

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



Mgr. Petra Kaválková

**Význam endokrinní funkce tukové tkáně při vzniku syndromu inzulínové
rezistence**

*The importance of endocrine function of adipose tissue in the development of
insulin resistance syndrome*

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha 2016

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	6
ABSTRAKT (CZ)	8
ABSTRAKT (EN)	9
1. ÚVOD	11
2. INZULÍNOVÁ REZISTENCE A METABOLICKÝ SYNDROM	12
2.1 Mechanismus působení inzulínu	13
2.2 Regulace glukózového metabolismu.....	14
2.3 Role lipidového metabolismu při rozvoji inzulínorezistence.....	17
3. FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM TUKOVÉ TKÁNĚ V LIDSKÉM ORGANIZMU	18
3.1 Složení tukové tkáně a buňky produkující hormony.....	19
3.2 Hormony tukové tkáně.....	21
3.3 Imunokompetentní buňky v tukové tkáni a jejich endokrinní funkce.....	25
4. DIFERENCIACE ADIPOCYTŮ V TUKOVÉ TKÁNI	26
4.1 Stupně adipocytární diferenciace.....	27
4.2 Jaderná regulace adipocytární diferenciace.....	28
4.2.1 Transkripční faktory v adipogenezi.....	29
4.3 Mimojaderná regulace adipocytární diferenciace.....	30
4.3.1 Adipogenní faktory.....	30
4.3.2 Antiadipogenní faktory.....	31
4.3.2.1 Farmakologické antiadipogenní faktory.....	32
5. PREADIPOCYTÁRNÍ FAKTOR – 1	33
5.1 Struktura Pref-1.....	33
5.2 Produkce a funkce Pref-1.....	34
5.3 Pref-1 v experimentálních studiích.....	34
5.4 Pref-1 v klinických studiích.....	35
5.5 Vztah Pref-1 k obezitě a diabetes mellitus 2. typu.....	35
5.6 Vztah Pref-1 k lipodystrofií.....	36
6. HYPOTÉZA A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	37
7. METODIKA STUDIÍ	37
7.1 Antropometrická vyšetření a odběry krevních vzorků.....	38
7.2 Hormonální a biochemická vyšetření krevních vzorků.....	38
7.3 Hyperinzulinemický isoglykemický clamp.....	39

7.3.1	Praktické provedení hyperinzulinemického isoglykemického clampu...	39
7.3.2	Vzorce pro výpočet rychlosti infuze glukózy a inzulínu.....	39
7.4	Statistická analýza získaných dat.....	40
8.	PROTOKOLY DÍLČÍCH STUDIÍ.....	40
8.1	Vliv nízkokalorické diety, akutní hyperinzulinémie a fenofibrátové léčby na sérové koncentrace Pref-1 u pacientek s obezitou a diabetes mellitus 2. typu.....	40
8.2	Vliv částečné realimentace na sérové koncentrace Pref-1 u pacientek s mentální anorexií.....	41
9.	VÝSLEDKY	41
9.1	Sérové koncentrace Preadipocytárního faktoru - 1 (Pref-1) u obézních žen a žen s diabetes mellitus 2. typu: vliv nízkokalorické diety, akutní hyperinzulinémie a fenofibrátové léčby.....	41
9.1.1.	Srovnání antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů obézních žen a žen s DM 2. typu s kontrolní skupinou zdravých žen.....	41
9.1.2	Srovnání antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů obézních žen před a po VLCD vs. kontrolní skupina žen.....	43
9.1.3	Srovnání antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů obézních žen s diabetes mellitus 2. typu před a po VLCD a vs. kontrolní skupina žen.....	44
9.1.4	Srovnání antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů pacientů zahrnutých do podstudie s fenofibrátovou léčbou.....	45
9.1.5	Sérové koncentrace Preadipocytárního faktoru-1 u obézních žen s nebo bez diabetes mellitus 2. typu a kontrolní skupiny žen a jeho vztah k antropometrickým a metabolickým parametrům.....	46
9.1.6	Vliv VLCD, fenofibrátové léčby a hyperinzulinémie během clampu na sérové koncentrace Pref-1.....	47
9.2	Vliv částečné realimentace na sérové koncentrace Pref-1 u pacientek s mentální anorexií.....	49
10	DISKUZE.....	53
11	ZÁVĚR A SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ PRÁCE.....	58
12	LITERATURA.....	60
13	PŘÍLOHY.....	72
13.1	Prohlášení autora.....	72
13.2	Identifikační záznam.....	72

13.3	Plné texty vlastních publikací tvořící podklady disertační práce.....	72
------	---	----

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli panu prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc. za příkladné odborné vedení po dobu mého postgraduálního studia, cenné rady a podporu při získávání výsledků, které se staly podkladem pro tvorbu publikací a disertační práce. Poděkování patří také laboratorním kolegům za spolupráci a podporu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AN	anorexia nervosa
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AGPAT2	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta
AKT	serine-threonine protein kinase
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
ATP	adenozintrifosfát
BMI	body mass index (index tělesné hmotnosti)
BMD	bone mineral density
BMP	bone morphogenetic protein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCR2	CC chemokinový receptor – 2
CD	cluster of differentiation
CDK6	cyklin D3-cyclindependentní kináza (Cyclin-Dependent Kinase 6)
C/EBP-β	enhancer-binding protein beta
CREB	cAMP response element-binding protein
CRP	C-reaktivní protein
Da	Dalton
DM2T	diabetes mellitus 2. typu
DSL	Delta/Serrate/LAG2
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
EGF	epidermální růstový faktor
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FABP	Fatty acid binding protein
FAS	syntáza mastných kyselin (fatty acid syntase)
FFA	volné mastné kyseliny
FGF	fibroblastový růstový faktor
Foxa2	forkhead box A2
FoxO1	forkhead transcriptional factor 1
GATA	rodina transkripčních faktorů o sekvenci „GATA“
GLUT	glukózový transportér
Glu-6-P	glukóza-6-fosfát
HAART	highly active antiretroviral treatment
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HAT	histonová acetyltransferáza
HDL	high-density lipoprotein
HIV	lidský imunodeficientní virus (human immunodeficiency virus)
hMSC	lidské mezenchymální buňky (human mesenchymal stem cells)
HOMA	homeostasis model assessment
ICAM	intracelulární adhezivní molekula (intracellular adhesion molecule)
IDE	inzulín degradující enzym
IFN- γ	interferon-γ
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
IL	interleukin
IL-6R	receptor pro interleukin 6
IR	inzulínová rezistence
IRS	substrát inzulínového receptoru (insulin receptor substrate)

KLF	Kruppel-like faktor
LDL	low-density lipoprotein
LPL	lipoproteinová lipáza
LPS	lipopolysacharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MA	mentální anorexie
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCE	mitotická klonální expanze (mitotic clonal expansion)
MCP-1	monocyty chemoatraktivující protein - 1 (monocyte chemoattractant protein - 1)
MIC-1	macrophage inhibitory cytokine 1
mRNA	messengerová RNA
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Program—Third Adult Treatment Panel
NKT	natural killer T lymfocyty
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (plasminogen activator inhibitor-1)
PBEF	pre-B-cell colony-enhancing factor (faktor podporující kolonie pre-B lymfocytů)
PDI	proteinová disulfidová izomeráza
PEP	fosfoenolpyruvát
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PPAR	receptor aktivován peroxizomovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor)
Pref-1	Preadipocytární faktor-1
RIA	radioimunoanalýza (radioimmunoassay)
RUNX2	runt-related transcriptional factor 2
SEM	střední chyba průměru (standard error of the mean)
siRNA	small interfering RNA
SMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3
SREBP1	sterol regulatory element-binding protein 1
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TACE	TNF- α konvertující enzym
TAZ	transkripční koaktivátor (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)
TGF- β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
T _h	T pomocný (helper) lymfocyt
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
TRAP220	thyroid receptor-associated proteincomplex 220 kDa component
TR	tyroidní receptor
TSH	tyreostimulační hormon
TZD	Thiazolidindiony
T3	trijodtyronin
VCAM	vaskulární adhezivní molekula (vascular cell adhesion molecule)
VLCD	nízkokalorická dieta (very-low-calorie diet)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)
Wnt	Wingless/Int-1
11BHSD1	11- β -hydroxysteroid-dehydrogenáza 1

ABSTRAKT (CZ)

Tuková tkáň produkuje řadu adipokinů, pro- i protizánětlivých cytokinů a hormonů, které mohou ovlivňovat rozvoj inzulínové rezistence, diabetes mellitus 2. typu a dalších komorbidit tvořících metabolický syndrom. Schopnost tukové tkáně skladovat lipidy a tím chránit ostatní orgány a tkáně před ektopickým ukládáním lipidů a rozvojem inzulínové rezistence (IR) je plně závislá na adipogenním potenciálu preadipocytů. Počet a funkce těchto buněk může hrát klíčovou roli v rozvoji jak „zdravé“ tukové tkáně, tak i při vzniku metabolických poruch typu diabetes mellitus 2. typu. Regulace množství tělesného tuku ovlivněním konverze preadipocytů ve zralé adipocyty může hrát významnou roli v léčbě obezity i jejích komorbidit. Jednou z příčin vzniku inzulínové rezistence může být inhibice diferenciaci preadipocytů ve zralé adipocyty a následné ektopické ukládání lipidů způsobené sekrecí Preadipocytárního faktoru – 1 (Pref-1). Pref-1 je nedávno objevený protein exprimovaný preadipocyty nikoli však zralými adipocyty. Je členem rodiny proteinů podobných epidermálním růstovým faktorům, které regulují diferenciaci adipocytů a osteoblastů. Inhibice preadipocytární diferenciaci může hrát významnou roli v regulaci velikosti adipocytů, jejich funkce, expandability a citlivosti k pozdějším metabolickým komplikacím.

Cílem této práce bylo sledovat změny hladin Pref-1 u pacientek s různými metabolickými onemocněními jako jsou obezita, diabetes mellitus 2. typu, mentální anorexie (MA) a též u zdravých štíhlých žen. Dále sledovat vztah sérových hladin Pref-1 k antropometrickým a metabolickým parametrům a vliv různých intervencí typu nízkokalorické diety (VLCD) resp. částečné realimentace na hladiny Pref-1. V další části této práce byl sledován vliv akutní hyperinzulinémie a léčby fenofibrátem u pacientek s obezitou a diabetes mellitus 2. typu na sérové hladiny Pref-1.

Získané výsledky ukazují významný rozdíl v sérových koncentracích Pref-1 u sledovaných skupin pacientek, jež odrážejí nutriční stav organismu. Obézní pacientky s DM 2. typu se vyznačovaly zvýšenými hladinami Pref-1 ve srovnání se štíhlými ženami a třítydenní nízkokalorická dieta vedla k signifikantnímu poklesu hladin Pref-1. Tříhodinová akutní hyperinzulinémie navozená při hyperinzulinemickém isoglykemickém clampu signifikantně snižovala sérové hladiny Pref-1 u zdravých kontrolních žen a obézních diabetiček před a po tříměsíční léčbě fenofibrátem. Naopak 46 denní realimentační program signifikantně zvýšil cirkulující hladiny Pref-1 u pacientek s MA, zatímco před realimentací nebyl nalezen rozdíl v Pref-1 mezi kontrolní skupinou a pacientkami s MA.

Klíčová slova: tuková tkáň – diabetes mellitus 2. typu – inzulinová rezistence – obezita – mentální anorexie – preadipocyty – Preadipocytární faktor 1 – nízkokalorická dieta – fenofibrát

ABSTRAKT (AJ)

Adipose tissue produces numerous adipokines, pro- and antiinflammatory cytokines and hormones which may influence the development of insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and other comorbidities of the metabolic syndrome.

The ability of adipose tissue to store lipids and thus protect other organs and tissues from ectopic lipid accumulation and development of insulin resistance (IR) is largely dependent on the adipogenic potential of preadipocytes. The amount and function of these cells may be the key factor in creating “healthy” adipose tissue or on the contrary “unhealthy” adipose tissue eventually leading to metabolic derangements. The regulation of the amount of body fat by converting preadipocytes into mature adipocytes may be crucial in the prevention and treatment of obesity and its comorbidities.

One of the reasons for development of insulin resistance can be the inhibition of the differentiation process of preadipocytes into mature adipocytes with consequent ectopic lipid accumulation caused by the secretion of preadipocyte factor - 1 (Pref – 1). Pref – 1 has been discovered recently as a protein produced by preadipocytes but not by mature adipocytes. Pref – 1 is a member of the protein family sharing similarity with epidermal growth factors which regulate the differentiation of adipocytes and osteoblasts. The inhibition of preadipocyte differentiation may play an important role in determination of the size of adipocytes, their function, expandibility and sensitivity to the potential metabolic disorders.

The aim of this thesis was to explore the changes of Pref – 1 levels in patients with different metabolic diseases such as obesity, type 2 diabetes mellitus, anorexia nervosa and also in healthy lean individuals. Furthermore, we studied the relationship between the serum levels of Pref – 1 and anthropometric and metabolic parameters and the influence of various interventions such as very low-calorie diet (VLCD), acute hyperinsulinemia or chronic fenofibrate treatment in patients with obesity or partial realimentation in anorexia nervosa (AN) patients, respectively, on Pref-1 levels.

The results show that there is a significant difference in serum concentration of Pref-1 among the above described groups of patients, which reflects their nutritional status. Obese diabetic patients had higher Pref-1 levels in comparison with lean individuals, and after three weeks of VLCD the Pref-1 level significantly decreased. A three-hour acute hyperinsulinemia during hyperinsulinemic-isoglycemic clamp significantly lowered Pref-1 levels in both healthy control group and diabetic patients before and after the treatment with fenofibrate.

On the other hand, a 46-day realimentation program significantly increased the circulating levels of Pref-1 in patients with AN while no difference in Pref-1 levels was found between the control group and patients with AN at baseline.

Key words: adipose tissue – type 2 diabetes mellitus – insulin resistance – obesity – anorexia nervosa – preadipocytes – Preadipocyte factor - 1 – very low-calorie diet – fenofibrate

1. ÚVOD

Obezita spolu s přidruženými komorbiditami, zejména diabetes mellitus 2. typu, v posledních 30 letech ve všech vyspělých světových zemích, včetně České republiky, dosahuje rozměrů epidemie. Podle aktuálních údajů WHO se výskyt obezity od roku 1980 zdvojnásobil a v roce 2008 bylo na celém světě více než 1,4 miliardy lidí s nadváhou, 200 milionů mužů a 300 milionů žen bylo obézních. Alarmující je výskyt nadváhy/obezity u dětí, který dle šetření WHO činil v roce 2013 41 milionů dětí mladších 5 let. Predikce obezity dle WHO pro rok 2015 je více než 700 milionů obézních na celém světě.

Obezita je definována jako zmnožení tukové tkáně v organismu, které je nejčastěji způsobeno dysbalancí mezi energetickým příjmem a výdejem. Tuková tkáň není jen tepelným izolátorem, mechanickou ochranou proti nárazu nebo zásobárnou energie, ale je především největším endokrinním orgánem lidského těla, jehož hormonální působky mají velký význam v regulaci metabolismu sacharidů, lipidů i celkového energetického metabolismu [1-3]. Hypertrofie tukové tkáně je charakterizována změnami v endokrinní funkci adipocytů, preadipocytů, makrofágů a rozvojem chronického subklinického zánětu. Dysfunkce tukové tkáně je provázána produkcí prozánětlivých, proaterogenních a prodiabetických adipokinů, cytokinů a chemokinů. Vzhledem k celosvětově vzrůstajícímu trendu obezity se do popředí vědeckého zájmu dostává snaha o pochopení mechanismů nadměrného ukládání energie v tukové tkáni a modulace endokrinní funkce tukové tkáně.

V současné době je proto věnována velká pozornost novým, slibným adipocytárním faktorům, které mohou hrát významnou roli v etiopatogenezi především inzulinové rezistence, diabetes mellitus 2. typu, ale i jiných komorbidit spojených s obezitou. Jedním z těchto faktorů je i nedávno objevený Preadipocytární faktor-1 (Pref-1), který je členem rodiny proteinů podobných epidermálním růstovým faktorům. Pref-1 hraje významnou roli v regulaci diferenciaci adipocytů a osteoblastů [4, 5], odráží stupeň adipocytární diferenciaci *in vitro* a *in vivo* a je proto používán jako preadipocytární marker [6]. Pref-1 produkovaný preadipocyty nikoli však adipocyty, je uvolňován do cirkulace, kde může systémově působit v dalších tkáních a orgánech a ovlivňovat tak lipidový a glukózový metabolismus a energetickou homeostázu. Výsledky experimentálních studií ukazují, že nadprodukce Pref-1 u myši vede ke snížení obsahu tukové tkáně, hypertriglyceridémii, snížené glukózové toleranci a zároveň snížené inzulinové senzitivě, čímž přispívá ke vzniku systémových metabolických onemocnění [7].

Objasnění a pochopení procesů probíhajících v tukové tkáni zdravých jedinců, obézních pacientů nebo pacientů trpících mentální anorexií může přispět k optimalizaci preventivních a terapeutických opatření. Je proto důležité detailně objasnit mechanismy zodpovědné za regulaci adipocytární diferenciaci a její změny u pacientů s obezitou či dalšími onemocněními spojenými se změnami nutričního stavu.

2. INZULÍNOVÁ REZISTENCE A METABOLICKÝ SYNDROM

Inzulínová rezistence (IR) je definována jako porucha účinku inzulínu, kdy normální hladiny inzulínu v plazmě vyvolají nižší biologickou odpověď organismu. Důsledkem IR je zhoršené vychytávání glukózy a její metabolizace svaly, porucha inhibice uvolňování glukózy z jater a zvýšená lipolýza v tukové tkáni [8, 9]. IR bývá často přítomna u osob trpících obezitou spolu s dalšími komorbiditami jako je arteriální hypertenze, hyperlipidémie, hyperurikémie, prokoagulační stav, endoteliální dysfunkce a zvýšení markerů subklinického zánětu. Tento soubor klinických, biochemických a humorálních odchylek je označován jako syndrom inzulínové rezistence, metabolický syndrom či Reavenův syndrom X [10]. Mnoho klinických studií prokázalo spojitost mezi obezitou a diabetes mellitus 2. typu, kde inzulínová rezistence hraje klíčovou roli v rozvoji diabetu [11]. Brunecká studie se zabývá prevalencí inzulínové rezistence u pacientů s porušenou glukózovou tolerancí, diabetes mellitus 2. typu, dyslipidemií, hyperurikémií a hypertenzí. Z výsledků studie je patrné, že nejvyšší prevalence inzulínové rezistence byla u pacientů s hypertriglyceridemií a sníženou hladinou HDL cholesterolu [12]. Na základě výsledků klinických studií je Světovou zdravotnickou organizací (WHO), European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) a National Cholesterol Education Program—Third Adult Treatment Panel (NCEP ATP III) postulována a rozšiřována definice metabolického syndromu. První doporučení týkající se charakterizace metabolického syndromu bylo vydáno WHO v roce 1999 jako součást definice, diagnostiky a klasifikace diabetu. I přes značné rozšíření termínu metabolický syndrom není definice dosud jednotná a liší se jak hraničními hodnotami, které musí být pro splnění kritérií dosaženy tak i charakteristickými znaky. Všechny dnes dostupné definice však obsahují následující kritéria: abdominální obezita (muži ≥ 102 cm, ženy ≥ 88 cm), triglyceridémie $> 1,7$ mmol/l nebo hypolipidemická léčba, HDL (muži $< 1,0$ mmol/l, ženy $< 1,3$ mmol/l), krevní tlak $\geq 130/ \geq 85$ nebo antihypertenzní léčba, glykémie na lačno $\geq 5,6$ mmol/l nebo přítomnost porušené glukózové tolerance nebo diabetes mellitus 2. typu [13]. Obecně lze říci, že metabolický syndrom je soubor rizikových faktorů, které se často vyskytují společně a vznikají velmi pravděpodobně na podkladě inzulínové rezistence.

2.1 Mechanismus působení inzulínu

Inzulín je produkován β buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu a cirkulací distribuován do cílových tkání, kterými jsou příčně pruhované svaly, tuková tkáň a játra. Inzulín je nejprve produkován ve formě preproinzulínu, který vzniká na ribozomech drsného endoplazmatického retikula. Preproinzulín je signální peptidázou štěpen na proinzulín, který je v membránových váčcích transportován do Golgiho aparátu, kde je skladován v sekrečních granulích. Sekrece inzulínu je bifázická. První fáze má rychlý nástup (4-6 minut), je silná a rychle odeznívá, v následné druhé fázi roste sekrece inzulínu pomalu a trvá několik desítek minut do doby, než se hladina glukózy ustálí [14]. Sekreci reguluje zejména koncentrace glukózy v intersticiální tekutině obklopující β buňky pankreatu, ale i aminokyseliny, mastné kyseliny, ketolátky a některé hormony a neurotransmitery [15]. Všechny tyto látky indukují sekreci pouze v přítomnosti glukózy. Na fyziologický stimulus (zvýšená hladina glukózy) reagují β buňky zvýšenou koncentrací Ca^{2+} v cytozolu [16], která způsobuje zvýšení poměru ATP/ADP uvnitř buňky, uzavření membránových K^+ kanálů a v důsledku depolarizace plazmatické membrány otevření Ca^{2+} kanálů. V důsledku zvýšené koncentrace Ca^{2+} dochází vlivem aktivace různých proteinkináz ke kontrakcím mikrotubulární a mikrofilamentové buněčné soustavy, jejímž výsledkem je přesun sekrečních granúl k místům exocytózy na buněčné membráně [17]. Hospodaření s Ca^{2+} uvnitř buňky ovlivňuje cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), který působí na sekreci inzulínu pouze při vysoké glykémii. cAMP ovlivňuje vtok vápenatých iontů do buňky, jejich distribuci a akumulaci v cytozolu tak, aby byla možná sekrece inzulínu do krevního řečiště.

V důsledku specifické vazby inzulínu na receptor je regulována celá řada fyziologických procesů včetně membránového transportu, buněčného růstu a diferenciací. Inzulínový receptor je transmembránový glykoprotein obsahující dva typy podjednotek označované jako α a β , které jsou spojené disulfidickými můstky v β - α - α - β konfiguraci. Vazba inzulínu na receptor způsobuje autofosforylaci β podjednotky, jejíž nitrobuněčná doména má charakter tyrozinkinázy. Aktivací inzulínového receptoru jsou iniciovány autofosforylačně-defosforylační reakce, probíhající dvěma signálními kaskádami. První je reprezentována přenosem signálu zprostředkovaným substrátem inzulínového receptoru, který působí jako druhý posel, jenž následně vyvolá stimulaci fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K). Výsledkem této reakce jsou metabolické účinky inzulínu, reprezentované zvýšenou lipogenezí, proteosyntézou a ukládáním glukózy ve formě glykogenu v játrech. Vstup glukózy do buňky je zprostředkován aktivací PI3K, kdy dochází k přesunu glukózových

transportérů GLUT4 z nitra buňky k jejímu povrchu. Následné otevření transportních kanálů pro glukózu pak umožní vstup glukózy do buněk. Tímto mechanismem je regulována postprandiální glykémie ve tkáních, které jsou závislé na inzulínu (tuková a svalová tkáň). Druhá signální kaskáda probíhá přes mitogen aktivovanou proteinkinázu, která se projevuje změnami v expresi genů včetně proteoanabolického účinku inzulínu a růstových účinků. Uvedené fyziologické procesy jsou udržovány v rovnováze souborem zpětných vazeb zprostředkovaných interakcí mezi glukózou a inzulínem, inzulínem a jeho agonisty (glukagon, katecholaminy, růstový hormon, kortizol), ale také hormonální regulací zprostředkovanou inkretiny a somatostatinem.

Degradace cirkulujícího inzulínu probíhá z 70 % v játrech, z 30 % v ledvinách a také svalech vlivem enzymatického působení inzulín degradujícího enzymu (IDE) a proteinové disulfidové izomerázy (PDI). Degradace inzulínu byla též prokázána v adipocytech, fibroblastech a lymfocytech. Degradací proces inzulínu začíná již jeho navázáním na inzulínový receptor lokalizovaný na buněčné membráně. Inzulínový receptor samotný nemá degradační schopnost, ale vystavuje inzulín působení IDE. Malá část inzulínu vázaného na receptor je degradována přímo na plazmatické membráně [18], ale většina inzulínu podléhá degradaci po internalizaci komplexu receptor-inzulín intracelulárně v endozomech.

2.2 Regulace glukózového metabolismu

Glukóza slouží jako zdroj energie pro všechny buňky lidského těla a účastní se vzájemné přeměny sacharidů, lipidů a proteinů. Jen mozek spotřebuje 120 g glukózy za den, což činí cca 50 % z celkové denní potřeby glukózy. Mozkové funkce jsou velmi vážně ohroženy, klesne-li hladina glykémie pod 2,2 mmol/l, pokud tento stav přetrvává, dochází k nevratnému poškození mozku a smrti. V případě nouze může mozek využít jako zdroj energie ketolátky (acetoacetát, hydroxybutyrát) [19-21]. Není-li glukóza okamžitě využita jako zdroj energie, je ukládána ve formě zásobního polysacharidu glykogenu nebo po přeměně na tuk ve formě zásobních triacylglycerolů. Jaterní glykogen je využíván při hladovění jako zdroj glukózy pro extrahepatální tkáň. Až 90 % glukózy v krevním oběhu je produktem štěpení glykogenu nebo pochází z biosyntetických reakcí z různých substrátů jako např. laktát, aminokyseliny a glycerol uvolněných z jiných tkání. Dále je jaterní tkáň zodpovědná za syntézu a sekreci lipoproteinů, které jsou využity tukovou a jinými tkáněmi jako zdroj cholesterolu a volných mastných kyselin. Během protražovaného hladovění jsou zdrojem energie tukové zásoby, které jsou mobilizovány lipolýzou a metabolizovány oxidací lipidů.

Kosterní sval významně ovlivňuje metabolismus glukózy uvolňováním aminokyselin, které slouží jako substrát pro jaterní glukoneogenezi. Zdrojem energie pro kosterní sval jsou glukóza, mastné kyseliny a ketolátky. Sval slouží také jako zásobárna glykogenu, malého množství mastných kyselin a významného množství bílkovin, které jsou mobilizovány v případě nouze. Hlavním místem pro uložení mastných kyselin ve formě triacylglycerolu je tuková tkáň. Triacylglycerol je syntetizován adipocyty z glycerolfosfátu a volných mastných kyselin. Glycerolfosfát je získáván z glykolýzy z důvodu chybění příslušné adipocytární kinázy, která by zabezpečila fosforylaci volného glycerolu. Glycerol a mastné kyseliny jsou uvolňovány do cirkulace pro případné využití játry při glukoneogenezi, kde slouží jako substráty.

Získání energie štěpením a oxidací glukózy na pyruvát a jiné meziprodukty vstupující jako substráty do dalších metabolických drah se nazývá glykolýza. Glykolýza může probíhat jak za aerobních tak za anaerobních podmínek. Při aerobním štěpení glukózy vzniká v první části glykolýzy, za enzymatického působení kináz, glukóza-6-fosfát, fruktóza-6-fosfát a fruktóza-1,6-bisfosfát. Tyto reakce jsou silně exergonické a nevratné. Přeměna glukózy na glukóza-6-fosfát (Glu-6-P) může být katalyzována 2 enzymy – glukokinázou a hexokinázou, které se liší v řadě vlastností. Glukokináza vykazuje vysokou specifitu nikoli však afinitu ke glukóze, vyskytuje se v játrech a β buňkách pankreatu, není inhibována Glu 6-P ale fruktóza-6-fosfátem a je zodpovědná za regulaci hladiny glukózy v krvi vlivem jejího využití játry. Naproti tomu hexokináza je zodpovědná za fosforylaci různých hexoz, vyskytuje se ve všech tkáních kromě jater a β buněk pankreatu, vykazuje vysokou afinitu pro glukózu, je inhibována Glu-6-P a je zodpovědná za dodávky glukózy jako energetického substrátu do tkání. Přeměna fruktóza-6-fosfátu na fruktóza-1,6-bisfosfát je nejpomalejší a hlavní regulační reakcí glykolýzy. Rozštěpením fruktóza-1,6-bisfosfát vzniká glyceraldehyd-3-fosfát, který je dále štěpen na pyruvát a dihydroxyaceton, ze kterého přes meziprodukt glyceraldehyd-3-fosfát vzniká rovněž pyruvát. Ten je následně transportován do mitochondrií, přeměněn na acetyl koenzym A (nebo oxalacetát) a odbourán na CO_2 a H_2O . Za anaerobních podmínek vzniká glykolytickou reakcí laktát. Celkový energetický výtěžek glykolýzy je 2 molekuly adenosintrifosfátu (ATP). Regulaci glykolýzy zajišťují 3 klíčové regulační enzymy, hexokináza, pyruvátkináza a hlavně fosfofruktokináza, jejichž syntézu zesiluje inzulín. Inzulín vede ke zvýšení rychlosti glykolytické dráhy a zvýšené využití glukózy. Regulace pyruvátkinázy probíhá kovalentní modifikací a uplatňuje se v hormonální regulaci metabolismu sacharidů glukagonem a adrenalinem. Aktivita fosfofruktokinázy je

regulována energetickým stavem buňky, kdy ATP, pyruvát a laktát působí inhibičně naopak AMP aktivačně [22].

Glukoneogeneze je opačnou reakcí glykolýzy a vyznačuje se syntézou glukózy z necukerných prekurzorů jako je např. laktát, glycerol, glukogenní aminokyseliny (alanin, glutamin) a 2-oxokyseliny (pyruvát, oxalacetát, 2-oxoglutarát) [23, 24]. Probíhá zejména v játrech a ledvinách (v menší míře také ve střevě) a jejím výsledkem je udržení přiměřené glykémie v případech, kdy je nedostatečný příjem glukózy potravou (hladovění). Glukoneogenetická dráha se skládá z 11 reakcí z čehož pouze 4 reakce jsou odlišné od glykolýzy. Ostatní reakce jsou obráceně běžícími reakcemi glykolýzy. Pokud je výchozím substrátem oxalacetát nebo glycerol, je glukoneogeneze lokalizována v cytoplasmě, vychází-li z jiných prekurzorů, je nejprve lokalizována v mitochondriích a následně v cytoplasmě. První 2 reakce glukoneogeneze obchází poslední reakci glykolýzy a přeměňují pyruvát nejprve na oxalacetát a následně na fosfoenolpyruvát (PEP) při katalýze pyruvátkarboxylázou a fosfoenolpyruvátkarboxykinázou. Další přeměny PEP jsou katalyzovány enzymy glykolýzy až do vzniku fruktóza-1,6-bisfosfátu, jehož přeměna na fruktóza-6-fosfát je katalyzována fruktóza-1,6-bisfosfatázou. Defosforylací glukóza-6-fosfátu za katalýzy glukóza-6-fosfatázy vzniká glukóza. Dalším substrátem pro glukoneogenezi je laktát, který vzniká ve svalech při zátěži a je také produkován erytrocyty. Laktát, který je uvolňován ze svalů do krevního oběhu, vstupuje do jater, kde je následně laktátdehydrogenázou převeden na pyruvát, který může být využit pro syntézu glukózy de novo. Glycerol, který vstupuje do jater (ev. ledvin) je účinkem glycerolkinázy převeden na glycerol-3-fosfát, ten je dále oxidován na dihydroxyacetonfosfát, který slouží jako meziprodukt glykolytické/glukoneogenetické dráhy. Glukogenní aminokyseliny poskytují při degradaci pyruvát nebo meziproducty citrátového cyklu, které se mohou přes oxalacetát zapojit do glukoneogenetické dráhy. Regulace glukoneogeneze je zprostředkována fosforylací klíčových regulačních enzymů, pyruvátkarboxylázy, fosfoenolpyruvátkarboxykinázy, fruktóza-1,6-bisfosfatázy, glukóza-6-fosfatázy [23, 24], která vede k jejich aktivaci za současného vyplavení hormonů glukagonu a adrenalinu. Inzulín, který je vyplaven do krevního oběhu při hyperglykémii, vede k defosforylací klíčových regulačních enzymů a tím k inhibici glukoneogeneze.

Glykogeneze je metabolická dráha probíhající v cytozolu za dostatečného přísunu energie, kdy energie je ukládána ve formě zásobního polysacharidu glykogenu. Nejvýznamnějším místem syntézy glykogenu jsou játra a svalová tkáň. Při poklesu hladiny glukózy v krvi nebo při intenzivní fyzické námaze může být energie dodávána štěpením glykogenu,

glykogenolýzou. Regulaci metabolismu glykogenu zajišťují regulační enzymy glykogenfosforyláza a glykogensyntáza a hormony inzulin, adrenalin a glukagon. Všechny tyto hormony interagují s receptory na membráně, čímž dochází k přenosu signálu do buňky a spuštění kaskády vedoucí k fosforylaci či defosforylaci enzymů.

2.3 Role lipidového metabolismu při rozvoji inzulinorezistence

V současné době se za základní příčinu vzniku inzulinové rezistence považuje nadměrný přísun volných mastných kyselin a ektopické ukládání lipidů ve tkáních. Fyziologicky působí volné mastné kyseliny (FFA) stimulačně na sekreci inzulinu a to synergicky s glukózou [25]. Při hladovění dochází k poklesu hladiny FFA a stimulačního efektu glukózy na β buňky, čímž dochází k poklesu sekrece inzulinu. Intenzita sekrece inzulinu a citlivost β buněk závisí na koncentraci glukózy a na koncentraci a typu FFA (nasyčené vs. nenasycené FFA). Krátkodobé zvýšení hladin FFA působí stimulačně na sekreci inzulinu. Při dlouhodobě přetrvávajících vysokých hladinách FFA dochází k hyperinzulinémii, jejíž intenzita je vyšší, než odpovídá hladině glukózy. Současně dochází k útlumu sekrece inzulinu stimulované glukózou a snižuje se exprese genu pro inzulin [26]. Počáteční hyperinzulinémie je kombinována s inzulinovou rezistencí, která vzniká ektopickým ukládáním FFA v jaterních, svalových a β buňkách pankreatu. Z výsledků klinických studií vyplývá, že triglyceridy uložené ve svalových buňkách jsou daleko silnějším prediktorem svalové inzulinorezistence, než cirkulující FFA [27]. Porušená citlivost buněk k inzulinu je způsobena tím, že FFA uvolněné z tukové tkáně nebo přijaté potravou vstupující do buněk nejsou oxidovány v mitochondriích, ale jejich aktivní forma je využita k syntéze triacylglycerolů. Intracelulárně zvýšené množství triacylglycerolů spolu se svými meziprodukty diacylglyceroly tlumí metabolismus glukózy a prohlubuje inzulinovou rezistenci [28]. Diacylglyceroly jsou signální meziprodukty stimulující aktivitu proteinkináz C, které fosforylují aminokyseliny serin a threonin v molekulách proteinů a tím ovlivňují intracelulární signalizaci. Výsledky experimentálních studií na hlodavcích, kteří měli alteraci v expresi lipidových transportních proteinů, ukazují na možnou spojitost mezi ektopickým ukládáním tuků a patogenezí inzulinové rezistence. Lipoproteinová lipáza (LpL) je klíčový enzym hydrolyzující cirkulující triglyceridy, které jsou transportovány do tkání pomocí specifických přenašečů mastných kyselin (FATPs) spolu s CD36. Nadměrná exprese LpL ve svalech podporuje příjem lipidů do svalové buňky a způsobuje svalovou inzulinovou rezistenci [29]. Naopak delece LpL [30] nebo jiných proteinů zahrnutých v transportu tuků včetně CD36 [31] nebo FATP1 [32] působí protektivně na rozvoj svalové inzulinorezistence u myši krměných vysokotukovou dietou.

Nadměrná exprese LpL způsobuje jaterní steatozu a inzulínovou rezistenci [29], naopak delece lipidových transportérů FATP2 [33] a FATP5 [34] zabraňuje vzniku hepatosteatozy a glukózové intolerance. Zvýšená akumulace lipidů v různých tkáních lidského organismu a s tím spojený rozvoj inzulínové rezistence je do jisté míry reverzibilní děj, který může být ovlivněn správnou dietní intervencí.

3. FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM TUKOVÉ TKÁNĚ V LIDSKÉM ORGANIZMU

V dnešní době je všeobecně akceptováno, že tuková tkáň není jen tepelným izolátorem, mechanickou ochranou proti nárazu nebo zásobárnou energie, ale je především největším endokrinním orgánem lidského těla, jehož hormonální působky mají velký význam v regulaci metabolismu sacharidů, lipidů i celkového energetického metabolismu (tabulka 1) [1-3]. Podle distribuce v lidském organismu je rozlišována podkožní a viscerální (nitrobřišní) tuková tkáň. Zmnožení viscerální tukové tkáně v organismu je označováno jako centrální (androidní obezita). Tento typ obezity je považován z hlediska kardiovaskulárních komplikací za rizikovější než nárůst subkutánní tukové tkáně v oblasti boků a hýždí (gynoidní obezita) [35-38].

Tuková tkáň je místem, kde z inaktivních prekurzorů vznikají aktivní hormony, například kortizol, který vzniká působením enzymu 11-OH-steroid dehydrogenázy typu 1 z inaktivního prekurzoru kortizonu [39]. Takto tvořený kortizol se portálním oběhem dostává přímo do jater, kde může zvyšovat glukoneogenezi a syntézu triglyceridů. Při nadměrné produkci kortizolu ve viscerální tukové tkáni obézních jedinců může vznikat jaterní inzulínová rezistence a diabetes mellitus 2. typu. Dále tuková tkáň slouží jako zdroj estrogenů (estron, estradiol) u postmenopauzálních žen [40]. U obézních žen, kde jsou hladiny estrogenů zvýšené, je větší riziko výskytu karcinomu prsu a endometria [41, 42].

Tuková tkáň může být také místem kumulace různých léčiv nebo jiných chemických polutantů lipofilního charakteru [43]. Příkladem takovýchto látek jsou organické pesticidy, polychlorované bifenyly, dioxiny a dibenzofurany, polybromované zpomalovače hoření a další nezařazené polutanty, které mohou ovlivňovat metabolické pochody v tukové tkáni. Předpokládá se, že při masivní redukci tělesné hmotnosti a snížení obsahu tělesného tuku, může dojít k vyplavení těchto toxických látek a ovlivnění systémových metabolických pochodů v lidském organismu [44, 45].

3.1 Složení tukové tkáně a buňky produkující hormony

Z hlediska morfologie se tuková tkáň dělí na bílou, hnědou a v poslední době objevenou béžovou tukovou tkáň. Bílá a hnědá tuková tkáň vykazují v energetickém metabolismu zcela rozdílnou roli. Bílá tuková tkáň slouží jako zásobárna energie, zatímco hnědá tuková tkáň je termogenním orgánem [46], který významně ovlivňuje tělesnou teplotu a energetický výdej [47]. Tuková tkáň je pouze z jedné třetiny tvořena diferencovanými adipocyty (bílé a hnědé), další dvě třetiny jsou tvořeny kombinací kapilární sítě, nervových vláken, endoteliálních buněk, imunokompetentních buněk, makrofágů, fibroblastů a preadipocytů [48]. Složení tukové tkáně kolísá v závislosti na změnách nutričního stavu. Dochází ke změnám obsahu triglyceridů v adipocytech, což mění jejich velikost a metabolické vlastnosti zejména citlivost na účinky inzulínu. Inzulínová senzitivita je nižší u obézních jedinců, kteří mají velké adipocyty produkující řadu prozánětlivých cytokinů, než u jedinců štíhlých [49].

Bílé adipocyty jsou sférické o průměru 50 až 150 μm . Jejich vnitřní prostor je vyplněn tukovými kapénkami obsahující zásobní triglyceridy, jádrem a malým množstvím cytoplazmy. Bílá tuková tkáň se v lidském těle vyvíjí již v prenatálním období [50], ovšem k adipocytární diferenciaci dochází až postnatálně [51]. Z hlediska lokalizace jsou nejdůležitější dvě bílá depa tukové tkáně, každé se svými jedinečnými anatomickými, metabolickými, endokrinními, parakrinními a autokrinními vlastnostmi. Jedná se o viscerální (intra-abdominální) a subkutánní tukovou tkáň [48]. Viscerální tuková tkáň vykazuje vyšší metabolickou aktivitu (lipolýza, lipogeneze). Volné mastné kyseliny vznikající lipolýzou jsou dopravovány portálním oběhem přímo do jater. Při nadměrné produkci volných mastných kyselin viscerální tukovou tkání u obezity vede jejich nadměrné uvolňování do jater ke zvýšené syntéze lipidů, glukoneogenezi a inzulínové rezistenci. Výsledkem tohoto negativního metabolického procesu je hyperlipidémie, porušená glukózová tolerance až diabetes mellitus 2. typu, arteriální hypertenze a ateroskleróza [52]. Zvýšení volných mastných kyselin komplexními mechanismy snižuje vychytávání glukózy svaly a vede k periferní inzulínové rezistenci [53]. Vzhledem k tomu, že pouze malá část z celkového tělesného tuku, (15 % - 18 % u mužů a 7 % - 8 % u žen) leží v nitrobřišní dutině, podílí se viscerální tuková tkáň pouze 15 % na celkových cirkulujících hladinách volných mastných kyselin, majoritní podíl má tedy podkožní tuková tkáň [53, 54].

Kromě subkutánní a viscerální oblasti je bílá tuková tkáň lokalizována kolem některých orgánů (srdce, ledviny, genitálie) [48]. V současné době je intenzivně zkoumána funkce epikardiální tukové tkáně, která obklopuje srdeční sval. Nedávné studie provedené u pacientů s aterosklerózou prokázaly, že epikardiální tuková tkáň vykazuje vyšší metabolickou aktivitu

než vlastní nitrobřišní viscerální tkáň a její množství pozitivně koreluje s metabolickými riziky [55, 56].

Hnědé adipocyty jsou menší než bílé adipocyty, mají kulatý nebo polygonální tvar a lipidy jsou v těchto buňkách uloženy ve formě několika malých, „multilokulárních“ inkluzí [57-59]. Jádro je uloženo centrálně a v cytoplazmě je velké množství mitochondrií s bohatě vyvinutými kristami. Právě velké množství mitochondrií je příčinou hnědého zbarvení těchto buněk. Hnědá tuková tkáň byla poprvé objevena v interskapulární oblasti u svišťů roku 1551 švýcarským přírodovědcem Konradem Gessnerem. Na počátku 20. století byla prokázána přítomnost hnědé tukové tkáně i u lidí [60]. Hnědá tuková tkáň se začíná vyvíjet u plodu již ve 20. týdnu intrauterinního vývoje a tento vývoj pokračuje až do doby krátce po porodu. Hnědá tuková tkáň tvoří až 1 % z celkové tělesné hmotnosti novorozence [47, 61, 62] a je lokalizovaná v interskapulární oblasti, okolo krevních cév, krčních svalů a v podpaží. Dále můžeme hnědý tuk nalézt podél velkých cév, průdušnice, podél jícnu, kolem břišní aorty, slinivky, nadledvin a ledvin [62-64]. V průběhu vývoje lidského organismu dochází k morfologické přeměně, hnědých adipocytů, kdy vlivem akumulace lipidů se z nich stávají unilokulární bílé adipocyty [65, 66]. Ačkoliv vědci dlouho pochybovali o přítomnosti hnědé tukové tkáně u dospělých lidí, nedávné použití pozitronové emisní tomografie prokázalo přítomnost aktivní hnědé tukové tkáně u dospělých jedinců [67]. Nakolik mají tyto spíše nečetné hnědé adipocyty fyziologický či patofyziologický význam při regulaci tělesné teploty a energetické homeostázy je ovšem nejasné. Z výsledků experimentálních studií vyplývá, že pokud je hnědá tuková tkáň termogenně aktivována, produkuje celou řadu faktorů podle některých autorů nazývané „batokiny“ [68, 69]. Tyto faktory mají odlišnou a často opačnou funkci než faktory uvolňované z bílé tukové tkáně.

Běžové adipocyty vznikají ze stejné kmenové buňky jako bílé adipocyty. Z výsledků studií vyplývá, že vlastností většiny bílých adipocytů je schopnost transdiferenciace na buňky běžové [70, 71]. Běžové adipocyty mají velmi nízkou bazální expresi uncoupling proteinu 1 (UCP1), ale mohou velmi silně odpovídat na cAMP aktivací termogenního programu stejně jako hnědé adipocyty. Pokud příjem energie převyší energetický výdej, přebytek energie může být uložen ve formě lipidů a běžový tuk se morfologicky podobá bílému. Běžové adipocyty mohou být stimulovány řadou faktorů, mezi které patří chlad, stimulace sympatiku, thiazolidindiony (TZDs) a některé hormony (včetně nedávno objeveného polypeptidu Irisinu), které způsobí zvýšení energetického výdeje [72]. Z pohledu klinické medicíny je však nutné zdůraznit, že převážná většina výše uvedených poznatků byla získána v experimentálních studiích a jejich význam u lidí nelze považovat za prokázaný.

Tabulka 1: Přehled nejdůležitějších faktorů produkovaných tukovou tkání a jejich funkce v organizmu

Skupina faktorů	Název faktoru	Funkce v organizmu, vztah k metablickým
Cytokiny	TNF- α	Regulace zánětu, snížení inzulínové senzitivity
	Interleukin-1, -6, -10, -18	Regulace zánětu, modulace inzulínové senzitivity
	MCP-1	Regulace migrace a infiltrace monocytů/makrofágů
	Resistin	Snížení inzulínové senzitivity, účast v regulaci zánětu
	Progranulin	Pozitivní korelace s inzulínovou rezistencí, DM 2.typu a
Adipokiny	Leptin	Regulace energetické homeostázy
	Adiponektin	Antiaterogenní účinky, zvýšení inzulínové senzitivity
	Visfatin	Inzulín-mimetický efekt
	Retinol-binding protein 4	Regulace intracelulárního transportu mastných kyselin, ovlivnění zánětu a inzulínové senzitivity
	Apelin	Ovlivnění chuti k jídlu, inhibice sekrece inzulínu v pankreatu po podání glukózy
	Omentin	Zvýšení inzulínové senzitivity, ovlivnění homeostázy pozitivní korelace s adiponektinem
	Lipocalin 2	Regulace lipidového metabolismu a inzulínové senzitivity
Hemostatické faktory	PAI-1	Protrombogenní účinky
	Tkáňový faktor	Protrombogenní účinky
Enzymy	Lipoproteinová lipáza	Regulace lipidového metabolismu
	Adipsin	Stimulace glukózového transportu, inhibice lipolýzy
	Dipeptidylpeptidáza 4	Ovlivnění metabolismu glukózy, degradace inkretinů
Cytoadhezivní	VCAM-1	Rozvoj aterosklerózy
	ICAM-1	Rozvoj aterosklerózy
Komponenty R-A-A systému	Renin	Regulace krevního tlaku
	Angiotenzinogen	Regulace krevního tlaku
	Angiotenzin I, II	Regulace krevního tlaku
Růstové faktory	FGF 21	Regulace inzulínové senzitivity, metabolismu, adaptace na hladovění
	TGF- β	Regulace glukózového a energetického metabolismu, ovlivnění rozvoje diabetické nefropatie
	CNTF	Regulace příjmu potravy
	MCSF	Rozvoj aterosklerózy

3.2 Hormony tukové tkáně

Tuková tkáň jako endokrinní orgán je zodpovědná za produkci celé řady faktorů, přičemž obecně převažují působky s metabolicky negativními a prozánětlivými účinky. Pokud jsou tyto působky secernovány v abnormálním množství, indukují metabolické, hemodynamické a hemostatické poruchy [73]. Produkce adipokinů je úměrná velikosti a lokalizaci tukové tkáně (viscerální, subkutánní) a ovlivňuje glukózový a lipidový metabolismus (např. adiponektin, resistin), zánět (TNF- α , IL-6), koagulaci (PAI-1), krevní tlak

(např. angiotenzinogen, angiotenzin II) a příjem potravy (leptin) [74-76] (viz tabulka 1). Aktivní působky nejsou secernovány pouze adipocyty, ale i dalšími buňkami přítomnými v tukové tkáni jako jsou preadipocyty, makrofágy, imunokompetentní buňky a další.

Leptin (z řeckého leptos – tenký, štíhlý) je proteinový hormon produkovaný adipocyty, který byl poprvé popsán roku 1994 v experimentální práci provedené na morbidně obézních *ob/ob* myších [77], jejichž obezita je důsledkem mutace leptinového genu vedoucí k tvorbě nefunkčního leptinu. V krevním oběhu cirkuluje leptin z větší části vázaný na solubilní leptinový receptor a jako signální faktor ovlivňuje centrální nervový systém (hypothalamus), což má za následek regulaci energetického příjmu a výdeje. Leptin tak představuje cirkulující hormonální signál, který informuje hypotalamické centrum sytosti o stavu tukových zásob organismu. Vztah mezi mRNA expresí, cirkulujícími hladinami leptinu a množstvím tělesného tuku je zřejmý. Cirkulující hladiny leptinu jsou zvýšeny u obézních a sníženy u štíhlých jedinců. Koncentrace leptinu jsou vyšší u žen než u mužů a korelují s BMI [78]. Rozdíly v hladinách leptinu u mužů a žen souvisejí s rozdílnou distribucí tukových dep a působením pohlavních hormonů na leptinovou regulaci [79]. Exprese mRNA pro leptin je vyšší v subkutánní v porovnání s viscerální tukovou tkání, což může být vysvětleno větší velikostí adipocytů subkutánní tukové tkáně [80]. Množství a rozložení tukové tkáně, velikost adipocytů, nutriční a hormonální faktory ovlivňují sekreci leptinu. Cirkulující hladiny leptinu se zvyšují o 40 % po jídle a snižují jako odpověď na hladovění. U malnutričních stavů, kdy dochází ke snížení hladin leptinu, nastupuje jeho regulační vliv vedoucí k šetření energie a umožňující přežití při sníženém energetickém příjmu [81]. Leptin nemá jen regulační vliv na energetickou homeostázu a příjem potravy, ale patologické zvýšení jeho cirkulujících hladin hraje důležitou roli při vzniku inzulinové rezistence a arteriální hypertenze. Patofyziologická role leptinu při vzniku inzulinové rezistence je intenzivně zkoumána jak u lidí, tak na leptin deficientních *ob/ob* myších trpících morbidní obezitou, hyperfagií, inzulinorezistencí, infertilitou a hyperkortizolémií. Ukázalo se, že tento patologický stav může být v případě *ob/ob* myši zcela normalizován podáváním rekombinantního leptinu [82]. Podávání rekombinantního leptinu u lidí trpících obezitou a inzulinorezistencí se zvýšenými hladinami leptinu, nepřineslo očekávané výsledky, což je pravděpodobně způsobeno rezistencí na účinky leptinu. Druhá možnost je, že leptin je určen ke zpětnovazebné regulaci a ochraně organismu při malnutričních stavech, kdy spouští procesy vedoucí k šetření energie. Z hlediska dlouhodobé historie lidstva totiž silný zpětnovazebný signál bránící přejídání a obezitě nebyl s výjimkou posledních několika desítek let potřebný.

Adiponektin je protein produkovaný převážně adipocyty bílé tukové tkáně [83]. Cirkulující hladiny adiponektinu jsou až tisíckrát vyšší než koncentrace leptinu nebo inzulinu. Adiponektin navíc v krevním oběhu cirkuluje v různých izoformách a má tendenci tvořit multimery, které mají různou afinitu a aktivitu v různých tkáních [84]. Adiponektin hraje významnou roli v energetické homeostáze a inzulinové senzitivitě a na rozdíl od ostatních adipokinů jsou jeho hladiny sníženy u obezity, inzulinorezistence, diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémie a kardiovaskulárních chorob. Zvýšená hladina adiponektinu je spojena s vyšší hladinou HDL cholesterolu a sníženou hladinou triglyceridů nezávisle na inzulinové senzitivitě a obezitě. Adiponektin negativně koreluje s CRP a fibrinogenem, což prokazuje jeho protizánětlivé a antiaterogenní účinky. Dále inhibuje adhezi monocytů k cévní stěně, změnu makrofágů na pěnové buňky [85] a produkci TNF- α . Hladiny adiponektinu stoupají po redukci hmotnosti a vyšší hladiny nacházíme u štíhlých jedinců, sportovců nebo malnutričních pacientů [86]. Studie provedená u bělochů a Pima indiánů potvrdila spojitost hypoadiponektinémie s obezitou a DM 2. typu, kdy koncentrace adiponektinu korelovala více s inzulinovou senzitivitou a hladinou inzulinu na lačno než s obsahem tělesného tuku a glykemií [87]. Doposud není zcela objasněno, zda má snížení hladin adiponektinu etiopatogenetický vztah ke vzniku diabetu 2. typu, inzulinorezistence a aterosklerózy nebo zda je pouze markerem rozvoje těchto chorob. Experimentální podávání adiponektinu tyto patologické stavy částečně upravuje. V současné době jedna ze skupin perorálních antidiabetik, thiazolidindiony, hladiny adiponektinu významně zvyšuje, což může částečně vysvětlovat jejich antidiabetické účinky [88].

Resistin je polypeptid, exprimovaný a secernovaný tukovou tkání u obézních jedinců. Předpokládá se, že u lidí je produkován imunokompetentními buňkami a u hlodavců zralými adipocyty. Byl objeven v roce 2001 jako jeden z faktorů, které byly významně sníženy po podání thiazolidindionů. Hladiny i lokální produkce jsou výrazně zvýšeny u pacientů s akutním (např. kriticky nemocní pacienti) [89] nebo chronickým zánětem (např. revmatoidní artritida) [90].

Visfatin je adipokin objevený roku 2004 [91], jehož název vyplývá z předpokládaného místa jeho produkce a sekrece ve viscerální tukové tkáni. Dále byla jeho exprese prokázána v lidských i zvířecích hepatocytech a svalech [92, 93], ledvinách a srdci [94-96]. Tento proteinový hormon má molekulární hmotnost 52 KDa a jeho gen je kódován 491 aminokyselinami. Visfatin je identický s pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF) popsáným v roce 1994, jako cytokin produkovaný lymfocyty a podílející se na zrání

lymfocytů a regulaci zánětu. Makrofágy infiltrující tukovou tkáň v odpovědi na zánětlivý podnět produkují visfatin ve větší míře než adipocyty [97, 98]. Předpokládá se, že visfatin má endokrinní, parakrinní a autokrinní funkci, přičemž autokrinní účinek hraje důležitou roli v regulaci inzulínové senzitivity v játrech [95]. Výsledky několika studií prokázaly možné zapojení visfatinu v regulaci glukózového metabolismu, ovlivnění DM 2. typu, inzulínové sekrece a senzitivity. Další funkcí visfatinu je podpora diferenciací adipocytů a ovlivnění lipogeneze ve viscerální tukové tkáni, čímž dochází ke zvětšení kapacity adipocytů pro ukládání lipidů a tím ke zvýšení inzulínové senzitivity.

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) je cytokin, který byl původně popsán jako endotoxinem indukovaný faktor způsobující nekrózu nádorů. Následně se ukázalo, že je identický s cachexinem, který je *in vitro* produkovan makrofágy. TNF- α je transmembránový protein o velikosti 26 kDa, který je štěpen na 17 kDa biologicky aktivní protein, jenž se váže na TNF- α receptory typu I a II. TNF- α je v tukové tkáni exprimován adipocyty a stromavaskulárními buňkami [99]. Oba receptory TNF- α jsou exprimovány ve formě vázané na membránu nebo v rozpustné formě výhradně adipocyty [100]. Expres TNF- α je vyšší v podkožní ve srovnání s viscerální tukovou tkání a závisí na celkovém nebo lokálním množství tuku [79, 99]. Ačkoliv se z počátku předpokládala jeho možná role v rozvoji kachexie, nyní se ukazuje rovněž jistá spojitost s obezitou a inzulínorezistencí. Expres TNF- α je zvýšená u obézních hlodavců i lidí a pozitivně koreluje s obsahem tukové tkáně v organizmu a inzulínovou rezistencí [100-102]. Dlouhodobé podávání TNF- α indukuje inzulínovou rezistenci *in vitro* i *in vivo*, naopak inaktivace TNF- α receptorů zlepšuje inzulínovou senzitivitu u hlodavců nikoli však u lidí [100]. Stejný výsledek měl u hlodavců i knockout genu pro TNF- α nebo jeho receptorů. Ačkoliv TNF- α ovlivňuje mnoho metabolických procesů, přímé endokrinní účinky mohou být méně významné než účinky vyplývající z autokrinní nebo parakrinní modulace nenasycených mastných kyselin nebo jiných hormonů produkovaných tukovou tkání.

Interleukin 6 (IL-6) je další cytokin spojený s obezitou a inzulínovou rezistencí [103]. Cirkuluje v oběhu ve více glykosylovaných formách o velikosti 22 až 27 kDa. Receptor pro interleukin 6 (IL-6R) je homologní k leptinovému receptoru a oba se vyskytují jako 80 kDa membránově vázané a přibližně 50 kDa solubilní formy. IL-6 i jeho receptor jsou exprimovány adipocyty a v matrix tukové tkáně [99]. Expres a sekrece je 2-3 krát vyšší ve viscerální v porovnání se subkutánní tukovou tkání [79, 99]. Na rozdíl od TNF- α cirkuluje interleukin 6 v krevním oběhu ve vysokých koncentracích. Expres i cirkulující hladiny IL-6

pozitivně korelují s obezitou, zhoršenou glukózovou tolerancí a inzulínovou rezistencí a jsou úměrně sníženy při váhovém úbytku [103]. V souvislosti s tímto zjištěním se hovoří o IL-6 jako o možném predikčním faktoru rozvoje diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění [103]. Genetické polymorfizmy v genovém lokusu pro interleukin 6 byly spojeny s obezitou, energetickým výdejem, inzulínovou senzitivitou a DM 2. typu [103]. Periferní podání IL-6 způsobuje hyperlipidémii, hyperglykémii a inzulínovou rezistenci u hlodavců i lidí [103]. Dále negativně ovlivňuje inzulínovou signalizaci v periferních tkáních [104], inhibuje adipogenezi a snižuje sekreci adiponektinu [103].

3.3 Imunokompetentní buňky v tukové tkáni a jejich endokrinní funkce

Imunokompetentní buňky jsou po adipocytech druhou nejvíce zastoupenou buněčnou populací v tukové tkáni, která přispívá k udržení její homeostázy. Obezita spolu s nutričním stavem organismu ovlivňuje množství a funkci imunokompetentních buněk a přispívá ke vzniku lokální (subklinické) a později systémové zánětlivé reakci organismu, která souvisí s rozvojem DM 2. typu, arteriální hypertenze a ischemické choroby srdeční. Subklinický zánět je charakterizován pouze mírným zvýšením cirkulujících prozánětlivých faktorů a absencí celkových klinických příznaků zánětu [105]. Imunokompetentní buňky v tukové tkáni jsou rozděleny do dvou velkých skupin – na buňky vrozené imunity (makrofágy, neutrofil, eosinofil, žírné buňky) a získané imunity (subtypy T a B lymfocytů). Mimoto jeden z podtypů lymfocytů - NKT buňky se podílejí na regulaci zánětu v tukové tkáni u obézních jedinců. Makrofágy přítomné v tukové tkáni se podílejí na odklizení buněčné debris z apoptotických buněk, regulaci angiogeneze a remodelaci extracelulární matrix [106]. Zatímco makrofágy tvoří 10-15 % z celkového počtu stromavaskulárních buněk v tukové tkáni štíhlých jedinců, u obézních jedinců je jejich počet významně zvýšen na 40-50 % [107]. Monocyty jsou diferencovány na M1 (klasicky aktivované) a M2 (alternativně aktivované) makrofágy, které se liší mírou pro- a protizánětlivého účinku. V tukové tkáni štíhlých jedinců převažují M2 makrofágy, které exprimují ve zvýšené míře arginasa-1, CD206 (mannosový receptor), CD301 a produkují protizánětlivé cytokiny – IL-10 a IL-1. Th2 typy cytokinů jako jsou IL-4, IL-10 a IL-13 stimulují polarizaci na M2 makrofágy [106, 108]. Naopak u obézních jedinců interferon gama (IFN γ) a lipopolysacharid (LPS) řídí polarizaci klasicky aktivovaných M1 makrofágů a podporují produkci prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 a MCP-1 [109, 110]. Klíčovým znakem M1 makrofágů je povrchová exprese proteinu CD11c spolu se specifickým makrofágovým znakem F4/80 a CD11b. Hlavním zdrojem populace M1 makrofágů infiltrujících tukovou tkáň jsou monocyty

z krevního oběhu [111]. Obezitou indukovaná infiltrace tukové tkáně makrofágy je způsobena interakcí CCR2 a MCP-1 a přispívá k rozvoji subklinické zánětlivé reakce [112] a inzulínové rezistence. Pozitivní korelace s BMI byla také nalezena u CD11c⁺ CD1c⁺ dendritických buněk přítomných v tukové tkáni. Výsledky studie prokázaly, že dieta s vysokým obsahem tuku zvyšuje obsah dendritických buněk v tukové tkáni u myši a je zvýšená exprese antigenů dendritických buněk (CD1c, CD11c, CD83) v subkutánní tukové tkáni u obézních v porovnání se štíhlými jedinci [113]. V tukové tkáni obézních lidí i myši byl nalezen významně zvýšený počet žírných buněk [114] produkujících široké spektrum zánětlivých mediátorů (histamin, heparin), lipidových mediátorů (PGE₂, LTB₄), proteáz (chymáza, tryptáza) a pro- i protizánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-4, IL-10) [115]. Výsledky experimentálních studií ukazují, že myši s deficiencí žírných buněk nebo léčené stabilizátorem granulace žírných buněk (kromoglykát sodný) nevykazují téměř žádnou infiltraci tukové tkáně makrofágy, inzulínorezistenci a mají nižší hmotnost při dietou indukované obezitě [114]. Zdá se, že žírné buňky neovlivňují inzulínorezistenci přímou regulací zánětu v tukové tkáni, ale nepřímou ovlivněním tělesné hmotnosti a obsahu tělesného tuku.

Dalšími zástupci ze skupiny imunokompetentních buněk vyskytujících se v tukové tkáni a podporující vznik zánětlivé reakce jsou neutrofilové. Obézní jedinci vykazují významné zvýšení jak u proteinů odvozených od neutrofilů (myeloperoxidáza, kalprotektin), tak u markerů neutrofilové aktivace (CD66b) [116]. Studie provedená na myších krátkodobě (3 dny) krmených dietou s vysokým obsahem tuku prokázala zvýšenou infiltraci tukové tkáně neutrofilů [117], což svědčí o prozánětlivém účinku v raném stadiu obezity. Naopak protizánětlivé účinky v tukové tkáni prokazují eozinofily, které jsou zodpovědné za expresi IL-4 a zvýšenou polarizaci M2 makrofágů vlivem sekrece Th2 typů cytokinů (IL-4, IL-13) [118]. Výsledky studií provedených na eosinofil-deficientních myších prokázaly zvýšený obsah tukové tkáně spolu se zvýšenou zánětlivou reakcí a glukózovou intolerancí.

4. DIFERENCIACE ADIPOCYTŮ V TUKOVÉ TKÁNI

Diferenciace adipocytů je vysoce kontrolovaný proces, který je intenzivně studován již 25 let. V současné době lze díky *in vitro* experimentálním modelům buněčných kultur určovat základní mechanismy zahrnující adipocytární proliferaci, diferenciaci a sekreci adipokinů. K tomu je s úspěchem využíváno preadipocytárních a adipocytárních buněčných linií a linií multipotentních kmenových buněk schopných diferenciace na tukové, svalové a kostní buňky. K diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk do adipocytárních linií včetně koordinace

složité sítě transkripčních faktorů, kofaktorů a signálních meziproduktů velkého množství metabolických drah přispívá celá řada rozdílných událostí. Nové tukové buňky vznikají jak z preexistující populace nediferencovaných progenitorových buněk, tak dediferenciací adipocytů na preadipocyty, které pak proliferují a rediferencují do zralých adipocytů. V obou případech hraje vznik nových tukových buněk klíčovou roli v rozvoji obezity. Analýza adipocytárního obratu pomocí značení uhlíkem C14 ukázala, že adipocyty jsou dynamickou a vysoce regulovanou buněčnou populací. Nové adipocyty vznikají konstantně jako náhrada zaniklých adipocytů a každých 8 let je nahrazeno přibližně 50 % adipocytů lidské subkutánní tukové tkáně [119]. Adipogeneze je vícestupňový proces zahrnující kaskádu transkripčních faktorů a proteinů buněčného cyklu, regulujících genovou expresi a vedoucí k vývoji adipocytů. Několik pozitivních a negativních regulátorů této sítě bylo objeveno teprve v nedávné době [120].

4.1. Stupně adipocytární diferenciaci

V současné době jsou popsány 2 základní fáze adipogeneze: determinační fáze a terminální diferenciacní fáze.

Determinační fáze je stádium adipogeneze, kdy kmenové buňky konvertují na preadipocyty, které nelze morfologicky odlišit od prekurzorových buněk, ale které konverzí ztratily schopnost diferenciaci na jiné buněčné typy. V terminální fázi diferenciaci získávají preadipocyty znaky zralých adipocytů včetně funkcí nezbytných pro lipidový transport, působení inzulínu a sekreci specifických adipocytárních proteinů. Molekulární regulace terminálního stadia diferenciaci je lépe charakterizována než u determinační fáze a to hlavně díky využití buněčných linií, které mají omezenou schopnost diferencovat na jiné typy buněk. Některé preadipocytární modely jako jsou myší buněčné linie 3T3-L1, 3T3-F442A potřebují jeden nebo dva cykly buněčného dělení před diferenciací, zatímco myší C3H10T1/2 a lidské preadipocyty nikoli. Mitotická klonální expanze (MCE) je proces probíhající pod vlivem specifických růstových faktorů a hormonů, který je nezbytný pro terminální adipocytární diferenciaci. Ve skutečnosti zablokování vstupu 3T3-L1 buněk do S fáze v době MCE zcela inhibuje program adipocytární konverze [121]. Tyto procesy závislé na komplexní koordinaci kaskády proteinů buněčného cyklu jako je např. E2F a retinoblastomový protein, jsou nezbytné pro terminální diferenciaci preadipocytů [122, 123]. Nezbytné rozvolnění DNA při mitoze, umožňuje přístup transkripčních faktorů k regulačním úsekům DNA a tím prezentaci genů účastnících se procesu diferenciaci adipocytů [124]. Proces diferenciaci adipocytů může být velmi dobře studován použitím buněčných kultur a preadipocytárních kultur, které mohou

být ovlivňovány hormonálními koktejly obsahující inzulín, dexametazon a 3-isobutyl-1-methylxanthin. 3T3-L1 a 3T3-F422A preadipocyty mohou diferencovat na zralé adipocyty exprimující specifické adipocytární geny a akumulující triacylglycerolové kapénky [124]. Diferenciace vyžaduje aktivaci řady transkripčních faktorů, které jsou zodpovědné za aktivaci a deaktivaci více než 2000 genů ovlivňující morfologii a fyziologii adipocytu [125].

4.2. Jaderná regulace adipocytární diferenciace

Terminální adipocytární diferenciace zahrnuje celou řadu transkripčních procesů. V první řadě dochází při adipogenezi k přechodné a dramatické indukci C/EBP- β a C/EBP- δ , která je *in vitro* stimulovaná hormonálním koktejlem [126]. C/EBP- β a C/EBP- δ se začnou hromadit během 24 hodin adipogenní indukce a buňky opakovaně vstupují do buněčného cyklu a vykonávají synchronně MCE [121]. Při přechodu z G1 do S fáze je C/EBP- β hyperfosforylován a sekvenčně aktivován za přispění glykogenové syntázy kinázy-3 β a mitogenem aktivované kinázy (MAPK). Následně C/EBP- β a C/EBP- δ indukují přímo expresi PPAR- γ a C/EBP- α , které jsou klíčovými transkripčními regulátory adipocytární diferenciace [127]. 2. den diferenciačního cyklu je akumulován protein C/EBP- α a následně fosforylován cyklinem D3 při navození proliferačního inhibičního účinku na buňky, které umožňují nástup konečné fáze diferenciace adipogeneze [128]. 8. den po zahájení procesu diferenciace je již více než 90 % adipocytů zralých [129]. C/EBP- α indukuje velké množství adipocytárních genů přímo a v *in vivo* studiích hraje důležitou roli v rozvoji tukové tkáně. Předpokládá se, že PPAR- γ , člen rodiny jaderných receptorů, hraje významnou roli v diferenciaci bílé ale i hnědé tukové tkáně [130]. Ektopická exprese C/EBP- α ve fibroblastech může indukovat adipogenezi pouze za přítomnosti PPAR- γ [131]. Účinek PPAR- γ je zprostředkován dvěma izoformami: PPAR- γ 1 a PPAR- γ 2. PPAR- γ 1 je na rozdíl od PPAR- γ 2 konstitutivně exprimován v tukové tkáni. Exprese těchto 2 izoform je řízena specifickým promotorem, který je určující pro odlišnou tkáňově specifickou expresi a regulaci [132]. Obě tyto izoformy jsou silně indukovány během preadipocytární diferenciace *in vitro* a jsou silně exprimovány v tukové tkáni zvířat. PPAR- γ 1 je produkován dříve než PPAR- γ 2 a je udržován ve vysokých hladinách během diferenciace adipocytů [133]. PPAR- γ je také velmi důležitý pro udržení diferencovaného stavu adipocytu. Vložení adenovirového dominantně-negativního PPAR- γ do zralých 3T3-L1 adipocytů, způsobí dediferenciaci adipocytů se ztrátou lipidové akumulace a snížení exprese adipocytárních markerů [134].

Dalšími faktory ovlivňujícími proces diferenciace adipocytů jsou Kruppel-like faktory (KLF), které jsou součástí rozsáhlé rodiny C2H2 proteinů s motivem zinkového prstu regulujících buněčnou apoptozu, proliferaci a diferenciaci. Rozsah KLF genů, které jsou exprimovány

v tukové tkáni, variabilita jejich expresních vzorů během diferenciaci a jejich účinek na vývoj a genovou expresi adipocytů indikuje, že kaskáda KLF je funkční během adipogeneze. Pro tento fakt svědčí např. KLF15, který podporuje diferenciaci adipocytů [135] a indukuje expresi inzulínem regulovaného glukózového transporteru GLUT-4, [136], KLF5 je indukován C/EBP- β a C/EBP- δ během časné fáze adipocytární diferenciaci a aktivuje Pparg2 promoter fungující spolu s C/EBPs. Dále KLF6 zabraňuje expresi Preadipocytárního faktoru-1 (Pref-1) v 3T3-L1 buňkách a fibroblastech. Ačkoliv nadměrná exprese KLF6 sama o sobě nedostačuje k tomu, aby podporovala adipocytární diferenciaci, buňky se sníženým množstvím KLF6 vykazují sníženou adipogenezi [137]. KLF2 a KLF7 jsou antiadipogenními faktory, KLF 2 potlačuje Pparg2 promoter [138-140].

Sterolový regulační element vázající transkripční faktor 1 (SREBP1c) byl identifikován jako proadipogenní transkripční faktor, který indukuje expresi PPAR- γ a může generovat dosud neznámý ligand PPAR- γ [141, 142]. SREBP1c také zprostředkovává biosyntézu lipidů prostřednictvím inzulínu v adipocytech zvýšením genové exprese hlavních lipogenních genů jako jsou fatty acid synthasa a acetyl-CoA-carboxyláza [143]. Exprese CREB v 3T3-L1 preadipocytech je nezbytná pro zahájení adipogeneze, zatímco potlačení exprese CREB adipogenezi zabraňuje [144, 145].

Mnoho transkripčních faktorů jako jsou např. rodina transkripčních faktorů schopných vázat DNA sekvence GATA, Forkhead Box O1 (FOXO1) a Forkhead Box A2 (FOXA2) adipogenezi potlačují. GATA2 a GATA3 jsou exprimovány v preadipocytech a downregulovány během terminálního stadia zrání [146]. Vynucená exprese GATA2 snižuje adipogenezi a GATA2 deficientní embryonální kmenové buňky vykazují zvýšený adipogenní potenciál. Exprese GATA2 a GATA3 oslabuje adipocytární diferenciaci a udržuje buňky v preadipocytárním stavu. Tyto inhibiční účinky na adipogenezi mohou být zprostředkovány redukcí PPAR- γ promotorové aktivity.

4.2.1. Transkripční kofaktory v adipogenezi

Jaderné kofaktory nejsou vázány na DNA přímo, ale podílejí se na formaci koaktivátorů nebo korepresorů, které se účastní spolu s transkripčními faktory transkripce. Některé kofaktory modifikují přímo chromatin jako např. histonové acetyltransferázy (HATs) a ATP dependentní chromatin remodelující proteiny SWI/SNF rodiny, zatímco jiné kofaktory nemají enzymatickou aktivitu, která je nutná pro vznik chromatinových modifikátorů. TRAP220 (PPAR-binding protein) je vazebným partnerem PPAR- γ a jeho nepřítomnost v proteinu zabraňuje adipogenezi [147], stejně jako absence koaktivátoru PPAR-interacting protein [148].

Komplex cyklin D3-cyclin-dependentní kináza (CDK6) váže fosforylovaný PPAR- γ a vede k jeho zvýšení transkripční aktivity, která podporuje adipogenezi [149]. Naopak cyklin D1 potlačuje aktivitu PPAR- γ a inhibuje diferenciaci adipocytů [150]. Transkripční koaktivátor TAZ potlačuje aktivitu PPAR- γ v adipocytech a aktivuje RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) v osteoblastech [151].

4.3. Mimojaderná regulace adipocytární diferenciace

Adipogeneze může být ovlivněna pozitivním nebo negativním způsobem hormony, cytokiny, růstovými faktory a farmakologickými substancemi.

4.3.1. Adipogenní faktory

Je známo, že inzulín, IGF-1 (insulin-like growth factor-1), hormony štítné žlázy, glukokortikoidy, mineralokortikoidy a agonisté PPAR- γ podporují diferenciaci. Inzulín a komponenty inzulín/IGF-1 signální kaskády hrají velmi důležitou roli v adipogenezi. Ztráta proteinu inzulínového receptorového substrátu (IRS) inhibuje adipogenezi [152, 153]. Efektorové molekuly inzulínové kaskády jako jsou fosfatidylinozitol-3 kináza, AKT1/2 ale i účinné imunosupresivum rapamycin jsou zapojeny do procesu adipogeneze [154, 155].

Hormon štítné žlázy trijodtyronin (T3) hraje významnou roli v normálním vývoji, diferenciaci a metabolické homeostáze včetně ovlivnění bazálního metabolismu a termogeneze. Tyroidní hormony jsou rovněž zapojeny do lipogeneze v lipogenních tkáních jako jsou játra [156] a tuková tkáň [157, 158] skrze tyroidními receptory indukovanou genovou expresí. U savců se vyskytují 2 hlavní izoformy tyroidního receptoru $\alpha 1$ (TR $\alpha 1$) a $\alpha 2$ (TR $\alpha 2$), které mají vzájemné funkční antagonistické působení. Vazbou T3 na TR $\alpha 1$ je indukována adipogeneze, zatímco receptor TR $\alpha 2$ má antagonistický účinek. V subkutánní tukové tkáni obézních pacientů je vyšší exprese TR $\alpha 1$ a současně i T3 než ve viscerální tukové tkáni [159].

Glukokortikoidy jsou významnými spouštěči adipogeneze *in vitro* a hyperkortizolismus je spojen s obezitou a poruchou distribuce tělesného tuku v organismu [160]. Receptory pro glukokortikoidy jsou přítomny v preadipocytech a uplatňují se v expresi C/EBP- δ a PPAR- γ [161]. Enzym 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenáza 1 (11BHSD1), zabezpečující přeměnu neaktivního kortizonu na aktivní kortizol (nebo kortikosteron u hlodavců), je exprimován v preadipocytech a adipocytech a senzitivizuje tak tukovou tkáň k působení glukokortikoidů. Výsledky experimentálních studií ukazují, že nadměrná exprese 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenázy 1 v tukové tkáni u myši se projevuje hromaděním viscerálního tuku, inzulínovou rezistencí, dyslipidemií a hypertenzí [162]. Naopak, myši s chybějící 11BHSD1 vykazují snížený obsah tělesného tuku [163]. Četné výsledky studií ukazují, že lokální

produkce kortizolu parakrinně podporuje adipogenezi ve viscerální tukové tkáni a zvýšená exprese 11BHS1 je spojena s obezitou u lidí i hlodavců [39].

Dalšími faktory s proadipogenním účinkem v lidských preadipocytech jsou fibroblastové růstové faktory FGF1, FGF2, FGF10, jejichž neutralizace zastavuje adipogenezi [164].

4.3.2 Antiadipogenní faktory

Wnt rodina (Wingless/Int-1) glykoproteinů působící autokrinním nebo parakrinním mechanismem ovlivňuje vývoj mnoha typů buněk. Wnt zcela blokuje produkci klíčových adipogenních transkripčních faktorů C/EBP- α a PPAR- γ . Naopak zablokování Wnt signalizace v preadipocytech vede ke spontánní diferenciaci, což nasvědčuje tomu, že preadipocytárními buňkami endogenně produkovaný Wnt je silným inhibítozem diferenciaci. Ektopická exprese Wnt genu silně potlačuje adipogenezi [165]. Konstitutivní exprese WNT10b genu, který je ve velkém množství exprimován v preadipocytech a downregulován při procesu diferenciaci, inhibuje adipogenezi [166]. Ektopická exprese WNT10b stabilizuje cytozolový β -catenin a je silným inhibítozem adipogeneze. *In vivo* transgenní exprese WNT10b v adipocytech vede k 50 % snížení bílé tukové tkáně a vývoj hnědé tukové tkáně zcela chybí. WNT10a a WNT6 jsou určující ve vývoji hnědých adipocytů.

Růstový faktor- β (TGF- β), BMP a myostatin regulují diferenciaci mnoha typů buněk včetně adipocytů. TGF- β je cytokin, stimuluje proliferaci preadipocytů a zastavuje adipogenezi *in vitro*. TGF- β a jeho signalizační komponenty jsou exprimovány v buněčných kulturách adipocytů ale i v tukové tkáni. Jeho nadměrná exprese narušuje vývoj tukové tkáně [167] naopak zablokování jeho signální dráhy inhibicí SMAD3 zvyšuje adipogenezi. SMAD3 se váže na C/EBPs a blokuje jeho transkripční aktivitu [168]. Vystavení multipotentních mezenchymálních buněk BMP4 vede tyto buňky k diferenciaci na adipocyty. Účinek BMP2 je více komplexní a je závislý na přítomnosti dalších signálních molekul. BMP2 stimuluje adipogenezi multipotentních C3H10T1/2 buněk v nižších koncentracích, ale ve vyšších koncentracích preferuje vývoj chondrocytů a osteoblastů. Myostatin může regulovat adipogenezi *in vitro* pozitivním nebo negativním způsobem v závislosti na typu buněk a podmínkách pro buněčné kultury [169].

Vystavení preadipocytů účinkům prozánětlivých cytokinů zabraňuje adipogenezi snížením exprese PPAR- γ a C/EBP- α a zablokováním účinku inzulinu. TNF- α a IL-1 potlačují adipocytární přeměnu aktivací TAK1/TAB1/NIK kaskády, která následně inhibuje účinky PPAR- γ [170]. Ve skutečnosti mají cytokiny potenciál snižovat počet adipocytů jak modulací více bodů v adipogenním procesu, tak aktivací různých intracelulárních signalizačních drah [171-173].

Pref-1 je transmembránový protein patřící do rodiny proteinů podobných epidermálním růstovým faktorům, který je aktivován proteolytickým štěpením [174]. Odštěpením extracelulární části Pref-1, dochází k inhibici adipogeneze díky možné interakci s Notch. Exprese Pref-1 je vysoká v preadipocytech a snižená při diferenciaci adipocytů a jeho vynucená exprese v 3T3-L1 buňkách adipogenezi blokuje.

4.3.2.1 Farmakologické antiadipogenní faktory

Některé léky mají silný vliv na adipogenezi. Vysoce účinná léčba infekce lidským imunodeficientním virem (HIV), je spojena s metabolickým syndromem, inzulinovou rezistencí, dyslipidemií, periferní lipodystrofií a viscerální obezitou [175]. Výsledky studií provedených na buněčných kulturách ukazují, že nelfinavir a indinavir, snižují preadipocytární diferenciaci a lipogenezi a současně zvyšují apoptozu a lipolýzu [172, 176, 177]. Studie provedené u pacientů s HIV a lipodystrofií ukázaly zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů v tukové tkáni což naznačuje, že redukční účinek proteázových inhibitorů na adipogenezi může souviset se zvýšenou lokální produkcí těchto cytokinů [178, 179].

Metformin, který je již 40 let s úspěchem používán k léčbě diabetes mellitus 2. typu, zabraňuje diferenciaci myších 3T3-L1 buněčných linií a primárních lidských adipocytů, snížením lipogenní genové exprese a zvýšením aktivity AMPK a vstupu glukózy do buňky [180-182]. Účinek metforminu na lidské adipocyty je pravděpodobně zprostředkován organickým kationtovým transportérem 1, který je tvořen během diferenciaci adipocytů [183]. Metformin je dále zodpovědný za zvýšení aktivity glukózového přenašeče GLUT-4, translokaci GLUT-1 a normalizaci funkce enzymatického systému v intracelulární inzulinové signální kaskádě a stimulaci tyrozinkinázové aktivity β podjednotek inzulinových receptorů. Vlivem snížení zvýšených hladin plazminogenového aktivátoru 1, běžně se vyskytujících u inzulinorezistentních jedinců, snižuje metformin riziko trombogenních komplikací [184] a vlivem antiapoptotického účinku na endotelové buňky ovlivňuje výskyt makrovaskulárních komplikací. Metformin rovněž snižuje tvorbu kyslíkových radikálů a chrání endotelové buňky před poškozením vyvolaným oxidačním stresem vlivem hyperglykémie.

5. PREADIPOCYTÁRNÍ FAKTOR - 1

5.1 Struktura Pref-1

Pref-1 je syntetizován jako protein skládající se z 380 aminokyselin obsahujících signální sekvence na N terminálním konci a jednoduchou membránovou doménu složenou z 300-322 aminokyselin. Nejvýraznější strukturální prvek Pref-1 se nachází v extracelulární doméně s EGF-like motivem [4]. EGF-like motiv byl původně popsán pro epidermální růstový faktor (EGF) a další růstové faktory, které se váží na EGF receptor a působí jako signály buněčné proliferace a diferenciaci. Pref-1 neobsahuje konzervovaná rezidua aminokyselin, která jsou nezbytná pro vazbu na EGF receptor. Pref-1 spíše sdílí strukturální charakteristiky s jinou třídou signálních proteinů podobných EGF jako jsou Notch/Delta/Serrate rodiny, které se podílejí na buněčné signalizaci a určení osudu buňky [185], ačkoli Pref-1 postrádá DSL (Delta/Serrate/LAG-2) doménu, která je obsažena ve všech klasických Notch ligandech pro zprostředkování receptor-ligandové interakce pro Notch [186, 187].

V buněčné membráně preadipocytů se v důsledku postranlačních modifikací nacházejí vícenásobné transmembránové formy Pref-1 o velikosti 50 do 60 kDa, které obsahují N-vázané oligosacharidy a zbytky kyseliny sialové v extracelulární doméně. Kromě toho existují čtyři hlavní alternativní sestřihové produkty Pref-1 (Pref-1A-D) [188]. Kromě největší plné délky Pref-1 formy, vytváří alternativní sestřih tři hlavní kratší formy Pref-1. Relativní množství různých sestřižených forem se liší v závislosti na tkáni nebo vývojovém stádiu zkoumaného materiálu [189].

Proteolytickým štěpením Pref-1 na 2 místech extracelulární domény vzniká rozpustná forma Pref-1 [190]. To znamená, že dvě větší alternativní formy sestřihu Pref-1, Pref-1A a Pref-1B (50kDa), jsou štěpeny v juxtamembránovém místě. Menší Pref-1C a Pref-1D, v důsledku větší delecce se štěpí pouze na N-konci, kdy vzniká menší 25kDa rozpustná forma. V tomto ohledu, fetální antigen 1, bílkovina v krevním oběhu plodu, pravděpodobně odpovídá větší rozpustné formě lidského Pref-1 [191-193]. Jeden z členů ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) rodiny proteinů, TNF- α -konvertující enzym (TACE, ADAM 17), může štěpit Pref-1 v juxtamembránové oblasti za vzniku velké rozpustné formy Pref-1 [194]. Bazální i stimulované štěpení může být inhibováno pomocí metaloproteinázového inhibitoru GM6001, což ukazuje, že štěpení membránového Pref-1 je závislé na metaloproteináze. Dále lentivirem zprostředkovaná exprese TACE zvyšuje štěpení Pref-1 za současného vzniku velké solubilní formy Pref-1. Naopak siRNA zprostředkovává snížení TACE a tím dochází k nižšímu uvolňování velké solubilní formy [194]. Kromě toho, toto štěpení nebylo

detekovatelné nebo bylo značně snižené v buňkách nesoucích mutovaný TACE, nebo v buňkách transfekovaných siRNA TACE. Tato data jasně ukazují, že štěpení v juxtamembráně pomocí TACE generuje velkou 50 kDa solubilní formu Pref-1. Zvýšené uvolňování 50 kDa extracelulární domény Pref-1 může být výrazně zvýšeno použitím forbolesteru a regulováno aktivací proteinkinázy C [190].

5.2 Produkce a funkce Pref-1

Preadipocytární faktor-1 (Pref-1) je ve velké míře exprimován preadipocyty, snížen při diferenciaci adipocytů a úplně chybí u zralých adipocytů [4, 5]. Pref-1 je také exprimován v různých tkáních v průběhu embryogeneze a jeho exprese mizí po narození [4, 193, 195]. Pref-1 odráží stupeň adipocytární diferenciace *in vitro* a *in vivo* a je proto používán jako preadipocytární marker, podle něhož mohou být preadipocyty dobře rozpoznávány [5]. Jeho exprese je snížena působením adipogenních faktorů (dexametazon) a naopak zvýšena antiadipogenním působením růstového hormonu, jehož stimulační účinek je způsoben aktivací FoxA2 [196]. Byla prokázána těsná korelace mezi dexametazonem zprostředkovanou down-regulací Pref-1 a účinkem dexametazonu na diferenciaci 3T3-L1 preadipocytů [197, 198]. Exprese Pref-1 inhibuje adipogenezi a zároveň hraje významnou roli v udržování preadipocytárního stavu [4]. Pref-1 inhibuje diferenciaci adipocytů aktivací MEK/ERK [199], akumulaci lipidů, expresi adipocytárních transkripčních faktorů jako jsou PPAR- γ a C/EBP α a dalších markerů včetně FAS (fatty acid synthase), stearyl - coenzym A desaturázy a FABP4/aP2. Zvýšené hladiny Pref-1 jsou spojeny se zhoršenou adipocytární diferenciací nebo dediferenciací zralých adipocytů a inzulínovou rezistencí [200].

5.3 Pref-1 v experimentálních studiích

Úloha Pref-1 v procesu adipogeneze je velmi dobře prokazatelná na myších modelech se sníženou [201] nebo naopak zvýšenou expresí Pref-1 [6, 7]. V experimentálních studiích provedených na Pref-1-null myších byla prokázána více než 50 % perinatální letalita a přeživší zvířata vykazovala retardaci růstu, malformace skeletu a jiné defekty včetně zvýšení obsahu tělesného tuku [201]. Obě pohlaví Pref-1-null myši vážily při odstavení méně než wild-type myši [201], ale velice rychle přibývaly na váze. Hmotnost významných tukových dep v organizmu (inguinální, retroperitoneální a gonadální) byla signifikantně vyšší u Pref-1-null myši, což ukazovalo, že rychlý přírůstek tělesné hmotnosti u Pref-1-null myši byl v důsledku zvýšení hmotnosti tukové tkáně. Histologická analýza tuku odhalila větší velikost adipocytů u Pref-1-null myši na rozdíl od jejich wild-type sourozenců. Výsledky dalšího

podrobného zkoumání ukázaly vyšší hladiny mRNA pozdního markeru adipocytární diferenciace stearyl-koenzymu A desaturázy a syntázy mastných kyselin v tukové tkáni Pref-1-null myši, což svědčí pro zvýšenou adipogenezi. U Pref-1-null myši bylo rovněž prokázáno zvýšené ukládání tuku v játrech, zvýšení cirkulující hladin triglyceridů, cholesterolu, volných mastných kyselin. Výsledky provedené na Pref-1-null myších demonstrují zvýšení adipogeneze *in vivo* a podporují předpokládanou roli Pref-1 jako negativního regulátoru adipogeneze.

Transgenní myši modely exprimující ve zvýšené míře rozpustnou formu Pref-1 mají výrazně snížený obsah tukové tkáně a redukovanou expresi adipocytárních markerů a faktorů [6, 7]. Snížený rozvoj tukové tkáně, typický pro model myši lipodystrofie, vyvolává u těchto myši hypertriglyceridémii, sníženou glukózovou toleranci a inzulínovou senzitivitu. Myši ektopicky exprimující Pref-1/hFc výhradně v játrech pod kontrolou albuminového promoteru také vykazují snížení obsahu tělesného tuku a adipocytárního markeru exprese, které naznačuje potenciální endokrinní způsob účinku Pref-1 [6]. Výsledky studií provedených na myších modelech se sníženou nebo zvýšenou expresí Pref-1 prokazují rozvoj inzulínové rezistence a porušené glukózové tolerance a současně poukazují na to, že správný vývoj tukové tkáně je nezbytný pro udržení glukózo/inzulínové homeostázy.

5.4 Pref-1 v klinických studiích

Klinické studie zabývající se metabolickým významem Pref-1 v organismu jsou prováděny zejména u dvou skupin pacientů trpících poruchami příjmu potravy. Je to mentální anorexie reprezentována malnutricí a zároveň úbytkem tukové tkáně a obezita reprezentující pozitivní kalorickou bilanci s hypertrofií tukové tkáně. Zdá se, že oba tyto extrémní metabolické stavy ovlivňují produkci Pref-1 v tukové tkáni, který může mít vliv na další metabolické pochody v organismu jako je např. kostní nebo glukózový metabolismus.

5.5 Vztah Pref-1 k obezitě a diabetes mellitus 2. typu

Studie provedená na metabolicky zdravých a metabolicky nemocných obézních pacientech prokázala významný rozdíl v tukové tkáni těchto pacientů. Zvýšená exprese Pref-1 v subkutánní a viscerální tukové tkáni byla spojena s nezdravým metabolickým profilem a hladiny Pref-1 pozitivně korelovaly s velikostí adipocytů. Vyšší hladiny Pref-1 nalezené v metabolicky nezdravé tkáni mohou omezovat diferenciaci preadipocytů. Dále byla prokázána pozitivní korelace s metabolicky nežádoucími parametry a inverzní korelace s metabolicky pozitivně působícími adipokiny jako je adiponektin, což ukazuje na možné spojení snížené adipogenní kapacity a systémové metabolické dysfunkce [202]. Snížená

hladina Pref-1 u metabolicky zdravých jedinců může odrážet zvýšenou adipogenní kapacitu jak v subkutánní tak ve viscerální tukové tkáni. To by umožnilo hyperplastické, nikoli však hypertrofické, tukové tkáni expanzi, což by nepochybně vedlo ke vzniku malých „zdravých“ adipocytů a redukcii volných mastných kyselin a ektopickému ukládání tuku v játrech, pankreatu a svalech [203]. Pacienti s diabetem měli v jiné studii větší velikost a zároveň nižší počet adipocytů ve srovnání s obézními pacienty bez diabetu [204]. Preadipocytární faktor-1 pozitivně koreluje s počtem makrofágů [202]. To může vést ke zvýšené inhibici preadipocytární diferenciace vlivem Pref-1, následné hypertrofii adipocytů, hypoxii a zvýšenému vzniku makrofágů. Zvýšený počet makrofágů je spojený s produkcí prozánětlivých faktorů, které mohou navodit fenotypové změny v preadipocytech, vedoucí ke zvýšené expresi Pref-1 a tím k inhibici diferenciace preadipocytů. Lidské preadipocyty kultivované v makrofágovém mediu vykazovaly sníženou adipogenezi jak bylo zjištěno vlivem snížení akumulace lipidů v buňce a redukce genové exprese adipogenních a lipogenních markerů [202]. Aktivace makrofágů zvyšuje genovou expresi a uvolňování prozánětlivých cytokinů a chemokinů a indukuje proliferaci preadipocytů. Tato data ukazují, že faktory produkované makrofágy zabraňují vzniku zralých adipocytů, což naznačuje možnou roli při omezování expanze tukové tkáně u lidí [205] a v konečném důsledku vznik inzulinové rezistence.

5.6 Vztah Pref-1 k lipodystrofii

Lipodystrofie je soubor vrozených nebo získaných onemocnění, která jsou charakterizována částečným nebo celkovým úbytkem tukové tkáně [206]. Lipodystrofičtí pacienti jsou ohroženi metabolickými komplikacemi včetně inzulinové rezistence, hyperlipidémie a diabetes mellitus 2. typu. Etiopatogeneze lipodystrofie není zcela objasněna, původ kongenitální lipodystrofie může být v mutaci některých genů (lamin A/C, AGPAT2, seipin, PPAR- γ) [207, 208]. Tyto geny mohou regulovat různé funkce tukové tkáně jako je metabolismus, diferenciace, přežívání, zrání a správnou funkci adipocytů, které jsou nezbytné pro udržení glukózové a lipidové homeostázy organismu. Zatím však nebyla prokázána přímá souvislost mezi expresí Pref-1 a vrozenou lipodystrofií. Exprese Pref-1 je zvýšená v tukové tkáni HIV pozitivních pacientů, kteří podstupují léčbu HAART (highly active antiretroviral treatment), která je spojená s lipodystrofií [209], úbytkem subkutánní tukové tkáně, hyperlipidémií a inzulinovou rezistencí [210]. Výsledky klinických studií provedených u pacientek trpících mentální anorexií prokázaly zvýšené hladiny Pref-1, ve srovnání se zdravými ženami s normálním BMI. Zvýšená hladina Pref-1 korelovala s množstvím tukové tkáně obsažené v kostní dřeni a sníženou kostní denzitou v této populaci [211]. Vzhledem k tomu, že

osteoblasty a adipocyty vznikají ze stejných progenitorových, mezenchymálních buněk (hMSC), je možné předpokládat ovlivnění tohoto procesu zvýšenou produkcí Pref-1.

Zatím není zřejmé, jakým způsobem může Pref-1 ovlivňovat metabolismus jak obézních, tak lipodystrofických pacientů, kteří vykazují poruchy v lipidovém a glukózovém metabolismu, včetně změn endokrinní funkce tukové tkáně. Je proto nezbytné nalézt receptor Pref-1, kterým je zprostředkováván biologický účinek tohoto metabolického faktoru.

6. HYPOTÉZA A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Jednou z příčin vzniku inzulínové rezistence může být inhibice diferenciacie preadipocytů na zralé adipocyty a následné ektopické ukládání lipidů způsobené sekrecí Preadipocytárního faktoru – 1 (Pref-1). Práce je založena na hypotéze, že sérové koncentrace Pref-1 se budou významně lišit u pacientek s obezitou a inzulínovou rezistencí a pacientek s mentální anorexií a štíhlých zdravých kontrolních subjektů. Dále předpokládáme, že tyto hladiny budou asociovány s parametry inzulínové rezistence, glukózového metabolismu a subklinického zánětu a budou významně ovlivněny snížením hmotnosti u obézních pacientek, respektive částečnou realimentací u pacientek s mentální anorexií.

Specifické cíle disertační práce jsou proto následující:

1. Sledovat změny hladin Pref-1 a dalších parametrů endokrinní funkce tukové tkáně u pacientek s obezitou a diabetes mellitus 2. typu ve srovnání s kontrolní skupinou štíhlých zdravých žen. Dále sledovat vztah hladin Pref-1 k metabolickým a antropometrickým parametrům a vliv různých intervencí typu nízkokalorické diety na hladiny Pref-1 a metabolické parametry.
2. Sledovat vliv akutní hyperinzulinémie a léčby fenofibrátem na sérové koncentrace Pref-1 u pacientek s obezitou a diabetes mellitus 2. typu.
3. Sledovat změny hladin Pref-1 a dalších parametrů endokrinní funkce tukové tkáně u pacientek s mentální anorexií ve srovnání s kontrolní skupinou. Dále sledovat vztah hladin Pref-1 k metabolickým a antropometrickým parametrům a vliv částečné realimentace pacientek s mentální anorexií na hladiny Pref-1 a metabolické parametry.

7. METODIKA STUDIÍ

Všechna uvedená klinická vyšetření a laboratorní měření byla provedena na 3. interní klinice 1. LF UK a VFN ve spolupráci s Psychiatrickou klinikou 1. LF UK a VFN a Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN.

7.1. Antropometrická vyšetření a odběry krevních vzorků

U všech subjektů zařazených do studie byla měřena výška, váha a vypočítán Body mass Index (BMI – hmotnost v kg/výška v m²). Obsah tělesného tuku byl měřen bioimpedanční metodou (Bodystat 1500, Bodystat Ltd., UK) a zároveň dvouenergií rentgenovou absorpciometrií (DEXA Hologic, Waltham, MA, USA). Kostní denzita byla rovněž měřena pomocí kostního denzitometru (DEXA). Bazální metabolismus byl měřen metodou nepřímé kalorimetrie (Vmax EncoreViasysTH HEALTHCARE, SensorMedics BV, Netherlands). Krevní vzorky byly odebírány u studijních subjektů za standardních podmínek, mezi 7. a 8. hodinou ranní nalačno (po celonočním lačnění), do třiceti minut byly centrifugovány (10 min při 1000 x g) a následně byla séra a plazmy uloženy do hlubokomrazícího boxu, kde byly uchovávány při teplotě -70°C do vyšetření. HOMA (homeostasis model assessment) index byl vypočítán pomocí vzorce: sérová koncentrace inzulínu nalačno (U/ml) * glykémie nalačno (mmol/l)/22.5.

7.2 Hormonální a biochemická vyšetření krevních vzorků

Biochemická vyšetření (glukóza, glykovaný hemoglobin, lipidový profil, jaterní testy, CRP) byla provedena v Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN.

Měření sérové koncentrace Pref-1 bylo provedeno metodou ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA). Senzitivita kitu byla 12 pg/ml a intra a interassay variabilita byla méně než 5 respektive 15 %. Rozmezí standardní křivky bylo 0,16-10,00 ng/ml.

Sérová koncentrace inzulínu byla měřena metodou RIA (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette Cedex, Francie). Senzitivita kitu byla 2,0 μIU/ml a intra a interassay variabilita byla 4,2 a 8,8 %.

Sérová koncentrace adiponektinu byla měřena metodou ELISA (Linco Research, St. Charles, Missouri, USA). Senzitivita byla 0,78 ng/ml.

Sérová koncentrace leptinu byla měřena metodou ELISA (BioVendor, Brno, Česká republika). Senzitivita kitu byla 0,12 ng/ml a intra a interassay variabilita byla 1,7 a 8,0 %.

Sérová koncentrace MIC-1 byla měřena metodou ELISA (BioVendor, Brno, Česká republika). Senzitivita kitu byla 22 pg/ml a intra a interassay variabilita byla 6,75 a 9 %. Rozmezí standardní křivky bylo 70-4480 pg/ml.

Sérová koncentrace FABP-4 byla měřena metodou ELISA (BioVendor, Brno, Česká republika). Senzitivita byla 0,1 ng/ml, intra a interassay variabilita byla 5 a 10 %.

Sérová koncentrace resistinu byla měřena metodou ELISA (BioVendor, Brno, Česká republika). Senzitivita byla 0,12 ng/ml, intra a interassay variabilita byla 5 a 10 %.

7.3 Hyperinzulinemický isoglykemický clamp

V současnosti jsou clampové techniky považovány za zlatý standard v testování sekrece inzulínu, inzulínové rezistence a sekrece kontraregulačních hormonů. Clampová metoda je technikou, která umožňuje navodit a libovolně dlouhou dobu udržovat požadovanou hladinu glykémie ev. inzulínemie *in vivo* pomocí infuzí glukózy a inzulínu, které mohou být podávány samostatně nebo v kombinaci. Podle hladiny cílové glykémie rozlišujeme testy hyperglykemické, euglykemické (normoglykemické), isoglykemické a hypoglykemické.

V naší studii jsme prováděli hyperinzulinemický isoglykemický clamp [212], kterým byla hodnocena míra účinku inzulínu dle podaného množství glukózy při standardně zvolené hyperinzulinémii vyvolané kontinuální infuzí inzulínu o konstantní rychlosti, tak abychom udrželi glykémii na požadované hodnotě. Za cílovou hodnotu glykémie byla považována vstupní glykémie na lačno. Relativní dávka inzulínu byla vztažena na jednotku tělesné hmotnosti nebo tělesného povrchu. Inzulín senzitivní osoby mají na rozdíl od inzulín rezistentních osob vyšší spotřebu glukózy k udržení požadované glykémie.

7.3.1 Praktické provedení clampu

Po celonočním lačnění byly pacientovi do obou předloktí zavedeny kanyly, jedna pro kontinuální infuzi inzulínu (20 IU krátkodobého lidského inzulínu HMR ve 20 ml 0,9 % NaCl, rychlost infuze 1 mIU/kg/min u pacientů BMI < 30 kg/m² a 40 mIU/m²/min při BMI > 30 kg/m²) a druhá k podání roztoku 20 % glukózy (v infuzích po 500 ml 20 % glukózy + 20 ml 7,45 % KCl). Rychlost infundované glukózy se měnila v závislosti na změnách glykémie za účelem udržení isoglykémie (vstupní glykémie na lačno). Kanyla v druhém předloktí sloužila k odběrům krevních vzorků k stanovení glykémie v časových intervalech 5 minut a inzulínemie vstupně a při rovnovážném stavu. Glykémie byla měřena kapesním glukometrem (Super Glucocard II, Japonsko). Celý hyperinzulinemický izoglykemický clamp trval 3 hodiny, kdy rovnovážný stav glykémie v cílovém rozmezí byl nastolen po 150 minutách clampu a trval nejméně 30 minut.

7.3.2 Vzorce pro výpočet rychlosti infuze glukózy a inzulínu

Rychlost infuze glukózy byla vypočtena dle vzorce:

pro pacientky s BMI < 30 kg/m²: $V_{glc} \text{ (ml/hod)} = (\text{hmotnost v kg} \times 60)/150$

pro pacientky s BMI > 30 kg/m²: $V_{glc} \text{ (ml/hod)} = (\text{těl. povrch v m}^2 \times 2400)/150$

Během clampu byla rychlost glukózové infuze upravována dle naměřené glykémie.

Rychlost infuze inzulínu byla vypočtena dle vzorce:

pro pacientky s BMI < 30 kg/m²: $V_{ins} \text{ (ml/hod)} = (\text{hmotnost v kg} \times 60)/1000$, rychlost inzulínu je 1 mIU/kg/min

pro pacientky s BMI > 30 kg/m²: $Vins \text{ (ml/hod)} = (\text{těl. povrch v m}^2 \times 2400)/1000$, rychlost inzulínu je 40 mIU/m²/min

7.4 Statistická analýza získaných dat

Statistické zpracování získaných dat bylo provedeno pomocí statistického softwaru SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Výsledky jsou uváděny jako průměr ± SEM (standard error of the mean – střední chyba průměru). Nepárový t-test nebo Mann-Whitney test byly použity ke srovnávání sérových koncentrací mezi kontrolní skupinou a skupinou pacientek s mentální anorexií resp. obezitou. Párový t-test nebo Wilcoxonův test byly použity k porovnání koncentrací Pref-1, biochemických a antropometrických parametrů u pacientek s mentální anorexií před a po částečné realimentaci respektive před a po absolvování nízkokalorické diety. Dále byla také použita Spearmanova korelace ke zhodnocení vztahu mezi koncentrací Pref-1 a dalšími sledovanými parametry. Za statisticky významné byly považovány rozdíly a korelace, kde p bylo menší než 0,05.

8. PROTOKOLY DÍLČÍCH STUDIÍ

8.1 Vliv nízkokalorické diety, akutní hyperinzulinémie a fenofibrátové léčby na sérové koncentrace Pref-1 u pacientek s obezitou a diabetes mellitus 2. typu

Do studie bylo zařazeno 19 pacientek s obezitou (BMI: $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) bez diabetes mellitus 2. typu (OB skupina), 22 obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu (DM2T skupina) a 22 zdravých kontrolních žen (BMI: 20-25 kg/m²) odpovídajícího věku. Tělesná hmotnost všech vyšetřovaných subjektů byla stabilní po dobu 3 měsíců před zařazením do studie. Pacientky s diabetem byly léčeny perorálními antidiabetiky (metforminem nebo kombinací metforminu a glimepiridu) po dobu zařazení do studie. Antidiabetická léčba nebyla měněna po dobu 3 měsíců před zařazením do studie. Žádná z vyšetřovaných žen netrpěla endokrinním, infekčním nebo nádorovým onemocněním. Všechny obézní ženy bez diabetu a 12 obézních žen s diabetem podstoupilo třítydenní nízkokalorickou dietu (600Kcal/den) na oddělení 3. interní kliniky 1. LF UK a VFN. Podskupina 11 obézních žen s diabetes mellitus 2. typu a 10 kontrolních štíhlých žen byla zařazena do substudie s fenofibrátovou léčbou. Pacientky byly léčeny PPAR- α agonistou fenofibrátem (Lipanthyl 267 M) po dobu 3 měsíců. Jejich inzulínová senzitivita byla vyšetřována hyperinzulinemickým isoglykemickým clampem. Zdravé ženy z kontrolní skupiny netrpěly obezitou ani malnutricí, hypertenzí ani jiným metabolickým onemocněním.

Informovaný souhlas podepsaly všechny studijní subjekty před zařazením do studie. Studijní protokol byl schválen Etickou komisí 1. LF UK a VFN a byl v souladu s Helsinskou deklarací.

8.2 Vliv částečné realimentace na sérové koncentrace Pref-1 u pacientek s mentální anorexií

Do této studie bylo zařazeno 18 dosud neléčených pacientek s mentální anorexií (věk: $24,39 \pm 1,21$ let, BMI: $15,58 \pm 0,28$ kg/m²) a 16 zdravých žen odpovídajícího věku (věk: $22,69 \pm 0,76$ let, BMI: $21,80 \pm 0,51$ kg/m²). Pacientky s mentální anorexií byly hospitalizované na oddělení Psychiatrické kliniky 1. LF UK a VFN, kde podstoupily program částečné realimentace v trvání 46 ± 2 dny. Realimentační program obsahoval 3 hlavní jídla, 2 svačiny a 1 druhou večeři, dieta obsahovala 50 % sacharidů, 25 % tuků, 25 % bílkovin a celkový denní příjem činil 2300kcal. Pacientky konzumovaly všechna jídla pod dohledem. Žádná z těchto žen neměla diabetes mellitus, netrpěla onemocněním štítné žlázy, akutním infekčním onemocněním ani alergií. Žádná pacientka neměla maligní onemocnění. Mentální anorexie trvala u sledovaného souboru žen v průměru $9 \pm 1,8$ roku. Pacientky byly vyšetřovány na začátku a na konci realimentačního programu a zdravé ženy pouze jednou.

Zdravé ženy tvořící kontrolní skupinu neužívaly žádnou medikaci a v minulosti netrpěly malnutricí, poruchou příjmu potravy, obezitou, hypertenzí, gastrointestinálním nebo psychiatrickým onemocněním. Ženy z kontrolní skupiny měly pravidelný menstruační cyklus. Všechny studijní subjekty podepsaly informovaný souhlas před zařazením do studie. Studie byla provedena se souhlasem Etické komise 1. LF UK a VFN a byla v souladu s Helsinskou deklarací.

9. VÝSLEDKY

9.1 Sérové koncentrace Preadipocytárního faktoru - 1 (Pref-1) u obézních žen a žen s diabetes mellitus 2. typu: vliv nízkokalorické diety, akutní hyperinzulinémie a fenofibrátové léčby

9.1.1. Srovnání antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů obézních žen a žen s DM 2. typu s kontrolní skupinou zdravých žen

Základní antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky sledovaných obézních žen nebo žen s DM 2. typu jsou ukázány v tabulce 2. Dle očekávání byl BMI, glykémie, triglyceridémie, inzulinémie, leptinémie, CRP, FABP-4, MIC-1 a HOMA index signifikantně vyšší u obou skupin obézních žen – s i bez DM 2. typu ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých, štíhlých žen. Naopak sérové koncentrace adiponektinu a HDL cholesterolu byly

signifikantně sníženy u obou těchto skupin. Hladina glykovaného hemoglobinu byla signifikantně zvýšena u skupiny obézních žen s DM 2. typu ve srovnání s kontrolní skupinou žen. Při porovnávání skupin pacientek trpících obezitou vs. skupina pacientek s DM 2. typu, měly pacientky s diabetem signifikantně nižší BMI, zatímco glykémie, glykovaný hemoglobin, triglyceridémie, inzulinémie a HOMA index byly signifikantně vyšší u skupiny žen s diabetem ve srovnání s obézní skupinou žen bez diabetu. Sérové koncentrace leptinu a adiponektinu se nelišily mezi skupinami obézních s nebo bez diabetu. Sérové koncentrace celkového cholesterolu a resistinu se mezi sledovanými skupinami nelišily.

Tabulka 2: Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní skupiny zdravých, štíhlých žen, obézních žen bez DM2T nebo obézních s DM2T.

Skupina	Kontrolní	Obézní	DM2T
Počet subjektů	22	19	22
Věk (roky)	45,6 ± 2,5	47,8 ± 3,1	54,2 ± 1,8
BMI (kg/m ²)	23,2 ± 0,4	48,2 ± 2,3**	44,3 ± 2,5**°
Glykémie (mmol/l)	4,47 ± 0,16	5,14 ± 0,22**	9,49 ± 0,75**°
HbA1c (%)	3,69 ± 0,09	4,13 ± 0,18	8,30 ± 1,04**°
Cholesterol (mmol/l)	5,03 ± 0,14	4,82 ± 0,25	4,85 ± 0,20
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,51 ± 0,07	1,21 ± 0,06**	0,94±0,04**°
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,06 ± 0,15	2,94 ± 0,20	2,71 ± 0,20
Triglyceridy (mmol/l)	1,03 ± 0,11	1,50 ± 0,10**	3,22 ± 0,83**°
Inzulín (mIU/l)	13,7 ± 1,5	27,3 ± 3,8**	51,8 ± 10,8**°
HOMA index	2,83 ± 0,34	6,46 ± 0,98**	20,46 ± 3,49**°
Leptin (ng/ml)	13,5 ± 1,7	50,7 ± 3,8**	43,5 ± 5,3**
Adiponektin (µg/ml)	23,6 ± 2,2	17,2 ± 2,3*	16,2 ± 2,0*
Resistin (ng/ml)	7,11 ± 0,73	7,30 ± 0,56	7,48 ± 1,51
CRP (mg/l)	5,3 ± 0,8	14,2 ± 2,2**	13,2 ± 3,5**
FABP-4 (ng/ml)	18,0 ± 3,16	77,8 ± 17,0**	106,6 ± 11,6**
MIC-1 (ng/ml)	336 ± 30	627 ± 83**	1211 ± 216**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± S.E.M. Statistická signifikance je vypočítána pomocí ANOVA on ranks a nepárovým t-testem nebo Mann-Whitney testem.

*p<0,05 vs. kontrolní skupina

** p<0,01 vs. kontrolní skupina

° p<0,01 T2DM vs. obézní

9.1.2 Srovnání antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů obézních žen před a po VLCD vs. kontrolní skupina žen

Vliv 3 týdenní nízkokalorické diety (VLCD – very-low-calorie diet) na antropometrické, hormonální a biochemické parametry skupiny obézních žen je ukázán v tabulce 3. VLCD signifikantně snížila BMI, sérové koncentrace celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, resistinu a C reaktivního proteinu. Sérové hladiny Fatty acid binding proteinu-4 (FABP-4) a Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1) byly signifikantně vyšší před a po VLCD v porovnání s kontrolní skupinou, ale VLCD na jejich sérové koncentrace vliv neměla. Glykémie, triglyceridémie, inzulinémie, leptinémie, sérová koncentrace HDL cholesterolu a adiponektinu zůstaly po 3 týdenní VLCD beze změny.

Tabulka 3: Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní skupiny zdravých, štíhlých žen, obézních žen bez DM2T před (obézní 1) a po (obézní 2) 3 týdenní VLCD.

Skupina	Kontrolní	Obézní	
		Obézní 1	Obézní 2
Počet subjektů	22	19	19
BMI (kg/m ²)	23,2 ± 0,4	48,2 ± 2,3**	45,7 ± 2,0**°
Glykémie (mmol/l)	4,47 ± 0,16	5,14 ± 0,22**	5,09 ± 0,25*
HbA1c (%)	3,69 ± 0,09	4,13 ± 0,18	----
Cholesterol (mmol/l)	5,03 ± 0,14	4,82 ± 0,25	4,16 ± 0,34**°
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,51 ± 0,07	1,21 ± 0,06**	1,05 ± 0,06**
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,06 ± 0,15	2,94 ± 0,20	2,31 ± 0,22*°
Triglyceridy (mmol/l)	1,03 ± 0,11	1,50 ± 0,10*	1,58 ± 0,29*
Inzulín (mIU/l)	13,7 ± 1,5	27,3 ± 3,8**	26,3 ± 2,8**
HOMA index	2,83 ± 0,34	6,46 ± 0,98**	5,68 ± 0,67**
Leptin (ng/ml)	13,5 ± 1,7	50,7 ± 3,8**	45,7 ± 5,0**
Adiponektin (µg/ml)	23,6 ± 2,2	17,2 ± 2,3*	18,7 ± 2,3
Resistin (ng/ml)	7,11 ± 0,73	7,30 ± 0,56	6,16 ± 0,40°
CRP (mg/l)	5,3 ± 0,8	14,2 ± 2,2**	5,8 ± 1,3°
FABP-4 (ng/ml)	18,0 ± 3,16	77,8 ± 17,0**	114,3 ± 1,3**
MIC-1 (ng/ml)	336 ± 30	627 ± 83**	749 ± 123**

Hodnoty jsou zobrazeny jako průměry ± S.E.M. Statistická signifikance je vypočítána pomocí one-way ANOVA a párového t-testu.

* p<0,05 obézní vs. kontrolní skupina

** p<0,01 obézní vs. kontrolní skupina

° p<0,05 obézní 1 vs. obézní 2

9.1.3 Srovnání antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů obézních žen s diabetes mellitus 2. typu před a po VLCD a vs. kontrolní skupina žen

Vliv 3 týdenní nízkokalorické diety (VLCD – very-low-calorie diet) na antropometrické, hormonální a biochemické parametry skupiny obézních žen s diabetes mellitus 2. typu je ukázán v tabulce 4. VLCD signifikantně snížila BMI, glykémii, celkový cholesterol, inzulinémii, HOMA index, leptinémii, a sérovou koncentraci C reaktivního proteinu. Naopak VLCD neměla vliv na sérové koncentrace HDL a LDL cholesterolu, adiponektinu, resistinu. Sérové hladiny Fatty acid binding proteinu-4 (FABP-4) a Macrophage inhibitory cytokinu 1 (MIC-1) byly signifikantně zvýšeny před a po VLCD v porovnání s kontrolní skupinou, ale VLCD na jejich sérové koncentrace vliv neměla.

Tabulka 4: Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní skupiny zdravých, štíhlých žen a obézních žen s DM2T před (DM2T 1) a po (DM2T 2) 3 týdenní VLCD.

Skupina	Kontrolní skupina	DM2T	
		DM2T 1	DM2T 2
Počet subjektů	22	12	12
BMI (kg/m ²)	23,2 ± 0,4	50,9 ± 2,9**	47,4 ± 2,7**°
Glykémie (mmol/l)	4,47 ± 0,16	10,48 ± 1,1**	7,43 ± 0,80***°
HbA1c (%)	3,69 ± 0,09	8,30 ± 1,04**	----
Cholesterol (mmol/l)	5,03 ± 0,14	4,7 ± 0,25	3,76 ± 0,24***°
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,51 ± 0,07	0,94±0,05**	0,84 ± 0,04**
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,06 ± 0,15	2,71 ± 0,20	2,10±0,27
Triglyceridy (mmol/l)	1,03 ± 0,11	3,43 ± 1,45**	2,32 ± 0,68**
Inzulín (mIU/l)	13,7 ± 1,5	55,7 ± 16,8**	31,4 ± 5,2***°
HOMA index	2,83 ± 0,34	22,51 ± 5,32**	9,68 ± 1,44***°
Leptin (ng/ml)	13,5 ± 1,7	52,7 ± 7,7**	45,2 ± 7,0***°
Adiponektin (µg/ml)	23,6 ± 2,2	16,2 ± 2,7	15,5 ± 2,4
Resistin (ng/ml)	7,11 ± 0,73	7,48 ± 1,51	6,81 ± 0,90
CRP (mg/l)	5,3 ± 0,8	13,2 ± 3,5**	7,1 ± 2,4°
FABP-4 (ng/ml)	18,0 ± 3,2	106,6 ± 11,6**	180,7 ± 45,6**
MIC-1 (ng/ml)	336 ± 30	1211 ± 216**	1654 ± 288**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± S.E.M. Statistická signifikance je vypočítána pomocí one-way ANOVA a párového t-testu.

*p<0,05 kontrolní skupina vs. DM2T 1

** p<0,01 kontrolní skupina vs. DM2T 1

° p<0,05 DM2T 1 vs. DM2T 2

9.1.4 Srovnání antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů pacientek zahrnutých do substudie s fenofibrátovou léčbou

Základní antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky pacientek léčených fenofibrátem jsou ukázány v tabulce 5. Při vstupu do studie byly BMI, glykémie, triglyceridémie, inzulinémie, HOMA index, aterogenní index, leptinémie a glykovaný hemoglobin signifikantně vyšší u skupiny diabetiček 2. typu ve srovnání s kontrolní skupinou, naopak HDL cholesterol byl signifikantně snížen. Tříměsíční léčba fenofibrátem vedla k signifikantnímu poklesu triglyceridémie, zatímco glykémie, glykovaný hemoglobin a HOMA index byl signifikantně zvýšen. Další parametry včetně BMI, celkového cholesterolu, HDL cholesterolu, inzulínu, adiponektinu a aterogenního indexu nebyly léčbou ovlivněny. Sérová koncentrace leptinu nebyla po léčbě fenofibrátem stanovena. Inzulínová senzitivita, měřená hyperinzulinemickým isoglykemickým clampem, byla signifikantně nižší u skupiny diabetiček ve srovnání s kontrolní skupinou a léčba fenofibrátem na ni neměla vliv, jak bylo ukázáno dříve [213]. Sérové koncentrace celkového cholesterolu a adiponektinu se nelišily.

Tabulka 5: Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní skupiny zdravých, štíhlých žen a obézních žen s DM2T před (DM2T baseline) a po tříměsíční léčbě PPAR- α agonistou – fenofibrátem (DM2T fenofibrát).

Skupina	Kontrolní	DM2T	
		Baseline	Fenofibrát
Počet subjektů	10	11	11
BMI (kg/m ²)	23,7 ± 0,8	36,7 ± 2,9*	36,5 ± 2,7*
glykémie (mmol/l)	4,97 ± 0,19	8,48 ± 0,68*	9,43 ± 0,84*°
Glykovaný hemoglobin (%)	38,1 ± 0,8	57,7 ± 5,6*	61,0 ± 5,8*°
Cholesterol (mmol/l)	5,39 ± 0,24	5,22 ± 0,32	5,09 ± 0,25
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,55 ± 0,28	1,17 ± 0,11*	1,20 ± 0,11*
Triglyceridy (mmol/l)	0,98 ± 0,12	2,96 ± 0,39*	2,17 ± 0,24*°
Inzulín (mIU/l)	23,0 ± 2,9	44,2 ± 7,1*	47,5 ± 8,0*
HOMA index	5,08 ± 0,56	16,66 ± 0,21*	20,12 ± 0,30*°
Adiponektin (µg/ml)	22,41 ± 1,82	17,46 ± 4,04	16,53 ± 2,56
Leptin (ng/ml)	11,7 ± 2,68	32,25 ± 3,41*	NA
Aterogenní index	1,88 ± 0,09	3,17 ± 0,37*	3,02 ± 0,75*

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. Statistická signifikance je vypočítána pomocí one-way ANOVA a párového t-testu.

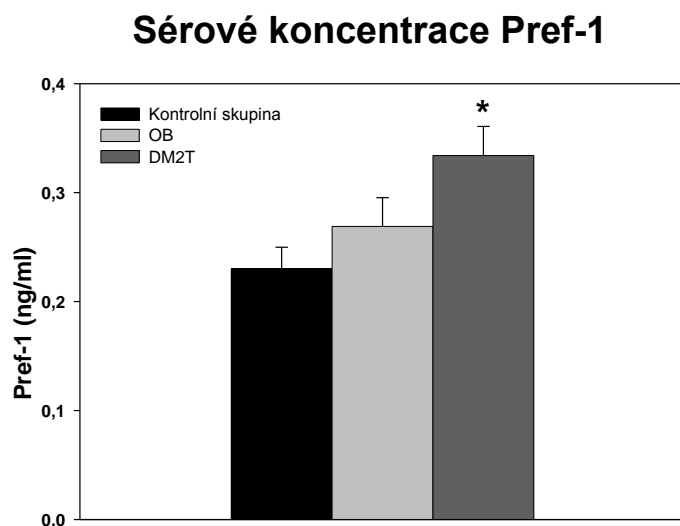
* $p < 0,05$ vs. kontrolní skupina

° $p < 0,05$ vs. DM2T baseline

9.1.5 Sérové koncentrace Preadipocytárního faktoru-1 u obézních žen s nebo bez diabetes mellitus 2. typu a kontrolní skupiny žen a jeho vztah k antropometrickým a metabolickým parametrům

Sérové koncentrace Pref-1 byly signifikantně vyšší u skupiny pacientek s diabetem ($0,334 \pm 0,027$ ng/ml) ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,230 \pm 0,019$ ng/ml, $p < 0,001$), zatímco u skupiny obézních bez diabetu vs. kontrolní skupina statisticky signifikantní rozdíl nebyl nalezen ($0,269 \pm 0,026$ ng/ml, $p = 0,143$). Rovněž nebyl prokázán žádný rozdíl v sérových koncentracích Pref-1 mezi skupinou obézních s a bez diabetu ($p = 0,060$) viz obrázek 1. V kombinované populaci štíhlých zdravých žen a obézních žen s DM 2. typu cirkulující hladiny Pref-1 pozitivně korelovaly s inzulínem, HOMA indexem, glykemií, leptinemií nikoli však s BMI, celkovým cholesterolem a adiponektinem, jak ukazuje tabulka 6.

Obrázek 1: Sérové koncentrace Pref-1 u kontrolní skupiny (černý sloupec, $n = 22$), obézní skupiny bez diabetu (světle šedivý sloupec, $n = 19$) a obézní skupiny s diabetem (tmavě šedivý sloupec, $n = 22$).



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. Statistická signifikance je vypočítána pomocí ANOVA on ranks.

* $p < 0,05$ vs. kontrolní skupina,

Tabulka 6: Vztah cirkulujících hladin Pref-1 s antropometrickými, biochemickými a hormonálními parametry v kombinované populaci zdravých, štíhlých žen, a obézních žen s diabetes mellitus 2. typu.

	R	p
BMI (kg/m²)		NS
Glykémie (mmol/l)	0,348	0,01
Celkový cholesterol (mmol/l)		NS
Triglyceridy (mmol/l)		NS
Inzulín (mIU/l)	0,39	0,004
HOMA-index	0,426	0,002
Leptin (ng/ml)	0,384	0,003
Adiponektin (µg/ml)		NS

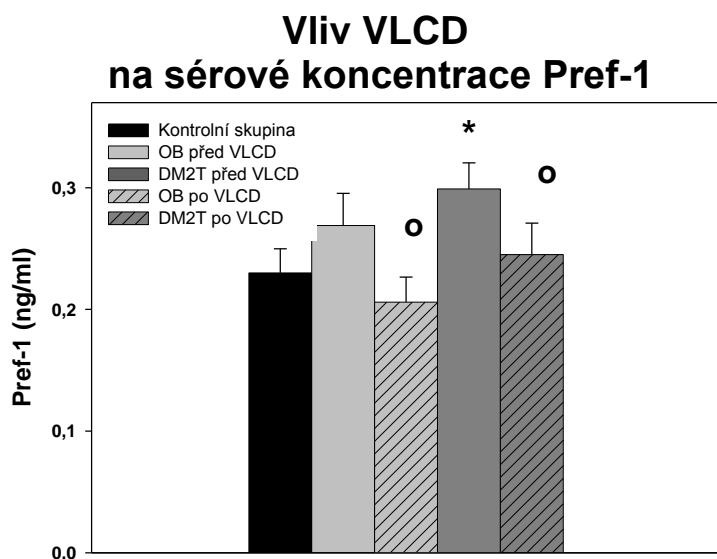
Statistická signifikance je vypočítána pomocí Spearmanova nebo Pearsonova korelačního testu, NS = nesignifikantní

9.1.6 Vliv VLCD, fenofibrátové léčby a hyperinzulinémie během clampu na sérové koncentrace Pref-1

Třítýdenní VLCD významně snížila cirkulující sérové hladiny Pref-1 u obou sledovaných skupin, obézních ($0,269 \pm 0,026$ ng/ml vs. $0,206 \pm 0,021$ ng/ml, $p = 0,005$) a skupiny s diabetem ($0,299 \pm 0,021$ ng/ml, $p = 0,010$) viz obrázek 2, zatímco léčba fenofibrátem na cirkulující hladiny Pref-1 u skupiny diabetiček vliv neměla ($0,209 \pm 0,020$ ng/ml vs. $0,231 \pm 0,029$ ng/ml, $p = 0,057$) viz obrázek 3.

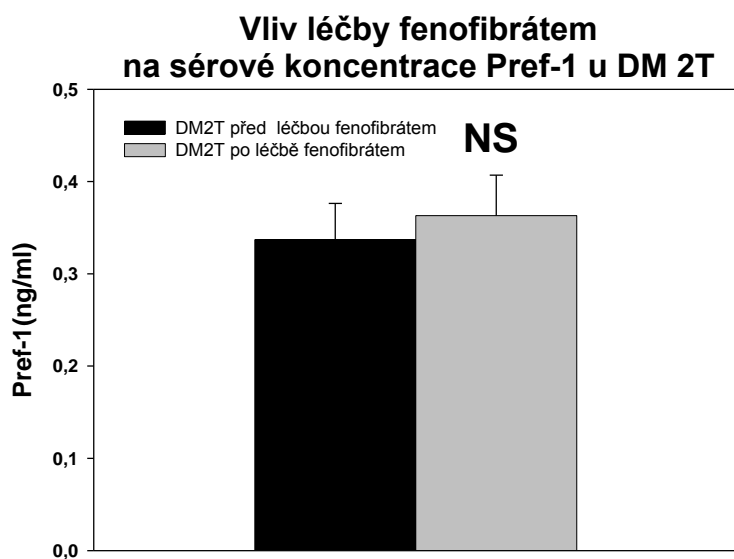
Tříhodinová akutní hyperinzulinémie navozená při hyperinzulinemickém isoglykemickém clampu významně snižovala cirkulující sérové hladiny Pref-1 u zdravých kontrolních subjektů a diabetiček před a po tříměsíční léčbě fenofibrátem (obr. 4). Pokles hladin Pref-1 v 90. minutě clampu byl významně výraznější u skupiny diabetiček léčených fenofibrátem ve srovnání s kontrolní skupinou a diabetičkami neléčenými fenofibrátem ($p < 0,026$). Podobný trend cirkulujících hladin Pref-1 byl pozorován ve 180. minutě, ačkoli rozdíl mezi sledovanými skupinami nebyl významný (obr. 4).

Obrázek 2: Sérové koncentrace Pref-1 u kontrolní skupiny, obézní skupiny před VLCD a po 3 týdenní VLCD, skupiny s diabetem před VLCD a po 3 týdenní VLCD.



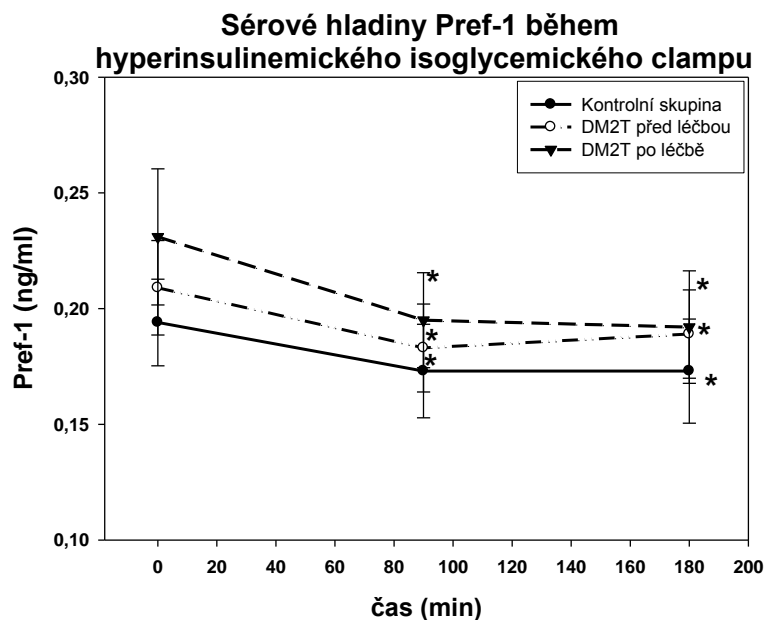
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. Statistická signifikance je vypočítána ANOVA (obézní, DM2T vs. kontrolní skupina nebo párového t-testu (obézní před VLCD vs. obézní po VLCD resp. DM2T před VLCD a DM2T po VLCD), * $p < 0,05$ DM2T vs. kontrolní skupina, ° $p < 0,05$ DM2T po VLCD nebo obézní po VLCD vs. DM2T nebo obézní před VLCD.

Obrázek 3: Vliv tříměsíční léčby fenofibrátem na sérové koncentrace Pref-1 u skupiny pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M.



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. NS – nesignifikantní.

Obrázek 4: Relativní změny koncentrace Pref-1 během hyperinzulinemického isoglykemického clampu u kontrolní skupiny zdravých žen (černá kolečka), obézních žen s DM2T před (prázdné kolečka) a po 3 měsících léčby PPAR- α agonistou fenofibrátem (černé trojúhelníky).



Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm S.E.M. Statistické signifikance byla vypočítána pomocí RM ANOVA.

* $p < 0,05$ vs. baseline příslušné skupiny

9.2 Vliv částečné realimentace na sérové koncentrace Pref-1 u pacientek s mentální anorexií

Antropometrické, hormonální a biochemické parametry kontrolní skupiny zdravých žen a pacientek s mentální anorexií před a po částečné realimentaci ukazuje tabulka 7. Při vstupu do studie byla tělesná hmotnost, BMI, obsah tělesného tuku, glykémie na lačno, sérová koncentrace inzulínu, TSH, volného T4, celkové bílkoviny, leptinu, klidového energetického výdeje, kostní denzity v bederní oblasti páteře a stehenní kosti u pacientek s mentální anorexií (MA) signifikantně nižší v porovnání se zdravými ženami z kontrolní skupiny.

Částečná realimentace pacientek s mentální anorexií vedla k signifikantnímu zvýšení tělesné hmotnosti, BMI, obsahu tělesného tuku, glykémie na lačno, sérové koncentrace inzulínu, leptinu, celkové bílkoviny, albuminu a klidového bazálního energetického výdeje.

Sérová koncentrace Pref-1, je ukázána na obrázku 5. Sérová koncentrace před zahájením realimentačního programu u pacientek s mentální anorexií (MA) se nelišila od kontrolní skupiny zdravých žen ($0,26 \pm 0,02$ vs. $0,32 \pm 0,05$ ng/ml, $p = 0,295$), taktéž se nelišila sérová koncentrace Pref-1 po částečné realimentaci u MA na rozdíl od kontrolní skupiny zdravých

žen ($0,35 \pm 0,04$ vs. $0,32 \pm 0,05$ ng/ml, $p = 0,578$). Částečná realimentace vedla k signifikantnímu zvýšení sérové koncentrace Pref-1 ($p = 0,015$) (obrázek 6).

Vztah mezi sérovou koncentrací Pref-1 a antropometrickými, biochemickými a hormonálními parametry byl vyjádřen pomocí Spermanova korelačního testu ve skupinách mentálních anorektiček před a po částečné realimentaci a kontrolní skupinou zdravých žen. Nebyl nalezen žádný vztah mezi cirkulujícími sérovými hladinami Pref-1 a sledovanými parametry na začátku studie před zahájením realimentačního programu. Totéž platí i pro vztah sérové koncentrace Pref-1 a BMI po částečné realimentaci ($p=0,161$). Naopak pozitivní korelace byla nalezena mezi cirkulující hladinou Pref-1 po částečné realimentaci a změnou BMI po realimentaci u pacientek trpících mentální anorexií (obrázek 7).

Tabulka 7: Antropometrická, hormonální a biochemická charakteristika kontrolní skupiny zdravých žen a pacientek s mentální anorexií před a po parciální realimentaci.

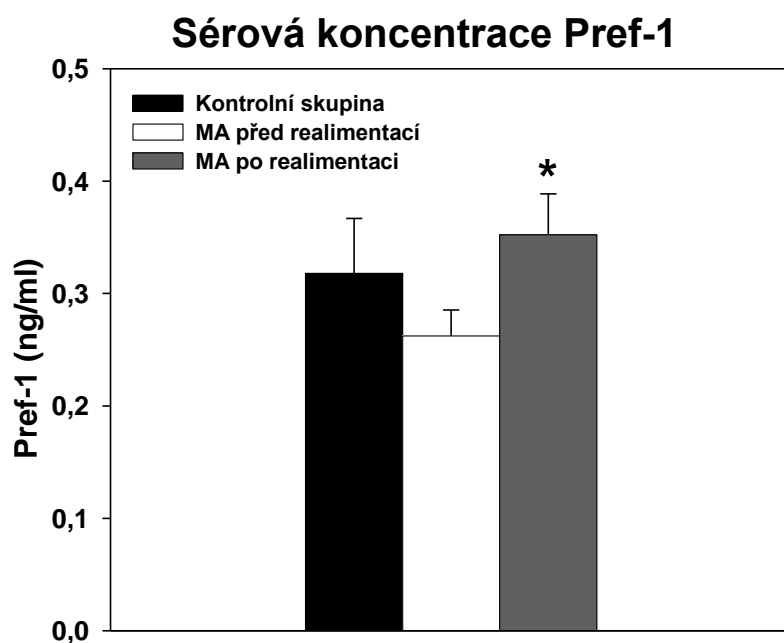
	Kontrolní	AN před	AN po
Věk (roky)	22,69 ± 0,76	24,39 ± 1,21	24,39 ± 1,21
Tělesná hmotnost (kg)	64,23 ± 1,91	42,59 ± 0,98 ^a	47,63 ± 0,91 ^{a, b}
Body mass index (kg/m ²)	21,80 ± 0,51	15,58 ± 0,28 ^a	17,44 ± 0,24 ^{a, b}
Obsah tělesného tuku (bodystat) (%)	20,07 ± 1,4	10,31 ± 1,8 ^a	13,3 ± 1,32 ^{a, b}
Obsah tělesného tuku (DEXA) (%)	26,19 ± 1,52	14,86 ± 1,58 ^a	18,71 ± 1,41 ^{a, b}
Klidový energetický výdej (kcal/day)	1405,75±30,63	1055,44±35,81 ^a	1166,00±24,02 ^{a, b}
Celkový cholesterol (mmol/l)	4,32 ± 0,19	7,64 ± 3,10	5,18 ± 0,24 ^a
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,76 ± 0,09	1,57 ± 0,10	1,63 ± 0,1
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,15 ± 0,13	2,37 ± 0,17	2,9 ± 0,20 ^a
Triglyceridy (mmol/l)	0,91 ± 0,12	1,52 ± 0,16 ^a	1,46 ± 0,17 ^a
Glykémie (mmol/l)	4,38 ± 0,08	3,97 ± 0,07 ^a	4,26 ± 0,08 ^b
Inzulín (μUI/ml)	19,29 ± 1,12	15,79 ± 0,75 ^a	16,1 ± 0,95 ^{a, b}
TSH (mIU)	2,25 ± 0,27	1,45 ± 0,21 ^a	-
Volný T4 (mIU)	14,19 ± 0,50	12,35 ± 0,51 ^a	-
Leptin (ng/ml)	11,8 ± 1,78	0,97 ± 0,23 ^a	2,62 ± 0,66 ^{a, b}
Celková bílkovina (g/l)	78,4 ± 1,28	69,66 ± 1,84 ^a	75,26 ± 0,97 ^b
Albumin (g/l)	46,36 ± 0,99	44,23 ± 1,03	47,32 ± 0,66 ^b
Celková BMD (g/cm ²)	1,08 ± 0,02	1,05 ± 0,02	1,04 ± 0,02 ^a
BMD femorální (g/cm ²)	0,96 ± 0,02	0,78 ± 0,03 ^a	-
BMD lumbální (g/cm ²)	0,99 ± 0,03	0,86 ± 0,03 ^a	-

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. Statistická signifikance je vypočítána pomocí nepárového nebo párového t-testu nebo Mann-Whitneyova testu

^a P < 0,05 vs. kontrolní skupina žen

^b P < 0,05 vs. anorexia nervosa před částečnou realimentací

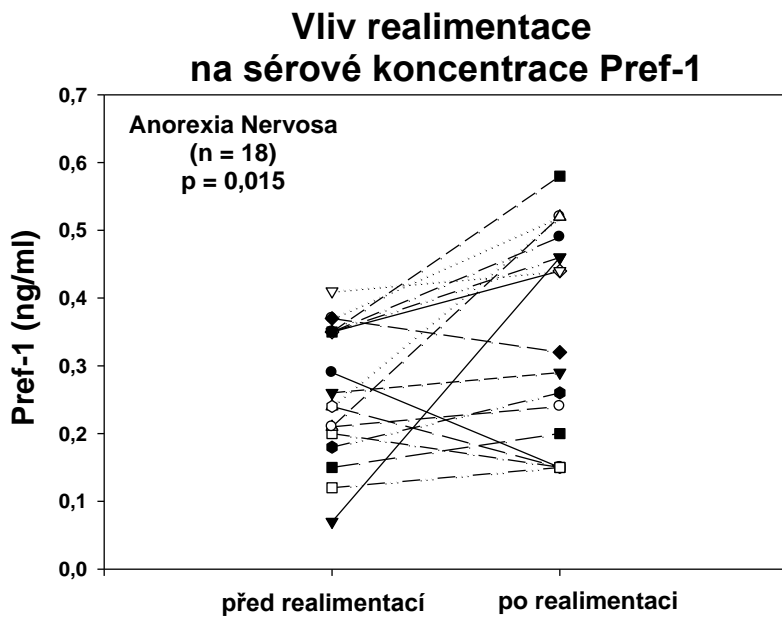
Obrázek 5: Sérová koncentrace Pref-1 u kontrolní skupiny (černý sloupec) a u patientek s mentální anorexií před (bílý sloupec) a po částečné realimentaci (šedivý sloupec).



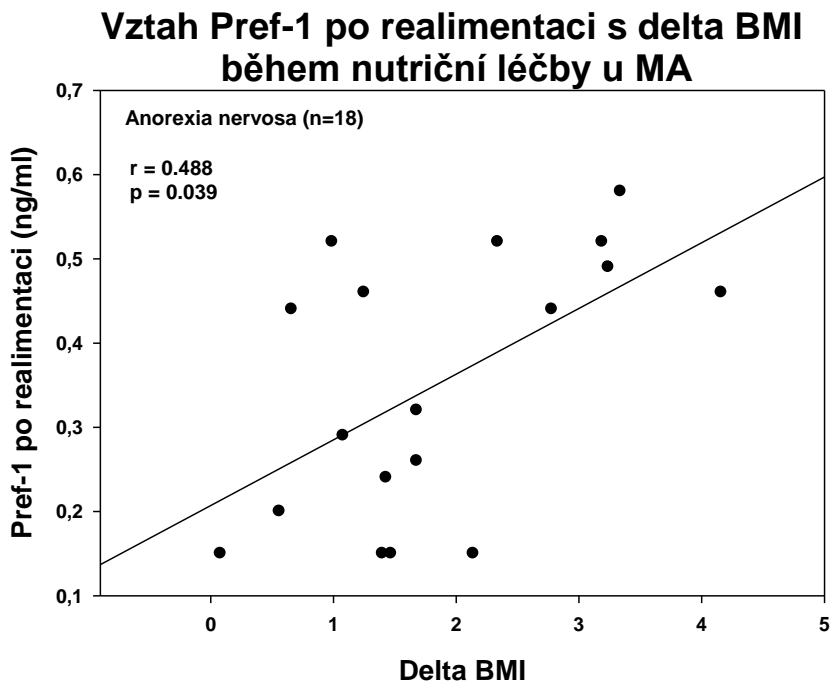
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± S.E.M. Statistická signifikance byla vypočítána nepárovým nebo párovým t-testem nebo Mann-Whitney testem.

* p < 0,05 vs. anorexia nervosa před částečnou realimentací

Obrázek 6: Vliv částečné realimentace na sérové koncentrace Pref-1 zobrazeno individuálně u jednotlivých pacientek s mentální anorexií.



Obrázek 7: Vztah sérových koncentrací Pref-1 po částečné realimentaci a změnou BMI během nutriční léčby u pacientek s mentální anorexií.



Statistická signifikance byla vypočítána pomocí Spearmanovy korelace.

10. DISKUZE

Předchozí studie ukázaly, že Pref-1 hraje důležitou roli v regulaci konverze preadipocytů ve zralé adipocyty a působí jako inhibitor adipocytární diferenciaci *in vitro* a *in vivo* [214]. Downregulace nebo inhibice Pref-1 je spojena s indukci a stimulací adipocytární diferenciaci a adipogeneze [215-217]. Zvýšené hladiny Pref-1 jsou spojeny s inzulínovou rezistencí a inhibicí adipocytární diferenciaci nebo dediferenciaci zralých adipocytů [200]. Signifikantně zvýšené bazální sérové hladiny Pref-1 u obézních pacientek s DM 2. typu ve srovnání se zdravými, štíhlými ženami naznačují možnou spojitost mezi zvýšenými koncentracemi Pref-1 a zhoršenou adipocytární diferenciací a zároveň inzulínovou rezistencí u obézních diabetických pacientek. Výsledky naší studie prokázaly, že vyšší cirkulující hladiny Pref-1 u pacientek s diabetem pozitivně korelují se sérovými hladinami inzulínu, glukózy, leptinu a HOMA indexem, což je v souladu s experimentálními daty ukazující zvýšené hladiny Pref-1 u myšího modelu lipodystrofie vyznačujícího se nadměrnou expresí Pref-1 [6], nSREBP-1c [218] a leptinového receptoru β [219] spojeného s inzulínovou rezistencí. Celkově tyto poznatky naznačují, že zvýšené hladiny Pref-1 u obézních inzulínrezistentních jedinců mohou přispívat k omezení preadipocytární diferenciaci a snížení počtu „zdravých, štíhlých“ adipocytárních dep, což následně vede k nadměrnému ukládání tuků ve zralých adipocytech [202]. Snížená kapacita tukové tkáně pro ukládání tuků vede k jejich ektopickému ukládání v jaterní a svalové tkáni, což může představovat možný mechanismus, kterým zvýšené hladiny Pref-1 přispívají k rozvoji inzulínové rezistence. Těžká inzulínová rezistence a hypertriglyceridémie u myší s nadměrnou expresí Pref-1 byla přičítána hlavně snížení inzulínem stimulovaného vychytávání glukózy v kosterním svalu a tukové tkáni a byla spojena se zhoršenou inzulínovou signalizací a zvýšeným obsahem diacylglycerolů v kosterním svalu [6]. Naše výsledky získané za použití clampu ukazují, že pacientky s diabetes mellitus 2. typu se zvýšenými hladinami Pref-1 mají signifikantně snížené celotělové vychytávání glukózy, což můžeme za těchto podmínek přičíst svalové IR (sval je v podmínkách hyperinzulinemického clampu zodpovědný za 70-80 % spotřebované glukózy). Jak ukazují výsledky nedávno provedených studií, nižší exprese Pref-1 v tukové tkáni metabolicky zdravých, obézních jedinců v porovnání s metabolicky nezdravými jedinci odráží zvýšenou adipogenní kapacitu a tudíž velmi pravděpodobně hraje významnou roli v ochraně organismu proti nežádoucímu metabolickému profilu spojeného s nadměrným ektopickým ukládáním tuku [202]. V naší studii se hladiny Pref-1 obézních pacientek bez DM 2. typu nelišily od hladin zdravých kontrolních subjektů, ale současně byla zaznamenána tendence

(nesignifikantní) k nižším hodnotám u těchto jedinců ve srovnání se skupinou s DM 2. typu navzdory signifikantně vyššímu BMI. Tento fakt může být částečně vysvětlen velikostí vyšetřované skupiny subjektů bez metabolických onemocnění.

Je zajímavé, že výsledky experimentálních studií provedených na myších se sníženými hladinami Pref-1 neukazují jednoznačně příznivý metabolický efekt, což naznačuje složitost působení Pref-1. Myši s úplným chyběním Pref-1 se vyznačují retardací růstu, vysokou perinatální mortalitou, abnormalitami skeletu a zvýšeným množstvím tělesného tuku, jsou-li krmeny dietou s vysokým obsahem tuku. Vyšetření tukové tkáně Pref-1-null myši odhalilo, že ke zvýšení obsahu tělesného tuku přispívá zvýšení diferenciací adipocytů a jejich zvýšené zrání [201]. Celkově však mohou být metabolické výsledky u těchto zvířat jistě modifikovány komplexními fenotypickými vlivy chybění Pref-1 v jiných tkáních a orgánech.

Potlačení exprese Pref-1 a následně obnovení adipocytární diferenciací byly zkoumány v několika studiích. Použití dexametazonu, složky diferenciací činidel, inhibuje transkripci Pref-1 a tím podporuje adipogenezi, z čehož vyplývá, že downregulace Pref-1 je nezbytná pro správnou konverzi preadipocytů na adipocyty [220]. Výsledky studie zkoumající vliv oxidovaného LDL na rovnováhu mezi diferenciací a proliferací v 3T3-L1 preadipocytech ukázaly, že preadipocyty léčené oxidovaným LDL vykazovaly vysokou rychlost proliferace, nízkou úroveň apoptózy, a zhoršenou diferenciací za současného zvýšení exprese Pref-1. Inhibice exprese Pref-1 použitím zvýšené koncentrace dexametazonu došlo k diferenciaci preadipocytů jako obvykle, což ukazuje na klíčovou roli Pref-1 v procesu adipogeneze [221]. Potlačení inhibičního efektu Pref-1 na adipogenní diferenciaci svalových buněk je zprostředkována inzulínem přítomným v diferenciací mediu [222]. V naší studii bylo ukázáno signifikantní snížení hladin Pref-1 zprostředkované akutní hyperinzulinémií při hyperinzulinemickém izoglykemickém clampu jak u zdravých jedinců, tak u diabetiček 2. typu před i po léčbě PPAR- α agonistou fenofibrátem, což potvrzuje přímý vliv inzulínu na hladiny Pref-1. Naše data však neumožňují vysvětlit přesný mechanismus působení inzulínu na regulaci Pref-1 a jeho modulaci fibrátovou léčbou. Křivka změn hladin Pref-1u zdravých subjektů a diabetických pacientů po fenofibrátové léčbě byla podobná a vyznačovala se prudkým poklesem hladin Pref-1 po 90. minutě hyperinzulinémie následované stabilizací hladin Pref-1. Naopak hladiny Pref-1 u diabetiček neléčených fenofibrátem ukázaly pomalý růst na konci clampu. Tyto výsledky mohou naznačovat, že fenofibrátová léčba zlepšuje sekreční odpověď Pref-1 na inzulín. Zajímavé je, že supresivní účinek inzulínu na hladiny Pref-1 prokázány při clampu je v rozporu s bazálním zjištěním nejvyšších hladin Pref-1 u hyperinzulinemických pacientek, kterými jsou diabetičky 2. typu. Toto paradoxní zjištění

může být vysvětleno významným rozdílným vlivem akutní a chronické hyperinzulinémie na cirkulující hladiny Pref-1, ačkoliv přesné vysvětlení mechanismu tohoto rozporu bude vyžadovat další analýzy.

V další části naší práce, jsme zkoumali vliv snížení tělesné hmotnosti na cirkulující hladiny Pref-1 během VLCD u obézních pacientek s a bez diabetes mellitus 2. typu. Z výsledků naší studie vyplývá, že sérové hladiny Pref-1 jsou po VLCD sniženy za současného zlepšení parametrů inzulínové rezistence (pokles glykémie, inzulínémie, HOMA-indexu, leptinémie) u diabetiček 2. typu a snížení tělesné hmotnosti a celkového cholesterolu u obou sledovaných skupin. Tyto výsledky naznačují, že downregulace Pref-1 se může podílet na pozitivním metabolickém účinku kalorické restrikce díky zvýšení diferenciaci preadipocytů v prostředí nízkých hladin Pref-1.

V naší práci jsme se také zabývali vlivem léčby PPAR- α agonistů na cirkulující hladiny Pref-1. Aktivace PPAR- α u zvířecích modelů obezity a inzulínové rezistence má za následek zlepšení inzulínové rezistence stimulací oxidace mastných kyselin ve svalové a jaterní tkáni, která vede ke sníženému ektopickému ukládání tuků v těchto tkáních [223]. Zvýšené hladiny Pref-1 jsou pozorovány společně se zvýšenou stimulací oxidace mastných kyselin, která je způsobena PPAR- α a je doprovázena snížením syntézy triglyceridů a mRNA exprese PPAR- γ v potkaních adipocytech během léčby bezafibrátem [224] nebo během hyperleptinémie navozené adenovirem a doprovázené ztrátou obsahu tělesného tuku u potkanů [225]. V naší studii vedla léčba fenofibrátem k nepatrnému zhoršení kontroly diabetu, projevující se zvýšením hladin glykovaného hemoglobinu, ačkoliv hladiny triglyceridů byly sniženy. Nedostatečná diabetická kompenzace po fenofibrátové léčbě byla popsána i v několika dalších studiích [226, 227]. Jako možné vysvětlení tohoto faktu se jeví jak nižší exprese PPAR- α v jaterní tkáni u lidí ve srovnání s potkany, tak i chybění vlivu léčby fenofibrátem na tělesnou hmotnost [228]. Tento vliv totiž u lidí není na rozdíl od hlodavců přítomen. Výsledky naší studie neprokázaly vliv léčby fenofibrátem na cirkulující hladiny Pref-1 u diabetiček 2. typu, přestože zde byla patrná zvýšená hladina Pref-1. Tento fakt může být částečně vysvětlen malým počtem pacientek ve sledované skupině podstupující léčbu fenofibrátem a relativně krátkým trváním této farmakologické intervence. Jak již bylo dříve zmíněno, ačkoli vedla léčba fenofibrátem ke zvýšení Pref-1 a zároveň zhoršení inzulínové rezistence, byl prokázán pozitivní supresivní efekt akutní hyperinzulinémie na cirkulující hladiny Pref-1, což dokazuje existenci regulačního mechanismu zodpovědného za sekreci a účinek Pref-1. Obecně lze shrnout, že obézní, diabetické ženy mají signifikantně zvýšené cirkulující hladiny Pref-1 v porovnání se zdravými, štíhlými ženami, což potvrzuje teorii, že Pref-1 zhoršuje

adipocytární diferenciaci spolu s rozvojem inzulínové rezistence, obezity a diabetes mellitus 2. typu. Spojitost mezi inzulínovou rezistencí a hladinami Pref-1 je potvrzena faktem, že zlepšení inzulínové senzitivity je zároveň doprovázeno sníženými hladinami Pref-1 po kalorické restrikci.

Ve druhé části našeho výzkumu jsme se zaměřili na sledování cirkulujících hladin Pref-1 u metabolického onemocnění, které se řadí stejně jako obezita mezi poruchy příjmu potravy, ale leží na opačném konci spektra těchto chorob. Jde o mentální anorexii, která je charakterizována úmyslným odmítáním potravy, malnutricí, úbytkem tukové tkáně a zvyšováním energetického výdeje. Příčina tohoto onemocnění není zatím zcela objasněna, proto i její léčba zůstává velmi obtížná. Pacienti trpící mentální anorexií vykazují změny v cirkulujících hladinách hormonů řídících příjem potravy včetně leptinu, ghrelinu a dalších v kombinaci s dalšími metabolickými a hormonálními abnormalitami [229-231]. Typickým znakem tohoto onemocnění je značné snížení obsahu tělesného tuku [232] a s tím související alterovaná endokrinní funkce tukové tkáně projevující se např. sníženými sérovými hladinami leptinu nebo naopak zvýšenými hladinami adiponektinu [233, 234]. Pref-1 hraje důležitou roli v adipocytární a osteoblastové diferenciaci [4, 5] a může nepřímo ovlivňovat regulaci kostního metabolismu a kostní denzitu. Dosud existuje jen velmi málo údajů o regulaci cirkulujících hladin Pref-1 u pacientů s MA a vlivu parciální realimentace na jeho hladiny. Na základě experimentálních dat ukazujících snížení obsahu tělesného tuku a změn v energetické homeostáze u myši nadměrně exprimujících Pref-1, vznikla naše hypotéza, že změny v sérových koncentracích Pref-1 mohou přispívat k etiopatogenezi mentální anorexie nebo k objasnění metabolických abnormalit doprovázející toto onemocnění.

Důležitým zjištěním naší studie je, že částečná realimentace u pacientek s mentální anorexií významně zvýšila cirkulující sérové hladiny Pref-1. Naopak hodnoty Pref-1 u MA před a po realimentaci se nelišily od hodnot zdravých žen. Tento fakt může být vysvětlen tím, že dynamické změny v cirkulujících sérových hladinách mohou být důležitější než absolutní koncentrace při procesu realimentace. Pref-1 je protein obsahující 385 aminokyselin, který je u lidí exprimován preadipocyty (nikoli však adipocyty) a jinými tkáněmi včetně buněk pankreatických ostrůvků, stromálních buněk brzlíku a buněk nadledvin [235]. Experimentální studie ukazují, že cirkulující hladiny Pref-1 se mohou přímo podílet na řízení ukládání lipidů a lipidového a glukózového metabolismu [6, 7, 201]. Myši s knockoutem genu pro Pref-1 krmené vysokotukovou dietou vykazují retardaci růstu, kosterní abnormality, zvýšený obsah tuku [201], což podporuje roli Pref-1 v regulaci adipocytární diferenciaci. Naopak mladé,

dospělé myši s nadměrnou expresí Pref-1 vykazují značnou redukci bílé tukové tkáně jako výsledek zhoršené adipocytární diferenciaci [6]. Tyto myši jsou rezistentní k obezitě vyvolané vysokotukovou dietou, ale naopak se u nich vyvíjí hypertriglyceridémie, zhoršená glukózová tolerance a inzulinová rezistence v důsledku nemožnosti správného vývoje tukové tkáně lépe řečeno její kapacitní nedostatečnosti [7]. Velice málo studií se zabývá cirkulujícími hladinami Pref-1 u lidí s malnutricí. Ve studii provedené Fazelim a kol. byly zjištěny signifikantně vyšší cirkulující hladiny u skupiny neléčených pacientek s mentální anorexií ve srovnání se zdravými ženami s normální tělesnou hmotností [211]. V této studii je uváděna pozitivní korelace cirkulujících hladin Pref-1 s množstvím tuku kostní dřeně v proximální části stehenní kosti. Na rozdíl od těchto výsledků jsme v naší studii neprokázali signifikantní rozdíl mezi cirkulujícími hladinami Pref-1 u pacientek s MA a zdravých žen. Rozdíl mezi výsledky naší studie a výsledky studie provedené Fazelim může být vysvětlen nižší hmotností u našich pacientek s MA oproti skupině vyšetřované Fazelim a odlišnou dobou trvání onemocnění. Výsledky naší studie ukazují, že částečná realimentace signifikantně zvyšuje cirkulující hladiny Pref-1, což naznačuje, že změny v nutričním stavu mohou signifikantně ovlivňovat produkci Pref-1 a jeho uvolňování z tukové tkáně. Toto zjištění je zajímavé vzhledem k tomu, že jsme neprokázali signifikantní souvislost s antropometrickými, biochemickými nutričními parametry v našem studovaném souboru pacientek. Tyto naše výsledky ukazují, že dynamické změny nutričního stavu ovlivňují koncentrace Pref-1 podstatně více než dlouhodobý stav nutriční. Naše výsledky byly získány testováním dynamických změn Pref-1 u skupiny pacientek s mentální anorexií po částečné realimentaci, zatímco nadměrná alimentace u kontrolní skupiny nebyla prováděna. Proto změny nalezené u skupiny žen trpících mentální anorexií nemohou být obecně extrapolovány na jiné stavy jako je např. obezita spojená s pozitivní energetickou bilancí. Zvýšené hladiny Pref-1 u pacientek s MA po částečné realimentaci signifikantně korelují se změnami BMI. Tato souvislost ukazuje, že produkce Pref-1 v tukové tkáni po realimentaci velmi pravděpodobně odráží její diferenciací kapacitu a/nebo počet preadipocytů. Pacienti vykazující vyšší hladiny Pref-1 a vyšší počet preadipocytů v tukové tkáni mohou mít vyšší hmotnostní přírůstky ve srovnání s pacienty s nižším počtem preadipocytů v tukové tkáni a s tím souvisejícími nižšími hladinami Pref-1. Lze tedy shrnout, že cirkulující hladiny Pref-1 u námi sledovaných neléčených pacientek s mentální anorexií se neliší od zdravých žen, ale jsou naopak zvýšené po částečné realimentaci, která koreluje se změnami BMI.

11. ZÁVĚR A SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ PRÁCE

Obezita, spolu s jejími komorbiditami a celosvětově se zvyšující prevalencí představuje závažný zdravotní, celospolečenský a v neposlední řadě i ekonomický problém. Obezita je charakterizována hypertrofií a hyperplazií tukové tkáně, která ve zvýšené míře produkuje celou řadu působků s endokrinním, exokrinním a parakrinním působením. Tyto faktory mají velký význam v regulaci metabolismu sacharidů, lipidů i celkového energetického metabolismu. Dysbalance v produkci těchto působků přispívá ke vzniku přidružených onemocnění doprovázející obezitu (inzulínová rezistence, diabetes mellitus 2. typu, arteriální hypertenze, hyperlipidémie, hyperurikémie, prokoagulační stav, endoteliální dysfunkce a zvýšení markerů subklinického zánětu). Z tohoto důvodu se do popředí výzkumného zájmu dostává studium nových faktorů produkovaných tukovou tkání, které mohou mít etiopatogenetickou souvislost s těmito chorobami. Jedním z těchto faktorů může být i Preadipocytární faktor-1. Sledování jeho cirkulujících hladin, funkce a působení u dvou nutričně odlišných stavů – obezity a mentální anorexie, se stalo předmětem naší práce.

Preadipocytární faktor-1 (Pref-1) je nedávno objevený faktor, který je ve velké míře exprimován preadipocyty, snížen při diferenciaci adipocytů a úplně chybí u zralých adipocytů [4, 5]. Pref-1 odráží stupeň adipocytární diferenciace *in vitro* a *in vivo* a je proto používán jako preadipocytární marker. Jeho exprese je snížena působením adipogenních faktorů (dexametazon) a naopak zvýšena antiadipogenním působením růstového hormonu, jehož stimulační účinek je způsoben aktivací FoxA2 [196]. Pref-1 inhibuje diferenciaci adipocytů aktivací MEK/ERK [199], akumulaci lipidů, expresi adipocytárních transkripčních faktorů jako jsou PPAR γ a C/EBP α a dalších markerů včetně FAS (fatty acid synthase), stearoyl - coenzym A desaturázy a FABP4/aP2. Zvýšené hladiny Pref-1 jsou spojeny se zhoršenou adipocytární diferenciací nebo dediferenciací zralých adipocytů a inzulínovou rezistencí [200]. V naší studii jsme ukázali, že cirkulující sérové koncentrace Pref-1 byly signifikantně vyšší u skupiny obézních pacientek s diabetem ve srovnání s kontrolní skupinou, zatímco u skupiny obézních bez diabetu nebyl ve srovnání s kontrolní skupinou rozdíl zaznamenán. V kombinované populaci štíhlých, zdravých žen a obézních žen s DM 2. typu cirkulující hladiny Pref-1 pozitivně korelovaly s hladinou inzulínu, HOMA indexem, glykemií, leptinemií nikoli však s BMI, celkovým cholesterolem a adiponektinem. Sledování vlivu třítydenní VLCD prokázalo, signifikantní snížení cirkulujících sérových hladin Pref-1 jak u obézních, tak u obézních s diabetem. Změny v cirkulujících hladinách Pref-1, u pacientek podstupujících tříměsíční léčbu fenofibrátem, nebyly prokázány. Výsledky naší

studie dále prokázaly, že tříhodinová akutní hyperinzulinémie navozená při hyperinzulinemickém isoglykemickém clampu signifikantně snižovala cirkulující sérové hladiny Pref-1 u zdravých žen a diabetiček před a po tříměsíční léčbě fenofibrátem. Snížení hladin Pref-1 v 90. minutě clampu bylo signifikantně výraznější u skupiny diabetiček léčených fenofibrátem ve srovnání s kontrolní skupinou a diabetiček neléčených fenofibrátem. Podobný trend cirkulujících hladin Pref-1 byl pozorován ve 180. minutě, ačkoli rozdíl mezi sledovanými skupinami nebyl signifikantní.

V další části studie, kde jsme sledovali cirkulující hladiny Pref-1 u pacientek s mentální anorexií, jsme neprokázali rozdíl cirkulujících hladin Pref-1 mezi skupinou s MA a skupinou zdravých žen z kontrolní skupiny. Naopak částečná realimentace vedla k signifikantnímu zvýšení sérové koncentrace Pref-1. Neméně významným zjištěním je nález pozitivní korelace mezi hladinami Pref-1 po částečné realimentaci a změnou BMI taktéž po realimentaci u pacientek s MA.

Závěrem lze shrnout, že produkce Pref-1 preadipocyty v tukové tkáni a jeho následné působení v organizmu neodráží pouze akutní nutriční stav, ale je součástí dynamických metabolických změn organizmu, které musí být chápány jako součást celkového dlouhodobého stavu sledovaného organizmu. Hledání patofyziologických souvislostí mezi působky produkovanými tukovou tkání a vznikem metabolických onemocnění bude vyžadovat další intenzivní výzkumy jak *in vitro* tak i *in vivo*.

12. LITERATURA

1. Van Gaal, L.F., I.L. Mertens, and C.E. De Block, *Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease*. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 875-80.
2. Bluher, M., *Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy*. *Mol Metab*, 2014. 3(3): p. 230-40.
3. Bluher, M., *Clinical relevance of adipokines*. *Diabetes Metab J*, 2012. 36(5): p. 317-27.
4. Smas, C.M. and H.S. Sul, *Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation*. *Cell*, 1993. 73(4): p. 725-34.
5. Wang, Y., et al., *Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis*. *J Nutr*, 2006. 136(12): p. 2953-6.
6. Lee, K., et al., *Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1)*. *J Clin Invest*, 2003. 111(4): p. 453-61.
7. Villena, J.A., et al., *Resistance to high-fat diet-induced obesity but exacerbated insulin resistance in mice overexpressing preadipocyte factor-1 (Pref-1): a new model of partial lipodystrophy*. *Diabetes*, 2008. 57(12): p. 3258-66.
8. Shuldiner, A.R., R. Yang, and D.W. Gong, *Resistin, obesity and insulin resistance--the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ*. *N Engl J Med*, 2001. 345(18): p. 1345-6.
9. Miller, J.L., *Insulin resistance syndrome. Description, pathogenesis, and management*. *Postgrad Med*, 2003. Spec No: p. 27-34.
10. Reaven, G.M., *Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988*. *Nutrition*, 1997. 13(1): p. 65; discussion 64, 66.
11. Olefsky, J.M. and O.G. Kolterman, *Mechanisms of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent (type II) diabetes*. *Am J Med*, 1981. 70(1): p. 151-68.
12. Bonora, E., et al., *Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study*. *Diabetes*, 1998. 47(10): p. 1643-9.
13. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. *Circulation*, 2009. 120(16): p. 1640-5.
14. Hedekov, C.J., *Mechanism of glucose-induced insulin secretion*. *Physiol Rev*, 1980. 60(2): p. 442-509.
15. Prentki, M. and F.M. Matschinsky, *Ca²⁺, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion*. *Physiol Rev*, 1987. 67(4): p. 1185-248.
16. Malaisse, W.J., *Calcium Entry and Activation of Endocrine-Cells*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1988. 522: p. 284-295.
17. Malaisse, W.J. and L. Orci, *The role of the cytoskeleton in pancreatic B-cell function*. *Methods Achiev Exp Pathol*, 1979. 9: p. 112-36.
18. Seta, K.A. and R.A. Roth, *Overexpression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 231(1): p. 167-71.
19. Balasse, E.O. and F. Fery, *Ketone body production and disposal: effects of fasting, diabetes, and exercise*. *Diabetes Metab Rev*, 1989. 5(3): p. 247-70.
20. Robinson, A.M. and D.H. Williamson, *Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues*. *Physiol Rev*, 1980. 60(1): p. 143-87.

21. Hasselbalch, S.G., et al., *Brain metabolism during short-term starvation in humans*. J Cereb Blood Flow Metab, 1994. 14(1): p. 125-31.
22. Passonneau, J.V. and O.H. Lowry, *The role of phosphofructokinase in metabolic regulation*. Adv Enzyme Regul, 1964. 2: p. 265-74.
23. Hue, L., L. Maisin, and M.H. Rider, *Palmitate inhibits liver glycolysis. Involvement of fructose 2,6-bisphosphate in the glucose/fatty acid cycle*. Biochem J, 1988. 251(2): p. 541-5.
24. Claus, T.H., et al., *The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism*. Curr Top Cell Regul, 1984. 23: p. 57-86.
25. Boden, G., X. Chen, and N. Iqbal, *Acute lowering of plasma fatty acids lowers basal insulin secretion in diabetic and nondiabetic subjects*. Diabetes, 1998. 47(10): p. 1609-12.
26. Jacqueminet, S., et al., *Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration*. Metabolism, 2000. 49(4): p. 532-6.
27. Krssak, M., et al., *Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study*. Diabetologia, 1999. 42(1): p. 113-6.
28. Pan, D.A., et al., *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action*. Diabetes, 1997. 46(6): p. 983-8.
29. Kim, J.K., et al., *Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(13): p. 7522-7.
30. Wang, H., et al., *Skeletal muscle-specific deletion of lipoprotein lipase enhances insulin signaling in skeletal muscle but causes insulin resistance in liver and other tissues*. Diabetes, 2009. 58(1): p. 116-24.
31. Goudriaan, J.R., et al., *CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice*. J Lipid Res, 2003. 44(12): p. 2270-7.
32. Kim, J.K., et al., *Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle*. J Clin Invest, 2004. 113(5): p. 756-63.
33. Falcon, A., et al., *FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. 299(3): p. E384-93.
34. Doege, H., et al., *Silencing of hepatic fatty acid transporter protein 5 in vivo reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and improves hyperglycemia*. J Biol Chem, 2008. 283(32): p. 22186-92.
35. Fujioka, S., et al., *Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity*. Metabolism, 1987. 36(1): p. 54-9.
36. Despres, J.P., et al., *Role of deep abdominal fat in the association between regional adipose tissue distribution and glucose tolerance in obese women*. Diabetes, 1989. 38(3): p. 304-9.
37. Pouliot, M.C., et al., *Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels*. Diabetes, 1992. 41(7): p. 826-34.
38. Kissebah, A.H., *Intra-abdominal fat: is it a major factor in developing diabetes and coronary artery disease?* Diabetes Res Clin Pract, 1996. 30 Suppl: p. 25-30.
39. Rask, E., et al., *Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(3): p. 1418-21.
40. Siiteri, P.K., *Adipose tissue as a source of hormones*. Am J Clin Nutr, 1987. 45(1 Suppl): p. 277-82.
41. Calle, E.E. and R. Kaaks, *Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(8): p. 579-91.

42. Baglietto, L., et al., *Circulating steroid hormone concentrations in postmenopausal women in relation to body size and composition*. Breast Cancer Res Treat, 2009. 115(1): p. 171-9.
43. Mullerova, D. and J. Kopecky, *White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants*. Physiol Res, 2007. 56(4): p. 375-81.
44. Jandacek, R.J., et al., *Effects of yo-yo diet, caloric restriction, and olestra on tissue distribution of hexachlorobenzene*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. 288(2): p. G292-9.
45. Walford, R.L., et al., *Physiologic changes in humans subjected to severe, selective calorie restriction for two years in biosphere 2: health, aging, and toxicological perspectives*. Toxicol Sci, 1999. 52(2 Suppl): p. 61-5.
46. Smith, R.E. and B.A. Horwitz, *Brown fat and thermogenesis*. Physiol Rev, 1969. 49(2): p. 330-425.
47. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. Physiol Rev, 2004. 84(1): p. 277-359.
48. Avram, A.S., M.M. Avram, and W.D. James, *Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue*. J Am Acad Dermatol, 2005. 53(4): p. 671-83.
49. Morton, N.M., et al., *Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice*. J Biol Chem, 2001. 276(44): p. 41293-300.
50. Poissonnet, C.M., M. LaVelle, and A.R. Burdi, *Growth and development of adipose tissue*. J Pediatr, 1988. 113(1 Pt 1): p. 1-9.
51. Burdi, A.R., et al., *Adipose tissue growth patterns during human gestation: a histometric comparison of buccal and gluteal fat depots*. Int J Obes, 1985. 9(4): p. 247-56.
52. Matsuzawa, Y., et al., *Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity*. Obes Res, 1995. 3 Suppl 2: p. 187S-194S.
53. Garg, A., *Regional adiposity and insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(9): p. 4206-10.
54. Jensen, M.D. and C.M. Johnson, *Contribution of leg and splanchnic free fatty acid (FFA) kinetics to postabsorptive FFA flux in men and women*. Metabolism, 1996. 45(5): p. 662-6.
55. Shioji, K., et al., *[Hypoadiponectinemia implies the development of atherosclerosis in carotid and coronary arteries]*. J Cardiol, 2005. 46(3): p. 105-12.
56. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. 105(9): p. 1135-43.
57. Afzelius, B.A., *Brown adipose tissue: its gross anatomy, histology, and cytology.*, in *Brown adipose tissue*, O. Lindberg, Editor. 1970, Elsevier: Amsterdam. p. 1-31.
58. Geloan, A., et al., *In vivo differentiation of brown adipocytes in adult mice: an electron microscopic study*. Am J Anat, 1990. 188(4): p. 366-72.
59. Napolitano, L. and D.W. Fawcett, *The fine structure of brown adipose tissue in the newborn mouse and rat*. J Biophys Biochem Cytol, 1958. 4: p. 685-90.
60. Bonnot, E., *The Interscapular Gland*. J Anat Physiol, 1908. 43(Pt 1): p. 43-58.
61. Houstek, J., et al., *Type II iodothyronine 5'-deiodinase and uncoupling protein in brown adipose tissue of human newborns*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. 77(2): p. 382-7.
62. Lean, M.E., *Brown adipose tissue in humans*. Proc Nutr Soc, 1989. 48(2): p. 243-56.
63. Fukuchi, K., et al., *Visualization of interscapular brown adipose tissue using (99m)Tc-tetrofosmin in pediatric patients*. J Nucl Med, 2003. 44(10): p. 1582-5.

64. Okuyama, C., et al., *123I-Metaiodobenzylguanidine uptake in the nape of the neck of children: likely visualization of brown adipose tissue*. J Nucl Med, 2003. 44(9): p. 1421-5.
65. Penicaud, L., et al., *The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance*. Nutrition, 2000. 16(10): p. 903-8.
66. Himms-Hagen, J., *Does brown adipose tissue (BAT) have a role in the physiology or treatment of human obesity?* Rev Endocr Metab Disord, 2001. 2(4): p. 395-401.
67. Saito, M., et al., *High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity*. Diabetes, 2009. 58(7): p. 1526-31.
68. Stanford, K.I., et al., *Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity*. J Clin Invest, 2013. 123(1): p. 215-23.
69. Townsend, K. and Y.H. Tseng, *Brown adipose tissue: Recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential*. Adipocyte, 2012. 1(1): p. 13-24.
70. Himms-Hagen, J., et al., *Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. 279(3): p. C670-81.
71. Cinti, S., *Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ*. J Endocrinol Invest, 2002. 25(10): p. 823-35.
72. Wu, J., P. Cohen, and B.M. Spiegelman, *Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?* Genes Dev, 2013. 27(3): p. 234-50.
73. Fonseca, V., et al., *Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in diabetes*. Endocr Rev, 2004. 25(1): p. 153-75.
74. Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity*. Nat Med, 2001. 7(8): p. 941-6.
75. Ran, J., et al., *Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance*. Metabolism, 2006. 55(4): p. 478-88.
76. Chu, N.F., et al., *Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men*. Atherosclerosis, 2001. 157(2): p. 495-503.
77. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. 372(6505): p. 425-32.
78. Tritos, N.A. and C.S. Mantzoros, *Leptin: its role in obesity and beyond*. Diabetologia, 1997. 40(12): p. 1371-9.
79. Wajchenberg, B.L., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome*. Endocr Rev, 2000. 21(6): p. 697-738.
80. Hamilton, B.S., et al., *Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans*. Nat Med, 1995. 1(9): p. 953-6.
81. Soliman, A.T., et al., *Serum leptin concentrations during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function*. Metabolism, 2000. 49(7): p. 819-25.
82. Pelleymounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. Science, 1995. 269(5223): p. 540-3.
83. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 1995. 270(45): p. 26746-9.
84. Polak, J., et al., *Total adiponectin and adiponectin multimeric complexes in relation to weight loss-induced improvements in insulin sensitivity in obese women: the NUGENOB study*. Eur J Endocrinol, 2008. 158(4): p. 533-41.

85. Ouchi, N., et al., *Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages.* *Circulation*, 2001. 103(8): p. 1057-63.
86. Housova, J., et al., *Serum adiponectin and resistin concentrations in patients with restrictive and binge/purge form of anorexia nervosa and bulimia nervosa.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(3): p. 1366-70.
87. Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(5): p. 1930-5.
88. Maeda, N., et al., *PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein.* *Diabetes*, 2001. 50(9): p. 2094-9.
89. Kremen, J., et al., *Increased subcutaneous and epicardial adipose tissue production of proinflammatory cytokines in cardiac surgery patients: possible role in postoperative insulin resistance.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91(11): p. 4620-7.
90. Senolt, L., et al., *Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum.* *Ann Rheum Dis*, 2007. 66(4): p. 458-63.
91. Fukuhara, A., et al., *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin.* *Science*, 2005. 307(5708): p. 426-30.
92. Garten, A., et al., *Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 391(1): p. 376-81.
93. Costford, S.R., et al., *Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans.* *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. 298(1): p. E117-26.
94. Krzysik-Walker, S.M., et al., *Is visfatin an adipokine or myokine? Evidence for greater visfatin expression in skeletal muscle than visceral fat in chickens.* *Endocrinology*, 2008. 149(4): p. 1543-50.
95. Skop, V., et al., *Autocrine effects of visfatin on hepatocyte sensitivity to insulin action.* *Physiol Res*, 2010. 59(4): p. 615-8.
96. Revollo, J.R., et al., *Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme.* *Cell Metab*, 2007. 6(5): p. 363-75.
97. Curat, C.A., et al., *Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin.* *Diabetologia*, 2006. 49(4): p. 744-7.
98. Varma, V., et al., *Human visfatin expression: relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipids, and inflammation.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(2): p. 666-72.
99. 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.
100. Ruan, H. and H.F. Lodish, *Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha.* *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. 14(5): p. 447-55.
101. Hotamisligil, G.S., *Inflammatory pathways and insulin action.* *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003. 27 Suppl 3: p. S53-5.
102. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.* *Science*, 1993. 259(5091): p. 87-91.
103. Fernandez-Real, J.M. and W. Ricart, *Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome.* *Endocr Rev*, 2003. 24(3): p. 278-301.

104. Senn, J.J., et al., *Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes.* J Biol Chem, 2003. 278(16): p. 13740-6.
105. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation.* Nature, 2008. 454(7203): p. 428-35.
106. Chawla, A., K.D. Nguyen, and Y.P. Goh, *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease.* Nat Rev Immunol, 2011. 11(11): p. 738-49.
107. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1796-808.
108. 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.
109. Ham, M., et al., *Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress.* Mol Cell Biol, 2013. 33(12): p. 2425-35.
110. Mathis, D., *Immunological goings-on in visceral adipose tissue.* Cell Metab, 2013. 17(6): p. 851-9.
111. Lumeng, C.N., et al., *Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity.* Diabetes, 2007. 56(1): p. 16-23.
112. Amano, S.U., et al., *Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation.* Cell Metab, 2014. 19(1): p. 162-71.
113. Bertola, A., et al., *Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients.* Diabetes, 2012. 61(9): p. 2238-47.
114. Liu, J., et al., *Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice.* Nat Med, 2009. 15(8): p. 940-5.
115. Abraham, S.N. and A.L. St John, *Mast cell-orchestrated immunity to pathogens.* Nat Rev Immunol, 2010. 10(6): p. 440-52.
116. Nijhuis, J., et al., *Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation.* Obesity (Silver Spring), 2009. 17(11): p. 2014-8.
117. Talukdar, S., et al., *Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase.* Nat Med, 2012. 18(9): p. 1407-12.
118. Wu, D., et al., *Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis.* Science, 2011. 332(6026): p. 243-7.
119. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans.* Nature, 2008. 453(7196): p. 783-7.
120. Lefterova, M.I. and M.A. Lazar, *New developments in adipogenesis.* Trends Endocrinol Metab, 2009. 20(3): p. 107-14.
121. Tang, Q.Q., T.C. Otto, and M.D. Lane, *CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(3): p. 850-5.
122. Fajas, L., et al., *The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation.* Dev Cell, 2002. 3(6): p. 903-10.
123. Fajas, L., et al., *E2Fs regulate adipocyte differentiation.* Dev Cell, 2002. 3(1): p. 39-49.
124. Cornelius, P., O.A. MacDougald, and M.D. Lane, *Regulation of adipocyte development.* Annu Rev Nutr, 1994. 14: p. 99-129.
125. Farmer, S.R., *Transcriptional control of adipocyte formation.* Cell Metab, 2006. 4(4): p. 263-73.
126. Ramji, D.P. and P. Foka, *CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation.* Biochem J, 2002. 365(Pt 3): p. 561-75.

127. Tang, Q.Q., et al., *Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(28): p. 9766-71.
128. Wang, G.L., et al., *Cyclin D3 maintains growth-inhibitory activity of C/EBPalpha by stabilizing C/EBPalpha-cdk2 and C/EBPalpha-Brm complexes*. Mol Cell Biol, 2006. 26(7): p. 2570-82.
129. Huang, H. and D.J. Tindall, *Dynamic FoxO transcription factors*. J Cell Sci, 2007. 120(Pt 15): p. 2479-87.
130. Kajimura, S., et al., *Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex*. Genes Dev, 2008. 22(10): p. 1397-409.
131. Freytag, S.O., D.L. Paielli, and J.D. Gilbert, *Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells*. Genes Dev, 1994. 8(14): p. 1654-63.
132. Zhu, Y., et al., *Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(17): p. 7921-5.
133. Morrison, R.F. and S.R. Farmer, *Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis*. J Biol Chem, 1999. 274(24): p. 17088-97.
134. Tamori, Y., et al., *Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes*. Diabetes, 2002. 51(7): p. 2045-55.
135. Mori, T., et al., *Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis*. J Biol Chem, 2005. 280(13): p. 12867-75.
136. Gray, S., et al., *The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4*. J Biol Chem, 2002. 277(37): p. 34322-8.
137. Li, D., et al., *Kruppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1*. J Biol Chem, 2005. 280(29): p. 26941-52.
138. Wu, J., et al., *The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes*. Biochemistry, 2005. 44(33): p. 11098-105.
139. Kanazawa, A., et al., *Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding Kruppel-like factor 7 are associated with type 2 diabetes*. Diabetologia, 2005. 48(7): p. 1315-22.
140. Kanazawa, A., et al., *Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 330(2): p. 505-10.
141. Kim, J.B., et al., *Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1*. J Clin Invest, 1998. 101(1): p. 1-9.
142. Kim, J.B. and B.M. Spiegelman, *ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism*. Genes Dev, 1996. 10(9): p. 1096-107.
143. Kim, J.B., et al., *ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(8): p. 4333-7.
144. Reusch, J.E., L.A. Colton, and D.J. Klemm, *CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells*. Mol Cell Biol, 2000. 20(3): p. 1008-20.
145. Zhang, J.W., et al., *Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis*. J Biol Chem, 2004. 279(6): p. 4471-8.

146. Tong, Q., et al., *Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition*. Science, 2000. 290(5489): p. 134-8.
147. Ge, K., et al., *Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis*. Nature, 2002. 417(6888): p. 563-7.
148. Qi, C., et al., *Transcriptional coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)-interacting protein, is required for PPARgamma-mediated adipogenesis*. J Biol Chem, 2003. 278(28): p. 25281-4.
149. Sarruf, D.A., et al., *Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. Mol Cell Biol, 2005. 25(22): p. 9985-95.
150. Fu, M., et al., *Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment*. J Biol Chem, 2005. 280(17): p. 16934-41.
151. Hong, J.H., et al., *TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation*. Science, 2005. 309(5737): p. 1074-8.
152. Smith, P.J., et al., *Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 1988. 263(19): p. 9402-8.
153. Bluher, M., et al., *Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance*. Dev Cell, 2002. 3(1): p. 25-38.
154. Garofalo, R.S., et al., *Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta*. J Clin Invest, 2003. 112(2): p. 197-208.
155. Kim, J.E. and J. Chen, *regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis*. Diabetes, 2004. 53(11): p. 2748-56.
156. Cachefo, A., et al., *Hepatic lipogenesis and cholesterol synthesis in hyperthyroid patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(11): p. 5353-7.
157. Jiang, W., et al., *Expression of thyroid hormone receptor alpha in 3T3-L1 adipocytes; triiodothyronine increases the expression of lipogenic enzyme and triglyceride accumulation*. J Endocrinol, 2004. 182(2): p. 295-302.
158. Ying, H., et al., *Impaired adipogenesis caused by a mutated thyroid hormone alpha1 receptor*. Mol Cell Biol, 2007. 27(6): p. 2359-71.
159. Ortega, F.J., et al., *Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor-alpha1 gene expression than omental fat*. Obesity (Silver Spring), 2009. 17(12): p. 2134-41.
160. Joyner, J.M., L.J. Hutley, and D.P. Cameron, *Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: regional and gender differences*. J Endocrinol, 2000. 166(1): p. 145-52.
161. Wu, Z., N.L. Bucher, and S.R. Farmer, *Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids*. Mol Cell Biol, 1996. 16(8): p. 4128-36.
162. Masuzaki, H., et al., *A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome*. Science, 2001. 294(5549): p. 2166-70.
163. Stewart, P.M. and J.W. Tomlinson, *Cortisol, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity*. Trends Endocrinol Metab, 2002. 13(3): p. 94-6.
164. Hutley, L., et al., *Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis*. Diabetes, 2004. 53(12): p. 3097-106.
165. Ross, S.E., et al., *Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling*. Science, 2000. 289(5481): p. 950-3.

166. Longo, K.A., et al., *Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues*. J Biol Chem, 2004. 279(34): p. 35503-9.
167. Clouthier, D.E., S.A. Comerford, and R.E. Hammer, *Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice*. J Clin Invest, 1997. 100(11): p. 2697-713.
168. Choy, L. and R. Derynck, *Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function*. J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9609-19.
169. Rebbapragada, A., et al., *Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis*. Mol Cell Biol, 2003. 23(20): p. 7230-42.
170. Suzawa, M., et al., *Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade*. Nat Cell Biol, 2003. 5(3): p. 224-30.
171. Constant, V.A., et al., *Macrophage-conditioned medium inhibits the differentiation of 3T3-L1 and human abdominal preadipocytes*. Diabetologia, 2006. 49(6): p. 1402-11.
172. Lumeng, C.N., S.M. Deyoung, and A.R. Saltiel, *Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 292(1): p. E166-74.
173. Yarmo, M.N., et al., *Macrophage-conditioned medium inhibits differentiation-induced Rb phosphorylation in 3T3-L1 preadipocytes*. Exp Cell Res, 2009. 315(3): p. 411-8.
174. Villena, J.A., K.H. Kim, and H.S. Sul, *Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development*. Horm Metab Res, 2002. 34(11-12): p. 664-70.
175. Leow, M.K., C.L. Addy, and C.S. Mantzoros, *Clinical review 159: Human immunodeficiency virus/highly active antiretroviral therapy-associated metabolic syndrome: clinical presentation, pathophysiology, and therapeutic strategies*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(5): p. 1961-76.
176. Dowell, P., et al., *Suppression of preadipocyte differentiation and promotion of adipocyte death by HIV protease inhibitors*. J Biol Chem, 2000. 275(52): p. 41325-32.
177. Zhang, B., et al., *Inhibition of adipocyte differentiation by HIV protease inhibitors*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(11): p. 4274-7.
178. Bastard, J.P., et al., *Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipoatrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance*. Lancet, 2002. 359(9311): p. 1026-31.
179. Kannisto, K., et al., *Expression of adipogenic transcription factors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1, IL-6 and CD45 in subcutaneous adipose tissue in lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy*. AIDS, 2003. 17(12): p. 1753-62.
180. Lenhard, J.M., et al., *Effects of troglitazone and metformin on glucose and lipid metabolism: alterations of two distinct molecular pathways*. Biochem Pharmacol, 1997. 54(7): p. 801-8.
181. Huypens, P., et al., *Metformin reduces adiponectin protein expression and release in 3T3-L1 adipocytes involving activation of AMP activated protein kinase*. Eur J Pharmacol, 2005. 518(2-3): p. 90-5.
182. Alexandre, K.B., et al., *Metformin inhibits intracellular lipid accumulation in the murine pre-adipocyte cell line, 3T3-L1*. Diabetes Obes Metab, 2008. 10(8): p. 688-90.
183. Moreno-Navarrete, J.M., et al., *OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects*. Diabetes, 2011. 60(1): p. 168-76.

184. Haffner, S.M., et al., *Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes?* JAMA, 1990. 263(21): p. 2893-8.
185. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism.* Cell, 2009. 137(2): p. 216-33.
186. Tax, F.E., J.J. Yeagers, and J.H. Thomas, *Sequence of C. elegans lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of Drosophila.* Nature, 1994. 368(6467): p. 150-4.
187. Gordon, W.R., K.L. Arnett, and S.C. Blacklow, *The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective.* J Cell Sci, 2008. 121(Pt 19): p. 3109-19.
188. Smas, C.M., D. Green, and H.S. Sul, *Structural characterization and alternate splicing of the gene encoding the preadipocyte EGF-like protein pref-1.* Biochemistry, 1994. 33(31): p. 9257-65.
189. Mei, B., et al., *Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing.* Biochem J, 2002. 364(Pt 1): p. 137-44.
190. Smas, C.M., L. Chen, and H.S. Sul, *Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation.* Mol Cell Biol, 1997. 17(2): p. 977-88.
191. Bachmann, E., et al., *Mouse fetal antigen 1 (mFA1), the circulating gene product of mdll, pref-1 and SCP-1: isolation, characterization and biology.* J Reprod Fertil, 1996. 107(2): p. 279-85.
192. Jensen, C.H., et al., *Protein structure of fetal antigen 1 (FA1). A novel circulating human epidermal-growth-factor-like protein expressed in neuroendocrine tumors and its relation to the gene products of dlk and pG2.* Eur J Biochem, 1994. 225(1): p. 83-92.
193. Floridon, C., et al., *Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation.* Differentiation, 2000. 66(1): p. 49-59.
194. Wang, Y. and H.S. Sul, *Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation.* Mol Cell Biol, 2006. 26(14): p. 5421-35.
195. Jensen, C.H., et al., *Neurons in the monoaminergic nuclei of the rat and human central nervous system express FA1/dlk.* Neuroreport, 2001. 12(18): p. 3959-63.
196. Wolfrum, C., et al., *Role of Foxa-2 in adipocyte metabolism and differentiation.* J Clin Invest, 2003. 112(3): p. 345-56.
197. Smas, C.M., et al., *Transcriptional control of the pref-1 gene in 3T3-L1 adipocyte differentiation. Sequence requirement for differentiation-dependent suppression.* J Biol Chem, 1998. 273(48): p. 31751-8.
198. Smas, C.M., et al., *Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation.* J Biol Chem, 1999. 274(18): p. 12632-41.
199. Kim, K.A., et al., *Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation.* Mol Cell Biol, 2007. 27(6): p. 2294-308.
200. Gustafson, B. and U. Smith, *Activation of canonical wntless-type MMTV integration site family (Wnt) signaling in mature adipocytes increases beta-catenin levels and leads to cell dedifferentiation and insulin resistance.* J Biol Chem, 2010. 285(18): p. 14031-41.

201. Moon, Y.S., et al., *Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity*. Mol Cell Biol, 2002. 22(15): p. 5585-92.
202. O'Connell, J., et al., *Preadipocyte factor-1 is associated with metabolic profile in severe obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. 96(4): p. E680-4.
203. O'Connell, J., et al., *The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity*. PLoS One, 2010. 5(4): p. e9997.
204. Pasarica, M., et al., *Lower total adipocyte number but no evidence for small adipocyte depletion in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2009. 32(5): p. 900-2.
205. Lacasa, D., et al., *Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes*. Endocrinology, 2007. 148(2): p. 868-77.
206. Garg, A., *Acquired and inherited lipodystrophies*. N Engl J Med, 2004. 350(12): p. 1220-34.
207. Shackleton, S., et al., *LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy*. Nat Genet, 2000. 24(2): p. 153-6.
208. Barroso, I., et al., *Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension*. Nature, 1999. 402(6764): p. 880-3.
209. Giralt, M., et al., *HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy*. Antivir Ther, 2006. 11(6): p. 729-40.
210. Koutkia, P. and S. Grinspoon, *HIV-associated lipodystrophy: pathogenesis, prognosis, treatment, and controversies*. Annu Rev Med, 2004. 55: p. 303-17.
211. Fazeli, P.K., et al., *Preadipocyte factor-1 is associated with marrow adiposity and bone mineral density in women with anorexia nervosa*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. 95(1): p. 407-13.
212. 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.
213. Haluzik, M.M., et al., *Serum adipocyte fatty acid binding protein levels in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of fenofibrate treatment*. Physiol Res, 2009. 58(1): p. 93-9.
214. de Zegher, F., et al., *Abundance of circulating preadipocyte factor 1 in early life*. Diabetes Care, 2012. 35(4): p. 848-9.
215. Gustafson, B. and U. Smith, *Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes*. J Biol Chem, 2006. 281(14): p. 9507-16.
216. Tseng, Y.H., et al., *Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin*. Nat Cell Biol, 2005. 7(6): p. 601-11.
217. Gong, H., et al., *Resistin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation*. Eur J Endocrinol, 2004. 150(6): p. 885-92.
218. Shimomura, I., et al., *Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy*. Genes Dev, 1998. 12(20): p. 3182-94.
219. Wang, M.Y., et al., *Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(16): p. 6139-44.
220. Sul, H.S., et al., *Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. 24 Suppl 4: p. S15-9.

221. Masella, R., et al., *Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation*. FEBS Lett, 2006. 580(10): p. 2421-9.
222. Yamanouchi, K., et al., *Increased adipogenicity of cells from regenerating skeletal muscle*. Exp Cell Res, 2006. 312(15): p. 2701-11.
223. Guerre-Millo, M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity*. J Biol Chem, 2000. 275(22): p. 16638-42.
224. Cabrero, A., et al., *Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes*. Diabetes, 2001. 50(8): p. 1883-90.
225. Zhou, Y.T., et al., *Reversing adipocyte differentiation: implications for treatment of obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(5): p. 2391-5.
226. Whitelaw, D.C., J.M. Smith, and M. Nattrass, *Effects of gemfibrozil on insulin resistance to fat metabolism in subjects with type 2 diabetes and hypertriglyceridaemia*. Diabetes Obes Metab, 2002. 4(3): p. 187-94.
227. Skrha, J., et al., *[Relation between hypertriglycerolemia and the action of insulin in type 2 diabetes mellitus]*. Cas Lek Cesk, 1994. 133(16): p. 496-9.
228. Anderlova, K., et al., *Influence of PPAR-alpha agonist fenofibrate on insulin sensitivity and selected adipose tissue-derived hormones in obese women with type 2 diabetes*. Physiol Res, 2007. 56(5): p. 579-86.
229. Baranowska, B., et al., *Neuropeptide Y, galanin, and leptin release in obese women and in women with anorexia nervosa*. Metabolism, 1997. 46(12): p. 1384-9.
230. Stoving, R.K., et al., *A review of endocrine changes in anorexia nervosa*. J Psychiatr Res, 1999. 33(2): p. 139-52.
231. Dostalova, I. and M. Haluzik, *The role of ghrelin in the regulation of food intake in patients with obesity and anorexia nervosa*. Physiol Res, 2009. 58(2): p. 159-70.
232. Frisch, R.E. and J.W. McArthur, *Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset*. Science, 1974. 185(4155): p. 949-51.
233. Grinspoon, S., et al., *Serum leptin levels in women with anorexia nervosa*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. 81(11): p. 3861-3.
234. Dolezalova, R., et al., *Changes of endocrine function of adipose tissue in anorexia nervosa: comparison of circulating levels versus subcutaneous mRNA expression*. Clin Endocrinol (Oxf), 2007. 67(5): p. 674-8.
235. Sul, H.S., *Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate*. Mol Endocrinol, 2009. 23(11): p. 1717-25.

13. PŘÍLOHY

13.1 Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 4.4. 2016

Mgr. Petra Kaválková

Podpis

13.2 Identifikační záznam

KAVÁLKOVÁ, Petra. *Význam endokrinní funkce tukové tkáně při vzniku syndromu inzulinové rezistence. [The importance of endocrine function of adipose tissue in the development of insulin resistance syndrome].* Praha 2016. 72 stran. 3 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, III. interní klinika. Školitel: Haluzík, Martin.

13.3 Plné texty vlastních publikací tvořících podklady disertační práce

a) s impact faktorem

Preadipocyte factor-1 concentrations in patients with anorexia nervosa: the influence of partial realimentation.

Kaválková P, Dostálová I, Haluzíková D, Trachta P, Hanušová V, Lacinová Z, Papežová H, Domlivilová D, Zikán V, Haluzík M. *Physiol Res.* 2012;61(2):153-9. Epub 2012 Jan 31. - **IF 1,53**

Serum Preadipocyte Factor-1 Concentrations in Females with Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: The Influence of Very Low Calorie Diet, Acute Hyperinsulinemia, and Fenofibrate Treatment.

Kavalkova P, Tuskova V, Roubicek T, Trachta P, Urbanova M, Drapalova J, Haluzikova D, Mraz M, Novak D, Matoulek M, Lacinova Z, Haluzik M. *Horm Metab Res.* 2013 Aug 26. [Epub ahead of print] PMID:23979788 - **IF 2,04**

b) bez impact factoru

Endokrinní funkce tukové tkáně: co je nového?

Petra Kaválková, Denisa Haluzíková, Martin Haluzík. DMEV č. 4/2010