

Eva Paradiž¹, Andraž Stožer², Maša Skelin Klemen³

Sklopitev med spodbujanjem in izločanjem v celicah β : nevrohormonska ojačitvena pot

Stimulus Secretion Coupling in Pancreatic β Cells: the Neurohormonal Amplifying Pathway

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: trebušna slinavka, celica β , izločanje inzulina, nevrohormonska ojačitvena pot, inkretini, adrenalin

Za zagotavljanje normalne homeostaze glukoze je ključno optimalno izločanje inzulina iz celic β trebušne slinavke, saj povečano izločanje inzulina vodi v življenjsko nevarno hipoglikemijo, medtem ko se nezadostno izločanje kaže v razvoju nenadnih in kroničnih zapletov, povezanih s sladkorno boleznijo. Delovanje celic β je pod vplivom številnih dejavnikov, ki vključujejo hrana, hormone in živčne prenašalce. Čeprav je glukoza osnovni in najpomembnejši dražljaj za celice β trebušne slinavke, številni hormoni in živčni prenašalci preko mnogih in še ne popolnoma raziskanih znotrajceličnih signalnih poti sodelujejo pri uravnavanju izločanja inzulina. Presnova glukoze je ključna za nastanek sprožilnega signala, tj. porast znotrajcelične koncentracije kalcijevih ionov. Hormoni in živčni prenašalci delujejo preko mehanizmov, ki vplivajo na koncentracijo kalcijevih ionov ali pa te ne spreminjajo, ampak zgolj uravnavajo občutljivost sekretornega aparata na kalcijeve ione. Ti modulatorji imajo lahko spodbujevalen ali zaviralen učinek na izločanje inzulina. Med spodbujevalce prištevamo glukagonu podoben peptid 1, od glukoze odvisni inzulinotropični peptid, holecistokinin, gastrin, acetilholin in vazoaktivni intestinalni polipeptid, med zaviralce pa uvrščamo somatostatin, adrenalin in grelin. V tem prispevku bomo podrobneje predstavili nevrohormonsko ojačitveno pot izločanja inzulina.

ABSTRACT

KEY WORDS: pancreas, β cell, insulin secretion, neurohormonal amplifying pathway, incretin hormones, adrenalin

Optimal insulin secretion from pancreatic β cells is essential for normal glucose homeostasis. Excessive insulin secretion causes life-threatening hypoglycemia, while insufficient secretion results in damaging acute and chronic consequences of diabetes mellitus.

¹ Asist. Eva Paradiž, dr. med., Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor; eva.paradz1@um.si

² Izr. prof. dr. Andraž Stožer, dr. med., Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

³ Doc. dr. Maša Skelin Klemen, dr. vet. med., Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

Pancreatic β cells are influenced by numerous factors, such as nutrients, hormones and neurotransmitters. Although glucose is the primary and the most important stimulus for pancreatic β cells, numerous hormones and neurotransmitters regulate insulin secretion through various and not fully understood intracellular signalling pathways. Glucose metabolism is crucial for producing the triggering signal, the increased intracellular calcium concentration. On the other hand, hormones and neurotransmitters act through mechanisms that directly involve changes in cytosolic calcium concentration or do not influence the triggering signal but modulate the sensitivity of the secretory machinery to calcium ions. These modulators may either stimulate or inhibit insulin secretion. Glucagon-like peptide 1, glucose-dependent insulinotropic peptide, cholecystokinin, gastrin, acetylcholine, and vasoactive intestinal peptide stimulate, while somatostatin, adrenalin, leptin and ghrelin inhibit insulin secretion. In the present article, we describe the neurohormonal amplifying pathway of insulin secretion.

UVOD IN TAKSONOMIJA POTI DO IZLOČANJA INZULINA

Koncentracija glukoze v krvi je natančno nadzorovana, kar je ključnega pomena za zdravje posameznika. V homeostazi glukoze igra najpomembnejšo vlogo endokrini del trebušne slinavke, ki preko celic β , ki izločajo inzulin, in celic α , ki izločajo glukagon, uravnava koncentracijo glukoze v krvi. Tako preprečuje nastanek življenjsko nevarne hipoglikemije in nenadnih ter kroničnih zapletov zaradi dlje časa trajajoče hiperglikemije. Poleg glukoze, ki je glavni sekretagog, se celice β trebušne slinavke odzivajo še na vrsto drugih dejavnikov, ki uravnavajo izločanje inzulina.

Glukoza se po vstopu v celico β z glukoznimi prenašalci presnovi, čemur sledi porast koncentracije ATP v citosolu. Posledica je zmanjšana verjetnost za odpiranje od ATP odvisnih kalijevih kanalov (kanali K_{ATP}) in depolarizacija celične membrane, ki sproži odpiranje napetostno odvisnih kalcijevih kanalov (angl. *voltage dependent Ca^{2+} channels*, VDCC). Vdor kalcija v celico in porast njegove koncentracije v citosolu ($[Ca^{2+}]_i$) je ključen za uravnavano eksocitozo, pri kateri pride do zlivanja sekretornih mešičkov z inzulinom s plazemsko membrano in do izločanja inzulina v zunajcelični prostor.

V članku s podnaslovom Sprožilna in presnovna ojačitvena pot smo opisali omenjeno kaskado dogodkov in izpostavili glavne mehanizme presnovne ojačitve z glukozo in drugimi hranili, kot so aminokisline in proste maščobne kisline. Poleg omenjenega izločanje inzulina uravnavajo tudi hormoni in nekateri živčni prenašalci. V tej t. i. nevrohormonski ojačitveni poti imajo pomembno fiziološko vlogo zlasti inkretini, ki spodbujajo izločanje inzulina po obroku. Tako prispevajo k večjemu odzivu celic β po peroralnem vnosu glukoze v primerjavi z enako ravno glikemije, ki je dosežena intravensko (1, 2). Čeprav je inkretinski učinek pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 (SB2) deloma oslabljen, se v zadnjih letih vse bolj izkorišča za zdravljenje SB2. Uporaba mimetikov inkretinov ali zaviralcev njihove razgradnje je namreč varna in ne povzroča neželenih hipoglikemij, ki se pojavljajo npr. pri uporabi nekaterih drugih antidiabetikov, zlasti sulfonilsečnin (SS). Poleg inkretinov spodbujata izločanje inzulina še peptidna hormona holecistokinin (CCK) in gastrin, katerih delovanje se vse bolj proučuje šele zadnja leta. Tudi glukagonu strukturno podoben peptid, vazoaktivni intestinalni peptid (angl. *vasoactive intestinal peptide*, VIP), do neke mere spodbuja izločanje inzulina (3). Pomemben vpliv na za-

viranje jetrne glukoneogeneze in izločanje inzulina ima v predabsorptivni ali cefalični fazi acetilholin, za katerega se je izkazalo, da ne deluje zgolj kot parasimpatični živčni prenašalec, ampak tudi kot parakrini dejavnik izločanja inzulina. Nasprotno med zaviralce izločanja inzulina štejemo somatostatini, adrenalin, leptin in grelin.

V nadaljevanju bomo podrobneje opisali do sedaj poznane mehanizme delovanja omenjenih spodbujevalcev in zaviralcev izločanja inzulina. Bistveni mehanizmi delovanja opisanih učinkovin so prikazani na sliki 1.

SPODBUJEVALCI IZLOČANJA INZULINA

Acetilholin

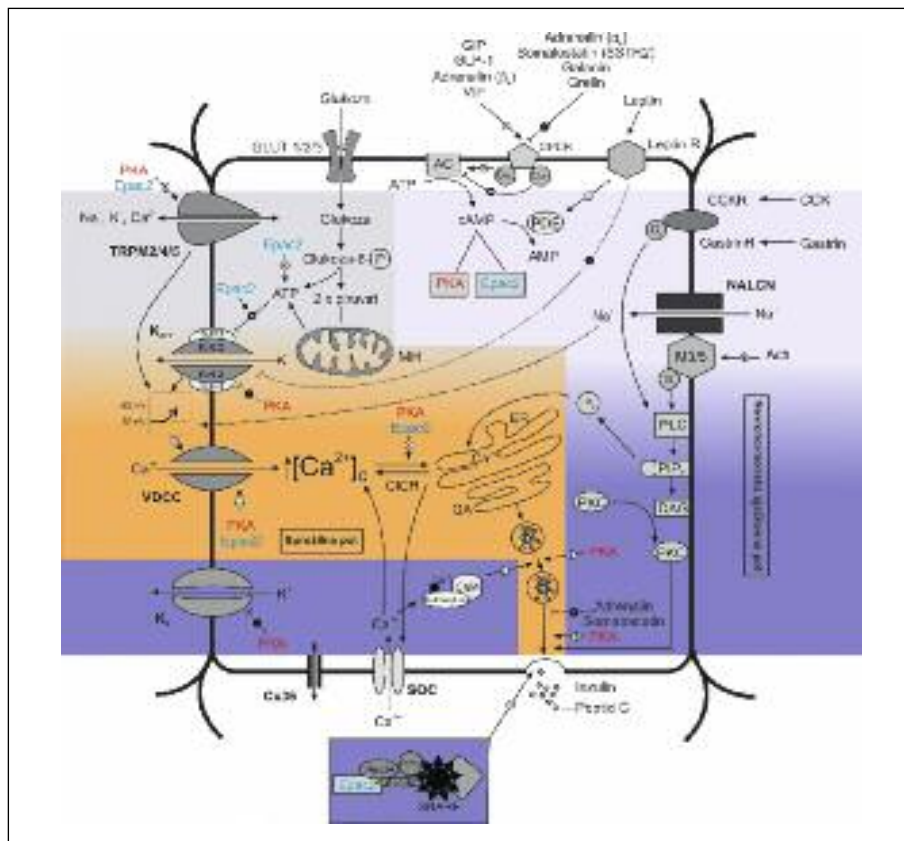
Celice β pri ljudeh imajo izražene muskarinske acetilholinske receptorje tipov M3 in M5, ki ob aktivaciji povečajo izločanje inzulina (4). Amplituda tega odziva je odvisna predvsem od koncentracije glukoze. Acetilholin preko vpliva na membranski potencial in porast $[Ca^{2+}]_c$ poveča sprožilni signal za izločanje, hkrati pa poveča tudi občutljivost sekretornega aparata na zvišanje $[Ca^{2+}]_c$. Poglavitni mehanizem delovanja poteka preko podenote α beljakovine G_q , ki aktivira fosfolipazo C (angl. *phospholipase C*, PLC). Ta hidrolizira fosfodiesterko vez fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfata (angl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP_2), iz katerega nastane diacilglicerol (angl. *diacylglycerol*, DAG) in inozitol 1,4,5-trisfosfat (angl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*, IP_3), pomembna sekundarna sporočevalca. IP_3 z vezavo na inozitol 1,4,5-trisfosfatne receptorje (angl. *inositol trisphosphate receptors*, IP_3R) endoplazemskega retikuluma povzroči sproščanje znotrajceličnih zalog Ca^{2+} . DAG je lipidotopna molekula na plazemski membrani, ki ob prisotnosti Ca^{2+} povzroči premik svoje tarčne molekule, proteinske kinaze C (angl. *protein kinase C*, PKC), iz citosola na membrano. PKC po aktivaciji fosforilira substrate na serinskih in treoninskih ostan-

kih, med njene tarčne molekule pa spada tudi beljakovine, ki sodelujejo pri eksocitozi (5).

Acetilholin aktivira tudi majhen depolarizirajoči tok, ki je posledica aktivacije t. i. neselektivnih puščajočih Na^+ kanalov (angl. *non-selective Na^+ leak channels*, NALCN), sklopljenih z receptorjem M3. Tok samostojno ne zadošča za električno aktivacijo celice, okrepi pa depolarizacijo, sproženo z glukozo, kar aktivira še nekaj dodatnih napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalov. Minimalen dodaten porast $[Ca^{2+}]_c$ povzroči tudi t. i. kapacitativni vstop Ca^{2+} ionov preko Ca^{2+} kanalov, ki jih aktivira izpraznjenje znotrajceličnih zalog Ca^{2+} (angl. *store operated conductance*, SOC) (6). Porast $[Ca^{2+}]_c$ preko kalmodulina aktivira tudi od kalmodulina odvisno proteinsko kinazo, ki v celici β pospeši mobilizacijo sekretornih mešičkov z inzulinom in tako vzdržuje zadosten bazen mešičkov, ki so na voljo za izločanje. To ob spodbujanju pospeši eksocitozo, hkrati pa vzdržuje sekretorno kapaciteto celic β (7).

Novejše raziskave kažejo tudi na vpletenost nikotinskih acetilholinskih receptorjev pri izločanju inzulina ob spodbujanju z acetilholinom. Zmanjšano izražanje teh receptorjev je povezano z zmanjšanim izločanjem inzulina in slabšo glukozno toleranco, hkrati pa bi lahko isti mehanizem preko desenzitizacije receptorjev in manjšega vpliva na endogeno sproščeni acetilholin prispeval k povečanemu tveganju za razvoj SB2 pri kadilcih (8, 9).

Kljub opisanim mehanizmom vpliv parasimpatičnega spodbujanja na homeostazo glukoze in izločanje inzulina ni enoznačen. Prvi razlog za to je, da se poleg acetilholina iz postganglijskih živčnih vlaken izločajo tudi dušikov oksid (NO), VIP, adenilat ciklazo aktivirajoči protein hipofize (angl. *pituitary adenylate cyclase-activating protein*, PACAP) in drugi živčni prenašalci, katerih učinki na celice β so lahko različni. Hkrati našete spojine vplivajo na različne celice v otočku in s tem vplivajo na



Slika 1. Povezave med sprožilno in nevrohormonsko ojačitveno potjo v celici β . Hormoni in živčni prenašalci lahko preko nevrohormonske ojačitvene poti (vijolična barva) uravnavajo z glukoze sproženo izločanje inzulina (rumena barva). Glukagonu podoben peptid (angl. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1), od glukoze odvisni inzulintropični peptid (angl. *glucose-dependent insulintropic peptide*, GIP), vazoaktivni intestinalni polipeptid (angl. *vasoactive intestinal peptide*, VIP), somatostatin, adrenalin, grelin in galanin delujejo preko receptorjev, ki so sklopljeni z beljakovino G (angl. *G protein-coupled receptor*, GPCR) in tako preko spodbujanja (+) ali zaviranja (-) adenilat ciklaze (AC) uravnavajo koncentracijo citosolnega cikličnega adenozin monofosfata (angl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP). Slednji z aktivacijo proteinske kinaze A (angl. *protein kinase A*, PKA) ali gvaninskega nukleotidnega izmenjevalnega dejavnika (angl. *exchange protein directly activated by cAMP* 2, Epac2) vpliva na izločanje inzulina preko aktivacije ali inhibicije ionskih kanalov, preko vpliva na notrajcelično koncentracijo kalcija ($[Ca^{2+}]_i$) ali preko neposrednih učinkov na proces eksocitoze. Holecistokinin (angl. *cholecystokinin*, CCK) z vezavo na holecistokininske receptorje (angl. *cholecystokinin receptor*, CCKR), gastrin z vezavo na gastrinske receptorje (GastrinR) in acetilholin (ACh) z vezavo na acetilholinske muskarinske receptorje tipa M3 in M5, ki so vsi sklopljeni z beljakovino G, aktivirajo podenoto α beljakovine G_q , ki aktivira fosfolipazo C (angl. *phospholipase C*, PLC). Ta hidrolizira fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (angl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP₂), nastane diacilglicerol (angl. *diacylglycerol*, DAG) in inozitol 1,4,5-trisfosfat (angl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*, IP₃). Ta povzroči sproščanje notrajceličnih zalog Ca^{2+} . DAG aktivira protein kinazo C (PKC), ki med drugim fosforilira tudi beljakovine, ki sodelujejo v procesu eksocitoze. ACh poleg tega aktivira tudi neselektivne Na^+ -puščajoče kanale (angl. *sodium leak channel non-selective protein*, NALCN), sklopljene z receptorjem M3. Tudi leptin z vezavo na leptinske receptorje (LeptinR) zavira izločanje inzulina, saj aktivira K_{ATP} -kanale in fosfodiesterazo (angl. *phosphodiesterase*, PDE), ki hidrolizira cAMP v AMP. Minus (-) pomeni zaviranje, plus (+) pa spodbujanje. Cx36 – presledkovni stik, ki ga tvori beljakovina koneksin 36 (angl. *connexin 36*), CICR – s Ca^{2+} -sproženo izločanje Ca^{2+} (angl. *calcium-induced calcium release*), MH – mitohondrij, GA – Golgijev aparat, ER – endoplazemski retikulum, VDCC – napetostno odvisni kalcijevi kanali (angl. *voltage-dependent calcium channels*), TRP – kanal prehodnega receptorskega potenciala (angl. *transient receptor potential channel*), Kir6.2 – transmembranska podenota K_{ATP} -kanalov, SUR1 – sulfonilsečninski receptor (angl. *sulfonylurea receptor*), ki je regulatorna enota K^+ -kanalov, SOC – Ca^{2+} -kanali, ki jih aktivira izpraznitev notrajceličnih zalog Ca^{2+} (angl. *store operated conductance*).

izločanje tudi drugih hormonov trebušne slinavke (5, 10). Povečan parasimpatični tonus se izrazi tudi v drugih tkivih in organih, ki se prav tako vključujejo v presnovne procese, npr. v jetrih in črevesju (11). Vagalno spodbujanje aktivira tudi muskarinske receptorje na črevesnih celicah L in tako poveča izločanje glukagonu podobnega peptida (angl. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1) (12).

Najpomembnejši del učinkov acetilholina se fiziološko izrazi v t. i. predabsortivni ali cefalični fazi, pri kateri vidni in olfaktorni dražljaji preko holinergičnih živčnih končičev, ki izhajajo iz n. vagusa, sprožijo izločanje acetilholina. Cefalična faza je pomembna za normalno homeostazo glukoze, saj deluje kot signal pričakovanega porasta glukoze, ki preko zmanjšanja glukoneogeneze v jetrih ter začetnega izločanja inzulina omeji porast glukoze ter tako prepreči preveliko obremenitev celic β (5). Novejša dognanja, ki kažejo, da je acetilholin predvsem parakrini signal, ki ga izločajo celice α Langerhansovih otočkov, porajajo dvome o splošno sprejetem prepričanju, da so Langerhansovi otočki tako kot pri glodavcih in drugih živalskih vrstah tudi pri človeku bogato parasimpatično oživčeni. Do aktivacije celic α in izločanja glukagona pride ob znižanih ravneh glukoze, ko je izločanje inzulina običajno zavrto (13). Mehanizem na videz paradoksnega izločanja acetilholina in glukagona hkrati še ni povsem jasen. Kaže, da sta v celicah α glukagon in acetilholin shranjena v ločenih veziklih, kar bi teoretično omogočalo njuno neodvisno izločanje (4). Druga možnost upošteva časovni razpon delovanja acetilholina. Razpolovna doba acetilholina v Langerhansovih otočkih je zaradi aktivnosti acetilholinesteraze sicer kratka, a znotrajcelične signalne kaskade, ki jih hormon sproži po vezavi na receptor, lahko poteka jo v razponu več deset minut (14, 15). To pomeni, da lahko učinki hormona, ki se izloči, ko so vrednosti glukoze nižje, senzitivizira-

jo celice β v daljšem časovnem obdobju in pozitivno vplivajo na izločanje inzulina ob naslednjem porastu koncentracije glukoze. Acetilholin bi lahko imel tudi v tem primeru, podobno kot pri cefalični fazi izločanja, vlogo pripravljalca celic β (4, 13).

Hkrati acetilholin, ki ga izločajo celice α , deluje tudi na receptorje M1 na celicah δ , ki ob tem izločajo somatostatin, slednji pa na izločanje inzulina vpliva zaviralno. Tako lahko učinek acetilholina na izločanje inzulina razdelimo na neposredno (spodbujevalno) in posredno (zaviralno) pot. Skupen učinek parasimpatičnega spodbujanja na izločanje inzulina je tako težko predvideti, saj je odvisen od več dejavnikov, med drugimi tudi od časovnega in prostorskega vzorca izločanja acetilholina po nevralni in parakrini poti (4).

Inkretini

Odkritje hormonov inkretinskega sistema je vodila ugotovitev, da je izločanje inzulina večje ob peroralnem zaužitju glukoze, kot če enak porast plazemske koncentracije glukoze sprožimo z intravenskim vnosom ustrezne količine glukoze (t. i. inkretinski učinek) (1, 2). Iz tega so sklepali, da se ob prisotnosti hranil iz črevesja izloča snov, ki spodbuja celice β v endokrinem delu trebušne slinavke k izločanju inzulina. Izraz inkretini je leta 1932 uvedel belgijski fiziolog Jean La Barre, da bi pripravek črevesnih hormonov ločil na dva dela – sekretinski del, ki poveča izločanje eksokrinega dela trebušne slinavke, in inkretinski del, sestavljen iz takrat še neznanih hormonov, ki spodbudno delujejo na celice β in tako znižujejo raven glukoze v krvi (16). V splošnem danes pod inkretinski sistem uvrščamo dva hormona – od glukoze odvisni inzulinotropni peptid (angl. *glucose-dependent insulinotropic peptide*, GIP) in GLP-1, ki sta po obremenitvi z glukozo odgovorna za večino inkretinskega učinka (17). GIP izločajo celice K v zgornjem delu tankega črevesa, GLP-1 pa celice L v spodnjem delu tankega

črevesa in v debelem črevesu, pri obeh pa sproščanje sproži pristnost hranil v svetlini črevesja (18).

Strukturna sorodnost med GLP-1 in glukagonom, ki ga izločajo celice α trebušne slinavke, izhaja iz dejstva, da ju zapisuje isti gen oz. izhajata iz iste spojine – preproglukagona. Potranslacijsko preoblikovanje prohormona v različnih tipih celic vodi do nastanka učinkovin z raznolikimi učinki. Glukagon je sicer eden izmed ključnih hormonov, vpletenih v homeostazo glukoze, ki preko spodbujanja jetrne glukoneogeneze preprečuje prekomeren padec ravni krvnega sladkorja med obroki. Čeprav je glavni dražljaj za izločanje glukagona nizka koncentracija glukoze, celice α spodbujajo tudi aminokisliline. Povečano izločanje glukagona ob beljakovinskem obroku tako prepreči hipoglikemijo, ki bi jo lahko povzročilo z aminokislinami sproženo izločanje inzulina (glej članek Sklopitev med spodbujanjem in izločanjem v celicah β : sprožilna in presnovna ojačitvena pot). Isti mehanizem ob zaužitju mešanega aminokislinsko-glukoznega obroka poskrbi za manjši upad izločanja glukagona kot v primeru glukoze same, kar verjetno zmanjša zaviralni učinek inzulina na jetrno glukoneogenezo in s tem omogoči porabo viška aminokislin (ki se ne porabijo za nastanek beljakovin) za nastanek glukoze. Vedno bolj pa stopa v ospredje tudi širši pomen glukagona pri uravnavanju številnih drugih procesov, npr. izločanja inzulina iz celic β , razvoju sladkorne bolezni in debelosti (19, 20).

Inkretini pri koncentracijah glukoze, ki niso spodbujevalne, nimajo učinka na izločanje inzulina. Posledično je tveganje za neželene učinke v obliki hipoglikemije majhno, uporaba inkretinskih mimetikov ali zaviralcev razgradnje endogenih inkretinov (zaviralci dipeptidil peptidaze 4 (angl. *dipeptidyl peptidase-4*, DPP-4)) v terapevtske namene pa varna. Ojačajo tako prvo kot drugo fazo izločanja inzulina ob prisotnosti glukoze ali SS (18). Pri tem novejša raziskave

izpostavljajo glutamat kot ključno signalno molekulo, ki povezuje presnovo glukoze in učinek inkretinov (21).

Vezava inkretinskih hormonov na receptorje, sklopljene z beljakovino G, preko $G\alpha_s$ poveča aktivnost adenilat ciklaze (AC), kar privede do porasta cikličnega adenozin monofosfata (cAMP) (18, 22, 23). Obe omenjeni poti na izločanje inzulina vplivata preko uravnavanja aktivnosti ionskih kanalčkov, vpliva na $[Ca^{2+}]_c$ in distalnih učinkov na eksocitozo. Tako aktivacija PKA preko fosforilacije podenote SUR1 K_{ATP} -kanalov povzroči njihovo zaprtje in posledično poveča depolarizacijo celice, preko inhibicije podvrste napetostno odvisnih K^+ -kanalov pa podaljša trajanje akcijskega potenciala celice (18). PKA poveča tudi mobilnost sekretornih mešičkov z inzulinom in hitrost njihovega zlivanja z membrano, velikost bazena mešičkov, ki so pripravljeni na izločanje, in njihovo občutljivost na porast $[Ca^{2+}]_c$ (24). Epac2A poveča občutljivost K_{ATP} -kanalov na zaviralne učinke ATP, poveča sintezo ATP v celici ter poveča gostoto sekretornih mešičkov ob membrani in preko medsebojnega delovanja z beljakovinami, kot so Rim2, Rab3A, Piccolo, vpliva na njihovo sidranje in zlivanje s membrano (6, 25).

Obe poti vplivata tudi na porast $[Ca^{2+}]_c$ v celici – preko sproščanja znotrajceličnih zalog Ca^{2+} preko fosforilacije in aktivacije rianodinskih receptorjev ali preko povečane aktivnosti napetostno odvisnih Ca^{2+} -kanalov (6).

Inkretini povečajo tudi aktivnost neselektivnih kationskih kanalov iz družine TRP (angl. *transient receptor potential*, TRP) – TRPM2, TRPM4, TRPM5 – kar povzroči dodaten depolarizacijski tok v celico (26, 27). Pri vplivu inkretinov pa je treba opozoriti, da pri fizioloških koncentracijah GLP-1 (1–10 pM) ta sproži električno aktivnost v celicah brez zaznavnega porasta $[cAMP]_c$. Porast slednjega zaznamo pri višjih koncentracijah GLP-1 (> 1 nM), kar kaže, da je del

učinkov GLP-1 neodvisen od sprememb [c-AMP]_i. Del teh učinkov verjetno poteka preko PLC/PKC in posledične aktivacije kanalov TRPM (27).

Holecistokinin in gastrin

Gastrin in CCK sta peptidna hormona, ki sta si strukturno in funkcionalno zelo sorodna. Po obroku se sproščata iz antralnih celic G (gastrin) oz. celic I tankega črevesa (CCK). V tkivih se vežeta na CCK in gastrinske receptorje, ki so izraženi tudi v Langerhansovih otočkih trebušne slinavke. Aktivacija receptorja, sklopljenega z beljakovino G preko podenote α_q , aktivira pot PLC in poveča nastanek DAG ter IP₃ (28). Hormona povečata bazalno in z glukozo sproženo izločanje inzulina, zaradi česar sta bila med prvimi kandidati pri preučevanju inkretinskega učinka. Večina raziskav v 70.-letih je zaključila, da so količine, ki se sprostijo ob glukozni obremenitvi, same po sebi premajhne, da bi pomembneje vplivale na delovanje celic β . Proučevanje njunih inzulintropičnih učinkov je bilo posledično v zadnjih desetletjih zapostavljeno, GLP-1 in GIP pa sta se uveljavila kot edina (pomembna) hormona inkretinskega sistema. Da z osredotočenjem na zgolj dva hormona verjetno spregledamo pomemben del dogajanja, izhaja že iz načina testiranja učinka gastrointestinalnih hormonov v obliki glukozne obremenitve, ki je izrazito nefiziološka. Večina ljudi in živali hrano uživa v obliki mešanih obrokov, ki sprožijo izločanje številnih gastrointestinalnih hormonov, ne zgolj GLP-1 in GIP (29).

Napredek v tehniki merjenja koncentracij posameznih hormonov ter boljše razumevanje kompleksnih interakcij in prepletenosti signalnih poti različnih učinkovin je povrnil zanimanje tudi za to področje, sploh po objavi rezultatov raziskave na miših, v kateri je kombinirano zdravljenje z GLP-1 in gastrinom privedlo do pozitivnih učinkov na obnavljanje celic β ter povrnitev normalne glikemije (30). Številne nadaljnje raziskave, ki so potrjevale sinergistične učinke gastri-

na in CCK (samostojno ali v kombinaciji z GLP-1 ter GIP) na izgubo telesne teže, inzulinsko občutljivost, glikemični nadzor in funkcijo preživetja celic β , kažejo na terapevtski potencial tovrstnih kombinacij pri zdravljenju SB2 (31–33). Celice α -otočkov oseb in živali s prekomerno telesno težo izločajo povečano količino GLP-1, ki spodbuja izločanje CCK iz celic β . Opisana pot naj bi imela zaščitno vlogo pri ohranjanju mase celic β preko preprečevanja apoptoze ob razvoju debelosti, kar kaže na pomen lokalnega izločanja hormonov in parakrinega signaliziranja med celicami znotraj otočkov (34, 35).

Vazoaktivni intestinalni polipeptid

Pred več kot 40 leti so iz dvanajstnika pri prašiču prvič izolirali peptid, ki so ga zaradi vazodilatacijskega delovanja poimenovali VIP (36). Sprva je bil prepoznan predvsem kot intestinalni hormon, a se je kmalu izkazalo, da je tudi pomemben živčni prenašalec v centralnem živčnem sistemu. Svoj učinek VIP izzove z vezavo na dva tipa receptorjev, ki sta sklopljena z beljakovino G, VPAC1 in VPAC2 (3). Z vezavo na slednjega VIP v celicah β trebušne slinavke spodbuja izločanje inzulina v odvisnosti od glukoze (37). Znotrajcelična signalna pot je podobna inkretinski, saj pride do aktivacije AC in posledično do zvišanja [cAMP]_i. Po drugi strani pa omenjeni hormon z vezavo na VPAC1 poveča nastajanje glukoze v jetrih z aktivacijo glukoneogeneze. Fiziološka vloga VIP je vprašljiva, saj je zaradi podvrženosti proteolitični razgradnji njegova biološka aktivnost izjemno kratka in znaša manj kot eno minuto (38).

Zadnja leta se razvijajo agonisti VPAC2, za katere se je izkazalo, da spodbujajo izločanje inzulina v odvisnosti od glukoze in izboljšajo glukozno toleranco pri podganah, vendar je razvoj omenjenih agonistov v terapevtske namene težaven zaradi presnovne nestabilnosti, hitrega izločanja preko ledvic in omejene absorpcije (37, 39).

ZAVIRALCI IZLOČANJA INZULINA

Med glavne zaviralce izločanja inzulina uvrščamo somatostatin, adrenalin, galanin, grelin in leptin. Mehanizem zaviranja izločanja je pri vseh podoben, pri čemer so učinki na električno aktivnost prehodni, učinek na eksocitozo pa traja, dokler je celica izpostavljena učinkovini. Učinki galanina in grelina pri ljudeh v fizioloških pogojih verjetno niso bistveni, zato so podrobneje predstavljeni le učinki somatostatina, adrenalina in leptina (6).

Somatostatin

Je pomemben zaviralec izločanja inzulina. Vnos somatostatina povzroči hiperpolarizacijo celic preko aktivacije somatostatinskega receptorja tipa 2 (angl. *somatostatin receptor subtype 2*, SSTR2), kar preko $G\alpha_i$ zavira AC, zniža koncentracijo cAMP in poveča prevodnost membrane za ione K^+ . Ob tem pride do delne repolarizacije membrane in zmanjšane pritoka Ca^{2+} v celico in prekinitve eksocitoze. Možen je tudi vpliv na zaviranje depolarizirajočih tokov (6). Zaradi svojih učinkov analogi somatostatina (oktreotid, pasireotid, lanreotid) predstavljajo pomemben del konzervativnega zdravljenja inzulinoma, nevroendokrinega tumorja celic β , za katerega je značilno avtonomno izločanje inzulina (40).

Adrenalin

Človeške celice β izražajo adrenergične receptorje α_{2a} , α_{1b} in β_2 . Učinki aktivacije različnih tipov receptorjev imajo nasprotujoče si učinke, kar pojasnjuje dejstvo, da ima pri človeku adrenalin na izločanje inzulina tako spodbujevalne (β_2) kot tudi zaviralne učinke (α_2). Večinoma prevladujejo zaviralni učinki preko receptorjev α_2 , katerih aktivacija preko $G\alpha_{i/o}$ podobno kot pri somatostatinu preko inhibicije AC privede do delne repolarizacije membrane in zmanjšane pritoka Ca^{2+} ionov v celico. Upad $[cAMP]_c$ ob simpatičnem spodbujanju zmanjša tudi prevodnost preko neselektivnih kationskih

kanalov TRPM2 (41). Nasprotno pa se ob aktivaciji receptorjev β_2 aktivnost AC in koncentracija cAMP zvišata. Učinek simpatičnega sistema je pomemben za natančno uravnavanje izločanja inzulina, ali t. i. *fine tuning*. Upad števila receptorjev β_2 naj bi bil povezan z zmanjšano glukozno toleranco, ki jo pogosto opazujemo pri starostnikih (42).

Tako adrenalin kot somatostatin na izločanje inzulina vplivata tudi distalno na ravni eksocitoze, predvsem preko manjše pripravljenosti na zlivanje z membrano sekretornih mešičkov z inulinom oz. *depri-minga*. Ti učinki so iz kvantitativnega vidika najverjetneje tudi najpomembnejši (6).

Leptin

Leptin je peptidni hormon, ki ga izločajo adipociti. Sodeluje pri uravnavanju presnove in homeostaze glukoze, pri čemer pomemben del njegovih učinkov poteka preko vpliva na apetit in porabo energije preko hipotalamusa, delno pa tudi preko neposrednih učinkov na periferna tkiva. Celice β izražajo leptinske receptorje, katerih aktivacija preko povečane aktivnosti kanalov K_{ATP} , zmanjšane vstopa glukoze v celico ter aktivacije fosfodiesteraze in posledično znižanja $[cAMP]_c$ v celici zavira izločanje inzulina (43). Inzulin nasprotno spodbuja izločanje leptina, s čimer hormona tvorita negativno povratno zvezo, imenovano adipo-inzularna os (44). Koncentracija leptina v krvi je neposredno povezana s količino maščevja v telesu. Pri osebah s prekomerno telesno težo je uravnavanje telesne teže in drugih procesov, ki so pod nadzorom leptina, moteno. Govorimo o razvoju leptinske rezistence, ki se kaže tudi na nivoju celic β , kjer porastu leptina ob pridobivanju na telesni teži ne sledi ustrezno zmanjšanje izločanja inzulina. Omenjeno pojasnjuje povišane ravni obeh hormonov, ki jih zaznamo pri osebah s prekomerno telesno težo (45). Lahko pa hiperinzulinemijo in druge simptome pri redkih posameznikih s pomanjkanjem leptina (denimo v sklopu

kongenitalnega pomanjkanja) rešujemo z nadomestnim zdravljenjem z rekombinantnim hormonom, kar normalizira izločanje inzulina in izboljša inzulinsko občutljivost (46, 47).

Zanimive učinke pomanjkanja leptina na delovanje celic β lahko opazujemo pri mišjih modelih s tkivno specifičnim pomanjkanjem leptinskega receptorja v trebušni slinavki, kjer se hiperinzulinemija razvije kot prva izmed funkcionalnih nepravilnosti. Kot sekundarne posledice ji sledijo pojav inzulinske rezistence, debelosti, motene tolerance za glukozo ter v nekaterih primerih celo znižane ravni glukoze na tešče, slednje verjetno zaradi povečanega bazalnega izločanja inzulina (48, 49). Tovrstne raziskave razkrivajo nov pogled na splošno sprejeto razumevanje patogeneze sladkorne bolezni, pri kateri je prekomerna telesna teža (kot prvi korak v tem procesu) odgovorna za pojav inzulinske rezistence. Povečano izločanje inzulina je v tem modelu zgolj kompenzacijski mehanizem, ki sledi razvoju periferne inzulinske rezistence. Vse več raziskav kaže, da pomembno vlogo igra tudi obraten proces, pri katerem je motnja v delovanju celic β s posledično hiperinzulinemijo primarna sprememba. Ne zgolj, da je povečano izločanje inzulina lahko zaznavno že pred razvojem debelosti, hipersekrecija inzulina prekomerno pridobivanje na teži pospešuje in je za razvoj debelosti in inzulinske rezistence celo soodgovorna (50–53). Različni vidiki motenega uravnavanja adipo-inzularne osi tako predstavljajo enega izmed pomembnejših mehanizmov, preko katerih se patogeneza debelosti in SB2 prepletata (44).

POGLED V PRIHODNOST

Sladkorna bolezen predstavlja enega od največjih javnozdravstvenih problemov, saj danes ogroža že več kot 400 milijonov ljudi po svetu, po pričakovanjih pa bo število bolnikov do leta 2040 naraslo na 640 milijonov (54). Več kot 90 % teh bolnikov zbo-

li za SB2, ki jo opredeljuje inzulinska rezistenca in sprva relativno, nato pa tudi absolutno pomanjkanje inzulina. Za zdravljenje SB2 so na voljo številna zdravila, ki bodisi izboljšujejo občutljivost tarčnih tkiv na inzulin, bodisi spodbujajo celice β k večjemu izločanju inzulina. Med slednjimi so najpogostejše uporabljena zdravila iz skupine SS, ki so sposobna aktivacije sprožilne poti v celicah β trebušne slinavke in so zelo potentna antidiabetična zdravila, a lahko njihova uporaba povzroči hipoglikemijo in pridobitev telesne mase. Dandanes se zato v praksi vse pogostejše uporabljajo učinkovine, ki spodbujajo izločanje inzulina po prej opisani nevrohormonski ojačitveni poti, za katero je potrebna prisotnost glukoze. Največji razvoj je bil v zadnjih letih narejen na področju inkretinov. Čeprav je inkretinski učinek pri bolnikih s SB2 delno zmanjšan, je zmanjšanje inzulintropnega učinka prisotno le pri GIP, delovanje GLP-1 pa ostaja praktično nespremenjeno kljub nižjim koncentracijam hormona v krvi pri bolnikih s SB2 (55, 56). Zato so terapevtski pristopi k zdravljenju SB2 usmerjeni večinoma k povečanju učinka GLP-1 s pomočjo na razgradnjo odpornih agonistov receptorjev za GLP-1 (mimetiki inkretinov) ali s pomočjo zaviralcev encima DPP-4, ki je odgovoren za hitro razgradnjo inkretinskih hormonov. Ker vemo, da so tako celice β kot tudi intestinalne celice, ki poleg GLP-1 in GIP izločajo tudi CCK in VIP, izpostavljene zapleteni mešanici hranil, ki spodbuja njihovo izločanje, se vse več pomena daje preučevanju ne zgolj inkretinov, temveč tudi CCK in VIP pri izločanju inzulina. Mehanizmi delovanja teh snovi so zapleteni in še neraziskani, njihove koncentracije pa nizke in biološka aktivnost kratka, kar predstavlja velik izziv za raziskovalce možnih novih antidiabetikov. Prav tako ni jasno, kaj se s celicami β in njihovimi odzivi na sprožilce in ojačevalce inzulinskega izločanja zgodi med razvojem SB2, saj se le malo raziskav ukvarja z vlogo funkcionalne

adaptacije v okviru kompenzatornega odgova na inzulinsko rezistenco. Zaradi navedenega je znanje o spremembah na nivoju sklopitve med spodbujanjem in izločanjem

v celicah β med razvojem SB2 zaenkrat precej pomanjkljivo. Nujne dodatne raziskave na tem področju bodo lahko predlagale možne nove tarče za zdravila v prihodnosti.

LITERATURA

1. Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Jr., et al. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964; 24: 1076–82.
2. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet.* 1964; 2 (7349): 20–1.
3. Igarashi H, Fujimori N, Ito T, et al. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and VIP receptors-elucidation of structure and function for therapeutic applications. *Int J Clin Med.* 2011; 2 (4): 500–8.
4. Molina J, Rodriguez-Diaz R, Fachado A, et al. Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreatic islet. *Diabetes.* 2014; 63 (8): 2714–26.
5. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev.* 2001; 22 (5): 565–604.
6. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic beta-cell electrical activity and insulin secretion: Of mice and men. *Physiol Rev.* 2018; 98 (1): 117–214.
7. Gromada J, Høy M, Renström E, et al. CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *The J Physiol.* 1999; 518 (Pt 3): 745–59.
8. Ganic E, Singh T, Luan C, et al. MafA-controlled nicotinic receptor expression is essential for insulin secretion and is impaired in patients with type 2 diabetes. *Cell Rep.* 2016; 14 (8): 1991–2002.
9. Yoshikawa H, Hellström-Lindahl E, Grill V. Evidence for functional nicotinic receptors on pancreatic beta cells. *Metabolism.* 2005; 54 (2): 247–54.
10. Sanlioglu AD, Karacay B, Balci MK, et al. Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2012; 49 (3): R157–67.
11. Gautam D, Han SJ, Hamdan FF, et al. A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell Metab.* 2006; 3 (6): 449–61.
12. Lustig RH. Hypothalamic obesity after craniopharyngioma: Mechanisms, diagnosis, and treatment. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011; 2: 60.
13. Rodriguez-Diaz R, Dando R, Jacques-Silva MC, et al. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med.* 2011; 17 (7): 888–92.
14. Zawulich WS, Zawulich KC, Rasmussen H. Cholinergic agonists prime the beta-cell to glucose stimulation. *Endocrinology.* 1989; 125 (5): 2400–6.
15. Godfrey DA, Matschinsky FM. Enzymes of the cholinergic system in islets of Langerhans. *J Histochem Cytochem.* 1975; 23 (9): 645–51.
16. Zunz E, Barre JL. Contributions a l'étude des variations physiologiques de la sécrétion interne du pancreas. *Archives Internationales de Physiologie.* 1930; 33 (2): 142–58.
17. Ahren B. Glucagon-early breakthroughs and recent discoveries. *Peptides.* 2015; 67: 74–81.
18. Yabe D, Seino Y. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: Comparison of their actions in insulin secretion and beta cell preservation. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011; 107 (2): 248–56.
19. Gannon MC, Nuttall FQ. Amino acid ingestion and glucose metabolism—a review. *IUBMB Life.* 2010; 62 (9): 660–8.

20. Marroqui L, Alonso-Magdalena P, Merino B, et al. Nutrient regulation of glucagon secretion: Involvement in metabolism and diabetes. *Nutr Res Rev.* 2014; 27 (1): 48–62.
21. Yokoi N, Gheni G, Takahashi H, et al. β -cell glutamate signaling: Its role in incretin-induced insulin secretion. *J Diabetes Investig.* 2016; 7 (Suppl 1): 38–43.
22. de Rooij J, Zwartkruis FJT, Verheijen MHG, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 1998; 396: 474–7.
23. Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, et al. Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008; 40 (7): 651–62.
24. Skelin M, Rupnik M. cAMP increases the sensitivity of exocytosis to Ca^{2+} primarily through protein kinase A in mouse pancreatic beta cells. *Cell Calcium.* 2011; 49 (2): 89–99.
25. Eliasson L, Ma X, Renstrom E, et al. SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J Gen Physiol.* 2003; 121 (3): 181–97.
26. Yosida M, Dezaki K, Uchida K, et al. Involvement of cAMP/EPAC/TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. *Diabetes.* 2014; 63 (10): 3394–403.
27. Shigeto M, Ramracheya R, Tarasov AI, et al. GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. *J Clin Invest.* 2015; 125 (12): 4714–28.
28. Lazo de la Vega-Monroy ML, Fernandez-Mejia C. Beta-cell function and failure in type 1 diabetes. In: Wagner D, ed. *Type 1 Diabetes - pathogenesis, genetics and immunotherapy.* Rijeka: IntechOpen; 2011.
29. Rehfeld JF. Incretin physiology beyond glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: Cholecystokinin and gastrin peptides. *Acta Physiol (Oxf).* 2011; 201 (4): 405–11.
30. Suarez-Pinzon WL, Power RF, Yan Y, et al. Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin restores normoglycemia in diabetic NOD mice. *Diabetes.* 2008; 57 (12): 3281–8.
31. Pathak V, Flatt PR, Irwin N. Cholecystokinin (cck) and related adjunct peptide therapies for the treatment of obesity and type 2 diabetes. *Peptides.* 2018; 100: 229–35.
32. Khan D, Vasu S, Moffett RC, et al. Expression of gastrin family peptides in pancreatic islets and their role in beta-cell function and survival. *Pancreas.* 2018; 47 (2): 190–9.
33. Téllez N, Joanny G, Escoriza J, et al. Gastrin treatment stimulates β -cell regeneration and improves glucose tolerance in 95% pancreatectomized rats. *Endocrinology.* 2011; 152 (7): 2580–8.
34. Lavine JA, Raess PW, Stapleton DS, et al. Cholecystokinin is up-regulated in obese mouse islets and expands β -cell mass by increasing β -cell survival. *Endocrinology.* 2010; 151 (8): 3577–88.
35. Linnemann AK, Neuman JC, Battiola TJ, et al. Glucagon-like peptide-1 regulates cholecystokinin production in β -cells to protect from apoptosis. *Molecular Endocrinology.* 2015; 29 (7): 978–7.
36. Said SI, Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine. *Science.* 1970; 169 (3951): 1217–8.
37. Tsutsumi M, Claus TH, Liang Y, et al. A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: A potential therapy for type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51 (5): 1453–60.
38. Domschke S, Domschke W, Bloom SR, et al. Vasoactive intestinal peptide in man: Pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects. *Gut.* 1978; 19 (11): 1049–53.
39. Giordanetto F, Revell JD, Knerr L, et al. Stapled vasoactive intestinal peptide (vip) derivatives improve VPAC2 agonism and glucose-dependent insulin secretion. *ACS Med Chem Lett.* 2013; 4 (12): 1163–8.
40. Ito T, Lee L, Jensen RT. Treatment of symptomatic neuroendocrine tumor syndromes: Recent advances and controversies. *Expert opinion on pharmacotherapy.* 2016; 17 (16): 2191–205.
41. Ito K, Dezaki K, Yoshida M, et al. Endogenous $\alpha 2A$ -adrenoceptor-operated sympathoadrenergic tones attenuate insulin secretion via cAMP/TRPM2 signaling. *Diabetes.* 2017; 66 (3): 699–709.
42. Santulli G, Lombardi A, Sorriento D, et al. Age-related impairment in insulin release: The essential role of $\beta(2)$ -adrenergic receptor. *Diabetes.* 2012; 61 (3): 692–701.
43. Marroqui L, Gonzalez A, Neco P, et al. Role of leptin in the pancreatic β -cell: Effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 2012; 49 (1): R9–17.
44. Seufert J. Leptin effects on pancreatic β -cell gene expression and function. *Diabetes.* 2004; 53 (suppl 1): S152–8.
45. Lee YH, Magkos F, Mantzoros CS, et al. Effects of leptin and adiponectin on pancreatic β -cell function. *Metabolism.* 2011; 60 (12): 1664–72.
46. Farooqi IS, O'Rahilly S, Gibson WT, et al. Congenital leptin deficiency due to homozygosity for the $\Delta 133G$ mutation: Report of another case and evaluation of response to four years of leptin therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2004; 89 (10): 4821–26.

47. Chan JL, Lee JH, Mantzoros CS, et al. Recombinant methionyl human leptin therapy in replacement doses improves insulin resistance and metabolic profile in patients with lipoatrophy and metabolic syndrome induced by the highly active antiretroviral therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91 (7): 2605–11.
48. Gray SL, Donald C, Jetha A, et al. Hyperinsulinemia precedes insulin resistance in mice lacking pancreatic betacell leptin signaling. *Endocrinology.* 2010; 151 (9): 4178–86.
49. Covey SD, Wideman RD, McDonald C, et al. The pancreatic β cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metab.* 2006; 4 (4): 291–302.
50. Templeman NM, Skovso S, Page MM, et al. A causal role for hyperinsulinemia in obesity. *J Endocrinol.* 2017; 232 (3): R173–83.
51. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106 (4): 473–81.
52. Corkey BE. Banting lecture 2011: Hyperinsulinemia: Cause or consequence? *Diabetes.* 2012; 61 (1): 4–13.
53. Stožer A, Hojs R, Dolenšek J. Beta cell functional adaptation and dysfunction in insulin resistance and the role of chronic kidney disease. *Nephron.* 2019.
54. International diabetes federation. IDF diabetes atlas. 8ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.
55. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, et al. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993; 91 (1): 301–7.
56. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, et al. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86 (8): 3717–23.

Prispelo 24. 5. 2018