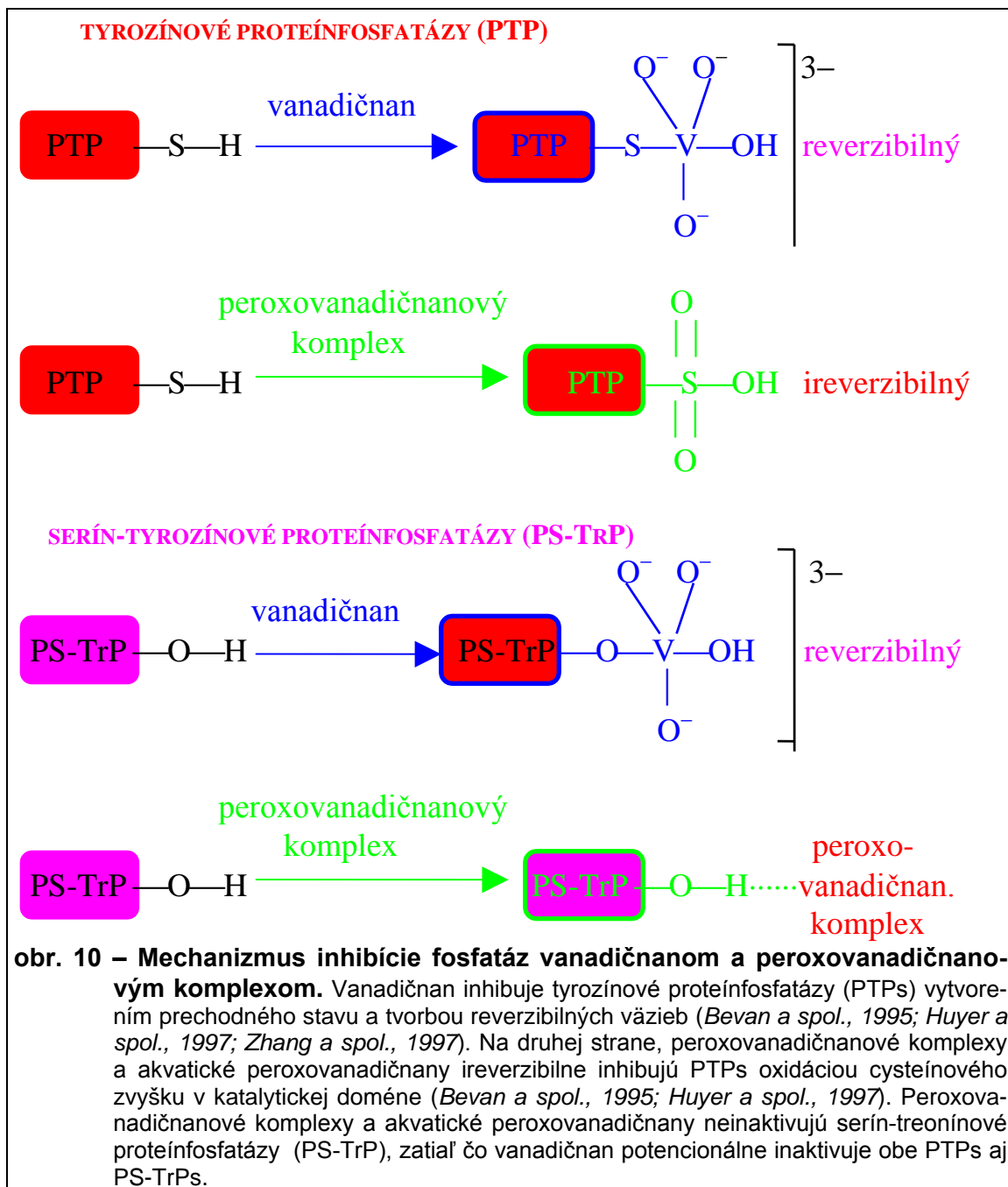
obr. 9 – Účinok PTPs na inzulínový receptor a jeho činnosť

Mechanizmus inhibície PTP je rozdielny u vanadičnanov a peroxovanadičnanových komplexov (obr. 10). Napriek tomu sa zdá, že pre inzulínmimetický účinok nie je bezpodmienečne potrebná inhibícia PTPs. Je potrebné upozorniť, že niektoré podobné komplexy s iným prechodným kovom (napr. molybdénom alebo ortuťou) môžu tiež inhibovať PTP, ale in vivo sú ako inzulínmimetiká neúčinné (Shaver a spol., 1995). V prípade peroxovanadičnanových komplexov je in vivo účinok významne ovplyvnený typom prídavných ligandov (Posner a spol., 1994; Bevan a spol., 1995). Modifikáciou týchto prídavných ligandov je možné modulovať účinnosť týchto komplexov.

Pri perorálnom podávaní vanádu okrem zníženia glykémie (Mooney a spol., 1989) zistili aj významný účinok zníženia periférnej inzulínovej rezistencie nadmernou stimuláciou inzulínových receptorov inzulínom (Green, 1993). Dokázal sa aj vplyv vanádu v inzulínmimeticknej oblasti na úrovni postreceptorovej inzulínom vyvolanej signálo-transdukčnej kaskády (Shechter a spol., 1992;

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

Shisheva a Shechter, 1993). Na postreceptorovej úrovni prebieha komplikovaná kaskáda fosforylácií a defosforylácií. Centrálné postavenie v tejto kaskáde má MAP kináza, ktorú vanád stimuluje (Hei a spol., 1994). Ďalším možným mechanizmom je zvýšenie aktivity cAMP fosfodiesterázy (Ueki a spol., 1992). Bol preukázaný aj účinok vanadičnanu na expresiu niektorých génov zapriahnutých v homeostáze glukózy, vrátane PEPCK a glukózových transportérov (Strout a spol., 1990; Paquet a spol., 1992; Ferber a spol., 1994).



Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

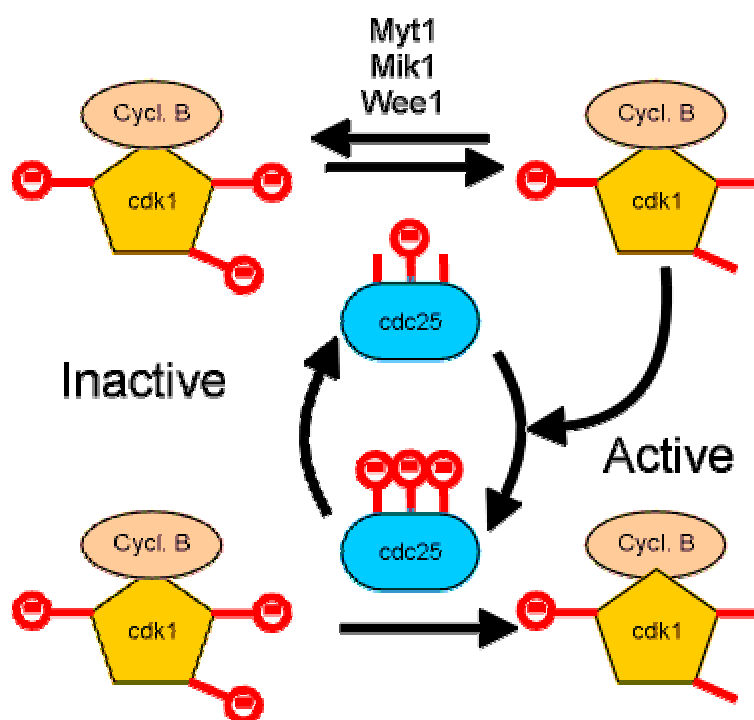
Dnes sú jednoznačne považované zlúčeniny vanádu za potencionálne terapeutiká pri liečení diabetu 1. aj 2. typu (*Thompson, 1999; Srivastava, 2000*).

Vplyv na bunkový cyklus. Biologické účinky komplexov vanádu nie sú ohraničené len na inzulínmimetické vlastnosti. Inhibícia PTPs súvisí s celým radom mechanizmov dôležitých v signálno-transdukčných procesoch bunky (*Nišťiar a Rácz, 2002*). Je to dôležité napr. aj pre diferenciáciu a rast (predlžovanie) neuritu potkaních feochromocytómových buniek (PC12), podobne aj pre rast neuritov ľudských neuroblastómových buniek SH-SY5Y, čo bolo zistené po ich ošetrovaní ortovanadičnanom sodným (*Rogers a spol., 1994*). Tieto účinky sa dostávajú následkom inhibície PTPs. Mechanizmus je odlišný od diferenciačnej signálnej dráhy, ktorá je indukovaná nervovým rastovým faktorom (NGF). Vanadičnan vykazuje mitogénne vlastnosti u SV40 buniek (*Wang a Scott, 1995*). U C3H10T1/3 myšacích fibroblastov peroxovanadičnaný vedú in situ k proliferácii (*Krady a spol., 1997*). Naopak, v prípade dvoch bunkových línií (neuroblastómu NB41 a gliómu C6) v prítomnosti dvoch peroxovanadičnanových komplexov bola proliferačná rýchlosť znížená (*Faure a spol., 1995*). Redukcia rýchlosti rastu bola spôsobená reverzibilným blokom v G2-M kontrolnom bode bunkového cyklu. Po odstránení peroxovanadičnanového komplexu z kultivačného prostredia, bunky sa znovu delili normálne. Pri netoxických koncentráciách peroxovanadičnanu, tento blok v G2-M bode cyklu je závislý od koncentrácií, na type buniek a na charaktere prídavných ligandov v peroxovanadičnanovom komplexe. Účinok je sprostredkovaný inhibíciou PTP (cdc25, cell division control 25) ktorý defosforyluje katalytickú subjednotku p34^{cdc2} (je to 32 kDa proteín dnes nazývaný CDK1, cyklín dependentná kináza 1) komplexu CDK1–cyklín-B, aktivácia ktorého je nevyhnutná pre postup do mitotickej fázy (*Nišťiar a Rácz, 2002, obr. 11*). Aj keď bola inhibícia PTP (cdc25) in vitro preukázaná, ostáva otvorenou otázkou či peroxovanadičnanový komplex inhibuje v bunke priamo PTP alebo inhibuje určitý krok v signálno-transdukčnom mechanizme v ktorom je PTP zapiahnutý.

Blok bunkového cyklu v bode G2-M vedie obyčajne k apoptóze (*Farinelli a Greene, 1996; Nišťiar a Rácz, 2000; Rácz a Nišťiar, 2000*). Bolo dokázané, že činitele vyvolávajúce blok bunkového cyklu vo fázach S, G2 a M vedú obyčajne

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

ku smrti bunky, oproti tomu činitele vyvolávajúce blok v kontrolnom bode G1-S chráni pred apoptózou (Reed, 2000). Expresia cyklínov D₁, ktoré sú dôležité pre reguláciu prechodu z G0-G1 fázy do S fázy je zvýšená extracelulárnym signálom regulovanou proteínkinázou (ERK) a inhibovaná p38, oba sú členmi mitogénom aktivovanej proteínkinázovej (MAPK) rodiny (Lavoie a spol., 1996). Peroxovanadičnanové komplexy pôsobia na aktivitu týchto kináz a preto majú potenciálny vplyv na bunkový cyklus pri prechode z fázy G0-G1 do S fázy (Foresti a spol., 2001).



Obr. 11 – Úloha cdc25 v bunkovom cykle

Antineoplastický účinok - cytotoxicita. Oproti inzulínu podobnému účinku môže mať vanád in vivo aj antineoplastický účinok (Thompson a spol., 1984). In vitro v koncentráciách 5-10 $\mu\text{mol/l}$, ortovanadičnan sodný vykazoval cytotoxický účinok na línie nádorových buniek (Cruz a spol., 1995). Morfologické zmeny a cytotoxický účinok zistený v štúdiách na bunkách závisel od koncentrácie ortovanadičnanu sodného a od času jeho pôsobenia (vystavenia vanadičnanu). Ak sa k NaVO_3 pridal peroxid vodíka viedlo to k potenciácii toxicity, ktorá bola daná vzniknutým peroxovanadičnanom. Štúdiá s rôznymi peroxova-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

nadičnanovými komplexmi boli vykonané na myšacích leukemických bunkách L1210 (*Djordjevic a Wampler, 1985*). V týchto štúdiách sa ukázalo, že protinádorová aktivita je významne ovplyvnená charakterom prídavného ligandu. Štúdie na bunkových líniách NB41 a C6 s dávkovo závislou toxicitou ukázali, že nízkomikromolárne komplexy (ľahké) vyvolávali reverzibilný blok bunkového cyklu, zatiaľ čo vysoko mikromolárne komplexy sú toxické (*Faure a spol., 1995*). Z toho vyplýva, že prídavný ligand má rozhodujúci význam. Tieto otázky sú predmetom intenzívneho štúdia.

Bunková smrť a komplexy vanádu. V bunkovej smrti je zapojený celý rad signálnych mechanizmov (*Rubin, 1997*), z ktorých v súvislosti s možnou interakciou so zlúčeninami vanádu sú v popredí záujmu procesy modulované MAPK rodinou. O význame vanádu v ostatných apoptotických dráhach vieme len málo (*Derijard, a spol., 1995; Whitmarsh a Davis, 1996; Lee a spol., 1997*). Interferencia zlúčenín vanádu s MAPK signálno-transdukčnou kaskádou môže byť základom jeho inzulín-like účinku, nakoľko aktivácia IRK (intracelulárnym signálom regulovaná proteínkináza) inzulínom vedie ku intracelulárnej aktivácii ERKs a proteínkináz p70^{s6k} a p90^{rsk} (*Pandey a spol., 1995*). Zároveň, nakoľko MAPK superrodina môže byť spojená s prežívaním a bunkovou smrťou, modulácia aktivity tejto rodiny bude zodpovedná za toxicitu zlúčenín vanádu. Soli vanádu, menovite ortovanadičnan sodný, síran vanadičitý a metavanadičnan sodný stimulujú ERK-1 a ERK-2, p70^{s6k} a p90^{rsk} u buniek CHO. Aktivácia p90^{rsk} je pravdepodobne následkom jej fosforylácie prostredníctvom ERK. Zvyšená aktivita týchto kináz je považovaná za základný nechanizmus inzulín-mimetického účinku solí vanádu. ERK-1 a ERK-2 sú pod kontrolou PTPs. *Krejsa a spol. (1997)* tvrdia, že pri účinku peroxovanadičnanov zohráva významnú úlohu oxidačný stres.

Napriek tomu, že o účinkoch peroxovanadičnanov sa už vie veľa, nevie sa presne ako tieto zlúčeniny vstupujú do bunky, či pasívnou difúziou alebo aktívnym transportom. Jednoduchá difúzia nie je pravdepodobná kvôli náboju komplexu. Facilitovaná difúzia alebo aktívny transport prostredníctvom membránových transportérov sa zdá byť prijateľnejším. Zlúčeniny sa potom chovajú ako akési trójske kone. V poslednom čase je ako apoptózu indukujúca potencional-

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

na protinádorová látka študovaný 4,7-dimetyl-1,10-fenantrolín sulfatooxovanadičitan (Narla a spol., 2000).

5. Vanád a diabetes mellitus

Diabetes mellitus je jednou z najštudovanejších oblastí lekárskeho výskumu vôbec. Okrem iného, v tejto oblasti vzbudil veľký záujem aj mikroelement vanád, kvôli svojim inzulínmimetickým a glukoregulačným účinkom (Verma a spol., 1998). Prvá zmienka o inzulínmimetickom účinku vanádu v literatúre na experimentálnom diabetickom modeli (Heyliger a spol., 1985) vnúkla nádej pre možné humánne využitie terapeutického efektu vanádu pri diabetes mellitus.

Soli vanadičnanov vykazovali inzulín-like účinok na metabolizmus glukózy *in vitro* (Tolman a spol., 1979; Gomez-Foix a spol., 1988; Pugazhenti a Khandelwal, 1992), ako aj *in vivo* (Heyliger a spol., 1985; Brichard a spol., 1988; King a spol., 1993). Oproti tomu, sú v literatúre údaje aj o opačnom účinku vanadičnanov (Bosch a spol., 1987; Domingo a spol., 1990, 1991; Nišťiar a spol., 1994) s rôznymi vedľajšími toxickými účinkami (Domingo a spol., 1992; Zaporowska a spol., 1993; Stohs a Bagchi, 1995), najmä pri použití vyšších koncentrácií v pitnej vode bolo zistených veľa nežiadúcich účinkov, ako odmietanie pitia (refusal effect - Korec a Nišťiar, 1993, 1994), zvýšený výskyt hnačiek, dehydratácia a zvýšené vylučovanie glukózy močom (Nišťiar a spol., 1994, 1999).

Pri porovnaní LD₅₀ sa zistilo, že ortovanadičnan sodný bol 6-10 násobne menej toxický ako síran vanadičitanu (Hudson, 1964; Tolman a spol., 1979). U STZ-diabetických potkanov po ošetrení síranom vanadičitanu sa normalizovala hladina glukózy, lipidov, kreatinínu a tyroidálnych hormónov v krvi (Ramadham a spol., 1989). Podobne mal vanadičitan pozitívny vplyv na funkciu izolovaného srdca a výstup glycerolu z tukového tkaniva u diabetických zvierat. Preukázal sa aj preventívny účinok perorálne podaného síranu vanadičitého na myokard a metabolizmus, ako aj na zníženie diabetických komplikácií (katarakty) u STZ-diabetických potkanov (Ramadham a spol., 1989). Podobne preventívne podanie síranu vanadičitého pred podaním STZ (streptozotocín) oddialilo resp.

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

zmiernilo deštrukciu β -buniek Langerhansových ostrovčekov pankreasu (Cam a spol., 1995). Pozitívne účinky vanádu pri diabete 1. aj 2. typu sme shrnuli v tab. 4.

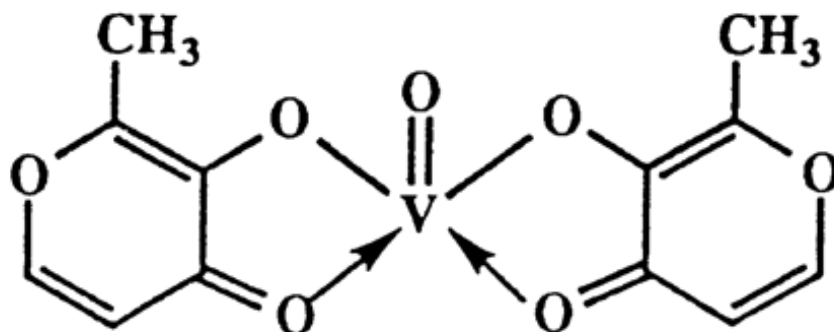
Tab. 4 – In vivo účinky vanádu pri diabetických modeloch

Model	Účinok	Literatúra
BB-potkany	redukuje potrebu exogénneho inzulínu na zabránenie glykozúrie, znižuje glykémiu a znižuje výskyt ketózy	Ramadham a spol., 1990 Yale a spol., 1995
parciálne pankrektomované potkany	zlepšuje senzitivitu na inzulín, periférny príjem glukózy u potkanov s 90% pankreatektómiou, výrazne zlepšuje syntézu svalového glykogénu	Rossetti a Laughlin, 1989
neonátálne STZ-potkany	ošetrenie vanádom upravuje bazálnu a stimulovanú tvorbu glukózy v pečeni a periférnu utilizáciu glukózy	Blondel a spol., 1990
geneticky obézne fa/fa potkany	zmierňuje hyperinzulinémiu a porušenú glukózovú toleranciu	Brichard a spol., 1989
obézne ob/ob myši	zmierňuje hyperglykémiu, upravuje glukózovú toleranciu a obsah glykogénu v pečeni, chráni pred vyčerpaním pankreatickej tvorby inzulínu	Brichard a spol., 1990

Nakoľko anorganický vanád je zle resorbovaný z gastrointestinálneho traktu, a zároveň vyvoláva aj určité problémy gastrointestinálneho traktu (napr. hnačky, dehydratáciu), vyvinuli sa snahy o syntézu organických zlúčením vanádu (Verma a spol., 1998; Goldwaser a spol., 2000). Jedným z nich bol aj bis(maltolát)oxovanadičitan (BMOV/IV/), ktorého štruktúra je na obr. 12 a bol syntetizovaný vo Vancouveri v Kanade (McNeill, a spol., 1992). BMOV sa syntetizuje jednucho (Caravan a spol., 1995) kombináciou síranu vanadičitého a maltolu (3-hydroxy-2-metyl-4-pyron), bežného aditíva v potravinárstve. BMOV je potentným príkladom orálneho preparátu absorbovaného z gastrointestinálneho traktu pasívnou difúziou, lipofilného, vo vode dobre rozpustného, elektricky neutrálneho s nízkou molekulovou hmotnosťou (Yuen a spol., 1993). Dávkovo závislostná krivka je porovnateľná u BMOV s rovnakou dávkou síranu vanadičitého pri jednorázovom podaní (Yuen a spol., 1995). ED₅₀ po orálnej administrácii ukázala, že BMOV je dvojnásobne účinnejší ako síran vanadičitý (ED₅₀: 0,5 mmol/kg pre BMOV oproti 0,92 mmol/kg pre síran vanadičitý). BMOV pri i.p. aplikácii bol až trojnásobne potentnejší ako síran vanadičitý (McNeill a spol., 1995). Dobre bola preštudovaná aj jeho distribúcia v tele a exkrécia u potkanov pomocou značenej ⁴⁸V-zlúčeniny (Setyawati a spol., 1998). Po perorálnom po-

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

daní sa vyššie koncentrácie zistili v obličkách, kostnej dreni, krvi, pečeni, slezine, srdci a pankrease. Jeho distribúcia do tkanív bola podstatne lepšia ako u síranu vanadičitého. Vylučovaný je najmä stolicou 69% a 12,5% močom do 4 dní (Bogden a spol., 1982; Wiegmann a spol., 1982).



obr. 12 – Bis(maltolát)oxovanadičitan (BMOV). Organická zlúčenina vanádu s vylepšenou biologickou účinnosťou, nízkou molekulovou hmotnosťou, elektroneutralita a prevyšujúca potenciou anorganického vanádu 2-3 násobne.

BMOV bol podaný STZ-diabetickým potkanom v pitnej vode v koncentrácii 0,75 mg/ml po dobu 6 mesiacov. BMOV upravil glykémiu na normálnu u 8 z 12 potkanov a vylepšil aj funkciu srdca u všetkých ošetrených zvierat. Bola preukázaná dobrá korelácia medzi dlhodobou úpravou glykémie a vylepšením funkcie srdca (Yuen a spol., 1995). Pri použití BMOV nebol zistený účinok na hmotnostný prírastok, ktorý bol pri anorganickom vanadičitane výrazný. Dlhodobé podávanie BMOV upravuje mnohé patologické fenomény pri STZ-diabete u potkanov (Dai a spol., 1995). Napr. nevyvoláva hnačky, ktoré v prípade síranu vanadičitého sa vyskytovali u 50% pokusných zvierat (Reul a spol., 1999). BMOV bol efektívny aj u fa/fa Zucker potkanoch pri diabete 2.typu.

Pri štúdiu inzulínmimetického účinku vanádu bola znížená hyperfágia charakteristická pre experimentálny diabetes. Na základe toho (Malabu a spol., 1994; Nišťiar a spol., 1994) vyslovili predpoklad, že zníženie glykémie je vyvolané zníženým príjmom krmiva. Tento predpoklad z časti vyvrátili Yuen a spol., (1997) a tvrdia, že to je len jedným z mechanizmov zníženia glykémie. Dobré výsledky boli získané aj s bis(acetylacetonato)oxovanadičitanom (Makinen a Brady, 2002).

6. Klinické štúdiá s vanádom

Medzi najdôležitejšie mikroelementy pri terapii diabetu okrem chrómu a horčíka nesporne patrí aj vanád (O'Connell, 2001).

U zdravých, nediabetických jedincov suplementácia vanadičnanu po dobu 6 týždňov signifikantne znížila hladinu cholesterolu (Curran a spol., 1959).

Goldfine a spol. (1995) sledovali účinok metavanadičnanu sodného u pacientov s diabetom 1. a 2. typu v štúdiu trvajúcim 2 týždne. Ošetrovanie s metavanadičnanom sodným (125 mg denne v rozdelenej dávke) znižovalo potrebu inzulínu ale nemalo vplyv na bazálnu hladinu C-peptidu. U dvoch z piatich pacientov s diabetom 1. typu zistili zvýšenú utilizáciu glukózy. Výrazne zlepšenú senzitivitu na inzulín zaznamenali u pacientov s diabetom 2. typu. Ošetrovanie vanádom nemalo vplyv na tvorbu glukózy pečňou. Ďalej zaznamenali zvýšené aktivity MAP a S6 kináz v monocytoch. Hlavný vedľajší účinok zaznamenali v povahe glukózovej intolerancii.

Cohen a spol. (1995) pri podávaní síranu vanadičitého (100 mg/deň) po dobu troch týždňov u šiestich pacientov s diabetes mellitus 2. typu zistili zníženie hladín glykémie nalačno a HbA_{1c} bez zmien plazmatickej hladiny inzulínu. Tento účinok pretrvával ešte dva týždne po prerušení suplementácie vanádu.

Boden a spol. (1996) pri podávaní síranu vanadičitého (50 mg dvakrát denne per os) počas štyroch týždňov pacientom s diabetes mellitus 2. typu zistili zníženie hladín glukózy nalačno (približne o 20%) a zníženie inzulínovej rezistencie pečňových buniek.

Beliaeva a spol. (2000) odskúšali zlúčeniny vanádu v celku s uspokojuvým výsledkom v Rusku.

Cusi a spol. (2001) aplikovali síran vanadičitý po dobu šesť týždňov v dávke 150 mg/deň a zistili, že zníženie glykémie je výsledkom skôr redukcie endogénnej produkcie glukózy ako jej zvýšenej utilizácie.

Najvýznamnejšie výsledky z klinických štúdií sme zhrnuli v Tab. č. 5. Z tabuľky vyplýva, že priemerná dávka síranu vanadičitého sa pohybuje na základe uvedených BMI okolo 1,2-1,8 mg/k živej hmotnosti.

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

Tab. 5 – Vybrané klinické skúšky s vanádom

SUBJEKTY	USPORIADANIE	VÝSLEDKY	POZNÁMKY
Goldfine a spol., 1995			
1.typ 5 osôb 2.typ 5 osôb vek: 28-65 rokov BMI 21,7-30,8 GHb 7,7-19,5% I, O	nerandomizovaný, bezplacebový 2 týždne 125 mg vanadičnanu sodného/deň	Zvýšil pohotovostný pool glukózy (29%, P<0,05) v prvej fáze dvojkrokového euglykemického hyperinzulinemického clampu u 2. typu. Nemal vplyv na aktivitu inzulínu u 1. typu, ale znižoval dávku inzulínu (P<0,05). Nemal vplyv na GHb, fruktozamín, bazálny HGO, potláčal HGO. Celkový CHO potláčal u 2. typu. MAP a S6 kinázy boli zvýšené u oboch skupín	Dáva bola rozdelená do troch dávok denne. Nebola zistená zmena hmotnosti ani kalorického príjmu počas pokusu. Neboli biochemicky zistené toxické účinky. Vedľajšie účinky najmä zo strany GIT: nauzea, zvracanie, mierne hnačky, hypoglykémia.
Boden a spol. 1996			
2.typ 8 osôb BMI 31,5 vek: 53,5 rokov I, O	jednoduchý slepý, placebo kontrolovaný, 100 mg síranu vanadičitého/deň 4 týždne	Znížil FBG o 20% (P<0,05), znížil HGO (P<0,02), nemal vplyv na príjem glukózy, jej oxidáciu alebo na syntézu glykogénu. Pokles HGO sa udržal aj v placebo fáze.	Placebo nasledovalo po aktívnej terapii po dobu 2 až 4 týždňových období s vysadením vanadičitanu. Vedľajšie účinky najmä v GIT: mierne hnačky, dočasné pocity diskomfortu zo strany GIT.
Cohen a spol., 1995			
2.typ 6 osôb vek: 50 rokov BMI 27,3 D, O GHb 9,6%	jednoduchý slepý, placebo kontrolovaný, 100 mg síranu vanadičitého/deň 3 týždne	Znížil FPG z 11,7 na 10,0 mmol/l. GHb znížil z 9,6 na 8,8%. Euglykemický hyperinzulinemický clamp ukázal zvýšenie glukózovej pohotovosti a príjmu, inhibíciu HGO, zvýšenú oxidáciu CHO následkom zvýšenej syntézy glykogénu a poklesu FFA. Nemal vplyv na hladiny fruktozamínu, inzulínu, ani na OGTT	Placebo dva týždne pred a dva týždne po aktívnom ošetrení vanadičitanom. BMI kolísalo medzi 23-38 U vanadičitanom ošetrených jedincov došlo k poklesu Hb a Hkt. 1% pokles hmotnosti.
Halberstram a spol., 1996			
2.typ 6 osôb kontrola 6 osôb vek: 53 rokov BMI 28,7 GHb 9,5% D, O	jednoduchý slepý, placebo kontrolovaný, 100 mg síranu vanadičitého/deň	U jedincov s 2. typom došlo k poklesu FPG a GHb (z 9,4 na 8,8%). U diabetikov euglykemický hyperinzulinemický clamp zvýšil utilizáciu glukózy a oxidáciu CHO, a znížil HGO. U diabetikov znížil celkový CHO a FFA.	BMI kontrol 29,5. Zmeny v hmotnosti neboli. Malé zmeny v CHO u kontrol. Mierne vedľajšie účinky v GIT.
BMI = body mass index; GHb = glykovaný hemoglobín; I = terapia inzulínom; O = terapia perorálnymi antidiabetikami; D = terapia diétou pod lekárskou kontrolou; HGO = výdaj glukózy pečťou (hepatic glucose output); CHO = cholesterol; FBG = glykémia nalačno (fasting blood glucose); FPG = glukóza v plazme nalačno (fasting plasma glucose); FFA = voľné masťné kyseliny (free fatty acids); OGTT = orálny glukózový záťažový test; Hkt = hematokrit.			

7. Vplyv vanádu na prvoka *Tetrahymena pyriformis*

V literatúre sme našli niekoľko prác zaoberajúcich sa účinkom vanadičnanov na prvoka *Tetrahymena pyriformis*. Tento jednobunkový organizmus sme využívali aj my na štúdium účinku rôznych toxických látok a žiarení na bunkovej úrovni (Ništiar a spol., 1981, 1983, 1884a,b, 1985, 1986, 1990, 1991; Hrušov-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

ský a Ništiar, 1987). Preto nás prirodzene zaujímal aj účinok zlúčenín vanádu na tento modelový objekt.

Shimizu (1981) študoval inhibičný účinok vanadičnanov (orto- aj metavanadičnanu) na ciliárnu dyneínovú ATPázu u tetrahymén. Zistil, že Mg-ATPáza 30S dyneínu bola veľmi citlivá na vanadičnan pri neutrálnom pH, prídavok KCl alebo NaCl do reakčnej zmesi citlivosť znížila. Citlivosť bola závislá aj od teploty. Metavanadičnan bol silnejším inhibítorom. Zaujímavé bolo, že inhibícia vykazovala bifázický charakter. Pri nižších koncentráciách vanadičnanu bola inhibícia signifikantnejšia. Tento mechanizmus sa pokúsili potom vysvetliť na C/A dyneíne izolovaného z flagelárnych axónoch spermíí morských ježoviek (*Yokota a Mabuchi, 1994*).

Veľa výsledkov s účinkom vanadičnanov získali (*Kovács a Csaba, 1992; Kovács a spol., 1992*) pri štúdiu inzulínového imprintingu. Zistili, že NaVO_3 pôsobiaci na Na^+K^+ -ATPázu nevplyva na väzbu inzulínu na inzulínové receptory *Tetrahymena* bezprostredne po ošetrení, ale až po približne 24 hodinách. Vanadičnan zvyšoval imprinting inzulínového potenciálu, ale nemal tento účinok ak bol podaný po inzulíne. Naznačili, že podobne ako u vyšších organizmov inhibícia Na^+K^+ -ATPázy zohráva dôležitú úlohu v inzulín-like účinku vanadičnanu, tak to je aj u *Tetrahymena*, čo dokazovalo aj to, že dcérske bunky viazali inzulín lepšie. Tomu hovorili hormónový (inzulínový) imprinting dcérskych generácií. Tento účinok vanadičnanu bol peroxidom vodíka ešte potencovaný. Zároveň preukázali, že vanadičnan stimuloval aktivitu tyrozínových kináz.

Nilsson-ová (1998, 1999) vystavila prvky *Tetrahymena* kultivované v proteóze peptónovom médiu (2%) vanadičnanu v koncentráciách 0,1-5,0 mmol/l. Zistila, že dávkovo závislým spôsobom bol rast potlačený (pri koncentráciách 0,1-0,5 mmol/l na 76-64%, pri koncentráciách 1-5 mmol/l na 61% kontrolných hodnôt. Podobne endocytóza a motilita bola znížená (okrem koncentrácie 0,1 mmol/l, kde bola mierne zvýšená) v závislosti na zvyšujúcej sa dávke, počet imobilných buniek stúpala dĺžkou expozície. Zistila aj zmeny pomeru cytoplazma/jadro, objem jadra sa zvýšil, objavili sa bunky atypického tvaru. Zdalo sa jej, že vanadičnan narúšal normálnu funkciu mikrotubulárnych systémov.

8. Vlastné pokusy

Nakoľko v dostupnej literatúre sme našli kontroverzné účinky ohľadom terapeutického efektu a toxického účinku vanádu, rozhodli sme sa tieto nezrovnalosti prešetriť a vytvoriť si vlastný názor. Preto sme vykonali viac pokusov, z ktorých časť už bola publikovaná (*Korec a Nišťiar, 1993, 1994; Nišťiar a spol., 1994, 1999*).

8.1. Vplyv vanádu a zinku na vylučovanie glukózy močom u BB potkanov v krátkodobom experimente

Tento pokus smeroval k overeniu inzulínmimetického účinku vanadičnanu amónneho (1 mmol/l v pitnej vode), chloridu zinočnatého (1 mmol/l v pitnej vode), 2 U inzulínu (Pur Insulin Interdep, Léčiva) a 2 U inzulínu (Ultralente MC, Novo) u potkanov kmeňa BB (modelové zvieratá na štúdium diabetu 1. typu, *Marliss, 1983*), 4 mesačných oboch pohlaví. Pri pokusoch sme zaradili do každej skupiny randomizovane 12 potkanov (6 samcov a 6 samičiek). Zvieratá pochádzali z inbredného vlastného chovu potkanov BB (pôvodom od dvoch rodičovských párov, získaných v roku 1988 od firmy Møllegard, Dánsko). Spontánny diabetes u nich prepukol okolo 90. dňa po narodení. Za diabetické sme považovali jedince u ktorých bola glykémia vyššia ako 16 mmol/l a pretrvávala aspoň 7 dní. Inzulínové preparáty boli aplikované medzi 14⁰⁰-15⁰⁰ hod, jednotlivé testované parametre sa robili vždy počas troch dní aplikácie, denne o 7⁰⁰ - 8⁰⁰ hod. Glykémia a glukóza v moči boli stanovené enzymatickým (GOD-POD) testom s O-dianizidínom ako indikátorom (*Korec, 1991*). Zvieratá boli držané jednotlivito v celosklených metabolických klietkach a mali voľný prístup k vode a krmivu (štandardná LD). U všetkých skupín boli počiatočné hodnoty sledovaných parametrov porovnateľné, významný štatistický rozdiel sme nezistili (t-test).

Výsledky. V Tab. 6 prezentujeme pravdepodobne prijaté dávky vanádu a zinku u potkanov.

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

Tab. 6 – Prijatá dávka vanádu resp. zinku počas pokusu

Skupina	b.w.	W	D/kg b.w./d
1 mmol NH₄VO₃/l	293±15	60,6±10,2	27,5±3,6
1 mmol ZnCl₂/l	290±16	42,3±8,1	19,9±3,8

b.w. = hmotnosť potkanov v gramoch; W = príjem vody v ml/deň; D/kg b.w./d = dávka na kg živej hmotnosti potkana a deň; počet zvierat v každej skupine je n=12.

Príjem krmiva, vody, glykémia a množstvo vylúčeného moča sú uvedené v Tab. 7. Príjem potravy bol výrazne vyšší po aplikácii inzulínových preparátov ($P < 0,05$). Na druhej strane, bol zaznamenaný výrazný pokles príjmu potravy po aplikácii vanadičnanu ($P < 0,01$), ale najmä po aplikácii chloridu zinku ($P < 0,001$). Signifikantný pokles glykémie bol zistený vo všetkých skupinách, najmä však po aplikácii inzulínového preparátu Ultralente. Účinok vanadičnanu, chloridu zinočnatého a inzulínového preparátu Interdep boli porovnateľné. Pokles glykémie v prípade vanadičnanu a chloridu zinočnatého bol v pozitívnej korelácii ($r = 0,96$) s poklesom príjmu potravy.

Tab. 7 – Príjem krmiva, vody, hladina glykémie a množstvo vylúčeného moča

Skupina	LD	Glc	W	U
Diabetické kontroly	18,8±2,1	16,8±1,5	77,6±11,4	65,4±14,8
1 mmol NH₄VO₃/l	15,3±1,1**	14,3±1,2**	60,6±10,2*	60,1±10,6
1 mmol ZnCl₂/l	12,1±0,6***	13,8±3,8*	42,3±8,1***	40,8±4,1**
2 U inzulínu Interdep	23,4±4,2*	14,0±2,0*	52,2±14,1**	38,6±6,1**
2 U inzulínu Ultralente	25,2±5,1*	8,6±1,4***	36,8±6,2***	25,2±4,4***

LD = príjem potravy v g/deň; Glc = glykémia mmol/l; W = príjem vody v ml/deň; U = výdaj moča v ml/deň; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; počet vyšetrení v každej skupine je n = 36, počet zvierat n = 12.

Príjem vody a množstvo vylúčeného moča nebol výrazne ovplyvnený aplikáciou vanadičnanu. Signifikantne znížený príjem vody bol zaznamenaný pri aplikácii vanadičnanu na hladine významnosti $P < 0,05$; podstatne viac znižoval príjem vody inzulínový preparát Interdep ($P < 0,01$) a veľmi významne chlorid zinočnatý a inzulínový preparát Ultralente ($P < 0,001$). Množstvo vylúčeného moča signifikantne klesá po inzulínových preparátoch, čo je typický inzulínový efekt a po chloride zinočnatom. Čo je ale veľmi dôležité, je to, že po aplikácii vanadičnanu ako aj chloridu zinočnatého je takmer všetká prijatá voda eliminovaná z

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

organizmu močom. Tento fenomén sme v našich prvých akútnych pokusoch nepreukázali (Korec a Ništiar, 1993; Ništiar a spol., 1994).

V Tab. 8 uvádzame údaje o koncentrácii glukózy v moči a o celkovom výdaji glukózy močom, ako aj hodnoty glukózového indexu a asimilačného koeficientu.

Tab. 8 – Koncentrácia glukózy v moči a celkový výdaj glukózy močom, glykemický index a asimilačný koeficient

Skupina	konc. Glc v U	Celk. Glc v U	GI	AQ
<i>Diabetické kontroly</i>	255,8±20,9	3,01±0,08	1,77±0,14	68,0±3,3
<i>1 mmol NH₄VO₃/l</i>	296,9±34,4*	3,21±0,09	1,88±0,12	58,0±5,3*
<i>1 mmol ZnCl₂/l</i>	205,1±10,8**	1,52±0,06***	2,22±0,29*	74,9±6,1
<i>2 U inzulínu Interdep</i>	203,1±14,6**	1,41±0,02***	1,21±0,09***	87,9±9,9**
<i>2 U inzulínu Ultralente</i>	67,6±15,1***	0,31±0,01***	0,67±0,03***	97,5±0,4***

konc. Glc v U = koncentrácia glukózy v moči v mmol/l; celk. Glc. v U = celkový výdaj glukózy močom v g/deň; GI = glukózový index, čo je pomer medzi glykémiou a hmotnosťou (v gramoch) glycidov v prijatom krmive; AQ = asimilačný koeficient, vyjadruje pomer utilizovanej glukózy z množstva glukózy prijatej krmivom v %; * = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001; počet vyšetrení v každej skupine je n = 36, počet zvierat n = 12.

Najvyššie koncentrácie glukózy v moči (glukozúria) boli zistené pri aplikácii vanadičnanu, chlorid zinočnatý mal glukozúriu znižujúci efekt. Ako sme očakávali oba inzulínové preparáty významne znížili koncentráciu glukózy v moči.

Celkový výdaj glukózy močom bol najvyšší v skupine, ktorej sme aplikovali vanadičnan a pomerne nízky pri zinku a inzulínových preparátoch.

Glukózový index sme definovali ako pomer medzi glykémiou a hmotnosťou glycidov v prijatom krmive v gramoch. Za normálnych podmienok pri krmení potkanov štandardnou Larsenovou diétou tento parameter sa pohybuje v rozmedzí 0,3 - 0,5. Ako ukazujú výsledky tento parameter bol významne horší pri suplementácii zinkom, štatisticky významne sa zlepšuje pri inzulínových preparátoch, kde v prípade preparátu Ultralente je takmer na úrovni zdravých potkanov.

Asimilačný koeficient sme vyjadrili v percentách, ako pomer utilizovanej glukózy k celkovému množstvu glukózy v prijatom krmive. Najnižšia asimilácia bola u potkanov suplementovaných vanadičnanom, zinok tento parameter významne neovplyvnil, inzulínové preparáty ho významne zlepšili.

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

Diskusia. Na základe získaných výsledkov je možné konštatovať, ako to dokumentujú údaje v Tab. 7, že v prípade zinku bola prijatá dávka ($19,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) vo forme chloridu zinočnatého výrazne nižšia ako je LD_{50} pre potkanov pri perorálnej aplikácii (okolo 350 mg.kg^{-1} ; *Lewis a Tatken, 1979*). Oproti tomu v prípade vanadičnanu amónneho prijatá dávka ($26,9 \text{ mg.kg}^{-1}$) bude už toxická, ako to ukázali naše pokusy (*Ništiar a spol., 1994*). Vyplýva to aj zo skúseností z klinických štúdií (*Goldfine a spol., 1995; Boden a spol., 1996*), v ktorých udávajú dávku pro toto okolo 100-125 mg vanadičnanu sodného, resp. síranu vanadičitého. Táto celková dávka zodpovedá približne $1,5\text{-}1,9 \text{ mg.kg}^{-1}$, čo je podstatne nižšia dávka, ako použitá v našich pokusoch. Z toho vyplýva, že bude potrebné určiť toxické dávky pre zlúčeniny vanádu pri rôznych aplikačných spôsoboch a algoritmoch (po jednorázovej aplikácii, pri aplikácii, resp. chronickej aplikácii).

Ani v tejto trojdňovej akútnej experimentálnej etape sa nám nepodarilo preukázať inzulínu podobný účinok vanadičnanu (*Heyliger a spol., 1985; Meyrovitch a spol., 1987*), dokonca ani v prípade zinku (*Shisheva a spol., 1992*) pri použitej dávke, okrem zníženia glykozúrie v prípade chloridu zinočnatého. Ukázalo sa, že aj počas trojdňovej aplikácii spočíval účinok vanádu a zinku na glykémiu najmä v tom, že znižovali príjem potravy a tomu zodpovedajúc došlo ku zníženiu glykémie. Podobné výsledky získali *Venkatesan a spol. (1991)* a navyše tvrdili, že dochádza aj k akcelerovanému vylučovaniu glukózy obličkami. Podobné zvýšené vylučovanie obličkami sme zaznamenali aj v našich pokusoch pri vanadičnane. Veľmi vysoký glukózový index v prípade chloridu zinočnatého poukázal na to, že aj keď boli glykémie v tejto skupine lepšie ako pri vanadičnane, resp. pri inzulínovom preparáte Interdep, ale bolo to najmä výrazným znížením príjmu krmiva u tohto preparátu. Všetky tieto nejasnosti nás varujú pred unáhlenými závermi a nabádajú k podstatne rozsiahlejším a dôkladnejším štúdiám najmä ohľadne preverenia možných toxických vedľajších účinkov, ako aj dávkovania, najmä v dlhodobej časovej perspektíve (chronické užívanie týchto preparátov).

8.2. Overenie toxicity vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňov BB a Wistar pri rôznych spôsoboch podania a časových algoritmov aplikácie

Pri našich predchádzajúcich štúdiách inzulínmimetického účinku vanadičnanu amónneho sa ukázalo, že bude potrebné overiť toxicitu vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňa Wistar a BB (z vlastného chovu, nediabetické) po jednorázovom podaní pri rôznych aplikačných formách (per os žalúdkovou sondou /gavage/, s.c., i.p., i.v.). Do každej skupiny sme zaradili po 24 jedincov (12 samcov a 12 samičiek) vo veku 3-4 mesiacov. Zvieratá pred pokusom boli držané v konvenčných podmienkach a v komerčných klietkach (po 2 potkany v jednej o rozmeroch 310 mm x 210 mm x 150 mm, tj. o ploche 65,1 cm²) s voľným prístupom ku krmivu a vode. Zvieratá boli držané pri svetelnom režime 12 hodín svetlo 12 hodín tma, pri teplote 20-24 °C. Po aplikácii zvieratá boli sledované ešte dva týždne. Zvieratá, ktoré počas pokusu (3 dni + 14 dní) uhynuli sme pitvali, a na základe priebehu intoxikácie a patologicko-anatomického nálezu sme sa snažili určiť príčinu smrti. LD₅₀ sme určili podľa *Weil-ovej* (1952).

V ďalšom pokuse sme overili toxicitu vanadičnanu amónneho v koncentráciách 0,1 mmol/l, 0,5 mmol/l a 1 mmol/l v pitnej vode v chronickom pokuse trvajúcim po dobu troch mesiacov u oboch kmeňov potkanov (BB a Wistar). Do pokusu sme do každej skupiny zaradili 24 potkanov samcov nediabetických a sledovali sme základné parametre, ako príjem vody, príjem krmiva, výdaj moča, glykémia, glukozúriu, výdaj glukózy močom, glukózový index a asimilačný koeficient.

Výsledky a diskusia. Z jednorázových aplikačných testov sú výsledky prezentované v Tab. 9-12.

Ako vyplýva z pokusov LD₅₀ pre i.v. aplikáciu vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňa Wistar (Tab. 9) je okolo 1,5 až 2,5 mg.kg⁻¹ živej hmotnosti, čo zodpovedá publikovaným údajom (*National Academy of Sciences, Washington, 1974*). Pohlavné rozdiely sme nezistili, a ani rozdiel medzi kmeňmi nie je významný, aj keď sa kmeň Wistar zdá byť o niečo odolnejší. K úhynu dochádzalo obyčajne do 2-24 hodín, za príznakov počiatočný neklud, kŕče, následne para-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

lýza končatín, lapavé dýchanie a výtok slín z úst, zvieratá prestali prijímať vodu a krmivo.

Tab. 9 – Určeni LD₅₀ pre intravenóznou (i.v.) aplikáciu vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňa BB a Wistar

Skupina	kmeň	dávka mg/kg b.w.	dávka log (x _i)	počet exitov	% úhynutých	zodpovedá ≅ LD
1	Wistar	5	0,699	24	100,0	100
2	Wistar	4	0,602	22	91,7	
3	Wistar	3	0,477	18	75,0	
4	Wistar	2	0,301	13	54,2	50
5	Wistar	1,5	0,176	10	41,6	50
6	Wistar	1	0,000	2	8,33	
7	Wistar	0,5	-0,301	0	0	0
8	BB	5	0,699	24	100,0	100
9	BB	4	0,602	23	95,8	
10	BB	3	0,477	20	83,3	
11	BB	2	0,301	16	66,6	
12	BB	1,5	0,176	12	50,0	50
13	BB	1	0,000	6	25,0	
14	BB	0,5	-0,301	0	0	
LD₅₀ pre potkany kmeňa Wistar = 1,90 (1,5-2,5)						
LD₅₀ pre potkany kmeňa BB = 1,52 (1,3-1,8)						

Pri pokusoch na stanovenie LD₅₀ pre i.p. aplikáciu vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňa Wistar (Tab. 10) je okolo 15,0 až 20,0 mg.kg⁻¹ živej hmotnosti. Pohlavné rozdiely sme zistili u kmeňa Wistar, kde sa samičky zdali byť odolnejšie. Rozdiel medzi kmeňmi bol významne odlišný a to v prospech kmeňa Wistar, ktorý bol rezistentnejší. K úhynu dochádzalo obyčajne do 2-36 hodín za podobných príznakov ako pri i.v. aplikácii, s tým rozdielom, že kľče boli výraznejšie.

LD₅₀ pre s.c. aplikáciu vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňa Wistar (tab. 11) je okolo 17,0 až 40,0 mg.kg⁻¹ živej hmotnosti. Pohlavné rozdiely sme nezistili. Rozdiel medzi kmeňmi nebol významne odlišný ale potkany kmeňa Wistar sa zdali byť odolnejšie. K úhynu dochádzalo obyčajne po 6 až 96 hodín. Príznaky boli podobné ako pri i.p., ale sa u niektorých jedincov objavili hnačky. Príjem vody a krmiva bol výrazne redukovaný.

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

Tab. 10 – Určeni LD₅₀ pre intraperitoneálnu (i.p.) aplikáciu vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňa BB a Wistar

skupina	kmeň	dávka mg/kg b.w.	dávka log (x _i)	počet exitov	% úhynutých	zodpovedá ≅ LD
1	Wistar	35	1,544	24	100,0	100
2	Wistar	30	1,477	23	95,8	
3	Wistar	25	1,398	20	83,3	
4	Wistar	20	1,301	14	58,3	50
5	Wistar	15	1,176	10	41,6	50
6	Wistar	10	1,000	3	12,5	
7	Wistar	5	0,699	0	0	0
8	BB	35	1,544	24	100,0	100
9	BB	30	1,477	24	100,0	100
10	BB	25	1,398	22	91,6	
11	BB	20	1,301	16	66,6	
12	BB	15	1,176	12	50,0	50
13	BB	10	1,000	8	33,3	
14	BB	5	0,699	0	0	0
LD₅₀ pre potkany kmeňa Wistar = 16,3 (15-20)						
LD₅₀ pre potkany kmeňa BB = 21,0 (10-25)						

Tab. 11 - Určenie LD₅₀ pre subkutánnu (s.c.) aplikáciu vanadičnanu amonného u potkanov kmeňa BB a Wistar

skupina	kmeň	dávka mg/kg b.w.	dávka log (x _i)	počet exitov	% úhynutých	zodpovedá ≅ LD
1	Wistar	70	1,544	24	100,0	100
2	Wistar	60	1,477	22	91,7	
3	Wistar	50	1,398	18	75,0	
4	Wistar	40	1,301	13	54,2	50
5	Wistar	30	1,176	10	41,6	50
6	Wistar	20	1,000	2	8,3	
7	Wistar	10	0,699	0	0	0
8	BB	70	1,544	24	100,0	100
9	BB	60	1,477	23	95,8	
10	BB	50	1,398	20	83,3	
11	BB	40	1,301	16	66,6	
12	BB	30	1,176	12	50,0	50
13	BB	20	1,000	6	25,0	
14	BB	10	0,699	0	0	
LD₅₀ pre potkany kmeňa Wistar = 31,0 (17-40)						
LD₅₀ pre potkany kmeňa BB = 26,5 (14-35)						

Ako vyplýva z pokusov LD₅₀ pre perorálnu aplikáciu vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňa Wistar (Tab. 12) je okolo 200,0 až 300,0 mg.kg⁻¹ živej hmotnosti. Pohlavné rozdiely sme nezistili. Rozdiel medzi kmeňmi nebol významný. K úhynom dochádzalo obyčajne do 48 hodín až 10 dní. Okrem vyššie uvedených príznakov bolo typické odmietanie vody a krmiva, dehydratácia, hnačky, v niektorých prípadoch zvýšená dráždivosť, zježená srst'. Ak vezmeme

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

do úvahy, že pri chronických pokusech, pri bežne používanej koncentrácii vanadičnanu amónneho okolo 1 mmol/l je prijaté potkanom denne približne 10 mg.kg⁻¹ živej hmotnosti, tak teoreticky potkany prijímú približne za 20 - 30 dní dávku zodpovedajúcu jednorázovej LD₅₀. To tak samozrejme nie je úplne pravda a preto sme si to overili aj v chronickom pokuse trvajúcim 90 dní. Výsledky sú uvedené v Tab. 13.

Tab. 12 – Určenie LD₅₀ pre perorálnu aplikáciu (pažerákovou sondou, gavage) vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňa BB a Wistar

skupina	kmeň	dávka mg/kg b.w.	dávka log (x _i)	Počet exitov	% úhynutých	Zodpovedá ≅ LD
1	Wistar	380	2,580	24	100,0	100
2	Wistar	350	2,544	22	91,6	
3	Wistar	320	2,505	19	79,2	
4	Wistar	290	2,462	14	58,3	50
5	Wistar	260	2,415	11	45,8	50
6	Wistar	230	2,362	10	41,7	50
7	Wistar	200	2,301	9	37,5	
8	Wistar	170	2,230	7	29,2	
9	Wistar	140	2,146	3	12,5	
10	Wistar	110	2,041	1	4,2	
11	Wistar	80	1,903	0	0	0
12	Wistar	50	1,699	0	0	0
13	BB	380	2,580	24	100,0	100
14	BB	350	2,544	24	100,0	100
15	BB	320	2,505	24	100,0	100
16	BB	290	2,462	20	83,3	
17	BB	260	2,415	18	75,0	
18	BB	230	2,362	13	54,2	50
19	BB	200	2,301	10	41,7	50
20	BB	170	2,230	8	33,3	
21	BB	140	2,146	5	20,8	
22	BB	110	2,041	4	16,7	
23	BB	80	1,903	3	12,5	
24	BB	50	1,699	0	0	0
LD₅₀ pre potkany kmeňa Wistar = 235 (200-300)						
LD₅₀ pre potkany kmeňa BB = 220 (200-250)						

Z týchto údajov vyplýva, že pri dávke 1 mmol/l vanadičnanu amónneho už je potrebné počítať s významným toxickým účinkom u oboch kmeňov potkanov, a vyskytujú sa úhyny, obyčajne následkom silnej dehydratácie a profúzných hnačiek zvierat. O podobných nálezoch v literatúre referovali aj *Ramadham a spol., 1989*). Často sme zisťovali silné prekrvenie až hemoragické zmeny na gastrointestinálnom trakte, najmä na tenkých črevách. Z orgánov sme zistili kr-

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

vácania do pečene a obličiek. U zvierat suplementovaných vanadičnanom amónnym pri všetkých použitých koncentráciách došlo k významnému poklesu príjmu potravy, ako aj vody, v závislosti na koncentrácii vanadičnanu. Tento efekt sme už zaznamenali aj v našich predchádzajúcich prácach (Nišťiar a spol., 1994, 1999) a bol zistený aj inými autormi (Brichard a spol., 1988).

Tab. 13 – Overenie toxicity rôznych koncentrácií vanadičnanu amónneho u potkanov kmeňa Wistar a BB počas chronickej aplikácii v pitnej vode (90 dní)

P	sk.1	sk.2	sk.3	sk.4	sk.5	sk.6	sk.7	sk.8
st	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	BB	BB	BB	BB
C	0	0,1	0,5	1,0	0	0,1	0,5	1,0
S	24	24	23	21	24	24	24	22
M	0	0	1	3	0	0	0	2
b.w.	395±12	397±14	375±16	333±34	438±25	427±22	382±37	349±52
w.g.	92	90	80	30	116	104	57	25
LD	19,4±0,4	17,0±0,2	16,8±0,2	16,1±0,2	22,0±0,3	17,6±0,2	16,3±0,2	16,0±0,2
W	30,5±1,2	25,2±0,8	20,8±0,7	17,1±0,2	36,1±1,0	29,1±1,0	22,5±0,3	18,0±0,2
V	0	87±4	368±17	650±54	0	93±6	374±37	626±55
U	12,2±0,7	13,1±0,6	13,3±0,7	13,3±0,5	14,1±0,2	14,1±0,4	13,9±0,3	13,8±0,4
Glc	6,8±0,1	6,7±0,2	6,8±0,3	6,6±0,5	7,7±0,2	7,2±0,2	7,0±0,1	6,8±0,5
GU	20±0,5	24±1,0	25±0,5	24±1,1	44±1,7	60±2,0	82±1,5	114±0,8
OG	0,044	0,057	0,060	0,057	0,112	0,152	0,205	0,283
GI	0,70	0,79	0,81	0,82	0,70	0,82	0,86	0,85
AQ	0,995	0,993	0,992	0,992	0,989	0,983	0,975	0,964

P = parameter; st = kmeň; C = koncentrácia vanadičnanu amónneho v pitnej vode v mmol/l; S = počet zvierat, ktoré pokus prežili; M = počet zvierat, ktoré uhynuli; b.w. = hmotnosť v g; w.g. = prírastok za 90 dní v g; LD = príjem krmiva za deň v g; W = príjem vody za deň v ml; V = mg vanadičnanu prijatého za 90 dní na kg ž.hm.; U = výdaj moča v ml; Glc = glykémia v mmol/l; GU = koncentrácia glukózy v moči v mmol/l; OG = celkový výdaj glukózy močom za deň v g; GI = glukózový index (glykémia/príjem sacharidov v potrave); AQ = asimilačný koeficient (podiel utilizovaných sacharidov/prijaté sacharidy).

Na základe príjmu vody a vykonaných prepočtov sme zistili, že zvieratá pri suplementácii 0,1 mmol/l vanadičnanu obdržali počas trvania experimentu (90 dní) približne 85-95 mg vanadičnanu na kg živej hmotnosti, čo zodpovedá dennej dávke okolo 1 mg.kg⁻¹ živej hmotnosti. Pri práci s touto koncentráciou vanadičnanu sa viac priblížime dávkovaniu v pokusoch u ľudí, kde sa denné dávky tiež pohybujú okolo 1,5 mg.kg⁻¹ hmotnosti (O'Connell, 2001). Pri koncentrácii vanadičnanu 0,5 mmol/l to bolo 360-380 mg a pri koncentrácii 1,0 mmol/l približne 610-670 mg, čo zodpovedá dennej dávke 4-4,2 mg.kg⁻¹, resp. 6,8-7,4 mg/kg⁻¹. Na základe týchto výsledkov odporúčame pri chronických pokusoch

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

pracovať s koncentráciami vanadičnanu okolo 0,1 mmol/l, resp. nižšími. Vanadičnan pri všetkých použitých koncentráciách znížil glykémiu u BB potkanov ($P < 0,05$), v prípade potkanov kmeňa Wistar tento účinok nebol štatisticky významný. Pri oboch kmeňoch mal vanadičnan významný účinok na zvýšenie hladiny glukózy v moči a na celkový výdaj glukózy močom. Tento efekt je úplne protikladný inzulín-like účinku.

Na základe predložených výsledkov sa prihovárime za významné zníženie doposiaľ používaných koncentrácií vanadičnanu v pitnej vode, resp. dávky pri ostatných aplikáciách, najmä v chronických pokusoch (trvajúcich dlhšie ako 6 týždňov), nakoľko pri vyšších hladinách vanadičnanu dochádza k významnému toxickému účinku a nižšie dávky lepšie odrážajú podmienky pri humánnej suplementácii, najmä pokiaľ prijmemé tézu, že terapia zlúčeninami vanadičnanu by mala trvať kontinuálne pomerne dlhé časové obdobie.

8.3. Vplyv vanádu na homeostázu glukózy u BB potkanov v chronickom experimente

Cieľom týchto pokusov bolo preveriť účinok chronickej suplementácie vanadičnanu a zinku v pitnej vode na homeostázu glukózy u zdravých a diabetických BB potkanov. Zároveň sme preverili účinok rôznych aplikačných schém na glykémiu u diabetických potkanov.

Materiál a metodika. 3,5 - 4 mesační samci potkanov kmeňa BB (čiasťtočne inbrední z F6 generácie) v celkovom počte 240 boli rozdelený do 10 experimentálnych skupín (v každej skupine po 24 jedincov). 120 jedincov bolo diabetických (glykémia vyššia ako 16 mmol/l; hmotnosti 272 ± 31 g) a 120 nediabetických súrodencov (hmotnosti 320 ± 15 g). U diabetických jedincov spontánny diabetes u nich prepukol okolo 90. dňa po narodení. Usporiadanie pokusu je uvedené v Tab. 14.

Potkany skupín 1. - 10. boli držané v sklenených metabolických klietkach s voľným prístupom k štandardnej Larsenovej diéte (Korec, 1991) a vode po dobu 3 mesiacov (vystavené 12 hodín svetlu a 12 hodín tme). Desať dní po prepuk-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

nutí diabetu boli zaradení do skupín 6. - 10. Do skupín 1. až 5. boli zaradení ich nediabetickí súrodenci. Vanadičnan bol podávaný v pitnej vode v dvoch koncentráciách, 0,1 a 0,5 mmol/l (NH_4VO_3 p.a. Lachema, rozpustený v kyseline citrónovej - 100 mg/l zásobného roztoku, tj. 10 mmol vanadičnanu/l). Chlorid zinočnatý bol tiež aplikovaný v pitnej vode v koncentráciách 0,1 a 0,5 mmol/l (ZnCl_2 , p.a., bezvodý). Glykémie, koncentráciu glukózy v moči sme zisťovali každý týždeň. Glykémie a glukóza v moči boli stanovené enzymatickým (GOD-POD) testom s O-dianizidínom ako indikátorom (Korec, 1991), vždy medzi 7.00 a 8.00 ráno. V stejnóm čase bolo odčítaná spotreba potravy, vody, množstvo vylúčeného moča.

Tab. 14 – Experimentálne usporiadanie – charakterizácia pokusných skupín a spôsob aplikácie vanádu a zinku

Skupina číslo	Počet potkanov	Diabetes	Dávka vanadičnanu, resp. ZnCl_2	Spôsob aplikácie
1.	24	–	0 mmol/l	pitná voda - 3 mesiace
2.	24	–	0,1 mmol/l vanadičnan	pitná voda - 3 mesiace
3.	24	–	0,5 mmol/l vanadičnan	pitná voda - 3 mesiace
4.	24	–	0,1 mmol/l ZnCl_2	pitná voda - 3 mesiace
5.	24	–	0,5 mmol/l ZnCl_2	pitná voda - 3 mesiace
6.	24	+	0 mmol/l	pitná voda - 3 mesiace
7.	24	+	0,1 mmol/l vanadičnan	pitná voda - 3 mesiace
8.	24	+	0,5 mmol/l vanadičnan	pitná voda - 3 mesiace
9.	24	+	0,1 mmol/l ZnCl_2	pitná voda - 3 mesiace
10.	24	+	0,5 mmol/l ZnCl_2	pitná voda - 3 mesiace

Všetky sledované hodnoty sme vyjadrili ako priemer a štandardnú odchýlku priemeru. Na porovnanie medzi skupinami bol použitý Studentov t-test. Za signifikantný rozdiel sme považovali hodnoty pravdepodobnosti $P < 0,05$.

Výsledky a diskusia. Výsledky sú uvedené v Tab. 15. V prípade oboch suplementácií mali koncentrácie 0,5 mmol/l ešte toxický účinok, o čom svedčí aj počet uhynutých zvierat. Zvieratá, ktoré počas pokusu exitovali, boli silne dehydratované a mali profúzne hnačky. Hmotnostný prírastok u oboch koncentrácií vanadičnanu u nediabetických potkanov bol významne znížený. To v prípade chloridu zinočnatého zistené nebolo, a nebolo signifikantné ani pri koncentrácii 0,5 mmol/l. U diabetických potkanov protikladne neošetreným potkanom, pri všetkých koncentráciách suplementov došlo k zvýšeniu hmotnosti tela. Ale

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

oproti hmotnosti pri zaradení do pokusu, hmotnosť sa zvýšila len u potkanov ošetrovaných s 0,01 mmol/l koncentráciou oboch suplementov. Tento poznatok poukazuje na to, že pri dlhodobej aplikácii sú výhodnejšie nižšie koncentrácie, pri ktorých ešte nedochádza k toxickým vedľajším účinkom (dehydratácia a hnačky). Príjem krmiva u nediabetických potkanov bol významne znížený len v skupine s vyššou koncentráciou vanadičnanu. Pri diabetických potkanov vo všetkých suplementovaných skupinách bol významne znížený príjem potravy. V prípade príjmu vody to bolo podobné, až na to, že pri diabetických potkanoch bol výraznejšie znížený príjem vody pri suplementácii vanadičnanom oproti chloridu zinočnatému a to v oboch koncentráciách.

Tab. 15 – Vplyv vanadičnanu amónneho v chronickom pokuse na vybrané ukazatele u potkanov BB

P	sk.1	sk.2	sk.3	sk.4	sk.5	sk.6	sk.7	sk.8	sk.9	sk.10
D	0	0,1 V	0,5 V	0,1 Zn	0,5 Zn	0	0,1 V	0,5 V	0,1 Zn	0,5 Zn
Dia	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
S	24	24	22	24	24	24	24	20	24	21
M	0	0	2	0	0	0	0	4	1	3
b.w.	443±9	427±8	399±10	442±21	432±32	278±22	398±15	302±45	354±33	318±57
w.g	102	85	60	98	87	-66	56	-36	12	-28
LD	19,9±0,2	19,1±0,3	16,7±0,3	19,6±0,4	19,0±0,4	27,6±0,4	22,5±0,3	14,4±0,8	20,8±1,3	18,6±2,8
W	25,1±0,2	25,3±0,2	22,1±0,6	24,9±0,8	23,8±0,7	104,7±9	48,8±2,6	39,2±4,7	96,2±11	77,4±17
Dos	0	79±5	358±54	78±9	379±67	0	202±25	1050±98	348±36	1484±99
U	12,5±0,3	14,3±0,3	20,3±0,6	12,9±0,4	14,1±0,9	98,8±14	36,1±1,8	35,9±4,0	60,6±14	68,8±22
Vič	6,7±0,2	6,6±0,2	6,0±0,4	6,8±0,3	6,6±0,4	28,7±0,8	8,3±0,4	11,2±0,7	12,4±0,6	14,1±0,9
GU	42±3	55±4	87±6	48±4	40±7	467±67	136±34	360±98	289±88	224±83
OG	0,10	0,14	0,32	0,11	0,10	8,31	0,88	2,33	3,15	2,77
GI	0,67	0,69	0,72	0,69	0,69	2,08	0,74	1,56	1,19	1,52
AQ	0,93	0,93	0,91	0,93	0,93	0,40	0,93	0,68	0,70	0,70

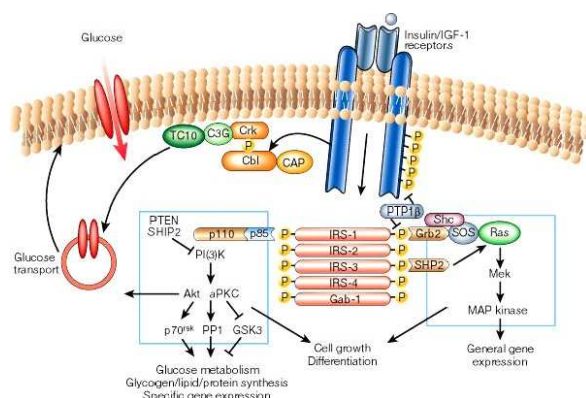
P = parameter; D = koncentrácia vanadičnanu amónneho (V) alebo chloridu zinočnatého (Zn) v mmol/l; Dia = diabetes; S = počet zvierat, ktoré pokus prežili; M = počet uhynutých zvierat; b.w. = hmotnosť zvierat v g; w.g = prírastok hmotnosti za 90 dní v g; LD = príjem krmiva za deň v g; W = príjem vody za deň v ml; Dos = dávka vanadičnanu resp. chloridu zinočnatého prijatého za 90 dní v mg/kg; U = výdaj moča za deň v ml; Glc = glykémia v mmol/l; GU = hľadina glukózy v moči v mmol/l; OG = celkový výdaj glukózy močom za deň v g; GI = glukózový index (pomer glykémie/sacharidy v potrave); AQ = asimilačný koeficient, podiel utilizovanej glukózy.

Zvýšená diuréza bola zistená u nediabetických potkanov pri oboch koncentráciách vanadičnanu, pri chloride zinočnatom len pri vyššej koncentrácii. Oproti tomu u diabetických zvierat vanadičnan v oboch koncentráciách významne znížil diurézu, zatiaľ čo tento účinok v prípade chloridu zinočnatého bol miernejší. Pri glykémiiach u nediabetických zvierat bol trend na zníženie glykémie len pri suplementácii vanadičnanom, chlorid zinočnatý bol v tomto smere bez účinku. Podobne u diabetických zvierat mal vanadičnan lepší účinok na zníženie glykémie, kde pri koncentrácii vanadičnanu 0,1 mmol/l takmer boli na

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

konci pokusu potkany v hornej oblasti euglykémie. Vanadičnan u nediabetických zvierat v pozitívnej korelácii s dávkou zvyšoval koncentráciu glukózy v moči. Oproti tomu u diabetických zvierat pri koncentrácii 0,1 mol/l vysoko významne ($P < 0,001$) znížil koncentráciu glukózy v moči. Pri dávke 0,5 mmol/l tento efekt nebol taký výrazný a medzi jednotlivými zvieratmi v skupine boli veľké rozdiely. Podobne aj chlorid zinočnatý mal v tomto smere významný efekt pri oboch dávkach. Tento euglykemizujúci a antiglykozurický účinok už je možné jednoznačne považovať za inzulín-like účinok. To potvrdzujú aj také ukazovatele ako glukózový index a asimilačný koeficient.

Na základe predložených výsledkov je možné konštatovať, že sú protikladné našich predchádzajúcim zisteniam (Ništiar a spol., 1999), s podstatne vyššou koncentráciou vanadičnanu (1,0 mmol/l v pitnej vode), pri čom sme tvrdili, že vanád nemá inzulínu podobné účinky a jeho efekt spočíva viac-menej v odmetaní potkanov piť vanadičnanom suplementovanú vodu, čo následne vedie ku zníženému príjmu potravy a zníženiu glykémie. Naše sprasné výsledky ukazujú, že ak sa vanadičnan nepoužije v toxických koncentráciách ale v koncentráciách okolo 0,1 mmol/l a dostatočne dlhú periódu môže mať táto suplementácia významný inzulín-like efekt. Tento účinok a jeho molekulové mechanizmy, zatiaľ ale nie sú úplne známe, najmä po uvedení si skutočnosti, že vyššie dávky vanadičnanu majú glykozúriu zvyšujúci efekt a tak pôsobia aj v terapeutických dávkach u nediabetických jedincov. Predpokladáme, že tu môže ísť o kostimuláciu určitých receptorových štruktúr vanádom, alebo moduláciu amplifikácie signálno-transdukčnej kaskády inzulínového receptora a jeho dráhy (obr. 13).



obr. 13 – Inzulínový receptor a jeho signálno-transdukčná dráha

8.4. Vplyv vanádu na incidenciu výskytu spontánneho diabetu u BB potkanov v multigeneračnom experimente

Pokus smeroval k zisteniu, či chronická suplementácia nízkych dávok vanádu má účinok na incidenciu výskytu spontánneho diabetu u potomstva počas niekoľkých filiálnych generácií (F1-F6). Do pokusu sme zaradili 6 párov potkanov kmeňa BB (P generácia), z ktorých ani jeden jedinec nebol diabetický. Tieto potkany boli suplementované vanadičnanom amónnym v koncentrácii 0,1 mmol/l v pitnej vode od veku 30 dní po narodení až do konca života. Ostatné generácie F1-F6 boli suplementované prakticky od narodenia až do konca života. Po narodení mláďat (F1 generácia) sme náhodne vybrali 6 samcov a 6 samíc, ktoré slúžili ako parentálna generácia pre ďalšiu filiálnu generáciu (F2) atď až po F6. V pokuse sme hodnotili počet narodených mláďat, počet odchovaných jedincov (tých, ktorí žili dlhšie ako 6 týždňov) a od 60 dňa sme u nich pravidelne mesačne raz stanovovali glykémiu (vždy ráno medzi 7.00 a 8.00 hod). V prípade ak boli aspoň tri náhodné glykémie vyššie ako 10 mmol/l považovali sme ich za potkanov náchylných na diabetes, ak boli tri následné glykémie (tri dni za sebou) vyššie ako 16 mmol/l, považovali sme ich za diabetické.

Na základe získaných výsledkov (Tab. 16) je možné konštatovať, že počet narodených mláďat mal výrazne klesajúci trend pri neošetrených potkanov vo filiálnych generáciách F4-F6, čo pri potkanoch suplementovaných vanadičnanom nebolo významné.

Čo sa týka prežívania narodených mláďat do 6. týždňov života (t.j. odchovaných jedincov) vykazoval tiež klesajúci trend v oboch skupinách, kde boli významné ($P < 0,05$) rozdiely zistené len v generácii F4 a F6 v prospech oštrenej skupiny.

Priemerná dĺžka života významne klesla u neošetrených potkanov v generáciách F4-F6 ($P < 0,05$, resp. $P < 0,001$ pre F6). Pri ošetrených potkanov tiež bol trend zvyšujúcou sa filiálnou generáciou ku skracovaniu priemernej doby života, ale bez štatistickej signifikancii.

Počet diabetických jedincov významne stúpol u neošetrených potkanov, najmä v generáciách F5-F6, zatiaľ čo v prípade potkanov oštrenej vanadič-

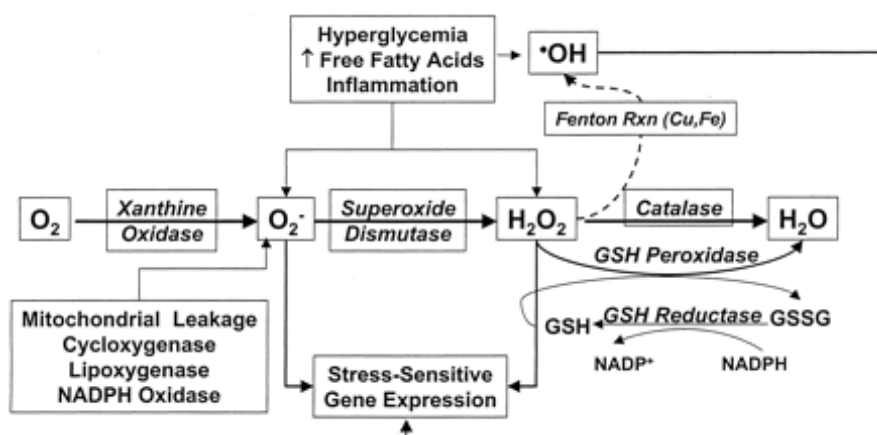
Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

nanom počet diabetických jedincov zostal v každej generácii pod 10%. Vysvetlenie tohto preventívneho účinku suplementácie vanadičnanom na prepuknutie diabetes mellitus bude vyžadovať ďalšie štúdiá, najmä na molekulárnej úrovni. Pravdepodobne to bude otázka potlačania mechanizmov rozvoja oxidačného stresu (obr. 14), resp. signálno-transdukčných dráh zúčastnených v rozvoji oxidačného stresu. V počte jedincov náchylných na diabetes medzi skupinami nebol významný rozdiel.

Tab.16 – Vplyv suplementácie vanadičnanu amónneho (1 mmol/l) v pitnej vode na incidenciu diabetu u potkanov kmeňa BB v multigeneračnej štúdii

	Neošetrené							Ošetrené						
	P	F1	F2	F3	F4	F5	F6	P	F1	F2	F3	F4	F5	F6
počet	12	473	482	438	382	365	352	12	469	458	444	438	433	431
% preživa	NT	94	95	89	79	73	63	NT	92	90	86	90	77	75
doba života	874	858	844	832	768	748	684	868	888	864	851	854	819	805
počet odchovaných	NT	444	457	383	301	266	221	NT	432	414	384	396	334	325
Nediabetické	12	429	411	317	253	184	76	12	418	376	335	326	266	249
diabetic.	0	9	13	24	23	44	98	0	2	10	14	28	24	20
% diabetických	NT	2,0	2,8	6,3	7,6	16,5	44,3	NT	<1,0	2,4	3,6	7,0	7,2	6,2
náchylní	0	6	33	42	35	38	47	0	12	28	35	42	44	56

Počet = udáva počet narodených zvierat a tým zaradených do pokusu (okrem P generácie); % preživa = je počet zvierat, ktoré prežili dlhšie ako 6 týždňov, neradili sme ich už do úhynu neonatov; počet odchovaných = počet zvierat žijúcich dlhšie ako 6 týždňov; doba života = udáva priemernu dobu života vypočítanú zo skupiny odchovaných jedincov; diabetický = aspoň tri následné glykémie vyššie ako 16 mmol/l; náchylní = aspoň tri glykémie vyššie ako 10 mmol/l.



obr. 14 – ROS (reaktívne formy kyslíka) a diabetes mellitus

Na základe zistených výsledkov sa ukazuje, že dlhodobá suplementácia vanadičnanom znižuje incidenciu diabetu u BB potkanov. To potvrdzujú aj ďal-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

šie ukazovatele, ako počet narodených a odchovaných jedincov, resp. priemerná doba života. Čo je v pozadí tohto fenoménu nám ukážu pravdepodobne až podrobnejšie štúdiá, ako sú štúdium antioxidačného statusu, poprípade odhalenie molekulovej podstaty účinku vanadičnanu pri dlhodobej suplementácii. K tomu nám môžu v prvej etape poskytnúť predbežné vysvetlenia štúdiá na modeli jednobunkového organizmu *Tetrahymena pyriformis*.

8.5. Vplyv vanádu a zinku na homeostázu glukózy u prvoka *Tetrahymena pyriformis*

Úvod. Jednobunkové živočíchy sú neustále vystavené škodlivým účinkom vodného prostredia v ktorom žijú. Preto musia disponovať s mimoriadne dynamickým systémom schopným rozpoznávať tieto environmentálne škodliviny (Koch a spol., 1979). Rozpoznávací systém je reprezentovaný receptorovou konfiguráciou na povrchu buniek, ktoré registrujú prítomnosť poškodzujúcej molekuly (signálu) a aktiváciou príslušnej signálno-transdukčnej dráhy zmobilizujú v bunke škodlivinu neutralizujúce systémy, napr. expresiu biologicky aktívnych receptorov (s katalytickou aktivitou) schopných nadviazať a rozložiť (alebo iným spôsobom zneutralizovať) toxickú substanciu. O takomto signálnom imprintingu v prípade inzulínového receptora u *Tetrahymena pyriformis* referovali Kovács a Csaba (1990, 1992). Pri funkcii tohto receptora zohrávajú dôležitú úlohu tyrozínkinázy. Nadviazanie inzulínu na α subjednotku vyvolá autofosforyláciu β subjednotky s tyrozínkinázovou aktivitou, ktorá spustí charakteristický inzulínový účinok (Rosen, 1987). Pri tomto procese dochádza ku kooperácii celého radu systémov druhých poslov (Kovács a Csaba, 1992). Tyrozínkinázová aktivita inzulínového receptora aktivuje fosfoinozitolkinázy, ktorá ovplyvňuje hladinu inozitoltrifosfátu (IP_3) a diacylglycerolu, proteínkinázy C, ktorá vplýva na funkciu Ca^{2+} -závislého kalmodulínového systému. Vanád je považovaný za aktivátor tyrozínkinázovej aktivity inzulínového receptora (Kovács a Csaba, 1992). Na druhej strane sa inzulínu podobný účinok realizuje tým, že vanád reverzibilne, resp. peroxovanádový komplex ireverzibilne inhibujú proteínové tyrozínfosfatázy

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

(PTPs). Inhibícia PTPs a následné zvýšenie bunkových fosforylácií pripomína inzulínu podobný účinok (Morinville a kol., 1998). Na základe in vitro experimentov s vanadičnanom (Tolman a kol., 1979; Gomez-Foix a kol., 1988; Pugazhenti a Khandelwal, 1992) predpokladal a preukázal celý rad autorov (Heyliger a kol., 1987; Brichard a kol., 1988; King a kol., 1993) aj in vivo inzulínu podobný účinok. Na druhej strane sa objavili aj práce, ktoré in vivo nepotvrdili inzulínu podobný účinok vanadičnanu (Bosch a kol., Domingo a kol., 1992; Stohs a Bagchi, 1995). V chronickom pokuse pri perorálnej aplikácii 1 mmol NH_4VO_3 v pitnej vode sme nepreukázali inzulínu podobný účinok vanadičnanu ani my (Nišťiar a kol., 1994, 1999). Pri použití významne nižších koncentrácií vanadičnanu okolo 0,1 mmol/l sme zistili v chronickom pokuse, resp. V multigeneračnej štúdií iné výsledky (uvedené vyššie).

Cieľom tejto práce bolo objasniť účinok vanadičnanu na utilizáciu glukózy u prvoka *Tetrahymena pyriformis*.

Materiál a metodika: *Tetrahymena pyriformis* kmeň W bol pestovaný v proteóza peptónovom médiu 0,2 % s obsahom kvasničného extraktu 0,1% pri 28 °C v tme. V logaritmickú fázu rastu boli bunky trikrát prepraté v minerálnom médiu (Kováč a kol., 1995) a upravená ich koncentrácia na $2 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ minerálneho média (2x koncentrovaného). K 5,0 ml takejto kultúry sme pridali 5,0 ml testovaného substrátu tak, aby finálna koncentrácia testovaných látok v experimentálnom systéme bola 20,0 mmol/l glukózy (1.skupina), 1,0 mmol/l vanádu (v NH_4VO_3 p.a., Lachema, 2.skupina), 0,5 mmol/l vanádu (3.skupina), 0,25 mmol/l vanádu (4.skupina), 1,0 mmol/l vanádu + 20,0 mmol/l glukózy (5.skupina), 0,5 mmol/l vanádu + 20,0 mmol/l glukózy (6.skupina) a 0,25 mmol/l vanádu + 20,0 mmol/l glukózy (7.skupina).

Po 24 hodinovej inkubácii (pri 25 °C a v tme) sme stanovili počty buniek (Kováč a Lukačínová, 1996; Kováč a kol., 1998) a koncentráciu glukózy v médiu po odstránení buniek prvoka (Oxochrom-Glukóza, Lachema). V každej skupine bolo nastavených 24 paralelných vzoriek (skúmaviek).

Výsledky boli spracované Studentovým t-testom.

Výsledky a diskusia: Na základe zistených výsledkov je možné predpokladať, že vanád v koncentrácii 1 mmol/l má mierne toxický účinok (Tab 17), na-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

koľko znížil počet buniek z pôvodných $1 \cdot 10^{-6} \cdot \text{ml}^{-1}$ na $4,6 \cdot 10^{-5} \cdot \text{ml}^{-1}$ média. V prípade 0,5 a 0,25 mmol/l vanádu sa počet buniek zvýšil len mierne, $1,2 \cdot 10^{-6} \cdot \text{ml}^{-1}$, resp. $1,4 \cdot 10^{-6} \cdot \text{ml}^{-1}$ média. V prípade 20 mmol/l glukózy došlo k nárastu počtu buniek na $6,8 \cdot 10^{-6} \cdot \text{ml}^{-1}$ média. V skupine s 1 mmol/l vanádu + 20 mmol/l glukózy bol nárast počtu prvokov porovnateľný s kontrolnou skupinou (20 mmol/l glukózy), tj. $6,1 \cdot 10^{-6} \cdot \text{ml}^{-1}$ média. V prípade 0,5 a 0,25 mmol/l vanádu + 20 mmol/l glukózy boli nárasty počtu buniek významne ($P < 0,01$) vyššie, $8,9 \cdot 10^{-6} \cdot \text{ml}^{-1}$, resp. $9,7 \cdot 10^{-6} \cdot \text{ml}^{-1}$ média. Tieto výsledky zodpovedajú údajom Morinville-a a kol. (1998) o možnom cytotoxickom účinku vanádu v koncentráciach vyšších ako 10 $\mu\text{mol/l}$ média pre primárne bunkové kultúry a línie nádorových buniek.

Tab. 17 – Vplyv vanadičnanu na rast a utilizáciu glukózy u *Tetrahymena pyriformis*

TPW v médiu po pridaní	počet buniek	Glc
20 mmol/l glukózy	6,835±0,77	12,6±0,6
1,0 mmol/l vanadičnanu amónneho	0,460±0,05	0,95±0,3
0,5 mmol/l vanadičnanu amónneho	1,248±0,08	0,88±0,4
0,25 mmol/l vanadičnanu amónneho	1,444±0,03	0,42±0,2
1,0 mmol/l vanadičnanu + 20 mmol/l glukózy	6,108±0,65	12,4±0,6
0,5 mmol/l vanadičnanu + 20 mmol/l glukózy	8,883±0,64	7,2±0,3
0,25 mmol/l vanadičnanu + 20 mmol/l glukózy	9,696±0,48	4,8±0,2
TPW = <i>Tetrahymena pyriformis</i> W; počet buniek = v miliónoch na ml kultivačného média; Vlč = koncentrácia glukózy v mmol/l;		

Po 24 hodinovej inkubácii hľadiny glukózy sú uvedené na Tab. 17. V skupinách, ktoré dostali len vanád boli hľadiny glukózy v každom prípade nižšie ako 1 mmol/l (obvyčajne vyplavené z buniek ich rozpadom). Hľadiny glukózy boli porovnateľné medzi kontrolnou skupinou a skupinou, ktorá dostala 1 mmol/l vanádu + 20 mmol/l glukózy, t.j. $12,6 \pm 0,6$ mmol/l resp. $12,4 \pm 0,6$ mmol/l, ale významne sa líšili ($P < 0,02$) ak sme utilizáciu glukózy vyjadrili na počet buniek prvoka *Tetrahymena pyriformis* (Tab. 18). V prípade 0,5 mmol/l vanádu + 20 mmol/l glukózy za 24 hodinovú inkubáciu došlo ku zníženiu glukózy v médiu na $7,2 \pm 0,3$ mmol/l, ešte viac pri 0,25 mmol/l vanádu + 20 mmol/l glukózy v médiu na $4,8 \pm 0,2$ mmol/l. Utilizácia glukózy a pomer utilizovanej glukózy na počet prvokov *Tetrahymena pyriformis* je uvedený v Tab. 18. Na základe prezentovaných výsledkov môžeme s veľkou istotou konštatovať, že vanád zvyšuje utilizáciu glu-

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

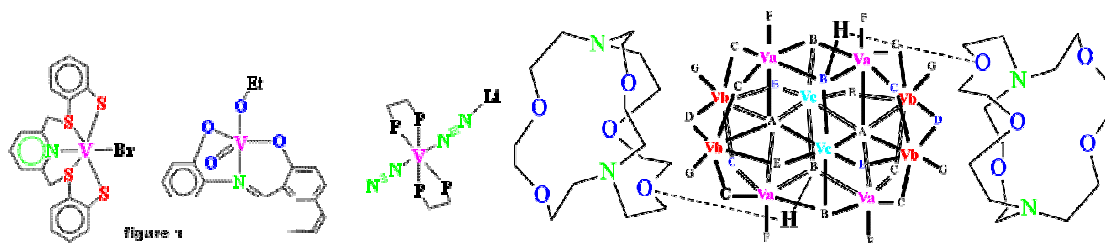
kózy, pravdepodobne aktiváciou inzulínového receptora a následných signálo-transdukčných mechanizmov (Kovács a Csaba, 1992; Csaba a Hegyesi, 1994; Morinville a kol., 1998). Napriek dôkazu o inzulínu podobnom účinku vanádu, doposiaľ zastávame názor, že pri in vivo experimentoch hlavný mechanizmus znižujúci glykémiu je refúzny účinok vanadičnanom oštrenej vody.

Tab. 18 - Utilizácia glukózy prvkami *Tetrahymena pyriformis* v prítomnosti vanadičnanu po 24 hodinovej inkubácii

TPW v médiu po pridaní	U Glc	U Glc/M buniek	U Glc v mg	U Glc v mg/M buniek
20 mmol/l Glc	7,4±0,9	1,08±0,06	13,32±1,22	1,95±0,04
1,0 mmol/l V + 20 mmol/l Glc	7,6±0,7	1,24±0,05	13,68±1,14	2,24±0,03
0,5 mmol/l V + 20 mmol/l Glc	12,8±0,6	1,45±0,03	23,04±1,08	2,59±0,03
0,25 mmol/l V + 20 mmol/l Glc	15,2±0,7	1,57±0,02	27,36±1,22	2,82±0,04

TPW = *Tetrahymena pyriformis* W; U Glc = utilizácia glukózy v mmol/l; U Glc/M buniek = utilizácia glukózy v mmol na 10 miliónov buniek; V = vanadičnan; Glc = glukóza;

Predpokladáme, že pri nižších dávkach vanadičnanu, ktoré by nevykazovali toxický, resp. refúzny efekt, po dlhodobej (aspoň 3 mesačnej) aplikácii by mohlo dôjsť aj in vivo k pozitívnemu účinku, bez dehydratácie zvierat. Overenie tohto predpokladu bude cieľom našich ďalších pokusov, ako i overenie iných aplikačných schém (pažeráková sonda, i.v., i.p., i.m.) v chronickom experimente s podstatne nižšími dávkami (tj. okolo 10-600 $\mu\text{g vanádu.kg}^{-1}$ živej hmotnosti). Zaujímavé by bolo overiť aj polyoxovanadičnanové (obr. 15), peroxovanádové komplexy, či už bisperoxovanádový komplex $M[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{L}]^n \cdot x\text{H}_2\text{O}$ alebo monovanádový komplex $M[\text{VO}(\text{O}_2)\text{L}]^n \cdot x\text{H}_2\text{O}$, ktoré sú podstatne stabilnejšie ako vanadičnan amónny či sodný, aj keď ich stabilita v biologických systémoch nie je známa (Morinville a kol., 1998).



obr. 15 – Komplexy zlúčenin vanádu a polyoxovanadičnan

9. Literatúra

1. **Altamarino-Lozano, M. - Valverde, M. - Alvarez-Barrera, L. - Molina, B. - Rojas, E.:** Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V(2)O(5)) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogen. Carcinog. Mutagen.*, 19, **1999**: 243-255.
2. **Anke, J.K. - Groppe, B. - Gruhn, L. - Langer, M. - Arnhold, W.:** New research on vanadium deficiency in ruminants. In: Anke, M. - Baumann, W. - Braunlich, H. - Bruckner, C. - Groppe, B. (eds.): Spurenelement-symposium: New Trace Elements. Friedrich-Schiller Universität, Jena, **1986**: 1266-1275.
3. **Badmaev, V. - Prakash, S. - Majeed, M.:** Vanadium: a review of its potential role in the fight against diabetes. *J. Alternative Complementary Med.*, 5, **1999**: 273-291.
4. **Barceloux, D.G.:** Vanadium. *Clin. Toxicol.*, 37, **1999**: 265-278.
5. **Barnes, D.M. - Sykes, D.B. - Shechter, Y. - Miller, D.S.:** Multiple sites of vanadate and peroxovanadate action in *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Physiol.*, 162, **1995**: 154-161.
6. **Beliaeva, N.F. - Gorodetskii, V.K. - Tochilkin, A.I. - Golubev, M.A. - Semenov, A.D. - Kovel'man, I.R.:** Vanadium compounds - a new class of therapeutic agents for treatment of diabetes mellitus. *Vopr. Med. Khim.*, 46, **2000**: 344-360.
7. **Bencko, V. - Cikrt, M. - Lener, J.:** Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. Grada-Avicenum, Praha, **1995**: 255-268.
8. **Bevan, A.P. - Drake, P.G. - Yale, J.-F. - Shaver, A. - Posner, B.I.:** Peroxovanadium compounds: biological actions and mechanism of insulin mimesis. *Mol. Cell. Biochem.*, 153, **1995**: 49-58.
9. **Bevan, A.P. - Burgess, J.W. - Yale, J.F. - Drake, P.G. - Lachance, D. - Baquiran, G. - Shaver, A. - Posner, B.I.:** In vivo insulin mimetic effects of pV compounds: role for tissue targeting in determining potency. *Am. J. Physiol.*, 268, **1995**: 60-66.
10. **Bhanot, S. - Bryer-Ash, M. - Cheung, A. - McNeill, J.H.:** Bis(maltolato)oxo-vanadium(IV) attenuates hyperinsulinemia and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Diabetes*, 43, **1994**: 857-861.
11. **Blondel, O. - Bailbe, D. - Portha, B.:** In vivo insulin resistance in streptozotocin-diabetic rats - evidence for reversal following vanadate treatment. *Diabetologia*, 32, **1989**: 185-190.
12. **Blondel, O. - Simon, J. - Chevalier, B. - Portha, B.:** Impaired insulin action but normal insulin receptor activity in diabetic rat liver: effect of vanadate. *Am. J. Physiol.*, 258, **1990**: E459-E467.
13. **Boden G. - Chen, X. - Ruiz, J. - van Rossum, G.D. - Turco, S.:** Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 45, **1996**: 1130-1135.
14. **Bogden, J.D. - Higashino, H. - Lavenhar, M.A. - Bauman, J.W.jr. - Kemp, F.W. - Aviv, A.:** Balance and tissue distribution of vanadium after short-term ingestion of vanadate. *J. Nutr.*, 112, **1982**: 2279-2285.
15. **Bosch, F. - Arino, J. - Gomez-Foix, A.M. - Guinovart, J.J.:** Glycogenolytic noninsulin-like effects of vanadate on rat hepatocyte glycogen synthase and phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, 262, **1987**: 218-222.
16. **Boscolo, P. - Carmignani, M. - Volpe, A.R. - Felaco, M. - Del Rosso, G. - Porcelli, G. - Giuliano, G.:** Renal toxicity and arterial hypertension in rats chronically exposed to vanadate. *Occup. Environm. Med.*, 51, **1994**: 500-503.
17. **Brichard, S.M. - Bailey, C.J. - Henzuin, J.C.:** Marked improvement of glucose homeostasis in diabetic ob/ob mice given oral vanadate. *Diabetes*, 39, **1990**: 1326-1332.
18. **Brichard, S.M. - Desbuquois, B. - Girard, J.:** Vanadate treatment of diabetic rats reverses the impaired expression of genes involved in hepatic glucose metabolism: effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes and on glucose transporter GLUT2. *Mol. Cell Endocrinol.*, 91, **1993**: 91-97.
19. **Brichard, S.M. - Okitolonda, W. - Henquin, J.C.:** Long-term improvement of glucose homeostasis by vanadate treatment in diabetic rats. *Endocrinology*, 123, **1988**: 2048-2053.
20. **Brichard, S.M. - Pottier, A.M. - Henzuin, J.C.:** Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate in obese hyperinsulinemic fa/fa rats. *Endocrinology*, 125, **1989**: 2510-2516.

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

21. **Butler, A. - Carter, J.N. - Simpson, M.T.:** Vanadium in proteins and enzymes. In: Bertini, I. - Sigel, A. - Sigel, H.: Handbook on Metalloproteins. Marcel Dekker Inc., New York - Basel, **2001**: 154-179.
22. **Byrne, A.R. - Kosta, L.:** Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. *Sci. Total. Environ.*, **10**, **1993**: 17-30.
23. **Cam, M.C. - Brownsey, R.W. - McNeill, J.H.:** Mechanism of vanadium action: insulin-mimetic or insulin enhancing agent? *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **78**, **2000**: 829-847.
24. **Cam, M.C. - Faun, J. - McNeill, J.H.:** Concentration-dependent glucose lowering effects of vanadyl are maintained following treatment withdrawal in streptozotocin diabetic rats. *Metabolism*, **44**, **1995**: 332-339.
25. **Campbell, N.J. - Dengel, A.C. - Griffith, W.P.:** Studies on transition metal peroxo complexes –X. The nature of peroxovanadates in aqueous solution. *Polyhedron*, **8**, **1989**: 1379-1386.
26. **Caravan, P. - Gelmini, L. - Glover, N. - Herring, F.G. - Li, H. - McNeill, J.H. - Rettig, S.J. - Setyawati, I.A. - Shuter, E. - Sun, Y. - Tracey, A.S. - Yuen, V.G. - Orvig, C.:** Reaction chemistry of BMOV, bis(maltolato)oxovanadium(IV), a potent insulin mimetic agent. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, **1995**: 12759-12770.
27. **Chasteen, N.D.:** The biochemistry of vanadium. *Struct. Bond. (Berlin)*, **53**, **1983**: 105-138.
28. **Chasteen, N.D. (ed.):** Vanadium in Biological systems: Physiology and Biochemistry. Kluwer Academic Press, Dordrecht, **1990**.
29. **Chrappová, J. - Schwendt, P. - Marek, J.:** Fluoroperoxokomplexy vanádu (V). IV. seminář „Pokroky v anorganické chémii“. Sborník příspěvků. Vranov u Brna, 16. - 19. září **2002**: 33-34.
30. **Cohen, N. - Halberstam, M. - Shlimovich, P. - Chang, C.J. - Shamon, H. - Rossetti, L.:** Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **95**, **1995**: 2501-2509.
31. **Crans, D.C.:** Enzyme interactions with labile oxovanadates and other polyoxometalates. *Comment Inor. Chem.*, **16**, **1994**: 1-33.
32. **Crans, D.C.:** Chemistry and insulin-like properties of vanadium(IV) and vanadium(V) compounds. *J. Inorg. Biochem.*, **80**, **2000**: 123-131.
33. **Crans, D.C. - Mahroof-Tahir, M. - Keramidias, A.D.:** Vanadium chemistry and biochemistry of relevance for use of vanadium compounds as antidiabetic agents. *Mol. Cell. Biochem.*, **153**, **1995**: 17-24.
34. **Crans, D.C. - Tracey, A.S.:** The chemistry of vanadium in aqueous and nonaqueous solution. In: Tracey, A.S. - Crans, D.C. (eds.): Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications. American Chemical Society Symposium Series 117, Oxford Univ. Press, Washington, **1998**.
35. **Cruz, T.F. - Morgan, A. - Min, W.:** In vitro and in vivo antineoplastic effects of orthovanadate. *Mol. Cell. Biochem.*, **153**, **1995**: 161-166.
36. **Csaba, G. - Hegyesi, H.:** Immunocytochemical verification of the insulin receptor's specificity in the nuclear envelope of eukaryotes. Comparison with receptors of the plasma membrane. *Biosci.Rep.*, **14**, **1994**: 25-31.
37. **Curran, G.L. - Azarnoff, D.L. - Bolinger, R.E.:** Effect of cholesterol synthesis inhibition in normocholesterolemic young men. *J. Clin. Invest.*, **38**, **1959**: 1251-1261.
38. **Cusi, K. - Cukier, S. - DeFronzo, R.A. - Torres, M. - Puchulu, F.M. - Redondo, J.C.P.:** Vanadyl sulfate improves hepatic and muscle insulin sensitivity in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, **2001**: 1410-1417.
39. **Dai, S. - Vera, E. - McNeill, J.H.:** Lack of haematological effect of oral vanadium treatment in rats. *Pharmacol. Toxicol.*, **76**, **1995**: 263-268.
40. **Degani, H. - Gochin, M. - Karlisch, S.J.D. - Shechter, Y.:** Electron paramagnetic studies and insulin-like effects of vanadium in rat adipocytes. *Biochemistry*, **20**, **1981**: 5795-5799.
41. **Derijard, B. - Raineaud, J. - Barrett, T. - Wu, I.H. - Han, J. - Ulevitch, R.J. - Davis, R.J.:** Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, **267**, **1995**: 682-685.

Ništiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

42. Djordjevic, C. - Vuletic, N. - Renslo, M.L. - Puryear, B.C. - Alimard, R.: Peroxo heteroligand vanadates(V): synthesis, spectra-structure relationships, and stability toward decomposition. *Mol. Cell. Biochem.*, 153, **1995**: 25-29.
43. Djordjevic, C. - Wampler, G.L.: Antitumor activity and toxicity of peroxo heteroligand vanadates (V) in relation to biochemistry of vanadium. *J. Inorg.Biochem.*, 25, **1985**: 51-55.
44. Domingo, J.L.: Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? *Mol. Cell. Toxicol.*, 203, **2000**: 185-187.
45. Domingo, J.L. - Gomez, M. - Llobet, J.M. - Corbella, J. - Keen, C.L.: Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side-effects which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology*, 66, **1991a**: 279-287.
46. Domingo, J.L. - Gomez, M. - Sanchez, D.J. - Llobet, J.M. - Keen, C.L.: Iron administration minimizes the toxicity of vanadate but not its insulin mimetic properties in diabetic rats. *Life Sci.*, 50, **1992**: 1311-1317.
47. Domingo, J. L. - Llobet, J.M. - Gomez, M. - Corbella, J. - Keen, C.L.: Effects of oral vanadium administration in streptozotocin-diabetic rats, In: Collery, P. - Porter, L.A. - Manfalt, M. - Etienne, J.C. (eds.): *Metal Ions in Biology and Medicine*, John Libbey Eurotext, Paris, **1990**: 312-314.
48. Domingo, J.L. - Paternain, J.L. - Llobet, J.M. - Corbella, J.: Effects of vanadium on reproduction, gestation, parturation and lactation in rats upon oral administration. *Life Sci.*, 39, **1986**: 819-824.
49. Drake, P.G. - Bevan, A.P. - Burgess, J.W. - Bergeron, J.J.M. - Posner, B.I.: A role of tyrosine phosphorylation in both activation and inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase in vivo. *Endocrinology*, 137, **1996**: 4960-4968.
50. DUBYAK, G.R. - Kleinzeller, A.D.: The insulin-mimetic effects of vanadate as a Na⁺-K⁺ ATPase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 255, **1980**: 5306-5312.
51. Duckworth, W.C. - Solomon, S.S. - Liepnieks, J. - Hamel, F.G. - Hand, S. - Peavy, D.E.: Insulin-like effects of vanadate in isolated rat adipocytes. *Endocrinology*, 122, **1988**: 2285-2289.
52. Edel, J. - Sabbioni, E.: Vanadium transport across placenta and milk of rats to the foetus and newborn. *Biol. Trace Element Res.*, 22, **1989**: 265-275.
53. Ehring, G.R. - Kerschbaum, H.H. - Fanger, C.M. - Eder, C. - Rauer, H. - Cahalan, M.D.: Vanadate induces calcium signaling Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activation, and gene expression in T lymphocytes and RBL-2H3 mast cells via thiol oxidation. *J. Immunol.*, 164, **2000**: 679-687.
54. Fantus, I.G. - Deragon, G. - Lai, R. - Tang, S.: Modulation of insulin action by vanadate: evidence of a role for phosphotyrosine phosphatase activity to alter cellular signaling. *Mol. Cell. Biochem.*, 153, **1995**: 103-112.
55. Faure, R. - Vincent, M. - Dufour, M. - Shaver, A. - Posner, B.I.: Arrest at the G2/M transition of the cell cycle by protein-tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and glial cell line. *J. Cell. Biochem.*, 59, **1995**: 389-401.
56. Ferber, S. - Meyerovitch, J. - Kriauciunas, K.M. - Kahn, C.R.: Vanadate normalizes hyperglycemia and PEPCK mRNA levels in ob/ob mice. *Metabolism*, 43, **1994**: 1346-1354.
57. Foresti, M. - Scippa, S. - Mele, F. - Palladino, G. - de Vincentiis, M.: A short low-level exposure to metavanadate during a cell cycle-specific interval of time is sufficient to permanently derange the differentiative properties of Mel cells. *Mutagenesis*, 16, **2001**: 395-400.
58. Ganguli, S. - Reuland, D.J. - Franklin, L.A. - Deakins, D.D. - Johnston, W.J. - Pasha, A.: Effects of maternal vanadate treatment of fetal development. *Life Sci.*, 55, **1994**: 1267-1276.
59. Gil, J. - Miralpeix, M. - Carreras, J. - Bartrons, R.: Insulin like effects of vanadate on glucokinase activity and fructose 2,6-biphosphate levels in livers of diabetic rats. *J. Biol. Chem.*, 263, **1988**: 1868-1871.
60. Goldfine, A.B. - Simonson, D.C. - Folli, F. - Patti, M.E. - Kahn, C.R.: Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80, **1995**: 3311-3320.
61. Goldwaser, I. - Qian, S. - Gershonov, E. - Fridkin, M. - Shechter, Y.: Organic vanadium chelators potentiate vanadium-evoked glucose metabolism in vitro and in vivo: establishing criteria for optimal chelators. *Mol. Pharmacol.*, 58, **2000**: 738-746.

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

62. **Gomez, M. - Sanchez, D.J. - Domingo, J.L. - Corbella, J.:** Embryotoxic and teratogenic effects of intraperitoneally administered metavanadate in mice. *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, 37, 1992: 47-56.
63. **Gomez-Foix, M. - Rodriguez-Gil, J. E. - Fillat, C. - Guinovart, J. J. - Bosch, F.:** Vanadate raises fructose 2,6-biphosphate concentrations and activates glycolysis in rat hepatocytes. *Biochem.J.*, 255, 1988: 507-512.
64. **Green, A.:** The insulin like effect of sodium vanadate on adipocyte transport is mediated at a post-insulin receptor level. *Biochem. J.*, 283, 1993: 663-669.
65. **Guerrieri, N. - Cerletti, P. - De Vincentiis, M. - Sakvati, A. - Scippa, S.:** Vanadium inhibition of serine and cysteine proteases. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part A, 122, 1999: 331-336.
66. **Hajjar, J.J. - Fucci, J.C. - Rowe, W.A. - Tomicic, T.K.:** Effect of vanadate on amino acid transport in rat jejunum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 184, 1987: 403-409.
67. **Halberstam, M. - Cohen, N. - Shlimovich, P. - Rossetti, L. - Shamoon, H.:** Oral vanadyl sulfate improves insulin sensitivity in NIDDM but not in obese nondiabetic subjects. *Diabetes*, 45, 1996: 659-666.
68. **Heffetz, D. - Bushkin, H. - Dror, R. - Zick, Y.:** The insulinomimetic agents H_2O_2 and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J. Biol. Chem.*, 265, 1990: 2896-2902.
69. **Hei, Y.-J. - Chen, X. - Pelech, S.L. - Diamond, J. - McNeill, J.H.:** Skeletal muscle mitogen activated protein kinases and ribosomal S6 kinases. Suppression in chronic diabetes and reversal by vanadium. *Diabetes*, 44, 1995: 1147-1155.
70. **Hei, Y.-J. - Diamond, J. - McNeill, J.H.:** Distribution of Map kinase, S6 kinase and casein kinase-2 in rat tissues, activation by insulin in spleen. *Biochem. Cell. Biol.*, 72, 1994: 49-53.
71. **Heylinger, C.E. - Tahiliani, A.G. - McNeill, J.H.:** Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science*, 227, 1985: 1474-1477.
72. **Hrušovský, J. - Nišťiar, F.:** Využitie prvoka *Tetrahymena pyriformis* ako bio-testu na stanovenie bojových otravných látok v biologických materiáloch. *Vojenské zdravotnícke listy*, 56, 1987: 163-165.
73. **Hudson, T.G.F.:** The effects of vanadium on metabolism (continued). In: Browning, E. (ed.): Vanadium, Toxicology and Biological Significance. Elsevier, New York, 1964: 30-43.
74. **Huyer, G. - Liu, S. - Kelly, J. - Moffat, J. - Payette, P. - Kennedy, B. - Tsapralis, G. - Gresser, M.J. - Ramachandran, C.:** Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.*, 272, 1997: 843-851.
75. **Jackson, T. - Salhanick, A.I. - Sparks, J.D. - Sparks, C.E. - Bolognino, M. - Amatrude, J.M.:** Insulin-mimetic effects of vanadate in primary cultures of rat hepatocytes. *Diabetes*, 37, 1954: 1234-1240.
76. **King, J. - Pugazhenti, S. - Khandelwal, R. L. - Sharma, R. K.:** Elevated N-myristoyl transferase activity is reversed by sodium orthovanadate in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1165, 1993: 259-262.
77. **Koch, A.S. - Fehér, J. - Lukovics, I.:** Single model of dynamic receptor pattern generation. *Biol. Cybernet.*, 32, 1979: 135-138.
78. **Korec, R.:** Experimental and Spontaneous Diabetes Mellitus in the Rat and Mouse. Ed. Center of University P.J. Šafárik, Košice, 1991: 13-25.
79. **Korec, R. - Nišťiar, F.:** Vanadat hat nicht einen Wahren Insulin-like Effekt in vivo bei Streptozotocin, Alloxan und BB-diabetischen Ratten. *Intern. Donau Symp. Diabetes*, Krakow, 1993: 38A.
80. **Korec, R. - Nišťiar, F.:** A reevaluation of vanadate (V^{5+}) and zinc (Zn^{2+}) effects in STZ-, alloxan- and BB-diabetic rats. *Abstr. 15th. Intern. Diabetes Fed. Congr.*, Japan, 1994: 425A, No.10APP1085.
81. **Kováč, G. - Lukačínová, A.:** *Tetrahymena pyriformis* - perspektívny laboratórny model (Toxikologické štúdiá). *Slov. vet. čas.*, 21, 1996: 137-141.
82. **Kováč, G., -Lukačínová, A. - Lukačín, Š.mI.:** *Tetrahymena pyriformis* - perspektívny laboratórny model (Biológia a udržiavanie kultúry). *Slov. vet. čas.*, 20, 1995: 277-280.
83. **Kováč, G. - Seidel, H. - Lukačínová, A.:** Vplyv ultrafialového a gama žiarenia na *Tetrahymena pyriformis* kmeň W. *Slov. vet. čas.*, 23, 1998: 251-255.

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

84. **Kovács, P. - Csaba, G.:** Involvement of the phosphoinositol (PI) system in the mechanism of hormonal imprinting. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 170, **1990**: 119-126.
85. **Kovács, P. - Csaba, G.:** Effects of inhibitors and activators of tyrosine kinase on insulin imprinting in Tetrahymena. *Cell. Biochem. Funct.*, 10, **1992**: 267-271.
86. **Kovács, P. - Hegyesi, H. - Csaba, G.:** Effects of vanadate and ouabain on binding and insulin imprinting in Tetrahymena. *Cell. Biochem. Funct.*, 10, **1992**: 31-34.
87. **Krady, M.-M. - Freyermuth, S. - Rogue, P. - Malviya, A.N.:** Pervanadate elicits proliferation and mediates activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in the nucleus. *FEBS Lett.*, 412, **1997**: 420-424.
88. **Krejsa, C.M. - Nadler, S.G. - Esselstyn, J.M. - Kvanagh, T.J. - Ledbetter, J.A. - Schieven, G.L.:** Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.*, 272, **1997**: 11541-11549.
89. **Lavoie, J.N. - L'Allemain, G. - Brunet, A. - Müller, R. - Pouysségur, J.:** Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44^{MAPK} and negatively by the p38/HOG^{MAPK} pathway. *J. Biol. Chem.*, 271, **1996**: 20608-20616.
90. **Lee, F.S. - Hagler, J. - Chen, Z.J. - Maniatis, T.:** Activation of the I κ B α kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell*, 88, **1997**: 213-222.
91. **Léonard, A. - Gerber, G.B.:** Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat. Res.*, 317, **1994**: 81-88.
92. **Lewis, R.J. - Tatken, R.L. (eds.):** NIOSH: Registry of toxic effects of chemical substances. Cincinnati, Ohio, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare. **1979**.
93. **Llobet, J.M. - Colomina, M.T. - Sirvent, J.J. - Domingo, J.L. - Corbella, J.:** Reproductive toxicology evaluation of vanadium in male mice. *Toxicology*, 80, **1993**: 199-206.
94. **Lyonnet, B. - Martz, M.E. - Martin, E.:** L'Emploi thérapeutique de dérivés du vanadium. *La Presse Med.*, 1, **1899**: 191-192.
95. **Maher, P.A.:** Stimulation of endothelial cell proliferation by vanadate is specific for microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 151, **1992**: 549-554.
96. **Makinen, M.W. - Brady, M.J.:** Structural origins of the insulin-mimetic activity of bis(acetylacetonato)oxovanadium(IV). *J. Biol. Chem.*, **2002**: 12215-12220.
97. **Malabu, U.S. - Dryden, S. - McCarthy, H.D. - Kilpatrick, A. - Williams, G.:** Effects of chronic vanadate administration in the STZ-diabetic rat. The antihyperglycemic action of vanadate is attributable entirely to its suppression of feeding. *Diabetes*, 43, **1994**: 9-15.
98. **Manci, E.A. - Coffin, C.M. - Smith, S.M. - Ganong, C.A.:** Placental vanadium in gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 10, **1989**: 417-425.
99. **Marliss, E.B. (ed.):** The juvenile diabetes foundation workshop on the spontaneously diabetic BB rats: Its potential for insight into human juvenile diabetes. *Metab. Clin. Exp.*, 32, suppl. 1, **1983**: 1-166.
100. **Masironi, R.:** Trace elements and cardiovascular diseases. *Bull. WHO*, 40, **1969**: 305-312.
101. **McNeill, J.H. - Yuen, V.G. - Dai, S. - Orvig, C.:** Increased potency of vanadium using organic ligands. *Mol. Cell. Biochem.*, 153, **1995**: 175-180.
102. **McNeill, J.H. - Yuen, V.G. - Hoveyda, H.R. - Orvig, C.:** Bis(maltolato)oxovanadium(IV) is a potent insulin mimic. *J. Med. Chem.*, 35, **1992**: 1489-1491.
103. **Meyerovitch, J. - Farfel, Z. - Sack, J. - Shechter, Y.:** Oral administration vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. Characterization and mode of action. *J. Biol. Chem.*, 262, **1987**: 6658-6662.
104. **Miralpeix, M. - Carballo, E. - Bartrons, R.:** Effects of vanadate on 6-phosphofructo 2-kinase activity and fructose 2,6-biphosphate levels in cultured rat hepatocytes. *Cell. Biochem. Funct.*, 8, **1990**: 237-241.
105. **Mooney, R.A. - Bordwell, K.L. - Luhowskyj, S. - Casnelle, J.E.:** The insulin-like effect of vanadate on lipolysis in rat adipocytes is not accompanied by insulin-like effect on tyrosine phosphorylation. *Endocrinology*, 124, **1989**: 422-429.
106. **Morinville, A. - Maysinger, D. - Shaver, A.:** From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *Trends Pharmacol. Sci.*, 19, **1998**: 452-460.

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

107. **Morita, T. - Imagawa, T. - Kanagawa, A. - Ueki, H.:** Sodium orthovanadate increases phospholipase A2 activity in isolated rat fat pads: a role of phospholipase A2 in the vanadate stimulated release of lipoprotein lipase activity. *Biol. Pharm. Bull.*, 18, **1995**: 347-349.
108. **Myron, D.R. - Givand, S.H. - Nielsen, F.H.:** Vanadium content of selected foods as determined by flameless atomic absorption spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 25, **1977**: 297-300.
109. **Nakai, M. - Watanabe, H. - Fujiwara, C. - Kakegawa, H. - Satoh, T. Takeda, J. - Matsushita, R. - Sakurai, H.:** Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *J. Pharm. Soc. Jap.*, 18, **1995**: 119-125.
110. **Narla, R.K. - Dong, Y. - D'Cruz, O.J. - Navara, C. - Uckun F.M.:** Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)sulfatooxovanadium(IV) as a novel apoptosis-inducing anticancer agent. *Clin. Cancer Res.*, 6, **2000**: 1546-1556.
111. **National Academy of Sciences:** Vanadium. National Academy of Sciences, Washington, **1974**: 117 s.
112. **Nechay, B.R.:** Mechanisms of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24, **1984**: 501-524.
113. **Nielsen, F.H.:** The ultratrace elements. In: Smith, K.T. (ed.): Trace Minerals in Foods. Marcel Dekker Inc., New York, **1988**.
114. **Nielsen, F.H.:** Vanadium in mammalian physiology and nutrition. In: Sigel, H. - Sigel, A. (eds.): Metal Ions in Biological Systems. vol.31, New York, Marcel Dekker, Inc., **1995**: 543-573.
115. **Nilsson, J.R.:** On the effect of vanadate on Tetrahymena. Scandinavian Section Society of Protozoologists. 20th Annual Meeting, April 7, 1998. Abstract in *J. Eukaryot. Microbiol.*, suppl., **1998**.
116. **Nilsson, J.R.:** Vanadate affects nuclear division and induces aberrantly-shaped cells during subsequent cytokinesis in Tetrahymena. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46, **1999**: 24-33.
117. **Nišťiar, F. - Hrušovský, J. - Beneš, J.:** Využitie prvoka Tetrahymena pyriformis pre testovanie kontaminácie biologických materiálov organofosfátmi a karbamátmi. *Veter. Med. (Praha)*, 26, **1981**: 695-700.
118. **Nišťiar, F. - Hrušovský, J. - Mojžiš, J.:** Vplyv niektorých pesticídov na prvoka Tetrahymena pyriformis. *Veter. Med. (Praha)*, 29, **1984a**: 699-704.
119. **Nišťiar, F. - Hrušovský, J. - Mojžiš, J.:** Vybrané biochemické ukazovatele u prvoka Tetrahymena pyriformis. *Veter. Med. (Praha)*, 29, **1984b**: 739-746.
120. **Nišťiar, F. - Hrušovský, J. - Mojžiš, J.:** Vplyv dichlórvosu a metationu na vybrané enzýmy prvoka Tetrahymena pyriformis. *Veter. Med. (Praha)*, 30, **1985**: 443-447.
121. **Nišťiar, F. - Hrušovský, J. - Mojžiš, J. - Beneš, J.:** Vplyv ultrafialového žiarenia na prvoka Tetrahymena pyriformis. *Veter. Med. (Praha)*, 28, **1983**: 443-448.
122. **Nišťiar, F. - Hrušovský, J. - Mojžiš, J. - Mižik, P. - Nišťiarová, A.:** Biologická metóda na stanovenie mykotoxínov - Tetrahymena pyriformis. *Veter. Med. (Praha)*, 31, **1986**: 245-250.
123. **Nišťiar, F. - Korec, R. - Nišťiarová, A.:** Effect of vanadium and zinc on glucose excretion by urine in BB rats. *Slov. veter. čas.*, 19, **1994**: 11-14.
124. **Nišťiar, F. - Kováč, G. - Rácz, O. - Seidel, H. - Nišťiarová, A.:** Effects of vanadium on glucose homeostasis in diabetic and non-diabetic BB rats. *Czech J. Anim. Sci.*, 44, **1999**: 547-550.
125. **Nišťiar, F. - Mižik, P. - Rexa, R. - Mojžiš, J. - Hrušovský, J. - Ivanko, Š. - Nišťiarová, A.:** Vplyv gama-žiarenia na Tetrahymena pyriformis kmeň W. *Veter. Med. (Praha)*, 36, **1991**: 633-637.
126. **Nišťiar, F. - Nišťiarová, A.:** Využitie jednobunkových organizmov ako test-objektov v biológii a medicíne. In: Pátý, L. (ed.): Fyzika, medicína a biologie. JČsMF, Praha, **1983**: 26-40.
127. **Nišťiar, F. - Nišťiarová, A. - Mojžiš, J.:** Vplyv vanádu na utilizáciu glukózy u prvoka Tetrahymena pyriformis. *Slov. vet. čas.*, 24, **1999**: 256-258.
128. **Nišťiar, F. - Puzová, H. - Mojžiš, J. - Ďurovičová, H. - Janigová, V. - Siegfried, L. - Nišťiarová, A.:** Využitie prvoka Tetrahymena pyriformis na štúdium faktorov virulencie Escherichia coli. *Biológia (Bratislava)*, 45, **1990**: 943-948.

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

129. Nišťiar, F. - Rácz, O.: Apoptóza - programovaná smrť buniek. I. časť. *Nutr.Hlth.*, 3, No. 3, 1998: 1-3.
130. Nišťiar, F. - Rácz, O.: Základy molekulovej medicíny. I. časť. 2002: 1-135. in press
131. O'Connell, B.S.: Select vitamins and minerals in the management of diabetes. *Diabetes Spectrum*, 14, 2001: 133-148.
132. Orvig, C. - Thompson, K.H. - Battell, M. - McNeill, J.H.: Vanadium compounds as insulin mimics. In: Sigel, H. - Sigel, A. (eds.): *Metal Ions in Biological Systems*. vol.31, New York, Marcel Dekker, Inc., 1995: 575-594.
133. Owusu-Yaw, J. - Cohen, M.D. - Fernando, S.Y. - Wei, C.I.: An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol. Lett.*, 50, 1990: 327-336.
134. Paquet, M.R. - Romanek, R.J. - Sargeant, R.J.: Vanadate induces the recruitment of GLUT-4 glucose transporter to the plasma membrane of rat adipocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, 109, 1992: 149-155.
135. Paternain, J.L. - Domingo, J.L. - Gomez, M. - Ortega, A. - Corvella, J.: Developmental toxicity of vanadium in mice after oral administration. *J. Appl. Toxicol.*, 10, 1990: 181-186.
136. Posner, B.I. - Faure, R. - Burgess, J.W. et al.: Peroxovanadium compounds: a new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J. Biol. Chem.*, 269, 1994: 4596-4604.
137. Pugazhenth, S. - Khandelwal, R.: Insulin-like effects of vanadate on hepatic glycogen metabolism in nondiabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 39, 1990: 821-827.
138. Pugazhenth, S. - Khandelwal, R. L.: Vanadate increases protein kinase C-induced phosphorylation of endogenous proteins of liver in vitro. *Biochem. Int.*, 26, 1992: 241-247.
139. Rácz, O. - Nišťiar, F.: Apoptóza - programovaná smrť buniek. II.časť. *Nutr. Hlth.*, 3, No.4, 1998: 2-3.
140. Ramadham, S. - Brownsey, R.W. - Cros, G.H. - Mongold, J.J. - McNeill, J.H.: Sustained prevention of myocardial abnormalities in diabetic rats following withdrawal from oral vanadyl treatment. *Metabolism*, 38, 1989: 1022-1028.
141. Ramadham, S. - Cros, G.H. - Mongold, J.J. - Serrano, J.J. - McNeill, J.H.: Enhanced in vivo sensitivity of vanadyl treated diabetic rats to insulin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 68, 1990: 486-491.
142. Ramadham, S. - Mongold, J.J. - Brownsey, R.W. - Cros, G.H. - McNeill, J.H.: Oral vanadyl sulfate in treatment of diabetes mellitus in rats. *Am. J. Physiol.*, 257, 1989: H904-H911.
143. Ramasarma, T. - Crane, F.: Does vanadium play a role in cellular regulation? *Curr. Top. Cell. Regul.*, 20, 1981: 247-301.
144. Reed, J.C.: Mechanisms of Apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 157, 2000: 1415-1430).
145. Reul, B.A. - Amin, S.S. - Buchet, J.-P. - Ongemba, L.N. - Crans, D.C. - Brichard, S.M.: Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats. *Brit. J. Pharmacol.*, 126, 1999: 467-477.
146. Rogers, M.V. - Buensuceso, C. - Montague, F. - Mahadevan, L.: Vanadate stimulates differentiation and neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC12 cells and neurite extension in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, 60, 1994: 479-494.
147. Rojas, E. - Valverde, M. - Herrera, L.A. - Altamarino-Lozano, M. - Ostrosky-Wegman, P.: Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluated by the single-cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 359, 1996: 77-84.
148. Rosen, O.M.: After insulin binds. *Science*, 237, 1987:1452-1458.
149. Rossetti, L. - Laughlin, M.R.: Correction of chronic hyperglycemia with vanadate, but not with phlorizin, normalizes in vivo glycogen repletion and in vitro glycogen synthase activity in diabetic skeletal muscle. *J. Clin. Invest.*, 84, 1989: 892-899.
150. Rubin, L.L.: Neuronal cell death: when, why and how. *Br. Med. Bull.*, 53, 1997: 617-631.
151. Sabbioni, E. - Marafante, E.: Metabolic patterns of vanadium in the rat. *Bioinorg. Chem.*, 9, 1978: 389-407.
152. Sarubin, A.: *The Health Professional's Guide to Popular Dietary Supplements*. The American Dietetic Association, Chicago, 2000.

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

153. **Setyawati, I.A. - Thompson, K.H. - Yuen, V.G. - Sun, Y. - Battell, M. - Lyster, D.M. - Vo, C. - Ruth, T.J. - Zeisler, S. - McNeill, J.H. - Orvig, C.:** Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of ⁴⁸V-labeled compounds in rats. *J. Appl. Physiol.*, 84, **1998**: 569-575.
154. **Shaver, A. - Ng, J.B. - Hall, D.A. - Posner, B.I.:** The chemistry of proxovanadium compounds relevant to insulin mimesis. *Mol. Cell. Biochem.*, 153, **1995**: 5-15.
155. **Shechter, Y. - Karlish, S.J.D.:** Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl(IV) ions. *Nature*, 284, **1980**: 556-558.
156. **Shechter, Y. - Ron, A.:** Effect of depletion of phosphate and bicarbonate ions on insulin action in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 261, **1986**: 14945-14950.
157. **Shechter, Y. - Shisheva, A. - Lazar, R. - Libman, J. - Shanzer, A.:** Hydrophobic carriers of vanadyl ions augment the insulinomimetic actions of vanadyl ions in rat adipocytes. *Biochemistry*, 31, **1992**: 2063-2068.
158. **Shi, X. - Jiang, H. - Mao, Y. - Ye, J. - Saffiotti, U.:** Vanadium(IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage. *Toxicology*, 106, **1996**: 27-38.
159. **Shisheva, A. - Gefel, D. - Shechter, Y.:** Insulin-like effects of zinc ion in vitro and in vivo. Preferential effects on desensitized adipocytes and induction of normoglycaemia in streptozotocin-induced rats. *Diabetes*, 41, **1992**: 982-988.
160. **Shisheva, A. - Shechter, Y.:** Role of cytosolic tyrosine kinase in mediating the insulin-like action of vanadate in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 268, **1993**: 6463-6469.
161. **Sigel, H. - Sigel, A. (eds.):** Vanadium and Its Role in Life. Metal Ions in Biological Systems. Vol. 31. Marcel Dekker Inc., New York, **1995**.
162. **Srivastava, A.K.:** Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. *Mol. Cell. Biochem.*, 206, **2000**: 177-182.
163. **Stohs, S. J. - Bagchi, D.:** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, **1995**: 321-336.
164. **Strout, H.V. - Vicario, P.P. - Biswas, C. - Saperstein, R. - Brady, E. - Pilch, P. - Berger, J.:** Vanadate treatment of streptozotocin diabetic rats restores expression of the insulin-responsive glucose transporter in skeletal muscle. *Endocrinology*, 126, **1990**: 2728-2732.
165. **Talvite, N.A. - Wagner, W.D.:** Studies in vanadium toxicology. *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.*, 9, **1954**: 414-422.
166. **Tamura, S. - Brown, T.A. - Dubler, R.E. - Larner, J.:** Insulin-like effect of vanadate on adipocyte glycogen synthase and on phosphorylation 95,000 dalton subunit of insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res.*, 113, **1983**: 80-86.
167. **Tamura, S. - Brown, T.A. - Whipple, J.H. - Fujita-Yamaguchi, Y. - Dubler, R.E. - Cheng, K. - Larner, J.:** A novel mechanism for the insulin-like effect of vanadate on glycogen synthase in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 259, **1984**: 6650-6658.
168. **Thompson, H.J. - Chasteen, N.D. - Meeker, L.D.:** Dietary vanadyl(IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 5, **1984**: 849-851.
169. **Thompson, K.:** Vanadium and diabetes. *BioFactors*, 10, **1999**: 43-51.
170. **Thompson, K.H. - McNeill, J.H.:** Effect of vanadyl sulfate feeding on susceptibility to peroxidative change in diabetic rats. *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.*, 80, **1993**: 187-200.
171. **Tolman, E.L. - Barris, E. - Burns, M. - Pansini, A. - Partridge, R.:** Effects of vanadium on glucose metabolism in vitro. *Life Sci.*, 25, **1979**: 1159-1164.
172. **Ueki, H. - Okuhama, R. - Sera, M. - Inoue, T. - Tominaga, M. - Morita, T.:** Stimulatory effect of vanadate on 3',5'-cyclic guanosine monophosphate-inhibited low Michaelis-Menten constant 3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase activity in isolated rat fat pads. *Endocrinology*, 131, **1992**: 441-446.
173. **Venkatesan, N. - Avidan, A. - Davidson, M.B.:** Antidiabetic action of vanadyl in rats independent of in vivo insulin-receptor kinase activity. *Diabetes*, 40, **1991**: 492-498.
174. **Verma, S. - Cam, M.C. - McNeill, J.H.:** Nutritional factors that can favorably influence the glucose/insulin system: vanadium. *J. Am. Coll. Nutr.*, 17, **1998**: 11-18.
175. **Wang, H. - Scott, R.E.:** Unique and selective mitogenic effects of vanadate on SV40-transformed cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 153, **1995**: 59-67.

Nišťiar, F.: Vanád a experimentálny diabetes mellitus

176. **Waters, M.D.:** Toxicology of vanadium. In: Goyer, R.A. - Mehlman, M.A. (eds.): *Advances in Modern Toxicology*. Vol.2, John Wiley & Sons. Washington. **1977:** 147-189.
177. **Weil, C.S.:** Tables or convenient calculation of median effective dose (LD₅₀-ED₅₀) and instruction in their use. *Biometrics*, 8, **1952:** 249-286.
178. **Welch, R.M. - Cary, E.E.:** Concentration of chromium, nickel and vanadium in plant materials. *Agric. Food Chem.*, 23, **1975:** 479-483.
179. **Whithmarsh, A.J. - Davis, R.J.:** Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.*, 74, **1996:** 589-607.
180. **Wiegmann, T.B. - Day, H.D. - Patak, R.V.:** Intestinal absorption and secretion of radioactive vanadium (48-VO³⁺) in rats and effect of Al(OH)₃. *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, 10, **1982:** 233-245.
181. **World Health Organisation (WHO):** International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 61. World Health Organisation, Geneva, **1988.**
182. **Yale, J.F. - Lachance, D. - Bevan, A.B. - Vigeant, C. - Shaver, A. - Posner, B.I.:** Hypoglycemic effects of peroxovanadium compounds in Sprague-Dawley and diabetic BB rats. *Diabetes*, 44, **1995:** 1274-1279.
183. **Yokota, E. - Mabuchi, I.:** C/A dynein isolated from sea urchin sperm flagellar axonemes. Enzymatic properties and interaction with microtubules. *J. Cell Sci.*, 107, **1994:** 353-361.
184. **Yuen, V.G. - Orvig, C. - McNeill, J.H.:** Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 71, **1993:** 263-269.
185. **Yuen, V.G. - Orvig, C. - McNeill, J.H.:** Effects of bis(maltolato)oxovanadium(IV) are distinct from food restriction in STZ-diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, 272, **1997:** E30-E35.
186. **Yuen, V.G. - Orvig, C. - McNeill, J.H.:** Comparison of the glucose-lowering properties of vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV) following acute and chronic administration. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73, **1995:** 55-64.
187. **Zaporowska, H. - Wasilewski, W. - Slotwinska, M.:** Effect of chronic vanadium administration in drinking water to rats. *BioMetals*, 6, **1993:** 3-10.
188. **Zhang, M. - Zhou, M. - Van Etten, R.L. - Stauffacher, C.V.:** Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate. *Biochemistry*, 36, **1997:** 15-23.