



Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



Autoreferát dizertační práce:

**Efekt nutričních intervencí na vlastnosti tukové tkáně
u obézních**

MUDr. Eva Krauzová

Školitel: Prof. MUDr. Vladimír Štich, Ph.D.

Praha, 2019

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Oborová rada: Preventivní medicína

Předseda: Doc. MUDr. Alexander Martin Čelko, CSc.

Školící pracoviště: Ústav patofyziologie 3.LF UK

Autor: MUDr. Eva Krauzová

Školitel: Prof. MUDr. Vladimír Štich, Ph.D.

SHRNUTÍ

Obezita je celosvětově nejrozšířenější metabolické onemocnění a její trvalý vzestup je alarmující. Závažnost obezity spočívá v tom, že je spojena s výrazným zvýšením rizika metabolických chorob jako je diabetes mellitus (DM) 2. typu, hyperlipidémie, kardiovaskulární a některá nádorová onemocnění. Obezita se tak podílí významně na zvyšování nákladů celého zdravotnického systému. Zásadní pro snížení této zátěže je prevence vzniku výše zmíněných chorob. Tato spočívá jednak v prevenci obezity samotné, jednak v poznání a následném ovlivnění mechanismů vzniku metabolických poruch s obezitou spojených. Podkladem vzniku těchto poruch jsou změny v klíčových metabolických orgánech: tukové tkáni, játrech, kosterním svalu a slinivce břišní. Předkládaná práce se soustředila na obezitou vyvolané poruchy tukové tkáně na úrovni metabolické, endokrinní a imunitní, jednotně prezentované jako dysfunkční tuková tkáň. Pozornost byla specificky věnována škodlivému účinku zvýšených hladin základních makronutrientů (sacharidů a lipidů) a na straně druhé příznivému působení nízkokalorické diety na molekulární charakteristiky tukové tkáně. Získané poznatky osvětlují mechanismy působení výživových podnětů na dysfunkci tukové tkáně na molekulární a buněčné úrovni a poskytují tak důležitý podklad k prevenci obezity a s ní spojených metabolických poruch. Spojitost mezi rizikovými faktory výživy a etiologií vzniku dysfunkční tukové tkáně tak poskytuje vědecky podložená fakta nezbytná k úpravě výživových doporučení. Tento přístup bychom mohli nazvat „Molekulární preventivní lékařství“.

Předkládaná dizertační práce je zpracována formou souboru publikací zabývajících se účinkem intervencí vedoucích k elevaci cirkulujících hladin nutrientů – hyperlipidémie, hyperglykémie na straně jedné a kalorickou restrikcí na straně druhé - na charakteristiky podkožní tukové tkáně. Zahrnuto je celkem 6 publikací, které vznikly na Ústavu pro studium obezity a diabetu 3. LF UK nyní nově přejmenovaném Ústavu patofyziologie 3. LF UK. Ústav se ve své výzkumné aktivitě dlouhodobě zabývá výzkumem tukové tkáně, obezitou, metabolickými komplikacemi obezity a jejich prevencí. Práce je tématicky rozdělena do dvou částí. V první části je společným tématem vliv krátkodobých intervencí na prozánětlivý profil jak na úrovni tukové tkáně, tak v cirkulaci. V publikaci č. 1 a 2 je zhodnocen efekt krátkodobé hyperlipidémie a hyperglykémie na imunitní profil tukové tkáně u obézních žen. Publikace č. 3 popisuje efekt jednorázově podaného vysokotukového pokrmu na zánětlivé změny v cirkulaci u mladých zdravých mužů. Publikace č. 4 sleduje regulaci mobilizace mastných kyselin z tukové tkáně během tělesné zátěže při podání metforminu. Druhá část práce zahrnující publikace č. 5 a 6 je tématicky věnována efektu hypokalorické diety a jejích různých fází na modulaci metabolických, endokrinních a imunitních funkcí tukové tkáně u obézních žen.

Studie sdružené v této dizertační práci poskytují příspěvky k poznání regulace vzniku prozánětlivého stavu organismu a úlohy energetického příjmu i hladiny základních makronutrientů v tomto procesu. Tyto střípky vědění mohou přispět k pochopení funkčních změn na úrovni tukové tkáně a vést tak k účinnému rozvoji preventivních a léčebných strategií.

Klíčová slova: obezita, tuková tkáň, hyperlipidémie, hyperglykémie, dietní intervence.

SUMMARY

Obesity is the world's most widespread metabolic disease and its continuous rise in prevalence is alarming. The severity of obesity is that it is associated with a significant increase in the risk of metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus, hyperlipidemia, cardiovascular disease and some types of cancer. Obesity thus contributes significantly to increasing the cost of healthcare system. Preventing the aforementioned diseases is essential to reduce this burden. This is based both on the prevention of obesity itself, on the other hand, on the knowledge and consequent influence on the mechanisms of metabolic disorders associated with obesity. These disorders are based on changes in key metabolic organs: adipose tissue, liver, skeletal muscle and pancreas. The present thesis is focused on obesity-induced disorders of adipose tissue at the metabolic, endocrine and immune levels, presented as dysfunctional adipose tissue. Special attention was paid to the detrimental effect of elevated levels of basic macronutrients (carbohydrates and lipids) and, on the other hand, to the beneficial effects of low calorie diets on molecular characteristics of adipose tissue. The acquired knowledge illuminates the mechanisms of action of nutritional stimuli on adipose tissue dysfunction at the molecular and cellular level and thus provides an important basis for the prevention of obesity and related metabolic disorders. Thus, the link between nutritional risk factors and the etiology of dysfunctional adipose tissue provides scientifically-based facts necessary to adjust nutritional recommendations. This approach could be called "Molecular Preventive Medicine".

This thesis is elaborated in the form of a set of publications dealing with the effect of interventions leading to the elevation of circulating levels of nutrients - hyperlipidemia, hyperglycemia on the one side, and calorie restriction on the other - on subcutaneous adipose tissue characteristics. A total of 6 publications that were created at the Department for the Study of Obesity and Diabetes, newly renamed as Department of Pathophysiology on the Third Faculty of Medicine of Charles University are included. This Department has been engaged in the research of adipose tissue, obesity, metabolic complications of obesity and their prevention for a long time. The thesis is thematically

divided into two parts. In the first part, the common theme is the influence of short-term interventions on the pro-inflammatory profile both at the level of adipose tissue and in the circulation. In publication No. 1 and 2 is evaluated the effect of short-term hyperlipidemia and hyperglycemia on the adipose tissue immune profile of obese women. Publication No. 3 describes the effect of a single-dose high-fat meal on inflammatory changes in circulation in young healthy men. Publication No. 4 is focused on the regulation of fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise influenced by antidiabetic medication - metformin. The second part of the thesis, which includes publications No. 5 and 6, focuses on the effect of hypocalorie diet and its various phases on the modulation of metabolic, endocrine and immune functions of adipose tissue in obese women.

The studies in this thesis provide contributions to the knowledge of the regulation of pro-inflammatory state of the organism and the role of energy intake and the level of basic macronutrients in this process. These fragments of knowledge can help to understand the functional changes at the level of the adipose tissue and thus lead to the effective development of preventive and treatment strategies.

Key words: obesity, adipose tissue, hyperlipidemia, hyperglycemia, diet intervention.

OBSAH

SHRNUTÍ	3
SUMMARY	4
OBSAH	5
1. OBEZITA, JEJÍ VÝSKYT A VÝZNAM V PREVENCI.....	6
1.1. Epidemiologie obezity	6
1.2. Etiopatogeneze obezity	7
1.3. Prevence a léčba obezity	7
2. TUKOVÁ TKÁŇ.....	8
2.1. Tuková tkáň a její buněčné složení	8
2.3. Adipocytokiny.....	8
2.4. Zánět v tukové tkáni.....	8
2.5. Dysfunkce tukové tkáně.....	9

3. POPIS VYBRANÝCH METODIK	10
3.1. Jehlová biopsie podkožní tukové tkáně.....	10
3.2. Euglykemický a Hyperglykemický clamp	10
3.3. Mikrodialýza	10
3.4. Průtoková cytometrie	10
3.5. Analýza metabolitů a cytokinů v plasmě	11
4. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	11
5. VÝSLEDKY	13
Publikace č. 1: Akutní hyperlipidémie vede k prozánětlivým a proaterogenním změnám v cirkulaci a v tukové tkáni u obézních žen	13
Publikace č. 2: Experimentální hyperglykémie vede ke zvýšení obsahu monocytů a T-lymfocytů v tukové tkáni u obézních žen	13
Publikace č. 3:	13
Publikace č. 4:	14
Publikace č. 5:	14
Publikace č. 6:	14
6. ZÁVĚRY A DISKUZE	15
7. PŘEHLED PUBLIKACÍ, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTACE	18
8. POUŽITÁ LITERATURA	20

1. OBEZITA, JEJÍ VÝSKYT A VÝZNAM V PREVENCI

1.1. Epidemiologie obezity

Obezita je charakterizována nadměrnou akumulací tukové tkáně v organismu. Její příčinou je nerovnováha mezi energetickým příjmem a výdejem. Obezitou se rozumí stav s hmotnostním indexem $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Dle Světové zdravotnické organizace je obezita považována za epidemii 21. století nyní přerůstající do pandemických rozměrů. V roce 2016 se 39 % dospělé populace ve světě nacházelo v pásmu nadváhy ($BMI 25,1 - 29,9 \text{ kg/m}^2$) a 13% v pásmu obezity. 11 % bylo mužů a 15 % žen [1]. V české populaci dle kontinuálního průzkumu společnosti STEM/MARK z roku 2013 se s nadváhou potýká 35 % a s obezitou 23 % dospělé populace [2]. Obézních je 20 % mužů a 18 % žen dle dat Českého statistického úřadu z roku 2018 (viz obrázek č.1). Ve většině evropských zemích se prevalence obézních dospělých pohybuje mezi 10 - 20 % , v ČR je to 23 %, což je

srovnatelné s okolními zeměmi jako je Německo, Litva, Belgie i Francie. Některé části Evropy jsou typické prevalencí obesity nad 30%, např. jižní Itálie či Malta. V rámci Evropské unie se ČR pohybuje na 13. místě z 28 zemí [3]. Oproti výzkumu v roce 2011 nedošlo v roce 2018 v ČR k významnému nárůstu prevalence osob s nadváhou či obezitou. Vysvětlení mohou být mnohá. Jedním z nich je, že naše populace již dosahuje maxima vzhledem k dané genetické výbavě, případně také informovanost populace o preventivních opatřeních a rizicích obezity mohou vést k zastavení vzestupu [4].

1.2. Etiopatogeneze obezity

Nejvýznamnější etiopatogenetický faktor vzniku obezity je nerovnováha mezi energetickým příjmem a výdejem. Za posledních 25 let došlo k významným změnám jídelníčku: např. ke snížení spotřeby hovězího a vepřového masa a k nárůstu spotřeby masa drůbežího. Více než o pětinu stoupla spotřeba ovoce a zeleniny. Přesto je v ČR stále vysoká konzumace tučných jídel a sekundárně zpracovaného masa. V mladší populaci se zvýšila spotřeba sladkých nápojů. Významnější změny jsou patrné v energetickém výdeji, kdy došlo k dramatickému nárůstu sedavého způsobu života [4].

1.3. Prevence a léčba obezity

Obezita představuje významný rizikový faktor vzniku diabetu 2. typu, hyperlipidémie, kardiovaskulárních, nádorových a neurodegenerativních onemocnění [5, 6]. V důsledku těchto komorbidit dochází k významnému vzestupu morbidity a mortality [7]. Proto je kladen důraz především na preventivní a léčebná opatření obezity a metabolického syndromu. Primárně preventivní intervence mají příznivější efektivitu vložených nákladů ve srovnání s léčbou již vzniklé nemoci. Strategie léčby obezity zahrnuje nejen redukci hmotnosti, ale především snížení metabolických rizik. Modifikace životního stylu zahrnuje tři základní komponenty: dietu, pohybovou aktivitu a behaviorální terapii. Komplexní intervence zahrnuje redukci hmotnosti o 0,5 – 1 kg/ týdně během prvních 12 týdnů a dále udržení hmotnosti po 6-9 měsících. Klinický benefit je dosažen už při mírné hmotnostní redukci (o 5 -10 % tělesné hmotnosti). Důležité je věnovat pozornost nejen samotné redukci hmotnosti, ale změně tělesného složení s cílem snížení tukové hmoty a navýšení svalové hmoty. Součástí léčebné strategie je zvládnutí komorbidit – kontrola dyslipidémie, glykémie, udržení normálního krevního tlaku, léčba syndromu spánkové apnoe a psychosociálních omezení [8].

2. TUKOVÁ TKÁŇ

2.1. Tuková tkáň a její buněčné složení

Tuková tkáň v lidském organismu je tradičně považována za uložisko přebytečné energie v podobě lipidů pro jejich pozdější uvolňování, dále je známá její termoizolační a ochranná funkce. V dnešním pojetí je tuková tkáň považována za heterogenní, multifunkční orgán s endokrinními, parakrinními a imunitními funkcemi [9]. Tuková tkáň (TT) je složena z tukových buněk - adipocytů a stromovaskulární frakce (SVF), která zahrnuje mesenchymální kmenové buňky, preadipocyty, imunitní buňky, endotelie a extracelulární matrix [10]. Právě tato ne-adipocytární buněčná frakce sehrává svou sekreční aktivitou zásadní roli v patofyziologii obezity [11]. Adipocyt má oproti jiným buňkám proměnlivou velikost v závislosti na fyziologických okolnostech.

2.3. Adipocytokiny

Podrobné patofyziologické mechanismy a mediátory zprostředkující vazbu mezi nadměrným množstvím tukové tkáně a zvýšenou morbiditou a mortalitou jsou předmětem intenzivního studia v posledních několika desetiletích. Přímé propojení etiopatogeneze mezi obezitou a změnami funkce tukové tkáně začalo být odhalováno v 90. letech 21. století, kdy byla poprvé popsána sekrece prozánětlivého cytokinu tumor necrosis factor (TNF α) tukovou tkání [12]. Tuková tkáň je považována za aktivní endokrinní orgán, který uvolňuje do cirkulace cytokiny podílející se na regulaci systémového metabolismu a ovlivňující funkci imunitních buněk i adipocytů samotných [12]. Dle současných poznatků je známo více než 600 působků produkovaných tukovou tkání [13]. Tyto působky se obecně nazývají adipokiny či adipocytokiny, jsou produkovány nejen adipocyty, ale také imunokompetentními buňkami, endoteliálními buňkami, fibroblasty a dalšími buňkami v tukové tkáni. Jsou popsány stovky adipokinů zahrnující protizánětlivé (např. adiponectin) i prozánětlivé působky (tumor necrosis factor α : TNF α , monocyte chemoattractant protein 1: MCP1, interleukin 6: IL6).

2.4. Zánět v tukové tkáni

Obezita je asociována s chronickým mírným prozánětlivým stavem organismu spojeným s produkcí a uvolňováním prozánětlivých molekul do cirkulace a do vlastní tukové tkáně a se zvýšenou infiltrací TT imunitními buňkami [14]. Poruchy funkce TT jsou spojeny s metabolickými odchylkami na celotělové úrovni, jak dokládají práce, kdy inzulinová rezistence koreluje s infiltrací

podkožní TT makrofágy a s expresí a sekrecí prozánětlivých cytokinů [15, 16]. Fenotyp imunitních buněk je ovlivňován cytokiny produkovanými přímo adipocyty nebo buňkami stromovaskulární frakce. Imunitní buňky v tukové tkáni štíhlých jedinců vyjadřují protizánětlivý fenotyp v zastoupení T- helper (T_H) a T-reg lymfocyty a M2 typ makrofágů [17]. U obézních jedinců převažuje prozánětlivý fenotyp imunitních buněk - T_H1 lymfocyty, cytotoxické T-lymfocyty (T_C) a M1 typ makrofágů [18]. Je nutno brát v úvahu že tyto dobře odlišitelné skupiny makrofágů M1 a M2 byly popsány ve zvířecím experimentu [19], ale v lidské tukové tkáni zřejmě není toto fenotypické rozdělení na prozánětlivé a protizánětlivé makrofágy jednoznačně prokázáno, spíše se předpokládá celé kontinuum fenotypu od M1 k M2 makrofágům. Ačkoli se za hlavní faktor v „osídlení“ TT imunitními buňkami dlouhou dobu považovaly právě makrofágy, které svými působky přitahovaly další imunitní buňky do tukové tkáně, při dalším studiu se ukázalo, že akumulaci makrofágů předchází infiltrace T- lymfocyty, které pravděpodobně reagují na metabolické stimuly jako je vysokotuková dieta dříve než makrofágy [20]. Jiné studie poukazují na to, že dalším možným stimulem infiltrace tukové tkáně imunitními buňkami mohou být volné mastné kyseliny, které se uvolňují z hypertrofických adipocytů a vedou k expresi chemoatraktantů (MCP -1, IL-8) [21]. Důležitými stimuly ovlivňujícími vstup imunokompetentních buněk do TT jsou také: lipotoxicita [22], zvýšená apoptóza hypertrofických adipocytů v důsledku hypoxie [23] a stres endoplazmatického retikula [24]. Alterovaná exprese prozánětlivých a protizánětlivých faktorů produkovaných imunitními buňkami působí zpětně na adipocyty a podílí se na vzniku dysfunkce tukové tkáně. Vliv nutriční a dietní intervence na infiltraci tukové tkáně imunitními buňkami je jedním z cílů této práce.

2.5. Dysfunkce tukové tkáně

Z pohledu metabolických komplikací je zcela zásadní schopnost tukové tkáně ukládat lipidy a jejich metabolity, aby nedocházelo k jejich ektopickému ukládání mimo tukovou tkáň [25]. Jsou dva základní principy expanze tukové tkáně. Hyperplastický typ je charakterizován tvorbou nových [26] adipocytů s vysokou schopností ukládat tukové kapénky. Tento typ expanze není spojen s metabolickými komplikacemi obezity a představuje jedno z vysvětlení tzv. metabolicky zdravých obézních [27]. Hypertrofický typ je častější cesta ukládání nadměrného množství energie založena na zvětšování adipocytů . Tyto zvětšené adipocyty však podléhají stresovým podmínkám jako je mechanický stres, lokální hypoxie v důsledku nedostatečné vaskularizace [28] a stres endoplazmatického retikula. Dochází tak k aktivaci kaskád, které svými působky přispívají k prozánětlivému stavu organismu [29]. Schopnost expanze podkožní tukové tkáně při nadměrném kalorickém příjmu tak může hrát zásadní roli v rozvoji metabolických komplikací u obézních

pacientů. Studie naznačují, že snížení tělesné hmotnosti navozené dietním režimem pozitivně ovlivňuje schopnost expanze a adipogenní potenciál tukové tkáně [30].

3. POPIS VYBRANÝCH METODIK

3.1. Jehlová biopsie podkožní tukové tkáně

Tato metoda spočívá v odběru malého množství (1-2g) podkožního tuku z oblasti břicha. Po znecitlivění lokální anestezií (1% Mesocain Zentiva, Praha) zavádíme punkční jehlu s 20 ml stříkačkou, která nám vytvoří podtlak. Takto několik minut odsáváme podkožní tuk, který je následně pročištěn a rozdělen pro následné analýzy.

3.2. Euglykemický a Hyperglykemický clamp

Euglykemický hyperinzulinový clamp (zámek) je „zlatý standart“ ke zjištění periferní inzulinové rezistence organismu a jeho protokol detailně popsal v roce 1979 DeFronzo [31]. Principem je zhodnotit inzulinovou citlivost na základě rychlosti odsunu glukózy při intravenózním podání předem definovaného množství inzulinu (1 mIU.kg⁻¹ .min⁻¹). Rychlost infuze glukózy potřebná k udržení euglykémie odpovídá odsunu glukózy z extracelulárního prostředí do buněk a je měřítkem účinku inzulinu. Tato hodnota je vyjádřena jako tzv. M-hodnota[32]. **Hyperglykemický clamp**, který se standartně využívá k testování sekrece inzulinu, jsme použili ve studii č. 2 k navození experimentální hyperglykémie. Po bolusové dávce 0,33 g/kg glukózy jsme intravenózně podali roztok 20% glukózy k dosažené stabilních hodnot glykémie v rozmezí 15 – 18 mmol/l po dobu třech hodin.

3.3. Mikrodialýza

Mikrodialyzační technika je mini-invazivní metoda umožňující monitorování metabolů v extracelulární tekutině *in vivo*. Mikrodialyzační sonda je vybavena semi-permeabilní membránou, která umožňuje průchod látek po směru osmotického gradientu, tedy z tkáně do dialyzátu, ve kterém jsou posléze tyto látky analyzovány. Nejčastěji jsou stanovovány nízkomolekulární metabolity, cytokiny apod. Ve studii č. 4 jsme analyzovali hladinu metforminu, laktátu a glycerolu v tukové tkáni během akutní tělesné zátěže.

3.4. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda umožňující analýzu různých buněčných subpopulací během průchodu laserovým paprskem. Typizace jednotlivých buněčných populací využívá reakce

antigen-protilátka, kdy reakce je vizualizována označením protilátky fluorochromem. Metodickou originalitou naší laboratoře bylo použití průtokové cytometrie ke stanovení zastoupení imunitních buněk v malém vzorku podkožní tukové tkáně (500mg).

3.5. Analýza metabolitů a cytokinů v plasmě

Vzorky plasmy a séra byly připravovány z nesrážlivé periferní krve a následně centrifugovány a rozděleny do alikvotů. Základní biochemické parametry byly stanovovány v certifikovaných laboratořích (FNKV, Spadia Lab). K analýze plasmatických hladin cytokinů jako IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α MCP-1, FGF-21, IL-1 β , leptin, VEGF-A, sICAM, sVCAM byly stanovovány metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) za použití komerčního setu (eBioscience, USA) nebo byl použit multiplexový analyzátor Luminex 200 (High Sensitivity Human Cytokine Milliplex panel; Merck, USA). Pro stanovení hladiny glycerolu a neesterifikovaných mastných kyselin v séru byly použity komerční analytické soupravy na principu kolorimetrie „RX Monza“ (Randox Laboratories Ltd., UK). Jedná se o spektrofotometrickou metodiku založenou na přímé úměře mezi absorbancí a koncentrací roztoku při konstantní vlnové délce. Porovnáním absorbancí našeho vzorku se vzorkem o známé koncentraci můžeme vypočítat koncentraci látky v našem vzorku.

4. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Porucha metabolických, endokrinních a imunitních funkcí TT se podílí na rozvoji inzulinové rezistence u obézních jedinců a následném zvýšeném riziku rozvoje metabolických a kardiovaskulárních chorob. Předmětem intenzivního výzkumu řady pracovišť je identifikovat molekuly a mechanismy zprostředkovávající regulaci výše zmíněných funkcí TT tak, aby se mohly stát potenciálním cílem preventivního i léčebného ovlivnění metabolických důsledků obezity.

Cílem tohoto projektu bylo přispět k poznání regulace výše zmíněných funkcí TT různými nutričními podněty: od restrikce energetického příjmu až k navození hyperlipidémie či hyperglykemie. Byly sledovány základní charakteristiky prozánětlivého stavu v TT tj. a) zastoupení a/nebo aktivace makrofágů a dalších buněčných populací v tukové tkáni, b) produkce prozánětlivých cytokinů buňkami tukové tkáně.

Poznatky získané uvedenými studiemi poukazují na mechanismy vzniku nutricí vyvolaných metabolických změn v tukové tkáni na molekulární úrovni otevírá cestu k účinnější prevenci a léčbě obezity.

Specifické cíle:

ČÁST A)

- Objasnit některé z mechanismů lipotoxicity resp. glukotoxicity sledováním účinku krátkodobých parenterálních intervencí vedoucích k hyperlipidémii a hyperglykémii na imunitní stav TT, prozánětlivý stav organismu a vztah k ateroskleróze u obézních žen (Publikace č. 1 a 2)

Hypotéza: Hyperlipidémie a hyperglykémie imitují obezitogenní prostředí a vedou k rozvoji prozánětlivého stavu na úrovni organismu i tukové tkáně.

- Analyzovat prozánětlivou reakci v cirkulaci vyvolanou jednorázovým vysokotukovým pokrmem u mladých zdravých mužů (Publikace č. 3)

Hypotéza: Vysokotukový pokrm vede k rozvoji prozánětlivého stavu, na kterém se podílí aktivace stresu endoplasmatického retikula.

- Sledovat regulaci mobilizace MK z TT během tělesné zátěže při podání insulin-sensibilizujícího a antilipolytického agens - metforminu- u mladých zdravých mužů (publikace č. 4)

Hypotéza: Metformin inhibuje lipolýzu aktivovanou fyzickou aktivitou u zdravých mužů.

ČÁST B)

- Sledovat účinek několikafázové kalorické restrikce na regulaci lipolýzy v TT na úrovni exprese regulačních genů v TT u obézních žen (Publikace č. 5)

Hypotéza: Jednotlivé fáze lišící se dobou trvání a mírou kalorické restrikce jsou charakterizovány rozdílnou regulací lipolýzy v TT tj. rozdílnou expresí genů regulujících metabolismus a lipolýzu.

- Porovnat efekt 2-denní a 28-denní velmi přísné kalorické restrikce na metabolické a prozánětlivé charakteristiky v cirkulaci a v podkožní tukové tkáni u obézních žen (Publikace č. 6)

Hypotéza: a) Již po dvou dnech trvání přísné nízkokalorické diety dochází ke změnám jak na úrovni molekulárních charakteristik tukové tkáně tak na úrovni systémového metabolického stavu organismu b) Odpověď tukové tkáně na 2-denní a 28-denní kalorickou restrikci se liší jak v metabolických, tak v imunitních odpovědích.

5. VÝSLEDKY

Publikace č. 1: **Akutní hyperlipidémie vede k prozánětlivým a proaterogenním změnám v cirkulaci a v tukové tkáni u obézních žen.**

Výsledky: Akutně zvýšená hladina MK vyvolaná infuzí Intralipidu způsobila zvýšení relativního zastoupení T-lymfocytů, a to především populace Th lymfocytů (CD45+/3+/4+) v cirkulaci. Ačkoli v tukové tkáni nedošlo k významným změnám v populacích T-lymfocytů, došlo zde ke zvýšení exprese markeru RORC (Th17 prozánětlivé lymfocyty). Relativní zastoupení monocytů CD45+/14+ a CD45+/14+/16+ v krvi bylo vlivem zvýšených hladin lipidů sníženo. Zároveň došlo ke zvýšení plasmatických hladin některých cytokinů (IL-6, MCP-1), adhesivních molekul (sICAM, sVCAM) a angiogenního markeru VEGF-A. V tukové tkáni došlo k nárůstu populace CD14+/206- a populace CD14/TLR4+ monocytů/makrofágů, a ke zvýšené expresi cytokinů IL-6 a MCP-1.

Publikace č. 2: **Experimentální hyperglykémie vede ke zvýšení obsahu monocytů a T-lymfocytů v tukové tkáni u obézních žen**

Výsledky: Akutní hyperglykémie vyvolala zvýšení monocytů/makrofágů charakterizovaných expresí CD45+/14+ v tukové tkáni. Tyto změny byly nezávislé na obsahu granulocytů v TT ($17.8 \pm 2.3\%$ před a $17.4 \pm 1.9\%$ po infuzi). Rezidenční makrofágy exprimující manosový receptor CD206 v TT nebyly ovlivněny hyperglykemií. V cirkulaci nedošlo ke změnám v obsahu monocytů/makrofágů. Populace T-lymfocytů (CD45+/3+ cells; T helper subpopulace CD45+/3+/4+; T cytotoxické lymfocyty- CD45+/3+/8+) se v cirkulaci nezměnily, ale došlo k nárůstu obsahu těchto buněk v TT. Současně došlo ke zvýšené mRNA exprese prozánětlivých cytokinů (CCL2, TLR4, TNF α) a lymfocytárních markerů (CD3g, CD4, CD8a, TBX21, GATA3, FoxP3) v TT ($p < 0.05$). Kontrolní infuze octreotidu ani fyziologického roztoku nevyvolala žádné z výše uvedených změn v cirkulaci ani v TT.

Publikace č. 3: **Postprandiální zánětlivá reakce není asociována se stresem endoplazmatického retikula v periferních monocytech u zdravých štíhlých mužů.**

Výsledky: HFM indukoval zvýšení všech populací leukocytů v krvi - granulocytů, lymfocytů i monocytů. Z monocytárních populací došlo ke zvýšení exprese především CD11c+ na povrchu monocytů. Současně došlo v naší práci ke zvýšené mRNA expresi prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF- α a MCP-1. HFM neovlivnil expresi markerů ER stresu na PBMC. Podání

ursodeoxycholové kyseliny před konzumací HFM neovlivnilo změny v mRNA expresi zánětlivých markerů ani markerů ER stresu.

Publikace č. 4: **Metformin neinhibuje lipolýzu v tukové tkáni během cvičení u mladých zdravých mužů**

Výsledky: Hladina metforminu v plazmě se kontinuálně zvyšovala během 3 hodin po podání 2550 mg p.o. metforminu a maximální hladiny bylo dosaženo po 3,5 hodinách (koncentrace 4ug/ml). Podobnou dynamiku dosahovaly hladiny metforminu v dialyzátu z tukové tkáně s maximální koncentrací 1,3 ug/ml. Míra lipolýzy v tukové tkáni byla měřena jako množství glycerolu v dialyzátu. Během cvičení se zvýšila lipolýza oproti bazálnímu stavu (4.3 násobně \pm 0.5 vs. basal; $p = 0.002$) a nedošlo k supresi po podání p.o. ani lokálně podaného metforminu. Hladina laktátu rostla během cvičení v plazmě i v dialyzátu po 30-ti a 60-ti minutách cvičení (3.6 násobně vs. basal; $p = 0.015$; 2.75 násobně vs. basal; $p = 0.002$). Metformin neměl efekt na hladinu laktátu během cvičení.

Publikace č. 5: **Expres lipolytických genů v tukové tkáni je rozdílně regulována během jednotlivých fází dietní intervence u obézních žen.**

Výsledky: Dietní intervence vedla ke snížení hmotnosti o 9,8%, které bylo dáno především úbytkem tukové hmoty. Na konci dietní intervence došlo ke snížení plasmatických hladin triglyceridů, snížení hladiny bazálního inzulínu a ke zlepšení inzulínové citlivosti měřené metodou clampu. Expres mRNA adrenergního β 2-receptoru v TT signifikantně vzrostla na konci VLCD a navrátila se k bazálním hodnotám během LCD a ve fázi udržení hmotnosti. Expres adrenergního α 2 receptoru se signifikantně snížila na konci VLCD a LCD a k původním hodnotám se vrátila během fáze udržení hmotnosti. Expres HSL a ATGL byla ovlivněna podobně: došlo k signifikantnímu snížení na konci LCD a k původním hodnotám se vrátila během fáze udržení hmotnosti. Na konci VLCD byla nižší expres ATGL, ale rozdíl nebyl statisticky významný ($p=0.076$). Expres fosfodiesterázy – 3B a inzulínového receptoru se během jednotlivých fází dietní intervence nezměnila.

Publikace č. 6: **Porovnání časné (2 dny) a pozdní (28 dnů) odpovědi tukové tkáně na velmi nízkokalorickou dietu u obézních žen.**

Výsledky: Dle očekávání došlo po 2 dnech VLCD ke zvýšení plasmatických hladin MK, které přetrvávalo až do 28. dne diety. Insulinová rezistence hodnocená HOMA-IR indexem byla, ve srovnání s basálním stavem, snížena již po 2 dnech intervence a snížena zůstala i po 28 dnech. Po 2 dnech VLCD bylo pozorováno zvýšení exprese lipolytických enzymů (HSL, ATGL), po 28 dnech

došlo k jejich poklesu na bazální hodnoty. Po 2 dnech VLCD se zvýšily hladiny cirkulujících cytokinů (IL-6, MCP-1), po 28 dnech se hodnoty vrátily k basálnímu stavu před dietou. Sekrece a mRNA exprese cytokinů v tukové tkáni nebyla po 2 dnech změněna, vzestup sekrece a exprese cytokinů (IL-6, MCP-1, TNF- α) v tukové tkáni byl pozorován po 28 dnech VLCD.

6. ZÁVĚRY A DISKUZE

Obezita je charakterizovaná zvýšenou akumulací tukové tkáně a je spojena se zvýšeným rizikem vzniku metabolických poruch vedoucích k inzulinové rezistenci a následně diabetu mellitu 2. typu, kardiovaskulárním a nádorovým onemocněním [5, 6]. Mechanismy zprostředkující vztah mezi obezitou a jejími komplikacemi nejsou stále zcela zřejmé, nicméně jejich poznání je zásadní pro prevenci a léčbu obezity a následně také prevenci jejích komplikací. Možným pojítkem mezi obezitou a chorobami s ní spojenými je dysfunkce tukové tkáně projevující se jak na úrovni metabolismu tukových buněk (lipolýza a lipogeneze), tak na úrovni endokrinní či imunitní. Dysfunkce na úrovni imunitní je vyjádřena prozánětlivým stavem tukové tkáně, který se podílí na vzniku prozánětlivého stavu na úrovni celého organismu. Mezi poruchami na výše zmíněných úrovních existuje úzká souvislost: např. metabolická porucha spočívající ve zvýšeném uvolňování mastných kyselin v procesu lipolýzy v adipocytech vyvolává změnu v endokrinní funkci samotných adipocytů a v atrakci imunitních buněk z cirkulace do TT. Následně se zvyšuje produkce prozánětlivých působků jak v migrujících imunitních buňkách, tak adipocytech samotných [33]. Soubor hypertrofický adipocyt + zvýšená přítomnost imunitních buněk + jejich prozánětlivý fenotyp + fibrosa tukové tkáně tvoří základní charakteristiky dysfunkční tukové tkáně u obézního jedince. Cílem této disertační práce je přispět k pochopení mechanismů a regulačních pochodů, které zprostředkovávají spojení mezi zvýšenými hladinami nutrientů (glukóza a mastné kyseliny) a prozánětlivým stavem organismu u obézních jedinců. K dosažení vyšší hladiny nutrientů jsme zvolili buď podání exogenní (lipidy, glukóza či vysokotukový pokrm) nebo endogenní navozenou buď dietní intervencí či fyzickou zátěží. Studie si kladly za cíl objasnit některé z mechanismů, jimiž nutriční podněty vyvolávají metabolické poruchy u obézních jedinců a přispět tak k poznání rizikových faktorů výživy a tím i k účinnější prevenci a léčbě obezity v budoucnu.

V první části této práce byla sledována akutní reakce imunitních buněk na experimentálně zvýšené hladiny nutrientů. V **publikaci č. 1** jsme se věnovali vlivu hyperlipidémie na zánětlivé a proaterogenní charakteristiky v tukové tkáni i cirkulaci. Zvoleným modelem bylo vyvolání hyperlipidémie exogenním podáním lipidů infuzí 20% Intralipidu. Ukázali jsme, že parenterální

podání lipidů spojené se zvýšením hladiny cirkulujících MK a TAG, typické pro obézního jedince s metabolickým syndromem, vyvolává aktivaci proaterogenních změn v cirkulaci, kdy monocyty zřejmě adherují k endotelu cévní stěny, což je v souladu s dosavadními poznatky [34, 35]. Současně dochází ke zvýšení hladin adhezních molekul v cirkulaci (sICAM, sVCAM). Výsledky mohou nasvědčovat tomu, že hyperlipidémie vyvolává oxidační stres a endoteliální dysfunkci, v souladu s prací Gowera at al. [36]. Prozánětlivé změny byly patrné i v tukové tkáni. Osvětlen byl tak jeden z mechanismů lipotoxicity: expozice akutní hyperlipidémií působí u obezních žen proaterogenní změny na úrovni cirkulace a prozánětlivé změny v tukové tkáni a na systemové úrovni.

V publikaci č. 2 jsme jako model možného toxického působení glukózy - tj. glukotoxicity - zvolili krátkodobý hyperglykemický klemptj. hyperglykémii navozenou parenterálním podáním exogenní glukózy. Hyperglykémie vyvolala prozánětlivou imunitní reakci vyjádřenou zvýšením populace makrofágů v TT. Zároveň došlo ke zvýšení populace T-helper a T-cytotoxických lymfocytů a zvýšení mRNA exprese markerů T-lymfocytů v TT. Výsledky potvrzují, že krátkodobá hyperglykémie indukuje prozánětlivou reakci v tukové tkáni a může tak přispívat ke zhoršení prozánětlivého stavu u populací jak s vyšší lačnou, tak s postprandiálně zvýšenou glykemií např. u obézních jedinců s prediabetem. Výsledky jsou dalším elementem potvrzujícím fenomén glukotoxicity a následně i důležitost dostatečné kompenzace hladin glykémie u pacientů s prediabetem a diabetem mellitem 2. typu. **V publikaci č. 3** jsme studovali vliv hypoerlipidémie v kontextu vzniku zánětlivého stavu tukové tkáně. Tentokrát bylo zvýšené hladiny lipidů dosaženo podáním vysokotukového vysokokalorického pokrmu (HFM). Tento pokrm vyvolal postprandiální leukocytózu a prozánětlivou reakci detekovanou v krevních monocyttech. Hypotéza o tom, že podkladem prozánětlivé reakce je stres endoplasmatického retikula (ER stres) však potvrzena nebyla. Ukazatelé ER stresu nebyly po podání HFM změněny, ani podání inhibitoru ER stresu neprokázalo žádný efekt na sledované parametry. Tato studie dokládá lipotoxické působení vysokotukového pokrmu a potvrzuje důležitost dietních doporučení a osvěty jako významného faktoru prevence metabolických onemocnění. V další **publikaci č.4** jsme k dosažení zvýšené hladiny volných MK zvolili model aktivace lipolýzy krátkodobou pohybovou aktivitou. Metformin je široce používaný lék první volby u prediabetu a diebetu 2. typu a bylo prokázáno, že vykazuje anti-lipolytický efekt [37, 38]. Znalost jeho působení na TT během cvičení je zásadní pro preskripci pohybové aktivity u prediabetiků a diabetiků jako součást prevence i léčby. Proto jsme testovali hypotézu, zda metformin může inhibovat cvičením indukovanou lipolýzu v tukové tkáni. Originálním metodickým přínosem práce bylo sledování distribuce metforminu v podkožní TT metodou mikrodialýzy. Hypotézu o inhibici lipolýzy během cvičení jsme nepotvrdili. Metformin tedy nehraje zásadní roli v mobilizaci lipidů během cvičení a pozitivní vliv cvičení na redukci

tukové hmoty není metforminem negativně ovlivněn. Výsledek je tak přínosem pro preskripci pohybové aktivity jako součást prevence a léčby prediabetu a diabetu mellitu 2. typu.

Ve druhé části této dizertační práce bylo snahou prohloubit znalosti o pozitivních efektech redukce hmotnosti jakožto základním preventivním i léčebným opatřením obezity a jejích komplikací. **V publikaci č. 5** jsme prokázali, že míra a regulace lipolýzy během redukčního režimu je závislá na míře a době trvání kalorické restrikce. Ukázali jsme, že ve změnách lipolýzy během kalorické restrikce hraje pravděpodobně roli rozdílná exprese genů spojených s adrenergní signalizací a následnou regulací lipolýzy. Výsledky jsou ve shodě s dřívější studií, kde byla demonstrována změna v adrenergní regulaci lipolýzy během dietní intervence pomocí *in vivo* mikrodialýzy tukové tkáně [39]. V souladu s klinickou zkušeností tato regulace pravděpodobně souvisí s výraznou redukcí tukové hmoty v prvním měsíci podávání nízkoenergetických diet a adaptací na nízkoenergetický režim v dalších fázích, dále také souvisí se závislostí redukce tukové hmoty na míře kalorické restrikce. **V publikaci č. 6** jsme sledovali změny širšího spektra metabolických a endokrinních charakteristik TT při velmi krátkém – dvoudenním - působení výrazné kalorické restrikce. Tato situace je vhodným modelem ke sledování působení kalorické restrikce *per se* tj. bez průvodní redukce tukové tkáně. Z publikovaných studií i z klinických zkušeností je známo, že k metabolickým změnám po bariatrických intervencích dochází již v prvních dnech po zákroku [40], ovšem podklad těchto změn není stále zřejmý. V naší studii byly změny v TT po dvou dnech kalorické restrikce srovnány se změnami po 28 denní intervenci, při níž dochází k již významné redukcí tělesného tuku. V našem souboru došlo již po dvou dnech kalorické restrikce ke snížení inzulinové rezistence hodnocené indexem HOMA-IR. Na úrovni TT výsledky ukázaly, že již po 2 dnech byla zvýšena exprese genů podílejících se na regulaci lipolýzy v TT, na druhé straně po dvou dnech diety nedošlo k indukci prozánětlivého stavu v TT, zatímco po 28 dnech diety byl prozánětlivý stav TT spíše zvýšen. Tyto výsledky naznačují, že v dynamické fázi výrazné kalorické restrikce mohou být charakteristiky zánětlivého stavu zčásti determinovány remodelací tukové tkáně: zmenšením adipocytů, změnami v infiltraci či polarizaci makrofágů, stupněm fibrosy a prokrvením TT. Naše předchozí studie [41, 42] ukázaly, že ke zlepšení prozánětlivého stavu TT v souvislosti s redukcí tukové hmoty je třeba režimů trvajících alespoň 3 měsíce, obsahující nejlépe i fázi udržení hmotnosti. V těchto studiích bylo též ukázáno, že změny v zánětu tukové tkáně nejsou jedinou determinantou zlepšení metabolického stavu obezního jedince při dietních intervencích.

Lze shrnout, že na základě analýz účinků krátkodobých intervencí byla potvrzena hypotéza o toxickém prozánětlivém působení jak zvýšených hladin glukózy (charakteristické pro dekompenzovaného diabetika), tak zvýšených hladin volných MK (charakteristické pro obezní jedince) na úrovni TT i celého organismu. Nízkoenergetická dieta zlepšuje metabolický stav

organismu obézního jedince již po několika dnech trvání, nicméně toto metabolické zlepšení není asociováno s odpovídajícími změnami v ukazatelích prozánětlivého stavu tukové tkáně. Pro toto zlepšení je třeba intervencí dlouhodobějších. Kalorická restrikce ovlivnila významně mechanismy regulace lipolýzy TT, což může být podkladem pozitivních změn spojených s redukcí hmotnosti.

Výsledky studií zahrnutých v této práci přispěly k pochopení regulace vzniku prozánětlivého stavu organismu a úlohy energetického příjmu i hladiny základních makronutrientů v tomto procesu. Další výzkum funkčních změn na úrovni tukové tkáně je nadále nezbytný k pochopení mechanismů a další implikace pro preventivní a léčebná doporučení.

7. PŘEHLED PUBLIKACÍ, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTACE

ČÁST A: Krátkodobé intervence

1) Krauzová E, Kračmerová J, Rossmeislová L, Mališová L, Tencerová M, Koc M, Štich V, Šiklová M. Acute hyperlipidemia initiates proinflammatory and proatherogenic changes in circulation and adipose tissue in obese women. *Atherosclerosis*. 2016 Jul;250:151-7.

2) Tencerová M, Kračmerová J, **Krauzová E**, Mališová L, Kováčová Z, Wedellová Z, Šiklová M, Štich V, Rossmeislová L. Experimental hyperglycemia induces an increase of monocyte and T-lymphocyte content in adipose tissue of healthy obese women. *PLoS One*. 2015 Apr 20;10(3).

3) Kračmerová J, **Czudková E**, Koc M, Mališová L, Šiklová M, Štich V, Rossmeislová L. Postprandial inflammation is not associated with endoplasmic reticulum stress in peripheral blood mononuclear cells from healthy lean men. *Br J Nutr*. 2014 May 28;116:1-10.

4) Krauzová E, Tůma P, de Glisezinski I, Štich V, Šiklová M. Metformin Does Not Inhibit Exercise-Induced Lipolysis in Adipose Tissue in Young Healthy Lean Men. *Front Physiol*. 2018 May 23; 9:604.

ČÁST B: Dietní intervence

5) Koppo K, Valle C, Šiklová-Vítková M, **Czudková E**, de Glisezinski I, van de Voorde J, Langin D, Štich V. Expression of lipolytic genes in adipose tissue is differentially regulated during multiple phases of dietary intervention in obese women. *Physiol Res.* 2013;62[43]:527-35.

6) Šrámková V, Rossmeislová L, **Krauzová E**, Kračmerová J, Koc M, Langin D, Štich V, Šiklová M. Comparison of Early (2 Days) and Later (28 Days) Response of Adipose Tissue to Very Low-Calorie Diet in Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Dec;101(12):5021-5029.

SEZNAM NEZAHRNUTÝCH PUBLIKACÍ S IF

- 1)** Gojda J, Rossmeislová L, Straková R, Tůmová J, Elkalaf M, Jaček M, Tůma P, Potočková J, **Krauzová E**, Waldauf P, Trnka J, Štich V, Anděl M. Chronic dietary exposure to branched chain amino acids impairs glucose disposal in vegans but not in omnivores. *Eur J Clin Nutr.* 2017 May;71(5):594-601. (IF 3,22)
- 2)** Šrámková V, Koc M, **Krauzová E**, Kračmerová J, Šiklová M, Elkalaf M, Langin D, Štich V, Rossmeislová L. Expression of lipogenic markers is decreased in subcutaneous adipose tissue and adipocytes of older women and is negatively linked to GDF15 expression. *J Physiol Biochem.* 2019 Mar 25. (IF 2,74)
- 3)** Šiklová M, **Krauzová E**, Svobodová B, Štěpán M, Koc M, Štich V, Rossmeislová L. Circulating monocyte and lymphocyte populations in healthy first degree relatives of type 2 diabetic patients at fasting and during short-term hyperinsulinemia. *Mediators Inflamm.* 2019 Mar 11;2019:1491083 (IF 3,55)

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. WHO Obesity and overweight. 2018.
2. <https://www.slideshare.net/stemmark/obezita-2013-stemmark-vzp>. STEM/MARK a VZP. 2013.
3. Svačina, Š., *Obezitologie a teorie metabolického syndromu*. 2013, Praha: Triton.
4. Matoulek, M., S. Svacina, and J. Lajka, [The incidence of obesity and its complications in the Czech Republic]. *Vnitr Lek*, 2010. **56**(10): p. 1019-27.
5. Lengyel, E., et al., *Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors*. *Trends Cancer*, 2018. **4**(5): p. 374-384.
6. Pistollato, F., et al., *Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A focus on human studies*. *Pharmacol Res*, 2018. **131**: p. 32-43.
7. Miller, C.T., et al., *The Effects of Exercise Training in Addition to Energy Restriction on Functional Capacities and Body Composition in Obese Adults during Weight Loss: A Systematic Review*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(11): p. e81692.
8. Yumuk, V., et al., *European Guidelines for Obesity Management in Adults*. *Obesity facts*, 2015. **8**(6): p. 402-424.
9. Tchkonina, T., et al., *Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots*. *Cell Metab*, 2013. **17**(5): p. 644-56.
10. Chung, S., et al., *Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes*. *Endocrinology*, 2006. **147**(11): p. 5340-51.
11. Fain, J.N., et al., *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. *Endocrinology*, 2004. **145**(5): p. 2273-82.
12. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance*. *Science*, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
13. Bluher, M., *Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2013. **27**(2): p. 163-77.
14. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *What we talk about when we talk about fat*. *Cell*, 2014. **156**(1-2): p. 20-44.
15. Klimcakova, E., et al., *Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat*. *Diabetologia*, 2011. **54**(4): p. 876-87.
16. Klimcakova, E., et al., *Worsening of obesity and metabolic status yields similar molecular adaptations in human subcutaneous and visceral adipose tissue: decreased metabolism and increased immune response*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(1): p. E73-82.
17. Zeyda, M., et al., *Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients*. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. **19**(4): p. 743-8.
18. Osborn, O. and J.M. Olefsky, *The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease*. *Nat Med*, 2012. **18**(3): p. 363-74.
19. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 175-84.
20. Feuerer, M., et al., *Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 930-9.
21. Graham, T.E., et al., *Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(24): p. 2552-63.
22. Unger, R.H. and P.E. Scherer, *Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity*. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. **21**(6): p. 345-52.
23. Halberg, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(16): p. 4467-83.

24. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
25. Ravussin, E. and S.R. Smith, *Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **967**: p. 363-78.
26. Despres, J.P., *Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat*. Crit Pathw Cardiol, 2007. **6**(2): p. 51-9.
27. Tan, C.Y. and A. Vidal-Puig, *Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 5): p. 935-40.
28. Trayhurn, P., B. Wang, and I.S. Wood, *Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity?* Br J Nutr, 2008. **100**(2): p. 227-35.
29. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): p. 900-17.
30. Rossmeislova, L., et al., *Weight loss improves the adipogenic capacity of human preadipocytes and modulates their secretory profile*. Diabetes, 2013. **62**(6): p. 1990-5.
31. DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, and R. Andres, *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. Am J Physiol, 1979. **237**(3): p. E214-23.
32. Pelikánová, T. and Z. Zadák, *Metabolické funkční testy*, in *Metodologie předklinického a klinického výzkumu v metabolismu, výživě, imunologii a farmakologii*. 2011, Galén: Prague.
33. Kosteli, A., et al., *Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue*. J Clin Invest, 2010. **120**(10): p. 3466-79.
34. den Hartigh, L.J., et al., *Postprandial VLDL lipolysis products increase monocyte adhesion and lipid droplet formation via activation of ERK2 and NfκappaB*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **306**(1): p. H109-20.
35. Motojima, K., et al., *Repetitive postprandial hypertriglyceridemia induces monocyte adhesion to aortic endothelial cells in Goto-Kakizaki rats*. Endocr J, 2008. **55**(2): p. 373-9.
36. Gower, R.M., et al., *CD11c/CD18 expression is upregulated on blood monocytes during hypertriglyceridemia and enhances adhesion to vascular cell adhesion molecule-1*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 160-6.
37. Bourron, O., et al., *Biguanides and thiazolidinediones inhibit stimulated lipolysis in human adipocytes through activation of AMP-activated protein kinase*. Diabetologia, 2010. **53**(4): p. 768-78.
38. Zhang, T., et al., *Mechanisms of metformin inhibiting lipolytic response to isoproterenol in primary rat adipocytes*. J Mol Endocrinol, 2009. **42**(1): p. 57-66.
39. Koppo, K., et al., *Catecholamine and insulin control of lipolysis in subcutaneous adipose tissue during long-term diet-induced weight loss in obese women*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2012. **302**(2): p. E226-E232.
40. Bojsen-Moller, K.N., et al., *Early enhancements of hepatic and later of peripheral insulin sensitivity combined with increased postprandial insulin secretion contribute to improved glycemic control after Roux-en-Y gastric bypass*. Diabetes, 2014. **63**(5): p. 1725-37.
41. Capel, F., et al., *Macrophages and adipocytes in human obesity: adipose tissue gene expression and insulin sensitivity during calorie restriction and weight stabilization*. Diabetes, 2009. **58**(7): p. 1558-67.
42. Vitkova, M., et al., *Plasma levels and adipose tissue expression of retinol-binding protein 4 are reduced during diet-induced weight loss in obese subjects but are not associated to changes in insulin sensitivity*. International Journal of Obesity, 2007. **31**: p. S57-S57.
43. Jensen, M.D., et al., *2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(25 Pt B): p. 2985-3023.