



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. lékařská fakulta

MUDr. Magda Bajzová

Vliv výživy a pohybové aktivity na regulaci metabolické a endokrinní funkce tukové tkáně

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Vladimír Štich, PhD

Oddělení tělovýchovného lékařství, 3. lékařská fakulta Praha

Předseda oborové rady: Doc. MUDr. Alexandr Martin Čelko, CSc.

2008

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Magda Bajzová

Název disertační práce: Vliv výživy a pohybové aktivity na regulaci metabolické a endokrinní funkce tukové tkáně

Název disertační práce anglicky: The influence of diet and physical activity on regulation of metabolic and endocrinous functions of adipose tissue

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Preventivní medicína

Školitel: Doc. MUDr. Vladimír Štich, PhD

Rok obhajoby: 2008

Klíčová slova v češtině: obezita, tuková tkáň, lipolýza, Retinol-binding protein 4, inzulinová rezistence

Klíčová slova v angličtině: obesity, adipose tissue, lipolysis, Retinol-binding protein 4, insulin resistance

© Magda Bajzová, Univerzita Karlova v Praze, 2008

Předmluva a poděkování

Předkládaná disertační práce vychází z klinických studií uskutečněných na Ústavu tělovýchovného lékařství 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Řada experimentů a analýz byla prováděna v úzké spolupráci s Francouzsko-českou laboratoří klinického výzkumu obezity, která představuje společné pracoviště 3. lékařské fakulty a francouzské instituce INSERM (Institut national de la sante et de la recherche medicale) v Toulouse.

Práce byly podpořeny z finančních zdrojů Výzkumného záměru Ministerstva školství 3. lékařské fakulty UK (grant MSM 0021620814), z grantu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví (IGA NR 8066-3/04), z grantu Grantové agentury České republiky (GACR 303/04/0158), z projektu HEPADIP podporovaného Evropskou komisí v rámci 6. Rámcového programu (Contract LSHM-CT-2005-018734) a projektu RIOMA Agence Nationale de la Recherche.

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Doc. Vladimíru Štichovi za uvedení do výzkumné činnosti v oblasti metabolismu tukové tkáně, neustálou podporu a porozumění nejen ve vědecké práci a poskytnutí možnosti profesního rozvoje v oboru tělovýchovného lékařství.

Děkuji spolupracovníkům Jindře Hejnové za vstřícný přístup především v dobách mých začátků, Zuzaně Pařízkové za všestranné zabezpečení hladkého průběhu klinických studií a chodu pracoviště a Janu Polákovi, Evě Klimčákové, Michaele Kováčikové, Zuzaně Kováčové, Michaele Vítkové a Lence Rossmeislové za jejich spolupráci, stimulující podněty a příjemnou atmosféru na pracovišti.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům a manželovi za celoživotní podporu, zájem a finanční pomoc.

3. lékařská fakulta UK, květen 2008
Magda Bajzová

ZKRATKY

AMPK: AMP-aktivovaná proteinkináza

ANP: atrialní natriuretický peptid

ATGL: lipáza adipocytárních triglyceridů

BNP: brain natriuretický peptid

cAMP: cyklický adenosin monofosfát

CD36: protein CD36, lidský homolog myší translokázy mastných kyselin

cGMP: cyklický guanosin monofosfát

CNP: C-typ natriuretického peptidu

DNL: de novo lipogeneza

FABP: fatty acid binding protein

FATP: fatty acid transport protein

HSL: hormon senzitivní lipáza

Il-6: interleukin 6

Il-8: interleukin 8

IRS-1: substrát inzulinového receptoru 1

NEFA: neesterifikované mastné kyseliny

NPs: natriuretické peptidy

KRBHA: Krebs Ringer Bicarbonate buffer containing 10 mmol/l HEPES and 2% fatty acid-free BSA

LPL: lipoproteinová lipáza

PKC: proteinkináza C

PKG: proteinkináza G

PEPCK: fosfoenolpyruvátcarboxykináza

RBP-4: retinol binding protein 4

TAG: triacylglycerol

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

VLCD: very low calorie diet

VLDL: very-low density lipoprotein

SOUHRN

Tuková tkáň je dávana do souvislosti s etiopatogenezí inzulinové rezistence a rozvojem metabolických komplikací včetně diabetes mellitus 2. typu a aterosklerózy. Patofyziologické mechanismy zprostředkující tuto vazbu jsou již delší dobu intenzivně studovány. Výzkum v této oblasti se ubírá dvěma hlavními směry – prvním ze zvažovaných kandidátů stojících za asociací inzulinové rezistence a nadměrné akumulace tukové tkáně jsou volné mastné kyseliny, které jsou do cirkulace uvolňovány v procesu lipolýzy z triacylglycerolů uskladněných v tukové buňce. Expozice volným mastným kyselinám pak vede ke vzniku inzulinové rezistence v cílových orgánech. Druhý směr zájmu je soustředěn na adipokiny - proteiny s regulační či endokrinní funkcí - které jsou tukovou buňkou produkovány a jejichž úloha je v rozvoji inzulinové rezistence rovněž předpokládána. Předložené práce jsou zaměřeny na výzkum jak metabolické funkce tukové buňky - konkrétně regulace lipolýzy (práce č. 1 a 2), tak úlohy tukové tkáně jakožto mocného endokrinního orgánu – konkrétně účinku jednoho z řady secernovaných adipokinů RBP4 (práce č. 3 a 4).

První část práce se zabývá regulací lipolýzy za různých nefyziologických podmínek na souboru štíhlých a obézních mužů během zátěžového protokolu. V práci č. 1 jsme prokázali inhibiční účinek NEFA s dlouhým řetězcem na alfa2-adrenergní dráhu *in vitro* i *in vivo* během fyzické zátěže, kdy tento inhibiční účinek byl markantnější u obézních jedinců. NEFA s dlouhým řetězcem-mediovaná suprese antilipolytické dráhy představuje další mechanismus, kterým dieta s vysokým obsahem tuků může zvýšit lipolýzu v tukové tkáni. V publikaci č. 2 jsme demonstrovali pokles lipolytické aktivity subkutánní tukové tkáně při infuzi inzulinu během 45-ti minutové zátěže vytrvalostního typu u štíhlých jedinců. Tento pokles byl daleko méně vyjádřený u obézních jedinců. Zátěží-indukovaná elevace plasmatických hladin katecholaminů byla u štíhlých mužů narozdíl od obézních při inzulinovém clampu redukována. Dospěli jsme tedy k závěru, že antilipolytický účinek inzulinu je přítomen i během fyzické aktivity a že naši obézní muži jsou k tomuto antilipolytickému účinku inzulinu během zátěže rezistentní.

Cílem druhé části práce bylo studovat recentně objevený kandidátní adipokin RBP4, který (na základě výsledků experimentů na zvířecích modelech) by mohl hrát významnou roli v regulaci metabolismu glukózy a patogenezi inzulinové rezistence. Sledovali jsme plasmatické hladiny a expresi RBP4 v tukové tkáni jednak během longitudinální intervenční studie na souboru 25 obézních žen (publikace č. 3) a v průřezové studii na souboru 59 žen se širokým rozmezím BMI a stupněm inzulinové rezistence (publikace č. 4). Plasmatické hladiny RBP4 i RBP4 mRNA z podkožní tukové tkáně poklesly po 4 týdenní VLCD, korelace mezi dietně-indukovanými změnami RBP4 a

inzulinovou senzitivitou jsme nenalezli. Po rozdělení souboru do dvou skupin dle stupně inzulinové senzitivity nebyl pozorován rozdíl v plasmatických hladinách RBP4. RBP4 mRNA byly výrazně nižší ve viscerální než v subkutánní tukové tkáni nezávisle na stupni obezity či přítomnosti metabolického syndromu. Korelace mezi ukazateli RBP4 a stupněm obezity či inzulinové rezistence nalezeny nebyly. Výsledky naší práce tak přímou souvislost RBP4 s inzulinovou rezistencí narozdíl od jiných autorů nepotvrzují. Snížení plasmatické hladiny RBP4 během kalorické restrikce doprovázené redukcí hmotnosti pravděpodobně souvisí se sníženou proteosyntézou v játrech. Úloha RBP4, dalšího ze škály adipokinů, v patogenezi inzulinové rezistence zůstává, vzhledem k nekonzistenci dostupných dat, předmětem dalšího bádání.

SUMMARY

Adipose tissue is associated with insulin resistance and development of metabolic complications including type 2 diabetes and atherosclerosis. Mechanisms responsible for this association have been studied intensively for a longer period. Research in this branch is focused on two main hypothesis. The first possible candidate linking insulin resistance with excessive adipose tissue accumulation are free fatty acids (FFA) released into the circulation from triglycerides stored in adipocyte during lipolysis. Exposition to FFA results in insulin resistance in target organs. Another candidate to be considered as mediator of insulin resistance are adipokines, proteins with regulatory or endocrinous function that are produced by adipocyte. Submitted papers are focused on investigation of both the metabolic (specifically regulation of lipolysis, paper n. 1 and 2) and endocrinous (specifically RBP4, paper n. 3 and 4) functions of adipose tissue.

In the first part of the thesis we have studied the regulation of lipolysis during various nonphysiological conditions in a group of lean and obese men during exercise. In paper n. 1 we have shown inhibitory effect of long chain fatty acids (LCFAs) on alpha2-adrenergic pathway *in vitro* and *in vivo* during exercise, this inhibitory effect being more expressed in obese subjects. LCFAs-mediated suppression of antilipolytic pathway represents another mechanism whereby a high fat content in the diet might increase adipose tissue lipolysis. In paper n. 2, we have demonstrated decrease of subcutaneous adipose tissue lipolytic activity when insulin was infused during 45-min period of endurance physical activity in lean subjects. This decrease was less pronounced in obese individuals. Exercise-induced elevation of catecholamines plasma levels was reduced in lean but not in obese during insulin clamp. We concluded that antilipolytic effect of insulin is present also during physical activity and that our obese men are resistant to this antilipolytic effect of insulin during exercise.

The aim of the second part of the thesis was to study retinol-binding protein 4 (RBP4), a recently characterized potential candidate that may play a role in the glucose metabolism regulation and the pathogenesis of insulin resistance. We have studied plasma levels and expressions of RBP4 in adipose tissue during longitudinal intervention study in a group of 25 obese women (paper n. 3) and in cross-sectional study in a group of 59 women with a wide range of BMI and insulin resistance (paper n. 4). RBP4 plasma levels as well as RBP4 mRNA in subcutaneous adipose tissue decreased in 4 weeks of VLCD. No correlations between diet-induced changes in RBP4 and insulin resistance were found. When we divided the whole group of women into two subgroups according to the degree of insulin sensitivity no difference in RBP4 plasma levels was seen. RBP4 mRNA were dramatically lower in visceral

compared to subcutaneous adipose tissue independently of the degree of obesity or presence of metabolic syndrome. Correlations between RBP4 indicators and the degree of obesity or insulin resistance were not found. Unlike other authors, the results of our work don't bring evidence for direct association of RBP4 and insulin resistance. Decrease of RBP4 plasma level during calorie restriction accompanied by weight loss might be related to the decreased protheosynthesis in liver. With respect to the inconsistent data, the role of RBP4 in the pathogenesis of insulin resistance has to be further elucidated.

OBSAH

1. ÚVOD	12
1.1 Metabolické funkce tukové tkáně	13
1.1.1 Poznámky k lipolýze	16
1.1.2 Portální teorie	16
1.1.3 In vivo studie svědčící proti portální teorii	17
1.2 Endokrinní funkce tukové tkáně	18
1.2.1 Leptin	19
1.2.2 Retinol-binding protein 4	20
1.2.3 Adiponektin	21
1.3 Výživa a pohybová aktivita	22
2. SOUBOR PŘEDLOŽENÝCH PRACÍ	27
3. CÍLE PRÁCE	28
3.1 Metabolické funkce tukové tkáně	28
3.1.1 Práce č. 1	28
3.1.2 Práce č. 2	32
3.1.3 Závěry předložených prací	36
3.1.4 Diskuze k předloženým pracem	36
3.2 Endokrinní funkce tukové tkáně	39
3.2.1 Práce č. 3	39
3.2.2 Práce č. 4	44
3.2.3 Závěry předložených prací	47
3.2.4 Diskuze k předloženým pracem	47
4. ZÁVĚR	51
5. LITERATURA	54

1. Úvod

Obezita, charakterizována nadměrnou akumulací tukové tkáně v organismu, patří celosvětově mezi hlavní zdravotní problémy současné doby. Prevalence nadváhy a obezity se pohybuje v rozmezí 40 – 60% v průmyslově vyspělých i mnoha rozvojových zemích (Rana 2007). Světová zdravotnická organizace označila v roce 1997 obezitu za globální epidemii ohrožující zdraví lidské populace zvýšeným rizikem přidružených chorob (hypertenze, diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární onemocnění). Přestože četné negativní důsledky obezity jak pro jedince samotného tak pro celou společnost byly opakovaně zcela zřetelně prokázány, počet obézních jedinců stále progresivně stoupá – podle údajů WHO se k roku 2005 jedná zhruba o 400 milionů obézních dospělých jedinců a předpokládá se nárůst na 700 milionů do roku 2015 (Clement 2008). Nadváha a obezita dnes již plně nahrazují tradiční globální zdravotní problémy jako jsou podvýživa a infekční choroby (WHO 2000). Řada rozvojových zemí dnes čelí boji proti infekcím a malnutrici na straně jedné a rapidnímu nárůstu obezity na straně druhé. Tyto entity se paradoxně vyskytují v těsné blízkosti díky nedostatečné výživě v prenatálním a kojeneckém období s následnou nadměrnou expozicí vysokotukové a energeticky densejší potravě v kombinaci s nedostatkem pohybové aktivity (WHO 2000).

Z výsledků řady epidemiologických studií vyplývá asociace mezi obezitou těžkého stupně a mortalitou na kardiovaskulární a cerebrovaskulární příhody. Hlavní metabolické komplikace provázející obezitu jako dyslipidemie, inzulinová rezistence a hypertenze jsou společně řazeny do metabolického syndromu. Ne všichni obézní však těmito odchylkami disponují. Nezbytným kritériem diagnózy metabolického syndromu je přítomnost centrální obezity, která je dle současného vědeckého poznání považována za příčinu chorob s obezitou asociovaných. Naopak periferní ukládání tuku v oblasti gluteofemorální je asociováno s nižším kardiovaskulárním rizikem, někteří autoři dokonce prokázali negativní asociaci obvodu boků s inzulinovou rezistencí, incidencí a prevalencí diabetu a celkovou mortalitou (Lissner 2001, Snijder 2003, Esmailzadeh 2006). Regionální distribuce tukové tkáně je důležitým indikátorem metabolických a kardiovaskulárních odchylek u obezity mírného stupně, kde tyto odchylky korelují s BMI nekonstantně (Feinleib 1985, Kandel 1985, Keys 1980, Mann 1974, Larsson 1991).

Již v 50. letech minulého století bylo známo, že metabolické komplikace obezity jsou spojeny predominantně s akumulací tukové tkáně v oblasti břicha (Vague 1956). S rozvojem zobrazovacích metod v 90. letech bylo možno lokalizovat abdominální tuk do oblasti intraabdominální (omentální a mesenterický souhrnně nazývaný viscerální tuk) a subkutánní,

dále měřit množství tuku v játrech a svalech (Kvist 1986, Abate 1995). Následovalo mnoho studií, zkoumajících souvislost inzulinové rezistence a rozložení tuku v jednotlivých lokalizacích. Navzdory mnohem menšímu množství viscerální tukové tkáně v porovnání s množstvím podkožního tuku mnoho prací prokázalo, že je to právě masa viscerálního tuku jenž významně koreluje s inzulinovou rezistencí, DM 2. typu a kardiovaskulárními příhodami (Pouliot 1992, Lemieux 1996, Banerji 1997, Lapidus 1984, Stokes 1985, Ducimetiere 1986, Donahue 1987). Jiné práce však poukazují na abdominální podkožní tuk jakožto klíčovou determinantu inzulinové rezistence (Kvist 1986, Ohlson 1985). Hypotéza viscerálního tuku u nemocí asociovaných s obezitou se velmi rychle ujala, i když příčinná souvislost i přes intenzivní výzkum v této oblasti nebyla dosud prokázána.

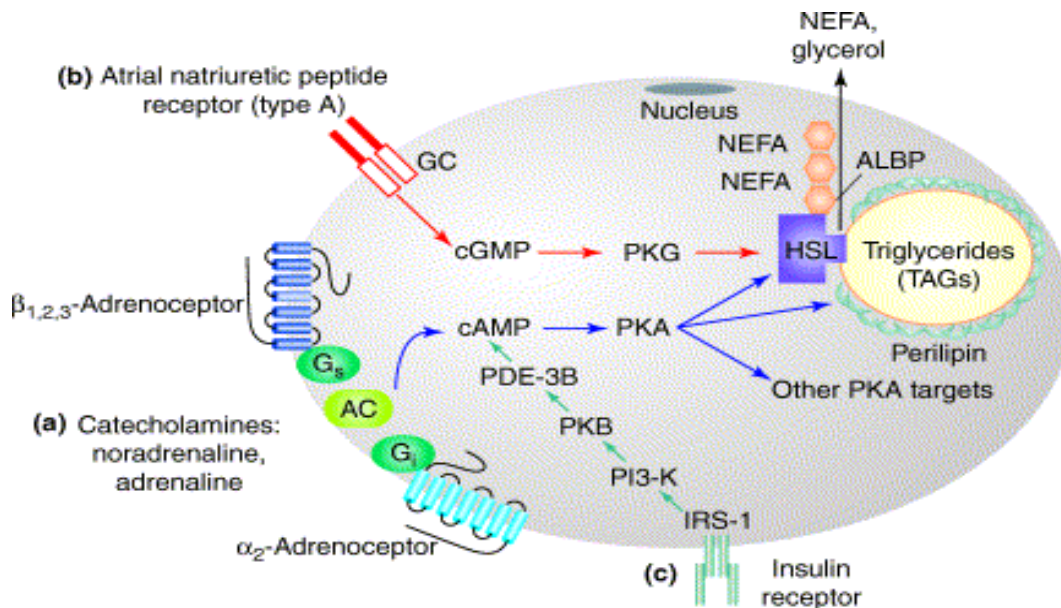
1.1 Metabolické funkce tukové tkáně

Bílá tuková tkáň představuje pro lidský organismus největší energii skladující orgán, který je u neobézního dospělého jedince zdrojem energie odpovídající cca 135 000 kcal (Large 2004).

Tuková buňka je uzpůsobena na skladování a mobilizaci triacylglycerolů (Wajchenberg 2000), zásobu energetických substrátů, které jsou v procesu lipolýzy hydrolyzovány na glycerol a neesterifikované mastné kyseliny. Před objevením leptinu v roce 1994, byly nepříznivé účinky asociované s obezitou dávány do souvislosti s metabolickou aktivitou adipocytu, především pak s uvolňováním neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) do cirkulace v procesu lipolýzy (Frayn 2005). Lipolýza v tukové tkáni je regulována řadou hormonů, mezi nejdůležitější patří katecholaminy, inzulin, atrální natriuretický peptid (ANP), růstový hormon a některé adipocytokiny. Význam jednotlivých hormonů pro regulaci lipolýzy se mění v závislosti na různých fyziologických situacích. Hlavní proměnné ovlivňující hormonální regulaci jsou dieta a pohybová aktivita (Stich 2004).

Katecholaminy mají na lipolýzu duální efekt: cestou beta-adrenergních receptorů lipolýzu stimulují, naopak působením na α_2 -adrenergní receptory lipolýzu inhibují. Tento protichůdný efekt katecholaminů je dán odlišností postreceptorových signálních kaskád. Beta-adrenoreceptory jsou spřaženy s Gs-proteinem, jehož aktivace spustí signální dráhu adenylát-cykláza \rightarrow produkce cAMP \rightarrow proteinkináza A \rightarrow fosforylace HSL (hormon senzitivní lipasa). α_2 -adrenoreceptory jsou spřaženy s Gi-proteinem, jehož aktivace vede naopak k supresi produkce cAMP a inhibici lipolýzy (Lafontan 2003, Large 2004). HSL je klíčovým enzymem v procesu lipolýzy mediované katecholaminy a ANP, zatímco bazální lipolýza (spontánní lipolytická aktivita adipocytu, činí 0.3-1.0 μ mol glycerolu/h/g tukové tkáně) je stimulovaná non-

HSL lipasami, především pak nedávno objevenou ATGL (adipose triglyceride lipase) (Langin 2005, Large 2004).



Obrázek č. 1. Regulace lipolýzy v lidských adipocytech. Signální transdukční dráhy pro (a) katecholaminy, (b) ANP a (c) inzulín. (převzato Lafontan 2003).

Dalším potentním stimulatorem lipolýzy je ANP, jehož úloha v regulaci lipolýzy byla poprvé popsána teprve v roce 2000. Vazbou na specifický receptor NPr-A na povrchu adipocytu aktivuje guanyl-cyklázu a produkci cGMP s následnou aktivací proteinkinázy G (PKG), která fosforyluje a tím aktivuje klíčový nitrobuněčný enzym lipolýzy HSL (Sengenés 2000). ANP patří do rodiny natriuretických peptidů, spolu s BNP (brain natriuretic peptide) a CNP (C-type natriuretic peptide). Natriuretické peptidy (NPs) vykazují řadu biologických účinků, převážně na kardiovaskulární a renální funkce. Lipolytický efekt všech tří NPs byl prokázán na lidských adipocytech *in vitro* s účinností ANP > BNP » CNP. *In vivo* byl dosud prokázán lipolytický efekt pouze pro ANP metodou mikrodialýzy, data o efektu ostatních NPs v humánních *in vivo* experimentech zatím chybí. Lipolytický účinek NPs je specifický pro tukové buňky primátů. (Sengenés 2002, Langin 2006)

Hlavním antilipolytickým hormonem je inzulín. Inzulín lipolýzu inhibuje a stimuluje ukládání triacylglycerolů v adipocytech. Vazbou na tyrosin kinázový receptor se aktivuje intracelulární signální dráha vedoucí v konečné fázi k hydrolýze cAMP, inaktivaci proteinkinázy A a HSL s důsledkem inhibice lipolýzy (viz obr. 1) (Degerman 1996). Postprandiálně či během infuze inzulinu

při euglykemickém hyperinzulinním clampu dochází u zdravých jedinců k výrazné redukci lipolýzy. Naopak v průběhu lačnění, fyzické aktivity či po infuzi somatostatinu, kdy je plasmatická hladina inzulínu snížena, dochází k dramatickému nárůstu lipolytické aktivity (Lafontan 2005). Plasmatické hladiny NEFA jsou u obesních jedinců zvýšeny díky rezistenci tukové buňky k působení inzulínu (má antilipolytický účinek) a vystupňovanému lipolytickému účinku katecholaminů ve viscerálních adipocytech (Opie 1963). Nadměrně zvýšené koncentrace NEFA vykazují řadu nepříznivých účinků (Tab.1). Mezi hlavní patří vznik inzulínové rezistence v kosterním svalu a inhibice, za fyziologických podmínek přítomného, suprimujícího účinku inzulínu na produkci glukózy v játrech (Randle 1963, Boden 1994, Ferrannini 1983). Dlouhodobě zvýšené hladiny NEFA negativně ovlivňují glukózou stimulovanou sekreci inzulínu (Zhou 1995). Těmito účinky lze vysvětlit, proč je zvýšená hladina NEFA považována za prediktor rozvoje diabetes mellitus 2. typu.

NEFA jsou substrátem pro jaterní produkci triacylglycerolů ve formě VLDL s následnou hypertriacylglycerolemií, která je asociována se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem (Hokanson 1996). Dále se podílí na endoteliální dysfunkci s potenciálním rizikem vzniku hypertenze a kardiovaskulárních příhod (Lind 2000).

Systém	Změny při elevaci NEFA
Játra	<input type="checkbox"/> glukoneogeneze <input type="checkbox"/> jaterní produkce glukózy u diabetiků
Kosterní sval	<input type="checkbox"/> inzulínová rezistence <input type="checkbox"/> inzulínem stimulovaného odsunu glukózy
Pankreas	<input type="checkbox"/> sekrece inzulínu (krátkodobě) <input type="checkbox"/> funkce β -buněk (dlouhodobě)
Endotel	<input type="checkbox"/> endotel-dependentní vasodilatace <input type="checkbox"/> aktivace endotelu

Tabulka 1: schéma škodlivých účinků zvýšené hladiny NEFA v různých tkáních ve vztahu k IR. (převzato Jensen MD 2006)

1.1.1 **Poznámky k lipolýze**

Na izolovaných lidských adipocytech a tkáňových explantech bylo opakovaně prokázáno, že bazální lipolýza je větší v subkutánních než ve viscerálních adipocytech (Ostman 1979, Hellme´r 1992, Maurie`ge 1995, Reynisdottir 1997, van Harmelen 1997, Richelsen 1991, Fried 1993). Naopak katecholaminy stimulovaná lipolýza je větší v adipocytech viscerálních v porovnání se subkutánními adipocyty abdominálními, gluteálními i femorálními a antilipolytický efekt inzulínu je větší v adipocytech subkutánních (Hellme´r 1992, Lafontan 2003). Metabolická aktivita tukové buňky je závislá na její velikosti – velké adipocyty syntetizují více TAG a v procesu lipolýzy uvolňují do cirkulace více NEFA (Edens 1993, Farnier 2003). Subkutánní adipocyty jsou větší než viscerální (Ostman 1979, Reynisdottir 1997), což by svědčilo pro větší obrát TAG v subkutánní lokalizaci a současně bylo v rozporu s široce akceptovanou teorií viscerálních hyperlipolytických adipocytů.

Postprandiálně dochází k inhibici lipolýzy a stimulaci ukládání energie ve formě TAG, především díky účinku inzulínu. Inzulín inhibuje HSL a aktivuje lipoproteinovou lipázu (LPL), enzym lokalizovaný na povrchu endotelových buněk v kapilárách tukové tkáně, srdce a kosterního svalu (Kotlar 1979), který hydrolyzuje TAG vyskytující se v krevní cirkulaci ve formě VLDL a chilomikronů na glycerol a NEFA. NEFA uvolněné z krevních lipoproteinů a plasmatické NEFA vázané na albumin jsou zdrojem pro syntézu TAG v adipocytech. Transport NEFA z cirkulace do buňky zajišťují specifické transportní proteiny (FATP, FABP, CD36). Syntéza TAG je proces postupné esterifikace NEFA ve formě acyl-Co A a glycerolu ve formě glycerol-3 fosfátu. Glycerol-3 fosfát je tvořen z glukózy, protože glycerolkinázová aktivita je v humánních adipocytech zanedbatelná. Určité množství NEFA dále vzniká v procesu de novo lipogeneze (DNL) z nonlipidových substrátů, převážně z glukózy, v tukové tkáni a játrech. Význam DNL u lidí není dosud zcela objasněn (Large 2004, Hellerstein 2001).

1.1.2 **Portální teorie**

Viscerální adipocyty mají in vitro větší lipolytickou aktivitu než subkutánní adipocyty. Zvýšená lipolýza viscerálních adipocytů je přičítána nižšímu antilipolytickému účinku inzulínu na jedné straně a vyšší katecholaminy-indukované lipolytické aktivitě na straně druhé. Portální teorie předpokládá zvýšený tok NEFA portální vénou přímo do jater, s následně zvýšenou expozicí těmto NEFA. Větší množství viscerálního tuku pak logicky znamená větší přísun NEFA do jater, akumulaci intrahepatálních TAG,

zvýšenou produkci a sekreci VLDL, stimulaci jaterní glukoneogeneze a oblenění clearance inzulínu s důsledkem vzniku inzulínové rezistence. Zvýšená hladina NEFA indukuje periferní i jaterní inzulínovou rezistenci, poškozují cévní reaktivitu a funkci pankreatických beta buněk. V kosterním svalu způsobují NEFA vznik inzulínové rezistence interferencí s inzulínovou signální dráhou: prostřednictvím proteinkinasy C (PKC)-indukované fosforylace substrátu 1 inzulínového receptoru (IRS-1) a následným potlačením IRS-1 zprostředkovaných dějů (Yu 2002). Portální teorie však není všeobecně akceptována (Bjorntorp 1990, Frayn 2000, Bergman 2006, Miles 2005) a argumentů proti této teorii stále přibývá.

1.1.3 *In vivo studie svědčící proti portální teorii*

Jestliže míra lipolýzy viscerální tukové tkáně koreluje s množstvím viscerálního tuku zdá se logické z pohledu „first pass“ efektu, že zvýšené množství viscerálního tuku bude odpovědné za inzulínovou rezistenci v játrech. Otázkou zůstává, zda je viscerální tuková tkáň skutečně zdrojem vysoké hladiny NEFA u obezity abdominálního typu. Přímé měření koncentrace NEFA nebo glycerolu v portální větvi je u lidí možné pouze za určitých specifických podmínek, výsledky několika málo takto zrealizovaných studií jsou shodné – rozdílné portální a arteriální koncentrace NEFA či glycerolu prokázány nebyly. V portální krvi, odebrané během cholecystektomie u 5 subjektů, nebyl nalezen signifikantní rozdíl v průměrné koncentraci NEFA ve srovnání s arteriální krví (Hagenfeld 1972). Množství NEFA z viscerálního tuku bylo minimální, ačkoli během „chirurgického stresu“ je předpokládána větší lipolytická aktivita ve viscerálním tuku.

Jinou možností stanovení NEFA pocházejících z útrobního tuku je použití značených izotopů. Několik studií s použitím metodiky izotopové diluce s katetrizací hepatální a femorální vény a femorální artérie k měření systémové a regionální kinetiky NEFA prováděla vědecká skupina profesora Jensena. NEFA v systémovém řečišti (odpovídá koncentraci v arteriální krvi) působí na kosterní sval, pankreatické beta buňky a endoteliální funkce. Koncentrace NEFA v portálním řečišti (determinována systémovou koncentrací NEFA a úrovní lipolýzy ve viscerální tukové tkáni) ovlivňuje produkci glukózy a VLDL v játrech. Portální koncentrace NEFA nebyla měřena přímo, ale procento NEFA z lipolýzy viscerální tukové tkáně jdoucí do jater odvozeno. Autoři demonstrovali, že: 1. Abdominální non-viscerální tuk má větší lipolytickou aktivitu než tuk gluteální oblasti u štíhlých i obézních osob obou pohlaví. 2. 70% NEFA v systémovém řečišti je původem z non-viscerální tukové tkáně. 3. S rostoucím množstvím viscerální tukové tkáně roste procentuální zastoupení NEFA jdoucích do jater, které pocházejí z lipolýzy ve viscerální tukové tkáni. Odhadnutá jaterní frakce NEFA z viscerální lipolýzy činí

5-10% u dospělých neobézních subjektů s nárůstem na 20-25% u subjektů s viscerálním typem obezity. Zde je nutno zdůraznit, že i když množství viscerálního tuku je asociováno s větším potenciálním fluxem NEFA do jater, i u subjektů s obezitou viscerálního typu pochází > 75% jaterní dodávky ze systémové cirkulace (Martin 1991, Jensen 2006).

Zdrojem zvýšené plasmatické hladiny NEFA u obezity abdominálního typu je tedy abdominální subkutánní tuk, nicméně viscerální tuk výrazně přispívá k vysokým portálním hladinám NEFA a jaterní expozici u abdominálně obezních jedinců.

Podle těchto závěrů je nepravděpodobné, že by viscerální tuková tkáň mohla hrát významnější roli v dodávce NEFA kosternímu svalu a tímto mechanismem způsobovat inzulinovou rezistenci v periferních tkáních.

1.2 Endokrinní funkce tukové tkáně

Donedávna se o tukové tkáni uvažovalo pouze jako o energii skladujícím orgánu, ale studie z poslední doby zcela změnily náš pohled na tuto tkáň s objevem mnoha substancí, které jsou zde produkovány a secernovány. Tuková tkáň tak získala statut endokrinního orgánu. V tukové tkáni je syntetizována řada bioaktivních látek peptidové i nepeptidové povahy, souhrnně označovaných jako adipokiny či adipocytokiny. Jsou to především leptin, adiponectin, visfatin, retinol-binding protein-4, adipisin, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) a interleukin 6. Některé mají účinek parakrinní, jiné jsou secernovány do cirkulace a ovlivňují vzdálené cílové orgány (Wajchenberg 2000, Llamas-Alvarez 2007). Jejich hlavní funkce spočívá především v regulaci energetické homeostázy a neuroendokrinních funkcí, ovlivňování imunitních funkcí a zánětlivých procesů v organismu.

Tuková tkáň je složena z vlastních tukových buněk - adipocytů - a stromavaskulární frakce. Stromavaskulární frakce obsahuje endoteliální buňky, makrofágy a fibroblasty, které se významnou měrou podílí na výsledném sekrečním profilu tukové tkáně (Llamas-Alvarez 2007). Makrofágy produkují mnohem více IL-6, IL-8, TNF- α , visfatinu a resistinu než adipocyty, kdežto adiponektin a leptin jsou produkovány především adipocyty.

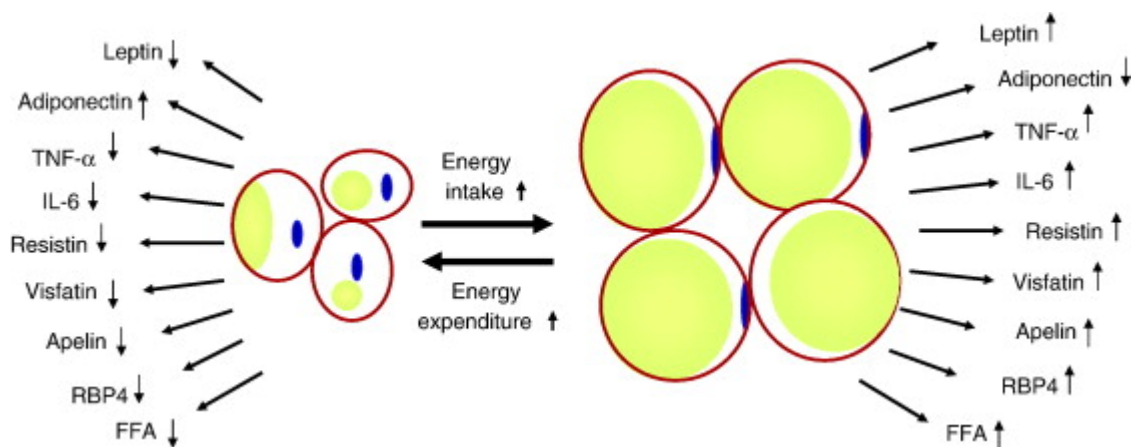
Adiponektin, leptin, resistin a visfatin jsou považovány za důležitý spojovací článek mezi obezitou, inzulinovou rezistencí a souvisejících zánětlivých onemocnění (Tilg 2006). Dále bude podrobně diskutován leptin (první objevený adipokin), retinol binding protein 4 (je předmětem našeho zájmu v uvedených publikacích) a adiponektin (nejznámější představitel inzulinsenzitizujícího účinku).

1.2.1 Leptin

Nejdříve objeveným adipokinem je leptin. Jeho název je odvozen od řeckého slova „leptos“ – (slabý, neduživý), protože u myši potlačuje chuť k jídlu a snižuje tělesnou hmotnost (Zou 2007). Gen kódující leptin se nazývá *ob*, myši s mutací genu kódující leptin (*ob/ob* myši) či kódující leptinový receptor (*db/db* myši) jsou fenotypicky obézní a jsou tradičně používány jako model pro studium obezity (Tilg 2006). Leptin je produkován hlavně adipocyty, ale také jinými tkáněmi (žaludek, játra, placenta a kosterní sval), jeho exprese je větší v subkutánních adipocytech než ve viscerálních (Schoof 2004). Leptin má zásadní podíl na regulaci tělesné hmotnosti – působením na centra sytosti v hypotalamu vede ke snížení příjmu potravy a současně stimuluje energetický výdej. Ke snížení chuti k jídlu a tělesné hmotnosti dochází prostřednictvím zvýšené exprese anorexigenních a snížené exprese orexigenních peptidů v hypotalamu (Zou 2007). U obézních jedinců jsou hladiny leptinu typicky zvýšeny, je u nich přítomna tzv. leptinová rezistence podobně jako inzulinová rezistence u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Patofyziologie leptinové rezistence není dosud zcela objasněna, i když několik mechanismů stojících za vznikem leptinové rezistence již bylo popsáno. Jedná se o poruchu transportu leptinu přes hematoencefalickou bariéru, defekt v leptinové signalizační kaskádě a blokády v neuronální komunikaci (Banks 2004). Kromě účinků centrálních, má leptin i řadu účinků periferních – v tukové buňce interferuje s účinky inzulínu na buněčný metabolismus i s vazbou inzulínu na membránové receptory. U myši inhibuje syntézu a sekreci inzulínu pankreatickými beta-buňkami a v kosterním svalu aktivuje klíčový enzym regulace buněčného energetického metabolismu AMP-kinázu s následným zvýšením oxidace svalových lipidů (Seufert 2004, Muoio 1997). Leptin dále hraje důležitou úlohu v regulaci hypotalamo-hypofyzo-adrenální, -thyroidální, -gonadální a -somatotropní osy, a je tak pravděpodobně klíčovým proteinem koordinujícím aktivitu těchto hormonálních os včetně jejich vlivu na energetickou homeostázu (Gueorguiev 2001). Pro osoby s deficitem leptinu či leptinového receptoru je charakteristický abnormální pubertální vývoj s biochemickým korelátém hypogonadotropního hypogonadismu (Clement 2008). Recentní práce dokladují další významnou funkci leptinu jakožto důležitého mediátoru imunitních a zánětlivých procesů. Jedná se o prozánětlivý cytokin, strukturálně podobný jiným prozánětlivým cytokinům Il-6, Il-12 a GCSF, s řadou účinků ve vrozené i získané imunitní a zánětlivé odpovědi (Tilg 2006).

Podávání rekombinantního leptinu jako kauzálního terapeutického preparátu v léčbě obezity je vyhrazeno pro extrémně vzácné případy pacientů s kongenitálním deficitem leptinu, protože efekt leptinové terapie

nebyl u obézních jedinců bez této monogenní poruchy prokázán (Heymsfield 1999).



Obr. 2. Sekrece adipocytokinů v tukové tkáni za normálních podmínek a při obezitě. (převzato Zou 2007)

1.2.2 **Retinol-binding protein 4**

Retinol binding protein 4 (RBP4), jehož hlavní funkce je transport aktivního metabolitu vitamínu A, all-trans-retinolu, v krevním řečišti byl poprvé popsán již v roce 1968. V klinické praxi je používán jako marker nutričního stavu, reaktant akutní fáze a indikátor alkoholické steatohepatitidy (Baeten 2004, Wagnerberger 2006). Strukturálně patří do lipokalinové superrodiny proteinů, které mají schopnost vázat hydrofobní ligandy. V plasmě dochází k tvorbě komplexu RBP4 s transthyretinem (prealbuminem) ve stochiometrickém poměru 1:1 jako prevence nadměrné ztráty nízkomolekulárního RBP4 glomerulární filtrací (Lewis 2007). Hlavním místem syntézy RBP4 jsou játra, exprese RBP4 byla opakovaně prokázána i v extrahepatálních tkáních u zvířat i lidí (tuková tkáň, ledviny, plíce, srdce, kosterní sval, slezina, varlata, oko).

Souvislost RBP4 s inzulínovou rezistencí byla popsána teprve v roce 2005, kdy Yang et al. popsali zvýšené hladiny RBP4 u inzulínrezistentních myší i lidí. Na základě série experimentů na geneticky manipulovaných myších bylo demonstrováno, že by RBP4 mohl být nadějným proteinem zodpovědným za vznik systémové inzulínové rezistence cestou indukce exprese jaterního glukoneogenního enzymu phosphoenolpyruvat karboxykinázy (PEPCK) a zásahem do inzulínové signální kaskády v kosterním svalu. Autoři demonstrovali, že exprese RBP4 je zvýšena u GLUT4 (glukózový transportér) knockout myší. Plasmatické hladiny RBP4 byly normalizovány po léčbě inzulínrezistentních myší rosiglitazonem, inzulínsenzitizujícím antidiabetikem, a

transgenní overexprese RBP4 či injekce rekombinantního RBP4 normálním myším vedla k inzulinové rezistenci (Yang 2005).

Výsledky prací sledující vztah RBP4 a inzulinové rezistence u lidí však nejsou konzistentní, a prvotní optimismus týkající se RBP4 jakožto slibného adipokinu stojícím za vznikem systémové inzulinové rezistence se pomalu vytrácí. Byly nalezeny korelace mezi plasmatickými hladinami RBP4 a IR u jedinců s porušenou glukózovou tolerancí, diabetes mellitus 2. typu a obezitou, plasmatické hladiny RBP4 byly navíc pozitivně asociovány s BMI, WHR, TAG a dalšími komponentami metabolického syndromu (Graham 2006). Na druhé straně skupina německých vědců nenašla rozdíl v plasmatických hladinách RBP4, když srovnávali štíhlé jedince, jedince s nadváhou a obézní s různým stupněm inzulinové rezistence. Korelace mezi plasmatickou hladinou RBP4 a BMI, obvodem pasu či inzulinovou rezistencí nalezeny nebyly (Janke 2006). Tyto korelace nebyly nalezeny ani v průřezové studii provedené na našem pracovišti (Bajzova 2007) a nepřítomnost rozdílu v plasmatických hladinách RBP4 ve vztahu ke stupni inzulinové rezistence byla v souladu s dalšími autory (Erikstrup 2006, Tan 2007, Broch 2007), ale v protikladu s jinými (Lee 2007, Haider 2007, Balagopal 2007). RBP4 je v tukové tkáni exprimován převážně v adipocytech, exprese ve stromavaskulární frakci je zanedbatelná (Vítková 2007, Janke 2006). Exprese ve viscerální tukové tkáni je nižší než v subkutánní, nezávisle na BMI, množství viscerálního či subkutánního tuku či přítomnosti metabolického syndromu (Bajzova 2007). Vliv redukce hmotnosti na plasmatickou hladinu RBP4 je také nejednoznačný, výsledky provedených prací se liší (Vítková 2007, Janke 2006). V současné době nemáme dostatek důkazů svědčících pro jasný vztah RBP4 k inzulinové rezistenci u lidí jak tomu nasvědčovaly experimenty na zvířecích modelech a objasnění přesné úlohy tohoto adipokinu by mělo být cílem dalšího výzkumu.

1.2.3 ***Adiponektin***

Adiponektin byl poprvé popsán v roce 1995. Strukturálně spadá do rodiny proteinů charakterizovaných amino-terminální kolagenovou doménou a karboxy-terminální globulární doménou. Ačkoli je syntetizován výhradně adipocyty, je exprimován i v buňkách kosterního svalu, kardiomyocytech a endoteliích (Tilg 2006). V cirkulaci se vyskytuje v několika polymerních izoformách. Jedná se o trimer (nízkomolekulární adiponektin), hexamer, složený ze dvou trimerů spojených disulfidickým můstkem (středněmolekulární adiponektin) a vysokomolekulární adiponektin, který je složen z polymerů o vyšší molekulové hmotnosti, 12- až 18-merů. V plasmě se vyskytuje v koncentracích tvořících zhruba 0.01% plasmatických bílkovin, což je množství o tři řády větší než koncentrace většiny hormonů. V *in vitro* i *in vivo*

studiích bylo opakovaně prokázáno, že adiponektin zlepšuje inzulinovou senzitivitu, stimuluje oxidaci NEFA, vychytávání glukózy a inhibuje hepatální glukoneogenezu. Adiponektin vykazuje svůj inzulinsenzitizující účinek v řadě tkání a je proto nazýván inzulinovým senzitizerem, mechanismus inzulinsenzitizujícího účinku je pravděpodobně zprostředkován cestou aktivace AMP-kinázy, klíčového enzymu buněčného energetického metabolismu (Tilg 2006, Combs 2001).

Plasmatické hladiny adiponektinu jsou sniženy u pacientů s diabetes mellitus 2. typu, inzulinorezistentních a obézních jedinců a u pacientů s kardiovaskulárními chorobami (Polak 2007). Determinujícím faktorem citlivosti k inzulinu se zdá být poměr a nikoli absolutní hodnota vysokomolekulárního a nízkomolekulárního adiponektinu v plasmě (Pajvani 2004). Po redukci hmotnosti navozené nízkokalorickou dietou dochází k elevaci všech tří forem adiponektinu (Polak 2007). Adiponektin je dále dáván do souvislosti se vznikem aterosklerózy, bylo prokázáno, že snížená hladina adiponektinu je asociována s rozvojem aterosklerotických změn (Maahs 2005). *In vitro* inhibuje adhezi monocytů k cévní stěně a transformaci makrofágů v pěnové buňky (Ouchi 2001). Recentní práce s podáváním rekombinantního adiponektinu obézním a diabetickým myším prokázali hypoglykemizující a inzulinsenzitizující účinek u těchto zvířat (Berg 2002), zda se bude tento protein používat v terapii metabolických odchylek u lidí je stále otázkou budoucnosti. Hladinu adiponektinu lze pozitivně ovlivnit farmakologicky některými antidiabetiky, např. rosiglitazonem (Majuri 2007), vliv režimových opatření již tak přesvědčivý není – výsledky prací sledující vliv redukční diety, pohybové aktivity či bariatrického zákroku na plasmatickou hladinu adiponektinu nejsou konzistentní (Boudou 2003, Esposito 2003, Hulver 2002, Kriketos 2004).

1.3 Výživa a pohybová aktivita

Režimová opatření (kalorická restrikce a pohybová aktivita) vedoucí k redukci hmotnosti jsou základní modalit v prevenci a léčbě chronických onemocnění jako jsou obezita, diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární onemocnění. Bylo opakovaně prokázáno, že již mírná redukce hmotnosti (5%) u diabetiků 2. typu vede ke snížení inzulinové rezistence, snížení lačné glykemie, hladiny triglyceridů a ke snížení krevního tlaku (Klein 2004).

Příznivé účinky režimových opatření jsou přičítány změnám v metabolismu tukové tkáně (včetně lipolýzy), které doprovází úbytek tukové hmoty v organismu. Některé práce prokazují, že dietní intervence vede ke snížení bazální lipolýzy a NEFA v cirkulaci, pravděpodobně díky zvýšené citlivosti adipocytu k antilipolytickému efektu inzulinu a snížené velikosti

adipocytu (Polak 2007), jiní autoři prokazují naopak zvýšení bazální lipolýzy po kalorické restrikci (Hellstrom 1996, Lofgren 2005).

Dietní režimy

Katecholaminy u obézních jedinců mají menší lipolytický účinek než u jedinců s normální hmotností díky nižší beta-adrenergní lipolytické a vyšší alfa2-adrenergní antilipolytické citlivosti. Hypokalorické dietní režimy vedou k návratu v rovnováze mezi beta- a alfa2- adrenergní stimulací (Barbe 1997, Mauričge 1999). Inzulín negativně interaguje se signální dráhou beta-adrenergních receptorů, snížená hladina inzulínu v důsledku dietního režimu přispívá ke změnám v lipolýze. Hypokalorické dietní režimy tedy vedou ke zvýšení katecholaminy-indukované lipolýzy. Nízkoenergetická dieta (2.5-2.9MJ/den po dobu 28 dní) dále vede k 80-100% nárůstu NP-indukované lipolýzy u obesních žen *in vivo*, pravděpodobně díky akcentaci lipolytické kaskády na postreceptorové úrovni (Sengenès 2002) a *in vitro* k elevaci bazální lipolýzy, rezistenci k účinku inzulínu působit antilipolyticky a lipogeneticky v podkožní tukové tkáni bez ovlivnění katecholaminy stimulované lipolýzy (Hellström 1996). Tyto metabolické změny indukované kalorickou restrikcí podporují mobilizaci tuků a redukci hmotnosti. Zdá se, že složení nízkoenergetické diety z hlediska makronutrientů nemá na mobilizaci triacylglycerolů (lipolýzu) a transport glukózy do adipocytu (lipogenezu) zásadní vliv (Suljkovicova 2002, Lofgren 2005). Akutní expozice mastným kyselinám s dlouhým řetězcem vede k inhibici alpha-adrenergního antilipolytického účinku v tukové tkáni *in vitro* i *in vivo* (Polak 2007).

Antilipolytický účinek inzulínu po redukční dietě vykazuje v podkožní tukové tkáni stejný efekt jako u jedinců s normální hmotností, inzulínová rezistence v tukové tkáni tedy vzniká při obezitě sekundárně a je reverzibilní. Pro objektivizaci antilipolytického účinku inzulínu ve viscerální tukové tkáni není dostatek důkazů (Polak 2007).

Řada adipocytokinů je asociována s množstvím tělesného tuku a je proto ovlivnitelná pozitivní či negativní změnou hmotnosti (Laughlin 1997, Maffei 1995). Vliv režimových opatření na endokrinní funkce tukové tkáně jsou v poslední době intenzivně studovány. Výsledky prací, které studují vliv redukčních režimů na plasmatické hladiny adipokinů a genovou expresi adipokinů v tukové tkáni nejsou konzistentní. Většina prací prokazuje snížení plasmatické hladiny leptinu a zvýšení plasmatické hladiny adiponektinu po nízkoenergetické dietě vedoucí k redukci hmotnosti (Monzillo 2003, Esposito 2003, Kotidis 2006, Labayen 2004, Polak 2007, Behre 2007), stejně jako po chirurgické léčbě obezity (Rizzo , Manco 2007, Yang 2001, Kopp 2005, Kotidis 2006). Jiní autoři však změnu v plasmatické hladině adiponektinu po redukční dietě nenalezli (Anderlová 2006, Xydakis 2004). Plasmatické hladiny

prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α vykazují po redukcii hmotnosti navozené nízkokalorickou dietou či chirurgickým zákrokem tendenci ke snížení (Manco 2006, Rizzo, Monzillo 2003, Esposito 2003, Sharman 2004), i když některé práce toto snížení nepotvrdily (Xydakis 2004).

Genová exprese retinol-binding protein 4 (RBP-4) i plasmatické hladiny RBP-4 signifikantně poklesly po 4-týdenní velmi přísné nízkokalorické dietě, během následující fáze 8-týdenní nízkokalorické diety genová exprese stoupla k výchozí hodnotám, kdežto plasmatická hladina RBP-4 se významně nezměnila. Výsledky práce nepotvrdily úlohu RBP4 v regulaci dietou-indukované změně v inzulinové citlivosti (Vitkova 2007).

Clement and Langin studovali efekt mírné redukce hmotnosti na genovou expresi zánětlivých faktorů v podkožní tukové tkáni obesních žen. 4-týdenní nízkokalorická dieta vedla ke změně exprese asi u 100 genů majících vztah k zánětlivým pochodům – exprese byla zvýšena u 41% a snížena u 59% genů. Většina těchto genů (75%) byla exprimována ve stromavaskulární frakci tukové tkáně (Clement 2007).

Pohybová aktivita

Cvičení je situace, kdy dochází ke zvýšení energetických nároků pracujícího kosterního svalstva. Jedním z hlavních energetických substrátů jsou neesterifikované mastné kyseliny, které jsou do oběhu uvolňovány z triglyceridů v procesu lipolýzy. Lipolýza je během fyzické zátěže stimulována. Beta-adrenergní lipolytická dráha je preferenčně stimulována n rozdíl od alfa2-adrenergní antilipolytické dráhy, která je dominantní v klidových podmínkách. Na našem pracovišti bylo prokázáno, že alfa2-adrenergní antilipolytický efekt je přítomen i během cvičení, když po lokálním podání alfa blokátoru phentolaminu do mikrodialyzační sondy došlo ke zvýšení lipolýzy během fyzické aktivity (Stich 1999). Dalším potentním stimulatorem lipolýzy během fyzické zátěže je ANP. ANP-dependentní lipolytická dráha se zdá být zásadní pro pacienty s chronickou medikací betablokátory, které inhibují katecholaminy-indukovanou lipolýzu, ale pozitivně ovlivňují uvolňování ANP z kardiomyocytů (Lafontan 2008). Během cvičení mírné intenzity je mobilizace lipidů z podkožní tukové tkáně více závislá na zvýšení ANP a snížení inzulinu v plasmě než na katecholaminy-dependentní stimulaci beta-adrenergních receptorů (Moro 2007). Sekrece inzulinu, hlavního antilipolytického hormonu, je během cvičení inhibována. Snížení plasmatické hladiny inzulinu během fyzické zátěže přispívá k fyziologické kontrole regulace lipolýzy a podporuje lipolytickou aktivitu tukových buněk.

Během akutní fyzické zátěže dochází ke snížení syntézy mastných kyselin a zvýšení lipolýzy, je-li fyzická aktivita pravidelná, pak tato cvičením-indukovaná lipolýza pravděpodobně přispívá ke snížení tukových rezerv.

Zdali je zvýšená nabídka NEFA během zátěží-indukované lipolýzy ihned využívána kosterním svalem však není potvrzeno (Stich 2004, Polak 2007). Molekulární mechanismy, které stojí za inhibicí syntézy NEFA a stimulací lipolýzy v adipocytech během zátěže nejsou detailně známy. Během fyzické aktivity dochází k elevaci plasmatické hladiny katecholaminů (adrenalinu), který cestou aktivace PAK fosforyluje HSL s následnou hydrolýzou TAG a cestou inhibice acetyl-CoA karboxylasy inhibuje syntézu NEFA. Enzym AMP-aktivovaná proteinkináza, hlavní regulátor intracelulární energetické homeostázy, je indukován během zátěže v adipocytech potkanů (Ruderman 2003) i lidí (Watt 2006). Recentní práce na potkanech demonstruje, že jak akutní tak chronická fyzická aktivita významně regulují aktivitu AMPK v adipocytech, pravděpodobně cestou zvýšené hladiny adrenalinu (adrenalin má lipolytický účinek in vitro, který po přidání blokátoru AMPK mizí) (Koh 2007). Lipolýza v podkožní tukové tkáni během fyzické zátěže je větší u žen než u mužů a při mírných intenzitách zátěže (30% a 50% VO₂max) je zřejmě více dependentní na zvýšení plasmatické hladiny ANP a snížení plasmatické hladiny inzulínu, než na katecholaminy-indukované stimulaci beta-adrenoreceptorů (Moro 2007).

Fyzická aktivita zlepšuje citlivost k inzulínu nezávisle na redukcí hmotnosti (Bantle 2008). Zlepšení inzulínové sensitivity po fyzické zátěži bylo prokázáno u obézních jedinců, u jedinců s porušenou glukózovou tolerancí, T2DM, ale i u zdravých jedinců (Ostergard 2007). Mechanismy inzulinsenzitivního účinku fyzické zátěže nejsou dosud i přes extensivní výzkum v této oblasti zcela objasněny. Kromě nepřímého vlivu redukce hmotnosti a změny tělesného složení se jedná o řadu dílčích efektů na úrovni kosterního svalu.

Chronický mírný celotělový zánět je charakteristický pro civilizační choroby včetně obezity. Pravidelná pohybová aktivita snižuje plasmatické hladiny CRP, dalo by se tedy očekávat, že pohybová aktivita bude suprimovat systémový zánětlivý stav přítomný u obesních jedinců (Clement 2007). Dostupná data však tuto hypotézu nepotvrzují – tříměsíční vytrvalostní trénink u obézních žen vedl ke snížení inzulínové rezistence, genová exprese v tukové tkáni ani plasmatické hladiny adiponektinu, TNF- α a interleukinu-6 tréninkem ovlivněny nebyly (Polak 2006). Tříměsíční dynamický silový trénink u obézních mužů vedl k podobným výsledkům – citlivost k inzulínu byla vlivem tréninku zlepšena, genová exprese v tukové tkáni a plasmatické hladiny adiponektinu, interleukinu-6, interleukinu-1b a TNF- α se nezměnily (Klimcakova 2006).

V poslední době se však objevily zprávy o příznivém protizánětlivém vlivu fyzického tréninku zprostředkovaném myokiny. Myokiny jsou definovány jako cytokiny produkované kontrahujícími se vlákny kosterního svalu, prvním popsaným myokinem je interleukin-6. Interleukin-6 zvyšuje plasmatické hladiny

protizánětlivých cytokinů (IL-1ra, IL-10) a inhibuje produkci prozánětlivého TNF-alpha. Suprese TNF-alpha pravidelnou fyzickou aktivitou má příznivý vliv na inzulinovou rezistenci (Pedersen 2006).

Efekt pohybové aktivity a kalorické restrikce na zánětlivý stav tukové tkáně je tedy odlišný a dosud není detailně prostudován.

Tuková tkáň je současně považována za potentní endokrinní orgán produkující do cirkulace, vedle neesterifikovaných mastných kyselin, řadu biologicky aktivních látek – adipokinů. Tyto adipokiny působí jako regulátory metabolismu v mnoha tkáních. Ovlivňují citlivost k inzulínu v kosterním svalu, játrech a tukové tkáni, podílí se na regulaci imunitní a zánětlivé odpovědi a indukují tak mírný celotělový zánětlivý stav organismu. Ten se zdá být pojítkem mezi obezitou, kardiovaskulárními chorobami a diabetes mellitus 2. typu. Režimová opatření vedou k redukci hmotnosti a snížení kardiovaskulárního rizika, pro předpokládaný pozitivní efekt na celotělový zánětlivý stav však nemáme konzistentní data.

2. Soubor předkládaných prací

1. Polak J, Moro C, Bessičre D, Hejnova J, Marqučs MA, **Bajzova M**, Lafontan M, Crampes F, Berlan M, Stich V. Acute exposure to long-chain fatty acids impairs α 2-adrenergic receptor-mediated antilipolysis in human adipose tissue. *J Lipid Res.* 48(10):2236-46, 2007.
2. **Bajzova M**, Moro C, de Glisezinski I, Polak J, Marques MA, Crampes F, Lafontan M, Berlan M, Stich V. The adipose tissue of young obese subjects is resistant to the antilipolytic effect of insulin during exercise: a microdialysis approach. Práce byla odeslána k publikaci do *International Journal of Obesity*, v recenzním řízení zamítnuta, nyní odeslána do *American Journal of Physiology*.
3. Vitkova M, Klimcakova E, Kovacikova M, Valle C, Moro C, Polak J, Hanacek J, Capel F, Viguerie N, Richterova B, **Bajzova M**, Hejnova J, Stich V, Langin D. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(6):2330-5, 2007.
4. **Bajzová M**, Kovaciková M, Vitková M, Klimcaková E, Polak J, Kovacová Z, Viguerie N, Vedral T, Mikulášek L, Sramková P, Srp A, Hejnová J, Langin D, Stich V. Retinol -binding protein 4 expression in visceral and subcutaneous fat in human obesity. *Physiol Res.* Nov 30; 2007. (Epub ahead of print).

3. Cíle práce

Tuková tkáň je dávana do souvislosti s etiopatogenezí inzulinové rezistence a rozvojem metabolických komplikací včetně diabetes mellitus 2. typu a aterosklerózy. Patofyziologické mechanismy zprostředkující tuto vazbu jsou již delší dobu intenzivně studovány. Výzkum v této oblasti se ubírá dvěma hlavními směry – prvním ze zvažovaných kandidátů stojících za asociací inzulinové rezistence a nadměrné akumulace tukové tkáně jsou volné mastné kyseliny, které jsou do cirkulace uvolňovány v procesu lipolýzy z triacylglycerolů uskladněných v tukové buňce. Expozice volným mastným kyselinám pak vede ke vzniku inzulinové rezistence v cílových orgánech. Druhý směr zájmu je soustředěn na adipokiny - proteiny s regulační či endokrinní funkcí - které jsou tukovou buňkou produkovány a jejichž úloha je v rozvoji inzulinové rezistence rovněž předpokládána. Předložené práce jsou zaměřeny na výzkum jak metabolické funkce tukové buňky - konkrétně regulace lipolýzy (práce č. 1 a 2), tak úlohy tukové tkáně jakožto mocného endokrinního orgánu – konkrétně účinku jednoho z řady secernovaných adipokinů RBP4 (práce č. 3 a 4).

3.1 Metabolické funkce tukové tkáně

3.1.1 Práce č. 1

Akutní expozice mastným kyselinám s dlouhým řetězcem vede k supresi antilipolytického alfa₂-adrenergního účinku v tukové tkáni u lidí

Úvod a cíle práce

Vznik obezity je spojen s porušenou rovnováhou mezi energetickým příjmem a výdejem. Dostupnost vysokoenergetických potravin bohatých na tuky predisponuje k nárůstu hmotnosti. Vliv výživy na lipolýzu, konkrétně akutní vysokotukové zátěže, která modifikuje extracelulární hladiny mastných kyselin, nebyl u lidí popsán. U potkanů dochází po farmakologickém snížení plasmatické hladiny NEFA k signifikantní redukci isoprotenerol-mediované lipolýzy (Gowri 1999). Expozice potkaních adipocytů NEFA (4-24h) nevede k alteraci lipolýzy ani inzulinem-stimulované vychytávání glukózy (Lundgren 2004). Lipotoxicita mastných kyselin se v tukové tkáni u tohoto zvířecího modelu nevyskytuje. Jiné práce prokázaly, že mastné kyseliny s krátkým řetězcem rychle přestupují skrz plasmatickou membránu adipocytu pasivní difúzí a indukují intracelulární pokles pH. Naopak průnik mastných kyselin s dlouhým řetězcem je ve fyziologických koncentracích zprostředkován transportéry proteinového charakteru. Pokles pH moduluje hormonální

signalizaci a vede k vzestupu hydrolýzy triglyceridů (Civelek 1996). Narozdíl od *in vitro* experimentů na zvířecích modelech, podobné experimenty u lidí publikovány nebyly. Lidské adipocyty exprimují jak lipolytické beta- tak antilipolytické alfa₂-adrenergní receptory (Lafontan 1982, Berlan 1982), zatímco u potkanů funkční alfa₂-adrenergní receptory nalezeny nebyly (Lafontan 1995). Nedávno byla u lidí popsána další lipolytická cesta, stimulovaná natriuretickými peptidy (NPs). NP-indukovaná lipolýza je specifická pro primáty a člověka (Sengenès 2000, Moro 2004). Vhodný zvířecí model pro studium regulace lipolýzy vzhledem k akutnímu příjmu dietního tuku tedy chybí. V nedávné práci u lidí jsme prokázali, že 4-denní vysokotuková dieta (65% tuků, 15% proteinů, 20% sacharidů) ovlivňuje alfa₂-adrenergní antilipolytický účinek katecholaminů v subkutánní tukové tkáni během fyzické zátěže (Suljkovicova 2002). 48-h *in vitro* inkubace humánních explantů tukové tkáně s bromopalmitátem vede k supresi antilipolytického alfa₂-adrenergního účinku (Gesta 2001). Efekt akutní expozice mastným kyselinám s dlouhým řetězcem na lipolýzu v humánní tukové tkáni a cvičením-indukovanou mobilizaci tuků nebyl dosud popsán.

Cílem této práce bylo: 1) studovat *in vitro* na humánních adipocytech akutní efekt expozice mastným kyselinám s dlouhým řetězcem na dobře charakterizované lipolytické dráhy. 2) studovat *in vivo*, zda vysokotuková dieta před fyzickou zátěží vede ke změně lipolýzy u štíhlých a obézních jedinců. Při fyzické zátěži dochází k aktivaci sympatikem-stimulované lipolýzy v subkutánní tukové tkáni (Stich 1999). Během cvičení jsou antilipolytické alfa₂- i lipolytické beta-receptory aktivované katecholaminy, antilipolytický účinek je větší u obézních jedinců (Stich 1999, Stich 2000). Tato studie byla koncipována s cílem evaluace mobilizace lipidů u štíhlých a obézních jedinců a nastínění možných rozdílů v adrenergní regulaci lipolýzy během fyzické zátěže v podmínkách nalačno a po příjmu vysokotukového pokrmu, který vede k rapidní elevaci plasmatických NEFA.

Metody

In vitro studie: Subkutánní tuková tkáň byla získána od 8 subjektů s nadváhou během plastické operace. Isolace adipocytů byla provedena standardním způsobem, izolované adipocyty byly rozděleny do tří dávek – v první (kontrolní) byla ihned analyzována lipolýza v NEFA-free mediu, druhá byla po 2h inkubována v NEFA-free KRBHA mediu a třetí byla po 2h inkubována v mediu s přidavkem mastných kyselin s dlouhým řetězcem (směs kyselin laurové, myristové, stearové, linoleové, arachidonové). Po 2h preinkubaci byly adipocyty inkubovány s ANP či isoproterenolem a dále s rostoucí koncentrací epinefrinu osamoceně či s přidavkem selektivního alfa₂-adrenergního antagonisty (RX821002). Na konci každého protokolu byly

vzorky media připraveny k determinaci glycerolu a NEFA (obě látky jsou používány jako markery lipolýzy).

In vivo studie: Do studie bylo rekrutováno 8 zdravých netréovaných štíhlých a 7 obézních mužů. Jedinci byli vyšetřeni v naší laboratoři ve dvou vyšetřovacích dnech v odstupu jednoho týdne. Jedinci podstoupili 45min fyzickou zátěž na bicyklovém ergometru při intenzitě 50% rezervy tepové frekvence. Aktuální TF během fyzické zátěže byla kontinuálně monitorována. Vyšetření bylo provedeno za podmínek na lačno v jednom vyšetřovacím dni a po příjmu vysokotukového pokrmu s obsahem 95% tuků a 5% sacharidů (o energii odpovídající 50% klidového energetického výdeje) v dalším vyšetřovacím dnu. Složení mastných kyselin v pokrmu bylo 66% satureovaných NEFA, 30% MUFA a 4% PUFA. Lipolýza v subkutánní tukové tkáni během fyzické zátěže byla stanovena za použití metodiky mikrodialýzy (standardní metoda k měření látek v extracelulárním prostředí v přítomnosti či absenci neselektivního alfa-antagonisty phentolaminu. Dvě 15min frakce dialyzátu byly sebrány v klidových podmínkách a za 15, 30 a 45min po zahájení fyzické zátěže. Vzorky krve k pozdější analýze byly odebrány v klidu, 30 a 45min po zahájení fyzické zátěže.

Detailní popis metod je uveden v publikaci č. 1.

Výsledky

In vitro studie: Tato studie byla provedena s cílem zjistit, zda preinkubace izolovaných adipocytů s mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem modifikuje alfa₂-adrenergní, beta-adrenergní a ANP-zprostředkovanou lipolytickou odpověď. Po 2h inkubace medium vstupně zbavené mastných kyselin obsahovalo 101±67umol/l NEFA a medium vstupně obohacené o mastné kyseliny s dlouhým řetězcem 372±127umol/l NEFA. Po 2h preinkubace došlo k aktivaci spontánní lipolýzy v mediu bez i s obohacením mastných kyselin s dlouhým řetězcem, přičemž tato byla v druhém mediu větší. Míra stimulace lipolýzy isoproterenolem či ANP nebyla významně ovlivněna. V adipocytech okamžitě inkubovaných v NEFA-free mediu jsme pozorovali očekávaný nárůst lipolytického účinku epinefrinu v přítomnosti selektivního alfa-antagonisty RX821002. Tento efekt však nebyl pozorován v adipocytech neinkubovaných v mediu s mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem či v mediu bez mastných kyselin s dlouhým řetězcem (ale obohaceným NEFA uvolněných během preinkubace).

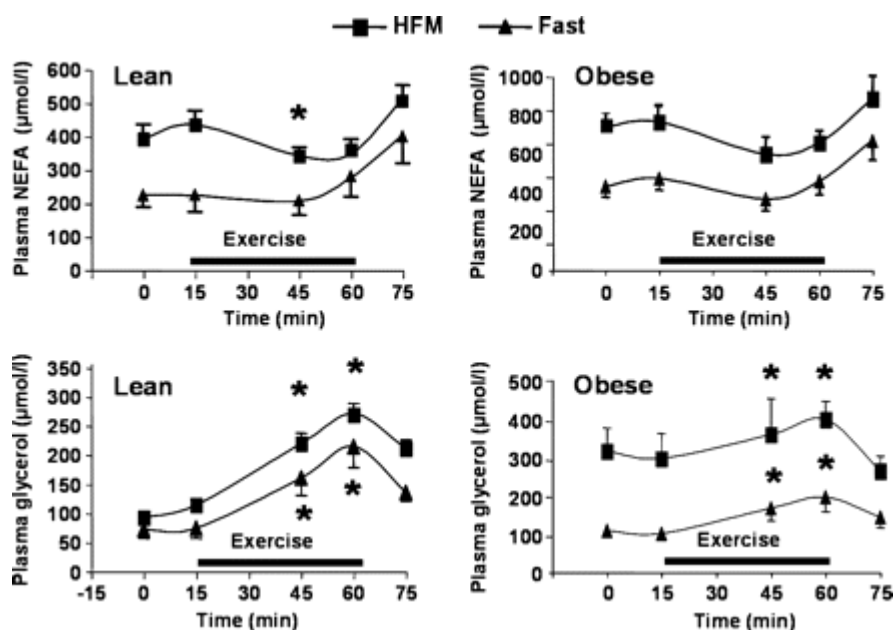
In vivo studie: Změny v plasmatické hladině inzulínu, glukózy, glycerolu a NEFA během 3h po příjmu vysokotukového pokrmu jsou prezentovány v tabulce č. 1. Plasmatické hladiny NEFA a glycerolu byly v podmínkách na lačno vyšší u obézních než u štíhlých jedinců. 3h po příjmu vysokotukového pokrmu došlo

k trojnásobnému zvýšení plasmatických hladin NEFA u obou skupin ($p=0.003$). Plasmatické hodnoty glycerolu po vysokotukovém pokrmu vzrostly, nárůst byl markantnější u obézních jedinců. Plasmatické hladiny inzulínu se významně nezměnily, glykémie mírně stoupla, ale vzestup nedosáhl statistické významnosti, ve 120. a 180. minutě.

Parameter	Time				
	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min
Lean					
Insulin ($\mu\text{U/ml}$)	4.9 ± 0.5	4.8 ± 0.4	5.7 ± 0.6	5.8 ± 0.4	6.4 ± 0.5
Glucose (mmol/l)	3.8 ± 0.4	3.7 ± 0.3	4.0 ± 0.3	4.3 ± 0.7	4.5 ± 0.4
Glycerol ($\mu\text{mol/ml}$)	83 ± 40	83 ± 25	91 ± 28	93 ± 29^a	114 ± 39^a
NEFA ($\mu\text{mol/ml}$)	202 ± 73	195 ± 52	348 ± 74^a	513 ± 133^a	587 ± 142^a
Obese					
Insulin ($\mu\text{U/ml}$)	7.1 ± 1.3	7.2 ± 0.9	6.8 ± 1.4	9.1 ± 3.3	9.2 ± 3.4
Glucose (mmol/l)	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.1	5.0 ± 0.5	4.9 ± 0.3	5.1 ± 0.4
Glycerol ($\mu\text{mol/ml}$)	140 ± 18^b	145.5 ± 19^b	$230 \pm 32^{a,b}$	$314 \pm 59^{a,b}$	$295 \pm 43^{a,b}$
NEFA ($\mu\text{mol/ml}$)	322 ± 44^b	393 ± 75^b	$449 \pm 51^{a,b}$	$743 \pm 70^{a,b}$	$768 \pm 85^{a,b}$

Tabulka č. 1. Plasmatické hodnoty inzulínu, glukózy, glycerolu a NEFA po HFM u štíhlých a obézních jedinců v klidu. HFM – vysokotukový pokrm, byl konzumován v 60. minutě. Hodnoty jsou průměry \pm SEM osmi separátních determinant. ^a $P < 0.05$ vs. 0 min. ^b Signifikantní vs. štíhlí jedinci.

Časový průběh plasmatických hladin glycerolu a NEFA během fyzické zátěže je prezentován v grafu č. 1. U štíhlých jedinců plasmatická hladina glycerolu během zátěže rostla podobně v oba vyšetřovací dny, zatímco plasmatická hladina NEFA se v podmínkách nalačno nezměnila a mírně klesla ve 30. minutě od začátku zátěže po požití vysokotukového pokrmu. U obézních jedinců plasmatická hladina glycerolu mírně stoupla během zátěže a plasmatická hladina NEFA poklesla ve 45. minutě po zahájení zátěže v obou vyšetřovacích dnech. Vysokotukový pokrm neměl významný vliv na změny katecholaminů během zátěže. Pokles inzulínu během zátěže byl obdobný v obou vyšetřovacích dnech u štíhlých jedinců. Statisticky významný pokles plasmatické hladiny inzulínu u obézních jedinců byl pozorován pouze po příjmu vysokotukového pokrmu, glykémie se nezměnila ani v jednom protokolu.



Graf č. 1. Plasmatické koncentrace glycerolu a NEFA v klidu, během zátěže, a v recovery periodě nalačno či 3h po vysokotukovém pokrmu (HFM). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM osmi (štíhlých) a sedmi (obézních)

separátních experimentů. * $P < 0.02$ při srovnání s klidovými hodnotami.

Bazální lipolýza (bazální koncentrace glycerolu v dialyzátu) byla u štíhlých jedinců podobná v podmínkách nalačno i po vysokotukovém pokrmu. Lipolýza během zátěže rostla nezávisle na vyšetřovacím protokolu. Zátěží-indukovaná lipolýza byla potencována při alfa-adrenergní blokádě v podmínkách nalačno, po vysokotukovém pokrmu však tento efekt pozorován nebyl. Bazální lipolýza u obézních jedinců byla v obou vyšetřovacích dnech identická. Zátěží-indukovaná lipolýza byla výrazně potencována alfa-adrenergním blokátorem (phentolaminem) v podmínkách nalačno. Naopak po vysokotukovém pokrmu byla zátěží-indukovaná lipolýza větší než nalačno. Stimulační efekt phentolaminu na zátěží-indukovanou lipolýzu byl navíc po vysokotukovém pokrmu úplně setřen.

Změny v průtoku krve subkutánní tukovou tkání (hodnocené koncentrací ethanolu odcházejícího z mikrodialyzační sondy) nebyly během zátěže signifikantní u štíhlých ani obézních jedinců.

3.1.2 Práce č. 2

Tuková tkáň mladých obézních mužů je rezistentní k antilipolytickému účinku inzulínu během fyzické zátěže: metodika mikrodialýzy

Úvod a cíle práce

Lipolýza v humánní tukové tkáni během fyzické zátěže je regulována zvýšenou hladinou katecholaminů a současným poklesem plasmatické hladiny inzulínu (Hagstrom-Toft 1992, Hodgetts 1991, Horowitz 2003). Lipolýza je v adipocytech aktivována stimulací beta-adrenergních receptorů (beta-AR) a inhibována stimulací alfa2-adrenergních receptorů (alfa2-AR) (Berlan 1982). Simultánní aktivace těchto dvou receptorů moduluje produkci intracelulárního cAMP, který aktivuje cAMP-dependentní protein kinázu, s následnou fosforylací a aktivací hormon-senzitivní lipázy (HSL). Naše skupina prokázala, že natriuretické peptidy (NPs) jsou aktivátory lipolýzy v lidských adipocytech (Sengenès 2000). Fyziologickou relevanci ANP-dependentní

lipolytické dráhy jsme demonstrovali u mladých mužů během fyzické aktivity (Moro 2004). Pokles hladiny inzulínu během cvičení je dalším faktorem zasahujícím do regulace mobilizace lipidů u lidí.

Je dobře známo že, inzulinová senzitivita (pokud jde o metabolismus karbohydrátů) je u obézních jedinců snížena, antilipolytický účinek inzulínu v tukové tkáni je však stále předmětem diskuze. Inzulín redukuje akumulaci cAMP v tukové buňce cestou aktivace fosfodiesterázy-3B (Hagstrom-Toft 1992) a fosforylace beta-adrenergních receptorů (Cimmino 1995). Snížení plasmatické hladiny inzulínu typické během fyzické aktivity tudíž přispívá k fyziologické kontrole lipolýzy a potencuje lipolytickou odpověď tukových buněk. Asociace inzulinové rezistence s diabetes mellitus či obezitou je dobře známa. Fyzická zátěž je vhodný model pro studium inzulinové rezistence, jelikož pokles plasmatické hladiny inzulínu je významným faktorem zasahujícím do mobilizace lipidů.

Cílem naší práce bylo studovat vliv mírné hyperinzulinémie na mobilizaci lipidů v podkožní tukové tkáni během cvičení u štíhlých a obézních mladých mužů v podmínkách nalačno. Ke studiu lokální lipolýzy (jejíž markerem je glycerol uvolněný z tukové buňky) a změny v lokálním krevním průtoku v podkožní tukové tkáni jsme použili metodiku mikrodialýzy (Arner 1990). Postulovali jsme nulovou hypotézu: 1) hyperinzulinémie vede k redukcí zátěži-indukované lipolýzy v porovnání s kontrolními podmínkami a 2) inzulinem zprostředkovaný antilipolytický účinek bude nižší u obézních než u štíhlých jedinců.

Metody

Do studie bylo zařazeno šest zdravých mladých štíhlých a šest obézních mužů. Všichni měli stabilní hmotnost v posledních 3 měsících. Inzulinová senzitivita byla vypočtena pomocí HOMA-IR dle Katze et al. Jeden týden před zahájením studie byla u subjektů stanovena maximální tepová frekvence na bicyklovém ergometru za použití stupňovité zátěže (30W/3min).

Jedinci byli vyšetřeni ráno nalačno ve dvou vyšetřovacích dnech separovaných časovým intervalem jednoho týdne. Studie byla randomizovaná, dvojitě zaslepená. Po uložení do horizontální polohy byly zavedeny dva katetry, jeden do žíly na dorsu ruky pro odběry krve a druhý do antekubitální žíly k infuzi inzulínu a glukózy (či fyziologického roztoku). Dále byly zavedeny dvě mikrodialyzační sondy do abdominální podkožní tukové tkáně. Sondy byly perfundovány Ringerovým roztokem, do kterého byl přidán ethanol ke sledování změny krevního průtoku. Jedna sonda byla perfundována Ringerovým roztokem a druhá phentolaminem (neselektivní alfa-adrenergní blokátor).

Při kontrolním vyšetření byla jedincům po celou dobu vyšetření aplikována infuze fyziologického roztoku. Po 60-ti min ekvilibrační periody, byly odebrány dvě 15-min frakce dialyzátu z obou sond. Následovala fyzická zátěž na bicyklovém ergometru po 45 min při zátěži odpovídající 50% rezervy tepové frekvence daného jedince. Dialyzát byl sbírán v časech 30 a 45 min zátěže a 30 min po ukončení zátěže. Tepová frekvence byla monitorována po celou dobu cvičení sporttesterem.

Při druhém vyšetření byla jedincům aplikována infuze inzulínu ($8\text{mU}/\text{min}/\text{m}^2$), současně byla zahájena aplikace 20% glukózy. Každých 5 min byla měřena aktuální glykémie a rychlost infuze glukózy byla upravována tak, aby byla udržena individuální lačná glykémie. Dvě 15-min frakce dialyzátu byly odebrány po 30-ti minutách inzulínové infuze. Za 45min od zahájení inzulínového clampu jedinci podstoupili 45min zátěž jako při kontrolním vyšetření.

Detailní popis metod je uveden v publikaci č. 2.

Výsledky:

Antropometrické, metabolické a funkční charakteristiky subjektů (Tabulka č. 1): Při prvním vyšetření jedinci cvičili za standardních podmínek (kontrolní vyšetření). Při druhém vyšetření jedinci cvičili za podmínek inzulínového clampu, který měl zabránit poklesu inzulínémie během cvičení. Lačné plasmatické hladiny inzulínu byly 5.7 ± 0.5 u štíhlých a 7.3 ± 1.1 mU/l u obézních mužů. Inzulínový clamp vedl ke stabilním hladinám inzulínu během cvičení (11.1 ± 2.7 a 15.9 ± 2.5 mU/l u štíhlých a obézních). Jedinci byli udržováni na jejich individuální lačné glykémii pomocí infuze glukózy. Průměrná glykémie před a během cvičení byla (4.73 ± 0.18 a 4.62 ± 0.37 mmol/l u štíhlých a 5.40 ± 0.17 a 4.87 ± 0.29 mmol/l u obézních mužů, respektive). Rychlost infuze glukózy v klidu byla vyšší u štíhlých než obézních jedinců (0.073 ± 0.014 a 0.048 ± 0.006 mmol/min; $p=0.03$), stejně jako během cvičení (0.189 ± 0.039 a 0.120 ± 0.016 mmol/min, $p=0.03$).

	Lean	Obese	P
Age (years)	25.5±0.4	28.3±1.8	NS
Height (cm)	183.7±2.2	179.5±5.0	NS
Weight (kg)	78.2±2.8	100.6±3.0	0.04
BMI (kg/m ²)	23.6±0.4	31.4±0.9	0.01
Fat mass (Kg)	10.1±0.4	23.7±1.3	0.001
Fat free mass (Kg)	67.8±2.3	83.3±0.2	0.003
Rest			
Free fatty acid (μmol/l)	353±21	454±76	NS
Glycerol (μmol/l)	86±15	140±18	0.04
Insulin (μU/ml)	5.7±0.5	7.3±1.1	NS
Glucose (mmol/l)	4.9±0.2	4.3±0.2	NS
HOMA-IR	0.60±0.06	1.31±0.16	0.03
Heart rate (beats/min)	62±3	61±4.3	NS
Exercise			
Heart rate (beats/min)	127±0.5	126±2	NS
Watts	130±0.4	126±9	NS

Tab. č. 1. Charakteristiky štíhlých a obézních jedinců v klidu a při zátěži. Plasmatické hladiny glycerolu, mastných kyselin, inzulínu a glukózy byly měřeny před infuzí inzulínu. P <0.05: srovnání štíhlých a obézních jedinců.

Efekt inzulínového clampu na koncentraci glycerolu a etanolu v dialyzátu během cvičení: Při kontrolním vyšetření, v klidu, se průměrná bazální koncentrace glycerolu v dialyzátu (DGC) nelišila v kontrolní sondě od sondy s fentolaminem u štíhlých ani u obézních mužů. Cvičení vedlo k nárůstu DGC v kontrolních sondách. Celkový nárůst (průměrný nárůst během cvičení minus klidové bazální hodnoty) byl v kontrolní sondě u štíhlých větší než u obézních jedinců (67.2±10.4 a 26.4±6.5 μmol/l; p=0.005). Přítomnost phentolaminu v perfuzátu signifikantně zvýšila uvolňování glycerolu u obézních, ale ne u štíhlých jedinců.

Během cvičení při inzulínovém clampu došlo k signifikantnímu snížení DGC u štíhlých mužů v kontrolní sondě i sondě s phentolaminem. U obézních mužů také došlo k redukci zátěží indukovaného nárůstu DGC, tato redukce však nedosáhla signifikantní významnosti ani v jedné sondě.

Etanol ratio v kontrolní sondě (koncentrace etanolu v dialyzátu/koncentrace etanolu v perfuzátu) byl v klidu větší u obézních než u štíhlých mužů (80±5 and 73±5, respectively). U štíhlých jedinců, inzulínový clamp vedl ke snížení etanol ratio v klidu (61±7 a 53±6 v kontrolní a sondě s phentolaminem). U obézních jedinců neměl inzulínový clamp vliv na etanol ratio ani v jedné sondě.

Během cvičení etanol ratio signifikantně poklesl při kontrolním vyšetření u štíhlých, nikoli však u obézních jedinců. Během cvičení při inzulínovém clampu etanol ratio u štíhlých poklesl v obou sondách, tento efekt nedosáhl signifikantní významnosti u obézních jedinců.

Plasmatické hladiny katecholaminů, glycerolu, glukózy a NEFA: Při kontrolním vyšetření vedla fyzická aktivita k elevaci norepinefrinu a epinefrinu v obou skupinách. Inzulínový clamp nevedl k elevaci katecholaminů během cvičení ani v jedné skupině. V klidu byla plasmatická hladina glycerolu vyšší u obézních než u štíhlých mužů, zatímco plasmatické hladiny NEFA, glukózy a inzulínu byly podobné.

V klidu a 45min po infuzi inzulínu plasmatické hladiny NEFA a glycerolu signifikantně poklesly (353 ± 21 na 226 ± 6 $\mu\text{mol/l}$ u štíhlých a 434 ± 71 na 262 ± 81 $\mu\text{mol/l}$ u obézních pro NEFA a 82 ± 17 na 61 ± 12 $\mu\text{mol/l}$ u štíhlých a 147 ± 16 na 124 ± 13 u obézních mužů pro glycerol). Nárůst glycerolu při inzulínovém clampu byl výrazně snížen u štíhlých, nikoli však u obézních jedinců. Plasmatické hladiny NEFA během inzulínového clampu signifikantně poklesly pouze u štíhlých mužů.

3.1.3 Závěry předložených prací

1. Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem stimulují bazální lipolýzu a inhibují alfa2-adrenergně zprostředkovaný antilipolytický účinek *in vitro*.
2. *In vivo*, *in situ* v podkožní tukové tkáni vede perorální příjem vysokotukového pokrmu k supresi alfa2-adrenergního antilipolytického účinku během fyzické aktivity; tento efekt je výrazněji vyjádřen u obézních jedinců.
3. Inzulín vykazuje antilipolytický účinek i během fyzické aktivity.
4. Obézní jedinci jsou k antilipolytickému účinku inzulínu během fyzické zátěže rezistentní.

3.1.4 Diskuze k předloženým pracem

Studovali jsme vliv metabolicky nepříznivých situací (vliv hyperinzulinémie a zvýšené plasmatické hladiny mastných kyselin) na lipolytickou odpověď tukové buňky během fyzické aktivity na souboru štíhlých a obézních mužů.

Lipolýza v tukové buňce je výsledkem vzájemného působení řady hormonů – katecholaminů, inzulínu, ANP, růstového hormonu, některých adipokinů. Katecholaminy vykazují v závislosti na relativní afinitě k jednotlivým subtypům adrenergních receptorů duální lipolytický účinek, kdy cestou stimulace beta1,2-adrenergních receptorů lipolýzu stimulují a cestou stimulace alfa2-adrenergních receptorů lipolýzu inhibují. Alfa2-adrenergní

antilipolytický účinek se zdá být klíčovým protektivním faktorem z hlediska progresu metabolických abnormalit u obézních pacientů. Alfa2-adrenergní antilipolytická aktivita je v klidu vyšší u obézních jedinců (Mauriege 1999). Tento antilipolytický účinek zprostředkovaný alfa2-AR byl prokázán v podkožní tukové tkáni i během tělesné zátěže (Stich 1999), u obézních jedinců je toto antilipolytické působení katecholaminů vyšší ve srovnání s neobézními (Stich 2000), a to i při arteficiálně udržované mírné hyperinzulinémii (Bajzová 2008) - inzulin tedy s alfa2-adrenergní lipolytickou dráhou neinterferuje. Zvýšení plasmatické hladiny NEFA po perorálním příjmu vysokotukového pokrmu vede k supresi antilipolytického alfa2-adrenergního účinku během následující fyzické aktivity jak u štíhlých tak u obézních mužů, nicméně tento efekt je více vyjádřený u obézních jedinců, u nichž je za kontrolních podmínek přítomen výrazný alfa2-adrenergní účinek.

Klinický dopad aktivace alfa2-adrenergních receptorů a jejich možné terapeutické ovlivnění antagonistou v léčbě obézních pacientů není jednoznačné. Antilipolytický alfa2-AR účinek v podmínkách fyzické inaktivity zřejmě představuje pro obézního pacienta ochranný mechanismus proti nadměrnému uvolňování mastných kyselin do cirkulace s důsledkem lipotoxicity (indukce periferní i jaterní inzulinové rezistence, poškození cévní reaktivity a funkce pankreatických beta buněk apod.). Přítomnost výrazného alfa2-AR antilipolytického účinku během fyzické aktivity se zdá být naopak nežádoucí z hlediska sníženého přísunu energetického substrátu pracujícímu kosternímu svalu. Nedostatečná mobilizace lipidů během fyzické aktivity spolu s metabolickou inflexibilitou kosterního svalu by mohla do jisté míry vysvětlovat snížení tolerance zátěže obézních jedinců (Hulens M 2001). Nabízí se tedy možnost preskripce fyzické aktivity pod clonou alfa2-blokátoru působícího selektivně v tukové tkáni. Suprimující alfa2-antilipolytický účinek mastných kyselin jsme prokázali *in vitro* po inkubaci humánních adipocytů s mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem (LCFA) i *in vivo* při fyzické zátěži, která následovala 3h po perorálním příjmu standardního vysokotukového pokrmu obsahujícího mastné kyseliny ve složení 66% nasycené, 30% mononenasycené a 4% polynenasycené. Vliv vysokotukové diety na beta-adrenergní lipolytickou dráhu nebyl prokázán (Suljkovicova 2002). Některé práce prokázaly, že obézní jedinci mají sníženou kapacitu kosterního svalu využít tuky během fyzické zátěže mírné intenzity (Zunquin 2008); přínos stimulace lipolýzy alfa2-blokátorem či mastnými kyselinami během fyzické zátěže pro obézního pacienta by ve svém důsledku tedy nebyl příznivý z hlediska negativního účinku zvýšené plasmatické hladiny NEFA. Jiní autoři však snížení oxidace mastných kyselin při zátěži u obézních jedinců neprokázali (Kanaley 2001, Lazzer 2007, Goodpaster 2002). Otázka izolovaného vlivu nasycených a nenasycených mastných kyselin na regulaci lipolytických drah zůstává předmětem dalšího výzkumu.

Inzulín, antilipolytický působící hormon, se uplatňuje postprandiálně v podmínkách, kdy hlavním energetickým substrátem je glukóza. Pro obézní pacienty charakteristická zvýšená lačná hladina inzulínu a současně zvýšená bazální lipolýza svědčí pro rezistenci k působení inzulínu na úrovni adipocytu. Pokles inzulínu během fyzické zátěže vede ke zvýšení lipolýzy u inzulinsenzitivních jedinců. V naší práci jsme prokázali, že mírná hyperinzulinémie vede ke snížení zátěži-indukované elevace extracelulárního glycerolu v podkožní tukové tkáni i plasmatického glycerolu u štíhlých jedinců. Snížená lipolýza v podmínkách zvýšené plasmatické hladiny inzulínu u inzulinsenzitivních jedinců tak demonstruje přítomnost antilipolytického účinku inzulínu i během fyzické zátěže. Alfa2-blokátor phentolamin neměl na míru zátěži-indukované lipolýzy během hyperinsulinémie signifikantní vliv – antilipolytická inzulínem stimulovaná dráha je tudíž během fyzické zátěže u inzulinsenzitivních jedinců nadřazena alfa2-antilipolytické dráze. U obézních jedinců nebyla redukce zátěži-indukované lipolýzy (extracelulární glycerol v podkožní tukové tkáni i plasmatický glycerol) během hyperinzulinémie signifikantně významná. Antilipolytický účinek inzulínu je tudíž u obézních jedinců během fyzické zátěže výrazně oslaben a tyto jedinci jsou rezistentní k antilipolytickému působení inzulínu při fyzické aktivitě. V mikrodialyzační sondě s přidavkem alfa2-blokátoru došlo k signifikantně významné elevaci extracelulárního glycerolu v dialyzátu, přítomnost alfa2-antilipolytického účinku je tedy u obézních pacientů výrazná během fyzické zátěže i při hyperinzulinémii. Alfa2-adrenergní antilipolytická cesta je u obézních na rozdíl od štíhlých jedinců při fyzické aktivitě dominantní. Dalším průkazem inzulínové rezistence v tukové tkáni obézních jedinců je porušená regulace lokálního krevního průtoku. Ke zvýšení krevního průtoku v tukové tkáni dochází v situacích metabolické aktivity tukové tkáně – při hladovění, postprandiálně a během fyzické aktivity (Frayn 2003). Snížený průtok v intersticiu tukové tkáně je považován za další marker inzulínové rezistence (Dimitriadis 2007, Karpe 2002). Krevní průtok v tukové tkáni (hodnocený jako poměr koncentrace etanolu v dialyzátu/perfuzátu – tzv. etanol ratio) byl u obézních nižší než u štíhlých jedinců, při hyperinzulinémii došlo ke snížení etanol ratio (svědčící pro nárůst intersticiálního průtoku) pouze u štíhlých jedinců. Absence inzulínem-indukované vasodilatace v intersticiu tukové tkáně je další známkou inzulínové rezistence v tukové tkáni obézních jedinců a mohla by částečně přispívat k nízké efektivitě redukčních režimů u některých obézních pacientů.

V kontrolních klidových podmínkách se koncentrace glycerolu v dialyzátu nelišila u štíhlých a obézních jedinců na rozdíl od podmínek fyzické zátěže při hyperinzulinémii. Inzulínová rezistence v tukové buňce nebyla u našich obézních pacientů v klidu vyjádřena, ale byla již detekovatelná během fyzické aktivity. Časná detekce inzulínové rezistence v tukové tkáni během zátěžového protokolu a suprese alfa2-antilipolytického účinku alfa2-

blokátořem či dietní intervencí současně s pohybovou terapií by mohla přispět k lepším výsledkům konzervativní léčby obézních pacientů.

3.2 Endokrinní funkce tukové tkáně

3.2.1 Práce č. 3

Plasmatické hladiny a exprese Retinol-binding proteinu 4 v tukové tkáni jsou sníženy po redukci hmotnosti navozené dietou u obézních jedinců, ale nejsou asociovány se změnou inzulinové senzitivity

Úvod a cíle práce

Diabetes mellitus 2. typu je charakterizován inzulinovou rezistencí a relativním deficitem inzulínu. Rezistence k účinku inzulínu se vyskytuje v řadě tkání, v játrech je spojena se zvýšenou glukoneogenezou a v kosterním svalu se snížením užitizace glukózy. Inzulinová rezistence je významným kauzálním faktorem metabolického syndromu a rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění. Obezita je jednou z hlavních příčin inzulinové rezistence a rizikovým faktorem pro rozvoj diabetes mellitus 2. typu. Nadměrné množství tukové tkáně je asociováno s produkcí četných molekul s parakrinní či endokrinní funkcí, které mohou přispívat k rozvoji inzulinové rezistence (Arner 2003). Nedávno popsáná kandidátní molekula je RBP4 (Yang 2005). Expese RBP4 v tukové tkáni a plasmatické hladiny RBP4 jsou zvýšeny u myších modelů inzulinové rezistence. Selektivní genetický knockout inzulínem stimulovaných glukozových transporterů 4 v adipocytech vede ke zhoršení celotělové inzulinové senzitivity (Abel 2001). Jelikož adipocyty přispívají pouze malou měrou k celotělovému odsunu glukózy, předpokládá se existence faktoru produkovaného adipocyty, který působí na játra a kosterní sval. Tímto faktorem se zdá být RBP4 (Yang 2005). Overexpese RBP4 či injekce rekombinantního RBP4 indukuje inzulinovou rezistenci u myši, zatímco farmakologicky snížené hladiny RBP4 vedou ke zlepšení inzulinové senzitivity u myši živených vysokotukovou dietou. RBP4 poškozujie inzulinovou signalizaci v kosterním svalu a ovlivňuje produkci glukózy v játrech.

RBP4 je protein s krátkým biologickým poločasem, v klinické praxi používán k hodnocení krátkodobé fluktuace nutričního stavu (Quadro 1999). Zvýšené plasmatické hladiny RBP4 byly popsány u jedinců s inzulinovou rezistencí a diabetiků 2. typu (Basualdo 1997, Graham 2006, Cho 2006). Korelace mezi

plasmatickými hladinami RBP4 a stupněm inzulinové rezistence byly nalezeny u různých populačních skupin (Graham 2006). Avšak kauzální úloha RBP4 v patogenezi inzulinové rezistence a diabetes mellitus 2. typu v dosud provedených průřezových klinických studiích prokázána nebyla (Polonsky 2006). V této práci jsme studovali RBP4 u obézních jedinců rekrutovaných do vícefázového redukčního programu složeného ze 4-týdenní velmi přísné nízkokalorické diety (very-low-calorie diet – VLCD), 2-měsíční nízkokalorické diety a 3 až 4-měsíční fáze stabilizace hmotnosti. RBP4 mRNA exprese v subkutánní tukové tkáni a plasmatické hladiny RBP4 byly stanoveny před a po skončení každé fáze a vztaženy k antropometrickým a biologickým parametrům včetně glucose disposal rate stanoveným euglykemickým hyperinsulinním klempem.

Metody

In vitro studie: Subkutánní tuková tkáň byla natrávena kolagenázou, zralé adipocyty separovány od stromavaskulární frakce centrifugací. Byly izolovány jednotlivé buněčné subtypy stromavaskulární frakce (endotelie, preadipocyty a makrofágy). V den 13, 60-80% buněk bylo diferencováno v adipocyty s obsahem lipidových inkluzí. Explanty tukové tkáně byly kultivovány v DMEM F12 mediu, preinkubovány k odstranění buněčného debris z poškozených buněk během preparace, v den 2 byly promyty a inkubovány v čerstvém mediu po 24h. Aliquoty byly uchovány v -80C do doby analýzy.

Klinický protokol. Do studie bylo rekrutováno 24 obézních premenopauzálních žen se stabilní hmotností v posledních třech měsících. První 4 týdny intervenčního programu dostávaly ženy VLCD o 800kcal/den. Další 8 týdnů byly instruovány, aby dodržovaly nízkokalorickou dietu o celkové energetické hodnotě o 600 kcal/den nižší než individuálně odhadnutý bazální energetický výdej (stanovený při vstupním vyšetření) násobený 1,3. Třetí období byla fáze stabilizace hmotnosti trvající 3-4 měsíce, během této fáze byly pacientky instruovány, aby dodržovaly habituální dietu. Konzultace dietologa byla 1x týdně v první a druhé fázi, 1x měsíčně ve třetí fázi programu. Při každé konzultaci odevzdaly pacientky 3-denní jídelníček. Na začátku programu a na konci každé fáze podstoupily pacientky komplexní klinické vyšetření včetně jehlové biopsie podkožní tukové tkáně z oblasti břicha a stanovení inzulinové senzitivity pomocí euglykemického clampu.

RNA analýza, determinace hladin z kultivačního media a plasmy. Extrakce celkové RNA, reversní transkripce a real time qPCR byla provedena ze vzorků tukové tkáně, kousků a buněk. Byla stanovena hladina glukózy, inzulínu, neesterifikovaných mastných kyselin, adiponektinu, RBP4.

Detailní popis metod je uveden v publikaci č. 3

Výsledky

Expresa RBP4 v tukové tkáni. Řada adipokinů je produkována jinými buňkami tukové tkáně než adipocyty. Porovnáním RBP4 mRNA exprese ve zralých adipocytech a buňkách stromavaskulární frakce z humánních subkutánní tukové tkáně jsme zjistili, že RBP4 je exprimován téměř výhradně v adipocytech. Přímou detekcí v izolovaných endotelích, makrofázích a preadipocyte-like buňkách jsme potvrdili, že exprese RBP4 byla velmi nízká v porovnání se zralými adipocyty. Expresa RBP4 byla indukována během konverze z preadipocytů na adipocyty. Na primárních kulturách explantů tukové tkáně jsme ukázali, že produkce RBP4 in vitro je srovnatelná s produkcí adiponektinu, který je produkován adipocyty ve velké míře.

Klinické ukazatele obézních žen během redukčního programu. Antropometrické parametry a plasmatické hladiny byly stanoveny na začátku programu a na konci každé intervenční fáze (Tabulka 1). Tělesná hmotnost a BMI poklesly během VLCD a LCD fáze, tělesná hmotnost se během fáze stabilizace hmotnosti stabilizovala. Hmotnostní úbytek byl způsoben především redukcí tukové tkáně. Beztuková hmota nepatrně poklesla během VLCD fáze, během dalších period se již neměnila. Pokles plasmatické hladiny inzulinu byl pozorován na konci každé fáze. Hladiny triglyceridů a neesterifikovaných mastných kyselin se snížily (mimo NEFA během VLCD), zatímco glykemie zůstala v průběhu protokolu nezměněna. Spotřeba glukózy evaluována pomocí euglykemického hyperinzulinního clampu během VLCD vzrostla a zůstala zvýšena po dobu LCD i stabilizační fáze.

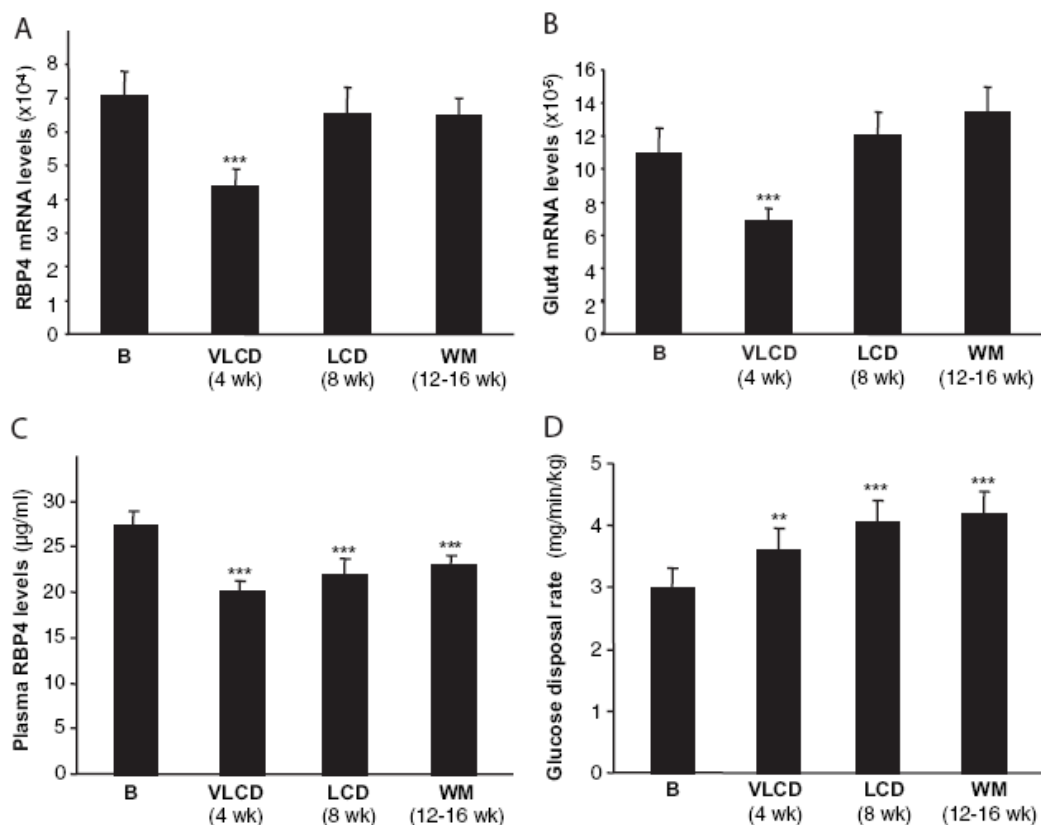
Tabulka č. 1: Klinické parametry 24 obézních žen vstuně a na konci jednotlivých fází redukčního programu

Parameter	Basal	VLCD 4 wk	LCD 8 wk	WM 12–16 wk
Weight (kg)	97 ± 16	90 ± 15 ^c	87 ± 15 ^c	87 ± 15 ^c
BMI (kg/m ²)	35 ± 5	33 ± 5 ^c	32 ± 4 ^c	32 ± 5 ^c
Fat mass (kg)	40 ± 12	35 ± 11 ^c	31 ± 9 ^c	32 ± 11 ^c
Fat-free mass (kg)	58 ± 6	55 ± 7 ^b	56 ± 8 ^b	55 ± 7 ^c
Waist (cm)	104 ± 13	99 ± 13 ^c	96 ± 13 ^c	96 ± 13 ^c
Glucose (mmol/liter)	5.6 ± 0.4	5.3 ± 0.6 ^a	5.4 ± 0.7	5.3 ± 0.8
Insulin (mU/liter)	13.6 ± 8.3	6.8 ± 3.7 ^c	5.8 ± 2.6 ^c	6.8 ± 2.8 ^c
Glycerol (μmol/liter)	217 ± 77	160 ± 39 ^b	145 ± 59 ^c	150 ± 43 ^c
Nonesterified fatty acid (μmol/liter)	693 ± 144	741 ± 126	580 ± 170 ^a	564 ± 171 ^a
β-hydroxybutyrate (mmol/liter)	0.16 ± 0.09	0.65 ± 0.36 ^c	0.27 ± 0.16 ^c	0.19 ± 0.17
Total cholesterol (mmol/liter)	4.82 ± 0.66	3.90 ± 0.76 ^c	4.29 ± 0.69 ^c	4.56 ± 0.66 ^a
Triglycerides (mmol/liter)	1.43 ± 0.69	1.06 ± 0.35 ^c	1.06 ± 0.37 ^b	1.03 ± 0.29 ^b
Leptin (ng/ml)	41 ± 15	20 ± 13 ^c	24 ± 14 ^c	27 ± 15 ^c
Adiponectin (μg/ml)	8.4 ± 3.9	8.4 ± 3.3	8.3 ± 3.3	9.2 ± 3.6
Cortisol (nmol/liter)	205 ± 96	157 ± 67 ^b	146 ± 61 ^b	177 ± 102 ^a
Glucose disposal rate (mg/kg·min)	2.98 ± 1.56	3.61 ± 1.65 ^b	4.05 ± 1.66 ^c	4.19 ± 1.74 ^c
Glucose disposal rate (mg/kg fat-free mass·min)	4.88 ± 2.29	5.75 ± 2.43 ^a	6.15 ± 2.31 ^c	6.48 ± 2.51 ^c

Hodnoty jsou průměry ± SD. *a* $P < 0.05$. *b* $P < 0.01$. *c* $P < 0.001$ vs. bazální hodnoty.

Expresa mRNA RBP4 v tukové tkáni během redukčního programu. RBP4 mRNA exprese se během VLCD snížila. Během LCD fáze došlo ke zvýšení RBP4 mRNA tak, že na konci LCD a fáze stabilizace hmotnosti se hladiny RBP4 mRNA nelišily od bazálních hodnot.

Plasmatické hladiny RBP4 během redukčního programu. Plasmatické hladiny RBP4 se snížily během VLCD. LCD fáze a fáze stabilizace hmotnosti byly charakterizovány mírným postupným vzestupem RBP4 v porovnání s VLCD periodou, nicméně hladiny RBP4 byly na konci programu nižší než vstupní hodnoty. Vývoj RBP4 hladin se odlišoval od hodnot spotřeby glukózy, které se během intervence výrazně neměnily.



Graf 1. mRNA RBP4 a GLUT4 v subkutánní tukové tkáni, plasmatické hladiny RBP4 a glucose disposal rate během redukčního programu u obézních žen (n=24). A, RBP4 mRNA v tukové tkáni. B, GLUT4 mRNA v tukové tkáni. C, plasmatické hladiny RBP4. D, glucose disposal rate. Hodnoty jsou průměry ± SEM. **, $P < 0.01$. ***, $P < 0.001$ vs. basální hodnoty.

Vztah mezi plasmatickou hladinou RBP4 a inzulinovou rezistencí. 24 obézních žen jsme rozdělili do dvou skupin dle bazálního stupně inzulinové rezistence. Rozdíly v bazálních plasmatických hladinách RBP4 ani dietou-indukovaným poklesem plasmatických hladin RBP4 jsme mezi skupinami nepozorovali. Přerozdělením subjektů do dvou skupin dle změny ve spotřebě glukózy po redukčním programu jsme získali obdobné výsledky – z toho vyplývá, že dietou navozená změna v plasmatické hladině RBP4 není ve skupinách rozdílná. Korelace mezi hladinami RBP4 a markery inzulinové rezistence jsme nenalezli a to jak před zahájením dietního programu tak po VLCD fázi či na konci dietního programu.

Tabulka č. 2

Dietou navozené změny v expresi RBP4 v tukové tkáni a plasmatických hladin RBP4 u 2 podskupin rozdělených dle stupně basální inzulinové senzitivity

	Obese subjects with low-insulin sensitivity (n = 12)	Obese subjects with high-insulin sensitivity (n = 12)
Glucose disposal rate (mg/min/kg)	1.77 ± 0.12	4.18 ± 0.35 ^{***}
Basal plasma RBP4 levels (µg/ml)	29 ± 3	26 ± 1
Decrease of plasma RBP4 levels during VLCD (%)	23 ± 8	26 ± 4
Decrease of plasma RBP4 levels during WM (%)	17 ± 5	13 ± 4

Hodnoty jsou průměry ± SEM. ^{***}, P<0.001

3.2.2 Práce č. 4

Expresie Retinol-binding proteinu 4 ve viscerální a subkutánní tukové tkáni u obézních jedinců

Úvod a cíle práce

Obezita je považována za jednu z hlavních příčin inzulinové rezistence a významný rizikový faktor pro vznik diabetes mellitus 2. typu. Nadměrné množství tukové tkáně v organismu je asociováno s produkcí několika látek s parakrinní a/nebo endokrinní aktivitou, které přispívají k rozvoji inzulinové rezistence. Nedávno objevený kandidátní adipokin je retinol-binding protein 4 (RBP4) (Yang 2005). Expresie RBP4 mRNA v tukové tkáni a cirkulující plasmatické hladiny jsou zvýšeny u několika myších modelů inzulinové rezistence. Over-expresie RBP4 či injekce rekombinantního RBP4 indukuje vznik inzulinové rezistence u myši, zatímco farmakologicky snížené hladiny RBP4 inzulinovou senzitivitu u myši na vysokotukové dietě zlepšují (Yang 2005). Genetický knockout inzulinem-stimulovaného glukózového transportéru (GLUT4) selektivně v adipocytech má za následek zhoršení celotělové citlivosti k inzulinu, tento efekt je pravděpodobně zprostředkován RBP4 (Abel 2001). U lidí byly popsány zvýšené plasmatické hladiny RBP4 u inzulinorezistentních jedinců a u diabetiků 2. typu (Yang 2005, Cho 2006,

Graham 2006). RBP4 je produkován hepatocyty, ale i adipocyty potkanů (Tsutsumi 1992) a lidí (Janke 2006). V recentní práci jsme prokázali, že RBP4 je secernován z explantů humánní tukové tkáně a exprimován téměř výlučně ve zralých adipocytech (exprese ve stromavaskulární frakci tukové tkáně byla zanedbatelná) (Viřkova 2007). Nedávno bylo demonstrováno, že exprese RBP4 mRNA je down-regulována v subkutánní tukové tkáni obézních žen (Janke 2006) a up-regulována u žen se syndromem polycystických ovaríí ve srovnání se štíhlými kontrolami (Tan 2007). Během několikastupňové dietní intervence nebyly změny v expresi RBP4 asociovány se změnou inzulinové senzitivity (Janke 2006). Vztah mezi plasmatickými hladinami RBP4 a expresí mRNA RBP4 v subkutánní tukové tkáni nebyl nalezen (Janke 2006). Z těchto dat vyplývá pravděpodobná role viscerálního tuku v produkci RBP4. Cílem naší práce bylo studovat expresi RBP4 v párových vzorcích subkutánní a viscerální tukové tkáně u skupiny pacientek se širokým rozmezím BMI a množstvím viscerální tukové tkáně a různým stupněm inzulinové rezistence. Na tomto souboru jsme dále sledovali vztah mezi plasmatickou hladinou RBP4 a indikátory obezity a plasmatickou hladinou RBP4 a inzulinovou rezistencí.

Metody

Do studie bylo zahrnuto 59 žen (věk 21 až 66 let, BMI 19.6 až 48.5 kg/m²), které byly indikovány k chirurgickému výkonu v dutině břišní. Vylučovací kritéria zahrnovaly malignitu, zánětlivé onemocnění, srdeční selhávání, ICHS v anamnéze, endokrinopatie, chronické renální či jaterní onemocnění a psychiatrické onemocnění. Všechny pacientky měly minimálně 3 měsíce před vstupem do studie stabilní hmotnost. Před operačním výkonem byly pacientky vyšetřeny – byla provedena antropometrická měření, počítačovou tomografií byla stanovena plocha viscerální a subkutánní abdominální tukové tkáně. Citlivost k inzulínu byla vyšetřena standardní metodou euglykemického hyperinzulinového clampu. Během operačního výkonu byly odebrány párové vzorky viscerální a subkutánní tukové tkáně k pozdější analýze RNA RBP4, leptinu a GLUT4. Biochemické parametry byly stanoveny standardními metodami, plasmatická hladina RBP4 byla stanovena sandwichovou ELISOU.

Detailní popis metod je uveden v publikaci č. 4.

Výsledky

Soubor 59 pacientek byl rozdělen na skupinu neobézních (n = 26) a obézních (n = 33). Obézní skupina byla dále stratifikována dle přítomnosti (n = 17) či nepřítomnosti (n = 16) metabolického syndromu, který byl diagnostikován na základě kritérií IDF (Alberti 2005). Antropometrické a metabolické

charakteristiky jednotlivých skupin jsou prezentovány v tabulce č. 1. Obézní pacientky s metabolickým syndromem měly větší relativní množství viscerálního tuku (vztažené k subkutánnímu tuku) a vyšší plasmatické hladiny triglyceridů než obézní bez metabolického syndromu. Obézní bez metabolického syndromu se v uvedených parametrech nelišily od neobézních jedinců. Glucose disposal rate (M) bylo nižší u skupiny obézních jedinců než u neobézních.

Tabulka 1

Anthropometrické and metabolické charakteristiky u neobézních (nonOB) a obézních pacientek bez (OB) a s (MS) metabolickým syndromem

Group	nonOB (n = 26)	OB (n = 17)	MS (n = 16)
Age (years)	40,2 ± 2,3	41,6 ± 2,4	49,4 ± 2,7
BMI (kg/m ²)	24,5 ± 0,73	37,1 ± 1,4 ^a	33,9 ± 1,2 ^b
Waist (cm)	83,3 ± 2,1	106,8 ± 2,7 ^a	107,3 ± 2,6 ^b
Fat mass (%)	30,2 ± 1,38	45,3 ± 1,16 ^a	41,9 ± 1,39 ^b
Visceral fat (cm ³)	74,1 ± 10,1	121,4 ± 9,8 ^a	156,2 ± 12,8 ^b
Subcutaneous fat (cm ³)	250,2 ± 25,3	310,5 ± 30,3 ^a	409,2 ± 29,9 ^{b,c}
Visceral /subcutaneous fat	0,28 ± 0,11	0,24 ± 0,07	0,42 ± 0,18 ^{b,c}
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,48 ± 0,06	1,40 ± 0,07	1,23 ± 0,05 ^b
LDL- cholesterol (mmol/l)	3,13 ± 0,16	2,85 ± 0,27	3,0 ± 0,33
Triglycerides (mmol/l)	1,01 ± 0,12	1,22 ± 0,09	2,36 ± 0,36 ^{b,c}
Blood glucose (mmol/l)	4,78 ± 0,08	5,38 ± 0,12 ^a	6,22 ± 0,44 ^b
Insulin (mmol/l)	5,88 ± 0,54	10,6 ± 1,7 ^a	13,3 ± 1,5 ^b
Glucose disposal rate - M (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	6,17 ± 0,44	3,80 ± 0,34 ^a	2,81 ± 0,33 ^b
RBP4 plasma (ng/l)	27,8 ± 1,5	26,0 ± 1,6	29,2 ± 1,8

Hodnoty jsou průměry ± SEM. Skupiny jsou porovnány one way ANOVA s Bonferroni's multiple t-test post-hoc analysis: ^a p < 0,05 OB vs. nonOB, ^b p < 0,05 MS vs. nonOB, ^c p < 0,05 MS vs. OB

RBP4 exprese ve viscerální a subkutánní tukové tkáni: Hladiny mRNA RBP4 byly signifikantně nižší ve viscerální než v subkutánní tukové tkáni ve všech třech skupinách i v celém souboru (2.0 ± 0.2 vs 8.0 ± 0.7 arbitrary units, p < 0.001). Rozdíly v hladinách mRNA RBP4 ve viscerální či subkutánní tukové tkáni mezi jednotlivými skupinami nalezeny nebyly. Byla prokázána signifikantní korelace mezi mRNA RBP4 ve viscerální a subkutánní tukové tkáni v celém souboru (r = 0.347, p < 0.05).

Expresa GLUT4 a leptinu ve viscerální a subkutánní tukové tkáni: Expresa leptinu byla nižší ve viscerální než subkutánní tukové tkáni ve všech třech skupinách, exprese GLUT4 byla signifikantně nižší ve viscerální než v subkutánní tukové tkáni pouze u obézních bez metabolického syndromu.

Plasmatické hladiny RBP4: Rozdíly v plasmatických hladinách RBP4 mezi jednotlivými skupinami nebyly přítomny, ani korelace mezi plasmatickou hladinou RBP4 a viscerální či subkutánní mRNA RBP4 v jednotlivých skupinách či celém souboru nebyly nalezeny.

Vztah mezi ukazateli RBP4 a antropometrickými a metabolickými parametry: V celém souboru byla nalezen slabá korelace mezi plasmatickou hladinou RBP4 a triglyceridy a plasmatickou hladinou RBP4 a glykemií. Jiné korelace nalezeny nebyly.

Vztah mezi expresí GLUT4 a RBP4: GLUT4 mRNA ve viscerálním tuku korelovala s RBP4 mRNA ve viscerálním i subkutánním tuku v celém souboru pacientek.

3.2.3 Závěry předložených prací:

1) kalorická restrikce spojená s redukcí hmotnosti vede k poklesu plasmatické hladiny RBP4 i exprese RBP4 mRNA v tukové tkáni.

2) exprese RBP4 mRNA ve viscerální tukové tkáni je nízká v porovnání se subkutánní tukovou tkání, a to nezávisle na stupni inzulinové rezistence či přítomnosti metabolického syndromu.

3) vztah mezi plasmatickou hladinou RBP4 a inzulinovou senzitivitou stejně jako mezi expresí RBP4 mRNA ve viscerální či subkutánní tukové tkáni a inzulinovou senzitivitou nebyl prokázán.

3.2.4 Diskuze k předloženým pracem

Retinol binding protein 4 byl navržen jako adipokin zahrnutý do regulace systémového metabolismu glukózy a patogeneze inzulinové rezistence (Yang 2005, Graham 2006, Cho 2006, Janke 2006). Zvýšené plasmatické hladiny RBP4 byly popsány u jedinců s inzulinovou rezistencí a diabetes mellitus 2. typu, ačkoli vztah mezi RBP4 a inzulinovou rezistencí v jiných průřezových studiích na jedincích s normální glukózovou tolerancí či mírným stupněm inzulinové rezistence prokázán nebyl. Exprese RBP4 byla prokázána v subkutánní tukové tkáni a nedávno také ve viscerální tukové tkáni u lidí (Tan 2007). Na našem pracovišti jsme demonstrovali (Vitkova 2007) že: 1) RBP4 je exprimován převážně v adipocytech, exprese ve stromavaskulární frakci tukové tkáně je zanedbatelná a 2) RBP4 je secernován z explantů lidské tukové tkáně.

V prospektivní intervenční studii jsme sledovali obézní inzulinorezistentní ženy v průběhu třířázového redukčního programu. U subjektů došlo k

významné redukci hmotnosti a tukové hmoty během VLCD fáze s následným mírným poklesem během LCD fáze a stabilizace hmotnosti během poslední, hmotnost stabilizační, fáze programu. Inzulinová senzitivita (vyjádřena jako glucose disposal) během jednotlivých fází postupně vzrůstala. Plasmatické hladiny RBP4 významně poklesly po VLCD fázi a následně stoupaly během dalších fází, nicméně zůstaly nižší než bazální hodnoty. Profil plasmatické hladiny RBP4 nebyl závislý na změnách markerů inzulinové sensitivity. Když jsme náš soubor rozdělili do dvou skupin podle stupně inzulinové rezistence, nenalezli jsme rozdíl v plasmatické hladině RBP4 mezi skupinami. Tato skutečnost dále podporuje neexistující vztah mezi inzulinovou rezistencí a RBP4. Korelace mezi RBP4 a glucose disposal v našem souboru žen nalezeny nebyly. Zdá se tedy, že RBP4 je regulován kalorickou restrikcí a redukcí hmotnosti, ale není asociován s inzulinovou senzitivitou ve sledované populaci.

Sérové hladiny viscerálních proteinů jsou používány k hodnocení klinického stavu pacientů s malnutricí. RBP4 je v klinické praxi používán jako výhodný nutriční marker pro jeho krátký biologický poločas a malý distribuční objem v organismu. Z tohoto pohledu je pokles plasmatické hladiny RBP4 během VLCD plně v souladu s dříve publikovanými pracemi. Porovnání plasmatické hladiny RBP4 a mRNA z tukové tkáně svědčí pro to, že energetický deficit navozený kalorickou restrikcí je jedním z determinantů poklesu RBP4, který je alespoň částečně způsoben poklesem produkce v tukové tkáni. V průběhu LCD a fáze stabilizace hmotnosti se hladiny RBP4 mRNA z tukové tkáně vrátily k basálním hladinám zatímco nárůst plasmatické hladiny RBP4 byl mnohem pozvolnější. Tato data naznačují, že snížené plasmatické hladiny RBP4 během redukčních programů mohou souviset se sníženou proteosyntézou v játrech, jež jsou považována za největší zdroj RBP4 u lidí.

V jiné, průřezové, studii jsme na souboru žen se širokým rozmezím BMI a stupněm inzulinové rezistence prokázali, že exprese RBP4 je ve viscerální tukové tkáni výrazně nižší než v subkutánní tukové tkáni a to nezávisle na BMI, množství viscerální či subkutánní tukové tkáně, či přítomnosti metabolického syndromu u studovaných subjektů. Rozdíly v expresi RBP4 ve viscerální či subkutánní tukové tkáni mezi jednotlivými skupinami stratifikovanými dle stupně obezity a přítomnosti metabolického syndromu nalezeny nebyly. Naše výsledky podporují skutečnost, že humánní viscerální tuková tkáň není zahrnuta do RBP4 mediovaných účinků v metabolismu sacharidů a/nebo působení inzulinu, respektive není pravděpodobné, že by RBP4 byl pojítkem mezi viscerálním tukem a inzulinovou rezistencí.

Dále jsme sledovali vztah mezi hladinami RBP4 mRNA ve dvou tukových depech ve vztahu k parametrům obezity, včetně absolutního a relativního množství viscerální tukové tkáně, stupně inzulinové rezistence a dalších

s obesitou asociovaných metabolických abnormalit. Korelace mezi RBP4 mRNA v těchto dvou tukových depech a kterýmkoli z markerů obezity, plasmatické hladiny lipidů, glukózy či glucose disposal rate během clampu jsme nenalezli. Down-regulaci RBP4 mRNA v subkutánní tukové tkáni u obézních žen, jak bylo dříve prezentováno (Janke 2006), tudíž naše práce nepotvrzuje: tuto diskrepanci lze snad částečně vysvětlit rozdíly ve věkovém rozpětí, stupni obezity, distribuci tukové tkáně a stupně inzulínové sensitivity mezi naším souborem a citovanou prací.

Recentně publikovaná práce (Klotig 2007) je však v rozporu s našimi výsledky – autoři našli vyšší hladiny RBP4 mRNA ve viscerální než subkutánní tukové tkáni. Ačkoli jejich soubor zahrnoval jak ženy tak muže a obézní jedinci měli vyšší věkový průměr, vztah mezi RBP4 expresí ve viscerální a subkutánní tukové tkáni se nezměnil v podskupinách rozdělených dle pohlaví, stupně obezity či glukózové tolerance. Důvody výše zmíněné diskrepance mezi studii nejsou zřejmé, je málo pravděpodobné, že by rozdíl ve věkovém složení mohl hrát významnější úlohu.

Analýzou vztahů mezi plasmatickou hladinou RBP4 a markery obezity, inzulínové rezistence a metabolického syndromu jsme nepotvrdili rozdíly v plasmatické hladině RBP4 v jednotlivých skupinách. Korelace mezi plasmatickou hladinou RBP4 a výše zmíněnými antropometrickými a metabolickými proměnnými jsme také nenalezli jak v celém souboru tak v jednotlivých skupinách, s výjimkou slabé pozitivní korelace s plasmatickou hladinou TG a glykemií, což je v souladu s ostatními autory (Erikstrup 2006, Takashima 2006). Nepřítomnost rozdílu v plasmatické hladině RBP4 ve vztahu ke stupni inzulínové rezistence je v souladu s několika jinými pracemi (Erikstrup 2006, Janke 2006, Broch 2007, Tan 2007), ale v protikladu s dalšími (Cho 2006, Graham 2006, Balagopal 2007, Haider 2007, Lee 2007). Diskrepance ve výsledcích může být díky rozdílné velikosti sledovaného souboru, rozdílnému stupni a typu obezity, stupni inzulínové rezistence a stupni dalších parametrů metabolického syndromu. Navíc, ve většině uvedených prací nebyla narozdíl od naší práce inzulínová sensitivity stanovena euglykemickým hyperinzulinním clampem. Nedávno byla též diskutována role RBP4 assay na variabilitu výsledků (Graham 2007). V naší práci byla použita sandvičová ELISA assay identická s assayí použitou ve studii Graham et al., která prokazovala silné korelace s inzulínovou senzitivitou. Tuto assay lze tudíž považovat za věrohodnou pro stanovení vztahu mezi stupněm inzulínové rezistence a plasmatickou hladinou RBP4.

Úloha RBP4, recentně objeveného adipokinu, v patogenezi inzulínové rezistence u lidí zůstává kontroverzní. Slibné výsledky experimentů na zvířecích modelech vzbudily zájem odborné veřejnosti o tento protein, který se zdál být klíčovým markerem inzulínorezistentních stavů a terapie zacílená na snížení plasmatické hladiny RBP4 jako esenciální pro léčbu pacientů s T2DM. Několik

prací studujících souvislost RBP4 s inzulínovou rezistencí u lidí však přinesla zcela nekonzistentní výsledky a úloha tohoto „nadějného adipokinu“ v patogenezi inzulínové rezistence a s ní spojených metabolických onemocnění tak zůstává předmětem dalšího výzkumu.

4. Závěr:

Výsledkem současného životního stylu populace je tendence k akumulaci tukové tkáně na úkor aktivní svalové hmoty. Obezita je asociována s inzulinovou rezistencí a četnými metabolickými komplikacemi jako diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulární onemocnění. Incidence obezity celosvětově dramaticky stoupá. Molekulární mechanismy zprostředkující vznik inzulinové rezistence a následných metabolických onemocnění nejsou dosud zcela objasněny i přes recentní extenzivní výzkum v této oblasti. Řada prací prokázala, že normální inzulinová senzitivita a homeostáza glukózy úzce souvisí s funkční tukovou tkání, která je proporcionální k tělesné hmotnosti. Dvě klíčové role funkční tukové tkáně v rozvoji inzulinové rezistence jsou: 1. uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) do oběhu z triacylglycerolů v procesu lipolýzy a 2. sekrece adipokinů, látek hormonální povahy, ovlivňujících energetický metabolismus a jídelní chování. Cílem této disertační práce je přispět k dalšímu pochopení mechanismů a regulačních pochodů, které se podílí na složitém vztahu dysfunkční tukové tkáně a vzniku metabolických abnormalit, zejména inzulinové rezistence a jejich konsekvencí, a jejich ovlivněním dietní intervencí či pohybovou aktivitou.

První část práce se zabývá regulací lipolýzy za různých nefyziologických podmínek na souboru štíhlých a obézních mužů během zátěžového protokolu. V publikaci č. 2 jsme demonstrovali pokles lipolytické aktivity subkutánní tukové tkáně při infuzi inzulinu během 45-ti minutové zátěže vytrvalostního typu u štíhlých jedinců. Tento pokles byl daleko méně vyjádřený u obézních jedinců. Zátěží-indukovaná elevace plasmatických hladin katecholaminů byla u štíhlých mužů narozdíl od obézních při inzulinovém clampu redukována. Dospěli jsme tedy k závěru, že antilipolytický účinek inzulinu je přítomen i během fyzické aktivity a že naši obézní muži jsou k tomuto antilipolytickému účinku inzulinu během zátěže rezistentní. Dále jsme prokázali, že antilipolytický účinek zprostředkovaný cestou stimulace alfa2-adrenergní dráhy je při mírné hyperinzulinemii během tělesné zátěže u obézních jedinců vyšší ve srovnání se štíhlými. Dominantní alfa2-adrenergní antilipolytický účinek u obézních mužů s důsledkem neadekvátní mobilizace lipidů během fyzické aktivity by se mohl do jisté míry spolupodílet na snížené toleranci zátěže a selhání režimových opatření v terapii obézních jedinců. V další práci studující regulaci lipolýzy v adipocytech (publikace č. 1) jsme prokázali inhibiční účinek NEFA s dlouhým řetězcem na alfa2-adrenergní dráhu *in vitro* i *in vivo* během fyzické zátěže, kdy tento inhibiční účinek byl markantnější u obézních jedinců. NEFA s dlouhým řetězcem-mediovaná suprese antilipolytické dráhy představuje další mechanismus, kterým dieta s vysokým obsahem tuků může zvýšit lipolýzu v tukové tkáni.

Cílem druhé části práce bylo studovat recentně objevený kandidátní adipokin RBP4, který (na základě výsledků experimentů na zvířecích modelech) by mohl hrát významnou roli v regulaci metabolismu glukózy a patogenezi inzulinové rezistence. Sledovali jsme plazmatické hladiny a expresi RBP4 v tukové tkáni jednak během longitudinální intervenční studie na souboru 25 obézních žen (publikace č. 3) a v průřezové studii na souboru 59 žen se širokým rozmezím BMI a stupněm inzulinové rezistence (publikace č. 4). Plazmatické hladiny RBP4 i RBP4 mRNA z podkožní tukové tkáně poklesly po 4 týdenní VLCD, korelace mezi dietně-indukovanými změnami RBP4 a inzulinovou senzitivitou jsme nenalezli. Po rozdělení souboru do dvou skupin dle stupně inzulinové senzitivity nebyl pozorován rozdíl v plazmatických hladinách RBP4. RBP4 mRNA byly výrazně nižší ve viscerální než v subkutánní tukové tkáni nezávisle na stupni obezity či přítomnosti metabolického syndromu. Korelace mezi ukazateli RBP4 a stupněm obezity či inzulinové rezistence nalezeny nebyly. Výsledky naší práce tak přímou souvislost RBP4 s inzulinovou rezistencí narozdíl od jiných autorů nepotvrzují. Snížení plazmatické hladiny RBP4 během kalorické restrikce doprovázené redukcí hmotnosti pravděpodobně souvisí se sníženou proteosyntézou v játrech. Úloha RBP4, dalšího ze škály adipokinů, v patogenezi inzulinové rezistence zůstává, vzhledem k nekonzistenci dostupných dat, předmětem dalšího bádání.

Z recentních prací vyplývá, že na metabolické a endokrinní funkce tukové tkáně nelze pohlížet izolovaně jako na dvě samostatné entity, ale naopak je nutno chápat je jako komunikující a vzájemně se ovlivňující funkční systémy. V *in vitro* experimentech na zvířecích buňkách mastné kyseliny ovlivňují expresi a sekreci adipokinů – EPA (eicosapentaenová) a DHA (docosahexaenová) inhibují expresi leptin mRNA (Reseland 2001), kys. palmitová stimuluje sekreci TNF- α a inhibuje sekreci Il-10 (Bradley 2008). Některé adipokiny regulují přímo či nepřímo metabolismus triglyceridů a mastných kyselin v adipocytech. Například MCP-1 (monocyte-chemoattractant protein-1) a TNF- α modulují zánětlivou reakci tukové tkáně, která následně zasahuje do metabolismu tukové buňky. Hypertrofické adipocyty obézních jedinců secernují velké množství MCP-1, který atrahuje do tukové tkáně makrofágy a přispívá tak k prozánětlivému stavu. Adipocyty a makrofágy pak ve zvýšené míře secernují MCP-1, TNF- α , Il1 β (interleukin-1 β), cytokiny, které v tukové buňce stimulují lipolýzu a inhibují syntézu triglyceridů (Langin 2006). Důsledkem je zvýšená plazmatická hladina NEFA se svým lipotoxickým účinkem na kosterní sval, játra a beta-buňky. Hypotéza chronického subklinického zánětlivého stavu předpokládá, že dlouhodobý nadměrný kalorický příjem vede k zánětlivé reakci tukové tkáně, která má za následek metabolickou dysfunkci adipocytu a indukci inzulinové rezistence.

Naše výsledky prezentované v této disertační práci posunují aktuální znalosti o regulaci lipolýzy v podkožní tukové tkáni a o úloze retinol-binding proteinu 4, jednoho z řady adipokinů, v etiopatogenezi inzulínové rezistence o krůček dále. V kontextu s řadou dalších významných poznatků četných výzkumných týmů mohou přispět k poskládání složité mozaiky patogeneze hlavních civilizačních onemocnění dnešní doby a jejich efektivnější prevenci a terapii.

5. Literatura:

Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Grundy SM. Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest* 96: 88-98, 1995.

Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim Y-B, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. Adipose-selective targeting of the Glut4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733, 2001.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome - a new worldwide definition. *Lancet* 366:1059-1062, 2005.

Anderlová K, Křemen J, Doležalová R, Housová J, Haluzíková D, Kunešová M, Haluzík M. The Influence of Very-Low-Calorie Diet on Serum Leptin, Soluble Leptin Receptor, Adiponectin and Resistin Levels in Obese Women. *Physiol. Res.* 55: 277-283, 2006.

Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 14:137-145, 2003.

Arner P, Kriegholm E, Engfeldt P. In situ studies of catecholamine-induced lipolysis in human adipose tissue using microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 284-288, 1990.

Baeten JM, Richardson BA, Bankson DD, Wener MH, Kreiss JK, Lavreys L. Use of serum retinol-binding protein for prediction of vitamin A deficiency: effects of HIV-1 infection, protein malnutrition, and the acute phase response. *Am J Clin Nutr* 79, 218-25, 2004.

Balagopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D. Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 92(5):1971-4, 2007.

Banerji MA, Lebowitz J, Chaiken RL, Gordon D, Kral JG, Lebovitz HE. Relationship of visceral adipose tissue and glucose disposal is independent of sex in black NIDDM subjects. *Am J Physiol* 273: E425-E432, 1997.

Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, Morley JE. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* May;53(5):1253-60, 2004.

Bantle JP, Rosset JW, Albright AL, Apovian CM, Clark NG et al. Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 31: Suppl. 1., 2008.

Barbe P, Stich V, Galitzky J, Kunesova M, Hainer V, Lafontan M, Berlan M. In vivo increase in beta-adrenergic lipolytic response in subcutaneous adipose tissue of obese subjects submitted to a hypocaloric diet. *J Clin Endocrinol Metab* 82(1):63-9, 1997.

Basualdo CG, Wein EE, Basu TK. Vitamin A (retinol) status of first nation adults with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 16:39-45, 1997.

Behre CJ, Gummesson A, Jernís M, Lystig TC, Fagerberg B, Carlsson B, Carlsson LM. Dissociation between adipose tissue expression and serum levels of adiponectin during and after diet-induced weight loss in obese subjects with and without the metabolic syndrome. *Metabolism* 56(8):1022-8, 2007.

Berg AH, Combs TP, Scherer PR: ACRP30/adiponectin: an adipokine regulativ glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 13, 84-9, 2002.

Bergman RN, Kim SP, Catalano KJ, Hsu IR, Chiu JD, Kabir M, Hucking K, Ader M: Why Visceral Fat is Bad: Mechanism of the Metabolic Syndrome. *Obesity* 14, 2006.

Berlan M, Lafontan M. The alpha2-adrenergic receptor of human fat cells: comparative study of alpha2-adrenergic radioligand binding and biological response. *J. Physiol. (Paris)*. 78: 279-287, 1982.

Bjorntorp P. „Portal“ adipose tissue as a generator of risks factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10: 493-496, 1990.

Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanism of Fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *Journal of Clinical Investigation* 93: 2438-2446, 1994.

Boudou P, Sobngwi E, Mauvais-Jarvis F, Vexiau P and Gautier JF. Absence of exercise-induced variations in adiponectin levels despite decreased abdominal adiposity and improved insulin sensitivity in type 2 diabetic men. *Eur J Endocrinol* 149: 421-424, 2003.

Bradley RL, Fisher FM, Maratos-Flier E. Dietary Fatty Acids Differentially Regulate Production of TNF-alpha and IL-10 by Murine 3T3-L1 Adipocytes. *Obesity* 16(5):938-44, 2008.

Broch M, Vendrell J, Ricart W, Richart C, Fernandez-Real JM (2007) Circulating retinol binding protein 4, insulin sensitivity, insulin secretion and insulin disposition index in obese and nonobese subjects. *Diabetes Care*, In Press

Cimmino M, Agosto A, Minaire Y, G elo en A. In situ regulation of lipolysis by insulin and norepinephrine: a microdialysis study during euglycemic hyperinsulinemic clamp. *Metabolism* 44: 1513-1518, 1995.

Civelek VNJ, Hamilton A, Tornheim K, Kelly KL, Corkey E. Intracellular pH in adipocytes: effects of free fatty acid diffusion across the plasma membrane, lipolytic agonists, and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 10139–10144, 1996.

Clement K, Langin D: Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue. *J Intern Med* 262: 422-430, 2007.

Clement K, Sorensen TIA. Obesity. Genomics and Postgenomics. Informa Healthcare USA, Inc. 2008.

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108, 1875-81, 2001.

Degerman E, Landstr om TR, Wijkander J, Holst LS, Ahmad F, Belfrage P, Manganiello V: Phosphorylation and Activation of Hormone-Sensitive Adipocyte Phosphodiesterase Type 3B. *Methods* 14 (1): 43-53, 1998.

Donahue RP, Abbott RD, Bloom E, Reed DM: Central Obesity and coronary heart disease in men. *Lancet* 1: 821-824, 1987.

Ducimetiere P, Richard J, Cambien F: The pattern of subcutaneous fat distribution in middle-aged men and risk of coronary heart disease: The Paris prospective study. *Int J Obes* 10: 229-240, 1986.

Edens NK, Fried SK, Kral JG, Hirsch J, Leibel RL: In vitro lipid synthesis in human adipose tissue from three abdominal sites. *Am J Physiol* 265:E374–E379, 1993.

Esmailzadeh A, Mirmiran P, Azadbakht L, Amiri P, Azizi F. Independent and inverse association of hip circumference with metabolite risk factors in Tehranian adult men. *Prev Med* 42(5):354-357, 2006.

Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R and

Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 289: 1799-1804, 2003.

Farnier C, Krief S, Blache M, Diot-Dupuy F, Mory G, Ferre P, Bazin R. Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:1178 –1186, 2003.

Feinleib M. Epidemiology of obesity in relation to health hazards. *Ann Intern Med* 103: 1019-1024, 1985.

Ferrannini E, Barret EJ, Bevilacqua S, De Fronzo RA. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *Journal of Clinical Investigation* 1983, 72: 1737-1747.

Frayn KN. Obesity and metabolit disease: is adipose tissue the culprit? *Proceedings of the Nutrition Society* 64: 7-13, 2005.

Frayn KN. Visceral fat and insulin resistance – causative or correlative? *British Journal of Nutrition* 83: S71-S77, 2000.

Fried SK, Leibel RL, Edens NK, Kral JG. Lipolysis in intraabdominal adipose tissues of obese women and men. *Obes Res* 1:443– 448, 1993.

Gesta S, Hejnova J, Berlan M, Daviaud D, Crampes F, Stich V, Valet P, Saulnier-Blache JS. In vitro and in vivo impairment of alpha2-adrenergic receptor-dependent antilipolysis by fatty acids in human adipose tissue. *Horm. Metab. Res.* 33: 701–707, 2001.

Gowri MS, Reaven GM, Azhar S. Effect of masoprocol on glucose transport and lipolysis by isolated rat adipocytes. *Metabolism.* 48: 411–414, 1999.

Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354:2552-2563, 2006.

Gueorguiev M, Góth ML, Korbonits M. Leptin and puberty: a review. *Pituitary* 4(1-2):79-86, 2001.

Hagenfeld L, Wahren J, Pernow B, Raf L: Uptake of individual free fatty acids by skeletal muscle and liver in man. *Journal of Clinical Investigation* 51: 2324-2330, 1972.

- Hagström-Toft E, Arner P, Johansson U, Erikson L, Ungerstedt U, Bolinder J. Effect of insulin on human adipose tissue metabolism in situ. Interactions with beta-adrenoceptors. *Diabetologia* 35: 664-670, 1990.
- Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M, Ludvik B. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(3):1168-71, 2007.
- Hellerstein MK. No common energy currency: de novo lipogenesis as the road less traveled. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74 (6), 707-708, 2001.
- Hellmeier J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75:15-20, 1992.
- Hellström L, Reynisdottir S, Langin D, Rössner S, Arner P. Regulation of lipolysis in fat cells of obese women during long-term hypocaloric diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20(8):745-52, 1996.
- Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282: 1568-75, 1999.
- Hodgetts V, Coppack SW, Frayn KN, Hockaday TD. Factors controlling fat mobilization from human subcutaneous adipose tissue during exercise. *J Appl Physiol* 71: 445-451, 1991.
- Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *Journal of Cardiovascular Risk* 3: 213-219, 1996.
- Horowitz JF. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends Endocrinol Metab* 14: 386-392, 2003.
- Hulens M, Vansant G, Lysens R, Claessens AL, Muls E. Exercise capacity in lean versus obese women. *Scand J Med Sci Sports* 11(5): 305-9, 2001.
- Hulver MW, Zheng D, Tanner CJ, Houmard JA, Kraus WE, Slentz CA, Sinha MK, Pories WJ, MacDonald KG and Dohm GL. Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E861-E865, 2002.

Janke J, Engeli S, Boschmann M, Adams F, Bohnke J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. Retinol-Binding Protein 4 in Human Obesity. *Diabetes* 55: 2805-2810, 2006.

Jensen MD. Adipose tissue as an endocrine organ: implications of its distribution on free fatty acid metabolism. *European Heart Journal Supplements* 8: B13-B19, 2006.

Kandel WB. Lipids, diabetes and coronary heart disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J* 110: 1100-1107, 1985.

Keys A. Overweight, obesity, coronary heart disease and mortality. *Nutr Rev* 38: 297-307, 1980.

Klein S, Sheard NF, Pi-Sunyer X, Daly A, Wylie RJ, Kulkarni K, Clark NG. Weight management through lifestyle modification for the prevention and management of type 2 diabetes: rationale and strategies: a statement of the American Diabetes Association, the North American Association for the Study of Obesity, and the American Society for Clinical Nutrition. *Diabetes Care* 27: 2067-2073, 2004.

Klimcakova E, Polak J, Moro C, Hejnova J, Majercik M, Viguerie N, Berlan M, Langin D, Stich V. Dynamic strength training improves insulin sensitivity without altering plasma levels and gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 91(12):5107-12, 2006.

Klotig N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CHJ, Fasshauer M, Schon M, Stumvoll M, Bluher M, Kahn B. Serum Retinol-Binding Protein Is More Highly Expressed in Visceral than in Subcutaneous Adipose Tissue and Is a Marker of Intra-abdominal Fat Mass. *Cell Metab.* 6, 79-87, 2007.

Koh HJ, Hirshman MF, He H, Li Y, Manabe Y, Balschi JA, Goodyear LJ: Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes. *Biochem. J.* 403, 473-481, 2007.

Kotlar TJ and Borensztajn J. Hydrolysis of Chylomicron Triacylglycerol by Endothelium-Bound Lipoprotein Lipase. *Biochem J* 183, 171-174, 1979.

Kriketos AD, Gan SK, Poynten AM, Furler SM, Chisholm DJ and Campbell LV. Exercise increases adiponectin levels and insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care* 27: 629-630, 2004.

Kvist H, Sjostrom L, Tylen U. Adipose tissue volume determinations in women by computed tomography: technical considerations. *Int J Obes* 10: 53-67, 1986.

Labayen I, Diez N, Parra MD, González A, Martínez JA. Time-course changes in macronutrient metabolism induced by a nutritionally balanced low-calorie diet in obese women. *Int J Food Sci Nutr* 55(1):27-35, 2004.

Lafontan M and Berlan M. Characterization of physiological agonist selectivity of human fat cell α_2 -adrenoceptors: adrenaline is the major stimulant of the α_2 -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 82: 107–111, 1982.

Lafontan M and Berlan M. Fat cell α_2 -adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr. Rev.* 16: 716–738, 1995.

Lafontan M, Berlan M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* 24: 6, 2003.

Lafontan M, Moro C, Berlan M, Crampes F, Sengenès C, Galitzky J. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. *Trends Endocrinol Metab* 19(4):130-7, 2008.

Llamas-Alvarez G, Szalowska E, de Vries MP, Weening D et al. Characterization of the Human Visceral Adipose Tissue Secretome. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 589–600, 2007.

Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacological Research* 53: 482–491, 2006.

Langin D. & Arner P. Importance of TNF α and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol. Metab.* 17: 314–320, 2006.

Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryden M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, van H, V, Gross RW, Holm C and Arner P. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54: 3190-3197, 2005.

Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow-up of participants in the population study of women in Gothenburg. *Br Med J* 289: 1257-1261, 1984.

Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30: 294-309, 2004.

Larsson B. Obesity, fat distribution and cardiovascular disease. *Int J Obesity* 15: 53-57, 1991.

Laughlin GA and Yen SS. Hypoleptinemia in women athletes: absence of a diurnal rhythm with amenorrhoea. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 318-321, 1997.

Lee DC, Lee JW, Im JA. Association of serum retinol binding protein 4 and insulin resistance in apparently healthy adolescents. *Metabolism* 56(3):327-31, 2007.

Lemieux S, Tremblay A, Prud-Homme D, Bouchard C, Nadau A, Despres J-P. Seven-year changes in body fat and visceral adipose tissue in women: associations with index of plasma glucose-insulin homeostasis. *Diabetes Care* 19: 983-991, 1996.

Lewis JG, Shand BI, Frampton CM, Elder PA. An ELISA for plasma retinol-binding protein using monoclonal and polyclonal antibodies: Plasma variation in normal and insulin resistant subjects. *Clin Biochem* 40(11):828-34, 2007.

Lind L, Fugmann A, Branth S, Vessby B, Millgard J, Berne C, Lithell H. The impairment in endothelial function induced by non-esterified fatty acids can be reversed by insulin. *Clinical Science* 99: 169-174, 2000.

Lissner L, Bjorkelund C, Heitmann BL, Seidell JC, Bengtsson C. Larger hip circumference independently predicts health and longevity in a Swedish female cohort. *Obes Res* 9(10):644-646, 2001.

Löfgren P, Andersson I, Wahrenberg H, Hoffstedt J. No difference in lipolysis or glucose transport of subcutaneous fat cells between moderate-fat and low-fat hypocaloric diets in obese women. *Horm Metab Res* 37(12):734-40, 2005.

Löfgren P, Hoffstedt J, Naslund E, Wirén M, Arner P. Prospective and controlled studies of the actions of insulin and catecholamine in fat cells of obese women following weight reduction. *Diabetologia* 48: 2334-2342, 2005.

Lundgren M, Eriksson JW. No in vitro effects of fatty acids on glucose uptake, lipolysis or insulin signaling in rat adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 36: 203-209. 2004.

Maahs DM et al. Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. *Circulation* 111, 747-753, 2005.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1161, 1995.

Majuri A, Santaniemi M, Rautio K, Kunnari A, Vartiainen J, Ruokonen A, Kesäniemi YA, Tapanainen JS, Ukkola O, Morin-Papunen L. Rosiglitazone treatment increases plasma levels of adiponectin and decreases levels of resistin in overweight women with PCOS: a randomized placebo-controlled study. *Eur J Endocrinol* 156(2):263-9, 2007.

Mann GV. The influence of obesity and health: part 2. *N Engl J Med* 291: 226-232, 1974.

Martin ML and Jensen MD. Effects of body fat distribution on regional lipolysis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* 88, 609-613, 1991.

Mauričge P, Imbeault P, Langin D, Lacaille M, Alméras N, Tremblay A, Després JP. Regional and gender variations in adipose tissue lipolysis in response to weight loss. *J Lipid Res* 40: 1559–1571, 1999.

Mauriege P, Marette A, Atgie C, Bouchard C, Theriault G, Bukowiecki LK, Marceau P, Biron S, Nadeau A, Despre's JP. Regional variation in adipose tissue metabolism of severely obese premenopausal women. *J Lipid Res* 36:672– 684, 1995.

Miles JM, Jensen MD. Counterpoint: Visceral Adiposity Is Not Causally Related to Insulin Resistance. *Diabetes Care* 9, 2005.

Moro C, Crampes F, Sengenès C, de Glisezinski I, Galitzky J, Thalamas C, Lafontan M, Berlan M. Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J.* 18: 908–910, 2004.

Moro C, Pillard F, de Glisezinski I, Crampes F, Thalamas C, Harant I, Marques MA, Lafontan M, Berlan M. Sex differences in lipolysis-regulating mechanism in overweight subjects: effect of exercise intensity. *Obesity* 15(9): 2245-55, 2007.

Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Jr., Tapscott EB, Coleman RA and Dohn GL. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46: 1360-1363, 1997.

Ohlson LO, Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, Bjorntorp P: The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus- 13,5 years of follow up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes* 34: 1055-1058, 1985.

Opie LH, Walfish PG. Plasma free fatty acid concentrations in obesity. *New England Journal of Medicine* 268: 757-760, 1963.

Ostman J, Arner P, Engfeldt P, Kager L. Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. *Metabolism* 28:1198–1205, 1979.

Ostergard T, Jessen N, Schmitz O, Mandarino LJ. The effect of exercise, training, and inactivity on insulin sensitivity in diabetics and their relatives: what is new? *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 541-548, 2007.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppress lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103, 1057-63, 2001.

Pajvani UB et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279: 12152-12162, 2004.

Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease kontrol. *Essays Biochem* 42: 105-17, 2006.

Polak J. Effect of diet on hormone-induced lipolysis. *Future Lipidol* 2(6): 583-585, 2007.

Polak J, Klimcakova E, Moro C, Viguerie N, Berlan M, Hejnova J, Richterova B, Kraus I, Langin D, Stich V. Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in obese women. *Metabolism* 55(10):1375-81, 2006.

Polak J, Klimcakova E, Kovacikova M, Vitkova M, Bajzova M, Stich V. Enkokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogenezi inzulinové rezistence. *Interní Med* 10: 443-446, 2006.

Polak J, Kovacova Z, Jacek M, Klimcakova E, Kovacikova M, Vitkova M, Kuda O, Sebela M, Samcova E, Stich V. An increase in plasma adiponectin multimeric complexes follows hypocaloric diet-induced weight loss in obese and overweight pre-menopausal women. *Clin Sci (Lond)* 112(11):557-65, 2007.

Polak J, Moro C, Bessičre D, Hejnova J, Marqučs MA, Bajzova M, Lafontan M, Crampes F, Berlan M, Stich V. Acute exposure to long-chain fatty acids impairs α 2-adrenergic receptor-mediated antilipolysis in human adipose tissue. *J Lipid Res.* 48(10):2236-46, 2007.

Polonsky KS. Retinol-binding protein 4, insulin resistance, and type 2 diabetes. *N Engl J Med* 354:2596–2598, 2006.

Pouliot MC, Espres J-P, Naderu A, Moorjani S, PrudHomme D, Lupien PJ, Tremblay A, Bouchard C. Visceral obesity in men: associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 41: 826-834, 1992.

Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, Freeman S, Cosma MP, Colantuoni V, Gottesman ME. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J* 18:4633–4644, 1999.

Rana JS, Nieuwdorp M, Jukema JW, Kastelein JJP. Cardiovascular metabolic syndrome – an interplay of, obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9: 218-232, 2007.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* i: 416-426, 1963.

Reinehr T, Roth CL, Alexy U, Kersting M, Kiess W, Andler W. Ghrelin levels before and after reduction of overweight due to a low-fat high-carbohydrate diet in obese children and adolescents. *Int J Obes* 29(4): 362-8, 2005.

Reseland JE, Haugen F, Hollung K, Solvoll K, Halvorsen B, Brude IR, Nenseter MS, Christiansen EN, Drevon CA. Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res.* 42, 743-750, 2001.

Reynisdottir S, Dauzats M, Thorne A, Langin D. Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4162– 4166, 1997.

Richelsen B, Pedersen SB, Moller-Pedersen T, Bak JF. Regional differences in triglyceride breakdown in human adipose tissue: effects of catecholamines, insulin, and prostaglandin E2. *Metabolism* 40:990 –996, 1991.

Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, Dean D, Constant S, Prentki M, Saha AK. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand* 178, 435–442, 2003.

Ryan AS, Nicklas BJ, Berman DM, Elahi D. Adiponectin levels do not change with moderate dietary induced weight loss and exercise in obese postmenopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27(9):1066-71, 2003.

Santosa S, Demonty I, Lichtenstein AH, Cianflone K, Jones PJ. An investigation of hormone and lipid associations after weight loss in women. *J Am Coll Nutr* 26(3): 250-8, 2007.

Schoof E, Stuppy A, Harig F, Carbon R, Horbach T, Stohr W, Rascher W, Dotsch J. Comparison of leptin gene expression in different adipose tissues in children and adults. *European Journal of Endocrinology* 150 (4): 579-584, 2004.

Sengenés C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J: Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J* 14: 1345–1351, 2000.

Sengenés C, Stich V, Berlan M, Hejnova J, Lafontan M, Pariskova Z, Galitzky J. Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(1):24-32, 2002.

Sengenés C, Zakaroff-Girard A, Moulin A, Berlan M, Bouloumié A, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 283: R257–R265, 2002.

Seufert J. Leptin Effects on Pancreatic beta-Cell Gene Expression and Function. *Diabetes* 53, S152-S158, 2004.

Sharman MJ, Volek JS. Weight loss leads to reductions in inflammatory biomarkers after a very-low-carbohydrate diet and a low-fat diet in overweight men. *Clin Sci (Lond)* 107(4):365-9, 2004.

Snijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CD, Kostense PJ, Yudkin JS, Heine RJ, Nijpels G, Seidell JC. Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr* 77(5):1192-1197, 2003.

Stich V, Berlan M. Physiological regulation of NEFA availability: lipolysis pathway. *Proc Nutr Soc* 63(2):369-74, 2004.

Stich V, de Glisezinski I, Crampes F, Suljkovicova H, Galitzky J, Riviere D, Hejnova J, Lafontan M, Berlan M. Activation of antilipolytic alpha2-adrenergic receptors by epinephrine during exercise in human adipose tissue. *American Journal of Physiology* 277, R1076-R1083, 1999.

Stokes III J, Garrison RJ, Kannel WB. The independent contributions of various indices of obesity to the 22-year incidence of coronary heart disease. The Framingham Heart Study. *Met Compl Hum Obesities* 49-57, 1985.

Suljkovicova H, Marion-Latard F, Hejnova J, Majercik M, Crampes F, de Glisezinski I, Berlan M, Rivire Dand, Stich V. Effect of macronutrient composition of the diet on the regulation of lipolysis in adipose tissue at rest and during exercise: Microdialysis study. *Metabolism* 51(10), 2002.

Takashima N, Tomoike H, Iwai N, Erikstrup C, Mortensen OH, Pedersen BK, Oh J, Graham TE, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance. *N Engl J Med* 355:1393-1395, 2006.

Tan BK, Chen J, Lehnert H, Kennedy R, Randeve HS. Raised serum, adipocyte and adipose tissue retinol-binding protein 4 in overweight women with polycystic ovary syndrome: effects of gonadal and adrenal steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7): 2764-72, 2007.

Tilg H and Moschen R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews* 6, 2006.

Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 4: 20-34, 1956.

van Harmelen V, Lonnqvist F, Thorne A, Wennlund A, Large V, Reynisdottir S, Arner P. Noradrenaline-induced lipolysis in isolated mesenteric, omental and subcutaneous adipocytes from obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21:972-979, 1997.

Vitkova M, Klimcakova E, Kovacicova M, Valle C, Moro C, Polak J, Hanacek J, Capel F, Viguerie N, Richterova B, Bajzova M, Hejnova J, Stich V, Langin D. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 92(6):2330-5, 2007.

Wagnerberger S, Schafer C, Bode C, Parlesak A. Saturation of retinol-binding protein correlates closely to the severity of alcohol-induced liver disease. *Alcohol* 38, 37-43, 2006.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews* 2000, 21: 697-738, 2000.

Watt MJ, Holmes AG, Pinnamaneni SK, Garnham AP, Steinberg GR, Kemp BE, Febbraio MA. Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E500–E508, 2006.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119, 2005.

Weisberg SP et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808, 2003.

World Health Organization. Obesity: prevention and managing the global epidemic – report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser 894: 1-253, 2000.

Xu H et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-1830, 2003.

Xydakis AM, Case CC, Jones PH, Hoogeveen RC, Liu MY, Smith EO, Nelson KW, Ballantyne CM. Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6):2697-703, 2004.

Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn B. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436, 356-362, 2005.

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3815-3819, 2001.

Yu C et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277, 50230-50236, 2002.

Zhou YP, Grill V. Long term exposure to fatty acids and ketones inhibit B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80: 1584-1590, 1995.

Zou C and Shao J. Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance. *J Nutr Biochem* 19(5):277-86, 2008.

Zunquin G, Theunynck D, Sesboue B, Arhan P, Bougle D. Comparison of fat oxidation during exercise between lean and obese pubertal boys: clinical implications. *Br J Sports Med.* 2008 Apr 2 (Epub ahead of print).