

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Miloš Mráz

**NOVÉ METABOLICKÉ REGULÁTORY A PROZÁNĚTLIVÉ
FAKTORY V ETIOPATOGENEZE DIABETES MELLITUS 2. TYPU
A OBEZITY: VLIV FARMAKOLOGICKÝCH A DIETNÍCH
INTERVENČÍ**

**Novel metabolic regulators and proinflammatory factors in the
etiopathogenesis of type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of
pharmacological and dietary interventions**

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha 2011

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	6
ABSTRAKT (CZ)	10
ABSTRACT (EN)	11
1. ÚVOD	12
2. FIBROBLASTOVÉ RŮSTOVÉ FAKTORY (FIBROBLAST GROWTH FACTORS – FGF)	14
2.1 Fibroblastový růstový faktor 19 (fibroblast growth factor 19 – FGF-19)	16
2.1.1 FGF-15 u myší	16
2.1.2 Receptorové interakce FGF-19.....	17
2.1.3 Funkce FGF-19.....	17
2.1.3.1 FGF-19 a regulace tvorby žluči	18
2.1.3.1.1 Enterohepatální signalizace	18
2.1.3.1.2 Regulace objemu žlučníku.....	19
2.1.3.2 Metabolické účinky FGF-19.....	20
2.1.3.3 Mitogenní aktivita FGF-19.....	21
2.2 Fibroblastový růstový faktor 21 (FGF-21)	22
2.2.1 Tvorba FGF-21	23
2.2.2 Funkce FGF-21	24
2.2.2.1 Adaptace na hladovění.....	24
2.2.2.2 Účinky na metabolismus glukózy a lipidů.....	26
2.2.2.2.1 Studie na zvířatech.....	26
2.2.2.2.2 Mechanismy působení FGF-21	27
2.2.2.2.3 FGF-21 u lidí	30
3. TUKOVÁ TKÁŇ A SUBKLINICKÝ ZÁNĚT	33
3.1 Funkce tukové tkáně	33
3.1.1 Hnědá tuková tkáň	33
3.2 Tuková tkáň jako endokrinní orgán	34
3.3 Adipocyty.....	36
3.4 Podkožní a viscerální tuková tkáň	36

3.5	Tuková tkáň jako mediátor zánětu a vrozené imunity	37
3.6	Obezita a adipokiny	39
3.6.1	Potenciálně prospěšné adipokiny	40
3.6.1.1	Leptin	40
3.6.1.2	Adiponektin.....	42
3.6.1.3	Visfatin.....	46
3.6.2	Prozánětlivé adipocytokiny.....	47
3.6.2.1	Tumor nekrotizující factor α (Tumor necrosis factor α – TNF- α).....	47
3.6.2.2	Interleukin 6 (IL-6)	48
3.7	Vznik zánětu v tukové tkáni	49
3.8	Makrofágy a tuková tkáň	50
3.8.1	Iniciace infiltrace tukové tkáně makrofágy.....	52
3.8.1.1	Hypertrofie a odumírání adipocytů.....	52
3.8.1.2	Stres endoplazmatického retikula	54
3.8.1.3	Lokální tkáňová hypoxie.....	55
3.8.1.4	Lipotoxicita	56
3.8.1.5	Metabolická endotoxemie	58
3.8.1.6	Adipocytokiny a další prozánětlivé faktory.....	59
3.8.1.7	Aktivace endotelu	60
3.8.2	Propagace náboru makrofágů do tukové tkáně.....	61
3.8.2.1	Chemokiny a chemokinové receptory	61
3.8.2.2	Význam chemokinů u obezity a asociovaných metabolických poruch.....	65
3.8.2.3	Chemokin CCL-2 (MCP-1) a jeho receptor CCR2.....	67
3.8.2.4	Další chemokiny	68
3.8.2.5	Chemotaktické faktory nechemokinové povahy.....	70
3.8.3	Remodelace tukové tkáně	72
3.8.3.1	Makrofágové fenotypy v tukové tkáni.....	72
3.8.3.2	Interakce mezi makrofágy a adipocyty	75
3.8.3.3	Odumírání a novotvorba adipocytů	76
3.8.3.4	Vaskularizace tukové tkáně	76
3.8.3.5	Změny v extracelulární matrix.....	77

3.9	Další imunokompetentní buňky a zánět v tukové tkáni.....	78
3.9.1	T-lymfocyty	78
3.9.2	NK leukocyty, mastocyty, neutrofilů a B-lymfocyty.....	80
4.	HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	82
5.	METODIKA STUDIE	83
5.1	Vyšetření antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů	83
5.2	Biopsie tukové a jaterní tkáně.....	83
5.3	Izolace krevních monocytů.....	84
5.4	Stanovení exprese mRNA.....	85
5.5	Nízkokalorická dieta (VLCD – very-low-calorie diet).....	86
5.6	Hyperinzulinemický izoglykemický clamp	86
5.7	Statistická analýza dat.....	87
6.	VLASTNÍ VÝSLEDKY	88
6.1	Sérové koncentrace a tkáňová exprese nového endokrinního regulátoru FGF-21 (fibroblastový růstový faktor 21) u pacientů s diabetes mellitus 2. typu a obezitou	88
6.2	Sérové koncentrace fibroblastového růstového faktoru 19 u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu: vliv akutní hyperinzulinémie, nízkokalorické diety a podávání agonisty PPAR α	89
6.3	Vliv nízkokalorické diety na mRNA expresi genů asociovaných se zánětem v podkožní tukové tkáni a periferních monocytech u obézních pacientů s diabetes mellitus 2. typu.....	90
7.	DISKUSE	92
8.	ZÁVĚR A SHRnutí VÝSLEDKŮ PRÁCE	103
9.	LITERATURA	106
10.	PŘÍLOHY	135
10.1	Prohlášení autora.....	135
10.2	Identifikační záznam.....	135
10.3	Plné texty vlastních publikací tvořících podklady dizertační práce.....	136

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla v rámci doktorského studijního programu v biomedicině na III. interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Poděkování patří v první a největší řadě mému školiteli prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc. za vynikající odborné vedení v průběhu celého studia a všestrannou pomoc a podporu při tvorbě doktorské dizertační práce. Dále bych rád vyjádřil své díky všem klinickým a laboratorním spolupracovníkům podílejícím se na vzniku odborných publikací sloužících jako podklady pro dizertační práci. Chtěl bych rovněž poděkovat prof. MUDr. Štěpánu Svačinovi, DrSc., který mi jako přednosta III. interní kliniky 1. LF UK a VFN vytvořil optimální podmínky k postgraduálnímu studiu a k mé práci a také všem kolegům ze III. interní kliniky, kteří mi předávali své cenné zkušenosti na poli klinické medicíny a vědeckého výzkumu.

Zvláštní poděkování zasluhují as. MUDr. Jarmila Křížová, PhD. a Mgr. Jana Drápalová za redigaci textu dizertační práce a Ing. Martin Vyhnanovský za tvorbu obrazového materiálu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACC	acetylCoAkarboxyláza
AdipoR	adiponektinový receptor
aFABP	adipocytární vazební protein pro mastné kyseliny (adipocyte fatty acid binding protein)
AGRP	agouti-related protein
AGT	angiotenzinogen
AMP	adenozinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
ANGPTL	angiopoetinu podobný protein
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
ap-1	aktivátorový protein 1
Apn	adiponektin
Apo	apoprotein
ATM	makrofágy tukové tkáně (adipose tissue macrophages)
ATP	adenozintrifosfát
BMI	body mass index (index tělesné hmotnosti)
C4	7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on
CCK	cholecystokinin
CCL	CC chemokin (CC-motif ligand)
CCR	CC chemokinový receptor
CCR-like	receptor podobný CC chemokinovému receptoru
CD	cluster of differentiation
ChREBP	carbohydrate responsive element-binding protein
CMKLR1	chemokinu podobný receptor 1 (chemokine-like receptor 1)
CNS	centrální nervový systém
CoA	koenzým A
CPT1	karnitinpalmitoyltransferáza-1
CRP	C-reaktivní protein
CX ₃ CL	CX ₃ C chemokin (C X ₃ C-motif ligand)
CX ₃ CR	CX ₃ C chemokinový receptor
CXCL	CXC chemokin (CXC-motif ligand)
CXCR	CXC chemokinový receptor
CYP	cytochrom P
Cyp7a	cholesterol 7 α -hydroxyláza
Cys	cystein
Da	Dalton
DGAT	diacylglycerolacyltransferáza
DIO	dietou indukovaná obezita
DM2	diabetes mellitus 2. typu
EDTA	etyléndiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplazmatické retikulum
FAS	syntáza mastných kyselin (fatty acid syntase)
FGF	fibroblastový růstový faktor

FGFR	receptor pro fibroblastové růstové faktory
Foxa2	forkhead box A2
FoxO1	forkhead transcriptional factor 1
FRS	substrát receptoru pro fibroblastové růstové faktory (fibroblast growth factor receptor substrate)
FXR	farnesoidní receptor X (farnesoid receptor X)
GGT	γ -glutamyltransferáza
GLUT	glukózový transportér
GPAT	glycerol-3-fosfát-1-acyltransferáza
GPR	receptor spjatý s G proteinem (G-protein-coupled receptor)
Gro- α	růstem regulovaný onkogén α (growth-regulated oncogene α)
HDL	high-density lipoprotein
HIF	hypoxií-indukovaný faktor
HMG-CoA	3-hydroxy-3-metylglutarylkoenzym A
HMW	vysokomolekulární (high-molecular-weight)
HNF4 α	hepatocytární nukleární faktor 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α)
HOMA	homeostasis model assessment
HSL	hormonsenzitivní lipáza
ICAM	intracelulární adhezivní molekula (intracellular adhesion molecule)
IFN- γ	interferon- γ
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
IKK β	I κ B kináza
IL	interleukin
IL-1Ra	antagonista receptoru pro interleukin 1 (interleukin-1 receptor antagonist)
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
INSIG2	inzulínem indukovaný gen 2
IP-10	interferonem γ indukovaný 10kDa protein
IRS-1	substrát 1 inzulínového receptoru (insulin receptor substrate 1)
JAK	Janus kináza
JNK	c-Jun-N-terminální kináza
LDL	low-density lipoprotein
LPL	lipoproteinová lipáza
LPS	lipopolysacharid
LRH-1	homolog 1 jaterního receptoru (liver receptor homologue 1)
LXR	jaterní receptor X (liver X receptor)
LYVE-1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (endoteliální hyaluronový receptor 1 lymfatických cév)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCP	monocyty chemoatraktivující protein (monocyte chemoattractant protein)
MCR _{glc}	metabolická clearance glukózy
MIF	migraci makrofágů inhibující faktor
MIP	makrofágový inflamační protein (macrophage inflammatory protein)
MMP	matrixová metaloproteináza
Mo	monocyt
mRNA	messengerová RNA
NAD	nikotinamidinnukleotid

Nampt	nikotinamidfosforibožyltransferáza
NASH	nealkoholická steatohepatitida
NF- κ B	nukleární faktor κ B
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
NK	natural killer
NMN	nikotinamidmononukleotid
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (plasminogen activator inhibitor-1)
PBEF	pre-B-cell colony-enhancing factor (faktor podporující kolonie pre-B lymfocytů)
PBS	phosphate buffered saline (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem)
PEPCK	fosfoenolpyruvátkarboxykináza
PGC-1 α	koaktivátor 1 α receptoru aktivovaného peroxizomovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α)
PI3K	fosfatidylinozitol-3-kináza
PM	periferní monocyty
PPAR	receptor aktivován peroxizomovými proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor)
PPRE	peroxisome proliferator-activated receptor response elements
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
RBP4	retinol vázající protein 4
RIA	radioimmunoassay
RT PCR	real-time polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)
SAA3	sérový amyloid A3
SCD1	steroylCoA desaturáza-1
SEM	střední chyba průměru (standard error of the mean)
SFRP5	sekreční protein 5 příbuzný frizzled proteinům (secreted frizzled-related protein 5)
SHP	small heterodimer partner
shRNA	short hairpin RNA
Sirt-1	sirtuin-1
STAT	transducery signálu a aktivátory transkripce (signal transducers and activators of transcription)
STH	somatotropní hormon
TGF β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
T _H	T pomocný (helper) lymfocyt
TIMPS	tkáňové inhibitory matrixových metaloproteináz (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases)
TLR	toll-like receptor
TNFR1	receptor 1 pro tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor receptor 1)
TNFRSF	tumor necrosis factor receptor superfamily
TNF α	tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
UCP	uncoupling protein
UPR	unfolded protein response
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VLCD	nízkokalorická dieta (very-low-calorie diet)

VLDL	very-low density lipoprotein
VMK	volné mastné kyseliny
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)
XCL	C chemokin (XC motif ligand)
XCR	C chemokinový receptor
ZAG	zinkový α 2-glykoprotein (Zinc- α 2-glycoprotein)
ZDF	Zucker diabetic fatty

ABSTRAKT (CZ)

Výzkum na poli obezity, diabetes mellitus a jejich komplikací se v posledních letech stále více orientuje na identifikaci nových netradičních faktorů uplatňujících se při jejich vzniku. Cílem předkládané práce proto bylo prozkoumat úlohu nedávno objevených regulátorů metabolických a zánětlivých reakcí zahrnujících fibroblastové růstové faktory 19 a 21 a chemotaktické cytokiny a jejich receptory v patogeneze obezity a diabetes mellitus 2. typu.

Do studie bylo zařazeno celkem 182 subjektů rozdělených do 3 kategorií – pacienti s obezitou bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu (OB), skupina obézních diabetiků 2. typu (DM2) a zdravých kontrolních jedinců s normální hmotností (C). Zvolené intervence zahrnovaly 2 až 3 týdny nízkokalorické diety (VLCD – energetický obsah 2500 kJ/den), tříměsíční podávání agonisty receptorů PPAR α fenofibrátu a akutní hyperinzulinémii v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu.

Získané výsledky naznačují, že zvýšení hladin FGF-21 po VLCD a léčbě fenofibrátem může přispívat k pozitivním efektům těchto intervencí. Koncentrace FGF-19 jsou také částečně závislé na nutričním stavu organismu, nejsou však přímo spojeny s parametry glukózového metabolismu nebo inzulínové senzitivity. Obézní pacienti si bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu se vyznačují zvýšeným expresním profilem chemotaktických a prozánětlivých cytokinů v podkožní tukové tkáni a korespondujících receptorů na periferních monocytech (PM), přičemž krátkodobá kalorická restrikce vede k úpravě tohoto profilu obzvláště na PM.

Klíčová slova: diabetes mellitus 2. typu – obezita – fibroblastový růstový faktor 19 – fibroblastový růstový faktor 21 – subklinický zánět – chemokiny – nízkokalorická dieta – fenofibrát

ABSTRACT (EN)

Identifying novel factors involved in the etiopathogenesis of obesity, diabetes mellitus and their complications has become one of the primary scopes of metabolic research in the last years. The aim of the present study was to evaluate the role of recently discovered metabolic and inflammatory regulators including fibroblast growth factors 19 and 21 and chemotactic cytokines in the development of obesity and type 2 diabetes mellitus (DM2). A total number of 182 patients were included into the study. They were divided into 3 groups – patients with obesity but without type 2 diabetes mellitus, individuals with obesity and type 2 diabetes mellitus and healthy control normal-weight subjects. Selected interventions included 2 to 3 weeks of very-low-calorie diet (VLCD – energy content 2500 kJ/day), 3 months of administration of PPAR α receptor agonist fenofibrate and acute hyperinsulinemia during hyperinsulinemic isoglycemic clamp.

Our results indicate that the increase of circulating FGF-21 levels after VLCD and fenofibrate treatment could contribute to positive metabolic effects of these interventions. Serum FGF-19 concentrations also partially depend upon the nutritional status of the organism, although they are not directly influenced by parameters of glucose metabolism. Obesity regardless of DM2 is associated with increased expression of chemotactic and proinflammatory cytokines in subcutaneous adipose tissue and corresponding receptors on peripheral monocytes (PM). Short-term caloric restriction significantly improves this profile, especially on PM.

Keywords: type 2 diabetes mellitus – obesity – fibroblast growth factor 19 – fibroblast growth factor 21 – low-grade inflammation – chemokines – very-low-calorie diet – fenofibrate

1. ÚVOD

Obezita, diabetes mellitus 2. typu a jejich komplikace představují jeden z nejpalčivějších medicínských problémů současnosti. Dle údajů WHO trpí celosvětově obezitou 500 milionů a diabetes mellitus 220 milionů lidí a předpokládá se, že tato čísla se do roku 2030 minimálně zdvojnásobí [1, 2]. V České Republice dosahuje aktuální prevalence obezity 23% a nadváhy 34% z celkového počtu obyvatel, přičemž výskyt diabetes mellitus 2. typu je ve skupině obézních až třikrát vyšší než u lidí s normální hmotností [3]. Ve snaze o lepší pochopení etiopatogenezy těchto onemocnění a navržení účinnějších možností jejich léčby a prevence se pozornost výzkumníků v poslední době začala zaměřovat na nové netradiční faktory podílející se na regulaci metabolických procesů a energetické homeostázy a pocházející kromě tukové tkáně i z jiných zdrojů, jako jsou např. imunokompetentní buňky (cytokiny, chemokiny), kosterní svaly (myokiny), játra (hepatokiny) nebo další orgány trávicího traktu (inkretiny...). Do této kategorie patří i někteří recentně objevení zástupci skupiny fibroblastových růstových faktorů, látek hrajících klíčovou roli při řízení různých biologických pochodů u lidí a vyšších živočichů všeobecně [4-6]. Dva ze tří endokrinně aktivních fibroblastových růstových faktorů (FGF), FGF-21 a FGF-19, se podílejí na ovlivnění metabolismu sacharidů, lipidů a dalších substancí a v experimentálních studiích vykazují příznivé efekty na celkovou metabolickou kompenzaci v podmínkách porušené glukózové homeostázy, což z nich tvoří potenciálně zajímavý cíl nově vyvíjených terapeutických intervencí.

Dalším procesem pojícím obezitu s diabetes mellitus 2. typu a jeho komplikacemi je subklinický zánět, charakterizovaný zvýšenou produkcí prozánětlivých faktorů, avšak bez přítomnosti klinických příznaků zánětu. Za základní příčinu vzniku lokální zánětlivé reakce v tukové tkáni je považována její infiltrace imunokompetentními buňkami, zejména makrofágy [7, 8]. Přesné mechanismy odpovědné za iniciaci a následný proces vstupu cirkulujících mononukleárních buněk do tukové tkáně obézních jedinců zatím nejsou jednoznačně definovány. Stěžejní roli při vzájemné interakci a komunikaci mezi periferními krevními elementy a buňkami tukové tkáně však pravděpodobně hrají cytokiny s chemotaktickými vlastnostmi, označované jako chemokiny, a jejich příslušné receptory, které standardně slouží ke stimulaci vstupu imunokompetentních buněk do míst zánětu a tkáňového poškození. Modulace chemotaktických signálů vycházejících

z tukové tkáně může proto představovat cestu k ovlivnění nepříznivých reakcí odpovědných za rozvoj metabolických komplikací již v jejich zárodku, což by mělo zásadní význam pro zvýšení účinnosti stávajících léčebných strategií, snížení komplikací a zlepšení celkové prognózy pacientů trpících diabetes mellitus 2. typu a s ním asociovanými onemocněními.

2. FIBROBLASTOVÉ RŮSTOVÉ FAKTORY (FIBROBLAST GROWTH FACTORS – FGF)

I když byla hlavním účinkem prvního objeveného fibroblastového růstového faktoru stimulace růstu 3T3 fibroblastů [9], je název této skupiny regulačních peptidů co se jejich funkcí týče do značné míry nepřesný. Látky patřící do skupiny fibroblastových růstových faktorů se podílejí na regulaci velkého množství procesů týkajících se hlavně buněčného růstu, diferenciaci a stárnutí a ovlivňují také angiogenezi a hematopoezu [4, 5, 10]. Lidská skupina FGF je tvořena 22 faktory, které jsou rozděleny do 7 podskupin na základě jejich primární struktury [4]. Řetězec FGF se skládá ze střední části o délce cca 120 aminokyselin, která v rámci jednotlivých podskupin vykazuje značnou podobnost, a z vysoce variabilní C-terminální a N-terminální sekvence, výrazně se lišící i u příslušníků stejné FGF podskupiny [11].

Fibroblastové růstové faktory se váží a účinkují přes receptory s tyrozinkinázovou aktivitou nacházející se na plazmatické membráně buněk označovanými jako receptory fibroblastových růstových faktorů (fibroblast growth factor receptors – FGFR). Tyto receptory se skládají z extracelulární části tvořené 3 doménami strukturálně podobnými imunoglobulinům, transmembránové části a intracelulární domény odpovědné za tyrozinkinázovou aktivitu [12]. V současnosti jsou známy 4 typy FGFR – FGFR 1-4, přičemž u typu 1 až 3 existují 2 varianty podmíněné posttranskripčním sestřihem (splicing) v druhé polovině extracelulární domény 3, označované jako b a c izoformy FGFR (FGFR1-3b a FGFR1-3c). b izoformy jsou exprimovány na epiteliálních buňkách a reagují s FGF pocházejících z buněk mezenchymálních, u c izoformem je tomu naopak. Tato reciprocita v expresi FGF a FGFR je odpovědná za typický parakrinní přenos signálu mezi epiteliálními a mezenchymálními tkáněmi, důležitý pro správný průběh embryogeneze u plodu a regulaci homeostázy u dospělých jedinců [4, 12, 13]. Na přenosu signálu z aktivovaného FGF receptoru se podílejí četné intracelulární signální dráhy zahrnující jako FRS-2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2 – substrát 2 receptoru pro FGF), MAPK (mitogen activated proteinkinase – proteinkináza aktivovaná mitogenem), SHP-2 (small heterodimer partner 2 - malý heterodimerický partner 2), PI3K (fosfatidylinozitol 3-kináza) a p70^{S6K}(protein-S6-kináza), Raf kináza, STAT (signal

transducers and activators of transcription –transducery signálu a aktivátory transkripce) a další [14-17].

Afinita fibroblastových růstových faktorů k FGFR a stabilita jejich interakce je zvyšována vazbou FGF na heparin nebo proteoglykany obsahující heparansulfát [18]. Tato vazba navíc zabraňuje uvolňování FGF ze tkání, kde jsou primárně syntetizovány, což podmiňuje převážně auto- a parakrinní mechanismus účinku, typický pro většinu FGF [4, 11]. Uvedený mechanismus je spolu s různou mírou exprese jednotlivých FGF a FGFR v konkrétních tkáních považován za hlavní mechanismus odpovědný za specifitu jejich účinku. Důležitý je také časový faktor – FGF-3, -4, -8 a -17 jsou exprimovány jenom v embryonálních tkáních, zatímco ostatní FGF se uplatňují hlavně v postnatálním vývoji [19].

Výjimku ze společných strukturálních charakteristik a typicky parakrinního mechanismu působení vlastního ostatním podskupinám FGF představuje skupina fibroblastového růstového faktoru 19 zahrnující 3 faktory – FGF-19, -21 a -23. Primární struktury těchto 3 faktorů se značně liší a jsou si navzájem jenom o málo podobnější než se strukturami ostatních podskupin FGF [4, 11]. I přes odlišnou strukturu vykazují tyto faktory několik společných vlastností, které je zcela odlišují od ostatních zástupců skupiny FGF. Jejich transkripce je regulována specifickými nukleárními receptory a jejich ligandy. Pro FGF-19 je to farnesoidní X receptor (FXR, NR1H1), což je receptor pro žlučové kyseliny [20]. Exprese FGF-21 je regulována převážně receptorem pro mastné kyseliny PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor α –receptor α aktivovaný peroxizomovými proliferátory) a tvorbu FGF-23 řídí zčásti receptor pro vitamín D [21-24].

Faktory skupiny FGF-19 mají také jenom malou schopnost vazby na heparin. Většina FGF obsahuje ve své struktuře pozitivně nabitý tzv. β -skládaný list složený z 12 protisměrných β -vláken, který je odpovědný za interakci s heparinem. Krystalografické analýzy ukázaly, že tato struktura je u FGF-19 a FGF-23 narušena a chybí β -vlákno na pozici 11 [11, 25]. Snížená schopnost vázat se na lokální tkáňové struktury obsahující heparansulfát umožňuje FGF této skupiny procházet i mimo místa jejich primární produkce a působit tak jako klasické hormony i ve vzdálených tkáních a orgánech (tedy nejen auto- a parakrinně, ale hlavně endokrinně).

Místo vazby na heparin jsou jako kofaktory ke stabilizaci interakce mezi FGF a FGF receptory využívány proteiny Klotho/ β Klotho. Klotho a β Klotho jsou transmembránové proteiny s různou tkáňovou expresí, což přispívá k selektivě účinků jednotlivých FGF na cílové tkáně a orgány. Protein Klotho, nutný pro signalizaci přes FGF-23, je primárně exprimován v ledvinách, mozku a reprodukčních orgánech [26-28]. FGF-21 zase interaguje s β Klotho exprimovaným v tukové tkáni, pankreatu a játrech [11, 29]. Vzhledem k široké distribuci FGF receptorů v organismu a schopnosti faktorů skupiny FGF-19 přecházet do systémové cirkulace je to tedy právě tkáňově specifická exprese těchto kofaktorů, která v konečném důsledku podmiňuje konkrétní účinky daných FGF: FGF-19 moduluje hlavně syntézu žlučových kyselin, FGF-21 reguluje metabolismus glukózy a lipidů a FGF-23 ovlivňuje homeostázu vápníku, fosfátů a vitamínu D [20, 30-34].

2.1 Fibroblastový růstový faktor 19 (fibroblast growth factor 19 – FGF-19)

FGF-19 je 24 003 Da protein složený z 194 aminokyselin. Jeho gen je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 11 (11q13.3) a jeho expresí vzniká prekurzor FGF-19 obsahující kromě samotného proteinu i 22-aminokyselinový signální peptid [35]. Poprvé byl tento protein u lidí izolován z mozkové tkáně, později však byl prokázán i ve fetální chrupavce, kůži a sítnici a u dospělých jedinců ve žlučníku a střevních buňkách, které představují hlavní zdroj jeho produkce [33, 36].

2.1.1 FGF-15 u myší

Pro každý lidský fibroblastový růstový faktor kromě FGF-19 byly u myší identifikovány vysoce podobné ortologické peptidy, sdílející až 90% aminokyselinové sekvence. U lidí zase neexistuje žádný FGF, jehož struktura by byla plně analogická myšimu FGF-15. Primární struktury lidského FGF-19 a myšího FGF-15 jsou identické z 53%, což je více než homologie FGF-19 s dalšími příslušníky své podskupiny FGF-21 a -23 [4, 37]. Gen kódující tyto proteiny se nachází na stejném lokusu u lidí, myší i ryb *Danio rerio* (Dáňo

pruhované) [37]. Analogickou podobnost co se týče struktury i umístění vykazuje i FXR receptor pro tyto proteiny [20, 38]. Uvedené poznatky umožňují považovat myši FGF-15 a lidský FGF-19 za ortology s podobnými, i když ne vždy identickými biologickými funkcemi. Tyto rozdíly byly nejnázorněji demonstrovány jejich různou expresí v rámci embryogenezy vnitřního ucha a sítnice u kuřat (FGF-19) a myši (FGF-15) [38, 39].

2.1.2 Receptorové interakce FGF-19

FGF-19 podobně jako ostatní FGF účinkuje přes FGF receptory, avšak jeho receptorové interakce jsou komplexnější než je tomu u ostatních příslušníků jeho podskupiny. FGF-21 ani -23 se neváží na FGFR bez přítomnosti příslušného specifického Klotho nebo β Klotho koreceptoru [27, 40]. FGF-19 může jako koreceptor využít jak Klotho, tak β Klotho anebo se může přímo vázat na FGFR4 (původně se předpokládalo, že se FGF-19 pojí specificky jenom s tímto FGF receptorem [35]). To mu umožňuje působit buď přes samotný FGFR4 nebo v přítomnosti koreceptorů i přes další FGFR, jak bylo prokázáno na transgenních 293 a 3T3-L1 fibroblastech produkujících Klotho a β Klotho ale neexprimujících FGFR4 [40, 41].

Strukturální mechanismy podmiňující specifitu FGF-19 ke Klotho a FGF receptorům byly objasněny teprve nedávno. C-terminální konec jeho proteinové struktury je odpovědný za vazbu na oba koreceptory, zatímco N-terminální konec zabezpečuje spojení a následnou aktivaci receptorů. Rozhodující funkci při interakci s FGF-19 plní u Klotho první β -glukozidáze podobná doména, u β Klotho je to doména druhá [42].

2.1.3 Funkce FGF-19

První výzkumy biologického významu FGF-19 se zaměřovaly na jeho úlohu v embryogeneze vnitřního ucha u kuřat [43]. Záhy se však ukázalo, že se tento protein podílí na regulaci četných dalších procesů zahrnujících metabolismus tuků a sacharidů a celkovou energetickou homeostázu [30]. Nejlépe pochopeny jsou však jeho regulační účinky na tvorbu a sekreci žlučových kyselin.

2.1.3.1 FGF-19 a regulace tvorby žluči

První důkazy o tom, že FGF-19 se podílí na regulaci tvorby žlučových kyselin se objevily v *in vitro* studiích zaměřených na identifikaci genů regulovaných receptorem pro žlučové kyseliny FXR (farnesiodní receptor X). Působením syntetického agonisty FXR označovaného jako GW 4064 došlo v primárních lidských hepatocytech ke zvýšené expresi několika genů, přičemž nejsilněji byla indukována právě exprese FGF-19. Stejný účinek na expresi FGF-19 vykazoval i přirozený ligand FXR chenodeoxycholová kyselina. Izolace vazebného místa pro FXR na genu pro FGF-19 definitivně potvrdila ústřední roli tohoto jaderného receptoru při regulaci syntézy FGF-19 [20].

Přesné mechanismy, kterými FGF-19 ovlivňuje tvorbu žlučových kyselin byly studovány na myších s knockoutem FGFR4 (označovaných jako *fgfr4^{-/-}*), což je hlavní FGF receptor na dospělých hepatocytech. *fgfr4^{-/-}* myši se vyznačují zvýšeným množstvím cirkulujících žlučových kyselin a jejich vyšší exkrecí, přičemž pro tyto myši je typický malý a vyprázdněný žlučník [44]. Dále je jaterní tkáň těchto zvířat charakterizována sníženou expresí enzymu cholesterol 7 α -hydroxylázy (Cyp7a), hlavního regulačního enzymu syntézy žlučových kyselin. Cyp7a je pozitivně regulována látkami vážícími se na nukleární receptor LXR (liver X receptor – jaterní receptor X). Negativní regulace probíhá přes FXR v součinnosti s tzv. malým heterodimerickým partnerem (small heterodimer partner – SHP) a homologem 1 jaterního receptoru (liver receptor homologue 1 – LRH-1) [45].

Uvedené výsledky podnítily další výzkum zaměřený na vztah mezi FGF-19 a Cyp7a. Působením rekombinantního FGF-19 došlo k přímo úměrnému snížení tvorby Cyp7a v primárních humánních hepatocytech *in vitro*. Stejného výsledku bylo dosaženo *in vivo* u myši infikovaných adenovirem exprimujícím FGF-19 [44]. Dále se ukázalo, že působení FGF-19 na Cyp7a je zprostředkované kaskádou c-Jun N-terminální kinázy (JNK) [46].

2.1.3.1.1 Enterohepatální signalizace

Exogenní podávání GW4064 nebo chenodeoxycholové kyseliny pokusným myším vedlo ke zvýšené expresi FGF-15 v buňkách tenkého střeva [33], zatímco v jaterní tkáni nebyla exprese FGF-15 u myši respektive FGF-19 u lidí prokázána [34, 36]. Receptor FGFR4 je

zase exprimován převážně v játrech a jen v malých množstvích ve střevě [33]. Další potvrzení koncepce endokrinního působení FGF-15/-19 přinesly údaje pozorované u *fgf-15^{-/-}* myši (myši s knockoutem genu pro FGF-15), které vykazovaly vyšší aktivitu Cyp7a1 a zvýšené vylučování žlučových kyselin. Navíc podávání GW4064 u nich nevedlo k supresi exprese Cyp7a [33]. Tento model negativní zpětné vazby syntézy žlučových kyselin pomocí látky produkované ve střevech nabízí odpověď i na známý paradox, kde u pokusných zvířat po podvazu žlučovodů dochází ke zvýšené tvorbě Cyp7a i přes nadměrné množství žlučových kyselin v játrech. Dlouhodobě se předpokládala existence neznámého střevního faktoru nutného k potlačení produkce Cyp7a, jehož tvorba by byla podvazem žlučovodů potlačena. Zdá se, že tímto faktorem je právě FGF-15/-19, což potvrzuje i snížení exprese Cyp7a, ke kterému došlo u těchto zvířat po podání GW 4064 [33, 47, 48].

2.1.3.1.2 Regulace objemu žlučníku

Kromě regulace syntézy žlučových kyselin ovlivňuje FGF-15/-19 i plnění žlučníku. Vyprazdňování žlučníku je stimulováno gastrointestinálním hormonem cholecystokininem (CCK) uvolňovaným z proximálního duodena působením procházejících živin. Mechanismy podílející se na jeho plnění jsou méně prozkoumány. *fgf-15^{-/-}* i *fgfr4^{-/-}* myši se vyznačují malými a kontrahovanými žlučníky [44, 49]. Podání FGF-15 nebo rekombinantního lidského FGF-19 *fgf-15^{-/-}* myším zvýšilo objem žlučníku desetinásobně v průběhu 15 minut [49]. Vzhledem k tomu, že FGF-15 se neexprimuje nikde ve žlučových cestách (žlučník, žlučovody, Oddiho sfinkter), předpokládá se, že také tuto funkci plní endokrinně aktivní FGF-15 ze střeva [49].

Celý systém regulace syntézy a sekrece žlučových kyselin pomocí FGF-15/-19 lze shrnout následovně: Při lačnění jsou žlučové kyseliny tvořeny v játrech a transportovány a skladovány ve žlučníku. Po příjmu potravy způsobí zvýšená koncentrace cholecystokininu kontrakci žlučníku a uvolnění žluči do duodena. Žlučové kyseliny po dosažení ilea vstoupí do enterocytů, kde aktivací nukleárního FXR stimulují expresi FGF-15/-19. Ten po uvolnění z enterocytů působí přes FGFR4 v játrech, kde sníží syntézu žlučových kyselin a stimuluje opětovné plnění žlučníku žlučí [19].

Tento model podporují i nedávné výsledky studií u člověka, při kterých byl detekován cirkulující FGF-19 přímo v krvi. Nalačno se jeho sérové hladiny pohybovaly v rozmezí od 49 do 590 pg/ml. Po aplikaci chenodeoxycholové kyseliny došlo k jejich zvýšení o cca 250% provázenému zároveň 26-procentním snížením sérových koncentrací markeru syntézy žlučových kyselin označovaného jako 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-on (C4). Naopak, podávání sekvstrantu žlučových kyselin cholestyraminu po dobu 2-3 týdnů vedlo ke snížení hladin FGF-19 o 87% doprovázenému 18-násobným zvýšením hodnot C4. Navíc se ukázalo, že sérové koncentrace FGF-19 podléhají diurnálnímu rytmu podobně jako je tomu u žlučových kyselin. V průběhu dne vykazovaly hladiny FGF-19 dva vrcholy – kolem 15. a 21. hodiny, což bylo cca 1,5 až 3 hodiny poté, co dosáhly nejvyšší koncentrace žlučové kyseliny (což je těsně postprandiálně). Hodnoty C4 byly následně maximálně sníženy asi za 2 hodiny po dosažení vrcholových hladin FGF-19. V lačném stavu byly sérové koncentrace žlučových kyselin i FGF-19 nízké, zatímco syntéza žlučových kyselin v játrech se zvýšila o 100% [34].

2.1.3.2 Metabolické účinky FGF-19

Na možnost, že FGF-19 se podílí i na regulaci metabolických procesů, upozornily výsledky studií na transgenních myších se zvýšenou expresí FGF-19. V porovnání s kontrolními zvířaty se tyto myši vyznačovaly nižší hmotností, danou hlavně menším podílem bílé tukové tkáně. Vykazovaly též nižší hladiny glykémie a inzulinémie a vyšší míru inzulinové senzitivity a glukózové tolerance. Jejich metabolický obrat byl signifikantně zvýšený nezávisle na hladinách tyreoidálních hormonů, růstového hormonu, IGF-1 nebo leptinu. Navíc si FGF-19 exprimující myši po 12 týdnech vysokotukové diety uchovaly svůj štíhlý fenotyp a vykazovaly nižší obsah triacylglycerolů v játrech a svalech než kontrolní zvířata [30].

Podobný účinek mělo i 7-denní podávání rekombinantního lidského FGF-19 myším krmeným vysokotukovou dietou v průběhu 4-6 týdnů. U hlodavců dostávajících placebo došlo ke vzestupu tělesné hmotnosti, zatímco u zvířat v FGF-19 skupině se hmotnost snižovala. Podávání FGF-19 vedlo též ke snížení respiračního kvocientu, což svědčí pro zvýšení podílu oxidace lipidů na celkové energetické produkci. U těchto zvířat bylo také pozorováno zlepšení glukózové tolerance a snížení sérových koncentrací inzulinu,

leptinu, cholesterolu a triglyceridů [50]. Dále se ukázalo, že podání rekombinantního FGF-19 *ob/ob* myším (geneticky obézní myši neprodukující leptin) nebo jejich zkřížení s FGF-19 produkujícími transgenními zvířaty vedlo ke snížení hmotnosti a zlepšení glukózové tolerance v porovnání s původním *ob/ob* kmenem, což naznačuje, že účinek FGF-19 je nezávislý na působení leptinu [50].

FGF-19 exprimující myši se vyznačují zvýšeným množstvím metabolicky aktivní mezilopatkové hnědé tukové tkáně. Tento jev byl proto původně pokládán za jeden z ústředních mechanismů pozitivního metabolického působení FGF-19. Avšak myši vzniklé zkřížením FGF-19 exprimujících zvířat a kmene s geneticky sníženým množstvím hnědého tuku (UCP-DTA) byly chráněné před vznikem dietou indukované obezity a hyperglykémie i přes snížený obsah hnědé tukové tkáně, což svědčí pro jiný, na této tkáni nezávislý účinek působení FGF-19 na metabolické procesy [50].

V jaterní tkáni zvířat, kterým byl exogenně podáván FGF-19 stejně jako u FGF-19 exprimujících myši došlo ke změně expresi u řady genů podílejících se na metabolismu lipidů. Jako nejdůležitější se jeví snížení aktivity genů kódujících enzymy steroyl CoA desaturázu-1 (SCD1) a mitochondriální acetyl CoA karboxylázu-2 (ACC2) [30, 50]. SCD1 je hlavním regulačním enzymem syntézy monoenových nenasycených mastných kyselin nutných pro tvorbu triglyceridů, cholesterolových esterů a fosfolipidů. ACC2 katalyzuje proměnu acetyl CoA na malonyl CoA, který inhibuje enzym karnitinpalmitoyl transferázu-1 (CPT1) odpovědný za transport mastných kyselin do mitochondrií, kde dochází k jejich spalování pomocí β -oxidace. Inhibice ACC2 proto vede ke zvýšení β -oxidace mastných kyselin. Podobně jako FGF-19 transgenní myši i zvířata neexprimující SCD1 (SCD^{-/-}) nebo ACC2 (ACC^{-/-}) mají štíhlý fenotyp a jsou rezistentní vůči vlivům vysokotukové diety [51, 52]. Podávání rekombinantního FGF-19 vedlo u standardních myši k supresi exprese SCD1 v průběhu několika dní, zatímco exprese ACC2 byla snížena už po 6 hodinách [50].

2.1.3.3 Mitogenní aktivita FGF-19

Jak už naznačuje jejich název, hrají faktory skupiny FGF důležitou roli v regulaci buněčné proliferace. Některé FGF a FGF receptory jsou přímo spojovány se vznikem a

progresí různých nádorů. FGFR4, což je hlavní receptor pro FGF-19 má relativně nízký mitogenní potenciál [35], navíc FGF-19 vykazoval jenom slabou mitogenní aktivitu i přes varianty receptorů FGFR1c, -2c a -3c, i když tyto studie nebraly v úvahu koreceptorový systém Klotho/ β Klotho [13].

U transgenních myší se zvýšenou expresí FGF-19 (obzvláště u samic) dochází v relativně krátkém čase (cca do 1 roku) ke vzniku hepatocelulárního karcinomu [53]. Navíc, u netransgenních myší byla zaznamenána hepatocelulární proliferace již po 6 dnech injekčního podávání rekombinantního lidského FGF-19 [53]. Není jasné, zda jsou tyto efekty důsledkem standardního fyziologického působení FGF-19, jelikož sérové koncentrace FGF-19 u transgenních myší dosahovaly 18-78 ng/ml, což je o 2 řády více než jsou jeho hladiny u lidí [53]. Také denní dávka exogenně podávaného rekombinantního FGF-19 30 μ g mnohonásobně překračovala koncentrace zjištěné u lidí [53]. Dlouhodobě zvýšená exprese FGF-19 u transgenních myší rozhodně nereflektuje typický cirkadiánní rytmus jeho tvorby, který je stěžejní pro jeho funkci regulátoru tvorby žlučových kyselin. Navíc lidský FGF-19 a myší FGF-15 jsou homologní jenom z 53%, přičemž jejich funkce jsou sice podobné, ale v některých oblastech se značně liší (např. při embryogeneze vnitřního ucha a sítnice). Hladiny a denní profil cirkulujících hladin FGF-15 nejsou známy, proto je obtížné hledat paralely mezi jednotlivými druhy. Pomocí objasnit mitogenní efekty FGF-15/-19 mohou další genetické modely, jako např. myši s konstitučně aktivním lidským FGFR4, u kterých nebyla pozorována žádná hepatocelulární proliferace [19].

2.2 Fibroblastový růstový faktor 21 (FGF-21)

FGF-21 byl poprvé izolován z myších embryí, kde je exprimován především v játrech a v menší míře v thymu [54]. U lidí je jeho gen lokalizován na krátkém raménku chromozomu 19 (19q13). Primární struktura lidského FGF-21 je tvořena 209 aminokyselinami, přičemž prvních 28 aminokyselin představuje signální peptid [55]. Struktura lidského FGF-21 je ze 75% identická s myším FGF-21 a v rámci humánních FGF se nejvíce (z 35%) shoduje se složením aminokyselinového řetězce FGF-19 [54].

FGF-21 se váže na všechny typy receptorů pro FGF (FGFR1-4), přičemž však tato vazba podobně jako u dalších endokrinně aktivních FGF (FGF-19 a -23) vyžaduje kofaktor, zvyšující její stabilitu. Tímto kofaktorem je u FGF-21 transmembránový protein β Klotho, umožňující vzájemnou vazbu mezi FGF-21 a receptorem, která je dostatečně silná na zprostředkování jeho metabolických účinků, zároveň však nestačí na aktivaci mitogenního efektu [56, 57]. Proto FGF-21, na rozdíl od většiny dalších fibroblastových růstových faktorů [4, 53, 58], nevykazuje signifikantní vliv na proliferaci nebo onkogenezu [32, 59, 60]. *In vitro* studie naznačují, že FGF-21 se preferenčně váže na c izoformu receptoru 1 pro FGF (FGFR1c) [57], ale bylo prokázáno, že je schopen účinkovat přes všechny 4 druhy FGFR [56].

β Klotho je exprimován v tukové tkáni, játrech, pankreatu a testes, čímž omezuje účinky FGF-21 na uvedené orgány [56, 61]. Podobně jako u FGF-19 se i FGF-21 váže na FGFR pomocí C-terminálního konce, zatímco N-terminální konec je nutný pro interakci s β Klotho, přičemž ke správnému účinku musí být oba konce intaktní [62, 63]. Signál z FGF receptoru dále pomocí fosorylace aktivuje intracelulární signální kaskády zahrnující FGF receptorový substrát 2 α (FRS2 α), Erk1/2 a Akt [13, 32, 64, 65].

2.2.1 Tvorba FGF-21

Za hlavní místo produkce FGF-21 jsou považovány hepatocyty, přičemž jeho syntéza je alespoň částečně regulována pomocí PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor α – receptor α aktivovaný peroxizomovým proliferátorem) [21, 22, 66]. U experimentálních myší vedlo krátkodobé lačnění (12-24 hodin) k výraznému zvýšení jaterní exprese a cirkulujících hladin FGF-21, s jejich následnou rychlou supresí opětovným obnovením příjmu potravy [21, 22, 66]. Působením exogenního PPAR α agonisty Wy-14,643 došlo u myší i *in vitro* v lidských hepatocytech k výrazné indukci exprese mRNA pro FGF-21 [66]. Naproti tomu, FGF-21 mRNA byla snížena u myší s deficitem PPAR α a ani 24-hodinové hladovění ani podání agonisty PPAR α receptoru Wy-14,643 nevedlo k jejímu nárůstu. Geneticky obézní leptin-deficitní *ob/ob* myší s výrazně zvýšenými hladinami jaterního PPAR α vykazovaly 12-násobný vzestup

koncentrací hepatální FGF-21 mRNA [67]. Navíc byly v promotoru genu pro FGF-21 jak u myši tak u lidí identifikovány tzv. PPRE (PPAR α response elements) [66].

U lidí bylo zvýšení tvorby FGF-21 pozorováno po podání přirozených (volné mastné kyseliny) [68] i farmakologických aktivátorů PPAR α [69]. Ukazuje se také, že kromě PPAR α se na regulaci tvorby FGF-21 podílí i další ze skupiny receptorů aktivovaných peroxizomovými proliferátory – PPAR γ [70, 71], i když některé údaje získané u lidí tento názor nepodporují [68, 69]. Celkově se však nabízí možnost, že příznivé metabolické účinky léčiv založených na aktivaci PPAR α (fibráty) a PPAR γ (thiazolidindiony) mohou být alespoň zčásti zprostředkovány indukcí FGF-21.

2.2.2 Funkce FGF-21

Výsledky především zvířecích studií naznačují, že FGF-21 plní důležitou funkci v regulaci četných procesů podílejících se na metabolismu glukózy a lipidů a energetické bilanci. Jak již bylo uvedeno výše, za hlavní místo účinku FGF-21 se považuje tuková tkáň, játra a pankreas [72].

2.2.2.1 Adaptace na hladovění

Sekrece FGF-21 je významně ovlivněna příjmem potravy. U pokusných myši ve stavu nasycení je jeho exprese utlumená. Při hladovění se sekrece FGF-21 výrazně zvyšuje a podílí se na adaptaci metabolických procesů na snížený příjem energie – v tukové tkáni stimuluje lipolýzu a v játrech podporuje glukoneogenezu a přeměnu uvolněných mastných kyselin na ketolátky [21, 22, 73]. Myši krmené ketogenní dietou vykazovaly výrazně vyšší expresi FGF-21 v porovnání se zvířaty přijímajícími standardní stravu. *In vivo* suprese jaterní exprese FGF-21 pomocí adenoviru exprimujícího shRNA (small hairpin RNA) vedla u myši na ketogenní dietě ke vzniku jaterní steatózy, hyperlipidémii a snížení sérových koncentrací ketolátek. Tyto vlivy byly alespoň částečně podmíněny změnami v expresi klíčových genů řídících metabolismus lipidů a ketolátek [74]. Indukce FGF-21 se proto ukazuje být nutnou podmínkou pro aktivaci oxidace lipidů a regulaci ketogeneze v reakci na snížení příjmu potravy [21, 22].

I přes podporu glukoneogenezy nevykazuje FGF-21 žádný stimulační vliv na glykogenolýzu a transgenní myši s nadměrnou expresí FGF-21 zvýšeně akumulují glykogen v játrech. Toto naznačuje, že v úvodních fázích hladovění, kde jako dominantní regulátor metabolické odpovědi působí glukagon, nehraje FGF-21 podstatnější roli. Jeho účinek se uplatňuje spíše při déletrvajícím lačnění, kdy už jsou zásoby glykogenu vyčerpány [73].

Při dlouhodobém hladovění dochází ke snížení až zastavení růstu pomocí blokace účinku osy růstový hormon (STH) – IGF-1 (insulin-like growth factor 1 – inzulínu podobný růstový faktor 1), přičemž přesný mechanismus této blokace není zcela znám [75]. Ukazuje se, že transgenní myši s nadměrnou expresí FGF-21 dosahují o 40-50% menší velikosti než kontrolní zvířata. Dále bylo prokázáno, že FGF-21 snižuje hladiny cirkulujícího IGF-1 o cca 50% bez odpovídajícího ovlivnění koncentrací STH, což vede ke vzniku rezistence na STH. Hlavním mechanismem odpovědným za tento jev se zdá být snížení množství aktivní formy látky označované jako STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5 – signální transduktor a aktivátor transkripce 5) v játrech. STAT5 je transkripční faktor aktivovaný pomocí STH a podílející se na regulaci exprese IGF-1 a dalších genů [76].

V rámci celkové adaptace organismu na déletrvajícím snížený energetický příjem dochází u hlodavců k rozvoji stavu podobného hibernaci označovaného jako torpor a charakterizovaného snížením celkové aktivity i tělesné teploty za účelem uchování energie. První poznatky o možném podílu FGF-21 na regulaci torporu pocházejí z prací, v kterých bylo prokázáno, že tento faktor indukuje v játrech kromě jiného i pankreatickou lipázu a další příbuzné enzymy jako je pankreatické lipáze podobný protein 2 (pancreatic lipase-related protein 2) a karboxyesterlipáza [21]. Tyto lipázy se podílejí na zvýšené oxidaci mastných kyselin vyvolané FGF-21. Extrapancreatická indukce pankreatických lipáz byla poprvé popsána u hibernujících veverek [77], později byla prokázána i u myši v průběhu torporu [78]. Protože pankreatické lipázy dokáží katalyzovat hydrolýzu triacylglycerolů v širokém teplotním rozmezí, předpokládá se, že jejich indukce může zabezpečit kontinuální přísun mastných kyselin jako zdroje energie za nepříznivých zevních podmínek. Předpoklad, že se FGF-21 podílí na regulaci torporu u myši byl podpořen výsledky *in vivo* studie, při které transgenní myši s nadměrnou expresí FGF-21

vstupovaly do stavu torporu již během prvních 24 hodin hladovění, zatímco kontrolní zvířata nikoliv [21].

2.2.2.2 Účinky na metabolismus glukózy a lipidů

2.2.2.2.1 Studie na zvířatech

Výrazně pozitivní účinky FGF-21 na metabolismus byly prokázány ve studiích na různých zvířecích modelech. Transgenní myši zvýšeně exprimující FGF-21 byly chráněny před rozvojem dietou-indukované obezity. Podávání rekombinantního FGF-21 vedlo u různých kmenů hlodavců s geneticky podmíněnou obezitou (*ob/ob* myši s deficitem leptinu, *db/db* myši s chyběním receptoru pro leptin a ZDF potkani) k signifikantnímu poklesu glykémie, inzulinémie a triglyceridů a zlepšení glukózové tolerance v průběhu orálního glukózového tolerančního testu (oGTT) [32]. V jiné skupině diabetických zvířat stejně jako u zdravých kontrol nemělo dvoutýdenní podávání FGF-21 žádný vliv na příjem potravy, hmotnost nebo tělesné složení [32]. U myši s obezitou vyvolanou nadměrným příjmem potravy dokázala aplikace exogenního FGF-21 zvrátit tuto obezitu stejně jako vzniklou jaterní steatózu, zvýšit energetický výdej a zlepšit periferní i jaterní inzulinovou senzitivitu [74, 79].

Ještě zajímavější výsledky přineslo exogenní podávání rekombinantního FGF-21 diabetickým opicím z rodu *M. rhesus*. Po 6 týdnech uvedené léčby došlo u zkoumaných primátů k výraznému poklesu hladin plazmatické glukózy, fruktozaminu, triglyceridů, inzulinu a glukagonu. FGF-21 dále významně snížil LDL a zvýšil HDL cholesterol a v porovnání s myšími modely i lehce ale signifikantně zredukoval tělesnou hmotnost. Jeho aplikace byla navíc spojená s poklesem hladin cirkulujících markerů zánětu a kardiovaskulárního rizika, jako např. CRP, IL-8, lipoproteiny apoA-1, apoC-III, PAI-1 (inhibitor aktivátoru plazminogenu I) nebo von Willebrandova faktoru a zvýšením hodnot protektivního adipokinu adiponektinu [80].

Uvedené pozitivní vlivy FGF-21 na prakticky všechny složky metabolického syndromu nebyly provázeny žádnými významnějšími nežádoucími účinky, typickými pro jiné látky používané k léčbě metabolických odchylek spojených s obezitou a diabetes mellitus 2. typu. Podávání suprafyziologických koncentrací FGF-21 stejně jako jeho nadměrná

endogenní exprese nevedly ke zvýšenému výskytu hypoglykémie, edémů nebo toxického poškození jater, ani k hmotnostnímu přírůstků nebo naopak excesivnímu hubnutí či lipodystrofií. Rovněž nebyly pozorovány žádné mitogenní účinky spojené se zvýšenými koncentracemi FGF-21 a to na rozdíl od FGF-19 ani na jaterní tkáň [21, 32, 59, 74, 79-81], přičemž se spíše ukazovalo, že FGF-21 může naopak působit antionkogenně [59].

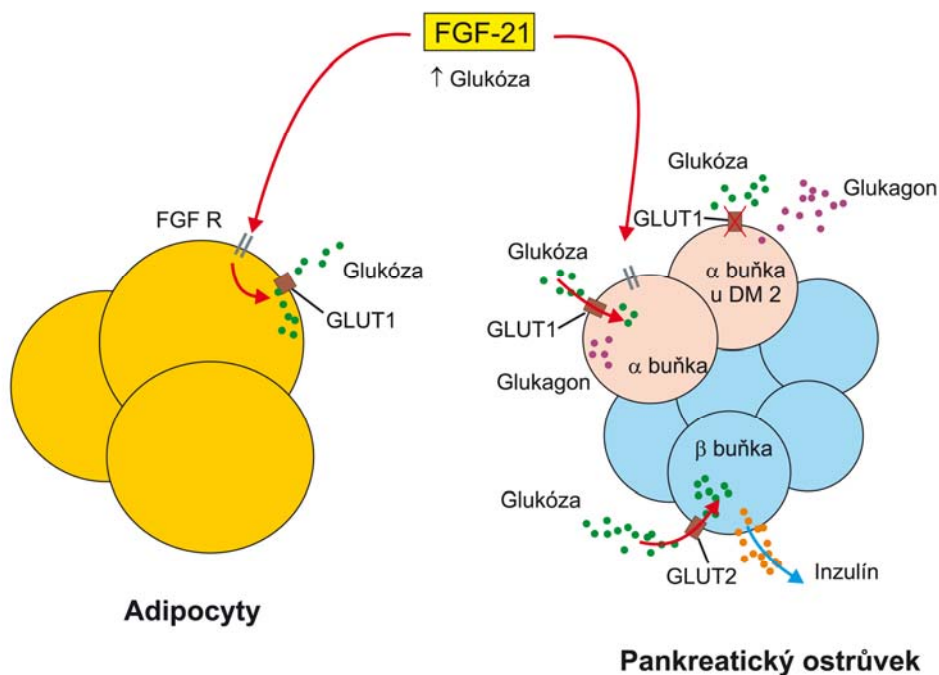
2.2.2.2.2 Mechanismy působení FGF-21

Schopnost FGF-21 komplexně ovlivňovat metabolické děje je dána jeho současným působením na procesy ve většině metabolicky aktivních orgánů jako jsou játra, tuková tkáň nebo pankreas. Navíc se zdá, že vlivy FGF-21 na regulaci jednotlivých funkcí a procesů jsou navzájem nezávislé [74, 82]. Ukazuje se také, že pozitivní metabolické působení FGF-21 je podmíněno hlavně zvýšením bazálního energetického výdeje a vyšší oxidací tuků [74, 79]. V játrech dochází vlivem FGF-21 k potenciaci oxidace mastných kyselin a supresi *de novo* lipogenezy. V tukové tkáni zase FGF-21 vede ke koordinované aktivaci lipogenezy, termogenezy a mobilizaci lipidů, což zvyšuje energetický výdej a zároveň poskytuje substrát pro aktivovanou oxidaci mastných kyselin v játrech [21, 74, 83, 84]. FGF-21 dále stimuluje vychytávání glukózy tukovými buňkami a to indukcí exprese glukózového transportéru GLUT-1 (glucose transporter 1 – *Obrázek 1*), přičemž tento mechanismus je nezávislý na účinku inzulínu (který působí přes translokaci jiného glukózového transportéru – GLUT-4 – z intracelulární pohotovostní zásoby) [32, 56, 84]. Všechny uvedené procesy mají tak za následek zvýšení inzulínové senzitivity ve výše uvedených orgánech a tkáních.

Kromě zlepšení citlivosti na inzulín působí FGF-21 i přímo v pankreatu (*Obrázek 1*). Jeho výskyt byl prokázán v Langerhansových ostrůvcích u myší, potkanů i lidí, stejně jako v izolovaných potkaních β -buňkách a buňkách INS-1E (inzulinomové buňky) [60]. V pankreatických ostrůvcích izolovaných ze zdravých potkanů zvyšoval FGF-21 koncentrace inzulínové mRNA i samotného proteinu, ale nepotencoval glukózou indukovanou sekreci inzulínu. U ostrůvků pocházejících z diabetických hlodavců došlo působením FGF-21 ke zvýšení obsahu inzulínu i jeho sekrece. Dlouhodobé podávání FGF-21 (kontinuální infuze v průběhu 8 týdnů) obézním *db/db* myším vedlo ke zvýšení syntézy inzulínu a zlepšení přežívání β -buněk, což vedlo k nárůstu jejich počtu a rovněž

ke zvýšení množství Langerhansových ostrůvků [60]. Dále je možné, že FGF-21 působí i na α -buňky, ve kterých snižuje tvorbu glukagonu, což by také mohlo přispívat ke zlepšení glykemické kompenzace [32]. Nedávno byly navíc na myších modelech pozorovány výrazně protektivní vlivy FGF-21 na pankreatické buňky při uměle navozené pankreatitidě [85, 86].

Obrázek 1: Účinky FGF-21 na tukovou tkáň a pankreas (DM2 – diabetes mellitus 2. typu, FGF-21 – fibroblastový růstový faktor 21, FGFR – receptor pro fibroblastové růstové faktory, GLUT1, 2 – glukózový transportér 1, 2).



Efekty FGF-21 jsou nezávislé na inzulínu, i když se jejich signální dráhy vzájemně ovlivňují [87]. Na rozdíl od rychlého nástupu účinku, typického pro inzulín, se aktivita FGF-21 začne projevovat v řádu hodin [32, 56]. Na subcelulární úrovni představuje hlavní mechanismus působení FGF-21 aktivaci genů produkujících enzymy a regulátory jednotlivých metabolických drah. Jedním z faktorů podílejících se na účincích FGF-21 je regulační protein označovaný jako PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α). Tento transkripční koaktivátor interaguje s několika různými proteiny vážícími se na DNA a podílí se tak na regulaci metabolických procesů v reakci na řadu stimulů včetně změny nutričního stavu organismu, fyzické aktivity nebo chladové expozice [73, 88]. V játrech vedla indukce PGC-1 α lačněním ke zvýšení transkripce genů

podílejících se na glukoneogeneze, ketogeneze a oxidaci mastných kyselin [89-91]. U myši s chybějící expresí PGC-1 α nedokáže FGF-21 indukovat expresi genů účastnících se glukoneogeneze [73]. Geneticky modifikovaná zvířata s knockoutem genu pro FGF-21 navíc nedokáží při déletrvajícím hladovění plně indukovat tvorbu PGC-1 α , čímž u nich dochází k narušení glukoneogenezy a ketogenezy [73].

Jiným důležitým genem regulovaným FGF-21 v játrech je gen kódující enzym stearoyl-Co desaturáza 1 (SCD-1), což je klíčový lipogenetický enzym podílející se na přeměně nasycených MK na mononenasyčené formy [92]. Exogenní přívod FGF-21 vedl u myši k výrazné supresi exprese SCD-1, která byla přímo úměrná podávané dávce [74]. Podobně jako u myši, kterým byl podáván exogenní FGF-21 je i pro zvířata s delecí SCD-1 typický štíhlý fenotyp, příznivý metabolický profil a snížený obsah lipidů v játrech [93]. Navíc byla schopnost FGF-21 suprimovat expresi SCD-1 snížena u leptin deficitních *ob/ob* myši v porovnání s kontrolami s normální tvorbou leptinu [74]. Tyto údaje naznačují, že snížení aktivity SCD-1 alespoň částečně přispívá k pozitivním metabolickým vlivům FGF-21.

Mezi další enzymy, jejichž jaterní exprese byla snížena vlivem FGF-21, patří acetylCoA karboxyláza 1 a 2 (ACC1/2), glycerol-3-fosfát-1-acyltransferáza (GPAT) a syntáza vyšších karboxylových kyselin (FAS – fatty acid syntase), což jsou klíčové enzymy podílející se na syntéze mastných kyselin a triacylglycerolů. Naopak, ke zvýšení došlo u 2 transkripčních faktorů – hepatocytárního nukleárního faktoru 4 α (HNF4 α) a Foxa2 (forkhead box A2). HNF4 α hraje důležitou úlohu při udržování metabolismu glukózy v játrech a zvyšuje expresi genu pro apoA1 [94]. Foxa2 je dalším významným regulátorem glukózového a lipidového metabolismu, jehož nadměrná exprese v geneticky modifikovaných myších vede ke zvýšení inzulinové senzitivity, normalizaci glykémie a zlepšení jaterní steatózy [95].

V experimentálních studiích ovlivňoval FGF-21 i metabolismus cholesterolu a žlučových kyselin. Jeho podávání vedlo ke snížení exprese HMG-CoA reduktázy, hlavního regulátoru syntézy cholesterolu, a zároveň ke zvýšení inhibitoru jeho exprese označovanému jako INSIG2 (insulin induced gen 2 – inzulinem indukovaný gen 2). Snížena byla také exprese enzymu CYP8B1, který se rovněž podílí na tvorbě žlučových kyselin. Tyto změny vedoucí velmi pravděpodobně k poklesu množství žlučových

kyselin secernovaných do střeva by mohly vysvětlovat zvýšené množství tuku ve stolici myši vystavených působení FGF-21 [74].

I v tukové tkáni podporuje FGF-21 působení PGC-1 α , který tam působí jako významný regulátor oxidačního metabolismu v mitochondriích [74]. FGF-21 také zvyšuje expresi UCP-1 (uncoupling protein 1) [74], hlavního mediátoru netřesové termogeneze [96]. Zároveň však stimuluje expresi řady faktorů, jejichž syntézu naopak v játrech potlačuje. Tyto faktory zahrnují SCD-1, diacylglycerol acyltransferázu 1 (DGAT1), ACC1, ACC2, carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP), aFABP (adipocytární vazební protein pro mastné kyseliny – adipose fatty acid binding protein) a fosfoenolpyruvátkarboxykinázu (PEPCK). Zvýšená je také exprese hormonsenzitivní lipázy (HSL) [74]. Tyto změny vedou k paralelnímu nárůstu lipogenezy a zároveň mobilizaci lipidů z adipocytů, což má za následek vznik tzv. substrátového nebo plýtvavého cyklu (angl. futile cycle) složeného z protichůdných metabolických reakcí probíhajících simultánně, jehož výsledkem je zvýšené uvolňování energie ve formě tepla jako důsledek hydrolýzy ATP nebo jiné makroergické sloučeniny [74, 97, 98].

2.2.2.2.3 FGF-21 u lidí

I přes množství poznatků o biologii FGF-21 pocházejících z *in vitro* a zvířecích studií, je zkoumání jeho funkcí a regulace u lidí stále v počátcích (i když klinické práce zabývající se FGF-21 u lidí v poslední době rychle přibývají). Vzhledem ke komplexitě účinků a funkcí tohoto faktoru jsou však zatím získané výsledky často inkonzistentní až protichůdné.

První dvě průřezové studie z roku 2008 zkoumaly hladiny FGF-21 u pacientů s obezitou [99] a diabetes mellitus 2. typu [100]. Zhang a kol. prokázali signifikantně vyšší sérové koncentrace FGF-21 u obézních jedinců, přičemž tyto hladiny po adjustaci na věk a BMI pozitivně korelovaly s obsahem tuku v organizmu, lačnou inzulinémií a hladinou triglyceridů a negativně s HDL cholesterolem. Zároveň byla exprese FGF-21 detekována i v subkutánním tuku, přičemž její míra významně pozitivně korelovala se sérovými hladinami FGF-21 [99]. Ve studii Chena a kol. vykazovali diabetičtí pacienti statisticky významně zvýšené hladiny FGF-21, které negativně korelovaly s lačnou glykemií, inzulinémií a HOMA indexem [100].

V další práci byla zachycena významná interindividuální variabilita sérových koncentrací FGF-21 u zdravých dobrovolníků, kde nejvyšší hodnoty dosahovaly až 250-násobků minimálních koncentrací. U těchto probandů hladiny FGF-21 nevykazovaly žádnou korelaci s věkem, pohlavím, BMI nebo glykemií. Nebyla zaznamenána diurnální variabilita koncentrací FGF-21 ani žádná souvislost se syntézou cholesterolu nebo žlučových kyselin (na rozdíl od FGF-19). Dvoudenní hladovění nebo dvoudenní konzumace ketogenní diety neovlivnily hladiny FGF-21, avšak po 7 dnech omezeného energetického příjmu došlo k 74-procentnímu zvýšení jeho koncentrací. Probandi s hypertriglyceridemií bez diabetes mellitus měli dvojnásobně vyšší hladiny FGF-21 oproti zdravým jedincům, přičemž podávání agonisty PPAR α fenofibrátu vedlo k jejich dalšímu zvýšení. Tyto údaje podporují význam receptorů PPAR α pro regulaci syntézy FGF-21 pozorovaný u zvířecích modelů i u lidí [101].

Několik dalších studií potvrdilo asociaci vyšších hodnot cirkulujícího FGF-21 s poruchou glukózové tolerance nebo diabetes mellitus 2. typu [102-104]. V těchto studiích koreloval sérový FGF-21 více či méně silně s různými parametry obezity a lipidového metabolismu (triglyceridy, celkový a HDL cholesterol, volné mastné kyseliny, poměr pas/boky atd.). Vztah k faktorům ovlivňujícím glykémii nebyl tak jednoznačný – v jedné studii nebyla zaznamenána žádná korelace mezi FGF-21 a parametry inzulínové sekrece a senzitivity měřené hyperglykemickým clampem nebo orálním glukózovým tolerančním testem [103]. V dalších dvou pracích zase FGF-21 negativně koreloval s lačnou a postprandiální inzulínemií a inzulínovou senzitivitou stanovenou glukózovým clampem nebo pomocí HOMA indexu [102, 104], a pozitivně s lačnou a postprandiální glykemií a glykovaným hemoglobinem [104]. Byly také zaznamenány pozitivní korelace se systolickým a diastolickým krevním tlakem, glykovaným hemoglobinem [102] a γ -glutamyltransferázou (GGT) [103]. Hladiny FGF-21 nebyly zvýšeny u pacientek s gestačním diabetem po korekci na bazální inzulínemii, i když i v této studii korelovaly jeho koncentrace pozitivně s parametry inzulínové rezistence a dyslipidemie [105]. Jiná recentní studie prokázala vyšší koncentrace FGF-21 u pacientů s Cushingovým syndromem, které však byly spíše podmíněné obezitou a nekorelovaly s hladinami kortizolu [106].

Na našem pracovišti jsme zkoumali sérové koncentrace FGF-21 u pacientek s mentální anorexií reprezentující restriční model proteinokalorické malnutrice. Ukázalo se, že přes svou roli v adaptaci na hladovění, byly cirkulující hladiny FGF-21 u těchto pacientek signifikantně nižší než u zdravých kontrolních jedinců. V obou skupinách FGF-21 pozitivně koreloval s BMI a sérovými hladinami leptinu a inzulínu a negativně s koncentracemi adiponektinu. Částečná realimentace v průběhu 2 měsíců vedla k dalšímu snížení hodnot FGF-21 [107]. Jiná práce zabývající se vlivem FGF-21 na hormony osy růstového hormonu u mentálních anorektiček prokázala negativní korelaci mezi FGF-21 a IGF-1 a pozitivní vztah s hladinami STH [108], čímž potvrdila možný vliv FGF-21 na vznik rezistence na STH, naznačený už ve zvířecích studiích [76].

Zajímavé výsledky přinesla práce studující možnou expresi FGF-21 ve svalech, kde se ukázalo, že jak akutní hyperinzulinémie v průběhu hyperinzulinemického euglykemického clampu tak i chronická hyperinzulinémie vedly k vyšší svalové expresi FGF-21. Nepovedlo se však prokázat korelaci mezi expresí mRNA pro FGF-21 a jeho cirkulujícími hladinami, co by svědčilo pro fakt, že příčně pruhovaná svalová tkáň nepatří mezi primární zdroje FGF-21 [109]. Tyto výsledky potvrzují experimentálně získané údaje, kde myši nadměrně exprimující Akt kinázu vykazovaly i zvýšenou svalovou expresi FGF-21. Zdá se proto, že tvorba FGF-21 ve svalové tkáni je spíše než přes PPAR α regulována signální kaskádou zahrnující inzulín a Akt [87].

Uvedené poznatky vyvolávají řadu dalších otázek ohledně biologických funkcí FGF-21 u lidí, z nichž asi nejzajímavější je důvod, proč jsou hladiny FGF-21 jako faktoru regulujícího adaptaci na hladovění, zvýšené i při stavech spojených s nadměrným energetickým příjmem jako obezita a diabetes mellitus 2. typu. Mohlo by se jednat buď o kompenzatorní reakci na nepříznivý metabolický profil u těchto nemocí nebo by vyšší koncentrace FGF-21 mohly být důsledkem rezistence na jeho účinky podobně jako je tomu u leptinu či inzulínu [10, 110]. Otázkou je rovněž mechanismus, jakým látka zvyšující glukoneogenezu při hladovění u pokusných zvířat s normální hmotností zároveň zlepšuje citlivost na inzulín a snižuje hepatální produkci glukózy u inzulín-rezistentních zvířat. Prakticky neprozkoumanou zatím zůstává také úloha dalších tkání (tuková tkáň, kosterní svaly) při tvorbě a systémové sekreci FGF-21 [110].

3. TUKOVÁ TKÁŇ A SUBKLINICKÝ ZÁNĚT

Tuková tkáň je multifunkční heterogenní orgán, tvořený různými buněčnými řadami, zahrnujícími jednak tukové buňky (adipocyty a preadipocyty), jednak fibroblasty, endoteliální buňky, makrofágy, lymfocyty a další imunokompetentní buňky pocházející z tzv. stroma-vaskulární frakce [111]. U savců se tuková tkáň dělí na bílou, obsahující především adipocyty s jedinou tukovou kapénkou (unilokulární buňky) a menším množstvím mitochondrií, a hnědou, skládající se z buněk s velkým počtem mitochondrií specializovaných na adaptivní termogenezu. Dle lokalizace se bílá tuková tkáň dále rozděluje na 2 velké (tradiční) části – podkožní a viscerální (mesenterální a omentální) [112] a další menší části – perivaskulární, epikardiální, perirenální a tukové buňky v kostní dřeni, na které se však v poslední době soustřeďuje stále více pozornosti v souvislosti s rozvojem komplikací obezity a diabetu. U lidí se nachází v průměru 3- až 4-krát více podkožního než viscerálního tuku [113], přičemž se zdá, že obě hlavní složky navzájem úzce spolupracují [114].

3.1 Funkce tukové tkáně

K dlouhodobě známým úlohám tukové tkáně, kterými jsou ukládání nadbytečné energie ve formě zásobních lipidů, tepelná izolace organismu a ochrana orgánů před účinky vnějších mechanických sil, se v poslední době přidaly i další méně tradiční funkce, jako schopnost produkce endokrinně aktivních látek [115, 116] nebo ovlivnění imunitních reakcí [7, 8]. Zvláštní roli plní hnědá tuková tkáň, vyskytující se hlavně u zvířat a dětí [117, 118], která však dle nejnovějších výsledků může hrát významnou úlohu i v pozdějším věku [119, 120].

3.1.1 Hnědá tuková tkáň

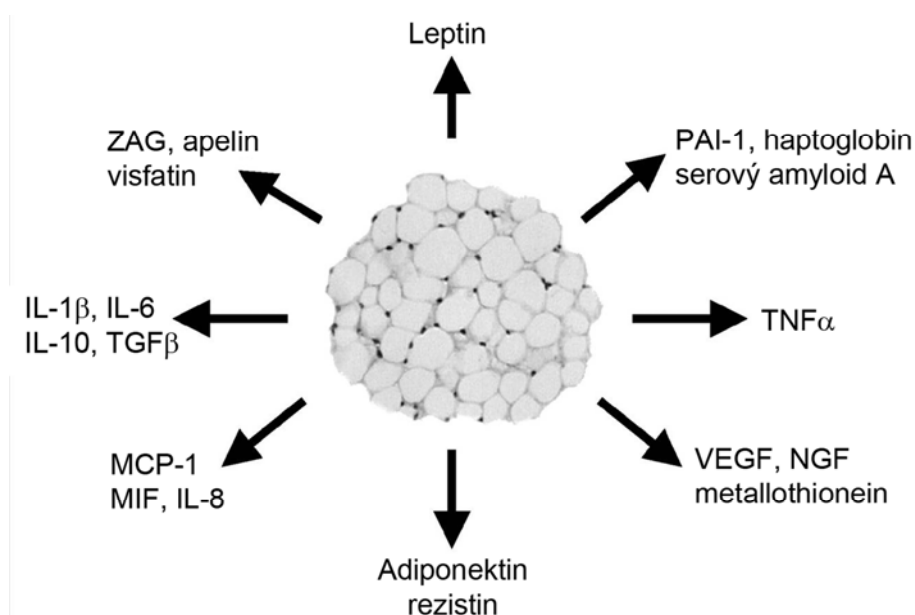
Hnědá tuková tkáň se u člověka (podobně jako u myši) objevuje již před narozením v typických lokalizacích, zejména v podkoží (mezi lopatkami), mezi krčními svaly, okolo thymu a aorty a perirenálně. V mitochondriích hnědých adipocytů jsou díky rozpřahujícím proteinům (UCP – uncoupling protein) odpojeny procesy koncového

oxidačního řetězce od syntézy ATP, čímž dochází k proměně velké části vytvořené energie na teplo. Termoregulační funkce hnědého tuku má význam hlavně u dětí. V poslední době se však objevují důkazy i o jeho úloze v metabolických regulacích u dospělých jedinců, jelikož exprese genů typických pro hnědý tuk koreluje negativně se stupněm obezity a inzulínové rezistence [121, 122] a jeho indukce vede ke zvýšenému vychytávání glukózy z periferního oběhu [123].

3.2 Tuková tkáň jako endokrinní orgán

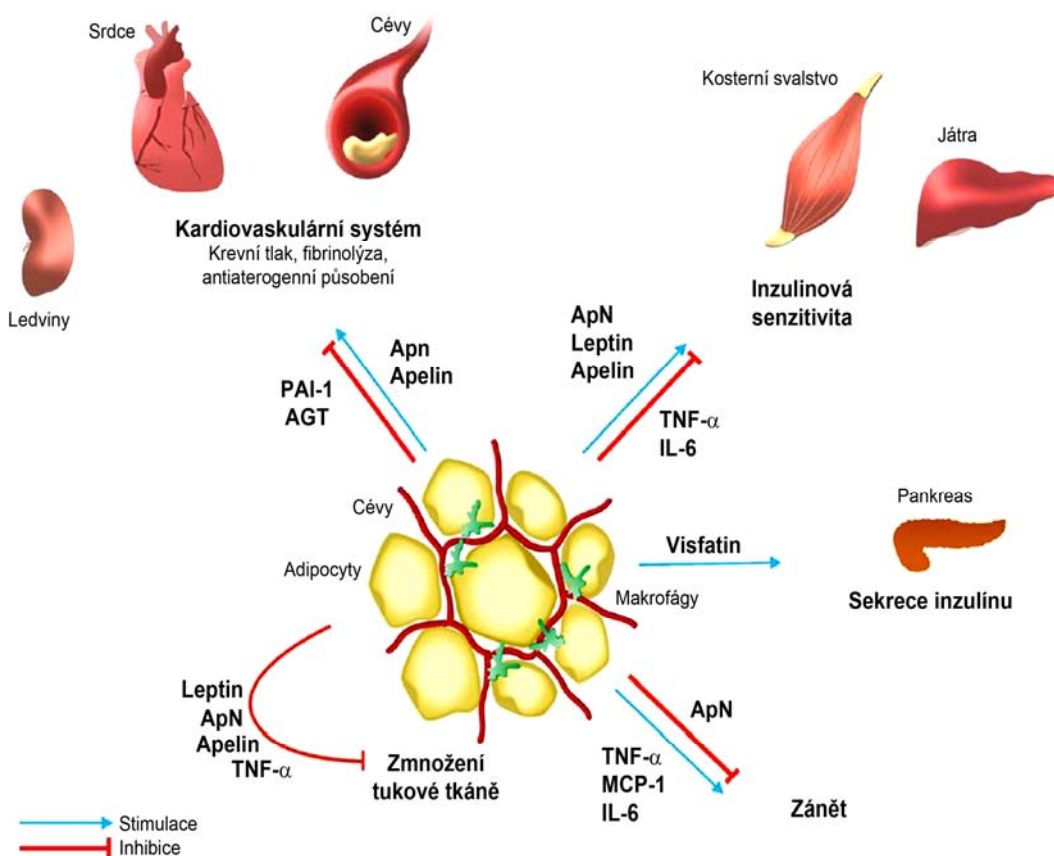
Tuková tkáň už v současnosti není považována jen za úložiště nadbytečné energie ve formě zásobních lipidů. Naopak, bylo prokázáno, že se jedná o jeden z klíčových endokrinních orgánů s výraznou parakrinní a autokrinní regulací [124]. Adipocyty tvoří přibližně 50% bílé tukové tkáně, přičemž druhá polovina se skládá z preadipocytů, fibroblastů, cévních a imunitních buněk (makrofágy, lymfocyty..) tvořících tzv. stroma-vaskulární frakci. [125].

Obrázek 2: Adipokiny – biologicky aktivní látky produkované buňkami tukové tkáně (IL – interleukin, MCP-1 – monocyty chemoatraktivující protein 1, MIF – migraci makrofágů inhibující faktor 1, NGF – nervový růstový faktor, PAI-1 – inhibitor 1 aktivátora plazminogenu, TGF β – transformující růstový faktor β , TNF α – tumor nekrotizující faktor α , VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, ZAG – zinkový α 2-glykoprotein). Upraveno podle Trayhurn *et al*, 2006.



Buňky tukové tkáně, hlavně adipocyty, preadipocyty a imunokompetentní buňky secernují široké spektrum hormonů, cytokinů a dalších působků, které svým účinkem ovlivňují nejen okolní tkáň, ale i vzdálené orgány jako játra, kosterní svaly, kardiovaskulární systém a jiné (Obrázek 2) [124, 126]. Uvedené látky se tak mohou podílet na rozvoji řady patologických procesů včetně aterosklerózy, zánětu, metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Obrázek 3) [115, 127-129]. Část těchto faktorů, označovaná jako adipokiny, je produkována téměř výhradně adipocyty (např. leptin nebo adiponektin...), další jsou tvořeny primárně imunokompetentními nebo dalšími stromálními buňkami (TNF- α , interleukiny...).

Obrázek 3: Adipokiny podílející se na vzniku inzulínové rezistence a dalších komponent metabolického syndromu (AGT – angiotenzinogen, Apn – adiponektin, IL-6 – interleukin 6, MCP-1 – monocyty chemoatrahující protein 1, PAI-1 – inhibitor plazminogenového aktivátoru 1, TNF- α – tumor nekrotizující faktor α). Upraveno podle Maury et Brichard, 2010.



3.3 Adipocyty

Adipocyty představují komplexní buňky, které se za normálních okolností podílejí na tvorbě, skladování a sekreci lipidů a protizánětlivých působků (adiponektin), mohou však být také zdrojem rozsáhlé palety prozánětlivých faktorů, jako TNF α , IL-6, IL-8, CCL-2 a další. Prozánětlivé adipokiny svým parakrinním a endokrinním působením vedou dále k rozvoji zánětu a inzulínové rezistence jednak lokálně v tukové tkáni a jednak celkově na úrovni dalších orgánů a systémů (*Obrázek 3*) [7, 130].

Celková masa tukové tkáně závisí jak na počtu tak na velikosti adipocytů. Množství tukových buněk se stabilizuje v ranné dospělosti, přičemž pozdější změny v objemu tělesného tuku jsou podmíněny hlavně změnou jejich velikosti. Obrat adipocytů za rok dosahuje v průměru hodnoty kolem 10% všech adipocytů [131].

S rostoucím množstvím tělesného tuku se zvyšuje i obsah tuku v adipocytech na maximálně 0,7-0,8 μg lipidů na 1 buňku, přičemž po dosažení tohoto prahu dochází i ke zrychlení tvorby nových adipocytů [132]. U obézních jedinců je však schopnost tukové tkáně tvořit nové adipocyty omezena [133]. Počet preadipocytů (prekurzorů adipocytů) je u pacientů s obezitou snížený bez ohledu na lokalizaci tukové tkáně [134]. Zároveň je snižena i míra jejich diferenciaci na zralé adipocyty [126]. Zdá se proto, že většina případů obezity v dospělém věku je spojená s adipocytární hypertrofií. Velké adipocyty vykazují vyšší stupeň inzulínové rezistence a lipolytické aktivity a produkují větší množství prozánětlivých cytokinů a méně protektivně působícího adiponektinu [135]. Také se častěji vyskytují u jedinců metabolickými poruchami asociovanými s obezitou [132]. Hypertrofované adipocyty respektive jejich velikost jsou zároveň faktorem, který u obezity nejlépe koreluje s inzulínovou rezistencí [136, 137].

3.4 Podkožní a viscerální tuková tkáň

Viscerální tuková tkáň, lokalizovaná intraperitoneálně, zahrnuje omentální a mezenteriální tuk a její zvýšená akumulace, označovaná jako tzv. androidní obezita, představuje nezávislý rizikový faktor pro rozvoj poruch glukózové tolerance, inzulínové rezistence, dyslipidémie a kardiovaskulárního postižení [138-141]. Zároveň lépe koreluje s rizikem vzniku uvedených nemocí než tzv. gynoidní typ obezity, charakterizovaný

zvýšenou akumulací tukové tkáně předilekčně v oblasti hýždí a stehen [142-145]. U mužů tvoří viscerální tuková tkáň kolem 20% z celkového tuku, zatímco u žen v premenopauzálním věku je to jenom 6%. U žen s abdominální obezitou byl navíc zjištěn typický mužský rizikový profil [132]. Hypertrofované adipocyty ve viscerální oblasti jsou charakterizované zvýšenou lipolytickou aktivitou a jsou rezistentní vůči antilipolytickým efektům inzulínu [146]. K jednoduchému posouzení míry abdominální obezity se používá měření obvodu pasu, u kterého však třeba zohlednit i podíl podkožního tuku, který představuje až 80-85% všech tukových zásob organismu, a to jak u štíhlých jedinců, tak u osob s obezitou [147].

Kromě lokalizace se obě tuková depa liší i spektrem produkovaných faktorů. Např. leptin je predominantně secernován podkožním tukem [148], zatímco exprese adiponektinu a některých cytokinů (IL-6, IL-8, angiotensinogen, PAI-1) je výraznější ve tkáni viscerální [149, 150]. Rychlost uvolňování volných mastných kyselin (VMK) je všeobecně vyšší u lidí s abdominální než gynoidní obezitou, avšak hlavním zdrojem sérových VMK se u těchto jedinců zdá být spíše subkutánní než viscerální tuk [151].

3.5 Tuková tkáň jako mediátor zánětu a vrozené imunity

Vrozená imunita představuje jediný způsob obrany proti infekcím u 99% všech mnohobuněčných živočišných druhů. U hmyzu zabezpečuje tuto funkci orgán zvaný tukové těleso obsahující receptor pro bakteriální a plísňové antigeny označovaný jako Toll receptor [152]. Tento receptor aktivuje signální kaskádu nukleárního faktoru κ B (NF- κ B), která vede k sekreci antimikrobiálních peptidů a indukci dalších obranných mechanismů [153]. Tukové těleso zároveň u hmyzu plní roli jater a slouží i jako zásobárna lipidů [154-156]. V průběhu evoluce došlo u obratlovců k rozdělení těchto funkcí mezi játra a tukovou tkáň. I když se původně předpokládalo (obzvláště po objevení proteinů akutní fáze), že vrozené imunitní reakce jsou spjaty hlavně s játry, v současnosti se ukazuje, že tuková tkáň si spolu se schopností akumulovat nadbytečné lipidy zachovala i možnost plnit některé funkce imunitního systému [157].

I když jsou rezidenční makrofágy považovány za hlavní zdroj zánětu v tukové tkáni, ukazuje se, že adipocyty rovněž vykazují signifikantní prozánětlivé schopnosti. Podobně

jako makrofágy jsou i adipocyty citlivé k různým infekčním agens a působkům, zprostředkujícím zánětlivé signály. Adipocyty na svém povrchu exprimují množství receptorů umožňujících zachytit přítomnost patogenů, přičemž aktivace těchto receptorů dále přes mnohočetné signální kaskády vede k tvorbě a sekreci prozánětlivých cytokinů a dalších reaktantů akutní fáze. Adipocyty citlivě reagují na působení TNF- α , který pomocí svých receptorů p55 a p75 stimuluje různé signální kaskády včetně drah NF- κ B, p38 mitogenem aktivované proteinkinázy (mitogen-activated protein kinase – MAPK), fosfatidylinozitol-3 kinázy a c-jun-N-terminální kinázy (JNK) [158]. Savčí lipopolysacharidový receptor TLR-4 (toll-like receptor 4) je exprimován v tukové tkáni i v *in vitro* kultivovaných adipocytech a po jeho stimulaci pomocí bakteriálního endotoxinu dochází k aktivaci p65/p50 a p68/p52 NF- κ B signálních kaskád [159, 160]. To dále vede k expresi prozánětlivých faktorů jako jsou interleukin 6 (IL-6), TNF- α a sérový amyloid A3 (SAA3). Působení endotoxinu také senzitivizuje adipocyty vůči působení infekčních patogenů, např. pomocí zvýšení exprese receptoru TLR-2 (toll-like receptor 2) odpovědného za rozeznávání plísňových antigenů. Bylo též prokázáno, že působením vybraných faktorů včetně IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, interferon- γ (IFN- γ) a komponent buněčné stěny hub dochází v adipocytech k aktivaci prozánětlivých signálních drah. Regulace těchto drah se mění v průběhu adipogeneze: diferenciace adipocytů vede k výraznému zvýšení exprese podjednotek NF- κ B (p68, p52), inhibitoru NF- κ B (I κ B) a sekrece IL-6 a ke snížení odpovědi na účinky lipopolysacharidu pomocí redukce aktivity NF- κ B podjednotek p65/p50 [161]. Uvedené změny do značné míry připomínají expresní profil aktivovaných dendritických buněk, což naznačuje existenci funkční podobnosti mezi těmito dvěma buněčnými typy [162].

V reakci na působení infekčních a zánětlivých signálů dochází v adipocytech ke tvorbě a uvolňování četných dalších mediátorů zánětu včetně TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 (plasminogen activator inhibitor-1 – PAI-1), leukemického inhibičního faktoru, hepatocytárního růstového faktoru, SAA3, faktoru inhibujícího migraci makrofágů (macrophage-migration inhibitory factor – MIF), haptoglobinu, složek komplementu B, D a C3, prostaglandinu E2, a adipokinů s potenciálně imunomodulačními vlastnostmi, jako jsou leptin, adiponektin a rezistin [163]. I když většina těchto faktorů účinkuje hlavně auto- a parakrinně, mnoho z nich

působí také systémově a přispívá signifikantně ke globální zánětlivé aktivitě v organismu.

Vzájemný vztah mezi obezitou a zánětem podporují i výsledky studií zabývajících se redukcí hmotnosti. Snížení množství tukové tkáně je spojeno s poklesem zánětlivých markerů bez ohledu na to, jestli hmotnost klesá v důsledku snížení příjmu potravy, zvýšení energetického výdeje nebo pomocí bariatrické chirurgie. Dietní opatření a zintenzívnění pohybového režimu vedly u pacientů s různým stupněm obezity a různého věku ke konzistentnímu poklesu cirkulujících zánětlivých parametrů včetně CRP, IL-6, IL-18 PAI-1, TNF- α , solubilního TNF receptoru, adhezivních molekul a dalších [164, 165]. Gastrický bypass zase vedl k signifikantnímu snížení hladin IL-6 a CRP provázenému výrazným zlepšením inzulínové senzitivity až vymizením diabetes mellitus v průběhu 14 měsíců od výkonu [166]. Uvedené údaje podporují kauzální vztah mezi obezitou a systémovým zánětem a zároveň poukazují na to, že příznivý vliv hmotnostní redukce na zdravotní stav může být přinejmenším částečně podmíněn snížením zánětlivé signalizace a prozánětlivého stavu.

3.6 Obezita a adipokiny

Obezita a diabetes mellitus 2. typu jsou spojeny s dysregulací téměř všech známých adipokinů. Jak již bylo uvedeno dříve, produkce většiny adipokinů podílejících se na vzniku prozánětlivého stavu a inzulínové rezistence se s rostoucí adipositou zvyšuje, a tak podporuje vznik metabolických komplikací. Na druhou stranu, tvorba adipokinů s protizánětlivými a inzulín-senzitizujícími účinky (jako např. adiponektin) je u nadměrné akumulace tuku snížena. A u dalších působků jako je leptin je obezita spojena s rezistencí k jejich pozitivnímu metabolickému působení [167].

Tuková tkáň se vyznačuje několika zvláštnostmi spojenými s její sekreční funkcí [116]. Různá tuková depa (podkožní, viscerální..) se od sebe liší nejen metabolickými vlastnostmi, ale i produkovanými adipokiny. Své typické vlastnosti si jednotlivé buněčné populace vzniklé diferenciací z preadipocytů zachovávají i po 40 děleních [168]. Odlišné sekreční produkty svým auto- a parakrinním působením různě ovlivňují okolní tkáň. Také celkový příspěvek jednotlivých tukových dep k systémovým koncentracím cirkulujících

adipokinů se výrazně liší – jak již bylo uvedeno, nitrobřišní tuk tvoří maximálně 15-20 % z celkového objemu tukové tkáně a to jak u štíhlých jedinců, tak u osob s obezitou, ale je sekrečně nepoměrně aktivnější než podkožní tuková tkáň [147, 169]. Navíc, i jiné orgány (imunokompetentní buňky, játra...) mohou přispívat ke zvýšeným hladinám některých prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF- α nebo IL-6.

3.6.1 Potenciálně prospěšné adipokiny

3.6.1.1 Leptin

Leptin (od řeckého slova *leptos* – štíhlý) je 16-kDa hormon tvořený adipocyty a prakticky se nevyskytující ve stromální vaskulární frakci tukové tkáně. Původně se předpokládalo, že leptin představuje hlavní signál působící na mozek za účelem inhibice příjmu potravy a snížení tělesné hmotnosti [115]. Uvedená koncepce byla částečně odvozena z pozorování, že nedostatek funkčního leptinového proteinu byl u lidí i pokusných zvířat provázen enormní hyperfágií a až monstrózní obezitou. Přívod exogenního leptinu navíc vedl k normalizaci tohoto stavu. Funkce leptinu jako antiobezitického hormonu však byla zpochybněna dalšími nálezy, které prokázaly, že běžný typ obezity je naopak spjat s vysokými hladinami leptinu a rezistencí na jeho účinky [170]. Na druhou stranu některé neuroendokrinní abnormality (jako např. infertilita) a poruchy imunitních funkcí pozorované u leptin-deficitních myší poukazovaly na jistou analogii se změnami vyvolanými hladověním. Tyto změny podmíněné nedostatečným přísunem potravy se zmírnily exogenním přívodem leptinu. Proto se v současnosti leptin pokládá za hormon odpovědný spíše za signalizaci energetického stavu organismu (obzvláště za podmínek malnutrice) než za podnět určený k přímé aktivaci procesů vedoucích k hmotnostní redukci [171, 172].

Systémové hladiny leptinu pozitivně korelují s množstvím tělesného tuku, ale zároveň odrážejí i akutní změny nutričního stavu, jelikož již krátce po zahájení hladovění dochází k poklesu jejich hodnot [173]. Sekrece leptinu závisí také na typu tukového depa a je vyšší v podkožním než viscerálním tuku [174].

Leptin účinkuje jednak centrálně (např. v hypothalamu, mozkové kůře nebo limbickém systému) a jednak na periférii (v pankreatu, játrech, imunitních buňkách a jinde).

Centrální účinky leptinu, obzvláště v hypothalamu, hrají důležitou roli v udržení energetické homeostázy a při správné funkci reprodukčních orgánů [171]. Na druhou stranu nevedla porucha periferní leptinové signalizace u myši k žádným významným metabolickým abnormalitám [175].

Leptin je z periferie transportován do mozku, kde v hypothalamu po navázání na svůj receptor (lept receptor b) aktivuje systém JAK-STAT3, což vede k inhibici tvorby orexigenních (podporujících chuť k jídlu) peptidů (např. neuropeptid Y a AGRP – agouti-related protein) a zvýšení produkce anorexigenně působících proteinů (např. proopiomelankortin). Výsledkem je snížená chuť k jídlu a omezení příjmu potravy [170]. Vznik leptinové rezistence, typické pro prostou obezitu, je připisován jednak snížení transportu leptinu přes hematoencefalickou bariéru, jednak zvýšeným hladinám SOCS3 v hypothalamu a zvýšené úrovni stresu endoplazmatického retikula, které inhibují leptinové signální dráhy [176-178]. Obdobně i pokles hladin leptinu spojený s hladověním vyvolává výrazné změny v energetickém metabolismu a hormonálním spektru. Nízké koncentrace leptinu vedou k nadměrnému příjmu potravy, inhibici energetického výdeje, snížení hladin tyreoidálních a pohlavních hormonů a poklesu imunity [170]. Ukazuje se, že tento pokles sérového leptinu, který by jinak mohl predisponovat jedince podstupující redukci tělesné hmotnosti k jejímu opětovnému rychlému nabytí, přetrvává jen v čase hubnutí a po jeho ukončení se hladiny leptinu vracejí na hodnoty před redukcí. Uvedená fakta poukazují na to, že pro hmotnostní redukci je podstatnější spíše relativní nedostatek leptinu než jeho absolutní pokles [179]. V poslední době se také prokázalo, že leptin kromě hypothalamu působí i v dalších strukturách CNS spojených s kognitivní a emoční regulací příjmu potravy, jako jsou mozková kůra nebo limbický systém [179, 180].

V periferních tkáních stimuluje leptin oxidaci VMK [181, 182] a vychytávání glukózy [183, 184] a brání ektopické akumulaci lipidů vedoucí k poškození metabolických a signálních drah [185, 186]. Tyto metabolické aktivity leptinu jsou částečně zprostředkovány centrálně přes hypothalamo-sympatiko-adrenální osu [181, 187]. Mnohé z metabolických efektů leptinu se odehrávají příliš rychle na to, aby mohly být připsány jenom indukcí transkripčních změn. Spíše se u nich jedná o aktivaci intracelulární signalizaci přes AMP-aktivovanou proteinkinázu (AMPK) [185]. U pacientů

s lipodystrofií nebo leptinovým deficitem vede podávání leptinu ke snížení inzulínové rezistence, hypertriglyceridémie a jaterní steatózy [188]. U prosté obezity může zase leptinová rezistence vést ke zvýšenému ektopickému ukládání lipidů mající za následek naopak zhoršení inzulínové senzitivity [189].

Substituce leptinem má u vrozené aleptinémie za následek omezení hyperfagie, redukci hmotnosti, úpravu hypogonadismu a změny v T lymfocyty-zprostředkovaných imunitních reakcích [180, 190]. Pozitivní efekt exogenního přívodu leptinu se projevuje i u stavů spojených s jeho částečným deficitem, jako jsou vrozená a získaná lipodystrofie, hypothalamická amenorrhea nebo mentální anorexie [188, 191, 192]. V klinických studiích na pacientech s běžnými formami obezity však byl zaznamenán jen minimální efekt podávání leptinu na snížení tělesné hmotnosti. Recentně se ale ukázalo, že současné podávání leptinu s látkami, zvyšujícími senzitivitu tkání na jeho účinky, jako jsou amylin nebo chaperony snižující stres endoplazmatického retikula, byla spojena se zlepšením leptinové senzitivity v hypothalamu a vedla k redukci hmotnosti u laboratorních zvířat i lidí [178, 193].

3.6.1.2 Adiponektin

Adiponektin je 30 kDa protein produkovaný podobně jako leptin zralými adipocyty bílé tukové tkáně [194-196]. V krevním řečišti se nachází ve 3 formách – jako trimer, hexamer a vysokomolekulární (HMW) 12- až 18-mer [197]. Na rozdíl od většiny ostatních adipokinů korelují systémové koncentrace adiponektinu s BMI negativně [198, 199] a jsou snižené u jedinců s obezitou, diabetes mellitus 2. typu nebo kardiovaskulárními onemocněními [200]. Příčinou snížené produkce adiponektinu může být hormonální dysregulace [196, 201], oxidační stres [202] nebo prozánětlivý stav [203] typický pro obezitu a metabolický syndrom.

Hlavní receptory pro adiponektin *in vivo* označované jako AdipoR1 a R2 se skládají ze 7 transmembránových domén, ale jejich struktura i funkce se odlišuje od klasických receptorů spojených s G proteiny. AdipoR1 je zvýšeně exprimován v kosterních svalech, zatímco AdipoR2 se vyskytuje i v játrech [204]. AdipoR1 je spjat hlavně s aktivací signální dráhy AMPK, která reguluje inhibici glukoneogenezy a zvyšuje oxidaci VMK.

AdipoR2 se spíše uplatňuje při aktivaci procesů spojených s receptory PPAR- α , které stimulují energetický výdej zvýšením oxidace VMK a snižují oxidační stres a celkový i lokální zánět [205, 206]. Adiponektin vykazuje podobné účinky na inzulínovou senzitivitu a redukci tělesného tuku jako leptin, ale navíc působí i protizánětlivě a redukuje aterosklerózu a oxidační stres, čímž simultánně zlepšuje většinu hlavních komponent metabolického syndromu [167].

Exogenní přívod rekombinantního adiponektinu stejně jako jeho nadměrná endogenní exprese u transgenních myší vedly k výraznému zvýšení inzulínové senzitivity [197], zatímco u myší s knockoutem genu pro adiponektin [207, 208] nebo pro oba jeho receptory [206] došlo k rychlému rozvoji inzulínové rezistence. Hlavní příčinou uvedených efektů je redukce jaterní glukoneogenezy a zvýšení transportu glukózy do svalů zprostředkované aktivací AMPK [197]. Adiponektin také stimuluje energetický výdej a oxidaci VMK v játrech i svalectech a snižuje množství triglyceridů ve tkáních, čímž dále zvyšuje inzulínovou senzitivitu [197]. Transgenní myší s nadprodukcí adiponektinu vykazují výrazně zlepšený lipidový profil [209, 210], pravděpodobně v důsledku zvýšeného katabolismu VLDL v kosterních svalectech [211]. Adiponektin rovněž redukuje expresi TNF- α a lokální zánět v tukové tkáni, čímž také přispívá ke zlepšení citlivosti k inzulínu [209, 212].

Prospektivní studie u lidí prokázaly, že plazmatické koncentrace adiponektinu pozitivně korelují se sníženým rizikem vzniku diabetes mellitus 2. typu [213, 214]. Další práce ukázaly, že spíše než celkový adiponektin je za pozitivní metabolické účinky včetně zlepšení inzulínové rezistence, snížení množství viscerálního tuku, zvýšení oxidace lipidů a zlepšený lipidogram odpovědná jeho HMW frakce [215, 216]. Je též známo, že perorální antidiabetika ze skupiny glitazonů, zvyšují nejvíce právě hladiny HMW adiponektinu, což může alespoň částečně vysvětlovat jejich inzulín-senzitizující účinky [217].

Studie na transgenních myších prokázaly, že adiponektin zvýšeně exprimován v bílé tukové tkáni má anti-adipogenní účinky, a to jednak v důsledku zvýšeného energetického výdeje a jednak díky změnám v diferenciaci adipocytů [209]. Teoreticky může inhibice vzniku plně zralého adipocytárního fenotypu snížit míru relapsů spojených s redukcí hmotnosti klasickou cestou přes omezení energetického příjmu. Snížení tukové masy u

zvířat nadměrně exprimujících nativní adiponektin navíc bránilo vzniku předčasné smrti vyvolané vysokotukovou dietou a to pravděpodobně snížením oxidačního stresu [210]. Částečný nedostatek adiponektinu vedl naopak k mírnému zvýšení obsahu tuku v organismu [209]. Spornou zatím zůstává možnost působení adiponektinu i na centrální struktury, jelikož výsledky dosavadních studií zabývajících se vlivem adiponektinu na příjem potravy se ukazují být značně inkonzistentní [171, 218, 219]

Adiponektin hraje významnou roli také při prevenci rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. U pacientů s angiograficky prokázaným postižením koronárního řečiště bylo zjištěno snížení hladiny sérového adiponektinu [200]. U obézních dětí byl deficit adiponektinu asociován se vznikem časně aterosklerózy, přičemž toto spojení bylo silnější než tomu bylo u tradičních kardiovaskulárních rizikových faktorů [220]. V rozsáhlé prospektivní studii kombinované s metaanalýzou předchozích prospektivních prací provedené Sattarem a kol. v roce 2006 však bylo snížení bazálních hladin adiponektinu spíše slabším prediktorem kardiovaskulárního rizika [221], zatímco v jiné studii se ukazovalo jako silný prediktor vzniku diabetes mellitus 2. typu [214].

Adiponektin vykazuje přímé pozitivní účinky na všechny fáze aterosklerotického procesu. ApoE-deficientní transgenní myši s nadměrnou expresí adiponektinu byly chráněny před rozvojem aterosklerózy [222], zatímco u zvířat s knock-outem genu pro adiponektin docházelo ke zrychlené proliferaci neointimální vrstvy po poškození stěny arterií [200, 207]. Molekulární mechanismy antiaterosklerotického účinku adiponektinu zahrnují:

- sníženou expresi adhezivních molekul na endoteliálních buňkách [223-226]
- supresi proliferace a migrace buněk hladké svaloviny v cévní stěně [227]
- inhibici transformace makrofágů na pěnové buňky [222, 228]
- antioxidační a protizánětlivé působení.

Dále se ukazuje, že hypoadiponektinemie pravděpodobně hraje roli i v patofyziologii arteriální hypertenze [229]. Zvířata s deficitem adiponektinu krmená dietou s vysokým obsahem soli měla signifikantně vyšší hodnoty systolického krevního tlaku než kontrolní subjekty [230]. Klinické studie navíc prokázaly, že adiponektin představuje nezávislý rizikový faktor rozvoje arteriální hypertenze bez ohledu na jeho antidiabetické a inzulín-senzitizující účinky [231, 232].

Jedním z hlavních mechanismů odpovědných za pozitivní metabolické a antiaterosklerotické účinky adiponektinu může být jeho vliv na potlačení zánětu a oxidačního stresu [200]. V endoteliálních buňkách adiponektin inhibuje aktivaci NF- κ B vyvolanou TNF- α [224, 226, 233]. Oba působky zároveň negativně ovlivňují vzájemnou produkci v tukové tkáni, což naznačuje, že snížená tvorba adiponektinu u obezity může vést ke zvýšení lokálního zánětu v tuku a tím k dalšímu poklesu jeho syntézy [208], čímž vzniká typický bludný kruh patologické auto- a parakrinní deregulace [234]. Dále bylo prokázáno, že adiponektin snižuje tvorbu superoxidových radikálů v endoteliálních buňkách vystavených působení oxidovaného LDL nebo vysokých koncentrací glukózy [223, 235], zatímco oxidační stres vede k poklesu jeho produkce [202]. Na rozdíl od tukové tkáně dochází ve svalech pod vlivem metabolického nebo oxidačního stresu ke zvýšení tvorby adiponektinu, což může představovat lokální ochranný mechanismus působící proti oxidačnímu a zánětlivému poškození a vzniku svalové inzulínové rezistence [236, 237].

Hypoadiponektinemie se typicky vyskytuje i u dalších nemocí asociovaných s metabolickým syndromem jako např. nealkoholická steatohepatitida (NASH – non-alcoholic steatohepatitis) [238]. Ochranné účinky adiponektinu proti rozvoji NASH mohou být podmíněny stimulací oxidace VMK, inhibicí *de novo* lipogenezy nebo jeho protizánětlivými účinky a snížením tvorby vaziva [239]. Obezita je navíc spojena se zvýšeným rizikem vzniku nádorových onemocnění [240-242]. Adiponektin může působit antionkogeně jednak nepřímo snižováním inzulínové rezistence a jednak přímým antiproliferativním působením na nádorové buňky [243]. Hypoadiponektinemie se proto dá považovat také za rizikový faktor pro vznik nádorového bujnění [244].

Souhrnně možno konstatovat, že adiponektin svými pozitivními účinky na inzulínovou senzitivitu, lipidový metabolismus, subklinický zánět, oxidační stres a vznik aterosklerózy působí proti rozvoji všech hlavních komponent metabolického syndromu a jeho eventuální agonisté mohou najít široké uplatnění v léčbě všech komorbidit asociovaných s obezitou a diabetes mellitus 2. typu.

3.6.1.3 Visfatin

Visfatin, protein exprimovaný v mnoha tkáních, byl pro svou úlohu v diferenciaci B lymfocytů původně označován jako PBEF (pre-B-cell colony-enhancing factor – faktor podporující kolonie pre-B lymfocytů) [245]. Později se ukázalo, že tento faktor vykazuje účinky podobné inzulínu a je nejvíce exprimován ve viscerální tukové tkáni, od čehož je odvozen i jeho současný název [246]. Další studie u lidí však nepotvrdily signifikantní rozdíly v expresi visfatinu mezi jednotlivými tukovými depy [247, 248]. Několik prací prokázalo možný vztah mezi sérovými hladinami visfatinu a vybranými antropometrickými a metabolickými parametry u obezity a diabetes mellitus 2. typu, zatímco jiní autoři uvedenou asociaci nepotvrdili, což mohlo být alespoň částečně důsledkem značných rozdílů v použité metodice stanovování visfatinu [249-251].

Původně slibně vypadající inzulínu-podobné účinky visfatinu nebyly dále potvrzeny ani *in vitro* ani *in vivo* [252] a výsledky původní práce byly autory částečně odvolány [253]. Ukázalo se však, že visfatin se významnou měrou podílí na syntéze NAD (nikotinamid dinukleotid), který má zásadní význam pro správnou funkci pankreatických β -buněk [252]. Zjistilo se totiž, že visfatin je totožný s enzymem nikotinamid fosforibozyltransferáza (Nampt), což je klíčový regulační enzym ve tvorbě NAD odpovědný za proměnu nikotinamidu na prekurzor NAD nikotinamid mononukleotid (NMN) [252]. V β -buňkách pankreatu vede indukce tvorby NAD pomocí Nampt (visfatinu) ke zvýšení glukózou-stimulované inzulínové sekrece prostřednictvím aktivace sirtuinu-1 (Sirt-1), což je NAD-dependentní deacetyláza. Myši s částečným deficitem Nampt (Nampt^{+/-}) se vyznačovaly porušenou glukózovou tolerancí v důsledku nedostatečné sekrece inzulínu, přičemž tento stav se upravil po podání NMN [252]. Intenzita Nampt indukované syntézy NAD klesá s věkem, což má za následek snížení aktivity Sirt-1 a může přispívat k redukci funkce β -buněk spojeného se stárnutím organismu [251].

Další výsledky poukazují na to, že visfatin nezávisle na své enzymatické aktivitě může působit i jako prozánětlivý cytokin podílející se na regulaci imunitní odpovědi a hrající roli v patogeneze různých složek metabolického syndromu jako jsou ateroskleróza a kardiovaskulární nemoci [249].

3.6.2 Prozánětlivé adipocytokiny

3.6.2.1 Tumor nekrotizující factor α (Tumor necrosis factor α – TNF- α)

Cirkulující hladiny TNF- α jsou zvýšeny u obézních jedinců a klesají po redukcii hmotnosti [254]. Exprese TNF- α je zároveň zvýšena v tukové tkáni obézních jedinců [255]. TNF- α je více exprimován ve viscerálním než podkožním tuku a to hlavně buňkami stromální vaskulární frakce, především makrofágy [255, 256]. Většina účinků TNF- α v tukové tkáni je zprostředkována podtypem 1 receptoru pro TNF- α (TNFR1 - TNF- α receptor 1 subtype) s následnou aktivací různých signálních drah [257]. Dvě z těchto drah přímo spojují zánětlivý stav s obezitou a inzulínovou rezistencí, a to dráha NF- κ B a dráha c-Jun N-terminální kinázy (JNK). Tyto dráhy jsou aktivovány podobnými stimuly včetně různých cytokinů, jejichž tvorba je zároveň uvedenými drahami dále regulována [258].

V první studii z roku 1993, která prokázala zvýšení hladin TNF- α u obézních potkanů, se navíc zjistilo, že jeho neutralizace vede k signifikantnímu nárůstu inzulínem-stimulovaného vychytávání glukózy, což poukázalo na významnou roli TNF- α v patogeneze inzulínové rezistence a diabetes mellitus 2. typu spojených s obezitou [259]. Molekulární mechanismy odpovědné za tento efekt zahrnují fosforylaci IRS-1 (insulin receptor substrate 1 – substrát 1 inzulínového receptoru) na serinových zbytcích zprostředkovanou JNK, což zabraňuje standardní fosforylaci na tyrozinových řetězcích nutnou pro další přenos inzulínové signalizace z IRS-1 [258, 260]. I když u pokusných zvířat je úloha TNF- α jako pojítka mezi subklinickým zánětem a inzulínovou rezistencí jednoznačně potvrzena, existence takového spojení u lidí je zatím předmětem intenzivních diskusí. U zdravých jedinců vedla krátkodobá infuze TNF- α k inhibici inzulínem zprostředkovaného vychytávání glukózy [261]. Avšak několik studií zabývajících se vlivem neutralizace TNF- α na inzulínovou rezistenci *in vivo* přineslo negativní výsledky, co mohlo být částečně důsledkem jejich malé statistické síly [262-265]. Na druhou stranu použití anti-TNF- α léků u pacientů s chronickými zánětlivými onemocněními jako např. revmatoidní artritida nebo ankylozující spondylitida bylo spojeno se zlepšením parametrů inzulínové rezistence [266-269].

Nadprodukce TNF- α může také představovat mechanismus, jehož úkolem je bránit nadměrnému ukládání tuku v organismu. Tím, že zvyšují lipolýzu a inzulínovou rezistenci, brání diferenciaci preadipocytů a podporují apoptózu adipocytů, mohou zvýšené hladiny TNF- α omezovat další hmotnostní přírůstky, avšak za cenu zhoršení inzulínové senzitivity a aktivace zánětlivých reakcí [270].

Plazmatické koncentrace TNF- α pozitivně korelovaly se stupněm rozvoje včasné aterosklerózy u zdravé mužské populace středního věku [271] a naopak vyřazení genu pro TNF- α vedlo u laboratorních myší s deficitem ApoE ke zmírnění vzniku aterosklerotických změn [272]. Proaterogenní role TNF- α pravděpodobně souvisí se zvýšením exprese adhezivních molekul (ICAM-1 – intracellular adhesion molecule 1 a VCAM – vascular cell adhesion molecule 1) a chemokinů MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) na cévní stěně a s indukcí exprese scavengerových receptorů skupiny A a zvýšeným vychytáváním oxidovaných LDL částic v makrofázích [272].

Kromě zvýšené tvorby prozánětlivých cytokinů [255, 273] vede TNF- α i ke snížení produkce protizánětlivých faktorů, jako např. adiponektinu [203, 274]. Kultivace lidských omentálních adipocytů v mediu obsahujícím výtěžek ze stroma-vaskulární frakce tukové tkáně v nich vedla k nadměrné produkci prozánětlivých adipocytokinů. Neutralizace TNF- α v mediu měla za následek ztrátu tohoto efektu, což poukazuje na stěžejní roli TNF- α při vzniku prozánětlivého fenotypu v adipocytech obézních jedinců [255].

3.6.2.2 Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 je cytokin produkovaných v mnoha buňkách a tkáních, jako jsou fibroblasty, endoteliální buňky, monocyty, adipocyty aj. [275]. Tuková tkáň přispívá k systémovým koncentracím IL-6 z 15-35% [276]. U obezity dochází ke zvýšení jak sérových hladin IL-6, tak jeho tvorby v tukové tkáni [275]. *In vitro* uvolňuje viscerální tuková tkáň 2-3-krát více IL-6 než tkáň subkutánní, přičemž jeho hlavním zdrojem jsou buňky stroma-vaskulární frakce [277].

Podobně jako TNF- α se i IL-6 podílí na vzniku inzulínové rezistence a prozánětlivého stavu. Receptor pro IL-6 patří do kategorie I cytokinových receptorů, které

k intracelulárnímu přenosu signálu využívají Janus kinázy (JAK) [275]. U myši krmených vysokotukovou dietou vedla zvýšená produkce IL-6 tukovou tkání ke vzniku inzulínové rezistence v játrech [260]. Tento mechanismus může být alespoň z části zprostředkován zvýšenou expresí proteinu SOCS-3 (supresor cytokinové signalizace 3 – supresor of cytokine signalling 3), který svou vazbou na inzulínový receptor inhibuje jeho funkci a taktéž vyvolává proteozomální degradaci IRS-1 [260]. Další práce prokázaly, že sérové hladiny IL-6, na rozdíl do TNF- α , leptinu nebo MCP-1, dosahovaly v portální žíle asi o 50% větší koncentrace než v a. radialis a zároveň přímo korelovaly s hodnotami CRP [150]. Uvedené údaje svědčí o významu viscerální tukové tkáně pro produkci IL-6 a zároveň vytvářejí spojení mezi viscerálním tukem, inzulínovou rezistencí, zánětem a jaterní produkcí reaktantů akutní fáze [150]. Na druhou stranu výsledky řady studií provedených na zvířecích modelech i lidech prokázaly, že akutní infuze IL-6 zvyšuje inzulínovou senzitivitu v kosterních svalech [278]. Při cvičení, které je obecně spojeno se zlepšením inzulínové senzitivity ve svalové tkáni, dochází k dramatickému nárůstu lokální i systémové hladiny IL-6, což naznačuje, že v kosterním svalstvu může IL-6 vykazovat protizánětlivé účinky. Tyto protichůdné účinky IL-6 by se alespoň částečně daly vysvětlit tím, že chronické zvýšení IL-6 na rozdíl od jeho akutního vzrůstu nemá prakticky žádný vliv na svalovou tkáň, ale zároveň přispívá ke vzniku inzulínové rezistence v játrech a tukové tkáni [275].

3.7 Vznik zánětu v tukové tkáni

Jak již bylo uvedeno dříve, za hlavní mechanismus vzniku zánětlivých změn v tukové tkáni obézních je v současnosti považována její infiltrace makrofágy (označovanými jako ATM – adipose tissue macrophages). První důkazy o propojení obezity a zvýšeného počtu makrofágů v tukové tkáni se objevily v roce 2003 [7, 279]. Od té doby bylo vztah mezi počtem ATM a adipozitou zkoumán u řady zvířecích modelů obezity charakterizovaných zvýšenou expresí prozánětlivých genů (TNF- α , IL-6 aj.) v makrofázích. Četné studie také potvrdily zvýšenou akumulaci makrofágů v tukové tkáni i u obézních lidí [280-282], obzvláště ve viscerálním depu (hlavně omentálním), přičemž tento jev se ještě zvýrazňoval při abdominálním typu obezity [283-286].

Infiltrace tuku makrofágy u lidí korelovala pozitivně s BMI i velikostí adipocytů [279] a chirurgicky navozená redukce hmotnosti vedla ke snížení obsahu ATM [287]. Množství makrofágů navíc pozitivně korelovalo s expresí TNF- α , iNOS (inducibilní syntáza oxidu dusnatého – inducible nitric oxid synthase), I κ B kinázy (IKK β) nebo monocyty atrahujícího faktoru 1 (MCP-1) ve stroma-vaskulární frakci tukové tkáně, tedy s faktory asociovanými se vznikem inzulinové rezistence [111, 288-290]. Zároveň byl prokázán i přímý vztah mezi makrofágy tukové tkáně a metabolickými, vaskulárními a jinými poruchami spojenými s obezitou, jako je endotelová dysfunkce [280] nebo nealkoholická steatohepatitida [285].

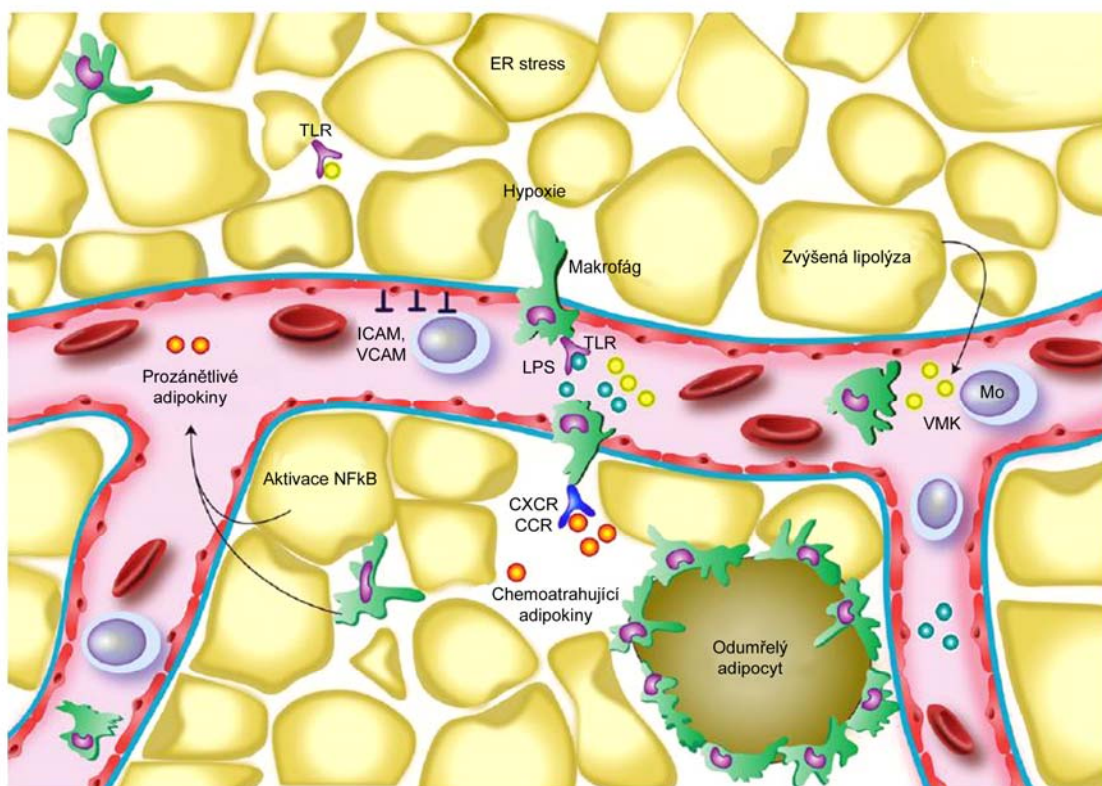
3.8 Makrofágy a tuková tkáň

Už první studie v roce 2003 prokázaly, že makrofágy v obézní tukové tkáni pocházejí převážně ze zdrojů mimo samotnou tkáň, obzvláště z kostní dřeně [279]. Při transplantačních studiích, kde byla zvířatům s makrofágovým antigenem CD45.2 implantována kostní dřeň s antigenem CD45.1, bylo zjištěno, že kolem 85% tukových makrofágů pochází z této transplantované tkáně a jen 15% pochází z organismu podstupujícího transplantaci [279]. I přesto se zdá, že malá část ATM může vznikat i konverzí z preadipocytů z vlastní tukové tkáně. Nejméně 2 studie prokázaly, že aktivované preadipocyty se některými funkčními a antigenními charakteristikami podobají makrofágům [7, 162]. Dále se ukázalo, že preadipocyty po vstříknutí do peritoneální dutiny myši získávají signifikantní fagocytární aktivitu a k podobné proměně dochází i *in vitro* po vytvoření mezibuněčných kontaktů mezi preadipocyty a peritoneálními makrofágy [162]. Preadipocyty navíc exprimují nejméně 5 markerů charakteristických pro makrofágy: F4/80, Mac-1, CD80, CD86 a CD45. Tyto preadipocyty s charakteristikami podobnými makrofágům by proto mohly představovat jedny z prvních buněčných iniciátorů zánětu v tukové tkáni, přestože uvedena hypotéza vyžaduje jednoznačné potvrzení dalšími experimentálními i *in vivo* studiemi.

Samotný proces vstupu makrofágů do tukové tkáně není zatím plně pochopen. Předpokládané mechanismy a stimuly zahrnují celou řadu možností, včetně hypertrofie a apoptózy adipocytů, tkáňové hypoxie, zvýšené sekrece vybraných adipokinů a

chemokinů, aktivace specifických receptorů prostřednictvím volných mastných kyselin, stres endoplazmatického retikula a působení dalších imunokompetentních buněk (Obrázek 4).

Obrázek 4: Mechanizmy podílející se na infiltraci makrofágů do tukové tkáně (CCR – CC chemokinový receptor, CXCR – CXC chemokinový receptor, ER stress – stres endoplazmatického retikula, ICAM – intracelulární adhezivní molekula, LPS – lipopolysacharid, Mo – monocyt, NFκB – nukleární faktor κB, TLR – toll-like receptor, VCAM – vaskulární celulózní adhezivní molekula, VMK – volné mastné kyseliny). Upraveno podle *Maury et Brichard, 2010*.



Celý proces infiltrace makrofágů je možné schematicky rozdělit do 3 základních fází [291]:

1. Iniciace vstupu makrofágů do tukové tkáně, kde hlavní roli hrají adipocyty a pravděpodobně i preadipocyty a některé další imunokompetentní buňky (lymfocyty, neutrofily)
2. Propagace vstupu makrofágů, která je již z větší části podmíněná přímo makrofágy a jejich produkty, hlavně chemokiny

3. Remodelace tukové tkáně jako důsledek infiltrace makrofágy a dalších změn souvisejících s expanzí obézní tukové tkáně (odumírání adipocytů, změny ve vaskularizaci aj.)

Všechny zmiňované procesy však s největší pravděpodobností probíhají téměř současně a navzájem se prolínají, proto v praxi není možné jednotlivé fáze od sebe jednoznačně odlišit. Uvedené dělení slouží proto hlavně k lepšímu pochopení souvislostí mezi jednotlivými mechanismy podílejícími se na vzniku a rozvoji zánětlivé reakce v tukové tkáni obézních jedinců.

3.8.1 Iniclace infiltrace tukové tkáně makrofágy

3.8.1.1 Hypertrofie a odumírání adipocytů

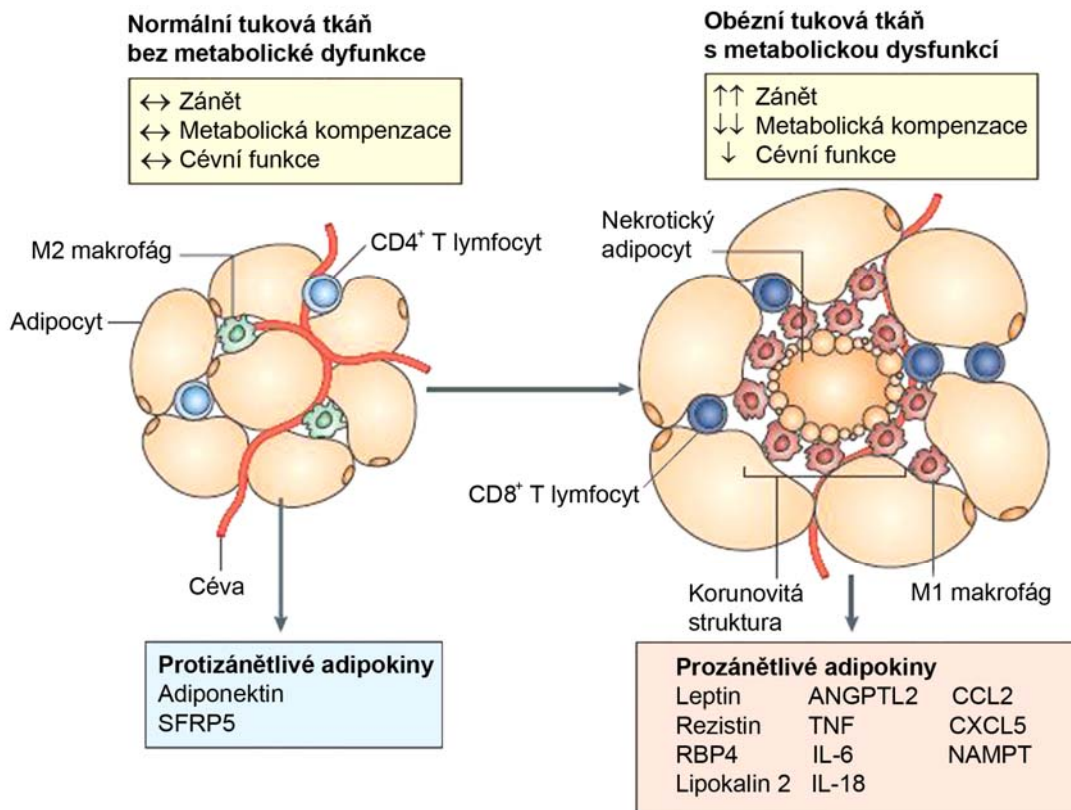
Na expanzi tukové tkáně se podílí jak adipocytární hyperplazie tak hypertrofie, i když u dospělých jedinců převažuje zvětšování tukových buněk [131]. Důsledkem adipocytární hypertrofie je dysregulace produkce adipokinů, odumírání tukových buněk a lokální tkáňová hypoxie, což jsou všechno faktory, které mohou vést ke zvýšenému vstupu cirkulujících monocytů z periferní krve či snížení migrace a zároveň další proliferaci tkáňových makrofágů [292-295]. Nedávné výzkumy naznačily, že právě změněná produkce adipokinů v hypertrofovaných adipocytech může být hlavním spouštěčem imunitních reakcí v tukové tkáni a že infiltrace makrofágy probíhá až sekundárně [296]. Rozdělení tukové tkáně získané z obézních myši na adipocytární a stroma-vaskulární frakci ukázalo, že faktory přitahující makrofágy byly exprimovány v adipocytech. Další experimenty zároveň prokázaly, že zvětšení tukové tkáně u těchto jedinců a zvýšení exprese chemoatrahujících faktorů časově předcházely infiltraci tukové tkáně makrofágy [296].

Adipocytární hypertrofie je dále spojena s poruchami v intracelulární signalizaci. V průběhu diferenciaci a hypertrofie adipocytárních buněčných kultur došlo k nárůstu konstitutivní aktivity NF- κ B, což může vést k nadprodukci určitých adipokinů [161]. Omentální adipocyty izolované od obézních jedinců zase nadměrně reagují na stimulaci pomocí TNF- α , což se také může podílet na zvýšené tvorbě adipocytárních faktorů. Tato hypersenzitivita byla zprostředkována hyperaktivací signální dráhy NF- κ B a byla výrazně

zmírněna pomocí inhibitorů NF- κ B [255]. Podobně i *in vivo* podání salsalátu, což je také inhibitor NF- κ B, vedlo u mladých obézních jedinců ke snížení glykémie, zlepšení inzulínové rezistence a zmírnění prozánětlivého stavu [297]. Další porušenou dráhou může být kaskáda JNK [298]. Hypertrofie 3T3-L1 adipocytů *in vitro* působením palmitátu vedla ke zvýšení oxidačního stresu s následným zvýšením tvorby chemoatrahujících látek prostřednictvím JNK a NF- κ B drah [299].

Nárůst velikosti adipocytů byl u obézních myší i lidí spojen s jejich častějším odumíráním v procesu podobném nekróze [300]. Více než 90% všech makrofágů v bílé tukové tkáni obézních jedinců je seskupeno kolem velkých mrtvých nebo odumírajících adipocytů, kde tvoří specifické struktury označované jako crown-like arrangements (korunovitá uspořádání – *Obrázek 5*).

Obrázek 5: Vznik a uspořádání korunovitých struktur v obézní tukové tkáni (ANGPTL2 – angiopoetinu podobný protein 2, CCL2 – CC chemokin 2, CXCL5 – CXC chemokin 5, IL – interleukin, NAMPT – nikotinamidfosforibozyltransferáza, RBP4 – retinol vázající protein 4, SFRP5 – sekreční protein 5 příbuzný frizzled proteinům, TNF – tumor nekrotizující faktor). Upraveno podle *Ouchi et al, 2011*.



Předpokládá se, že tato uspořádání slouží k odstranění buněčného detritu a tukových kapének uvolněných z adipocytů [300, 301]. Uvedené struktury se vyskytují jen u obézních subjektů, a to ve stejné míře v podkožním i ve viscerálním tuku [284]. Podobné nálezy byly pozorovány i u neobézních myší s kongenitálním deficitem hormon-senzitivní lipázy (HSL^{-/-}), které představují model adipocytární hypertrofie bez zvýšeného množství tukové tkáně [300]. Přesné mechanismy, kterými adipocytární hypertrofie aktivuje nekrotické nebo apoptotické dráhy, nejsou zatím známy, i když se zdá, že zahrnují aktivaci stresových reakcí (zejména zvýšený stres endoplazmatického retikula) v důsledku zvýšeného přívodu živin, hlavně mastných kyselin a proteinů [302].

3.8.1.2 Stres endoplazmatického retikula

Zvýšený energetický příjem je spojován také s rozvojem stresu endoplazmatického retikula (ER) [303]. Nadměrný přívod živin u obezity vyvolává prostřednictvím excesivního hromadění lipidů a poruch v energetickém metabolismu stres ER v játrech a tukové tkáni [304]. ER stres aktivuje tzv. unfolded protein response (UPR) kaskádu, která vede k transkripci genů podílejících se na syntéze, tvorbě prostorové struktury, modifikaci a degradaci proteinů s cílem snížit tuto stresovou reakci [305]. Avšak v případě, že delší dobu nedochází ke zmírnění ER stresu, vede UPR až k indukci buněčné smrti [306]. ER stres aktivuje různé transmembránové proteiny včetně proteinkinázy/endoribonukleázy IRE1, která spouští splicing mRNA pro transkripční faktor XBP-1, který kontroluje protektivní odpověď UPR na ER stres. IRE1 také aktivuje signální dráhy IKKB, MAPK p38 a JNK a ústřední prozánětlivou dráhu NF-κB, čímž spouští buněčnou zánětlivou reakci a produkci volných kyslíkových radikálů. Tak vede ER stres indukovaný obezitou k serinové fosforylaci IRS a inhibici inzulínové signalizace [304]. Uvedený koncept podporují údaje u heterozygotních XBP-1^{+/-} myší, u kterých je protektivní mechanismus aktivovaný při ER stresu částečně nefunkční a tyto myší jsou pak obzvláště náchylné ke vzniku inzulínové rezistence [304]. Podávání chemických chaperonů snižujících ER stres vede naopak k obnovení inzulínové senzitivity u obézních myší [307]. Navíc se ukazuje, že ER stres má za následek snížení exprese glukózového transportéru GLUT4 v adipocytech [308]. Vztah mezi chronicky zvýšeným energetickým

příjmem, subklinickým zánětem vyvolaným ER stresem a inzulínovou rezistencí byl potvrzen i v dalších experimentálních i klinických studiích [309-312]. Je proto možné konstatovat, že ER stres aktivací zánětlivých drah přímo interferuje s inzulínovou signální kaskádou a může představovat jeden z prvních mechanismů podílejících se na vzniku IR v tukové i jiných tkáních.

3.8.1.3 Lokální tkáňová hypoxie

Dalším významným faktorem, podílejícím se na iniciaci vstupu makrofágů do tukové tkáně, se ukazuje být lokální tkáňová hypoxie, což bylo prokázáno na nejméně 3 myších modelech obezity (DIO – dietou indukovaná obezita, KK_{Ay} – kombinace KK myši s glukózovou intolerancí a Ay obézní myši, Lep^{ob/ob} – myši s kongenitálním deficitem leptinu) [313, 314]. Tato hypoxie je omezena pouze na tukovou tkáň a není výsledkem hypoxie systémové [315, 316], ale vzniká spíše v důsledku hypoperfuze rychle expandující tukové masy [295]. I když hypertrofované adipocyty mohou mít větší rozměry než je normální difúzní vzdálenost kyslíku ve tkáních [313], přítomnost hypoxie byla (pomocí značení pimonidazolem) zjištěna jak v malých tak i velkých adipocytech získaných z obézních laboratorních zvířat [316]. Proto se zdá, že hlavním důvodem vzniku místní hypoxie v obézní tukové tkáni bude spíše než velikost adipocytů snížení krevního průtoku na jednotku tkáně [295, 314, 316-318]. Snížení rychlosti krevního toku bylo nejvýrazněji viditelné v kapilárách obsahujících adherující leukocyty a shluky krevních destiček, což poukazuje na významnou roli vystupňované vzájemné interakce mezi leukocyty a endotelem v uvedených procesech. Tyto interakce byly u obézních myši přítomné ve viscerální, nikoliv však v podkožní tukové tkáni [295].

Lokální hypoxie byla prokázána tukové tkáni pacientů s obezitou, přičemž byl snížen jednak parciální tlak kyslíku a jednak krevní průtok [318, 319]. V podkožním tuku obézních jedinců dochází navíc ke zvýšené expresi tzv. hypoxií-indukovaného faktoru 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α - HIF1 α), který je považován za hlavní regulátor kyslíkové homeostázy ve tkáních [287]. HIF1 α působí jako transkripční faktor a zvyšuje expresi řady genů podílejících se na procesech erythropoezy, angiogenezy a glykolýzy [320].

Kauzální souvislost mezi tkáňovou hypoxií a změnami v produkci adipokinů byla potvrzena v *in vitro* studiích. V různých modelech adipocytárních tkáňových kultur došlo působením hypoxie ke snížení mRNA exprese adiponektinu a zvýšení exprese prozánětlivých faktorů (TNF- α , IL-1, IL-6, PAI-1, MCP-1, TGF- β) a dalších genů (HIF-1 α , glukózový transportér 1, VEGF) [315, 316, 321]. Hypoxie indukovala expresi prozánětlivých genů i v makrofágových kulturách [315] a u obézních myši se makrofágy vyskytovaly více v hypoxických oblastech tukové tkáně [322]. U lidí navíc makrofágové markery negativně korelovaly s parciálním tlakem kyslíku ve tkáních [318]. Molekulární mechanismy podílející se na dysregulaci genové exprese zahrnují pravděpodobně aktivaci NF- κ B a HIF-1 α , zvýšení stresu endoplazmatického retikula a poruchy v posttranskripčních modifikacích proteinů [314, 316]. Lokální hypoxie proto může být jedním z rozhodujících činitelů iniciujících infiltraci makrofágů do tukové tkáně obézních jedinců.

3.8.1.4 Lipotoxicita

Obézní jedinci se vyznačují chronicky zvýšenými plazmatickými hladinami volných mastných kyselin (VMK) v důsledku snížené schopnosti inzulínu inhibovat lipolýzu a zvýšeného přívodu lipidů potravou [323]. Toll-like receptory (TLR) představují skupinu receptorů specializovaných na rozeznávání antigenních vzorů a struktur. Tyto receptory hrají stěžejní roli v reakcích vrozené imunity tím, že v odpovědi na přítomnost mikrobiálních patogenů aktivují prozánětlivé obranné dráhy. Nejlépe prozkoumaným členem této receptorové skupiny je TLR-4, který představuje vazebné místo pro lipopolysacharidy buněčných stěn Gram-negativních bakterií i pro další, nebakteriální molekuly, jako např. nasycené mastné kyseliny. Aktivace TLR-4 vede k indukci intracelulárních zánětlivých drah souvisejících také se vznikem inzulínové rezistence, jako jsou dráhy pro JNK nebo NF- κ B [167]. Předpokládá se proto, že TLR-4 může představovat další významné pojítko mezi zvýšeným množstvím lipidů, subklinickým zánětem a inzulínovou rezistencí [324]. Myši s knockoutem genu pro TLR-4 jsou chráněny před vznikem lipidy-indukovaných zánětlivých změn, inzulínové rezistence a obezity [324-326]. Davis a kol. zjistili, že tuková tkáň 10ScN myši, u kterých chybí TLR-

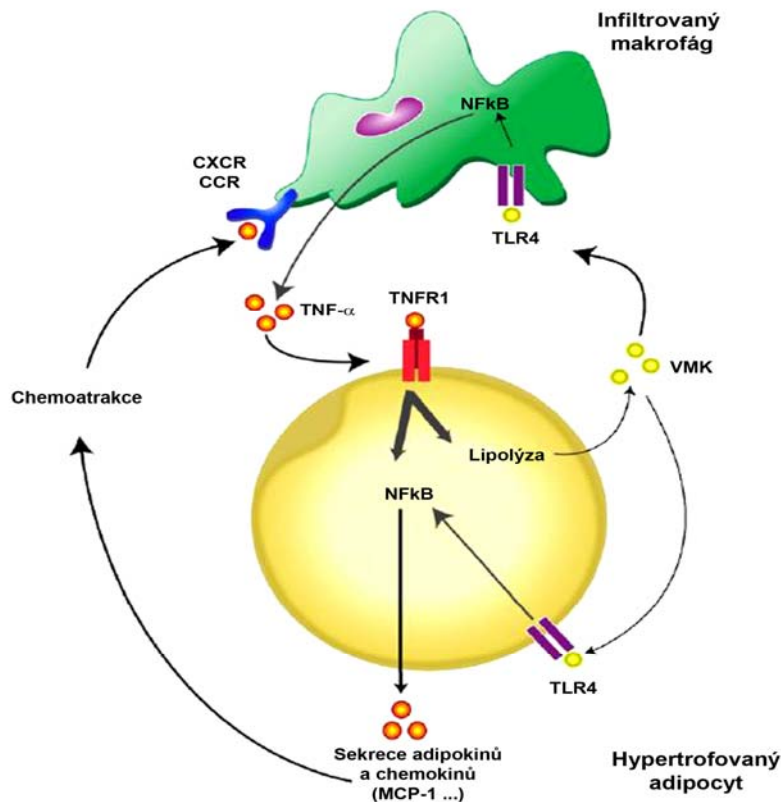
4 receptor, vykazovala po podání diety bohaté na nasycené VMK nižší obsah makrofágů a menší úroveň zánětu než tomu bylo u kontrolních zvířat [327]. Podobné změny byly prokázány i u zvířat, kterým TLR-4 chyběl v kostní dřeni, což naznačuje, že intaktní signalizace přes TLR-4 na hematopoetických buňkách představuje důležitý předpoklad vzniku inzulinové rezistence u obezity [328]. To potvrzuje i fakt, že jejich deficit je spojen se sníženou mírou infiltrace tukové tkáně makrofágy [329]. U obézních myši byla naopak exprese TLR-4 v tukové tkáni signifikantně zvýšena [324]. Exprese funkčního TLR-4 byla potvrzena i v lidské tukové tkáni [281, 330].

Nasycené mastné kyseliny vyvolávají zánětlivé změny přes TLR-4 receptory v obou základních celulárních frakcích tukové tkáně. V primárních adipocytech indukují produkci prozánětlivých adipokinů [324, 331] a zároveň aktivují i makrofágy, obzvláště podtyp CD11c⁺, čímž dále zvyšují jejich zánětlivou aktivitu [290, 324, 332]. Recentní práce Hana a kol. ukázala, že VMK zvyšují prostřednictvím TLR-4 i expresi faktorů atrahujících monocyty, jako je MCP-1 [333]. VMK také představují základní stavební kámen pro glykosfingolipidy a snížený obsah glykosfingolipidů v adipocytech byl spojen s jejich menšími rozměry a sníženou destrukcí, což vede ke zlepšení jejich inzulinové senzitivity a snížení obsahu makrofágů v tukové tkáni [334].

Předpokládá se, že TLR-4 mohou hrát významnou roli ve vzniku bludného kruhu vzájemného parakrinního ovlivňování mezi adipocyty a makrofágy zahrnujícího VMK a TNF- α a vedoucího k progresi zánětlivých změn v tukové tkáni (*Obrázek 6*) [332, 335]. Hypertrofované adipocyty ve zvýšené míře uvolňují nasycené VMK, které prostřednictvím TLR-4 aktivují makrofágy. Ty následně začnou nadměrně produkovat TNF- α , který přes receptor TNFR1 zpětně působí na adipocyty, kde aktivuje dráhu NF- κ B vedoucí ke zvýšení produkce prozánětlivých faktorů a dalšímu nárůstu sekrece VMK [332]. Jak již bylo uvedeno dříve, představuje TNF- α produkováný buňkami stroma-vaskulární frakce izolované z omentálního tuku jeden z hlavních faktorů způsobujících dysregulaci produkce adipokinů v adipocytech [255]. U obézních jedinců by navíc toto parakrinní působení mohlo být potencováno výše zmiňovanou hyperreaktivitou adipocytů na působení TNF- α s následnou nadměrnou aktivací dráhy NF- κ B [255]. VMK mohou prostřednictvím TLR-4 alespoň částečně působit i přímo autokrinně na adipocyty a podporovat tím nadprodukcí zánětlivých mediátorů [296]. Tento autokrinní mechanismus

byl navržen jako jeden z možných spouštěčů lokálního zánětu v tukové tkáni, i když definitivní potvrzení jeho významu v iniciaci prozánětlivé kaskády stále chybí [167].

Obrázek 6: Vzájemná interakce mezi adipocylem a makrofágem prostřednictvím volných mastných kyselin, toll-like receptorů a dalších prozánětlivých působků (CCR – CC chemokinový receptor, CXCR – CXC chemokinový receptor, MCP-1 – monocyty chemoatrahující faktor 1, NFκB – nukleární faktor κB, TLR4 – toll-like receptor 4, TNF-α – tumor nekrotizující faktor α, TNFR1 – receptor 1 pro tumor nekrotizující faktor, VMK – volné mastné kyseliny). Upraveno podle *Maury et Brichard, 2010*.



3.8.1.5 Metabolická endotoxemie

Střevní mikroflóra představuje důležitý faktor ovlivňující získávání živin a energie z přijaté potravy a jejich ukládání v organismu. Ukazuje se například, že na rozdíl od standardních laboratorních myší, majících ve svých střevech symbiotické mikroorganismy, jsou zvířata bez této mikroflóry chráněna před vznikem dietou indukované obezity [336]. Kolonizace štíhlých myší mikroflórou z geneticky obézních zvířat vedla ke zvýšení jejich hmotnosti, zatímco nekolonizovaní kontrolní jedinci nepřibírali ani na obezitogenní dietě [337].

Metabolická endotoxemie (tj. přítomnost lipopolysacharidů buněčné stěny Gram-negativních buněk) by přes aktivaci TLR-4 receptorů mohla být dalším důležitým mechanismem pojícím obezitu, subklinický zánět a inzulínovou rezistenci [338, 339]. Lipopolysacharidy (LPS) se ve střevě kontinuálně uvolňují při odumírání Gram-negativních bakterií a následně jsou absorbovány střevními kapilárami a dále transportovány jako součást chylomikronů, přičemž intenzita tohoto typu transportu roste se zvyšujícím se příjmem tuků v potravě. Bylo prokázáno, že vysokotuková dieta u myší zvyšuje obsah Gram-negativních bakterií ve střevě a také vede ke zvýšení koncentrací plazmatického LPS. Exogenní přívod LPS ve formě infuze nebo injekce měl za následek zvýšení celkové tělesné hmotnosti i množství tělesného tuku, rozvoj inzulínové rezistence a zvýšení exprese prozánětlivých adipokinů v tukové tkáni pokusných zvířat [338, 339]. Podávání antibiotik zase vedlo ke snížení úrovně metabolické endotoxemie a k poklesu přidružených metabolických a prozánětlivých abnormalit [340]. Obdobné výsledky byly zaznamenány i u lidí: u zdravých mužů korelovaly plazmatické hladiny LPS pozitivně s energetickým příjmem [341] a hladina endotoxemie byla prokazatelně vyšší u pacientů s diabetes mellitus 2. typu než u kontrolních subjektů [342]. V jiné studii bylo podávání potravy s vysokým obsahem tuku spojeno se vznikem mírné systémové endotoxemie [343]. Bylo dále prokázáno, že endotoxemie má modulační účinky na produkci prozánětlivých adipokinů a chemotaktických faktorů, jako jsou leptin a MCP-1 a že zvyšuje lokální hypoxii v tukové tkáni [339, 344]. Uvedené údaje naznačují, že střevní mikrobiota pravděpodobně plní důležitou úlohu v indukci chronických zánětlivých změn spojených s metabolickými dysregulacemi.

3.8.1.6 Adipocytokiny a další prozánětlivé faktory

Jak již bylo podrobněji uvedeno výše, je adipocytární hypertrofie spojena se změnami v produkci adipokinů, přičemž tyto změny hrají jednu z rozhodujících rolí při infiltraci tukové tkáně makrofágy. Z klasických adipokinů se jako nejvýznamnější jeví leptin. Leptin může spouštět vstup makrofágů do tukové tkáně působením na endoteliální buňky, kde aktivací drah oxidačního stresu, NF- κ B a ap-1 (activator protein 1 – aktivátorový protein 1) vede ke zvýšené expresi chemokinů a adhezivních molekul [111, 345]. *In vitro*

navíc leptin vykazuje přímé chemoatraktivní účinky na monocyty a makrofágy [346]. Myši s chybějící tvorbou ($Lep^{ob/ob}$) nebo nedostatečným účinkem ($Lep^{db/db}$) leptinu měly sice vyšší infiltraci tukové tkáně makrofágy než kontrolní zvířata, ale míra infiltrace byla nižší než by se vzhledem k jejich tělesné hmotnosti očekávalo [7].

Adiponektin jako nejvýznamnější antiobezitický adipokin na rozdíl od leptinu redukuje expresi adhezivních molekul na endotelu a zároveň inhibuje expresi prozánětlivých faktorů v monocitech a makrofázích [347]. Obézní *ob/ob* leptin-deficitní myši s transgenně zvýšenou expresí adiponektinu jsou i přes výrazné zvýšení množství tukové tkáně chráněny před vznikem inzulinové rezistence [348]. Adipocyty z tukové tkáně těchto myši měly menší rozměry než u kontrolních netransgenních *ob/ob* zvířat, přičemž infiltrace makrofágy a úroveň zánětlivé reakce byly také výrazně sniženy. Zatím však není jasné, jestli uvedené nálezy byly důsledkem přímého účinku adiponektinu na endoteliální buňky nebo makrofágy/monocyty, nebo byly podmíněny celkovým zlepšením metabolického stavu organismu.

Komplementový systém, tvořící jednu ze základních složek imunitních reakcí, se vyskytuje v téměř nezměněné podobě u širokého spektra živočišných druhů. Některé složky komplementu jako C3, faktor B a adipsin byly prokázány i v tukové tkáni. U laboratorních myší, u kterých chyběl receptor pro C3a, došlo k výraznému poklesu infiltrace tukové tkáně makrofágy a tato zvířata byla zároveň rezistentní ke vzniku dietou-indukované obezity, inzulinové rezistence a jaterní steatózy [349]. Uvedené nálezy poukazují na potenciální úlohu komplementového systému při akumulaci makrofágů v tukové tkáni.

3.8.1.7 Aktivace endotelu

Infiltrace imunokompetentních buněk do tkání vyžaduje jejich adhezi na buňky endotelu kapilár s následnou extravazací do okolních tkáňových struktur. Uvedený proces vyžaduje přítomnost adhezivních molekul zprostředkávajících spojení mezi hematopoetickými a endoteliálními buňkami [350]. Cirkulující hladiny solubilních forem hlavních cytoadhezivních molekul, jako jsou ICAM-1 (intracelulární adhezní molekula 1), VCAM-1 (vaskulární celulární adhezní molekula 1) a E-selektin (selektivní pro

endoteliální buňky) jsou zvýšeny u obezity a klesají s redukcí hmotnosti [351-353]. U myši vedla vysokotuková dieta ke zvýšení exprese ICAM-1 již v průběhu 3 týdnů a po 6 měsících korelovala její solubilní frakce pozitivně s tělesnou hmotností a procentem tuku [354]. Endoteliální buňky mohou být aktivovány produkty makrofágů i adipokinů. Inkubace lidských endoteliálních buněk pocházejících z tukové tkáně v médiu obohaceném o výtěžek ze zralých adipocytů vedla ke vzrůstu tvorby endoteliálních adhezivních molekul a zvýšení diapedezy krevních monocytů [111]. Podávání protilátky proti ICAM-1 obézním myším naopak mělo za následek supresi adheze leukocytů k endoteliální stěně, zlepšení funkce endotelu a zvýšení krevního průtoku v epididymální tukové tkáni [295]. Jiná studie sice ukázala, že u zvířat s deficiencí ICAM-1 nebyla infiltrace makrofágů do tukové tkáně zásadně narušena (což mohlo být podmíněno efektem dalších adhezivních faktorů) [355], celkově se však aktivace endotelu pomocí cytoadhezivních molekul jeví jako jedna ze stěžejních podmínek vzniku zánětlivé reakce v tukové tkáni.

3.8.2 Propagace nábory makrofágů do tukové tkáně

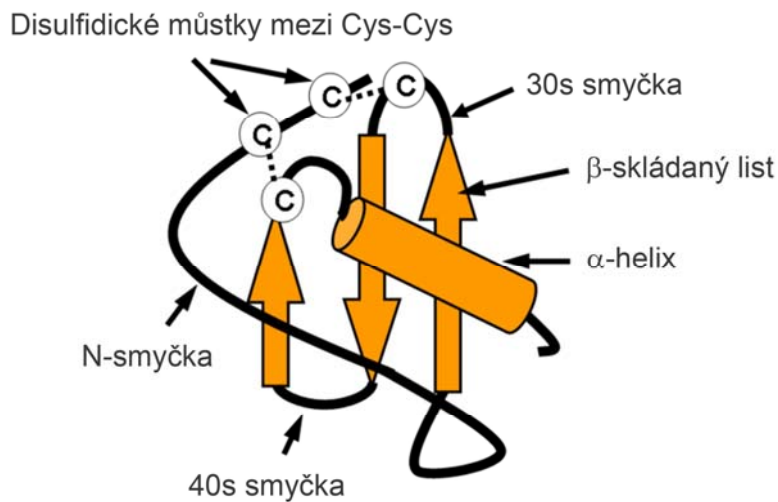
Zatímco výše uvedené procesy představují hlavní kandidátní mechanismy podílející se na iniciaci vstupu makrofágů do tukové tkáně, za další prohlubování těchto reakcí se zdají být odpovědné již samotné tkáňové makrofágy. U laboratorních myši se ukázalo, že množství rezidenčních makrofágů koreluje s celkovým obsahem tuku jen do určitého rozmezí. Po jeho překročení dochází rychle až k 4-násobnému vzrůstu exprese makrofágového markeru F4/80, který již dále nekoreluje s množstvím tělesného tuku. To naznačuje možnost, že k dalšímu pokračování vstupu makrofágů přispívají výrazně i faktory přímo nesouvisející s počtem a velikostí adipocytů [356]. Jako nejzajímavější se v těchto souvislostech jeví různé chemokiny a další látky s chemoatraktivními vlastnostmi, produkované makrofágy i jinými buňkami tukové tkáně.

3.8.2.1 Chemokiny a chemokinové receptory

Chemokiny (chemotaktické cytokiny) jsou malé, cca 8-10 kDa proteiny s chemoatraktivní schopností ve vztahu k různým převážně imunokompetentním buňkám

včetně monocytů, lymfocytů nebo neutro-, eozino- a bazofilů. Podílejí se však i na dalších homeostatických procesech jako je angiogeneza nebo mezibuněčná komunikace [357]. Jejich primární struktura typicky obsahuje (většinou) 4 cysteinové zbytky ve fylogeneticky vysoce konzervovaných lokalizacích, které jsou vzájemnou vazbou pomocí disulfidických můstků (mezi Cys1-Cys3 a Cys2-Cys4) odpovědné za vznik terciární struktury jednotlivých proteinů (Obrázek 7).

Obrázek 7: Třídimenzionální struktura molekuly chemokinu. Upraveno podle Kohidai L, 2006 (en.wikipedia.org).



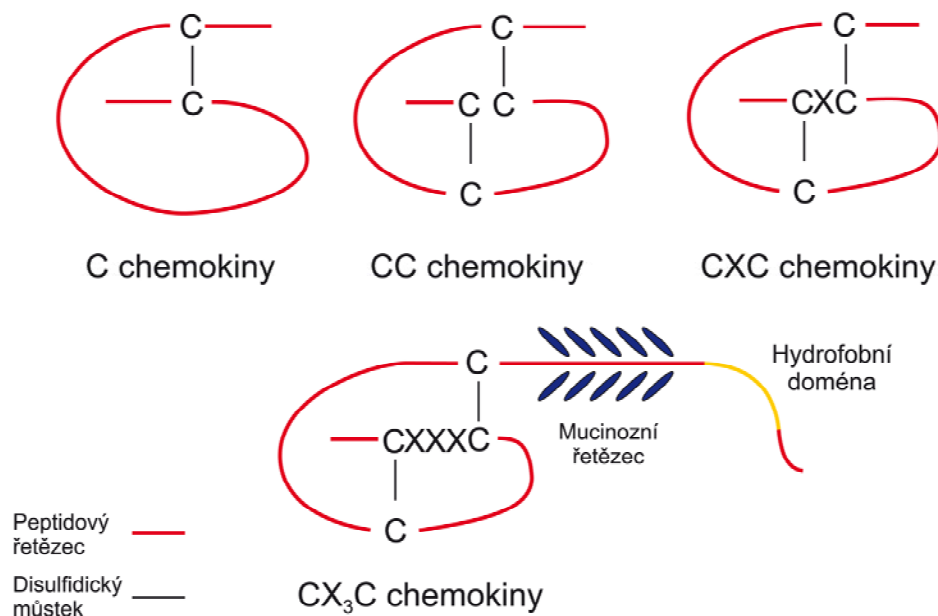
První 2 cysteinové zbytky se nacházejí blízko N-terminálního konce, třetí leží ve středu molekuly a čtvrtý nedaleko C-konce. Na první 2 zbytky navazuje tzv. N-smyčka složená z 10 aminokyselin, po které následuje jednozávitnicová helix (tzv. 3_{10} helix), tři β -skládané listy a N-terminální α -helix. Tyto struktury jsou propojeny smyčkami označovanými jako 30s, 40s a 50s smyčky, přičemž třetí a čtvrtý cysteinový zbytek jsou lokalizovány ve 30s a 50s smyčce (Obrázek 7) [358-360].

Zatím bylo identifikováno přes 50 různých chemokinů, dělících se podle vzájemného postavení prvních 2 cysteinových zbytků do 4 tříd (Obrázek 8) [361, 362]:

- CXC chemokiny (α -chemokiny, CXCL –ligandy obsahující CXC motiv) – dva N-terminální cysteinové zbytky jsou oddělené jednou další aminokyselinou

- CC chemokiny (β -chemokiny, CCL –ligandy obsahující CC motiv) – oba N-terminální cysteiny spolu přímo sousedí
- C chemokiny (γ -chemokiny, XCL –ligandy obsahující XC motiv) – obsahují jenom 2 cysteinové zbytky – jeden na N-konci a druhý dále v průběhu řetězce
- CX₃C chemokiny (δ -chemokiny, CX₃CL – ligandy obsahující CX₃C motiv) – mezi oběma cysteiny se nachází 3 další aminokyselinové zbytky

Obrázek 8: Struktura jednotlivých chemokinových tříd. Upraveno podle Kohidai L, 2006 (en.wikipeida.org).



Označování chemokinů je navíc značně komplikováno existencí dalších nesystémových názvů, odvozených většinou z hlavní nebo první objevené funkce jednotlivých proteinů.

CC chemokiny tvoří s dosud identifikovanými 27 členy nejpočetnější chemokinovou rodinu. Většina CC chemokinů obsahuje 4 cysteinové zbytky, u některých z nich (CCL1, CCL15, CCL21, CCL23, CCL28) se však nachází zbytků 6 [363]. Hlavní úlohou CC chemokinů je chemotaxe monocytů do míst chronického zánětu, ale působí i na dendritické buňky, bazofily a T-lymfocyty. Účinek CC chemokinů je zprostředkováno jejich receptory (CCR), kterých existuje 10 typů (CCR1-10) [361].

CXC skupina je u savců tvořena minimálně 17 chemokiny, které se podle přítomnosti trojice glutamát-leucin-arginin (ELR) těsně předcházejícímu první cystein dělí na ELR⁺ a

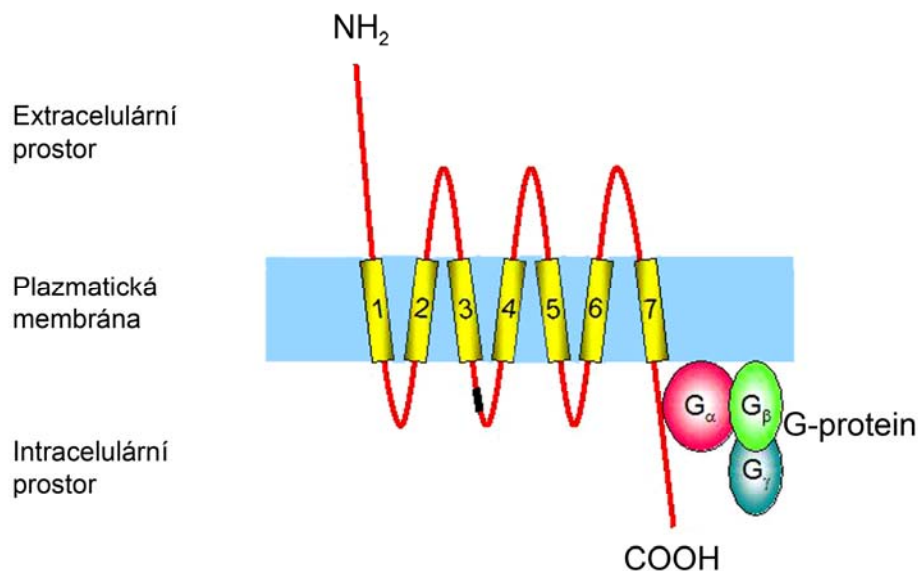
ELR⁻ podskupinu. ELR⁺ CXC chemokiny, jejichž typickým představitelem je IL-8 (CXCL-8) působí hlavně na neutrofile, u kterých indukují chemotaxi, degranulaci a oxidační vzplanutí [361, 364]. ELR⁻ chemokiny, jako např. CXCL13 vykazují chemotaktické účinky spíše na lymfocyty. Obě skupiny navíc mají význam v procesech angiogeneze [365, 366]. CXC chemokiny se na cílových strukturách váží na receptory označované jako CXCR, kterých bylo zatím popsáno 7 (CXCR1-7) [361, 367].

Skupina C chemokinů, charakterizovaná jenom dvěma cysteinovými zbytky v primární struktuře, je tvořena 2 zástupci – XCL-1 a XCL-2, kteří se přes svůj receptor (XCR1) podílejí na chemoatrakci T lymfocytů do thymu [368, 369].

Zatím jediným identifikovaným zástupcem CX₃C chemokinů je CX₃CL1 (označovaný i jako fraktalkin nebo u myši neurotakin) [370, 371], který ve své struktuře obsahuje mucinózní proteinový řetězec umožňující jeho přichycení na povrch endoteliálních buněk, takže může sloužit i jako adhezivní molekula pro leukocyty [372, 373]. TNF- α konvertující enzym může odštípnout CX₃CL1 z této vazby, čímž z něj vznikne solubilní chemoatraktant pro monocyty a T-lymfocyty [374, 375]. Jeho receptor se označuje jako CX₃CR1 [376].

Chemokinové receptory se skládají ze 7 transmembránových helikálních domén spojených s G proteiny aktivujícími fosfolipázu C (*Obrázek 9*).

Obrázek 9: Schematická struktura chemokinového receptoru. Upraveno podle Cirovic D, 2011 (en.wikipedia.org).



Jejich primární struktura je tvořena přibližně 350 aminokyselinami. Transmembránové domény jsou navzájem propojeny 3 intracelulárními a 3 extracelulárními hydrofilními můstky. C-terminální sekvence umístěná také intracelulárně obsahuje serinové a treoninové zbytky důležité pro regulaci receptoru a je místem vazby G proteinu na receptor. Extracelulární N-konec zase zahrnuje i specifické vazební místo pro konkrétní protein [377]. Vazba chemokinů na receptor spouští signalizační dráhy, které prostřednictvím polymerizace a štěpení aktinu vedou ke tvorbě lamelipodii a následnému pohybu buněk [378]. V současné době je známo 19 chemokinových receptorů – 10 pro CC chemokiny (CCR), 7 pro CXC chemokiny (CXCR) a po jednom pro C a CX₃C chemokiny (XCR a CX₃CR) [361, 367].

3.8.2.2 Význam chemokinů u obezity a asociovaných metabolických poruch

Schopnost indukovat chemotaxi imunokompetentních buněk činí z chemokinů jeden z potenciálně nejdůležitějších mechanismů podílejících se na vstupu cirkulujících monocytů, lymfocytů a dalších buněčných elementů do tukové tkáně, což potvrzují i výsledky recentních klinických i experimentálních studií. Týká se to především CC a CXC chemokinů působících převážně na mononukleární hematopoetické buňky. Přehled nejdůležitějších chemokinů s jejich možným uplatněním v patogeneze obezity a diabetes mellitus 2. typu je uveden v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Nejdůležitější chemokiny a jejich vztah k obezitě a diabetes mellitus 2. typu

<i>Chemokin</i>	<i>Alternativní název</i>	<i>Receptor</i>	<i>Klinická asociace s obezitou a DM2</i>	<i>In vitro údaje</i>
CCL-2	MCP-1	CCR2	Zvýšený u obezity a DM2 ^[282, 379-384]	Spojený s IR u myších modelů, adipocytů a buněk kosterního svalstva ^[385-388]
CCL-3	MIP-1 α	CCR1		Regulován adiponektinem ^[212, 387]

Chemokin	Alternativní název	Receptor	Klinická asociace s obezitou a DM2	In vitro údaje
CCL-4	MIP-1 β	CCR1, CCR5		Regulován adiponektinem, indukuje IR v buňkách kosterních svalů ^[212, 386]
CCL-5	RANTES	CCR5	Asociovaný s výskytem DM2 ^[389]	Zvýšený ve viscerálních adipocytech ^[390, 391]
CCL-7	MCP-3, MARC	CCR2	Zvýšený u obezity ^[296]	
CCL-8	MCP-2	CCR1, CCR2B, CCR5	Zvýšený u obezity ^[282, 392]	
CCL-11	Eotaxin	CCR2, CCR3, CCR5	Zvýšený u obezity, ale bez asociace s IR ^[393, 394]	Zvýšená sekrece u obezity ^[394]
CCL-13	MCP-4, NCC-1, CKb10	CCR2, CCR3, CCR5	Zvýšený u obezity ^[393]	
CXCL-1	Gro- α , GRO1, NAP-3, KC	CXCR2		Regulován adiponektinem ^[212]
CXCL-5	ENA-78	CXCR2	Spájí obezitu s IR ^[395]	Indukuje inzulínovou rezistencí v kosterním svalstvu ^[395]
CXCL-8	IL-8, NAP- 1, MDNCF, GCP-1	CXCR1, CXCR2	Zvýšený u obezity a DM2 ^[381, 382]	Regulován adiponektinem, indukuje inzulínovou rezistencí v kosterním svalstvu ^[212, 386]

Chemokin	Alternativní název	Receptor	Klinická asociace s obezitou a DM2	In vitro údaje
CXCL-10	IP-10, CRG-2	CXCR3	Zvýšený u obezity, ale bez asociace s IR ^{[389,} 396]	Regulován interferonem γ ^[397]

3.8.2.3 Chemokin CCL-2 (MCP-1) a jeho receptor CCR2

Nejvíce prozkoumaným chemokinem je ve vztahu k regulaci vstupu imunokompetentních buněk do tkání CCL-2 (označovaný též jako MCP-1 – monocyty chemoatrahující protein 1), jehož základní úlohou je přitahování monocytů a T lymfocytů do tkání poškozených traumatem nebo infekcí [358]. Jeho hlavním receptorem je receptor CCR-2. Bylo prokázáno, že CCL-2 je rovněž adipokin, jelikož je secernován také adipocyty laboratorních hlodavců i lidí [212, 380, 387, 398], přičemž hypertrofované adipocyty jej produkují ve větším množství než buňky štíhlých jedinců [294]. Ukazuje se také, že adipocyty nepředstavují jediný zdroj CCL-2 v tukové tkáni [399]. *In vitro* je exprese a sekrece CCL-2 v adipocytech stimulována působením TNF- α , IL-6 či růstovým hormonem [400]. Působením CCL-2 na 3T3-L1 adipocyty snížilo vychytávání glukózy těmito buňkami [398], podobné účinky CCL-2 byly prokázány i v kosterních svalech a to již při subfyziologických koncentracích [386].

Pomocí myších modelů bylo prokázáno, že nadměrná exprese CCL-2 vyvolává metabolický fenotyp podobný obezitě, včetně rozvoje inzulínové rezistence, infiltrace tukové tkáně makrofágy a jaterní steatózy a to bez jakéhokoliv zvýšení tělesné hmotnosti [385]. Zároveň se ukázalo, že deficit CCL-2 u myši s dietou-indukovanou obezitou nebo inhibice jeho exprese u *db/db* myši zlepšila inzulínovou rezistenci a snížila počet makrofágů v tukové tkáni [385]. Transgenní zvýšená exprese CCL-2 v tukové tkáni myšího modelu endokrinním působením snižovala inzulínovou senzitivitu v kosterním svalu [380, 381].

U lidí byly prokázány výrazně vyšší hladiny CCL-2 v souvislosti s obezitou [382-384] i diabetes mellitus 2. typu [282, 379]. Zvýšená exprese CCL-2 byla u obézních jedinců popsána v různých tukových depech včetně viscerálních, podkožního a epikardiálního [382]. Vysoké hladiny CCL-2 navíc zvyšují riziko vzniku diabetu nezávisle na dalších klinických, metabolických nebo imunologických rizikových faktorech [401-403]. Naopak, fyzická aktivita, redukce hmotnosti po bariatrické operaci a terapie agonistou PPAR- γ pioglitazonem vedly ke snížení plazmatických hladin CCL-2 [287, 404]. Ukázalo se také, že exprese CCL-2 je vyšší ve viscerálním než v podkožním tukovém depu, úzce souvisí s počtem makrofágů ve tkáni a klesá např. po chirurgicky indukovaném poklesu hmotnosti [405, 406].

Ne všechny práce však potvrzují předpokládanou ústřední roli CCL-2 při vzniku zánětu v tukové tkáni. Ve 2 recentních studiích nebyl deficit CCL-2 spojen se zlepšením inzulinové senzitivity nebo poklesem míry infiltrace tukové tkáně makrofágy [407]. Podobně rozporuplné výsledky byly zjištěny i u CCR-2, hlavního receptoru pro CCL-2, kde knock-out jeho genu nevedl k prevenci rozvoje dietou-indukované obezity u laboratorních myši [408]. V jiné práci byl deficit CCR-2 naopak spojen se snížením počtu makrofágů v tukové tkáni, zlepšením inzulinové senzitivity a snížením prozánětlivého stavu u experimentálních zvířat [409, 410]. Farmakologická inhibice CCR-2 také vedla ke zlepšení parametrů glukózového metabolismu a poklesu markerů zánětu a to i nezávisle na přítomnosti tukové tkáně [282]. U makrofágů těsně po vstupu do tukové tkáně v průběhu podávání vysokotukové diety byla exprese CCR-2 vyšší než tomu bylo u rezidentních makrofágů [289]. Celkově se proto zatím zdá, že nadměrná exprese CCL-2 v tukové tkáni zvyšuje infiltraci tkáně makrofágy. Není však úplně jasné, zda deficit CCL-2 může naopak množství makrofágů snížit, což může být podmíněno i tím, že CCR-2 funguje i jako receptor pro další chemokiny ovlivňující vstup makrofágů do tkání, jako jsou CCL-7 a CCL-8 [282, 393].

3.8.2.4 Další chemokiny

O úloze dalších monocyty-atrahuujících chemokinů je zatím k dispozici méně poznatků, ale bylo prokázáno, že hladiny CCL-3 (MIP-1 α – makrofágový inflamační protein 1 α),

CCL-5 (RANTES – regulated upon activation, normal T-expressed and secreted) CCL-7 (MCP-3 – monocyty chemoatrahující protein 3), CCL-8 (MCP-2 – monocyty chemoatrahující protein 2), CCL-11 (eotaxin) a CCL-13 (MPC-4 – monocyty chemoatrahující protein 4) jsou u obézních pacientů rovněž zvýšené a v případě CCL-3 a CCL-5 pozitivně korelují s lačnou inzulinémií a u CCL-5 i se zvýšenou expresí prozánětlivých genů ve viscerálním tuku [282, 296, 389, 393, 394, 411]. Rovněž byl zaznamenán nárůst exprese těchto chemokinů v tukové tkáni obézních jedinců spolu se zvýšením exprese jejich receptorů (CCR-1, CCR-2, CCR-3 a CCR-5), přičemž exprese CCL-11 a receptorů CCR-2 a CCR-5 byla vyšší ve viscerálním (omentálním) než podkožním depu [282]. CCL-5 byl navíc asociován s výskytem diabetes mellitus 2. typu, toto spojení se však nepodařilo potvrdit u CCL-11 [389].

Ze skupiny CXC chemokinů byly zvýšené plazmatické hodnoty zaznamenány u IL-8 (CXCL-8), který je kromě jiných zdrojů secernován i z tukové tkáně [412-414]. Zatím však nebyla prokázána jednoznačná korelace mezi vyššími hladinami IL-8 a parametry inzulinové rezistence, jelikož jejich vzájemný vztah byl ovlivněn dalšími metabolickými a imunologickými parametry [382]. IL-8 je ale zvýšené exprimován tukovými buňkami získanými od inzulinorezistentních jedinců [414]. Obdobně u chemokinu CXCL-10 (IP-10 – interferonem γ indukovaný 10kDa protein) byly jeho sérové koncentrace u obézních jedinců zvýšené, ale nebyly asociovány s inzulinovou rezistencí [389, 396]. Další z CXC chemokinů, u kterého se nedávno podařilo prokázat i adipogenní původ a jehož hladiny jsou výrazně zvýšené u obezity, je CXCL-5, přičemž redukce hmotnosti byla zároveň spjata s poklesem jeho koncentrací [395]. Podobně jako CCL-2 i CXCL-5 vyvolává inzulinovou rezistenci v kosterním svalstvu a představuje tak další potenciální pojitko mezi zánětem v tukové tkáni a periferní inzulinovou rezistencí. U myši vedla inhibice účinku CXCL-5 pomocí monoklonálních protilátek nebo za použití antagonistů jeho receptoru (CXCR-2) ke zlepšení inzulinové rezistence bez ovlivnění tělesné hmotnosti nebo příjmu potravy. Navíc vykazovala zvířata s knock-outem genu pro CXCR-2 zvýšenou citlivost k inzulinu, i když dosud získané výsledky nedovolují v tomto směru žádné definitivní závěry [395, 415]. Z ostatních CXC chemokinů byla u CXCL-14 zjištěna úloha při aktivaci makrofágů v experimentálních podmínkách [416].

Ukazuje se, že sekrece mnoha chemokinů z tukové tkáně včetně CCL-2, CCL-3, CCL-4 (MIP-1 β – makrofágový inflamační protein 1 β), CXCL-1 (Gro- α – growth-regulated oncogene α) a CXCL-8 je inhibována působením adiponektinu [212], což by mohlo představovat jeden z potenciálních mechanismů odpovědných za pozitivní metabolické účinky adiponektinu. Podobně bylo prokázáno spojení mezi zvýšenými hladinami CCL-11 a hypoadiponektinemií, i když jasný důkaz přímé regulace tvorby CCL-11 adiponektinem zatím chybí [417]. Tkáňová hypoxie jako jeden z potenciálních spouštěčů zánětu v tukové tkáni je spojena se zvýšením sekrece CCL-5, přičemž tvorba CCL-2 byla naopak lehce snížena [321, 390]. Vztah hypoxie k dalším chemokinům nebyl zatím předmětem podrobnějšího zkoumání.

Jak naznačují výše uvedené údaje, je příspěvek jednotlivých chemokinů k infiltraci tukové tkáně makrofágy a ke vzniku lokální i systémové zánětlivé reakci velmi komplexní. Chemokiny a jejich receptory jistě představují jeden ze stěžejních faktorů podílejících se na vstupu periferních mononukleárních buněk do tukové tkáně obézních jedinců. Přesné mechanismy vzájemné interakce mezi adipocyty, rezidenčními imunokompetentními buňkami a cirkulujícími krevními elementy, jakož i procesy vedoucí k iniciaci produkce těchto chemotaktických signálů zatím zůstávají z větší části neobjasněné.

3.8.2.5 Chemotaktické faktory nechemokinové povahy

Chemerin je chemoatrakční protein původně objevený v zánětlivých exsudátech [418], který je však spolu se svým receptorem CMKLR1 (chemokine-like receptor 1 – chemokinu podobný receptor 1) ve zvýšené míře exprimován v obézní tukové tkáni [419-421]. Chemerin i jeho receptor (označovaný též jako ChemR23) hrají důležitou úlohu při adipogeneze a knock-down obou těchto proteinů vede k jejímu úplnému zastavení [420]. Se zvyšující se mírou obezity vzrůstá u lidí více exprese CMKLR1 než chemerinu [420]. Chemerin je v lidské tukové tkáni exprimován jednak adipocyty, přičemž tato exprese je stimulována působením TNF- α , a jednak buňkami stromálně-vaskulární frakce [415]. Výskyt receptoru CMKLR1 byl zatím prokázán na makrofázích [422]. Porovnáním různých zvířecích modelů obezity a diabetu se ukázalo, že exprese chemerinu je snižena

v tukové tkáni geneticky obézních myši ($Lep^{ob/ob}$, $Lep^{db/db}$) [420, 422] a naopak zvýšená u obézních hlodavců druhu *Psammomys obesus* (pískomil tlustý) [419]. U lidí byla potvrzena korelace sérových hladin chemerinu s BMI, triglyceridemií a krevním tlakem nezávisle na přítomnosti poruchy glukózového metabolismu [419]. Vzhledem k produkci chemerinu i v jiných orgánech (např. játra nebo plíce) je však obtížné přesně určit podíl adipocytárního chemerinu na jeho celkových koncentracích. Pokud jde o účinky chemerinu na adipocyty, údaje jsou zatím rozporuplné. V jedné studii došlo vlivem chemerinu ke zlepšení vychytávání glukózy ve 3T3 adipocytech [422], jiná práce prokázala přesný opak [423]. Působením chemerinu dále dochází ke vzniku inzulínové rezistence v kosterním svalu a jeho exprese v adipocytech je stimulována IL-1 β [415, 423].

Zkoumání účinků chemerinu je komplikováno také faktem, že tento faktor působí i přes jiné receptory než CMKLR1. Navíc byly identifikovány i další proteiny vznikající z chemerinu a vyznačující se často odlišným působením. Chemerin je syntetizován ve formě prochemerinu, jehož afinita k CMKLR1 je relativně nízká [418]. Z prochemerinu v cirkulaci účinkem serinových proteáz, uplatňujících se při regulaci koagulační kaskády a zánětlivých procesů, rychle vzniká samotný chemerin [418]. Působením cysteinových proteáz se však z prochemerinu tvoří jiné, chemerinu podobné peptidy, které mají výrazně vyšší afinitu k CMKLR1 než chemerin a zároveň působí protizánětlivě na aktivované makrofágy [424, 425]. Uvedené rozdíly v účincích by mohly být důsledkem vazby i na další receptory, jako jsou 2 nedávno objevené receptory spojené s G-proteiny označované jako GPR1 (G-protein-coupled receptor 1 – receptor spjatý s G proteinem 1) a CCR-like 2 (receptor podobný CC chemokinovému receptoru 2). Ukázalo se, že na CMKLR1 se chemerin váže svou C-terminální doménou, čímž přímo aktivuje danou buňku. Na CCR-like 2 se však navazuje N-terminální doménou, přičemž C-terminální vazebné místo může sloužit ke spojení s CMKLR1 na vedlejší buňce [425]. Úloha těchto nových receptorů a derivátů chemerinu v patogeneze obezity a jejích komplikací zatím není prozkoumána.

3.8.3 Remodelace tukové tkáně

Obezitou vyvolané změny ve struktuře, celulárním obsahu a funkci vedou v tukové tkáni k aktivaci četných remodelačních procesů, měnících dále tkáňovou architekturu a složení. Uvedené procesy zahrnují změny ve fenotypu makrofágů, vystupňování adipocytární apoptózy, nebo remodelaci tkáňové matrix působením metaloproteináz. Některé z těchto reakcí dále přispívají k prohloubení patologických změn, jiné slouží jako reparační mechanismy snažící se zmírnit negativní dopad adipogenních a prozánětlivých procesů na tukovou tkáň.

3.8.3.1 Makrofágové fenotypy v tukové tkáni

Makrofágy jsou vysoce heterogenní skupinou buněk vyskytující se v téměř všech orgánech (např. alveolární makrofágy v plicích, Kupfferovy buňky v játrech, mikrogliaální buňky v CNS, osteoklasty v kostech aj.) a lišící se od monocytů schopností migrovat do tkání pod vlivem zánětlivých nebo jiných stimulů [426]. Vyznačují se značnou plasticitou, která jim umožňuje efektivně reagovat na různé okolní signály a jejich fenotyp je významně ovlivněn procesy vrozené i získané imunity. Analogicky ke konceptu diferenciaci T_H (helper – pomocný) lymfocytů na typ T_H1 a T_H2 i makrofágy mohou být aktivovány jako M1 nebo M2 fenotyp [427, 428]. Stimulace makrofágů T_H1 cytokiny jako např. interferonem γ nebo bakteriálními produkty jako jsou lipopolysacharidy vede ke vzniku klasických M1 makrofágů s výrazným prozánětlivým a antibakteriálním potenciálem. T_H2 cytokiny jako IL-4 nebo IL-13 podporují alternativní aktivaci na M2 makrofágy s antiparazitickými, reparačními a remodelačními vlastnostmi [302]. Jedním z hlavních znaků M2 makrofágů je jejich schopnost produkovat enzym arginázu, která blokuje aktivitu inducibilní syntázy oxidu dusnatého (iNOS) a tím pomáhá při reparaci poškozených tkání [429]. M2 makrofágy se dále dělí na M2a (aktivované pomocí IL-4 nebo IL-13), M2b (aktivované působením IL-1 β nebo lipopolysacharidem) a M2c (aktivované přes IL-10, TGF β – transforming growth factor β nebo glukokortikoidy) [430]. V současné době jsou však do kategorie M2 zahrnovány všechny další typy makrofágů kromě standardního M1 typu, což jsou buňky s různými biochemickými a fyziologickými vlastnostmi [431, 432]. Proto byla nedávno navržena

nová klasifikace makrofágů založená na jejich funkci a zahrnující obranu hostitele, hojení ran a regulaci imunitních reakcí [433].

Výsledky recentních prací ukázaly, že u makrofágů tukové tkáně závisí typ aktivace na stupni adipozity. U myši s normální hmotností vykazovaly rezidenční makrofágy znaky M2 fenotypu, včetně produkce proteinu Ym1 (což je chitináze podobný protein), arginázy a protizánětlivých cytokinů IL-10, IL-1Ra aj. Dietou-indukovaná obezita vedla ke snížení exprese těchto genů a naopak k nárůstu exprese typických prozánětlivých faktorů včetně povrchových antigenů F4/80, CD11b a CD11c, iNOS a prozánětlivých cytokinů jako TNF- α nebo IL-6, čímž došlo k posunu od protizánětlivého M2 k prozánětlivému M1 fenotypu [434, 435]. Tento posun nebyl důsledkem proměny rezidenčních M2 makrofágů nýbrž vstupu monocytů z periferní krve a jejich proměny na M1 makrofágy. Tyto makrofágy se navíc preferenčně shlukovaly do specifických struktur obklopujících nekrotické adipocyty a tvořících tak již dříve popsané korunovité struktury, zatímco původní M2 makrofágy byly lokalizovány hlavně v mezibuněčných prostorech mezi adipocyty [436]. Porovnáním genové exprese v makrofázích z obézních myši bez a s knockoutem pro chemokinový receptor CCR-2 se ukázalo, že tento M2/M1 posun vyžaduje přítomnost funkční osy CCL-2/CCR-2 [289]. Cílená ablace CD11c⁺ makrofágů vedla u obézních myši k výraznému lokálnímu i systémovému snížení produkce prozánětlivých faktorů a ke zlepšení inzulínové senzitivity [437].

Na vzniku a udržení M1 fenotypu u makrofágů nově vstupujících do tukové tkáně se u laboratorních myši podílejí i mnohé dříve zmiňované faktory, jako adipokiny, tkáňová hypoxie, metabolická endotoxemie nebo volné mastné kyseliny [290, 438, 439]. VMK uvolňované z hypertrofických adipocytů mohou svým parakrinním působením přes TLR spouštět prozánětlivou sekreci z makrofágů (viz výše uvedený mechanismus vzájemného parakrinního působení mezi adipocyty a makrofágy) [324]. Subpopulace myeloidních buněk charakterizovaná antigeny F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁺ byla navíc náchylnější k aktivaci přes TLR-4 a TLR-2 receptory než skupina F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁻ [290]. TLR-4 představuje spolu s receptorem CD14 navíc rozhodující faktor při vzniku zánětu zprostředkovaného bakteriálním lipopolysacharidem [338].

Nenasycené mastné kyseliny a jejich deriváty se vážou také na transkripční faktory ze skupiny PPAR (receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem – peroxisome

proliferator-activated receptor). PPAR γ je exprimovaný v adipocytech i makrofázích, přičemž jeho aktivace je spjata se zlepšením inzulínové senzitivity a snížením lokálního a celkového zánětu [440, 441]. Nepřítomnost funkčního PPAR γ na makrofázích vedla u pokusných zvířat k nemožnosti jejich aktivace směrem k M2 fenotypu a zároveň je predisponovala ke vzniku dietou-indukované obezity a inzulínové rezistence [442]. I přes celkově zvýšené množství vykazovala tuková tkáň PPAR γ -deficientních myší nižší obsah makrofágů, což bylo připisováno sníženému počtu M2 aktivovaných buněk. Podávání PPAR γ agonisty rosiglitazonu naopak vedlo u hlodavců na vysokotukové dietě ke změně polarizace makrofágů z M1 na M2, což naznačuje, že PPAR γ je jedním z rozhodujících faktorů umožňujících alternativní aktivaci tukových makrofágů [443]. Snížená infiltrace M1 makrofágy po aktivaci PPAR γ byla spojena s inhibicí exprese chemokinu CCL-2 a jeho receptoru CCR-2 [444, 445]. Na subcelulární úrovni byly cílové struktury pro PPAR γ nalezeny v promotorových oblastech mnoha genů exprimovaných typicky v M2 makrofázích [442].

I další z PPAR receptorů, PPAR δ , se podílí na regulaci polarizace tukových makrofágů, přičemž jeho deficit v myeloidních buňkách vedl ke snížení M2 aktivace s následným zvýšením zánětu v adipocytech, vzrůstu tělesné hmotnosti a systémové inzulínové rezistence [446]. *In vivo* se PPAR δ účastní i polarizace Kupfferových buněk v játrech, čímž může též ovlivňovat inzulínovou senzitivitu a glukózový metabolismus [447].

Podobné pozitivní účinky na aktivaci makrofágového M2 fenotypu jako u PPAR receptorů byly recentně prokázány i u adiponektinu [448], což přidává další střípek do mozaiky mechanismů jeho protizánětlivého a pozitivního metabolického působení.

Údaje z experimentálních studií jsou však, podobně jako u jiných faktorů, přenosné na lidskou fyziologii jen v omezené míře. Ukázalo se, že makrofágy izolované z lidské tukové tkáně exprimují zároveň M1 i M2 znaky a u obezity se hromadí hlavně makrofágy s pozitivitou CD14 a CD206 (receptor pro manózu), což jsou antigeny obvykle typické pro M2 rezidenční buňky [292]. Se zvyšujícím se BMI dochází u lidských tukových makrofágů ke snížení exprese některých M1 markerů a zvýšení exprese M2 markeru LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 – endoteliální hyaluronový receptor 1 lymfatických cév). Lidské makrofágy pocházející z tukové tkáně (CD14⁺/CD206⁺) sice vykazují protizánětlivý fenotyp, jsou však schopny produkovat i

prozánětlivé mediátor [284]. Z uvedených faktů se proto jeví, že u lidí nejsou tukové makrofágy striktně polarizované na M1 nebo M2 fenotyp.

Rozdíly mezi myšimi a lidskými makrofágy zahrnují i další faktory. Myši M1 makrofágy produkují iNOS [289], faktor který může přímo přispívat ke vzniku inzulínové rezistence [449]. Lidské makrofágy však pravděpodobně iNOS vůbec netvoří [292, 450]. Makrofágy čerstvě aťrahoované do myši tukové tkáně se vyznačují expresí CD11c [290, 434], což je povrchový antigen typický pro dendritické buňky hlodavců [290]. Dendritické buňky vznikají podobně jako makrofágy z cirkulujících monocytů a mohou migrovat do míst postižených zánětem [426, 451]. U lidí je exprese CD11c minimální a nemění se s rozvojem obezity [284], i když jiná recentní studie prokázala, že u Indiánů z kmene Pima naopak může být nezávislým negativním prediktorem inzulínové rezistence [452]. Uvedené diskrepance potvrzují, že výsledky zvířecích experimentů nemohou být kompletně a beze změn přenášeny na humánní fyziologii a podporují nutnost dalšího intenzivního výzkumu zaměřeného na přesnější charakterizaci fenotypu a vlastností makrofágů v lidské tukové tkáni..

3.8.3.2 Interakce mezi makrofágy a adipocyty

Produkty pocházející z aktivovaných makrofágů, obzvláště TNF- α , svým parakrinním působením snižují citlivost adipocytů k inzulínu a podporují uvolňování VMK jednak přímou aktivací lipolýzy a jednak nepřímo inhibicí antilipolytického efektu inzulínu [453-455]. Samotné mechanismy jejich vzájemné interakce začínají být intenzivněji zkoumány teprve v poslední době. Kromě zmiňovaných VMK a receptorů TLR se v těchto reakcích uplatňuje i sérový amyloid A (SAA), dosud známý hlavně jako protein akutní fáze, a to pomocí regulace efluxu cholesterolu z adipocytů [456]. Dalšími faktory s významnou úlohou při komunikaci mezi adipocyty a makrofágy jsou proteiny vázající mastné kyseliny (FABP – fatty-acid-binding proteins) [335]. FABP4 (aFABP – adipocytární FABP) a FABP5 jsou specificky exprimované v adipocytech a makrofázích a inhibice FABP4 vedla ke zlepšení inzulínové senzitivity a dalších parametrů glukózového metabolismu u genetických i dietou- indukovaných myších modelů obezity a diabetu mellitus 2. typu [457]. Došlo také ke snížení míry jaterní steatózy a potlačení

exprese prozánětlivých působků a aktivity zánětlivé signální dráhy JNK1. Uvedené poznatky činí z FABP4 potenciálně významný cíl terapeutických intervencí.

3.8.3.3 Odumírání a novotvorba adipocytů

Ve studii Strissela a kol. se ukázalo, že u myši s dietou-indukovanou obezitou došlo po 16 týdnech vysokotukové diety k odumření kolem 80% adipocytů v epididymální tukové tkáni. Po dalších 4 týdnech (ve 20. týdnu celkově) však překvapivě nastala redukce množství mrtvých buněk na pouze 16 %, což byla hodnota podobná stavu ve 12. týdnu. Většina buněk navíc patřila do kategorie malých adipocytů (<5000 μm^2). V rozmezí mezi 16. a 20 týdnem došlo také k poklesu množství kolagenových depozit. Na základě uvedených výsledků autoři předpokládají, že v daném časovém úseku proběhla remodelace tukové tkáně a po dosažení vrcholu v odumírání adipocytů v 16. týdnu byla další její další expanze podmíněná místo hypertrofie spíše hyperplazií adipocytů. Jednou z příčin zlepšení celkového prozánětlivého stavu tukové tkáně ve 20. týdnu mohla být zvýšená ingesce odumřelých buněk makrofágy, která mohla vést ke změně polarizace na typ M2. Na druhou stranu docházelo současně s remodelací tukové tkáně již od 12. týdne ke zvyšování obsahu tuku v játrech vedoucímu k rozvoji jaterní steatózy, což naznačuje, že zdánlivě pozitivní remodelační změny v tuku mohou vést k omezení jeho kapacity k ukládání lipidů a k jejich následné ektopické depozici se všemi negativními metabolickými důsledky [301].

Tukové makrofágy mohou navíc pomocí svých produktů modulovat viabilitu a proliferaci adipocytárních progenitorových buněk a interferovat se standardní adipocytární diferenciací [292, 458-460].

3.8.3.4 Vaskularizace tukové tkáně

Jak již bylo uvedeno dříve, snížení hustoty cévní sítě může být jedním z faktorů přispívajících k iniciaci vstupu makrofágů do tukové tkáně [461]. U obezních Lep^{ob/ob} myši přispívají tukové makrofágy výrazně ke zvýšené expresi proangiogenního faktoru PDGF (platelet-derived growth factor – destičkový růstový faktor), zatímco u štíhlých zvířat jsou za většinu jeho lokální produkce odpovědny preadipocyty [462]. Zvýšené

množství makrofágů v obézní tukové tkáni proto může ovlivňovat její remodelaci i stimulaci angiogenezy [292, 462], i když *in vivo* údaje u lidí zatím chybí.

3.8.3.5 Změny v extracelulární matrix

Ukazuje se, že zvýšená depozice kolagenu v extracelulární matrix koreluje s mírou odumírání adipocytů a infiltrací tuku makrofágy [301]. Rozsáhlé transkripční analýzy tukové tkáně u lidí stejně jako imunohistochemické a *in vitro* studie také naznačují, že makrofágy-indukované změny na preadipocytech mohou vést k nadměrné tvorbě složek extracelulární matrix a následnému zvýšení intersticiální fibrózy [463, 464].

Remodelace tukové tkáně zahrnuje s největší pravděpodobností i systém matrixových metaloproteináz. Studie na zvířatech s dietně i geneticky ($Lep^{ob/ob}$ i $Lep^{db/db}$) indukovanou obezitou prokázaly zvýšenou expresi matrixových metaloproteináz (MMP) -2, -3, -11, -12, -14 a -19, přičemž další metaloproteinázy jako MMP-7 a -9 byly naopak sniženy. Navíc byly u obézních jedinců jinak regulované i tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMPS – tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) [465, 466]. Úlohu MMP a TIMP při expanzi tukové tkáně potvrzují i výsledky studií na modelech s knockoutem zvolených genů. MMP-2^{-/-} myši přibíraly na vysokotukové dietě méně a měly menší obsah tuku v organizmu než MMP-2^{+/+} kontroly [467]. Podobný byl fenotyp i u TIMP-1^{-/-} myši [468]. Rovněž použití inhibitorů MMP vedlo ke snížení obsahu tuku v organizmu [469, 470]. U myši na vysokotukové dietě bránilo přidání rybího oleje do potravy uvedenému nárůstu MMP [471]. Na základě zmiňovaných dat se zdá, že u obezity dochází k aktivaci systému MMP/TIMP, což následně umožňuje hypertrofii adipocytů a expanzi a remodelaci tukové tkáně.

Potenciální úloha MMP při vývoji obezity byla potvrzena i v klinických studiích, kde u obézních jedinců byly plazmatické koncentrace MMP-2 a MMP-9 vyšší než u štíhlých kontrolních subjektů [472]. Hladiny TIMP-1 byly u pacientů s obezitou rovněž zvýšené a korelovaly pozitivně s BMI, plazmatickými VMK, cholesterolem, IL-6 a leptinem [473].

Všechny uvedené jevy naznačují, že tukové makrofágy mohou snižovat plasticitu tukové tkáně ovlivněním počtu adipocytárních progenitorových buněk a jejich diferenciaci na

zralé adipocyty a modulací angiogenezy a remodelace tkáňové matrix. Tyto procesy spolu se zvýšeným uvolňováním VMK z adipocytů mohou přispívat k ektopickému ukládání tuků do periferních orgánů včetně jater, kosterního svalstva a pankreatu a vzniku lipotoxicity a inzulínové rezistence [305, 474].

3.9 Další imunokompetentní buňky a zánět v tukové tkáni

Tuková tkáň u obezity je kromě zvýšeného množství makrofágů charakterizována i infiltrací dalšími imunokompetentními buňkami, které mohou mít zásadní význam pro iniciaci zánětlivých reakcí a vstup makrofágů z periferní cirkulace. Patří mezi ně buňky podílející se na vrozených imunitních reakcích jako NK buňky, neutrofilů a mastocyty ale i mediátory získané imunity jako T- a B-lymfocyty.

3.9.1 T-lymfocyty

Recentní studie poukázaly na zvýšený výskyt $CD3^+$ T-lymfocytů ve viscerální tukové tkáni obézních myší, korelujících s mírou zánětu a inzulínové rezistence [322, 475, 476]. V práci Kinschera a kol. infiltrovaly $CD3^+$ lymfocyty tukovou tkáň v průběhu prvních 5 týdnů od zahájení podávání vysokotukové diety, přičemž v tomto období došlo už i k rozvoji inzulínové rezistence. Vstup makrofágů do tkáně se navíc objevil až po 10 týdnech diety, což by naznačovalo, že právě T-lymfocyty by mohly fungovat jako spouštěč procesů vedoucích ke vstupu makrofágů a vzniku zánětu v tukové tkáni [475]. Vzhledem ke zvýšené expresi chemokinu CCL-5 (RANTES) a jeho receptoru CCR-5 v tkáňových vzorcích i v *in vitro* migračních experimentech se CCL-5 secernovaný z adipocytů jeví jako jeden z možných chemotaktických faktorů sloužících k chemoatrakci těchto T-lymfocytů [476].

T-lymfocyty tukové tkáně byly dále dle antigenního složení charakterizovány jako buď $CD4^+$ nebo $CD8^+$. U myší s dietou indukovanou obezitou i u $Lep^{ob/ob}$ zvířat byly nalezeny 3- až 4-násobně vyšší koncentrace cytotoxických $CD3^+/CD8^+/CD4^-$ T-lymfocytů [322].

U lidí s diabetes mellitus 2. typu byla exprese $CD8$ v tukové tkáni zvýšená jenom mírně, zatímco exprese $CD4$ pozitivně korelovala s tělesnou hmotností. Navíc se ukázalo, že většina tukových makrofágů u těchto subjektů se vyznačuje pozitivitou leukocytárního

antigenu DR, což naznačuje, že mohou být aktivované INF- γ , což je cytokin produkovaný CD4⁺ pomocnými T-lymfocyty [475].

Další studie prokázala, že CD8⁺ T-lymfocyty nacházející se v tukové tkáni, přispívají ke vstupu makrofágů do tkáně. CD8⁺ lymfocyty byly ve tkáni přítomny dříve než makrofágy. U zvířat s deficitem CD8 nedošlo na vysokotukové dietě ke zvýšení vstupu makrofágů do tuku a tyto myši vykazovaly vyšší inzulinovou senzitivitu než kontrolní jedinci. Podání CD8⁺ buněk vedlo k obnovení standardní makrofágové infiltrace. Periferní krevní monocyty se navíc působením CD8⁺ T-lymfocytů diferencovaly na makrofágy s vysokou expresí TNF- α (TNF- α^{high}). Uvedené výsledky podporují význam CD8⁺ T-lymfocytů při chemoatrakci, diferenciaci a aktivaci makrofágů v obézní tukové tkáni [477].

CD4⁺ T_H (helpery) a T_{reg} lymfocyty hrají klíčovou úlohu při určování výsledku aktivace zánětlivých kaskád. Prozánětlivé T_{H1} lymfocyty podporují sekreci zánětlivých faktorů z makrofágů. T_{H2} a T_{reg} buňky naopak aktivují protizánětlivý M2 fenotyp. Vysokotuková dieta vedla u laboratorních zvířat ke zvýšení množství T_{H1} a snížení T_{H2} a T_{reg} lymfocytů v tukové tkáni s následným vstupem M1 makrofágů a rozvojem zánětu a inzulinové rezistence [478].

Ablace T_{reg} lymfocytů, napodobující jejich snížení pozorované v tukové tkáni obézních myší, vedla k oslabení inzulinové signalizace v tukové tkáni a játrech doprovázeném nárůstem sekrece prozánětlivých cytokinů. Zvýšení jejich aktivity mělo naopak za následek snížení lačné glykémie a nárůst produkce IL-10. Na základě transkripčního profilu se také ukázalo, že T_{reg} lymfocyty pocházející z tukové tkáně zvýšeně exprimují četné geny podílející se na migraci a extravazaci leukocytů, což potvrzuje jejich důležitou roli v regulaci zánětu v tukové tkáni [479].

Myši s delecí genů Rag-1 a Rag-2, u kterých chybí T- a B-lymfocyty, se vyznačují větší obezitou a inzulinovou rezistencí než kontrolní jedinci [478, 480]. Tento stav je spojen se zvýšenou infiltrací viscerální tukové tkáně NK buňkami (natural killer) a makrofágy, což naznačuje, že přítomnost lymfocytů sehrává protektivní roli v procesu vzniku subklinického zánětu a jeho metabolických komplikací. Rekonstrukce CD4⁺ buněčné řady u Rag^{-/-} myší vedla k normalizaci hmotnosti a snížení vstupu makrofágů do tukové

tkáně, což však neplatilo pro CD8⁺ T-lymfocyty [478]. Z uvedených výsledků se zdá, že to jsou právě CD4⁺ T_H2 lymfocyty, které snižují zánět ve viscerální tukové tkáni.

Mezi nejzajímavější poznatky, které studie zkoumající T lymfocyty přinesly, patří kromě toho, že jejich infiltrace do tukové tkáně předchází vstup makrofágů, i fakt, že tukové T lymfocyty exprimují jenom omezený soubor receptorů výrazně podobný tomu, který se aktivuje při imunitní odpovědi na virové patogeny. Buňky uplatňující se při získané imunitní odpovědi, jako jsou i T-lymfocyty, se aktivují jenom v přítomnosti specifického antigenu. Omezený počet receptorů v buňkách pocházejících z tukové tkáně může naznačovat, že tyto T lymfocyty rozeznávají jako patogenní vlastní buněčné struktury, potvrzení uvedené hypotézy však vyžaduje provedení celé řady dalších experimentálních a klinických studií [481].

3.9.2 NK leukocyty, mastocyty, neutrofilly a B-lymfocyty

NK (natural killer) T lymfocyty se také nacházejí v tukové tkáni a hlavními antigeny, které rozeznávají, jsou lipidy. Absence NK buněk vede ke snížení inzulínové rezistence a zánětu v tukové tkáni po podání vysokotukové diety, zatímco jejich aktivace má za následek exacerbaci těchto procesů [482].

I když mastocyty jsou tradičně považovány za mediátory alergické reakce, nedávno se ukázalo, že se podílejí na vzniku četných dalších patologických stavů včetně obezity a diabetu. Bylo prokázáno, že mastocyty se hromadí v tukové tkáni ještě před makrofágy a jejich chybění mělo za následek redukci tělesné hmotnosti i obsahu makrofágů v tukové tkáni, takže se zdá, že i mastocyty se mohou podílet na stimulaci vstupu makrofágů z periferie. Mastocyty zvýšeně exprimují IL-6 a IFN- γ , které následně zvyšují expresi proteáz degradujících antiangiogenní molekuly. Mastocyty zprostředkovaná angiogeneza by proto též mohla přispívat k infiltraci tukové tkáně imunokompetentními buňkami [483].

Při běžné reakci na zánětlivé podněty vstupují neutrofilly do místa zánětu dříve než makrofágy. Zastoupení neutrofilů v tukové tkáni bylo proto zkoumáno v časných fázích vysokotukové diety u myší, přičemž se zjistilo, že neutrofilly přechodně infiltrovaly tukovou tkáň již v průběhu prvního týdne po nasazení diety s vrcholem svého zastoupení

3. den s následným postupným poklesem k výchozím hodnotám [484]. U obézních žen neutrofilů v tukové tkáni ve zvýšené míře adherovaly k endotelu [485]. Vzhledem k uvedeným údajům představují i neutrofilů jeden z možných iniciačních mechanismů podílejících se na náboru makrofágů do tukové tkáně.

Stejně jako T- i B-lymfocyty infiltrují tukovou tkáň brzy po zahájení vysokotukové diety, ale jejich role v patogeneze subklinického zánětu zatím zůstává nejasná [480].

Jak vyplývá z uvedeného přehledu, procesy podílející se na vzniku a dalším rozvoji zánětu v tukové tkáni zahrnují velké množství komplexních reakcí, které se navzájem ovlivňují mnoha různými způsoby. Přesné mechanismy jejich vzájemné interakce se v současnosti teprve začínají blíže prozkoumávat. Jejich lepší pochopení však představuje cestu vedoucí k objevu nových účinnějších terapeutických strategií, umožňujících efektivněji bojovat proti současné pandemii obezity a s ní spojených metabolických poruch.

4. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Při koncipování naší práce jsme vycházeli z předpokladu, že hladiny fibroblastových růstových faktorů 19 a 21 jsou ovlivněné přítomností obezity a diabetes mellitus 2. typu. Dále jsme předpokládali, že aktivace receptorů PPAR- α pomocí jejich agonisty fenofibrátu stejně jako akutní hyperinzulinemie v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu budou mít za následek další změny hladin FGF-19 a FGF-21. Taktéž jsme předpokládali, že mezi podkožní tukovou tkání a periferními monocyty u obézních pacientů s diabetes mellitus 2. typu bude existovat jistá forma interakce zprostředkována chemotaktickými a dalšími prozánětlivými faktory, která bude přispívat k lokální i systémové zánětlivé reakci. A konečně jsme vycházeli z předpokladu, že za pozitivní metabolické účinky několikátýdenní nízkokalorické diety by mohly být alespoň zčásti odpovědné změny hladin FGF-21 a FGF-19 nebo mRNA exprese chemotaktických faktorů a jejich receptorů v podkožní tukové tkáni a na cirkulujících monocytech.

Specifické cíle naší práce byly následující:

- Zkoumat možnou úlohu fibroblastových růstových faktorů 19 (FGF-19) a 21 (FGF-21) při rozvoji obezity a diabetes mellitus 2. typu
- Pomocí vybraných farmakologických intervencí – akutní hyperinzulinémie a léčby agonistou PPAR- α – blíže popsat mechanismy podílející se na regulaci hladin FGF-19 a FGF-21
- Za pomoci stanovení mRNA exprese prostudovat úlohu chemoatrahujících faktorů a dalších cytokinů a adipokinů a příslušných receptorů produkovaných v podkožní tukové tkáni a v cirkulujících monocytech v procesech subklinického zánětu u diabetes mellitus 2. typu a obezity a zároveň posoudit vzájemný vztah mezi periferními monocyty a tukovou tkání u těchto onemocnění
- Zhodnotit, zda změny cirkulujících hladin FGF-19 a FGF-21 nebo mRNA exprese vybraných chemokinů a cytokinů v podkožní tukové tkáni a cirkulujících monocytech mohou vysvětlovat pozitivní vliv krátkodobé nízkokalorické diety na metabolickou kompenzaci u diabetes mellitus 2. typu spojeného s obezitou

5. METODIKA STUDIE

Všechna klinická a laboratorní vyšetření byla prováděna na III. interní klinice VFN ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN. Perioperační bioptické vzorky tukové a jaterní tkáně byly získávány v součinnosti s 1. chirurgickou klinikou VFN.

5.1 Vyšetření antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů

U všech vyšetřovaných subjektů byla změřena tělesná výška a hmotnost a vypočítán body mass index (BMI – hmotnost v kg/výška v m²). Odběry krevních vzorků byly provedeny za standardních podmínek po celonočním lačnění mezi 7. a 8. hodinou ranní. Do 30 minut byly vzorky zpracovány pomocí centrifugace (10 min při 1000 x g) a séra byla dále uskladněna při teplotě -70°C k dalšímu vyšetření.

Základní biochemické parametry byly stanoveny standardními laboratorními metodami. Sérové hladiny inzulínu a adiponektinu byly měřeny komerčními RIA kity (Cis Bio International, Francie a Linco Research, USA). HOMA index (HOMeostasis Model Assessment) byl vypočítán pomocí vzorce:

sérová koncentrace inzulínu nalačno (mIU/l) x glykémie nalačno/22,5 [486].

Sérové koncentrace leptinu, FGF-19 a FGF-21 byly měřeny komerčními ELISA kity (Biovendor, ČR) a sérové hladiny IL-6, IL-8, CCL-2 a TNF- α byly stanovovány pomocí kitů LINCoplex na přístroji Luminex 2000 (Linco Research, USA).

5.2 Biopsie tukové a jaterní tkáně

Biopsie podkožní tukové tkáně byla u pacientů prováděna v ranních hodinách současně s krevními odběry po 10-12 hodinovém lačnění. Vzorky tukové tkáně byly odebírány z oblasti břišní stěny cca 10-15 cm laterálně od pupku. Po zarouškování a dezinfekci místa odběru bylo provedeno lokální znecitlivění 20 ml 1% trimecainu (Mesocain 1% inj. sol.). Následně byl skalpelem proveden krátký řez (3-4 mm), kterým byla paralelně s břišní stěnou zavedena plastová kanyla s kovovým zavaděčem (Braunüle MT, 12G,

délka 80 mm, vnitřní/vnější průměr 2,2/2,7 mm, Braun Melsungen, Německo). Po opatrném rozrušení podkožní tukové tkáně byl odstraněn kovový zavaděč, na kanylu byla připojena 20 ml stříkačka a pomocí podtlaku bylo odebráno požadované množství tukové tkáně (200-1000 mg). Vzorky tkáně byly rozděleny do plastových zkumavek (Eppendorf AG, Německo, obsah 1,5 ml) s 1 ml RNA stabilizujícího činidla (RNAlater, Quiagen, Německo), okamžitě zamrazeny na -80°C a uloženy k dalšímu zpracování.

Ke studiu exprese FGF-21 byly vzorky jaterní, podkožní a viscerální tukové tkáně odebírány chirurgicky v průběhu operace od obézních pacientek podstupujících založení gastrického by-passu nebo sleeve gastrektomie a od kontrolní skupiny žen při elektivní cholecystektomii. Získané vzorky byly též uloženy do zkumavek s RNA laterem a ihned zmrazeny.

5.3 Izolace krevních monocytů

Krevní vzorky použité k izolaci periferních monocytů byly odebírány do média obsahujícího Na-EDTA a zpracovány do 2 hodin po odběru. Leukocyty se ze vzorků získávaly pomocí Ficoll-PaqueTM Plus (Amersham Biosciences AB, Švédsko). Do 50ml zkumavky Falcon bylo napipetováno 3,5 ml Ficoll-PaqueTM Plus a následně bylo pomalu přidáno 5 ml krevního vzorku. Po centrifugaci byly agregáty leukocytů přeneseny do další zkumavky obsahující 10 ml PBS (0,001M PBS, pH 7,4) a opětovně centrifugovány. Supernatant byl odsán a buněčná peleta byla rozpuštěna v roztoku DE-GAS (0,01 M PBS pH 7,4; 0,5 M EDTA pH 8,0 a 1% BSA). Monocyty byly dále izolovány magnetickou izolační metodou za použití magnetických mikrokuliček značených monocytovým antigenem CD14 (MiniMacs Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Poté byla z CD14⁺ monocytů izolována celková RNA na přístroji MagNA Pure instrument pomocí izolačního kitu MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Německo).

5.4 Stanovení exprese mRNA

Vzorky tukové a jaterní tkáně byly homogenizovány za použití kuliček MagNA Lyser Green Beads na automatickém homogenizátoru MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Poté byla z homogenizátu na přístroji MagNA Pure instrument pomocí kitu MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Německo) izolována celková RNA. Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometrickým měřením absorbance při 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf AG, Německo). Integrita RNA a její případná kontaminace DNA byly kontrolovány elektroforeticky pomocí vizualizace 18S a 28S ribosomálních bandů na 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem.

Pro reverzní transkripci bylo použito 0,05 µg RNA. Syntéza byla provedena soupravou RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Science, Litva) s využitím oligo(dT)18 primerů podle protokolu doporučeného výrobcem. Vzorky cDNA byly do dalšího zpracování skladovány při -20°C.

Stanovení genové exprese bylo provedeno pomocí panelu TaqMan® Custom Array na přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) případně pomocí specifických TaqMan Gene expression esejí na přístroji Abi Prism 7500 Instrument (Applied Biosystems, USA). V reakční směsi se nacházelo cca 12 µg cDNA, TaqMan® Universal PCR Master Mix, NO AmpErase® UNG (Applied Biosystems, USA) a voda zbavená nukleáz (Fermentas Life Science, Litva). Po iniciační 10-minutové denaturaci při 95°C následovalo 45 pětasedmdesátivteřinových cyklů využívajících standardní teplotní profil. Všechny vzorky byly měřeny alespoň v duplikátu. Data byla vyjádřena jako prahové hodnoty (C_T), tzn. jako změna fluorescence v reálném čase. Pro každý vzorek byly stanovovány také endogenní kontroly β -2-mikroglobulin a 18S pro kompenzaci odchylek ve vstupním objemu RNA do reakční směsi a účinnosti reakce. Relativní genová exprese sledovaných genů byla vypočítána podle vzorce $2^{-\Delta\Delta(C_T \text{ cytokinu} - C_T \text{ endogenní kontroly})}$.

5.5 Nízkokalorická dieta (VLCD – very-low-calorie diet)

Obézní pacientky s diabetes mellitus 2. typu podstoupily v rámci redukčního pobytu na III. interní klinice VFN dvou- až třítydenní hospitalizaci s nízkokalorickou dietou o energetickém obsahu 600 kcal (2500 kJ)/den.

5.6 Hyperinzulinemický izoglykemický clamp

Použitá clampová metodika byla založená na principech představených DeFronzem a kol. [487]. Účinnost inzulínu byla hodnocena na základě množství glukózy potřebného k zachování cílové glykémie při konstantní rychlosti inzulínové infuze přepočtené na jednotku tělesné hmotnosti nebo tělesného povrchu. V případě izoglykemického clampu se cílová hodnota rovnala lačné glykémii.

Na začátku studie byly do žil na obou předloktích zavedeny 2 standardní kanyly. Jedna sloužila na podávání inzulínu (20 IU krátkodobého lidského inzulínu HMR ve 20 ml 0,9% NaCl, rychlost infuze 1 mIU/kg/min u pacientů BMI < 30 kg/m² a 40 mIU/m²/min při BMI > 30 kg/m²) a roztoku 20% glukózy (v infuzích po 500 ml 20% glukózy + 20 ml 7,45% KCl). Rychlost infuze glukózy se měnila v závislosti na změnách koncentrace glykémie s cílem udržet izoglykémii. Druhá kanyla v kontralaterální ruce byla používána k odběrům krevních vzorků na stanovení glykémie v intervalu 5 minut a inzulinémie vstupně a během rovnovážného stavu. Glykémie byla měřena pomocí glukometru (Super Glucocard II, Japonsko). Délka trvání clampu byla 3 hodiny, přičemž rovnovážný stav, kdy se stabilní glykémie pohybovala v cílovém rozmezí, byl nastolen minimálně po dobu poslední půl hodiny.

Mezi parametry, vypočítané na základě údajů z clampu, patřily:

- míra ukládání glukózy (M , mg.kg⁻¹.min⁻¹) – množství infundované glukózy nutné k udržení cílových hodnot glykémie
- míra ukládání glukózy korigována na ztráty glukózy močí (M_{korig} , mg.kg⁻¹.min⁻¹)
- metabolická clearance glukózy (MCR_{glc} , ml.kg⁻¹.min⁻¹) – míra vychytávání glukózy vztažena k hodnotě glykémie

- indexy inzulínové senzitivity
 - M/I ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ na $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$) – poměr míry vychytávání glukózy k průměrné koncentraci inzulínu v průběhu rovnovážného stavu
 - $\text{MCR}_{\text{glc}}/I$ ($\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ na $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$) – poměr metabolické clearance glukózy k průměrné koncentraci inzulínu v průběhu rovnovážného stavu

5.7 Statistická analýza dat

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (SPSS Inc., USA). Jednotlivé parametry byly vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standard error of the mean – střední chyba průměru). Za statisticky významné byly považovány rozdíly a korelace, kde p bylo menší než 0,05.

K porovnání výsledků mezi jednotlivými skupinami byla použita jednocestná analýza rozptylu (One-way ANOVA) následovaná Holm-Sidakovým nebo Dunnovým testem a dále párový a nepárový t -test nebo neparametrický Wilcoxonův (Mann-Whitneyův) test. Závislost mezi jednotlivými faktory byla hodnocena pomocí Spearmanova nebo Pearsonova korelačního testu a mnohočetné regresní analýzy. U analýzy genové exprese byla ke korekci falešně pozitivních hodnot při mnohočetném testování použita Benjamini-Hochbergova metoda [488].

6. VLASTNÍ VÝSLEDKY

6.1 Sérové koncentrace a tkáňová exprese nového endokrinního regulátoru FGF-21 (fibroblastový růstový faktor 21) u pacientů s diabetes mellitus 2. typu a obezitou

Cíl práce: Fibroblastový růstový faktor-21 (FGF-21) je nový endokrinní a parakrinní regulátor metabolické homeostázy. Cílem naší práce bylo posoudit jeho koncentrace u pacientů s obezitou s nebo bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu a u zdravých jedinců a zhodnotit vliv zvolených dietních a farmakologických intervencí na jeho sérové hladiny a mRNA expresi.

Metodika: U 26 obézních pacientů bez DM2 (OB), 11 diabetických pacientů s obezitou (T2DM) a 32 zdravých kontrolních subjektů (C) s normální hmotností jsme vyšetřili základní biochemické a hormonální parametry za pomoci standardních laboratorních metod. Sérové hladiny FGF-21 byly stanoveny pomocí komerčního ELISA kitu a k analýze mRNA exprese FGF-21 v podkožní a viscerální tukové tkáni a ve vzorcích jater byla použita metoda RT PCR. Zvolené intervence zahrnovaly akutní hyperinzulinémii v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu, 3 týdny nízkokalorické diety (VLCD – energetický obsah 2500 kJ/den) a tříměsíční podávání agonisty receptorů PPAR α fenofibrátu.

Výsledky: Za bazálních podmínek byly sérové hladiny FGF-21 signifikantně vyšší u obézních pacientek i žen s DM2 v porovnání s kontrolní skupinou (323 ± 35 a 395 ± 56 vs. 213 ± 23 pg/ml, $p < 0.05$), přičemž mezi OB a T2DM skupinou se jeho koncentrace vzájemně nelišily. Tři týdny nízkokalorické diety stejně jako tři měsíce léčby fenofibrátem vedly k významnému zvýšení sérových hodnot FGF-21 (339 ± 60 vs. 587 ± 124 pg/ml, $p < 0,05$ pro VLCD a 364 ± 68 vs. 593 ± 54 pg/ml, $p < 0,05$ pro fenofibrát). Hyperinzulinémie v průběhu clampu měla u T2DM pacientek na rozdíl od kontrolní skupiny za následek signifikantní nárůst koncentrací FGF-21, který se ještě zvýraznil po léčbě fenofibrátem. U obézních žen byla mRNA exprese FGF-21 ve viscerálním tuku zvýšená dvounásobně oproti kontrolní skupině, zatímco v podkožní tukové tkáni nebyl mezi oběma skupinami zaznamenán signifikantní rozdíl. Po 3 týdnech nízkokalorické

diety došlo u obézních pacientek k signifikantnímu vzestupu mRNA exprese FGF-21 v podkožním tuku.

Závěr: Zvýšení sérových koncentrací FGF-21 po nízkokalorické dietě a léčbě fenofibrátem může přispívat k pozitivním metabolickým účinkům těchto intervencí. Získaná data podporují existenci přímého pozitivního vlivu FGF-21 na metabolickou kompenzaci organismu.

Výsledky této práce byly publikovány v časopisu *Clinical Endocrinology*, plný text článku v otištěné verzi je uveden v příloze.

6.2 Sérové koncentrace fibroblastového růstového faktoru 19 u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu: vliv akutní hyperinzulinémie, nízkokalorické diety a podávání agonisty PPAR α

Cíl práce: Fibroblastový růstový faktor 19 (FGF-19) je nedávno objevený regulační protein s endokrinní a parakrinní aktivitou vykazující potenciálně zajímavé účinky na metabolickou a energetickou homeostázu. Cílem naší práce bylo stanovit sérové koncentrace FGF-19 u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu a u kontrolních zdravých subjektů a posoudit vliv zvolených intervencí na tyto hodnoty.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 29 pacientek s obezitou (OB), 19 žen s diabetes mellitus 2. typu (T2DM) a 30 zdravých štíhlých probandek (C). Jako intervence byly zvoleny akutní hyperinzulinémie v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu, nízkokalorická dieta (VLCD, energetický obsah 2500 kJ/den) a léčba agonistou receptorů PPAR α fenofibrátem.

Výsledky: Bazální sérové koncentrace FGF-19 byly signifikantně nižší u obézních jedinců než v kontrolní skupině ($132,1 \pm 12,7$ vs. $202,2 \pm 16,7$ pg/ml, $p < 0,05$), zatímco mezi diabetickými pacientkami a dalšími dvěma skupinami nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl ($189,2 \pm 30,9$ vs. $132,1 \pm 12,7$ pg/ml, n.s. a $189,2 \pm 30,9$ vs. $202,2 \pm 16,7$ pg/ml, n.s.). Akutní hyperinzulinémie měla tendenci snižovat hladiny FGF-19 u T2DM i kontrolní skupiny. Tři týdny nízkokalorické diety neměly u obézních subjektů

vliv na koncentrace FGF-19 ($140,3 \pm 19,7$ vs. $176,1 \pm 27,1$ pg/ml, n.s.). Tříměsíční léčba fenofibrátem vedla u diabetických pacientek k významnému snížení sérového FGF-19 ($194,6 \pm 26,2$ vs. $107,5 \pm 25,0$ pg/ml, $p < 0,05$).

Závěr: Sérové koncentrace FGF-19 byly v naší studii částečně závislé na nutričním stavu jedince, zároveň však neměly prokazatelný vztah k parametrům glukózového metabolismu a inzulínové senzitivity.

Výsledky této práce přijaty k publikaci v časopisu *Physiological Research*, plný text článku je uveden v příloze.

6.3 Vliv nízkokalorické diety na mRNA expresi genů asociovaných se zánětem v podkožní tukové tkáni a periferních monocytech u obézních pacientů s diabetes mellitus 2. typu

Cíl práce: Subklinický zánět představuje jeden z hlavních mechanismů pojících obezitu, diabetes mellitus 2. typu a kardiovaskulární onemocnění. Cílem naší práce bylo prozkoumat expresní profil vybraných genů podílejících se na regulacích zánětlivých reakcí v tukové tkáni a periferních monocytech u obézních pacientů s a bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu za bazálních podmínek a po dietní intervenci.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 12 obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu (T2DM), 8 obézních žen bez přítomnosti diabetes mellitus (OB) a 15 štíhlých zdravých žen (C). Hladiny zvolených biochemických parametrů, hormonů a cytokinů byly stanoveny standardními laboratorními metodami. K analýze byl zvolen panel 39 genů pro faktory účastnící se zánětlivých reakcí s důrazem na chemotaktické působky podílející se na regulaci vstupu imunokompetentních buněk do tukové tkáně. mRNA exprese vybraných genů byla stanovena pomocí RT PCR ve vzorcích podkožní tukové tkáně a izolovaných periferních monocytech za bazálních podmínek a po 2 týdnech nízkokalorické diety (energetický příjem 2500 kJ/den).

Výsledky: V porovnání s kontrolní skupinou vykazovaly diabetické pacientky i obézní ženy bez diabetu signifikantně vyšší sérové hladiny prozánětlivých faktorů (CRP, TNF- α ,

IL-6, IL-8). V podkožní tukové tkáni měly tyto 2 skupiny zvýšenou mRNA expresi makrofágového antigenu CD68 a prozánětlivých chemokinů (CCL-2, -3, -7, -8, -17, -22), která byla doprovázená vyšší expresí komplementárních chemokinových receptorů (CCR-1, -2, -3, -5) a dalších prozánětlivých receptorů (TLR-2, -4, receptory pro TNF α a IL-6) na cirkulujících monocytech, přičemž tento profil byl více vyjádřený u T2DM skupiny. Dva týdny nízkokalorické diety vedly u obézních diabetiček ke snížení tělesné hmotnosti spojené se zlepšením metabolického profilu. V periferních monocytech došlo po dietě k signifikantnímu snížení exprese chemokinových receptorů, zatímco v podkožním tuku klesla exprese chemokinů CCL-8 a CXCL-10 a výrazně vzrostla exprese chemokinu CCL-17.

Závěr: Obezita byla v naší studii spojena se zvýšenou expresí chemotaktických a prozánětlivých faktorů v podkožní tukové tkáni a odpovídajících receptorů na periferních monocytech. Přítomnost diabetes mellitus 2. typu tento expresní profil dále potencovala, zatímco 2 týdny nízkokalorické diety vedly u obézních diabetických pacientů k jeho signifikantnímu zlepšení.

Výsledky této práce byly publikovány v časopise Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, plný text článku v otištěné verzi je uveden v příloze.

7. DISKUSE

Skupina fibroblastových růstových faktorů s endokrinní aktivitou, zahrnující FGF-19, FGF-21 a FGF-23, představuje nedávno identifikovanou rodinu působků podílejících se na regulaci celé řady biologických procesů včetně metabolické a hormonální homeostázy. Vzhledem k tomu, že jejich objev se datuje jen několik let zpět a díky komplexnosti jejich účinků, jsou poznatky o přesných mechanismech jejich působení, obzvláště u lidí, poměrně kusé a nejednoznačné. Experimentální práce však naznačily jejich význam v patogeneze řady metabolických poruch, stejně jako jejich potenciální uplatnění při léčbě některých z těchto onemocnění včetně diabetes mellitus 2. typu a dalších komponent metabolického syndromu. V naší práci jsme se proto zaměřili na zkoumání faktorů FGF-21 a FGF-19, vykazujících nejtěsnější vztah k regulaci významných metabolických drah účastnících se proměny základních substrátů včetně sacharidů, lipidů a žlučových kyselin.

Výsledky experimentálních studií na zvířecích modelech prokázaly, že FGF-21, tvořený primárně v játrech, představuje důležitý metabolický regulátor nutný pro aktivaci jaterní oxidace lipidů, metabolismus triglyceridů a tvorbu ketolátek při ketogenní dietě. U myši je FGF-21 klíčovým mediátorem pleiotropních účinků receptorů PPAR α , které jsou pokládány za hlavní regulátor adaptačních reakcí při hladovění [22, 84, 489, 490]. Jako ještě důležitější se ukazuje poznatek, že exogenní podávání FGF-21 vede k významnému snížení glykémie u diabetických hlodavců i primátů [32, 80], což naznačuje potenciál FGF-21 jako možného terapeutického agens při léčbě diabetes mellitus 2. typu a dalších složek metabolického syndromu [489].

Na rozdíl od značného množství dat z experimentálních studií, jsou účinky a regulace FGF-21 u lidí zatím prozkoumány jen málo. Ve 2 průřezových studiích byly hladiny FGF-21 zvýšené u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu a zároveň představovaly nezávislý rizikový faktor pro vznik metabolického syndromu [99, 100]. V naší práci jsme potvrdili, že vyšší sérové koncentrace FGF-21 jsou asociovány s obezitou a diabetes mellitus 2. typu a že jsou dále zvyšovány podáváním agonisty PPAR α a kalorickou restrikcí. Uvedené údaje jsou v souladu s daty ze zvířecích studií, kde bylo prokázáno 25-násobné zvýšení mRNA exprese FGF-21 v játrech po hladovění nebo po užívání PPAR α agonistů [21]. Zvýšení hladin FGF-21 po nízkokalorické dietě

proto může být alespoň zčásti důsledkem aktivace PPAR α při adaptaci na hladovění. Tři týdny nízkokalorické diety vedly kromě poklesu hmotnosti i ke zlepšení inzulínové senzitivity (stanovené pomocí HOMA indexu), což naznačuje, že některé pozitivní účinky redukční diety mohou být důsledkem zvýšení sérových koncentrací FGF-21. Na rozdíl od uvedeného zvýšilo podávání agonisty PPAR α fenofibrátu diabetickým pacientům hladiny FGF-21 v podobném rozsahu jako tomu bylo u restriktce příjmu potravy, přičemž však nebyla zaznamenána žádná změna v parametrech inzulínové senzitivity měřených izoglykemickým hyperinzulinemickým clampem. Po léčbě fenofibrátem došlo navíc k mírnému zhoršení diabetické kompenzace, což nepodporuje hypotézu, že by endogenní zvýšení FGF-21 mělo být primárně odpovědné za zlepšení inzulínové senzitivity u této skupiny pacientů. Uvedené výsledky však mohou být zkresleny relativně nízkým počtem pacientů zařazených do studie a použitím ne zcela přesných parametrů pro měření inzulínové senzitivity (HOMA index) u některých podskupin.

Mezi další důležité poznatky vyplývající z naší práce, patří fakt, že krátkodobá hyperinzulinémie v průběhu clampu ovlivňuje sérové hladiny FGF-21 jinak u obézních diabetiků a jinak u zdravých štíhlých osob. U pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu došlo v průběhu tříhodinového izoglykemického hyperinzulinemického clampu k signifikantnímu vzestupu koncentrací FGF-21, zatímco v kontrolní skupině naopak hodnoty FGF-21 v polovině clampu přechodně poklesly. Získaná data nám v tuto chvíli neumožňují identifikovat přesné příčiny a význam odlišné regulace FGF-21 během krátkodobé hyperinzulinémie u různých subjektů. Jednou z možností je, že zvýšení hladin FGF-21 může u inzulínorezistentních diabetiků 2. typu představovat kompenzační mechanismus sloužící ke zvýšení vychytávání glukózy alterovaném inzulínovou rezistencí. Celkově však získané výsledky svědčí pro to, že i u lidí (podobně jako u experimentálních zvířecích modelů) jsou sérové hladiny FGF-21 regulovány v závislosti na nutričním stavu organismu. Nález zvýšených koncentrací FGF-21 u obézních jedinců a jejich další potenciace nízkokalorickou dietou potvrzují naše předchozí výsledky u chronicky podvyživených pacientek trpících mentální anorexií, u kterých byly hodnoty FGF-21 snižené [107]. Definitivní prokázání významu uvedených poznatků při vzniku

inzulínové rezistence nebo naopak ochraně před jejími negativními účinky však vyžaduje provedení dalších studií zahrnujících rozsáhlejší pacientské populace.

I když u myši byla jako hlavní zdroj FGF-21 identifikována játra [22, 30, 54], u lidí byla mRNA exprese FGF-21 detekována i v podkožní tukové tkáni, kde zároveň pozitivně korelovala se sérovým FGF-21 [99]. V naší práci jsme stanovovali mRNA expresi FGF-21 v podkožní a viscerální tukové tkáni a ve vzorcích z jaterního parenchymu. Na rozdíl od Zhanga a kol [99] jsme nenašli signifikantní rozdíl v expresi FGF-21 v podkožním tuku mezi obézními jedinci a kontrolní skupinou. U obézních pacientů jsme však zachytili zvýšenou expresi FGF-21 ve viscerální tukové tkáni v porovnání se štíhlými kontrolními subjekty. Jelikož u myši byla mRNA exprese FGF-21 zvýšená po podání agonistů receptorů PPAR γ [491], v dalším kroku jsme analyzovali vztah mezi expresí PPAR γ a FGF-21. Nepodařilo se nám prokázat žádný signifikantní rozdíl v mRNA expresi receptorů PPAR γ mezi štíhlými a obézními jedinci ani v subkutánní ani ve viscerální tukové tkáni, což naznačuje, že aktivace PPAR γ nehraje zásadní roli při zvýšení hladin FGF-21 spojeném s obezitou.

K posouzení míry, kterou tuková tkáň přispívá k celkové produkci FGF-21, jsme změřili jeho mRNA expresi i v játrech, která jsou u zvířat pokládána za hlavní zdroj FGF-21. Ukázalo se, že exprese FGF-21 je více než 100-násobně vyšší v lidském jaterním parenchymu než v tukové tkáni, což potvrzuje, že i u lidí představují játra nejdůležitější místo tvorby FGF-21.

Celkově je možné na základě našich výsledků konstatovat, že sérové hladiny FGF-21 jsou zvýšené u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu v porovnání s jedinci s normální hmotností. Nízkokalorická dieta stejně jako podávání agonisty PPAR α vedly k dalšímu navýšení koncentrací FGF-21, přičemž ke zlepšení inzulínové senzitivity došlo jenom u pacientů po kalorické restrikci. Objasnění přesné role FGF-21 v patogeneze inzulínové rezistence, diabetes mellitus 2. typu a přidružených metabolických komplikací stejně jako ověření jeho terapeutického potenciálu, naznačeného studiemi na zvířatech, však bude ještě vyžadovat intenzivní výzkumné úsilí.

FGF-19 je další recentně objevený regulační protein, patřící do stejné podskupiny endokrinně aktivních fibroblastových růstových faktorů jako FGF-21. FGF-19 hraje

ústřední roli při supresi syntézy a sekrece žlučových kyselin. Jelikož je metabolismus žlučových kyselin úzce spjat s dalšími metabolickými drahami, obzvláště s metabolismem lipidů [492, 493], nabízí se zajímavá hypotéza, že by se FGF-19 mohl podílet i na regulaci dalších procesů, včetně metabolismu cholesterolu, triglyceridů, lipoproteinů a glukózy [30, 50]. Hlodavci zvýšeně exprimující FGF-19 se vyznačují nižší tělesnou hmotností a zlepšenou glukózovou tolerancí a inzulínovou senzitivitou ve srovnání s kontrolními zvířaty. Navíc jsou chráněni před vznikem obezity indukované vysokotukovou dietou [30]. Podobné výsledky přineslo i exogenní podávání rekombinantního FGF-19 myším. I zde vedlo k poklesu tělesné hmotnosti a snížení glykémie, inzulinémie a hladin cholesterolu a triglyceridů [50].

U lidí nejsou údaje týkající se vztahu FGF-19 k různým metabolickým parametrům tak jednoznačné. V naší předchozí studii jsme ukázali, že u pacientek s mentální anorexií a těžkou malnutricí nebyly hladiny FGF-19 ovlivněny nutričním stavem a zároveň ani nevykazovaly žádný vztah ke zkoumaným metabolickým parametrům [107]. Schreuder a kol. nenašli přímý vztah mezi inzulínovou rezistencí stanovenou pomocí HOMA indexu a tvorbou FGF-19 ve střevě u pacientů s nealkoholickou jaterní steatohepatitidou (NASH), i když u pacientů s inzulínovou rezistencí byl inhibiční efekt FGF-19 na tvorbu žlučových kyselin oslabený [494]. V nedávno provedené studii Brufaua a kol. se sérové koncentrace FGF-19 mezi pacienty s diabetes mellitus 2. typu a zdravými jedinci nelišily [495]. Na rozdíl od toho prokázal Reiche a kol. negativní korelaci mezi sérovým FGF-19 a lačnou glykemií u zdravých probandů [496]. Naše výsledky naznačují, že FGF-19 koreluje negativně s body mass indexem (BMI), přičemž tato korelace byla nejvýraznější u osob s nejtěžší obezitou (3. stupeň obezity s BMI > 40 kg/m²), zatímco u diabetických pacientů s průměrným BMI ~ 36 kg/m² byly hodnoty FGF-19 oproti kontrolní skupině jenom mírně snižené. Pozitivní korelace mezi FGF-19 a sérovým adiponektinem, která byla přítomná u všech studovaných podskupin, dále rozšiřuje obdobný nález u chronicky dialyzovaných pacientů [496] na další patientské subpopulace. Uvedená data naznačují existenci vztahu mezi FGF-19 a regulací endokrinní funkce tukové tkáně, která významně ovlivňuje metabolismus glukózy a inzulínovou senzitivitu [497, 498].

Tři týdny nízkokalorické diety vedly u obézních diabetiků 2. typu k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti, snížení glykémie, inzulinémie a HOMA indexu inzulínové

rezistence a lehké úpravě lipidového profilu. Hladiny FGF-19 vykazovaly mírnou tendenci k růstu, rozdíl však nedosahoval statistické významnosti. U hladovců bylo hladovění spojeno se zvýšenou produkcí FGF-15 (myšího ortologu FGF-19) a sníženou expresí FGF receptoru 4 v játrech. Zároveň došlo ke zvýšení exprese CYP7A1, klíčového regulačního enzymu syntézy žlučových kyselin, a to mechanismy nezávislými na ose FGF-15 – FGFR4 (hlavně snížením inzulínem mediované suprese CYP7A1) [499]. Zda se podobné procesy mohou uplatňovat i u lidí a zda i FGF-19 (podobně jako FGF-21) hraje určitou roli při adaptaci na hladovění, zatím ze získaných výsledků není jasné. Je však možné konstatovat, že sérové hladiny FGF-19 jsou alespoň částečně ovlivněny nutričním stavem a tělesnou hmotností, obzvláště při vyšších stupních obezity. Chybění jednoznačného spojení mezi hladinami FGF-19 a parametry glukózového metabolismu a inzulínové senzitivity je v souladu s výsledky podobných studií u lidí, které zatím neprokázaly existenci kauzálního vztahu mezi FGF-19 a poruchami glukózové homeostázy [494, 495].

Metabolismus žlučových kyselin je těsně spjat s metabolickými drahami pro cholesterol a triglyceridy. Exkrece žlučových kyselin představuje hlavní způsob vylučování cholesterolu a sekvestrace žlučových kyselin pomocí resínů (žlučových sekvestrantů) vede ke snížení celkového a LDL cholesterolu a zvýšení HDL cholesterolu a triglyceridů v séru [493, 500, 501]. Nejdůležitějším faktorem propojujícím tvorbu žlučových kyselin s metabolismem lipidů je Farnesoidní X receptor (FXR), který je považován za hlavní induktor syntézy FGF-19. FXR inhibuje expresi řady lipogenních genů a stimuluje aktivitu lipoproteinové lipázy (LPL) a receptorů pro VLDL [492, 502]. FXR také aktivuje receptory PPAR α , čímž podporuje katabolismus VMK [503]. Přesná úloha FGF-19 v uvedených procesech zatím není známa. U laboratorních zvířat inhibuje FGF-19 expresi několika enzymů regulujících syntézu mastných kyselin [30, 50]. Ve studii Brufaua a kol vedlo podávání sekvestrantu žlučových kyselin colesevelamu ke zlepšení diabetické kompenzace a zároveň snížení bazálních a postprandiálních hladin FGF-19 u pacientů s diabetes mellitus 2. typu i u zdravých dobrovolníků. Zároveň však nebyla prokázána přímá souvislost mezi parametry glukózového metabolismu a hodnotami FGF-19 nebo žlučovými kyselinami [495]. Podobně se i v naší práci nepodařilo zachytit žádnou korelaci mezi hladinami FGF-19 a složkami lipidového spektra.

Jelikož fibráty jako hypolipidemika s primárním účinkem na triglyceridy působí, podobně jako FXR, přes receptor PPAR α , v další části naší práce jsme se zaměřili na posouzení vlivu podávání fenofibrátu na hladiny FGF-19 s cílem zjistit, zda pozitivní metabolické efekty léčby fibráty mohou alespoň částečně souviset se změnami koncentrací FGF-19. Tříměsíční léčba fenofibrátem vedla u hypertriglyceridemických pacientů ke snížení sérových triglyceridů bez změny tělesné hmotnosti nebo hodnot celkového a HDL cholesterolu. Hladiny FGF-19 po podávání fenofibrátu výrazně poklesly, což naznačuje, že fibrátem vyvolaná aktivace PPAR α není doprovázená indukcí tvorby FGF-19.

Stále více důkazů naznačuje v poslední době důležitost žlučových kyselin a jejich receptorů při regulaci účinků inzulínu [492]. *In vitro* a experimentální studie poukázaly na fakt, že aktivace FXR vede ke zlepšení inzulínové senzitivity a inzulínem stimulovaného vychytávání glukózy [504, 505]. Stimulace hepatálního FXR snížila jaterní glukoneogenezu, zvýšila tvorbu glykogenu a snížila hodnoty glykémie [505, 506]. U myši docházelo působením inzulínu k nárůstu jaterní exprese FGF receptoru 4, představujícího hlavní jaterní izoformu FGF receptorů [499]. Podobně jako FGF-19 i inzulín snižuje syntézu žlučových kyselin tím, že inhibuje expresi jejich klíčového regulačního enzymu CYP7A1. Ukázalo se, že FGF-15, myší ortolog FGF-19, a inzulín působí v játrech částečně přes stejnou dráhu, kde hlavní styčný bod představuje transkripční faktor FoxO1 (forkhead transcriptional factor 1), který kontroluje expresi jednak CYP7A1, jednak řady genů účastnících se glukoneogenezy [499]. K posouzení vlivu krátkodobé hyperinzulinémie na sérové koncentrace FGF-19 jsme provedli hyperinzulinemický izoglykemický clamp u diabetických pacientů léčených fenofibrátem a v kontrolní skupině zdravých jedinců. I když obě skupiny začínaly na přibližně stejných hodnotách FGF-19, po 90 minutách došlo u diabetiků k prudkému poklesu jeho koncentrací, po kterém následoval pomalý vzestup přetrvávající do konce clampu. U kontrolních subjektů hladina FGF-19 v průběhu celé procedury postupně kontinuálně klesala, přičemž na závěr dosahovala téměř stejné hodnoty jako v diabetické skupině. Jako velice zajímavé se ukázaly výsledky clampové studie po 3 měsících užívání fenofibrátu, kde vstupní hodnoty FGF-19 byly o polovinu nižší než před léčbou, zároveň však akutní hyperinzulinémie v průběhu clampu nedokázala signifikantně ovlivnit jeho

koncentrace ani v jednom směru. Uvedené údaje naznačují, že v regulaci hladin FGF-19 se kromě působení žlučových kyselin ve střevě uplatňují i jiné mechanismy, přičemž jedním z nich by mohl být např. přímý účinek inzulínu na syntézu FGF-19. Na spojení mezi FGF-19 a inzulínem se však mohou podílet i jiné, nepřímé faktory. Jedním z nejslibnějších kandidátů se zdají být volné mastné kyseliny (VMK), jelikož jejich tvorba je téměř úplně inhibována v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu a k jejich snížení dochází i při aktivaci PPAR α prostřednictvím fibrátů [507].

Celkově se nám v části naší práce, věnované FGF-19, podařilo prokázat, že FGF-19 koreluje negativně s BMI a je signifikantně zvýšený u pacientů s vysokým stupněm obezity v porovnání s jedinci s normální hmotností. Nízkokalorická dieta neměla žádný vliv na hodnoty FGF-19, zatímco podávání agonisty PPAR α fenofibrátu vedlo k jejich signifikantní redukci. Akutní hyperinzulinémie vykazovala tendenci snižovat sérové hladiny FGF-19, což naznačuje existenci dalších regulačních mechanismů kromě přímého působení žlučových kyselin na střevní FXR receptory. I přes to, že se nám, podobně jako jiným skupinám, nepodařilo prokázat žádný přímý vztah mezi FGF-19 a přítomností diabetes mellitus 2. typu nebo některým z parametrů glukózového metabolismu a inzulínové senzitivity, představuje další upřesnění jeho úlohy v komplexu reakcí integrujících metabolismus žlučových kyselin, lipidů a glukózy důležitý cíl v rámci výzkumu patofyziologických mechanismů uplatňujících se při vzniku diabetes mellitus a metabolického syndromu.

Chronický subklinický zánět představuje jeden z ústředních mechanismů podílejících se na patogenezi obezity a s ní souvisejících metabolických a kardiovaskulárních komplikací [7]. Vzhledem k tomu, že stěžejní úloha při vzniku prozánětlivého stavu je připisována infiltraci makrofágů do tukové tkáně, v poslední části naší práce jsme se zaměřili na zkoumání faktorů podílejících se na vzájemné interakci mezi periferními monocyty a tukovou tkání. Hlavním objektem našeho zájmu byly vybrané chemotaktické cytokiny a jejich receptory, stejně jako další prozánětlivé faktory podílející se na iniciaci a propagaci vstupu makrofágů do tukové tkáně, přičemž jsme kromě bazálních podmínek sledovali i vliv krátkodobé kalorické restrikce na expresi uvedených působků.

Předchozí studie prokázaly, že většina tukových makrofágů pochází ze zdrojů mimo tukovou tkáň [111, 279]. Za hlavní faktory, účastníci se vstupu makrofágů do tukové tkáně, jsou v současnosti pokládány chemokiny a jejich příslušné receptory [361, 385]. V tukové tkáni obézních jedinců byla prokázána zvýšená mRNA exprese chemokinů z CC podskupiny, včetně CCL-2, CCL-3, CCL-5, CCL-7, CCL-8 a CCL-11 [282, 394, 476, 508], přičemž míra exprese ve většině prací pozitivně korelovala se stupněm infiltrace tkáně makrofágy, což svědčí o významu chemokinů pro regulaci vstupu mononukleárních buněk do tukové tkáně [385, 388]. V naší práci se nám jako prvním podařilo prokázat zvýšenou expresi dalších 2 CC chemokinů u obézních pacientů s i bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu, a to chemokinů CCL-17 a CCL-22, což jsou faktory podílející se především na chemotaxi T_H2 lymfocytů (pomocné T lymfocyty 2. typu) [361]. Podkožní tuková tkáň obézních jedinců vykazovala zvýšenou expresi 4 chemokinů (CCL-3, CCL-7, CCL-17 a CCL-22) v porovnání se štíhlými kontrolami, což svědčí pro fakt, že i samotná obezita významně zvyšuje chemotaktický potenciál tukové tkáně. Oproti obézním pacientům došlo u diabetiků 2. typu k další akcentaci exprese 3 ze 4 uvedených chemokinů doprovázené navíc zvýšením exprese dvou dalších potentních CC chemokinů CCL-2 a CCL-8. Zároveň se podkožní tuk diabetických pacientů vyznačoval sníženou expresí protizánětlivých faktorů, jako jsou adiponektin a adiponektinový receptor 1 (AdipoR1) a nárůstem exprese prozánětlivého rezistinu. Celkově tak naše výsledky prokazují, že podkožní tuková tkáň obézních jedinců se nachází v prozánětlivém stavu charakterizovaném zvýšenou tvorbou signálů atrahujících hlavně makrofágy a T lymfocyty, přičemž přítomnost diabetes mellitus 2. typu je spojená s další potenciací tohoto chemotaktického a prozánětlivého profilu.

Chemokiny působí na cílové buňky prostřednictvím specifických chemokinových receptorů (pro CC chemokiny jsou to CC receptory - CCR) [361]. Zvýšená exprese několika CC receptorů včetně CCR-1, CCR-2, CCR-3 a CCR-5, byla prokázána v podkožní i viscerální tukové tkáni obézních jedinců [282]. U našich obézních diabetiků se zvýšeně exprimovaly jenom receptory CCR-1 a CCR-5, přičemž u jedinců s obezitou ale bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu nebylo zaznamenána zvýšená exprese žádného ze zkoumaných CCR v porovnání se štíhlými kontrolami. Naopak, na periferních monocytech obou těchto skupin došlo k významnému nárůstu exprese 3 ze 4

CC receptorů (CCR-1, CCR-2 a CCR-5 u T2DM a CCR-1, CCR-2 a CCR-5 u obézní skupiny), které přesně doplňovalo nadměrnou expresi CC chemokinů z podkožního tuku. Uvedené nálezy podporují existenci intenzivních cytokinových a hormonálních interakcí mezi tukovou tkání a cirkulujícími monocyty jako jedné ze základních součástí vzniku subklinického zánětu u obezity a asociovaných metabolických onemocnění.

Periferní monocyty našich pacientů s diabetes mellitus 2. typu zvýšeně exprimovaly i další prozánětlivé receptory [324, 333, 509], včetně toll-like receptorů 2 a 4 a receptorů pro IL-6 (IL-6R) a TNF- α (TNFRSF 1A a 1B), stejně jako odpovídající zánětlivé cytokiny TNF α , rezistin a prolaktin, což dále přispívalo k prozánětlivému fenotypu cirkulujících mononukleárů. Získaná data poukazují na význam periferních monocytů jako důležitého faktoru přispívajícího k přechodu od prosté obezity k plně vyjádřeným poruchám glukózové homeostázy.

V předchozích studiích byla i mírná redukce tělesné hmotnosti (~5-10% z výchozí hodnoty) spojena s redukcí inzulínové rezistence a zlepšením glykemické kompenzace u obézních pacientů s DM2, vedoucím ke snížení morbidity a mortality a zlepšení prognózy pacientů [510]. V další části naší práce jsme se proto zaměřili na posouzení vlivu nízkokalorické diety na expresní profil chemoatraktivních a prozánětlivých genů v obou typech tkání u osob s obezitou a diabetes mellitus 2. typu. Dva týdny kalorické restrikce (energetický příjem 2500 kJ/den) signifikantně zredukovaly tělesnou hmotnost, zlepšily metabolické parametry a snížily míru subklinického zánětu. Cirkulující cytokiny a adipokiny reagovaly na dietu různým způsobem, přičemž došlo k očekávanému poklesu hladin leptinu a IL-6 a naopak lehkému a ne zcela očekávanému zvýšení koncentrací TNF- α . Nejzajímavějším poznatkem získaným z této části naší práce však byl fakt, že i relativně krátce trvající kalorická restrikce stačila navodit významnou a konzistentní redukci mRNA exprese téměř všech chemokinových a cytokinových receptorů na periferních monocytech. I když u exprese chemokinů nedošlo k signifikantní změně, nižší množství povrchových CCR může vést ke snížení vstupu monocytů do tukové tkáně, což by mohlo představovat jeden z mechanismů odpovědných za pozitivní metabolické efekty krátkodobé nízkokalorické diety.

Na druhou stranu nebyla po 2 týdnech kalorické restrikce zaznamenána téměř žádná změna v mRNA expresi komplementárně zvýšených cytokinů v podkožní tukové tkáni.

Očekávaný pokles exprese leptinu byl doprovázen snížením exprese jenom u 2 chemokinů – CCL-8 a CXCL-10, což naznačuje, že monocyty jsou krátkodobou dietou ovlivněny více než podkožní tuk a podporuje hypotézu, že právě cirkulující mononukleární buňky jsou jedním z primárních mediátorů účinku VLCD a mohou hrát důležitou, i kdy zatím nedostatečně poznanou roli v patogeneze diabetes mellitus 2 typu.

Dalším novým poznatkem vyplývajícím z naší práce byl nález 7-násobného zvýšení mRNA exprese chemokinů CCL-17 v podkožní tukové tkáni obézních diabetiků po 2 týdnech VLCD. CCL-17 působí jako silný chemoatraktant pro T_H2 lymfocyty, zralé dendritické buňky, bazofily a makrofágy [361]. Recentní studie prokázaly, že akumulace T lymfocytů předchází infiltraci makrofágů do tukové tkáně, což naznačuje, že právě zvýšení množství jistých subpopulací T lymfocytů může být primárním impulzem k iniciaci vstupu makrofágů [475, 478]. Také se ukázalo, že pro průběh zánětlivé reakce je důležitý poměr T_H1 a T_H2 lymfocytů [478]. T_H1 buňky mají prozánětlivé vlastnosti a podporují diferenciaci tukových makrofágů směrem k zánětlivému M1 fenotypu. T_H2 lymfocyty naopak působí aktivačně na protizánětlivé M2 makrofágy. Dietou indukovaná obezita přesouvá makrofágový fenotyp z M2 k prozánětlivému M1 stavu, přičemž uvedený přesun je hlavně způsoben vstupem makrofágů z periferní cirkulace a ne změnou *in situ* M2 makrofágů na M1 fenotyp [434, 436]. Zvýšení chemokinů CCL-17, atrahujícího hlavně T_H2 lymfocyty, v podkožním tuku po nízkokalorické dietě může vést ke zvýšené infiltraci T_H2 buněk do tukové tkáně s následným zvýšením množství protizánětlivých M2 makrofágů. Jelikož jsme v naší práci nestanovovali zastoupení jednotlivých buněčných řad v tukové tkáni, nemůžeme na základě aktuálních výsledků navrhanou hypotézu zatím potvrdit. Přesná úloha chemokinů CCL-17 a potenciální zdroje jeho zvýšené exprese po VLCD však určitě představují lákavý terč dalších výzkumů zabývajících se přesnými mechanismy vzniku a rozvoje zánětu v tukové tkáni.

V poslední části naší práce jsme tedy prokázali, že podkožní tuková tkáň stejně jako periferní monocyty obézních pacientů vykazují silný chemoatrakční expresní profil s komplementárně zvýšenou expresí chemotaktických faktorů v tukové tkáni a jejich příslušných receptorů na cirkulujících mononukleárních buňkách. Přítomnost diabetes mellitus 2. typu uvedený profil dále potencovala. Dva týdny nízkokalorické diety signifikantně zlepšovaly metabolický profil a snižovaly subklinický zánět u obézních

diabetiků, přičemž tyto efekty byly s velkou pravděpodobností alespoň z části zprostředkované zlepšením expresního profilu chemokinových a cytokinových receptorů na periferních monocytech a možná též zvýšenou expresí chemokinů CCL-17 v podkožním tuku.

8. ZÁVĚR A SHRUTÍ VÝSLEDKŮ PRÁCE

Intenzivní výzkum věnovaný obezitě, diabetes mellitus 2. typu a dalším metabolickým odchylkám podílejícím se na rozvoji aterosklerózy a kardiovaskulárních komplikací přináší zvláště v poslední době nepřeborné množství informací o nových látkách a mechanismech podílejících se na etiopatogeneze těchto civilizačních nemocí. Do uvedené skupiny patří i recentně objevené látky ze skupiny fibroblastových růstových faktorů s endokrinními účinky, které svým regulačním působením ovlivňují pochody ve většině metabolicky aktivních tkání a orgánů. Pozitivní vliv těchto faktorů na celkový metabolický profil, naznačený experimentálními *in vitro* a zvířecími studii, z nich činí potenciálně velice lákavý cíl nejrůznějších terapeutických intervencí. Přesné a jednoznačné údaje o jejich vlivech a mechanismech účinku, které by umožnily plně využít potenciál skrývající se v modulaci jejich regulačních funkcí, však obzvláště u lidí zatím pořád chybí. Proto bylo jedním z hlavních cílů naší práce přinést další poznatky o dvou endokrinně aktivních fibroblastových růstových faktorech podílejících se na regulaci procesů intermediárního metabolismu, FGF-21 a FGF-19, v kontextu jeho nejčastějších poruch jako jsou obezita a diabetes mellitus 2. typu.

Fibroblastový růstový faktor 21 je regulační protein produkovaný dominantně v játrech a podílející se na řízení metabolismu glukózy a lipidů a energetické bilance organismu. Za hlavní místo jeho působení se považují játra, pankreas a tuková tkáň. U zvířat hraje FGF-21 důležitou roli při adaptaci na hladovění a jeho exogenní přívod vede ke zlepšení metabolických parametrů u laboratorních hlodavců i primátů. V naší studii jsme ukázali, že hladiny FGF-21 jsou signifikantně zvýšené u pacientů s obezitou s i bez přítomnosti diabetes mellitus 2. typu v porovnání se štíhlými subjekty. Dále jsme prokázali, že nízkokalorická dieta stejně jako podávání agonisty PPAR α vedou k dalšímu zvýšení hodnot FGF-21, zatímco inzulinová senzitivita se zlepšila jenom u subjektů po kalorické restrikci. Způsob ovlivnění koncentrací FGF-21 akutní hyperinzulinémií závisel na přítomnosti poruchy metabolismu glukózy – u pacientů s diabetes mellitus 2. typu došlo v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického clampu ke vzestupu hladin FGF-21, zatímco u zdravých štíhlých jedinců jeho hodnoty přechodně spíše klesaly. Získané výsledky svědčí pro to, že i u lidí (podobně jako u experimentálních zvířecích modelů) jsou sérové hladiny FGF-21 regulovány v závislosti na nutričním stavu organismu.. Je

možné, že zvýšení koncentrací FGF-21 představuje u inzulín-rezistentních diabetiků 2. typu jistý druh kompenzačního mechanismu sloužícího ke zvýšení vychytávání glukózy alterovaného inzulínovou rezistencí. Potvrzení nebo vyvrácení uvedené hypotézy však vyžaduje provedení dalších studií.

Fibroblastový růstový faktor 19, produkovaný především v enterocytech, představuje hlavní supresor syntézy žlučových kyselin a zároveň inhibuje i vyprazdňování žlučníku. Zvířecí studie naznačily jeho potenciálně pozitivní vliv na metabolismus lipidů a sacharidů, i když dosavadní výsledky u lidí jsou spíše inkonzistentní. V naší práci se podobně jako v jiných studiích nepodařilo prokázat přímou asociaci mezi hladinami FGF-19 a parametry glukózového metabolismu nebo inzulínové senzitivity (ať už vypočítanými na základě HOMA indexu nebo změřenými přímo pomocí hyperinzulinemického izoglykemického clampu). Na druhou stranu sérové koncentrace FGF-19 korelovaly negativně s tělesnou hmotností, přičemž tento vztah byl vyjádřen obzvláště u osob s vysokým stupněm obezity. Analogicky se nám podařilo prokázat pozitivní korelaci mezi FGF-19 a adiponektinem, což rozšiřuje obdobné poznatky získané u chronicky hemodialyzovaných pacientů i na osoby s obezitou a diabetes mellitus 2. typu, stejně jako na zdravé štíhlé jedince. Nízkokalorická dieta neměla žádný vliv na hodnoty FGF-19, zatímco podávání agonisty PPAR α vedlo k jejich signifikantní redukci. Akutní hyperinzulinémie vykazovala tendenci snižovat sérové hladiny FGF-19, což naznačuje existenci dalších regulačních mechanismů kromě přímého působení žlučových kyselin na střevní buňky.

Subklinický zánět je považován za jeden z hlavních mechanismů integrujících obezitu, diabetes mellitus 2. typu a další komponenty metabolického syndromu. Hlavní úloha při vzniku lokálního zánětu v tukové tkáni a následně i systémové zánětlivé reakci je v současnosti připisována infiltraci tukové tkáně imunokompetentními buňkami, obzvláště makrofágy, pocházejícími z periferní cirkulace. Přesné mechanismy interakce tukové tkáně a periferních monocytů (prekurzorů tkáňových makrofágů) však dosud nejsou plně objasněny. Ve snaze blíže charakterizovat jejich vzájemnou souhru jsme se proto v poslední části naší práce zaměřili na posouzení exprese chemotaktických a dalších prozánětlivých faktorů a jim odpovídajících receptorů v podkožní tukové tkáni a periferních monocytech obézních jedinců s diabetes mellitus 2. typu. Naše výsledky

prokázaly, že podkožní tuková tkáň obézních pacientů zvýšeně exprimuje celou paletu chemotaktických cytokinů, působících primárně na mononukleární buňky. Ty se zároveň vyznačují nadměrnou expresí korespondujících chemokinových a cytokinových receptorů. Přítomnost diabetes mellitus 2. typu uvedený chemoatrakční a prozánětlivý profil dále potencovala. Zlepšení metabolického a zánětlivého stavu po krátkodobé kalorické restrikci bylo alespoň z části zprostředkováno úpravou expresního profilu chemokinových a cytokinových receptorů na periferních monocytech, i když se na něm mohla podílet i zvýšená exprese některých chemokinů v podkožní tukové tkáni (CCL-17). Získané poznatky identifikují periferní monocyty jako důležitý a dosud málo zdůrazňovaný faktor účastnící se patogeneze obezity a diabetes mellitus 2. typu, který je možné rychle a pozitivně ovlivnit dietní intervencí.

I přes veškeré úsilí věnované v poslední době léčbě a prevenci současné pandemie obezity a diabetes mellitus 2. typu, zaujímají metabolická, kardiovaskulární a další onemocnění asociována s nadměrnou akumulací tělesného tuku pořád první příčky v žebříčcích morbidity a mortality v naší společnosti. Hlubší pochopení patofyziologických mechanismů vedoucích k rozvoji uvedených poruch lze pokládat za základní podmínku k identifikaci inovativních terapeutických strategií schopných kauzálně zasáhnout do patogeneze obezity a přidružených onemocnění. Věříme, že v uvedeném kontextu představují nové poznatky týkající se fibroblastových růstových faktorů 19 a 21 a vzájemné souhry mezi tukovou tkání a periferními monocyty pomocí chemotaktických faktorů a jejich receptorů v přítomnosti obezity a diabetes mellitus 2. typu předkládané v této práci krok správným směrem.

9. LITERATURA

1. WHO. *Obesity and Overweight Fact Sheet*. 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. WHO. *Diabetes Fact Sheet*. 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
3. Matoulek, M., S. Svacina, and J. Lajka, [*The incidence of obesity and its complications in the Czech Republic*]. *Vnitr Lek*. **56**(10): p. 1019-27.
4. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *Fibroblast growth factors*. *Genome Biol*, 2001. **2**(3): p. REVIEWS3005.
5. Itoh, N. and D.M. Ornitz, *Evolution of the Fgf and Fgfr gene families*. *Trends Genet*, 2004. **20**(11): p. 563-9.
6. Popovici, C., et al., *An evolutionary history of the FGF superfamily*. *Bioessays*, 2005. **27**(8): p. 849-57.
7. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
8. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1785-8.
9. Gospodarowicz, D., *Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth*. *Nature*, 1974. **249**(453): p. 123-7.
10. Kharitononkov, A., *FGFs and metabolism*. *Curr Opin Pharmacol*, 2009. **9**(6): p. 805-10.
11. Goetz, R., et al., *Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(9): p. 3417-28.
12. Mohammadi, M., S.K. Olsen, and O.A. Ibrahimi, *Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. **16**(2): p. 107-37.
13. Zhang, X., et al., *Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(23): p. 15694-700.
14. Pelech, S.L., B.B. Olwin, and E.G. Krebs, *Fibroblast growth factor treatment of Swiss 3T3 cells activates a subunit S6 kinase that phosphorylates a synthetic peptide substrate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(16): p. 5968-72.
15. Carballada, R., H. Yasuo, and P. Lemaire, *Phosphatidylinositol-3 kinase acts in parallel to the ERK MAP kinase in the FGF pathway during Xenopus mesoderm induction*. *Development*, 2001. **128**(1): p. 35-44.
16. Deo, D.D., et al., *Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(24): p. 21237-45.
17. Kontaridis, M.I., et al., *Role of SHP-2 in fibroblast growth factor receptor-mediated suppression of myogenesis in C2C12 myoblasts*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(11): p. 3875-91.
18. Ornitz, D.M., *FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development*. *Bioessays*, 2000. **22**(2): p. 108-12.

19. Jones, S., *Mini-review: endocrine actions of fibroblast growth factor 19*. Mol Pharm, 2008. **5**(1): p. 42-8.
20. Holt, J.A., et al., *Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis*. Genes Dev, 2003. **17**(13): p. 1581-91.
21. Inagaki, T., et al., *Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 415-25.
22. Badman, M.K., et al., *Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 426-37.
23. Shimada, T., et al., *Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(5): p. F1088-95.
24. Liu, S., et al., *Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(5): p. 1305-15.
25. Harmer, N.J., et al., *The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity*. Biochemistry, 2004. **43**(3): p. 629-40.
26. Torres, P.U., et al., *Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism*. Kidney Int, 2007. **71**(8): p. 730-7.
27. Kurosu, H., et al., *Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6120-3.
28. Urakawa, I., et al., *Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 770-4.
29. Kurosu, H., et al., *Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 26687-95.
30. Tomlinson, E., et al., *Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity*. Endocrinology, 2002. **143**(5): p. 1741-7.
31. Shimada, T., et al., *FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(3): p. 429-35.
32. Kharitonov, A., et al., *FGF-21 as a novel metabolic regulator*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1627-35.
33. Inagaki, T., et al., *Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis*. Cell Metab, 2005. **2**(4): p. 217-25.
34. Lundasen, T., et al., *Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man*. J Intern Med, 2006. **260**(6): p. 530-6.
35. Xie, M.H., et al., *FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4*. Cytokine, 1999. **11**(10): p. 729-35.
36. Nishimura, T., et al., *Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1444**(1): p. 148-51.
37. Katoh, M. and M. Katoh, *Evolutionary conservation of CCND1-ORAOV1-FGF19-FGF4 locus from zebrafish to human*. Int J Mol Med, 2003. **12**(1): p. 45-50.

38. Wright, T.J., et al., *Mouse FGF15 is the ortholog of human and chick FGF19, but is not uniquely required for otic induction.* Dev Biol, 2004. **269**(1): p. 264-75.
39. Kurose, H., et al., *Expression of Fibroblast growth factor 19 (Fgf19) during chicken embryogenesis and eye development, compared with Fgf15 expression in the mouse.* Gene Expr Patterns, 2004. **4**(6): p. 687-93.
40. Kharitononkov, A., et al., *FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho.* J Cell Physiol, 2008. **215**(1): p. 1-7.
41. Wu, X., et al., *Co-receptor requirements for fibroblast growth factor-19 signaling.* J Biol Chem, 2007. **282**(40): p. 29069-72.
42. Wu, X., et al., *C-terminal tail of FGF19 determines its specificity toward Klotho co-receptors.* J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33304-9.
43. Ladher, R.K., et al., *Identification of synergistic signals initiating inner ear development.* Science, 2000. **290**(5498): p. 1965-7.
44. Yu, C., et al., *Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4.* J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15482-9.
45. Kalaany, N.Y. and D.J. Mangelsdorf, *LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism.* Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 159-91.
46. Yu, C., et al., *Independent repression of bile acid synthesis and activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by activated hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and bile acids.* J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 17707-14.
47. Vlahcevic, Z.R., W.M. Pandak, and R.T. Stravitz, *Regulation of bile acid biosynthesis.* Gastroenterol Clin North Am, 1999. **28**(1): p. 1-25, v.
48. Pandak, W.M., et al., *Hormonal regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase specific activity, mRNA levels, and transcriptional activity in vivo in the rat.* J Lipid Res, 1997. **38**(12): p. 2483-91.
49. Choi, M., et al., *Identification of a hormonal basis for gallbladder filling.* Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1253-5.
50. Fu, L., et al., *Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes.* Endocrinology, 2004. **145**(6): p. 2594-603.
51. Ntambi, J.M., et al., *Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11482-6.
52. Abu-Elheiga, L., et al., *Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10207-12.
53. Nicholes, K., et al., *A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice.* Am J Pathol, 2002. **160**(6): p. 2295-307.
54. Nishimura, T., et al., *Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1492**(1): p. 203-6.
55. Zhang, Z. and W.J. Henzel, *Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites.* Protein Sci, 2004. **13**(10): p. 2819-2824.
56. Ogawa, Y., et al., *BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7432-7.

57. Suzuki, M., et al., *betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(4): p. 1006-14.
58. Eswarakumar, V.P., I. Lax, and J. Schlessinger, *Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 139-49.
59. Huang, X., et al., *Forced expression of hepatocyte-specific fibroblast growth factor 21 delays initiation of chemically induced hepatocarcinogenesis*. Mol Carcinog, 2006. **45**(12): p. 934-42.
60. Wenthe, W., et al., *Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2470-8.
61. Ito, S., et al., *Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein*. Mech Dev, 2000. **98**(1-2): p. 115-9.
62. Micanovic, R., et al., *Different roles of N- and C- termini in the functional activity of FGF21*. J Cell Physiol, 2009. **219**(2): p. 227-34.
63. Yie, J., et al., *FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation*. FEBS Lett, 2009. **583**(1): p. 19-24.
64. Ibrahim, O.A., et al., *Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly*. Biochemistry, 2004. **43**(16): p. 4724-30.
65. Mohammadi, M., S.K. Olsen, and R. Goetz, *A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an a la carte menu of heparan sulfate motifs*. Curr Opin Struct Biol, 2005. **15**(5): p. 506-16.
66. Lundasen, T., et al., *PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **360**(2): p. 437-40.
67. Memon, R.A., et al., *Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4021-31.
68. Mai, K., et al., *Free Fatty Acids Link Metabolism and Regulation of the Insulin-Sensitizing Fibroblast Growth Factor-21*. Diabetes, 2009. **58**(7): p. 1532-1538.
69. Christodoulides, C., et al., *Circulating fibroblast growth factor 21 is induced by peroxisome proliferator-activated receptor agonists but not ketosis in man*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(9): p. 3594-601.
70. Wang, H., L. Qiang, and S.R. Farmer, *Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(1): p. 188-200.
71. Li, K., et al., *Effects of rosiglitazone on fasting plasma fibroblast growth factor-21 levels in patients with type 2 diabetes mellitus*. Eur J Endocrinol, 2009. **161**(3): p. 391-5.
72. Dostalova, I., D. Haluzikova, and M. Haluzik, *Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator with potential therapeutic properties in obesity/type 2 diabetes mellitus*. Physiol Res, 2009. **58**(1): p. 1-7.

73. Potthoff, M.J., et al., *FGF21 induces PGC-1 β and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(26): p. 10853-10858.
74. Coskun, T., et al., *Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice*. Endocrinology, 2008. **149**(12): p. 6018-27.
75. Thissen, J.P., L.E. Underwood, and J.M. Ketelslegers, *Regulation of insulin-like growth factor-I in starvation and injury*. Nutr Rev, 1999. **57**(6): p. 167-76.
76. Inagaki, T., et al., *Inhibition of Growth Hormone Signaling by the Fasting-Induced Hormone FGF21*. 2008. **8**(1): p. 77-83.
77. Andrews, M.T., et al., *Low-temperature carbon utilization is regulated by novel gene activity in the heart of a hibernating mammal*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(14): p. 8392-8397.
78. Zhang, J., et al., *Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals*. Nature, 2006. **439**(7074): p. 340-3.
79. Xu, J., et al., *Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice*. Diabetes, 2009. **58**(1): p. 250-9.
80. Kharitonkov, A., et al., *The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21*. Endocrinology, 2007. **148**(2): p. 774-81.
81. Wu, X., et al., *FGF19-induced Hepatocyte Proliferation Is Mediated through FGFR4 Activation*. Journal of Biological Chemistry. **285**(8): p. 5165-5170.
82. Kharitonkov, A. and A.B. Shanafelt, *FGF21: a novel prospect for the treatment of metabolic diseases*. Curr Opin Investig Drugs, 2009. **10**(4): p. 359-64.
83. Arner, P., et al., *FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity*. FEBS Lett, 2008. **582**(12): p. 1725-30.
84. Moyers, J.S., et al., *Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPAR γ signaling*. J Cell Physiol, 2007. **210**(1): p. 1-6.
85. Charis, L.J., et al., *Fibroblast Growth Factor 21 Reduces the Severity of Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1795-1804.
86. Hana, A., *A Novel Role for the Fibroblast Growth Factor 21 in Acute Pancreatitis*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1577-1579.
87. Izumiya, Y., et al., *FGF21 is an Akt-regulated myokine*. FEBS Lett, 2008. **582**(27): p. 3805-10.
88. Puigserver, P. and B.M. Spiegelman, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator*. Endocr Rev, 2003. **24**(1): p. 78-90.
89. Rhee, J., et al., *Regulation of hepatic fasting response by PPAR δ coactivator-1 β (PGC-1 β): Requirement for hepatocyte nuclear factor 4 β in gluconeogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(7): p. 4012-4017.
90. Yoon, J.C., et al., *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 131-138.
91. Burgess, S.C., et al., *Diminished Hepatic Gluconeogenesis via Defects in Tricarboxylic Acid Cycle Flux in Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ*

- Coactivator-1 β* (PGC-1 β)-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(28): p. 19000-19008.
92. Dobrzyn, A. and J.M. Ntambi, *The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2005. **73**(1): p. 35-41.
 93. Cohen, P., et al., *Role for Stearoyl-CoA Desaturase-1 in Leptin-Mediated Weight Loss*. *Science*, 2002. **297**(5579): p. 240-243.
 94. Fajans, S.S., G.I. Bell, and K.S. Polonsky, *Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(13): p. 971-980.
 95. Wolfrum, C., et al., *Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes*. *Nature*, 2004. **432**(7020): p. 1027-1032.
 96. Handschin, C. and B.M. Spiegelman, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 Coactivators, Energy Homeostasis, and Metabolism*. *Endocr Rev*, 2006. **27**(7): p. 728-735.
 97. Samoilov, M., S. Plyasunov, and A.P. Arkin, *Stochastic amplification and signaling in enzymatic futile cycles through noise-induced bistability with oscillations*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(7): p. 2310-2315.
 98. Rousset, S., et al., *The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins*. *Diabetes*, 2004. **53**(suppl 1): p. S130-S135.
 99. Zhang, X., et al., *Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans*. *Diabetes*, 2008. **57**(5): p. 1246-1253.
 100. Chen, W.W., et al., *Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2008. **116**(1): p. 65-8.
 101. Gälman, C., et al., *The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR α Activation in Man*. *Cell Metabolism*, 2008. **8**(2): p. 169-174.
 102. Li, L., et al., *Plasma FGF-21 levels in type 2 diabetic patients with ketosis*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008. **82**(2): p. 209-13.
 103. Li, H., et al., *Serum fibroblast growth factor 21 is associated with adverse lipid profiles and gamma-glutamyltransferase but not insulin sensitivity in Chinese subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(6): p. 2151-6.
 104. Chavez, A.O., et al., *Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance*. *Diabetes Care*, 2009. **32**(8): p. 1542-6.
 105. Sebastian, S., et al., *Serum fibroblast growth factor 21 levels in gestational diabetes mellitus in relation to insulin resistance and dyslipidemia*. *Metabolism: clinical and experimental*. **59**(1): p. 33-37.
 106. Durovcova, V., et al., *Plasma concentrations of fibroblast growth factors 21 and 19 in patients with Cushing's syndrome*. *Physiol Res*, 2009.
 107. Dostalova, I., et al., *Plasma concentrations of fibroblast growth factors 19 and 21 in patients with anorexia nervosa*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(9): p. 3627-32.

108. Fazeli, P.K., et al., *Fibroblast Growth Factor-21 May Mediate Growth Hormone Resistance in Anorexia Nervosa*. J Clin Endocrinol Metab. **95**(1): p. 369-374.
109. Hojman, P., et al., *Fibroblast Growth Factor-21 Is Induced in Human Skeletal Muscles by Hyperinsulinemia*. Diabetes, 2009. **58**(12): p. 2797-2801.
110. Kliewer, S.A. and D.J. Mangelsdorf, *Fibroblast growth factor 21: from pharmacology to physiology*. Am J Clin Nutr. **91**(1): p. 254S-257S.
111. Curat, C.A., et al., *From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1285-92.
112. Gustafson, B., *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb. **17**(4): p. 332-41.
113. Chowdhury, B., et al., *A multicompartiment body composition technique based on computerized tomography*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1994. **18**(4): p. 219-34.
114. Yang, X. and U. Smith, *Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer?* Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1127-39.
115. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
116. Guerre-Millo, M., *Adipose tissue and adipokines: for better or worse*. Diabetes Metab, 2004. **30**(1): p. 13-9.
117. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 277-359.
118. Enerback, S., *Human brown adipose tissue*. Cell Metab, 2010. **11**(4): p. 248-52.
119. Vijgen, G.H., et al., *Brown adipose tissue in morbidly obese subjects*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17247.
120. van Marken Lichtenbelt, W.D., et al., *Cold-activated brown adipose tissue in healthy men*. N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1500-8.
121. Hammarstedt, A., et al., *Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(2): p. 578-82.
122. Semple, R.K., et al., *Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1alpha is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28**(1): p. 176-9.
123. Virtanen, K.A., et al., *Functional brown adipose tissue in healthy adults*. N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1518-25.
124. Havel, P.J., *Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(1): p. 51-9.
125. Compher, C. and K.O. Badellino, *Obesity and inflammation: lessons from bariatric surgery*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2008. **32**(6): p. 645-7.
126. Isakson, P., et al., *Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation*. Diabetes, 2009. **58**(7): p. 1550-7.
127. Halaas, J.L., et al., *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene*. Science, 1995. **269**(5223): p. 543-6.

128. Hotamisligil, G.S., *The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance*. J Intern Med, 1999. **245**(6): p. 621-5.
129. Shimomura, I., et al., *Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity*. Nat Med, 1996. **2**(7): p. 800-3.
130. Dandona, P., A. Aljada, and A. Bandyopadhyay, *Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes*. Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 4-7.
131. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
132. Krotkiewski, M., et al., *Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution*. J Clin Invest, 1983. **72**(3): p. 1150-62.
133. van Harmelen, V., et al., *Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27**(8): p. 889-95.
134. Tchoukalova, Y., C. Koutsari, and M. Jensen, *Committed subcutaneous preadipocytes are reduced in human obesity*. Diabetologia, 2007. **50**(1): p. 151-7.
135. Sopasakis, V.R., et al., *High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator*. Obes Res, 2004. **12**(3): p. 454-60.
136. Weyer, C., et al., *Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance*. Diabetologia, 2000. **43**(12): p. 1498-506.
137. Bjorntorp, P., P. Berchtold, and G. Tibblin, *Insulin secretion in relation to adipose tissue in men*. Diabetes, 1971. **20**(2): p. 65-70.
138. Smith, S.R. and J.J. Zachwieja, *Visceral adipose tissue: a critical review of intervention strategies*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999. **23**(4): p. 329-35.
139. Despres, J.P., *Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome*. Nutrition, 1993. **9**(5): p. 452-9.
140. Abate, N., et al., *Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM*. Diabetes, 1996. **45**(12): p. 1684-93.
141. Despres, J.P., et al., *Genetic aspects of susceptibility to obesity and related dyslipidemias*. Mol Cell Biochem, 1992. **113**(2): p. 151-69.
142. Larsson, B., et al., *Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **288**(6428): p. 1401-4.
143. Donahue, R.P. and R.D. Abbott, *Central obesity and coronary heart disease in men*. Lancet, 1987. **2**(8569): p. 1215.
144. Ducimetiere, P., J. Richard, and F. Cambien, *The pattern of subcutaneous fat distribution in middle-aged men and the risk of coronary heart disease: the Paris Prospective Study*. Int J Obes, 1986. **10**(3): p. 229-40.
145. Lapidus, L., et al., *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, Sweden*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **289**(6454): p. 1257-61.
146. Mittelman, S.D., et al., *Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo*. Diabetes, 2002. **51**(3): p. 755-61.

147. Montague, C.T., et al., *Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution*. Diabetes, 1997. **46**(3): p. 342-7.
148. Van Harmelen, V., et al., *Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women*. Diabetes, 1998. **47**(6): p. 913-7.
149. Dusserre, E., P. Moulin, and H. Vidal, *Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1500**(1): p. 88-96.
150. Fontana, L., et al., *Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 1010-3.
151. Wajchenberg, B.L., et al., *Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2009. **53**(2): p. 145-50.
152. Leclerc, V. and J.M. Reichhart, *The immune response of Drosophila melanogaster*. Immunol Rev, 2004. **198**: p. 59-71.
153. Rolff, J. and M.T. Siva-Jothy, *Invertebrate ecological immunology*. Science, 2003. **301**(5632): p. 472-5.
154. Rusten, T.E., et al., *Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway*. Dev Cell, 2004. **7**(2): p. 179-92.
155. Sondergaard, L., *Homology between the mammalian liver and the Drosophila fat body*. Trends Genet, 1993. **9**(6): p. 193.
156. Tong, Q., et al., *Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition*. Science, 2000. **290**(5489): p. 134-8.
157. Mortensen, R.F., *C-reactive protein, inflammation, and innate immunity*. Immunol Res, 2001. **24**(2): p. 163-76.
158. Ryden, M., et al., *Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1085-91.
159. Rajala, M.W. and P.E. Scherer, *Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3765-73.
160. Lin, Y., et al., *The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24255-63.
161. Berg, A.H., et al., *Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF-kappaB expression and activity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(6): p. E1178-88.
162. Charriere, G., et al., *Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9850-5.
163. Fain, J.N., et al., *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2273-82.
164. Nicoletti, G., et al., *Effect of a multidisciplinary program of weight reduction on endothelial functions in obese women*. J Endocrinol Invest, 2003. **26**(3): p. RC5-8.

165. Heilbronn, L.K., M. Noakes, and P.M. Clifton, *Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(6): p. 968-70.
166. Kopp, H.P., et al., *Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(6): p. 1042-7.
167. Maury, E. and S.M. Brichard, *Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome*. *Mol Cell Endocrinol*. **314**(1): p. 1-16.
168. Tchkonina, T., et al., *Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **292**(1): p. E298-307.
169. Klein, S., et al., *Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from shaping America's health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, the Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(6): p. 1647-52.
170. Ahima, R.S., *Revisiting leptin's role in obesity and weight loss*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(7): p. 2380-3.
171. Badman, M.K. and J.S. Flier, *The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(6): p. 2103-15.
172. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 2548-56.
173. Becker, D.J., et al., *Diet- and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue*. *FEBS Lett*, 1995. **371**(3): p. 324-8.
174. Montague, C.T., et al., *Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes*. *Diabetes*, 1998. **47**(9): p. 1384-91.
175. Guo, K., et al., *Disruption of peripheral leptin signaling in mice results in hyperleptinemia without associated metabolic abnormalities*. *Endocrinology*, 2007. **148**(8): p. 3987-97.
176. Morton, G.J., et al., *Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 703-10.
177. Flier, J.S., *Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(5): p. 1407-13.
178. Ozcan, L., et al., *Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance*. *Cell Metab*, 2009. **9**(1): p. 35-51.
179. Rosenbaum, M., et al., *Leptin reverses weight loss-induced changes in regional neural activity responses to visual food stimuli*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(7): p. 2583-91.
180. Farooqi, I.S., et al., *Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(12): p. 879-84.
181. Minokoshi, Y., et al., *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. *Nature*, 2002. **415**(6869): p. 339-43.
182. Muoio, D.M., et al., *Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle*. *Diabetes*, 1997. **46**(8): p. 1360-3.

183. Haque, M.S., et al., *Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats*. *Diabetes*, 1999. **48**(9): p. 1706-12.
184. Kamohara, S., et al., *Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment*. *Nature*, 1997. **389**(6649): p. 374-7.
185. Kahn, B.B., et al., *AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism*. *Cell Metab*, 2005. **1**(1): p. 15-25.
186. Unger, R.H., *Lipotoxic diseases*. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 319-36.
187. Buettner, C., et al., *Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms*. *Nat Med*, 2008. **14**(6): p. 667-75.
188. Oral, E.A., et al., *Leptin-replacement therapy for lipodystrophy*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(8): p. 570-8.
189. Ahima, R.S., et al., *Brain adipocytokine action and metabolic regulation*. *Diabetes*, 2006. **55 Suppl 2**: p. S145-54.
190. Farooqi, I.S., et al., *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(8): p. 1093-103.
191. Bluher, S. and C.S. Mantzoros, *Leptin in humans: lessons from translational research*. *Am J Clin Nutr*, 2009. **89**(3): p. 991S-997S.
192. Chan, J.L. and C.S. Mantzoros, *Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa*. *Lancet*, 2005. **366**(9479): p. 74-85.
193. Roth, J.D., et al., *Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: evidence from nonclinical and clinical studies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(20): p. 7257-62.
194. Maeda, K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **221**(2): p. 286-9.
195. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(45): p. 26746-9.
196. Halleux, C.M., et al., *Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **288**(5): p. 1102-7.
197. Kadowaki, T., et al., *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1784-92.
198. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **257**(1): p. 79-83.
199. Brichard, S.M., M.L. Delporte, and M. Lambert, *Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin*. *Horm Metab Res*, 2003. **35**(6): p. 337-42.
200. Ouchi, N. and K. Walsh, *Adiponectin as an anti-inflammatory factor*. *Clin Chim Acta*, 2007. **380**(1-2): p. 24-30.
201. Delporte, M.L., et al., *Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies*. *Biochem J*, 2002. **367**(Pt 3): p. 677-85.

202. Furukawa, S., et al., *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1752-61.
203. Bruun, J.M., et al., *Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(3): p. E527-33.
204. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. Nature, 2003. **423**(6941): p. 762-9.
205. Capeau, J., *The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow*. J Hepatol, 2007. **47**(5): p. 736-8.
206. Yamauchi, T., et al., *Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 332-9.
207. Kubota, N., et al., *Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 25863-6.
208. Maeda, N., et al., *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 731-7.
209. Bauche, I.B., et al., *Overexpression of adiponectin targeted to adipose tissue in transgenic mice: impaired adipocyte differentiation*. Endocrinology, 2007. **148**(4): p. 1539-49.
210. Otabe, S., et al., *Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(1): p. E210-8.
211. Qiao, L., et al., *Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism*. Diabetes, 2008. **57**(7): p. 1824-33.
212. Dietze-Schroeder, D., et al., *Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2003-11.
213. Lindsay, R.S., et al., *Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population*. Lancet, 2002. **360**(9326): p. 57-8.
214. Spranger, J., et al., *Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus*. Lancet, 2003. **361**(9353): p. 226-8.
215. Heidemann, C., et al., *Total and high-molecular-weight adiponectin and resistin in relation to the risk for type 2 diabetes in women*. Ann Intern Med, 2008. **149**(5): p. 307-16.
216. Lara-Castro, C., et al., *Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 249-59.
217. Kubota, N., et al., *Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8748-55.
218. Kubota, N., et al., *Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake*. Cell Metab, 2007. **6**(1): p. 55-68.
219. Qi, Y., et al., *Adiponectin acts in the brain to decrease body weight*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 524-9.
220. Beaujoye, V., et al., *Determinants of early atherosclerosis in obese children and adolescents*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(8): p. 3025-32.

221. Sattar, N., et al., *Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis*. *Circulation*, 2006. **114**(7): p. 623-9.
222. Yamauchi, T., et al., *Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(4): p. 2461-8.
223. Ouedraogo, R., et al., *Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(6): p. 1718-26.
224. Kobashi, C., et al., *Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8*. *Circ Res*, 2005. **97**(12): p. 1245-52.
225. Ouchi, N., et al., *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin*. *Circulation*, 1999. **100**(25): p. 2473-6.
226. Ouchi, N., et al., *Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway*. *Circulation*, 2000. **102**(11): p. 1296-301.
227. Arita, Y., et al., *Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell*. *Circulation*, 2002. **105**(24): p. 2893-8.
228. Ouchi, N., et al., *Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages*. *Circulation*, 2001. **103**(8): p. 1057-63.
229. Wang, Z.V. and P.E. Scherer, *Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension*. *Hypertension*, 2008. **51**(1): p. 8-14.
230. Ohashi, K., et al., *Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension*. *Hypertension*, 2006. **47**(6): p. 1108-16.
231. Chow, W.S., et al., *Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study*. *Hypertension*, 2007. **49**(6): p. 1455-61.
232. Iwashima, Y., et al., *Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension*. *Hypertension*, 2004. **43**(6): p. 1318-23.
233. Haugen, F. and C.A. Drevon, *Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin*. *Endocrinology*, 2007. **148**(11): p. 5478-86.
234. Guerre-Millo, M., *Adiponectin: an update*. *Diabetes Metab*, 2008. **34**(1): p. 12-8.
235. Motoshima, H., et al., *Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **315**(2): p. 264-71.
236. Delaigle, A.M., et al., *Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies*. *Endocrinology*, 2004. **145**(12): p. 5589-97.
237. Delaigle, A.M., et al., *Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: In vivo and in vitro studies*. *Diabetologia*, 2006. **49**(6): p. 1311-23.
238. Hui, J.M., et al., *Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?* *Hepatology*, 2004. **40**(1): p. 46-54.
239. Kamada, Y., T. Takehara, and N. Hayashi, *Adipocytokines and liver disease*. *J Gastroenterol*, 2008. **43**(11): p. 811-22.

240. Frezza, E.E., M.S. Wachtel, and M. Chiriva-Internati, *Influence of obesity on the risk of developing colon cancer*. Gut, 2006. **55**(2): p. 285-91.
241. Hsing, A.W., L.C. Sakoda, and S. Chua, Jr., *Obesity, metabolic syndrome, and prostate cancer*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(3): p. s843-57.
242. Schaffler, A., J. Scholmerich, and C. Buechler, *Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. **3**(4): p. 345-54.
243. Barb, D., et al., *Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(3): p. s858-66.
244. Kelesidis, I., T. Kelesidis, and C.S. Mantzoros, *Adiponectin and cancer: a systematic review*. Br J Cancer, 2006. **94**(9): p. 1221-5.
245. Samal, B., et al., *Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1431-7.
246. Fukuhara, A., et al., *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin*. Science, 2005. **307**(5708): p. 426-30.
247. Berndt, J., et al., *Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans*. Diabetes, 2005. **54**(10): p. 2911-6.
248. Varma, V., et al., *Human visfatin expression: relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipids, and inflammation*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(2): p. 666-72.
249. Garten, A., et al., *Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(3): p. 130-8.
250. Rasouli, N. and P.A. Kern, *Adipocytokines and the metabolic complications of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11 Suppl 1): p. S64-73.
251. Imai, S., *Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): a link between NAD biology, metabolism, and diseases*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(1): p. 20-8.
252. Revollo, J.R., et al., *Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 363-75.
253. Fukuhara, A., et al., *Retraction*. Science, 2007. **318**(5850): p. 565.
254. Dandona, P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(8): p. 2907-10.
255. Maury, E., et al., *In vitro hyperresponsiveness to tumor necrosis factor-alpha contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(4): p. 1393-400.
256. Fain, J.N., S.W. Bahouth, and A.K. Madan, *TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28**(4): p. 616-22.
257. Cawthorn, W.P. and J.K. Sethi, *TNF-alpha and adipocyte biology*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 117-31.
258. Shoelson, S.E., L. Herrero, and A. Naaz, *Obesity, inflammation, and insulin resistance*. Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2169-80.
259. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
260. Sabio, G., et al., *A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1539-43.

261. Plomgaard, P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation*. Diabetes, 2005. **54**(10): p. 2939-45.
262. Bernstein, L.E., et al., *Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome*. Arch Intern Med, 2006. **166**(8): p. 902-8.
263. Dominguez, H., et al., *Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes*. J Vasc Res, 2005. **42**(6): p. 517-25.
264. Ofei, F., et al., *Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM*. Diabetes, 1996. **45**(7): p. 881-5.
265. Paquot, N., et al., *No increased insulin sensitivity after a single intravenous administration of a recombinant human tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein in obese insulin-resistant patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(3): p. 1316-9.
266. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(1): p. 83-6.
267. Kiortsis, D.N., et al., *Effects of infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(5): p. 765-6.
268. Tam, L.S., et al., *Impact of TNF inhibition on insulin resistance and lipids levels in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(9): p. 1495-8.
269. Yazdani-Biuki, B., et al., *Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(9): p. 641-2.
270. Prins, J.B., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells*. Diabetes, 1997. **46**(12): p. 1939-44.
271. Skoog, T., et al., *Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men*. Eur Heart J, 2002. **23**(5): p. 376-83.
272. Ohta, H., et al., *Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Atherosclerosis, 2005. **180**(1): p. 11-7.
273. Wang, B. and P. Trayhurn, *Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture*. Pflugers Arch, 2006. **452**(4): p. 418-27.
274. Ruan, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1319-36.
275. Bastard, J.P., et al., *Point-counterpoint: Interleukin-6 does/does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis*. J Appl Physiol, 2007. **102**(2): p. 821-2; author reply 825.
276. Mohamed-Ali, V., et al., *Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4196-200.

277. Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg, *Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 847-50.
278. Pedersen, B.K. and C.P. Fischer, *Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. **10**(3): p. 265-71.
279. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
280. Apovian, C.M., et al., *Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(9): p. 1654-9.
281. Vitseva, O.I., et al., *Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(5): p. 932-7.
282. Huber, J., et al., *CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(8): p. 3215-21.
283. Harman-Boehm, I., et al., *Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2240-7.
284. Zeyda, M., et al., *Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production*. Int J Obes (Lond), 2007. **31**(9): p. 1420-8.
285. Canello, R., et al., *Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1554-61.
286. Maury, E., et al., *Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(3): p. E656-65.
287. Canello, R., et al., *Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2277-86.
288. Curat, C.A., et al., *Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin*. Diabetologia, 2006. **49**(4): p. 744-7.
289. Lumeng, C.N., et al., *Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity*. Diabetes, 2007. **56**(1): p. 16-23.
290. Nguyen, M.T., et al., *A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 35279-92.
291. Surmi, B.K. and A.H. Hasty, *Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling*. Future Lipidol, 2008. **3**(5): p. 545-556.
292. Bourlier, V., et al., *Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages*. Circulation, 2008. **117**(6): p. 806-15.
293. Jernas, M., et al., *Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression*. Faseb J, 2006. **20**(9): p. 1540-2.

294. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1023-33.
295. Nishimura, S., et al., *In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 710-21.
296. Jiao, P., et al., *Obesity-related upregulation of monocyte chemotactic factors in adipocytes: involvement of nuclear factor-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase pathways*. Diabetes, 2009. **58**(1): p. 104-15.
297. Fleischman, A., et al., *Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults*. Diabetes Care, 2008. **31**(2): p. 289-94.
298. Sourris, K.C., et al., *c-Jun NH2-terminal kinase activity in subcutaneous adipose tissue but not nuclear factor-kappaB activity in peripheral blood mononuclear cells is an independent determinant of insulin resistance in healthy individuals*. Diabetes, 2009. **58**(6): p. 1259-65.
299. Takahashi, K., et al., *JNK- and IkappaB-dependent pathways regulate MCP-1 but not adiponectin release from artificially hypertrophied 3T3-L1 adipocytes preloaded with palmitate in vitro*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(5): p. E898-909.
300. Cinti, S., et al., *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. J Lipid Res, 2005. **46**(11): p. 2347-55.
301. Strissel, K.J., et al., *Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications*. Diabetes, 2007. **56**(12): p. 2910-8.
302. Bourlier, V. and A. Bouloumie, *Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance*. Diabetes Metab, 2009. **35**(4): p. 251-60.
303. Gregor, M.G. and G.S. Hotamisligil, *Adipocyte stress: The endoplasmic reticulum and metabolic disease*. J Lipid Res, 2007.
304. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
305. Schenk, S., M. Saberi, and J.M. Olefsky, *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 2992-3002.
306. Shen, X., K. Zhang, and R.J. Kaufman, *The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum*. J Chem Neuroanat, 2004. **28**(1-2): p. 79-92.
307. Ozcan, U., et al., *Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1137-40.
308. Miller, R.S., D. Diaczok, and D.W. Cooke, *Repression of GLUT4 expression by the endoplasmic reticulum stress response in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(1): p. 188-92.
309. Nakatani, Y., et al., *Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 847-51.
310. Yoshiuchi, K., et al., *Direct monitoring of in vivo ER stress during the development of insulin resistance with ER stress-activated indicator transgenic mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **366**(2): p. 545-50.
311. Boden, G., et al., *Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals*. Diabetes, 2008. **57**(9): p. 2438-44.

312. Gregor, M.F., et al., *Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss*. *Diabetes*, 2009. **58**(3): p. 693-700.
313. Trayhurn, P., B. Wang, and I.S. Wood, *Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity?* *Br J Nutr*, 2008. **100**(2): p. 227-35.
314. Ye, J., *Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance*. *Int J Obes (Lond)*, 2009. **33**(1): p. 54-66.
315. Ye, J., et al., *Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293**(4): p. E1118-28.
316. Hosogai, N., et al., *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation*. *Diabetes*, 2007. **56**(4): p. 901-11.
317. Goossens, G.H., *The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance*. *Physiol Behav*, 2008. **94**(2): p. 206-18.
318. Pasarica, M., et al., *Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response*. *Diabetes*, 2009. **58**(3): p. 718-25.
319. Virtanen, K.A., et al., *Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(8): p. 3902-10.
320. Semenza, G.L., *HIF-1 and human disease: one highly involved factor*. *Genes Dev*, 2000. **14**(16): p. 1983-91.
321. Wang, B., I.S. Wood, and P. Trayhurn, *Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes*. *Pflugers Arch*, 2007. **455**(3): p. 479-92.
322. Rausch, M.E., et al., *Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration*. *Int J Obes (Lond)*, 2008. **32**(3): p. 451-63.
323. Cnop, M., *Fatty acids and glucolipototoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 3): p. 348-52.
324. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
325. Tsukumo, D.M., et al., *Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance*. *Diabetes*, 2007. **56**(8): p. 1986-98.
326. Poggi, M., et al., *C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet*. *Diabetologia*, 2007. **50**(6): p. 1267-76.
327. Davis, J.E., et al., *Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat*. *Obesity (Silver Spring)*, 2008. **16**(6): p. 1248-55.
328. Saberi, M., et al., *Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice*. *Cell Metab*, 2009. **10**(5): p. 419-29.
329. Coenen, K.R., et al., *Impact of macrophage toll-like receptor 4 deficiency on macrophage infiltration into adipose tissue and the artery wall in mice*. *Diabetologia*, 2009. **52**(2): p. 318-28.
330. Bes-Houtmann, S., et al., *Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes*. *Histochem Cell Biol*, 2007. **127**(2): p. 131-7.

331. Nguyen, M.T., et al., *JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35361-71.
332. Suganami, T., et al., *Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(1): p. 45-9.
333. Yeop Han, C., et al., *Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation*. Diabetes, 2010. **59**(2): p. 386-96.
334. van Eijk, M., et al., *Reducing glycosphingolipid content in adipose tissue of obese mice restores insulin sensitivity, adipogenesis and reduces inflammation*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4723.
335. Furuhashi, M., et al., *Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2640-50.
336. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
337. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 979-84.
338. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
339. Leuwer, M., et al., *Endotoxaemia leads to major increases in inflammatory adipokine gene expression in white adipose tissue of mice*. Pflugers Arch, 2009. **457**(4): p. 731-41.
340. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
341. Amar, J., et al., *Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1219-23.
342. Creely, S.J., et al., *Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(3): p. E740-7.
343. Erridge, C., et al., *A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(5): p. 1286-92.
344. Anderson, P.D., et al., *Innate immunity modulates adipokines in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2272-9.
345. Bouloumie, A., et al., *Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells*. Faseb J, 1999. **13**(10): p. 1231-8.
346. Gruen, M.L., et al., *Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(5): p. C1481-8.
347. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.

348. Kim, J.Y., et al., *Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2621-37.
349. Mamane, Y., et al., *The C3a anaphylatoxin receptor is a key mediator of insulin resistance and functions by modulating adipose tissue macrophage infiltration and activation*. Diabetes, 2009. **58**(9): p. 2006-17.
350. Sengenès, C., et al., *The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue*. J Intern Med, 2007. **262**(4): p. 415-21.
351. Ferri, C., et al., *Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 1): p. 568-73.
352. Bosanska, L., et al., *The influence of obesity and different fat depots on adipose tissue gene expression and protein levels of cell adhesion molecules*. Physiol Res. **59**(1): p. 79-88.
353. Bosanska, L., et al., *[The influence of very-low-calorie diet on soluble adhesion molecules and their gene expression in adipose tissue of obese women]*. Cas Lek Cesk, 2008. **147**(1): p. 32-7.
354. Brake, D.K., et al., *ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1232-9.
355. Robker, R.L., et al., *Leukocyte migration in adipose tissue of mice null for ICAM-1 and Mac-1 adhesion receptors*. Obes Res, 2004. **12**(6): p. 936-40.
356. Coenen, K.R., et al., *Diet-induced increases in adiposity, but not plasma lipids, promote macrophage infiltration into white adipose tissue*. Diabetes, 2007. **56**(3): p. 564-73.
357. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
358. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 565-8.
359. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function and inhibition of chemokines*. Annual Review of Pharmacology & Toxicology, 2002. **42**(1): p. 469.
360. Rajarathnam, K., I. Clark-Lewis, and B.D. Sykes, *1H NMR solution structure of an active monomeric interleukin-8*. Biochemistry, 1995. **34**(40): p. 12983-90.
361. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
362. Bacon, K., et al., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(10): p. 1067-8.
363. Laing, K.J. and C.J. Secombes, *Chemokines*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 443-60.
364. Baggiolini, M., *Chemokines in pathology and medicine*. J Intern Med, 2001. **250**(2): p. 91-104.
365. Bikfalvi, A., *Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(3): p. 379-85.
366. Strieter, R.M., et al., *CXC chemokines in angiogenesis of cancer*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(3): p. 195-200.
367. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. 2006. p. 2201-2213.
368. Yoshida, T., et al., *Structure and expression of two highly related genes encoding SCM-1/human lymphotactin*. FEBS Letters, 1996. **395**(1): p. 82-88.

369. Yoshida, T., et al., *Identification of Single C Motif-1/Lymphotactin Receptor XCR1*. 1998. p. 16551-16554.
370. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 640-4.
371. Pan, Y., et al., *Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 611-7.
372. Haskell, C.A., M.D. Cleary, and I.F. Charo, *Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(15): p. 10053-8.
373. Fong, A.M., et al., *Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1413-9.
374. Tsou, C.L., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44622-6.
375. Garton, K.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 37993-8001.
376. Imai, T., et al., *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion*. Cell, 1997. **91**(4): p. 521-30.
377. Murdoch, C. and A. Finn, *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3032-43.
378. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
379. Malavazos, A.E., et al., *Influence of epicardial adipose tissue and adipocytokine levels on cardiac abnormalities in visceral obesity*. Int J Cardiol, 2007. **121**(1): p. 132-4.
380. Christiansen, T., B. Richelsen, and J.M. Bruun, *Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects*. Int J Obes (Lond), 2005. **29**(1): p. 146-50.
381. Kim, C.S., et al., *Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters*. Int J Obes (Lond), 2006. **30**(9): p. 1347-55.
382. Herder, C., et al., *Chemokines as risk factors for type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg study, 1984-2002*. Diabetologia, 2006. **49**(5): p. 921-9.
383. Piemonti, L., et al., *Fasting plasma leptin, tumor necrosis factor-alpha receptor 2, and monocyte chemoattracting protein 1 concentration in a population of glucose-tolerant and glucose-intolerant women: impact on cardiovascular mortality*. Diabetes Care, 2003. **26**(10): p. 2883-9.
384. Simeoni, E., et al., *Association between the A-2518G polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 gene and insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus*. Diabetologia, 2004. **47**(9): p. 1574-80.

385. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1494-505.
386. Sell, H., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle*. Endocrinology, 2006. **147**(5): p. 2458-67.
387. Gerhardt, C.C., et al., *Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **175**(1-2): p. 81-92.
388. Kamei, N., et al., *Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26602-14.
389. Herder, C., et al., *Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4)*. Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S11-7.
390. Skurk, T., et al., *Expression and secretion of RANTES (CCL5) in human adipocytes in response to immunological stimuli and hypoxia*. Horm Metab Res, 2009. **41**(3): p. 183-9.
391. Madani, R., et al., *RANTES release by human adipose tissue in vivo and evidence for depot-specific differences*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(6): p. E1262-8.
392. Murdolo, G., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in subcutaneous abdominal adipose tissue: characterization of interstitial concentration and regulation of gene expression by insulin*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(7): p. 2688-95.
393. Hashimoto, I., et al., *Elevated serum monocyte chemoattractant protein-4 and chronic inflammation in overweight subjects*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14**(5): p. 799-811.
394. Vasudevan, A.R., et al., *Eotaxin and obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(1): p. 256-61.
395. Chavey, C., et al., *CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance*. Cell Metab, 2009. **9**(4): p. 339-49.
396. Herder, C., et al., *Low-grade inflammation, obesity, and insulin resistance in adolescents*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4569-74.
397. Herder, C., et al., *Constitutive and regulated expression and secretion of interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10) in human adipocytes*. Int J Obes (Lond), 2007. **31**(3): p. 403-10.
398. Sartipy, P. and D.J. Loskutoff, *Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7265-70.
399. Fain, J.N. and A.K. Madan, *Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) release by explants of human visceral adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2005. **29**(11): p. 1299-307.
400. Fasshauer, M., et al., *Monocyte chemoattractant protein 1 expression is stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(2): p. 598-604.

401. Troseid, M., et al., *Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome*. Eur Heart J, 2004. **25**(4): p. 349-55.
402. Di Gregorio, G.B., et al., *Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2305-13.
403. Schernthaner, G.H., et al., *Effect of massive weight loss induced by bariatric surgery on serum levels of interleukin-18 and monocyte-chemoattractant-protein-1 in morbid obesity*. Obes Surg, 2006. **16**(6): p. 709-15.
404. Bruun, J.M., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(4): p. 2282-9.
405. Inouye, K.E., et al., *Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2242-50.
406. Kirk, E.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]*. Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1254-61.
407. Chen, A., et al., *Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity*. Obes Res, 2005. **13**(8): p. 1311-20.
408. Weisberg, S.P., et al., *CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 115-24.
409. Tamura, Y., et al., *Inhibition of CCR2 ameliorates insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(12): p. 2195-201.
410. Yang, S.J., et al., *Inhibition of the chemokine (C-C motif) ligand 2/chemokine (C-C motif) receptor 2 pathway attenuates hyperglycaemia and inflammation in a mouse model of hepatic steatosis and lipodystrophy*. Diabetologia, 2009. **52**(5): p. 972-81.
411. Keophiphath, M., et al., *CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(1): p. 39-45.
412. Bruun, J.M., S.B. Pedersen, and B. Richelsen, *Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 1267-73.
413. Straczkowski, M., et al., *Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(10): p. 4602-6.
414. Rotter, V., I. Nagaev, and U. Smith, *Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45777-84.
415. Sell, H. and J. Eckel, *Chemotactic cytokines, obesity and type 2 diabetes: in vivo and in vitro evidence for a possible causal correlation?* Proc Nutr Soc, 2009. **68**(4): p. 378-84.

416. Nara, N., et al., *Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30794-803.
417. Herder, C., et al., *Hypoadiponectinemia and proinflammatory state: two sides of the same coin?: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey 4 (KORA S4)*. Diabetes Care, 2006. **29**(7): p. 1626-31.
418. Wittamer, V., et al., *Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 977-85.
419. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome*. Endocrinology, 2007. **148**(10): p. 4687-94.
420. Goralski, K.B., et al., *Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 28175-88.
421. Roh, S.G., et al., *Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(4): p. 1013-8.
422. Takahashi, M., et al., *Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes*. FEBS Lett, 2008. **582**(5): p. 573-8.
423. Kralisch, S., et al., *Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro*. Regul Pept, 2009. **154**(1-3): p. 102-6.
424. Wittamer, V., et al., *The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9956-62.
425. Cash, J.L., et al., *Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 767-75.
426. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
427. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
428. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
429. Satriano, J., *Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article*. Amino Acids, 2004. **26**(4): p. 321-9.
430. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
431. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
432. Edwards, J.P., et al., *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1298-307.
433. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
434. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
435. Gordon, S., *Macrophage heterogeneity and tissue lipids*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 89-93.

436. Lumeng, C.N., et al., *Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes*. *Diabetes*, 2008. **57**(12): p. 3239-46.
437. Patsouris, D., et al., *Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals*. *Cell Metab*, 2008. **8**(4): p. 301-9.
438. Murdoch, C., M. Muthana, and C.E. Lewis, *Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6257-63.
439. Antuna-Puente, B., et al., *Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity*. *Diabetes Metab*, 2008. **34**(1): p. 2-11.
440. Chinetti, G., J.C. Fruchart, and B. Staels, *Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003. **27 Suppl 3**: p. S41-5.
441. Hevener, A.L., et al., *Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(6): p. 1658-69.
442. Odegaard, J.I., et al., *Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1116-20.
443. Stienstra, R., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(33): p. 22620-7.
444. Guri, A.J., et al., *Loss of PPAR gamma in immune cells impairs the ability of abscisic acid to improve insulin sensitivity by suppressing monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration into white adipose tissue*. *J Nutr Biochem*, 2008. **19**(4): p. 216-28.
445. Chen, Y., et al., *The mouse CCR2 gene is regulated by two promoters that are responsive to plasma cholesterol and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **332**(1): p. 188-93.
446. Kang, K., et al., *Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity*. *Cell Metab*, 2008. **7**(6): p. 485-95.
447. Odegaard, J.I., et al., *Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance*. *Cell Metab*, 2008. **7**(6): p. 496-507.
448. Ohashi, K., et al., *Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype*. *J Biol Chem*. **285**(9): p. 6153-60.
449. de Luca, C. and J.M. Olefsky, *Inflammation and insulin resistance*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(1): p. 97-105.
450. Schneemann, M. and G. Schoeden, *Macrophage biology and immunology: man is not a mouse*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(3): p. 579; discussion 580.
451. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 71-82.
452. Ortega Martinez de Victoria, E., et al., *Macrophage content in subcutaneous adipose tissue: associations with adiposity, age, inflammatory markers, and whole-body insulin action in healthy Pima Indians*. *Diabetes*, 2009. **58**(2): p. 385-93.

453. Permana, P.A., C. Menge, and P.D. Reaven, *Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **341**(2): p. 507-14.
454. Suganami, T., J. Nishida, and Y. Ogawa, *A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2062-8.
455. Lumeng, C.N., S.M. Deyoung, and A.R. Saltiel, *Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **292**(1): p. E166-74.
456. Poitou, C., et al., *Role of serum amyloid a in adipocyte-macrophage cross talk and adipocyte cholesterol efflux*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(5): p. 1810-7.
457. Furuhashi, M., et al., *Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2*. *Nature*, 2007. **447**(7147): p. 959-65.
458. Molgat, A.S., A. Gagnon, and A. Sorisky, *Preadipocyte apoptosis is prevented by macrophage-conditioned medium in a PDGF-dependent manner*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(4): p. C757-65.
459. Constant, V.A., et al., *Macrophage-conditioned medium inhibits the differentiation of 3T3-L1 and human abdominal preadipocytes*. *Diabetologia*, 2006. **49**(6): p. 1402-11.
460. Lacasa, D., et al., *Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes*. *Endocrinology*, 2007. **148**(2): p. 868-77.
461. Voros, G., et al., *Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity*. *Endocrinology*, 2005. **146**(10): p. 4545-54.
462. Pang, C., et al., *Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(2): p. E313-22.
463. Henegar, C., et al., *Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity*. *Genome Biol*, 2008. **9**(1): p. R14.
464. Keophiphath, M., et al., *Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes*. *Mol Endocrinol*, 2009. **23**(1): p. 11-24.
465. Maquoi, E., et al., *Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity*. *Diabetes*, 2002. **51**(4): p. 1093-101.
466. Chavey, C., et al., *Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(14): p. 11888-96.
467. Van Hul, M. and H.R. Lijnen, *A functional role of gelatinase A in the development of nutritionally induced obesity in mice*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(7): p. 1198-206.
468. Lijnen, H.R., et al., *Deficiency of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) impairs nutritionally induced obesity in mice*. *Thromb Haemost*, 2003. **89**(2): p. 249-55.

469. Demeulemeester, D., D. Collen, and H.R. Lijnen, *Effect of matrix metalloproteinase inhibition on adipose tissue development*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(1): p. 105-10.
470. Lijnen, H.R., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition impairs adipose tissue development in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(3): p. 374-9.
471. Huber, J., et al., *Prevention of high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3 polyunsaturated fatty acids*. Int J Obes (Lond), 2007. **31**(6): p. 1004-13.
472. Derosa, G., et al., *Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients*. Endothelium, 2008. **15**(4): p. 219-24.
473. Kralisch, S., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predicts adiposity in humans*. Eur J Endocrinol, 2007. **156**(2): p. 257-61.
474. Heilbronn, L., S.R. Smith, and E. Ravussin, *Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28 Suppl 4**: p. S12-21.
475. Kintscher, U., et al., *T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1304-10.
476. Wu, H., et al., *T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity*. Circulation, 2007. **115**(8): p. 1029-38.
477. Nishimura, S., et al., *CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 914-20.
478. Winer, S., et al., *Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 921-9.
479. Feuerer, M., et al., *Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 930-9.
480. Duffaut, C., et al., *Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **384**(4): p. 482-5.
481. Anderson, E.K., D.A. Gutierrez, and A.H. Hasty, *Adipose tissue recruitment of leukocytes*. Curr Opin Lipidol. **21**(3): p. 172-7.
482. Ohmura, K., et al., *Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 193-9.
483. Liu, J., et al., *Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 940-5.
484. Elgazar-Carmon, V., et al., *Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding*. J Lipid Res, 2008. **49**(9): p. 1894-903.
485. Leik, C.E. and S.W. Walsh, *Neutrophils infiltrate resistance-sized vessels of subcutaneous fat in women with preeclampsia*. Hypertension, 2004. **44**(1): p. 72-7.

486. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*, 1985. **28**(7): p. 412-419.
487. DeFronzo, R.A., J.D. Tobin, and R. Andres, *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. *Am J Physiol*, 1979. **237**(3): p. E214-23.
488. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing*. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 1995. **57**(1): p. 289-300.
489. Kharitonov, A. and A.B. Shanafelt, *Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases*. *BioDrugs*, 2008. **22**(1): p. 37-44.
490. Lefebvre, P., et al., *Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(3): p. 571-80.
491. Muise, E.S., et al., *Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states*. *Mol Pharmacol*, 2008. **74**(2): p. 403-12.
492. Lefebvre, P., et al., *Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(1): p. 147-191.
493. Insull, W., Jr., *Clinical Utility of Bile Acid Sequestrants in the Treatment of Dyslipidemia: A Scientific Review*. *South Med J*, 2006. **99**(3): p. 257-273
10.1097/01.smj.0000208120.73327.db.
494. Schreuder, T.C., et al., *The hepatic response to FGF19 is impaired in patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. **298**(3): p. G440-5.
495. Brufau, G., et al., *Improved glycemic control with colesevelam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly associated with changes in bile acid metabolism*. *Hepatology*, 2010. **52**(4): p. 1455-64.
496. Reiche, M., et al., *Fibroblast Growth Factor 19 Serum Levels: Relation to Renal Function and Metabolic Parameters*. *Horm Metab Res*, 2010. **42**(03): p. 178,181.
497. Anderlova, K., et al., *The influence of very-low-calorie-diet on serum leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in obese women*. *Physiol Res*, 2006. **55**(3): p. 277-83.
498. Ronti, T., G. Lupattelli, and E. Mannarino, *The endocrine function of adipose tissue: an update*. *Clinical Endocrinology*, 2006. **64**(4): p. 355-365.
499. Shin, D.J. and T.F. Osborne, *FGF15/FGFR4 integrates growth factor signaling with hepatic bile acid metabolism and insulin action*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(17): p. 11110-20.
500. Beil, U., et al., *Effects of interruption of the enterohepatic circulation of bile acids on the transport of very low density-lipoprotein triglycerides*. *Metabolism*, 1982. **31**(5): p. 438-444.
501. Shepherd, J., et al., *Cholestyramine Promotes Receptor-Mediated Low-Density-Lipoprotein Catabolism*. *N Engl J Med*, 1980. **302**(22): p. 1219-1222.
502. Smelt, A.H.M., *Triglycerides and gallstone formation*. *Clinica Chimica Acta*, 2010. **411**(21-22): p. 1625-1631.

503. Pineda Torra, I., et al., *Bile Acids Induce the Expression of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {alpha} Gene via Activation of the Farnesoid X Receptor*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(2): p. 259-272.
504. Cariou, B., et al., *The Farnesoid X Receptor Modulates Adiposity and Peripheral Insulin Sensitivity in Mice*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(16): p. 11039-11049.
505. Zhang, Y., et al., *Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(4): p. 1006-11.
506. Ma, K., et al., *Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006. **116**(4): p. 1102-1109.
507. Stumvoll, M., et al., *Suppression of Systemic, Intramuscular, and Subcutaneous Adipose Tissue Lipolysis by Insulin in Humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(10): p. 3740-3745.
508. Dahlman, I., et al., *A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(10): p. 5834-40.
509. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(5): p. 979-87; quiz 988.
510. Anderson, J.W., E.C. Konz, and D.J. Jenkins, *Health advantages and disadvantages of weight-reducing diets: a computer analysis and critical review*. *J Am Coll Nutr*, 2000. **19**(5): p. 578-90.

10. PŘÍLOHY

10.1 Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29.7.2011

MUDr. Miloš Mráz

10.2 Identifikační záznam

MRÁZ, Miloš. *Nové metabolické regulátory a prozánětlivé faktory v etiopatogeneze diabetes mellitus 2. typu a obezity: vliv farmakologických a dietních intervencí. [Novel metabolic regulators and proinflammatory factors in the etiopathogenesis of type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of pharmacological and dietary interventions]*. Praha, 2011. 175 stran. 5 příloh. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, III. interní klinika. Školitel: Haluzík, Martin.

10.3 Plné texty vlastních publikací tvořících podklady dizertační práce

- Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z, Michalsky D, Kasalicky M, Haluzikova D, Matoulek M, Dostalova I, Humenanska V, Haluzik M. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Sep;71(3):369-75.
- Mraz M, Lacinova Z, Drapalova J, Haluzikova D, Horinek A, Matoulek M, Trachta P, Kavalkova P, Svacina S, Haluzik M. The effect of very-low-calorie-diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, April 2011, 96(4).
- Mraz M, Lacinova Z, Kavalkova P, Haluzikova D, Trachta P, Drapalova J, Hanusova V, Haluzik M. Serum concentrations of fibroblast growth factor 19 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of acute hyperinsulinemia, very-low calorie diet and PPAR- α agonist treatment. *Physiol Res*. 2011 May 16. [Epub ahead of print].

ORIGINAL ARTICLE

Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity

M. Mraz*, M. Bartlova*, Z. Lacinova*, D. Michalsky†, M. Kasalicky†, D. Haluzikova‡, M. Matoulek*, I. Dostalova*, V. Humenanska§ and M. Haluzik*

*Third Department of Medicine, †Department of Surgery, ‡Department of Sports Medicine, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague and §Bio Vendor, Brno, Czech Republic

Summary

Objective Fibroblast growth factor-21 (FGF21) is a novel endocrine and paracrine regulator of metabolic homeostasis. The aim of our study was to measure its serum concentrations in patients with obesity, obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) and healthy subjects (C), and to assess the changes of its circulating levels and mRNA expression after dietary and pharmacological interventions.

Design We measured biochemical parameters, serum FGF21, adiponectin, leptin and insulin levels by commercial ELISA and RIA kits, and mRNA expression in the liver, subcutaneous and visceral fat by RT PCR in 26 obese patients, 11 T2DM patients and 32 control subjects. The interventions were acute hyperinsulinaemia during isoglycaemic–hyperinsulinaemic clamp, very low calorie diet (VLCD) and 3 months treatment with PPAR- α agonist fenofibrate.

Results Baseline serum FGF21 levels were significantly higher in both obese and T2DM patients relative to healthy controls. FGF21 levels in obesity did not significantly differ from T2DM group. Both 3 weeks of VLCD and 3 months of fenofibrate treatment significantly increased FGF21 levels. FGF21 mRNA expression in visceral fat was twofold higher in obesity relative to C group, while it did not differ in subcutaneous fat. VLCD significantly increased FGF21 mRNA expression in subcutaneous fat of obesity. 3-h hyperinsulinaemia during the clamp increased FGF21 levels in T2DM but not in C group.

Conclusion An increase in FGF21 levels after VLCD and fenofibrate treatment may contribute to positive metabolic effect of these interventions and suggests the possibility of direct positive metabolic effects of FGF21 in humans.

(Received 28 July 2008; returned for revision 25 September 2008; finally revised 21 November 2008; accepted 25 November 2008)

Introduction

Recent experimental studies have identified fibroblast growth factor-21 (FGF21) as an important endocrine and paracrine regulator of metabolic homeostasis.^{1–7} The expression of FGF21 in the murine liver is tightly nutritionally regulated. It is increased by starvation and ketogenic state^{8–10} and decreased by refeeding.⁸ Experimental studies have also identified FGF21 as an important downstream target of PPAR- α activation that may mediate some of its metabolic effects.^{8,11}

Animal studies have shown a strong anti-inflammatory, antidiabetic and hypolipidaemic effects of FGF21 administration without any significant side effects.^{1,5,7} In spite of the important metabolic role of FGF21 in animals less is known about the regulation of FGF21 in humans. Only two cross-sectional studies focused on the changes of FGF21 levels in humans have been published to date. Zhang *et al.* found increased FGF21 levels in patients with obesity and metabolic syndrome. Increased FGF21 levels represented an independent risk factor for the presence of metabolic syndrome.¹² Chen *et al.* found increased FGF21 levels in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) relative to healthy subjects.¹³

To our best knowledge no information about the dynamic changes in FGF21 levels after dietary intervention, hypolipidaemic treatment with fibrates or acute hyperinsulinaemia in humans is available. Furthermore, no information about the levels of FGF21 mRNA expression in different adipose tissue depots and in the liver in humans is available. Here we tested the hypothesis that changes in circulating FGF21 levels contribute to the positive metabolic effects of very low calorie diet (VLCD) in patients with obesity or lipid lowering effect of PPAR- α agonist fenofibrate in patients with obesity and T2DM. To this end, we measured circulating levels of FGF21 and its mRNA expression in liver, subcutaneous and visceral adipose tissue of patients with T2DM and obesity and studied its changes after above mentioned interventions.

Methods

Study subjects and interventions

Overall, 26 women with obesity without T2DM, 11 women with obesity and T2DM, and 32 age-matched healthy control women were included into the study. The body weight of all study participants

Correspondence: Martin Haluzik, Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University, U Nemocnice 1, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 224 96 29 08; Fax: +420 224 91 97 80; E-mail: mhalu@lfl.cuni.cz

remained stable for at least 3 months before the beginning of the study.

VLCD substudy

Twelve out of 26 obese subjects without T2DM underwent a 3-week VLCD programme. They were hospitalized in the Third Department of Medicine, General University Hospital and were given a very-low-calorie diet (VLCD) with energy content of 2300 kJ/day for 3 weeks.

Fenofibrate treatment substudy

Eleven obese females with T2DM and 11 non-obese women were included into fenofibrate intervention study. T2DM patients were treated with diet, metformin alone or combination of metformin and glimepiride before the beginning of the study. The diabetic medication remained unchanged from 3 months before the start throughout the entire study. The diabetic subjects were treated with PPAR- α agonist fenofibrate (Lipanthyl M 267) for 3 months. Their insulin sensitivity before and after 3 months of fenofibrate treatment was examined by isoglycaemic–hyperinsulinaemic clamp as described previously.¹⁴ Eleven lean healthy nondiabetic subjects, who were free of any medication, underwent a single isoglycaemic–hyperinsulinaemic clamp and served as a control group in fenofibrate intervention study.

FGF21 and PPAR γ mRNA and protein expression substudy

The mRNA expression of FGF21 and PPAR γ in visceral and subcutaneous fat and the FGF21 mRNA expression in liver were measured in another patients' population whose clinical characteristics were described previously in detail.¹⁵ Fat samples were obtained from 10 obese women undergoing gastric banding surgery for third grade obesity and from 12 lean control women undergoing elective cholecystectomy. Liver samples ($n = 5$) were obtained from obese women undergoing elective sleeve gastrectomy operation for third grade obesity.

Written informed consent was signed by all participants before being enrolled into the study. The study was approved by the Human Ethical Review Committee, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic and was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki as revised in 2000.

Anthropometric examination, blood and tissue sampling

All subjects were measured and weighted and their body mass index (BMI) was calculated. Blood samples were withdrawn between 07:00 and 08:00 h after overnight fasting. Blood samples were separated by centrifugation for 10 min at 1000 g within 30 min from blood collection. Serum was subsequently stored in aliquots at -70°C until further analysis.

Clinical and hormonal parameters in obese patients on VLCD were measured 1 day before the beginning of the diet and at the end of the third week of VLCD. Samples of subcutaneous adipose tissue from women with third degree obesity were obtained from the

abdominal region under local trimecain (Mesocain 1% inj. sol.) anaesthesia by single fine needle biopsy using cannula Braunüle[®] MT size 4 (G 12, internal/external diameter 2.2/2.7 mm, length 80 mm; Braun Melsungen, Melsungen, Germany) 1 day before the beginning of the diet and at the end of the third week of VLCD.

Clinical and hormonal parameters in type 2 diabetes patients were measured at baseline and after 3 months of treatment with PPAR- α agonist – fenofibrate (200 mg, Lipanthyl 267 M).

The anthropometric examination and blood drawing in patients from FGF21 mRNA and protein expression substudy was performed 1 day before the operation. Paired samples of the subcutaneous and visceral adipose tissue from non-obese and obese women were collected at the beginning of surgery (gastric banding in obese and elective cholecystectomy in control subjects, respectively). Approximately 100 mg of adipose tissue was collected to 1 ml of RNA stabilization reagent (RNAlater, Qiagen, Germany) and stored at -80°C until further analysis.

Hormonal and biochemical assays

Serum FGF21 levels were measured by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Biovendor, Czech Republic), following the manufacturer's instructions. Serum samples for FGF levels measurement were diluted 1 : 3 with a dilution buffer prior to the assay. The standard curve range for the assay was 15.6–1000.0 pg/ml. Sensitivity was 10 pg/ml and the intra- and interassay variability was 3–8% and 10–13%, respectively. Serum insulin concentrations were measured by commercial RIA kit (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette Cedex, France). Sensitivity was 2.0 $\mu\text{IU/ml}$ and the intra- and interassay variability was < 5% and < 9%, respectively. Serum adiponectin levels were measured by commercial RIA kit (Linco Research, St Charles, Missouri). Sensitivity was 1.0 ng/ml and the intra- and interassay variability of kit was < 5.0% and < 9.0%, respectively. Serum leptin concentrations were measured by commercial ELISA kit (Biovendor, Brno, Czech Republic). Sensitivity was 0.12 ng/ml and the intra- and interassay variability was < 5.0% and < 9.0%, respectively.

Biochemical parameters were measured in the Department of Biochemistry of General University Hospital by standard laboratory methods. Homeostasis model assessment (HOMA-R) index was calculated as previously described¹⁶ using the following formula:

$$\frac{\text{Fasting serum insulin (mIU/l)} \times \text{Fasting serum glucose (mmol/l)}}{22.5}$$

Determination of mRNA expression

Total RNA was extracted from 60 to 80 mg of subcutaneous and visceral adipose tissue by homogenization using MagNA lyser (Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim, Germany) instrument and following isolation of RNA on automatic isolator MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) using MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). The integrity of the RNA was checked by visualization of 18S and 28S ribosomal bands on 1% agarose gel with ethidium bromide. Concentration and purity of RNA were determined by spectrophotometer (BioPhotometer Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

A 0.05 µg of total RNA was used for reverse transcription to synthesize the first strand cDNA using the oligo(dT) primers following the instructions of the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Science, Vilnius, Lithuania). cDNA was used for determination of gene expression of FGF21, PPAR γ and 18S rRNA by method real-time PCR performed on ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) using TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, NO AmpErase[®] UNG and specific TaqMan Gene expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA).

All PCRs for each gene were amplified separately. Controls with no template cDNA were performed with each assay and all samples were run at least in duplicates. The increase in fluorescence was measured in real time and data were obtained as threshold cycle (C_T) values. Results were normalized to 18S rRNA. Relative gene expression of genes was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (C_T gene of interest – C_T 18S rRNA).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed on SIGMASTAT software (Jandel Scientific, San Rafael, CA). The results are expressed as means \pm standard error means (SEM). Changes of FGF21 levels and hormonal parameters between obese women vs. control subjects were evaluated by ANOVA, unpaired *t*-test or paired *t*-test and Mann–Whitney Rank Sum Test as appropriate. The changes of FGF21 during the clamp were analysed by One Way Repeated Measures Analysis of Variance followed by Holm–Sidak test. Pearson or Spearman correlation tests were used to calculate the relationships between FGF21 levels and other parameters.

Results

Baseline characteristics of patients with obesity, patients with T2DM and control group

Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of obese, T2DM and control groups are shown in Table 1. As expected,

BMI, HOMA index, blood glucose levels, serum triglyceride, leptin and insulin concentrations were significantly higher in both obese and T2DM group relative to control subjects. On the contrary, adiponectin levels were significantly lower in obese group and tended to do so in T2DM group. No differences in serum cholesterol concentrations were found between the groups. When comparing T2DM with obese group, diabetic group had significantly lower BMI and leptin levels while age, blood glucose levels, triglycerides, insulin levels and HOMA index were significantly higher in T2DM group relative to obese subjects.

Anthropometric and clinical characteristics of patients included into VLCD study

The influence of VLCD on anthropometric, biochemical and hormonal parameters is summarized in Table 2. At baseline, patients with obesity had significantly higher BMI, blood glucose, serum insulin, HOMA index and leptin levels, and lower serum adiponectin levels relative to control subjects (see Table 1). The groups did not significantly differ in serum triglyceride and cholesterol levels. VLCD induced a significant decrease in BMI and HOMA index. Insulin, glucose and leptin concentrations tended to decrease after VLCD, but the difference did not reach the statistical significance. No significant influence of VLCD on serum cholesterol, triglyceride and adiponectin levels was found.

Anthropometric and clinical characteristics of patients included into fenofibrate treatment study

Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of the study subgroup are shown in Table 3. At baseline, BMI, blood glucose, serum triglyceride, insulin, glycated haemoglobin levels and atherogenic index were significantly higher while serum HDL cholesterol concentrations were significantly lower in T2DM group relative to control group. Three months of treatment with fenofibrate led to a significant decrease of serum triglyceride concentrations (Table 3), while blood glucose, HOMA index and glycated

Table 1. Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of control, obese and T2DM groups

Group	Control	Obese	T2DM
Number of subjects	32	26	11
Age (years)	47.7 \pm 2.3	41.6 \pm 2.3	54.1 \pm 2.4***
BMI (kg/m ²)	23.9 \pm 0.4	45.6 \pm 1.7**	36.7 \pm 2.9****
Blood glucose (mmol/l)	4.30 \pm 0.23	5.64 \pm 0.38**	8.48 \pm 0.68*****
Cholesterol (mmol/l)	5.07 \pm 0.17	4.65 \pm 0.21	5.22 \pm 0.32
Triglyceride (mmol/l)	1.15 \pm 0.11	1.57 \pm 0.13*	2.96 \pm 0.39****
Insulin (mIU/l)	11.18 \pm 2.06	24.81 \pm 2.93**	44.2 \pm 7.1*****
HOMA index	2.08 \pm 0.56	5.94 \pm 0.80**	16.66 \pm 0.21*****
Leptin (ng/ml)	12.32 \pm 1.64	45.87 \pm 2.28**	32.43 \pm 3.81*****
Adiponectin (µg/ml)	22.41 \pm 1.82	13.21 \pm 1.09**	17.46 \pm 4.04
FGF21 (pg/ml)	213 \pm 23	323 \pm 35*	395 \pm 56*

Control, control group of healthy women; Obese, obese women without type 2 diabetes mellitus; T2DM, obese women with type 2 diabetes mellitus. Values are means \pm SEM. Statistical significance is from one-way ANOVA. **P* < 0.05 vs. control group; ***P* < 0.01 vs. control group; ****P* < 0.01 T2DM vs. obese; BMI, body mass index; FGF21, fibroblast growth factor-21; HOMA, homeostasis model assessment of insulin resistance.

Table 2. Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of obese group before and after 3 weeks of VLCD

Group	Obese	
	Obese 1	Obese 2
Number of subjects	12	12
BMI (kg/m ²)	49.50 ± 2.66*	47.12 ± 2.47***
Blood glucose (mmol/l)	5.91 ± 0.47*	5.26 ± 0.26*
Cholesterol (mmol/l)	4.50 ± 0.23	4.12 ± 0.22
Triglyceride (mmol/l)	1.37 ± 0.01	1.17 ± 0.10
Insulin (mIU/l)	34.03 ± 3.56*	30.34 ± 4.11*
HOMA index	8.53 ± 1.09*	6.57 ± 0.88***
Leptin (ng/ml)	45.83 ± 3.89*	42.47 ± 4.77*
Adiponectin (µg/ml)	13.66 ± 1.45*	14.33 ± 1.52*

Obese 1, obese female subjects before 3 weeks of VLCD; Obese 2, obese female subjects after 3 weeks of VLCD. Values are means ± SEM. Statistical significance is from one-way ANOVA and Paired *t*-test, respectively. **P* < 0.05 obese vs. control group; ***P* < 0.05 obese 1 vs. obese 2; BMI, body mass index; HOMA, homeostasis model assessment of insulin resistance.

haemoglobin slightly but significantly increased (Table 3). Other parameters including BMI were not affected by fenofibrate treatment (Table 3). Insulin sensitivity of T2DM group was significantly lower relative to control group and was not significantly affected by fenofibrate treatment (data not shown).

The influence of obesity and obesity/T2DM on FGF21 levels and the relationship of FGF21 levels with anthropometric and metabolic parameters

Circulating concentrations of FGF21 were significantly higher in both obese and T2DM groups relative to control subjects (Table 1).

Group	Control	T2DM	
		Baseline	Fenofibrate
Number of subjects	11	11	11
BMI (kg/m ²)	23.7 ± 0.8	36.7 ± 2.9*	36.5 ± 2.7*
Blood glucose (mmol/l)	4.97 ± 0.19	8.48 ± 0.68*	9.43 ± 0.84***
Glycated haemoglobin (%)	3.81 ± 0.08	5.77 ± 0.56*	6.10 ± 0.58***
Cholesterol (mmol/l)	5.39 ± 0.24	5.22 ± 0.32	5.09 ± 0.25
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.55 ± 0.28	1.17 ± 0.11*	1.20 ± 0.11*
Triglyceride (mmol/l)	0.98 ± 0.12	2.96 ± 0.39*	2.17 ± 0.24***
Insulin (mIU/l)	23.0 ± 2.9	44.2 ± 7.1*	47.5 ± 8.0*
HOMA index	5.08 ± 0.56	16.66 ± 0.21*	20.12 ± 0.30***
Adiponectin (µg/ml)	22.41 ± 1.82	17.46 ± 4.04	16.53 ± 2.56
Atherogenic index	1.88 ± 0.09	3.17 ± 0.37*	3.02 ± 0.75*

Control, control group of healthy women; T2DM baseline, obese women with type 2 diabetes mellitus before 3 months of treatment with PPAR-α agonist fenofibrate, T2DM fenofibrate, obese women with type 2 diabetes mellitus after 3 months of treatment with PPAR-α agonist fenofibrate. Values are means ± SEM. Statistical significance is from one-way ANOVA and Paired *t*-test, respectively. **P* < 0.05 vs. control group; ***P* < 0.05 vs. T2DM baseline; BMI, body mass index; FGF21, fibroblast growth factor-21; HOMA, homeostasis model assessment of insulin resistance.

FGF21 levels did not significantly differ between obese and T2DM group.

In a combined population of all three groups FGF21 levels significantly positively correlated with BMI, blood glucose and serum leptin levels while an inverse relationship of FGF21 with serum adiponectin levels was found (Table 4). On the contrary, FGF21 levels were not significantly related to serum cholesterol, triglyceride and insulin levels or HOMA index.

In a fenofibrate substudy, no significant relationship between serum FGF21 levels and various measures of insulin sensitivity from glucose clamp were found (data not shown).

The influence of VLCD, fenofibrate treatment and hyperinsulinaemia during the clamp on serum FGF21 levels

Both the 3 weeks of VLCD (Fig. 1) and 3 months of treatment with fenofibrate (Fig. 2) significantly increased serum FGF21 levels relative to baseline. In control group, serum FGF21 levels slightly but significantly decreased after 90 min of hyperinsulinaemia during the isoglycaemic-hyperinsulinaemic clamp and returned to baseline values after 180 min of hyperinsulinaemia (Fig. 3). In T2DM group both before and after fenofibrate treatment, 180 min of hyperinsulinaemia during the clamp significantly increased serum FGF21 levels (Fig. 3).

FGF21 and PPARγ mRNA expression in the liver, subcutaneous and visceral adipose tissue

FGF21 mRNA expression was detectable in both subcutaneous and visceral adipose tissue. While FGF21 mRNA expression in subcutaneous fat did not differ between lean and obese subjects, it was two-fold higher in visceral fat of obese relative to lean individuals (Fig. 4). Liver FGF21 mRNA expression was about 100-fold higher

Table 3. Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of control group and T2DM subjects before and after treatment with fenofibrate

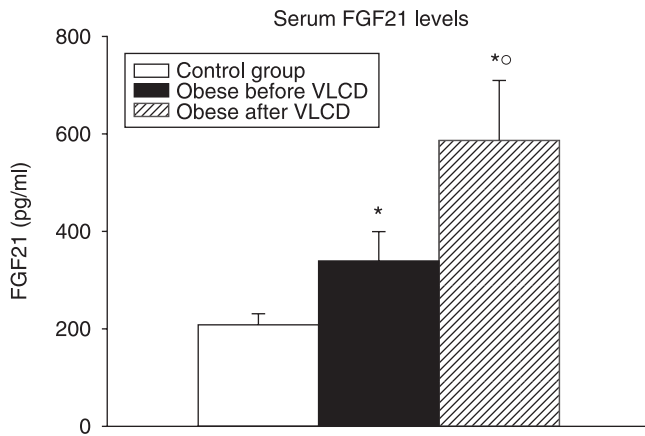


Fig. 1 Serum FGF21 concentrations in control group (open bar), obese patients before (filled bar) and after (dashed bar) 3 weeks of very low calorie diet (VLCD). Values are means \pm SEM. Statistical significance is from one-way ANOVA and Paired *t*-test, respectively. **P* < 0.05 vs. control group; °*P* < 0.05 obese group after VLCD vs. obese group before VLCD.

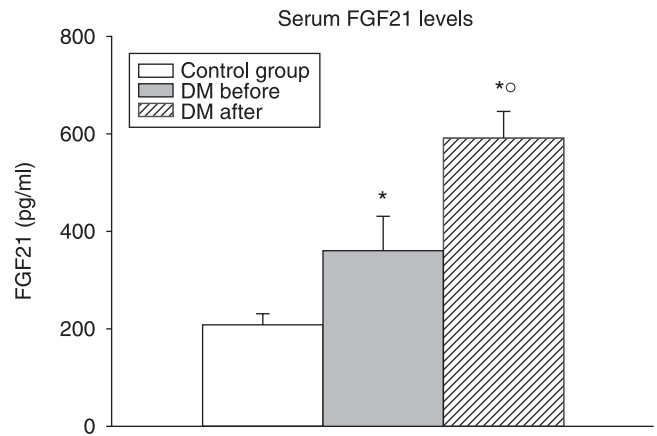


Fig. 2 Serum FGF21 concentrations in control group (open bar), type 2 DM group before (filled bar) and after 3 months of fenofibrate treatment (dashed bar). Values are mean \pm SEM. Statistical significance is from one-way ANOVA and paired *t*-test. **P* < 0.05 vs. control group, °*P* < 0.05 T2DM after fenofibrate treatment vs. T2DM group before fenofibrate treatment.

Table 4. The relationships of circulating FGF21 levels with anthropometric, biochemical and hormonal parameters in all three groups

	FGF21	
	<i>r</i>	<i>P</i>
BMI	0.359	0.003
Blood glucose	0.354	0.008
Cholesterol		NS
Triglycerides		NS
Insulin		NS
HOMA-index		NS
Leptin	0.306	0.016
Adiponectin	-0.301	0.018

The correlations were calculated in a combined population of healthy non-obese women, obese women without and with type 2 diabetes mellitus. BMI, body mass index; HOMA, homeostasis model assessment of insulin resistance; Statistical significance is from Spearman correlation test; NS, nonsignificant.

relative to its adipose tissue mRNA expression. Three weeks of VLCD significantly increased FGF21 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue of obese subjects (data not shown).

In a combined population of both lean and obese group mRNA expression of FGF21 in visceral adipose tissue correlated positively with BMI (*r* = 0.692, *P* < 0.05).

PPAR γ mRNA expression did not significantly differ between control and obese patients in either subcutaneous or visceral adipose tissue (Fig. 4).

Discussion

Our study demonstrated that both 3 weeks of VLCD and 3 months of PPAR- α agonist treatment significantly increased circulating FGF21 levels regardless of the changes in insulin sensitivity that was improved only in VLCD-treated group but remained unchanged in PPAR- α agonist-treated group. We have also shown that both liver

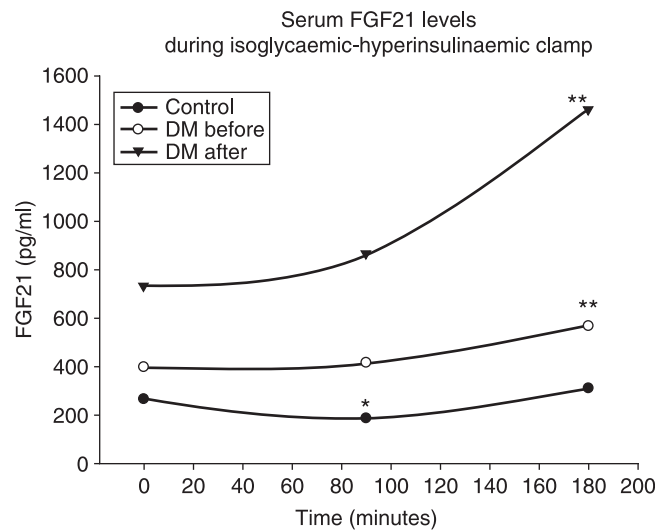


Fig. 3 Changes of FGF21 concentrations during isoglycaemic–hyperinsulinaemic clamp of control group of healthy women (filled circles), obese women with type 2 DM before (open circles) and after 3 months of treatment with PPAR- α agonist – fenofibrate (filled triangles). Statistical significance is from RM ANOVA: **P* < 0.05 vs. baseline value of the respective group, ***P* < 0.01 vs. baseline value of the respective group.

and adipose tissue are the sites of production of FGF21 in humans. Collectively, these findings are in agreement with presumption that both liver and adipose tissue affects metabolic processes through their endocrine production.^{17–21} Previous experimental studies have shown that FGF21 is an important metabolic regulator produced primarily by the liver that is necessary for normal activation of hepatic lipid oxidation, triglyceride clearance and ketogenesis induced by ketogenic diet. FGF21 has also been identified as a mediator of the pleiotropic actions of PPAR- α in mice,^{8,11,22} which is considered a key regulator of the adaptation to fasting.²³ Even more importantly, systemic administration of FGF21 markedly decreased

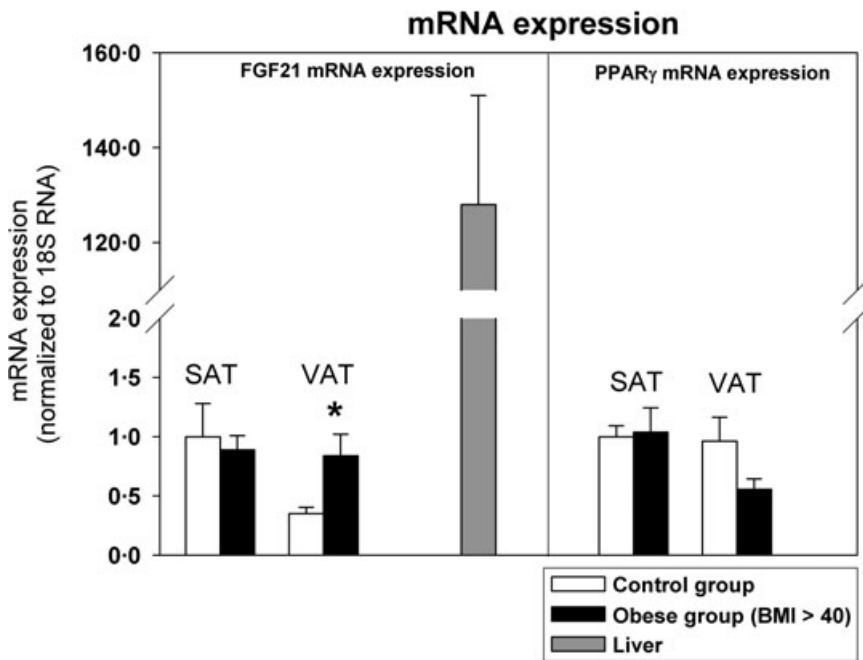


Fig. 4 Comparison of FGF21 and PPAR γ mRNA expression in subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissue samples obtained from healthy women ($n = 12$) and obese women without type 2 DM ($n = 10$) and mRNA expression of FGF21 in liver tissue samples obtained from obese subjects ($n = 5$). Values are mean \pm SEM. Statistical significance is from one-way ANOVA and t -test: * $P < 0.05$ vs. control group.

blood glucose levels in both the diabetic rodents¹ and monkeys,⁵ suggesting that FGF21 might be an interesting candidate for treating diabetes and/or other metabolic dysregulations clustered in patients with metabolic syndrome.¹¹

In contrast to numerous data from animal studies, very little is known about the regulation of FGF21 in humans. Two cross-sectional human studies published to date described increased FGF21 levels in obese¹² and type 2 diabetic¹³ patients relative to lean individuals. Elevated circulating FGF21 levels were independently associated with increased risk of metabolic syndrome.¹² Here we show that the increase of FGF21 levels found in obesity and/or T2DM is further augmented by both diet intervention and PPAR- α agonist treatment. These results are in line with data from previous animal studies which reported a 25-fold increase of liver FGF21 mRNA levels in mice after fasting or treatment with PPAR- α agonists.²⁴ Increased levels of FGF21 in patients undergoing VLCD thus could be at least partially interpreted as a response to fasting with subsequent PPAR- α activation. Three weeks of VLCD not only decreased the body weight but also improved insulin sensitivity as roughly measured by HOMA index. These findings suggest the possibility that some of the positive metabolic effects of the hypocaloric diet could be mediated by the increase in FGF21 levels. On the contrary, treatment of diabetic patients with PPAR- α agonist fenofibrate increased FGF21 levels to a similar degree as in diet intervention study regardless of their unchanged insulin sensitivity as measured by isoglycaemic-hyperinsulinaemic clamp. The diabetes compensation was even slightly worsened after fenofibrate treatment arguing rather against the principal role of increased endogenous FGF21 in increasing insulin sensitivity in this group of patients. It should be noted, however, that the relatively low number of patients included in our study and the use of HOMA index as a measure of insulin sensitivity in VLCD substudy could have influenced the results.

Another important finding of our study is the differential effect of short-term hyperinsulinaemia during the clamp on serum FGF21 levels in obese T2DM patients vs. lean nondiabetic subjects. Three hours of isoglycaemic-hyperinsulinaemic clamp significantly increased serum FGF21 levels in obese T2DM patients while no such effect appeared in healthy subjects. In fact, 90 min of hyperinsulinaemia transiently decreased FGF21 in healthy subjects. Our current data do not allow us to unravel the mechanism and/or physiological significance of differential regulation of FGF21 by short-term hyperinsulinaemia. It is tempting to speculate, that the increase of FGF21 levels in insulin resistant T2DM patients may represent a compensatory mechanism to facilitate glucose uptake blunted by insulin resistance. Collectively, our and previously published data suggest that serum FGF21 levels in humans are regulated by nutritional status. The finding of increased FGF21 levels in obesity and its augmentation by VLCD is in line with our previous finding of decreased FGF21 levels in chronically malnourished patients with anorexia nervosa.²⁵ The physiological significance of these changes and its relevance in the development and/or protection against insulin resistance and/or type 2 diabetes remains to be determined.

Although the predominant site of FGF21 production in mice is the liver,^{6,8,26} FGF21 mRNA expression was detected in human subcutaneous adipose tissue and it positively correlated with FGF21 circulating levels.¹² Here we measured the mRNA expression of FGF21 in human visceral and subcutaneous adipose tissue and in the liver. In contrast to previous results by Zhang *et al.*,¹² we did not find a significant difference in FGF21 mRNA expression in subcutaneous adipose tissue between obese and control group. Interestingly, we found significantly higher FGF21 expression in visceral adipose tissue of obese relative to lean subjects. As it was recently reported that FGF21 was up-regulated by PPAR- γ agonists in mice,²⁷ we assessed whether increased adipose tissue FGF21 mRNA expression in visceral fat correlates with PPAR- γ mRNA

expression. In contrast to FGF21, no significant differences were found in PPAR- γ mRNA expression between lean and obese subjects in either visceral or subcutaneous. This finding suggests that PPAR- γ activation did not significantly contribute to differences in FGF21 levels between obese and lean individuals in our study.

To assess the quantitative importance of FGF21 production in fat with respect to its circulating levels we also measured FGF21 mRNA expression in the principal site of its production in the liver. FGF21 expression in the liver was more than 100-fold higher relative to fat suggesting that the liver remains the most important producer of this factor in humans.

Taken together, our study demonstrated that FGF21 levels were significantly increased in patients with obesity, and obesity and type 2 diabetes mellitus relative to lean subjects. Both hypocaloric diet and PPAR- α agonist treatment further increased FGF21 levels while insulin sensitivity was improved only in VLCD-treated patients. The clarification of importance of FGF21 in insulin-sensitizing effects of dietary interventions and its potential in the treatment of type 2 diabetes and/or other metabolic abnormalities in patients with metabolic syndrome require further investigation.

Acknowledgements

Supported by MZ0VFN2005 and IGA 8302-5 to MH.

Conflict of interest

The authors declare there is no conflict of interest associated with this manuscript.

References

- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A. *et al.* (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 1627–1635.
- Eswarakumar, V.P., Lax, I. & Schlessinger, J. (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine and Growth Factor Review*, **16**, 139–149.
- Fu, X.B., Li, X.K., Wang, T. *et al.* (2004) Enhanced anti-apoptosis and gut epithelium protection function of acidic fibroblast growth factor after cancelling of its mitogenic activity. *World Journal of Gastroenterology*, **10**, 3590–3596.
- Itoh, N. & Ornitz, D.M. (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics*, **20**, 563–569.
- Kharitonov, A., Wroblewski, V.J., Koester, A. *et al.* (2007) The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*, **148**, 774–781.
- Tomlinson, E., Fu, L., John, L. *et al.* (2002) Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology*, **143**, 1741–1747.
- Wente, W., Efanov, A.M., Brenner, M. *et al.* (2006) Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic β -cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes*, **55**, 2470–2478.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R. *et al.* (2007) Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR- α and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metabolism*, **5**, 426–437.
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A. *et al.* (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metabolism*, **2**, 217–225.
- Lundasen, T., Hunt, M.C., Nilsson, L.M. *et al.* (2007) PPAR- α is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **360**, 437–440.
- Kharitonov, A. & Shanafelt, A.B. (2008) Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases. *BioDrugs*, **22**, 37–44.
- Zhang, X., Yeung, D.C., Karpisek, M. *et al.* (2008) Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*, **57**, 1246–1253.
- Chen, W.W., Li, L., Yang, G.Y. *et al.* (2008) Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **116**, 65–68.
- Anderlova, K., Dolezalova, R., Housova, J. *et al.* (2007) Influence of PPAR- α agonist fenofibrate on insulin sensitivity and selected adipose tissue-derived hormones in obese women with type 2 diabetes. *Physiological Research*, **56**, 579–586.
- Dolinkova, M., Dostalova, I., Lacinova, Z. *et al.* (2008) The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **291**, 63–70.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S. *et al.* (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, **28**, 412–419.
- Haluzik, M. & Haluzikova, D. (2006) The role of resistin in obesity-induced insulin resistance. *Current Opinion in Investigational Drugs*, **7**, 306–311.
- Havel, P.J. (2002) Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Current Opinions in Lipidology*, **13**, 51–59.
- Housa, D., Housova, J., Vernerova, Z. *et al.* (2006) Adipocytokines and cancer. *Physiological Research*, **55**, 233–244.
- Trujillo, M.E. & Scherer, P.E. (2005) Adiponectin – journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *Journal of Internal Medicine*, **257**, 167–175.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M. *et al.* (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425–432.
- Moyers, J.S., Shiyanova, T.L., Mehrbod, F. *et al.* (2007) Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPAR- γ signaling. *Journal of Cellular Physiology*, **210**, 1–6.
- Lefebvre, P., Chinetti, G., Fruchart, J.C. *et al.* (2006) Sorting out the roles of PPAR- α in energy metabolism and vascular homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, **116**, 571–580.
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G. *et al.* (2007) Endocrine regulation of the fasting response by PPAR- α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metabolism*, **5**, 415–425.
- Dostalova, I., Kavalkova, P., Haluzikova, D. *et al.* (2008) Plasma concentrations of fibroblast growth factors 19 and 21 in patients with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**, 3627–3632.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M. *et al.* (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1492**, 203–206.
- Muise, E.S., Azzolina, B., Kuo, D.W. *et al.* (2008) Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Molecular Pharmacology*, **74**, 403–412.

The Effect of Very-Low-Calorie Diet on mRNA Expression of Inflammation-Related Genes in Subcutaneous Adipose Tissue and Peripheral Monocytes of Obese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

M. Mraz, Z. Lacinova, J. Drapalova, D. Haluzikova, A. Horinek, M. Matoulek, P. Trachta, P. Kavalkova, S. Svacina, and M. Haluzik

Third Department of Medicine (M.Mr., Z.L., J.D., D.H., A.H., M.Ma., P.T., P.K., S.S., M.H.) and Department of Sports Medicine (D.H.), General University Hospital and First Medical Faculty, Charles University, 128 08 Prague 2, Czech Republic

Context: Low-grade inflammation links obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), and cardiovascular diseases.

Objective: To explore the expression profile of genes involved in inflammatory pathways in adipose tissue and peripheral monocytes (PM) of obese patients with and without T2DM at baseline and after dietary intervention.

Design: Two-week intervention study with very-low-calorie diet (VLCD).

Setting: University hospital.

Patients: Twelve obese females with T2DM, 8 obese nondiabetic females (OB) and 15 healthy age-matched females.

Intervention: Two weeks of VLCD (2500 kJ/d).

Main Outcome Measures: Metabolic parameters, circulating cytokines, hormones, and mRNA expression of 39 genes in sc adipose tissue (SCAT) and PM.

Results: Both T2DM and OB group had significantly increased serum concentrations of circulating proinflammatory factors (C-reactive protein, TNF α , IL-6, IL-8), mRNA expression of macrophage antigen CD68 and proinflammatory chemokines (CCL-2, -3, -7, -8, -17, -22) in SCAT and complementary chemokine receptors (CCR-1, -2, -3, -5) and other proinflammatory receptors (toll-like receptor 2 and 4, TNF receptor superfamily 1A and 1B, IL-6R) in PM, with OB group showing less pronounced chemoattracting and proinflammatory profile compared to T2DM group. In T2DM patients VLCD decreased body weight, improved metabolic profile, and decreased mRNA expression of up-regulated CCRs in PM and chemokines [CCL 8, chemokine (C-X-C motif) ligand 10] in SCAT. VLCD markedly increased mRNA expression of T-lymphocyte attracting chemokine CCL-17 in SCAT.

Conclusion: Obese patients with and without T2DM have increased mRNA expression of chemoattracting and proinflammatory factors in SCAT and expression of corresponding receptors in PM. Two weeks of VLCD significantly improved this profile in T2DM patients. (*J Clin Endocrinol Metab* 96: 0000–0000, 2011)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2010-1858 Received August 9, 2010. Accepted January 3, 2011.

Abbreviations: ATM, Adipose tissue macrophage; BMI, body mass index; CCL, chemokine (C-C motif) ligand; CCR, chemokine (C-C motif) receptor; CRP, C-reactive protein; CXCL, chemokine (C-X-C motif) ligand; OB, obese nondiabetic; PM, peripheral monocyte; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SCAT, sc adipose tissue; T2DM, type 2 diabetes mellitus; T_H, T helper lymphocyte; TLR, toll-like receptor; TNFRSF, TNF receptor superfamily; VLCD, very-low-calorie diet.

Subclinical inflammation is one of the key mechanisms linking obesity, insulin resistance, and other components of the metabolic syndrome (1–3). The pivotal role in the development of this chronic low-grade proinflammatory state is now attributed to adipose tissue and its endocrine factors (1, 4–6). Obesity is characterized by elevated circulating levels of acute phase proteins, proinflammatory cytokines, and chemokines such as TNF α , IL-6, IL-8, and chemokine C-C motif ligand 2 (CCL-2), leptin, resistin, and many others (1, 5). These factors induce insulin resistance by interference with postreceptor insulin signaling cascade (7) and accelerate the development of endothelial dysfunction/atherosclerosis (5).

A number of studies have shown that both adipocytes (8) as well as immunocompetent cells residing in adipose tissue contribute to this inflammatory process (2, 9). Excessive accumulation of adipose tissue is associated with elevated number of adipose tissue macrophages (ATMs) (2, 10, 11) and increased expression of proinflammatory factors in fat (2, 9). Accumulation of ATMs in fat is linked to insulin resistance and endothelial dysfunction in obese subjects (12).

It has been demonstrated that most of the ATMs in fat are derived from circulating mononuclear cells outside the adipose tissue (9–11). Peripheral blood monocytes are recruited into adipose tissue by various chemoattractants produced by hypertrophic adipocytes as well as resident stromal macrophages and T-lymphocytes. Their products subsequently act on adipocytes in a paracrine manner promoting the production of proinflammatory factors. This cross-talk between ATMs and adipocytes generates a vicious circle of increased adipose tissue inflammation that contributes to the low-grade systemic inflammation (13, 14).

At present, very little is known about interactions between circulating monocytes and adipose tissue, although this interplay may be critically important in the development of systemic subclinical inflammation, type 2 diabetes mellitus (T2DM), and its atherosclerotic complications. We hypothesized that this interplay is driven by adipose tissue production of factors associated with the recruitment of peripheral monocytes (PM) into adipose tissue, such as chemokines and chemokine receptors. Furthermore, we tested the hypothesis that metabolic improvements after short-term very-low-calorie diet (VLCD) could be mediated by improved inflammatory profile and decreased expression of chemotactic factors in both PM and sc adipose tissue (SCAT). To this end, we evaluated the expression of a selected panel of inflammation-related factors in SCAT and PM of patients with obesity and T2DM.

Materials and Methods

Study subjects

Twelve obese women with T2DM (T2DM group), eight obese nondiabetic females (OB group), and fifteen healthy normal-weight age-matched women (C group) were included in the study. Eight of 12 T2DM patients had been treated either with oral antidiabetic drugs (metformin, sulfonylurea derivatives, or thiazolidindiones), insulin, or its combination. The rest of T2DM patients were treated by diet only. All diabetic patients were on antihypertensive treatment, four patients were treated by statins, one by fibrate. None of the patients had malignant tumor, thyroid disease, or acute infectious disease. In the OB group one patient was treated with antihypertensives and none of them was on hypolipidemic medication. Control subjects had no history of obesity and/or diabetes mellitus, arterial hypertension, or lipid metabolism disturbances and received no medication. Blood tests confirmed normal blood count, biochemical and hormonal parameters.

All T2DM patients underwent a 2-week VLCD with energy intake of 2500 kJ/d (600 kcal/d). During this program, all patients were hospitalized in the Third Department of Medicine, General University Hospital, Prague.

The body weight of all study participants remained stable for at least 3 months before the beginning of the study. Written informed consent was signed by all participants before being enrolled in the study. The study was approved by Human Ethical Review Committee, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic and was performed in accordance with the guidelines proposed in Declaration of Helsinki.

Anthropometric examination, blood, and adipose tissue sampling

All patients with T2DM were examined twice: at basal state before the beginning of any intervention and after 2 wk of VLCD, while OB and normal-weight healthy women were examined only once. All subjects were measured and weighed, and their body mass index (BMI) was calculated. Blood samples for cytokines, C-reactive protein (CRP), insulin, and biochemical parameters measurement were withdrawn between 0700 h and 0800 h after 12 h of overnight fasting. Blood samples were separated by centrifugation for 10 min at 1000 \times g within 30 min from blood collection. Serum was subsequently stored in aliquots at -80 C until further analysis.

Blood samples for monocyte isolation were collected in Na-EDTA anticoagulant from all subjects and processed within 1–2 h.

Samples of SCAT for mRNA expression analysis were obtained from the abdominal region as described previously elsewhere (6).

Hormonal and biochemical assays

Serum adiponectin, CRP, leptin, resistin, and insulin concentrations were measured by commercial ELISA and RIA kits as described previously (8). Serum concentrations of IL-6, IL-8, CCL-2, and TNF α were measured using Human serum adipokine panel B LINCOplex Kit on Luminex200 instrument (Linco Research, St. Charles, MO). Sensitivity was 1.6 pg/ml for IL-6, 0.2 pg/ml for IL-8, 0.14 pg/ml for CCL-2, and 0.22 pg/ml TNF α .

The intra- and interassay variabilities were less than 10% and 15%, respectively.

Biochemical parameters were measured in the Department of Biochemistry of General University Hospital by standard laboratory methods.

PM separation and total RNA isolation from monocytes and adipose tissue

Peripheral blood leukocytes were obtained from blood sample using Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences AB, Sweden). For each blood sample, 3.5 ml of Ficoll-Paque™ Plus was placed in a Falcon tube, and then 5 ml blood sample was slowly added. Immediately after this preparation, tubes were centrifuged. After centrifugation, leukocyte agglomerates were placed in a tube containing 10 ml of PBS (0.01 M PBS), pH 7.4. Tubes were centrifuged again, the supernatant was discarded, and the cell pellet was dissolved in PBS. After centrifugation the supernatant was discarded and the pellet was dissolved in DEGAS buffer (0.01 M PBS with 0.5 M EDTA, pH 8 and 1% BSA). Monocytes were isolated from cell pellet with magnetic activated cell sorting technique (MiniMacs Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) using microbeads coated with CD14 antibody (MACS CD14 MicroBeads; Miltenyi Biotec). Total RNA was extracted from CD14+ monocyte samples on MagNA Pure instrument using MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Samples of SCAT were homogenized on a MagNA Lyser Instrument using MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH). Total RNA was extracted from the homogenized sample using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), and cDNA was prepared as described in detail previously (8).

Quantitative real-time PCR

Quantification of mRNA was performed using real-time PCR as described in detail previously elsewhere (8).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed on SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, IL). Anthropometric, biochemical, and hor-

monal results are expressed as means \pm SEM. Differences of gene expression and serum parameters between obese with T2DM and nonobese were evaluated using one-way ANOVA, unpaired *t* test, or Mann-Whitney rank sum test as appropriate. Differences between obese women with T2DM before and after VLCD were evaluated using paired *t* test or Wilcoxon Signed-Rank test as appropriate. Statistical significance was assigned to $P < 0.05$. The Benjamini–Hochberg procedure for false discovery rate was used for multiple testing of mRNA gene expression profiles in both PM and SCAT (15).

Results

Anthropometric, biochemical, and hormonal characteristics of study subjects

Anthropometric, biochemical, and hormonal characteristics of all study groups are summarized in Table 1. As expected, T2DM patients had markedly increased BMI, serum triglycerides, blood glucose, glycated hemoglobin, CRP, insulin, leptin, resistin, TNF α , IL-6, and IL-8 levels compared with control group. T2DM and OB patients had similarly increased levels of insulin, leptin, and resistin. BMI, blood glucose, and glycated hemoglobin was significantly higher in T2DM group compared with OB subjects. CRP and IL-6 in both OB and T2DM group were significantly elevated, whereas TNF α was increased only in T2DM subjects. Serum adiponectin levels were lower in both T2DM and OB relative to control group.

Two weeks VLCD significantly reduced body weight, fasting glycemia, insulinemia, total cholesterol, leptin, CRP, and IL-6 levels in T2DM subjects. Serum resistin and adiponectin concentrations were not significantly affected by VLCD, whereas serum TNF α levels were significantly increased after VLCD.

TABLE 1. Clinical, hormonal, and metabolic characteristics of study subjects

	Controls	Obese	T2DM	
			Before VLCD	After VLCD
Number (n)	15	8	12	12
Age (yr)	54.1 \pm 1.8	51.9 \pm 2.2	57.7 \pm 2.7	57.7 \pm 2.7
Body mass index (kg/m ²)	23.3 \pm 0.6	43.8 \pm 1.6 ^a	51.5 \pm 2.6 ^{a,b}	48.7 \pm 2.3 ^{a,b,c}
C-reactive protein (mg/liter)	0.51 \pm 0.19	1.60 \pm 0.28 ^a	2.25 \pm 0.43 ^a	1.31 \pm 0.30 ^{a,c}
Insulin (mIU/liter)	16.3 \pm 1.1	29.8 \pm 3.4 ^a	35.3 \pm 3.7 ^a	29.4 \pm 4.5 ^a
Blood glucose (mmol/liter)	4.84 \pm 0.16	4.63 \pm 0.14	8.51 \pm 1.11 ^{a,b}	6.28 \pm 0.64 ^{a,b,c}
HbA1c (% IFCC)	3.52 \pm 0.16	3.88 \pm 0.13	6.66 \pm 0.62 ^{a,b}	Not assessed
Cholesterol total (mmol/liter)	5.00 \pm 0.23	5.05 \pm 0.55	4.74 \pm 0.26	3.90 \pm 0.24 ^{a,c}
Triglycerides (mmol/liter)	1.13 \pm 0.19	1.74 \pm 0.31	1.91 \pm 0.15 ^a	1.75 \pm 0.18 ^a
Leptin (ng/ml)	14.3 \pm 2.5	58.1 \pm 3.2 ^a	61.1 \pm 5.8 ^a	54.7 \pm 7.5 ^{a,c}
Resistin (ng/ml)	5.15 \pm 0.37	8.82 \pm 0.92 ^a	9.67 \pm 2.11 ^a	7.13 \pm 1.13
Adiponectin (μ g/ml)	29.2 \pm 3.4	15.3 \pm 2.0 ^a	16.1 \pm 2.0 ^a	14.9 \pm 1.5 ^a
IL-6 (pg/ml)	1.01 \pm 0.14	3.86 \pm 0.55 ^a	2.34 \pm 0.45 ^a	1.54 \pm 0.32 ^{a,c}
IL-8 (pg/ml)	1.22 \pm 0.19	Not assessed	2.53 \pm 0.26 ^a	2.61 \pm 0.29 ^a
CCL-2 (pg/ml)	211 \pm 36	226 \pm 26	240 \pm 35	259 \pm 45
TNF α (pg/ml)	3.52 \pm 0.39	4.77 \pm 0.52	6.53 \pm 0.84 ^a	8.08 \pm 0.97 ^{a,c}

Values are mean \pm SEM. ^a $P < 0.05$ vs. control group; ^b $P < 0.05$ vs. obese group; ^c $P < 0.05$ vs. T2DM group before VLCD.

IFCC, International Federation of Clinical Chemistry.

TABLE 2. Chemokines and chemokine receptors: mRNA expression changes in peripheral monocytes and subcutaneous adipose tissue of obese nondiabetic and T2DM patients relative to control group

Gene symbol	Gene name	Peripheral monocytes				Subcutaneous adipose tissue			
		Obese nondiabetic		T2DM before VLCD		Obese nondiabetic		T2DM before VLCD	
		Fold change	P value	Fold change	P value	Fold change	P value	Fold change	P value
<i>CD68</i>	CD68 molecule	1.40	0.010	1.67	0.008	1.73	0.022	2.18	0.001
<i>CCL-2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	0.84	NS	0.38	0.034	1.28	NS	2.73	0.022
<i>CCL-3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3	1.36	NS	1.71	NS	1.70	0.041	2.59	0.021
<i>CCL-5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	1.22	NS	1.27	NS	0.65	NS	0.93	NS
<i>CCL-7</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 7	ND		ND		2.27	0.007	7.34	<0.001
<i>CCL-8</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 8	0.99	NS	1.12	NS	1.45	NS	2.29	0.011
<i>CCL-17</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 17	ND		ND		4.32	0.001	2.92	0.006
<i>CCL-22</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 22	ND		ND		3.73	0.003	5.02	0.002
<i>CXCL-10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	0.68	NS	0.29	NS	1.50	NS	1.23	NS
<i>CCR-1</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 1	2.12	0.045	2.22	<0.001	1.65	NS	2.39	<0.001
<i>CCR-2</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 2	2.06	0.007	2.20	<0.001	1.04	NS	1.41	NS
<i>CCR-3</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 3	2.93	0.003	0.74	NS	0.62	NS	0.96	NS
<i>CCR-5</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 5	1.29	NS	1.46	0.042	1.91	NS	2.46	<0.001

ND, not detectable; NS, nonsignificant. The mean value of the relative gene expression of control group was taken as 1.0.

mRNA expression of inflammation-related genes in SCAT and PM

The summary of inflammation-related gene mRNA expression in SCAT and PM of T2DM and OB patients relative to control group is shown in Table 2 (chemokines and chemokine receptors), Table 3 (hormones, adipokines, and corresponding receptors) and Table 4 (cytokines and other in-

flammation-related factors and corresponding receptors). At baseline, of the 39 genes studied, significant differences in mRNA expression were detected in 22 genes in SCAT and in 20 genes in PM. mRNA expression in both SCAT and PM was undetectable in three genes (*IL-1 α* , *IL-19*, *IL-20*).

In SCAT of T2DM patients increased expression of almost all measured chemokines was found (Table 2), to-

TABLE 3. Hormones, adipokines, and corresponding receptors: mRNA expression changes in peripheral monocytes and subcutaneous adipose tissue of obese nondiabetic and T2DM patients relative to control group

Gene symbol	Gene name	Peripheral monocytes				Subcutaneous adipose tissue			
		Obese nondiabetic		T2DM before VLCD		Obese nondiabetic		T2DM before VLCD	
		Fold change	P value	Fold change	P value	Fold change	P value	Fold change	P value
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectin	ND		ND		0.71	NS	0.35	<0.001
<i>ADIPOR1</i>	Adiponectin receptor 1	1.57	NS	1.87	0.003	1.22	NS	0.92	NS
<i>ADIPOR2</i>	Adiponectin receptor 2	1.27	NS	1.23	NS	0.68	NS	0.68	0.040
<i>LEP</i>	Leptin	ND		ND		1.55	NS	1.55	0.028
<i>NAMPT (Visfatin)</i>	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	1.28	NS	2.91	<0.001	0.75	NS	1.04	NS
<i>PRL</i>	Prolactin	1.83	NS	3.33	0.038	1.15	NS	1.03	NS
<i>PRLR</i>	Prolactin receptor	1.30	NS	0.76	NS	1.21	NS	1.02	NS
<i>RETN</i>	Resistin	0.96	NS	2.40	<0.001	0.98	NS	1.76	NS

ND, not detectable; NS, nonsignificant. Mean value of the relative gene expression of control group was taken as 1.

TABLE 4. Cytokines and other inflammation-related factors and corresponding receptors: mRNA expression changes in peripheral monocytes and subcutaneous adipose tissue of obese nondiabetic and T2DM patients relative to control group

Gene symbol	Gene name	Peripheral monocytes				Subcutaneous adipose tissue			
		Obese nondiabetic		T2DM before VLCD		Obese nondiabetic		T2DM before VLCD	
		Fold change	P value	Fold change	P value	Fold change	P value	Fold change	P value
<i>TNFα</i>	Tumor necrosis factor α	1.25	NS	2.63	0.014	1.47	NS	1.37	NS
<i>IL-6</i>	Interleukin 6	ND		ND		1.01	NS	1.87	NS
<i>IL-8</i>	Interleukin 8	2.26	0.043	1.80	NS	1.31	NS	1.52	NS
<i>IL-18</i>	Interleukin 18	1.06	NS	1.17	NS	2.36	0.010	2.46	0.016
<i>MIF</i>	Macrophage migration inhibitory factor	1.15	NS	1.51	<0.001	1.26	NS	1.37	0.034
<i>TNFRSF 1A</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	1.91	0.004	2.06	0.001	1.09	NS	1.06	NS
<i>TNFRSF 1B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	1.87	NS	1.43	0.043	1.02	NS	0.94	NS
<i>TLR2</i>	Toll-like receptor 2	1.59	NS	1.71	0.034	1.03	NS	1.47	0.049
<i>TLR4</i>	Toll-like receptor 4	1.50	0.005	1.53	0.004	1.04	NS	0.93	NS
<i>IL-1R1</i>	Interleukin-1 receptor. Type I	1.18	NS	0.95	NS	1.34	NS	1.03	NS
<i>IL-6R</i>	Interleukin 6 receptor	1.52	NS	1.75	0.008	1.12	NS	0.88	NS
<i>PPARα</i>	Peroxisome proliferator activated receptor α	1.88	NS	1.32	NS	1.28	NS	3.67	<0.001
<i>PPARβ/δ</i>	Peroxisome proliferator activated receptor β/δ	1.48	0.043	1.82	0.006	0.82	NS	0.74	NS
<i>ICAM-1</i>	Intercellular adhesion molecule 1	1.12	NS	1.30	0.047	1.19	NS	0.92	NS
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	0.88	NS	0.92	NS	0.59	NS	0.40	0.001

ND, not detectable; NS, nonsignificant. Mean value of the relative gene expression of control group was taken as 1.0.

gether with elevated expression of leptin, IL-18, macrophage migration inhibitory factor and toll-like receptor 2 (TLR-2). Increased expression of chemokines CCL-3, CCL-7, CCL-17, and CCL-22 was found in SCAT of OB patients compared with control group (Table 2). Except for IL-18, no other assessed cytokines or their receptors were increased in adipose tissue of OB patients (Tables 3 and 4).

In PM of T2DM patients mRNA expression of most chemokine and cytokine receptors including chemokine (C-C motif) receptor (CCR)-1, CCR-2, CCR-5, IL-6 receptor, adipokine receptor 1, TLR-2 and -4, and TNF receptor superfamily members 1A and 1B (TNFRSF 1A and 1B) was increased. In OB group, the expression of CCR-1, CCR-2, and CCR-3 was increased along with TLR-2 and TNFRSF 1A. TNF α , macrophage migration inhibitory factor, prolactin, visfatin, resistin, peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ), and intracellular adhesion molecule I mRNA was increased in PM of T2DM group, while only IL-8 and PPAR β/δ mRNA expression was increased in OB group (Tables 3 and 4).

When comparing directly T2DM and OB group, in SCAT of T2DM subjects we found significantly decreased mRNA expression of adiponectin (0.49, $P < 0.001$) adiponectin receptor 1 (0.74, $P = 0.007$), and intracellular adhesion molecule I (0.77, $P = 0.031$) and increased expression of resistin (1.79, $P = 0.044$). In PM only expression of resistin (2.49, $P < 0.001$) and visfatin (2.27, $P = 0.042$) was increased compared with OB subjects.

The influence of VLCD on mRNA expression profile in T2DM subjects

As depicted in Fig. 1, VLCD decreased mRNA expression of leptin ($P = 0.025$), chemokines CCL-8 ($P = 0.029$), and chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL-10) ($P = 0.026$), PPAR α ($P = 0.031$), and vascular endothelial growth factor A (VEGFA; $P = 0.04$) in sc fat. On the contrary, VLCD induced a 7-fold increase in mRNA expression of chemokine CCL-17 ($P = 0.01$) and 1.4-fold increase in mRNA expression of CCR-5 ($P < 0.001$). In PM of T2DM patients, VLCD decreased expression of most of chemokine receptors [CCR-1 ($P = 0.019$), CCR-2 ($P = 0.031$), CCR-5 ($P = 0.03$)] and other receptors

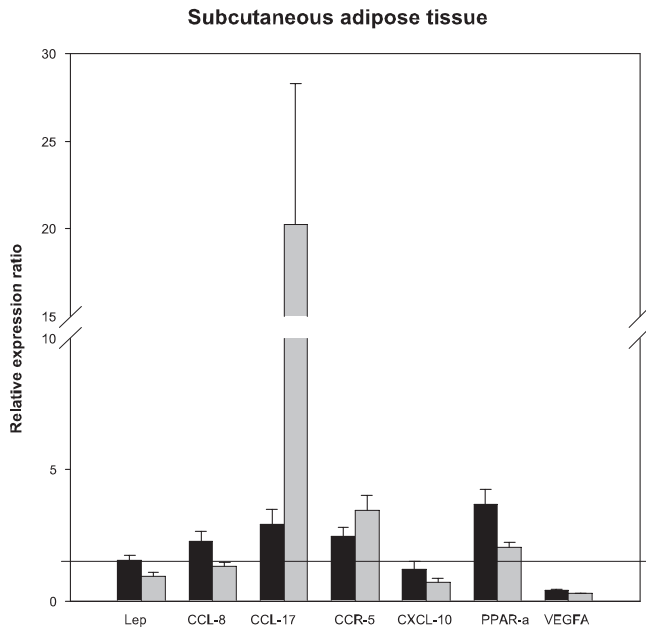


FIG. 1. mRNA expression changes in SCAT of T2DM after VLCD (gray bars) vs. baseline (black bars). Mean value of the relative gene expression of control group was taken as 1.0. Only genes with significant change ($P < 0.05$) after VLCD are depicted. Lep, leptin; CXCL-10, chemokine (C-X-C motif) ligand 10; VEGFA, vascular endothelial growth factor A.

[TLR-2 ($P = 0.016$) and -4 ($P = 0.036$), TNFRSF 1A ($P = 0.021$) and IL-6 receptor ($P = 0.015$), and macrophage marker CD68 ($P = 0.036$)] (Fig. 2).

Discussion

Chronic low-grade inflammation is a central component in the pathogenesis of obesity-related metabolic and cardiovascular disorders (2). We hypothesized that this process is

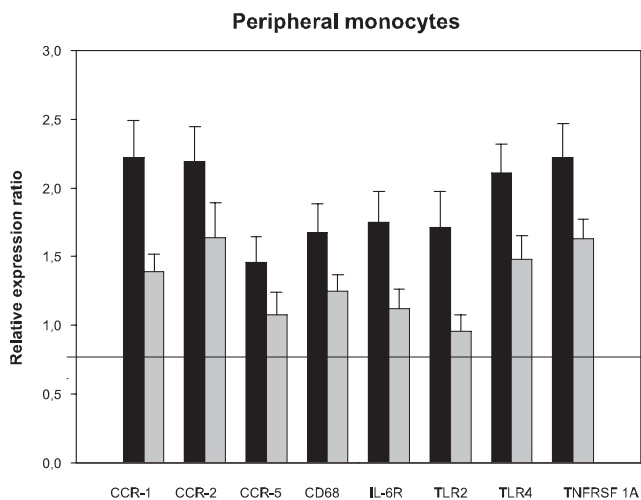


FIG. 2. mRNA expression changes in PM of T2DM after VLCD (gray bars) vs. baseline (black bars). Mean value of the relative gene expression of control group was taken as 1.0. Only genes with significant change ($P < 0.05$) after VLCD are depicted.

driven by adipose tissue production of factors associated with the recruitment of PM into adipose tissue, namely chemokines and CCRs. To this end, we evaluated the expression of selected cytokines, chemokines, CCRs, and other inflammation-related factors in SCAT and PM of patients with obesity and T2DM and explored the influence of short-term VLCD on these parameters.

Previous studies have shown that most of the macrophages in adipose tissue come from sources outside of fat (11, 16). Crucial players in their recruitment from circulation to adipose tissue are chemokines and their corresponding receptors (17, 18). Increased gene expression of numerous CC-family chemokines (CCLs) including CCL-2, CCL-3, CCL-5, CCL-7, CCL-8, and CCL-11 in adipose tissue of obese patients have been reported previously (19–22). Increased mRNA expression of these chemokines correlated with ATM infiltration in most of the studies, suggesting their important role in mononuclear cell recruitment into adipose tissue (17, 23). Here we demonstrate for the first time increased expression of CCL-17 and CCL-22, two chemokines involved in chemotaxis of predominantly type 2 T helper lymphocytes (T_H2) lymphocytes (18) in obese subjects both with and without T2DM. Subcutaneous fat of OB patients showed increased expression of four of the investigated chemokines (CCL-3, CCL-7, CCL-17, and CCL-22) relative to lean control group, suggesting that obesity itself without disturbances in glucose homeostasis substantially increased chemoattracting potential of sc fat. In T2DM subjects, the enhanced chemokine expression profile was further underlined by elevated expression of two other potent chemokines (CCL-2 and CCL-8) accompanied by more pronounced increase in expression in three of the four chemokines elevated in OB subjects. In addition to differences in chemokine expression, obese T2DM patients had significantly lower fat mRNA expression of antiinflammatory and insulin-sensitizing adiponectin and adiponectin receptor 1 and increased mRNA expression of proinflammatory factor resistin. Taken together, our study indicates a strong proinflammatory and chemoattractant state of sc fat for macrophages, T lymphocytes, and other immunocompetent cells in obese patients both with and without T2DM. This profile was more pronounced in obese patients with T2DM.

Chemokines exert their effects via chemokine receptors (CCRs for CC chemokines) (18). Increased mRNA expression of several CCRs, including CCR-1, CCR-2, CCR-3, and CCR-5, has been demonstrated in sc and visceral adipose tissue of obese humans (22). In SCAT of our obese T2DM patients we only found up-regulated mRNA expression of CCR-1 and CCR-5, while no such change was detected in OB subjects without T2DM. Intriguingly, the expression of three of the four investigated CCRs (CCR-1, CCR-2, and CCR-5 for T2DM and CCR-1, CCR-2, and CCR-3 for OB) was

significantly elevated in PM of both obese groups, complementing the increased chemokine production from SCAT. These findings support the idea of an intensive hormonal and cytokine interplay between sc fat and PM as an important part of low-grade systemic inflammatory process in obesity.

In addition to CCRs, other receptors for inflammatory factors involved in the regulation of chemokine and cytokine production (24–26) were increasingly expressed in PM of obese T2DM patients including TLR-2 and -4, IL-6 receptor, and TNFRSF 1A and 1B. Increased mRNA expression of these inflammation-promoting receptors in PM of T2DM patients in our study was accompanied by up-regulated expression of proinflammatory cytokines including TNF α , resistin, and prolactin, further contributing to their proinflammatory phenotype. PM of OB subjects without T2DM showed relatively lower expression profile of inflammation-related cytokines and receptors compared with obese T2DM group with the up-regulation of TLR-4, TNFRSF 1A, and IL-8 only. Overall, these findings identify PM as important players in the progression of metabolic disturbances from simple obesity and insulin resistance to overt disturbances of glucose metabolism.

In previous studies, even modest reduction of body weight (5–10% of original body weight) was associated with decreased insulin resistance and improved glucose control in obese T2DM patients, resulting in decreased morbidity and mortality and improved prognosis (27). In the second part of our study we therefore evaluated the influence of a short-term VLCD on the expression profile of inflammation-related genes in both sc fat and PM in obese T2DM group. Two weeks of VLCD significantly decreased body weight, improved metabolic parameters, and reduced low-grade inflammation in our T2DM patients. Circulating cyto- and adipokines responded to the dietary challenge rather inconsistently, with an expected decrease of leptin and IL-6 levels and a rather unexpected increase of TNF α levels.

The most intriguing observation of our study was that even a short period of weight reduction was sufficient to induce a significant and consistent decrease in mRNA expression of almost all up-regulated chemokine and cytokine receptors in PM (Fig. 2). Although the expression of proinflammatory cytokines in PM did not change significantly, lower levels of CCRs suggest its reduced response to chemotactic signals. This decrease could subsequently reduce monocyte recruitment into adipose tissue and partially explain positive metabolic effects of short-term VLCD.

On the contrary, almost no change in the expression profile of corresponding up-regulated chemokines in SCAT after VLCD was found in our study. The expected decrease in leptin mRNA expression was accompanied by down-regulation of only two chemokines—CCL-8 and CXCL-10. This finding suggests that PM are more affected by short-term

caloric restriction than sc fat and might be among primary mediators of favorable metabolic changes after VLCD. It also provides further support for the idea that the chemotactic potential of circulating monocytes plays an important and hitherto unrecognized role in the pathogenesis of T2DM.

Another important and novel finding of our study was a 7-fold increase in mRNA expression of the chemokine CCL-17 in the sc fat after VLCD. CCL-17 acts as a strong chemoattractant for T_H2 lymphocytes, mature dendritic cells, basophils, and macrophages (18). Recent studies have demonstrated that accumulation of T-lymphocytes precedes macrophage infiltration in adipose tissue, suggesting that T-lymphocytes infiltration might be the primary action triggering the recruitment of macrophages into adipose tissue (28, 29). Furthermore, the importance of the T_H1/T_H2 ratio in determining the outcome of inflammatory responses was shown (29). T_H1 cells are proinflammatory and promote the differentiation of classical inflammatory M1 macrophages. T_H2 cells, on the contrary, induce an antiinflammatory M2 macrophage phenotype. Diet-induced obesity was previously shown to shift ATMs from an M2-polarized state that is protective against inflammation to an M1 proinflammatory state (30). Interestingly, it was demonstrated that obesity-induced switch in ATM state is generated by localized recruitment of inflammatory ATM subtypes from circulation and not by converting the M2 macrophages *in situ* (31). Our results suggest that increased expression of T_H2-attracting CCL-17 in sc fat after VLCD (which might be considered a reverse process to diet-induced obesity) may lead to increased infiltration of fat by circulating T_H2 cells, which could further promote the favorable shift to M2 macrophage phenotype. As we evaluated the gene expression in the whole SCAT and did not assess the cellular content of the tissue, we do not have definitive proof for this hypothesis. It should also be mentioned that we only evaluated mRNA and not protein expression of the studied factors. However, the proposed mechanism as well as the eventual source of the increased CCL-17 in adipose tissue should become the subjects of further experiments.

In summary, we have demonstrated that both SCAT and PM of obese patients exert a strong chemoattracting profile with complementary orchestrated expression of chemotactic factors and their respective receptors. The presence of T2DM further strengthened this profile compared with obesity without disturbances in glucose metabolism. Two weeks of VLDC significantly improved metabolic profile and reduced low-grade inflammation of T2DM patients. These effects were mediated by improved expression profile of chemokine and cytokine receptors in PM and possibly by increased fat mRNA expression of CCL-17 that might be responsible for recruitment of antiinflammatory T_H2 lymphocytes into adipose tissue after VLCD.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. Martin Haluzik, M.D., D.Sc., U nemocnice 1, 128 08 Prague 2, Czech Republic. E-mail: mhalu@lf1.cuni.cz.

This work was supported by SVV-2010-260503 (Specific University Research Programme) and Internal Grant Agency of Ministry of Health of Czech Republic 10024-4.

Disclosure Summary: The authors have nothing to declare.

References

- Wellen KE, Hotamisligil GS 2003 Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1785–1788
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H 2003 Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821–1830
- Hotamisligil GS 2006 Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860–867
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A 2004 Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25:4–7
- Berg AH, Scherer PE 2005 Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96:939–949
- Dolezalova R, Lacinova Z, Dolinkova M, Kleiblova P, Haluzikova D, Housa D, Papezova H, Haluzik M 2007 Changes of endocrine function of adipose tissue in anorexia nervosa: comparison of circulating levels versus subcutaneous mRNA expression. *Clin Endocrinol* 67:674–678
- Zeyda M, Stulnig TM 2009 Obesity, inflammation, and insulin resistance—a mini-review. *Gerontology* 55:379–386
- Dolinkova M, Dostalova I, Lacinova Z, Michalsky D, Haluzikova D, Mraz M, Kasalicky M, Haluzik M 2008 The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol Cell Endocrinol* 291:63–70
- Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clement K 2005 Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54:2277–2286
- Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B 2005 Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2282–2289
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–1808
- Anderson EK, Gutierrez DA, Hasty AH 2005 Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr Opin Lipidol* 21:172–177
- Suganami T, Nishida J, Ogawa Y 2005 A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2062–2068
- Bourlier V, Bouloumie A 2009 Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* 35:251–260
- Benjamini Y, Hochberg Y 1995 Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Royal Stat Soc Ser B (Methodological)* 57:289–300
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A 2004 From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53:1285–1292
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M 2006 MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116:1494–1505
- Charo IF, Ransohoff RM 2006 The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610–621
- Vasudevan AR, Wu H, Xydakis AM, Jones PH, Smith EO, Sweeney JF, Corry DB, Ballantyne CM 2006 Eotaxin and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 91:256–261
- Dahlman I, Kaaman M, Olsson T, Tan GD, Bickerton AS, Wahlen K, Andersson J, Nordstrom EA, Blomqvist L, Sjogren A, Forsgren M, Attersand A, Arner P 2005 A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5834–5840
- Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM 2007 T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 115:1029–1038
- Huber J, Kiefer FW, Zeyda M, Ludvik B, Silberhumer GR, Prager G, Zlabinger GJ, Stulnig TM 2008 CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3215–3221
- Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T 2006 Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281:26602–26614
- Kaisho T, Akira S 2006 Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117:979–987; quiz 988
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Zmami I, Yin H, Flier JS 2006 TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015–3025
- Yeop Han C, Kargi AY, Omer M, Chan CK, Wabitsch M, O'Brien KD, Wight TN, Chait A 2006 Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation. *Diabetes* 59:386–396
- Anderson JW, Konz EC 2001 Obesity and disease management: effects of weight loss on comorbid conditions. *Obesity Res* 9(Suppl 4):326S–334S
- Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N 2008 T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1304–1310
- Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielinski J, Mastrorandi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM 2009 Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15:921–929
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR 2007 Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175–184
- Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR 2008 Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 57:3239–3246

Serum concentrations of fibroblast growth factor 19 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of acute hyperinsulinemia, very-low calorie diet and PPAR- α agonist treatment

M. Mraz¹, Z. Lacinova¹, P. Kavalkova¹, D. Haluzikova^{1,2}, P. Trachta¹, J. Drapalova¹, V. Hanusova¹,
M. Haluzik¹

¹3rd Department of Medicine, ²Department of Sports Medicine, General University Hospital and 1st Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic

Corresponding author:

Prof. Martin Haluzík, M.D., D.S.c.

U nemocnice 1

128 08 Prague 2

Czech Republic

e-mail: mhalu@lf1.cuni.cz

Tel.: +420 224 96 29 08

Short title: FGF-19 in obesity and T2DM: influence of diet and fibrates

Summary

The aim of our study was to measure serum concentrations of fibroblast growth factor 19 (FGF-19) in patients with obesity (OB), obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) and healthy subjects (C) at baseline and after selected interventions. We measured serum FGF-19 levels and other biochemical and hormonal parameters in 29 OB and 19 T2DM females and 30 sex- and age-matched control subjects. The interventions were acute hyperinsulinemia during isoglycemic-hyperinsulinemic clamp (n=11 for T2DM and 10 for C), very low calorie diet (VLCD, n=12 for OB) and 3 months treatment with PPAR- α agonist fenofibrate (n=11 for T2DM). Baseline serum FGF-19 levels were significantly lower in OB relative to C group (132.1 ± 12.7 vs. 202.2 ± 16.7 pg/ml, $p<0.05$), while no significant difference was observed between T2DM and OB or control group. Acute hyperinsulinemia tended to decrease FGF-19 levels in both healthy and T2DM subjects. Three weeks of VLCD in OB group had no significant effect on FGF-19, whereas three months of fenofibrate treatment markedly reduced FGF-19 levels in T2DM patients (194.58 ± 26.2 vs. 107.47 ± 25.0 pg/ml, $p<0.05$). We conclude that FGF-19 levels in our study were at least partially dependent upon nutritional status, but were not related to parameters of glucose metabolism or insulin sensitivity.

Key words: FGF-19, obesity, type 2 diabetes mellitus, very low calorie diet, fenofibrate

Introduction

Fibroblast growth factor 19 (FGF-19) is a recently identified endocrine regulator with multiple effects on metabolic processes and energy homeostasis (Itoh and Ornitz 2004; Nishimura *et al.* 1999; Xie *et al.* 1999). Produced predominantly in enterocytes of terminal ileum under the regulation of Farnesoid X receptor (FXR), a bile acid nuclear receptor, and acting mainly in liver through fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4), FGF-19 has been demonstrated to play a central role in the negative feedback loop of bile acid synthesis and gallbladder refilling (Holt *et al.* 2003; Choi *et*

al. 2006; Inagaki *et al.* 2005; Yu *et al.* 2005; Yu *et al.* 2000). Animal studies have also shown antiadipogenic, anti-diabetic and hypolipidemic effects of either exogenous administration or endogenous overexpression of FGF-19 with altered expression of a number of genes involved especially in lipid metabolism (Fu *et al.* 2004; Tomlinson *et al.* 2002).

In contrast to animals, only limited data on FGF-19 concentrations, regulation and function are available in humans. In the first study conducted in healthy human volunteers, serum FGF-19 levels exerted a pronounced diurnal rhythm following the rise in serum bile acids, which was abolished upon fasting. Treatment with bile acid sequestrants decreased FGF-19 concentrations, while administration of chenodeoxycholic acid had opposite effect (Lundasen *et al.* 2006). In two other studies circulating FGF-19 was found to be increased in patients with end-stage renal disease and extrahepatic cholestasis caused by tumorous obstruction of biliary ducts (Reiche *et al.*; Schaap *et al.* 2009). Chronically malnourished patients with anorexia nervosa did not show any changes in systemic FGF-19 compared to normal-weight subjects (Dostalova *et al.* 2008b). The only two trials exploring in part the relation of FGF-19 to glucose metabolism disorders could not find significant difference in its circulating levels between patients with type 2 diabetes mellitus or insulin resistance relative to healthy controls (Brufau *et al.* 2010; Schreuder *et al.* 2010).

To our best knowledge, no targeted information about the influence of obesity on circulating FGF-19 levels is available, nor are any data about the dynamic changes in FGF-19 concentrations after dietary intervention or acute hyperinsulinemia. The main regulator of FGF-19 production FXR is an important link between bile acid and triglyceride metabolism, interacting with a variety of genes and receptors, among others PPAR- α (Smelt 2010). The exact role of FGF-19 in these interactions and the influence of lipid-lowering PPAR- α agonists on FGF-19 levels are largely unknown as well. In the present study we therefore addressed the question whether circulating FGF-19 levels are influenced by increased body weight and the presence of T2DM and whether any changes in its concentrations could contribute to positive metabolic effects of very-low calorie diet in patients with

obesity or lipid-lowering therapy with PPAR- α agonists in subjects with obesity and type 2 diabetes. To this end we measured serum FGF-19 concentrations in patients with obesity and T2DM and studied its changes after above mentioned interventions.

Methods

Study subjects and interventions

Overall, 29 women with obesity (defined as BMI \geq 30) without type 2 diabetes mellitus, 19 women with obesity and type 2 diabetes mellitus and 30 age-matched healthy control women were included into the study. The body weight of all study participants remained stable for at least 3 months before the beginning of the study.

Very low calorie diet sub-study

12 out of 29 obese subjects without type 2 diabetes mellitus underwent a 3-week very low calorie diet (VLCD) program. They were hospitalized in the 3rd Department of Medicine, General University Hospital, Prague and were given a very low calorie diet with energy content of 2500 kJ/day.

Fenofibrate treatment sub-study

11 obese females with type 2 diabetes mellitus and 10 non-obese women were included into fenofibrate intervention study, which was described in detail elsewhere (Haluzik *et al.* 2009). T2DM patients were treated with diet, metformin alone or combination of metformin and glimepiride before the beginning of the study. Diabetic medication remained unchanged from three months before the start throughout the entire study. Diabetic subjects were treated with PPAR- α agonist fenofibrate (Lipanthyl M 267) for three months. Their insulin sensitivity before and after 3 months of fenofibrate

treatment was examined by isoglycemic-hyperinsulinemic clamp as described previously (Anderlova *et al.* 2007). Ten lean healthy non-diabetic subjects, who were free of any medication, underwent a single isoglycemic-hyperinsulinemic clamp and served as a control group in fenofibrate intervention study.

Written informed consent was signed by all participants before being enrolled into the study. The study was approved by the Human Ethical Review Committee, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic and was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki as revised in 2000.

Anthropometric examination, blood and tissue sampling

All subjects were measured and weighted and their body mass index (BMI) was calculated. Blood samples were withdrawn between 07:00 h and 08:00 h after overnight fasting. Blood samples were separated by centrifugation for 10 minutes at 1000x g within 30 minutes from blood collection. Serum was subsequently stored in aliquots at -70 °C until further analysis.

Clinical and hormonal parameters in obese patients on VLCD were measured one day before the beginning of the diet and at the end of the third week of VLCD. Clinical and hormonal parameters in type 2 diabetes patients in the fenofibrate substudy were measured at baseline and after 3 months of treatment with PPAR- α agonist fenofibrate (200mg, Lipanthyl 267M).

Hormonal and biochemical assays

Serum FGF-19 levels were measured by a sandwich enzyme immunoassay (BioVendor, Brno, Czech Republic), following the manufacturer's instructions. Serum samples for FGF-19 measurement were diluted 1:1 with a dilution buffer prior to the assay. The standard curve range for the assay was 15.0 - 960.0 ng/ml. Sensitivity was 4.8 pg/ml and the intra- and interassay variability was 3-8 % and 10-13

%, respectively. Serum insulin concentrations were measured by commercial RIA kit (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette Cedex, France). Sensitivity was 2.0 μ IU/ml. Serum adiponectin levels were measured by commercial ELISA kit (Linco Research, St. Charles, Missouri, USA). Sensitivity was 0.78 ng/ml. Serum leptin concentrations were measured by commercial ELISA kit (Biovendor, Brno, Czech Republic). Sensitivity was 0.17 ng/ml. The intra- and interassay variability of all kits was less than 5.0 % and 9.0 % respectively.

Biochemical parameters were measured in the Department of Biochemistry of General University Hospital, Prague by standard laboratory methods. Homeostasis model assessment (HOMA-R) index was calculated as previously described (Matthews *et al.* 1985) using the following formula:

fasting serum insulin (mIU/l) \times fasting serum glucose (mmol/l)/22.5.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, IL). The results are expressed as means \pm standard error means (SEM). Changes in FGF-19 and hormonal parameters between studied groups were evaluated by One-way ANOVA followed by Holm-Sidak method or ANOVA on Ranks followed by Dunn's test and Paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test as appropriate. Changes of FGF-19 during the clamp were analyzed by One-way RM ANOVA on Ranks followed by Dunn's method. Spearman or Pearson correlation test and multiple regression analysis were used to calculate the relationships between FGF-19 levels and other parameters. Statistical significance was assigned to $p < 0.05$.

Results

Baseline characteristics of patients with obesity, patients with type 2 diabetes mellitus and control group

Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of obese, T2DM, and control group are shown in *Table 1*. As expected, BMI, blood glucose levels, HOMA index, serum triglyceride, leptin and insulin concentrations were significantly higher in both obese and T2DM group relative to control subjects. On the contrary, adiponectin levels were significantly lower in both of these groups. No difference in serum cholesterol was found between the groups. When comparing T2DM with obese group, diabetic patients had significantly lower BMI and leptin levels, while blood glucose, triglycerides, insulin and HOMA index were significantly higher in T2DM group relative to obese subjects.

Anthropometric and clinical characteristics of patients included into VLCD study

The influence of VLCD on anthropometric, biochemical and hormonal parameters is summarized in *Table 2*. At baseline, patients with obesity had significantly higher BMI, blood glucose, serum insulin, HOMA index and leptin and lower serum adiponectin relative to control subjects. The groups did not significantly differ in serum triglyceride and cholesterol levels. VLCD induced a significant decrease in BMI and HOMA index. Insulin, glucose and leptin concentrations tended to decrease after VLCD, but the difference did not reach the statistical significance. No significant influence of VLCD on serum cholesterol, triglyceride and adiponectin levels was found.

Anthropometric and clinical characteristics of patients included into fenofibrate treatment study

Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of the study sub-group have been described in detail elsewhere (Haluzik *et al.* 2009) and are briefly shown in *Table 3*. At baseline, BMI, blood glucose, serum triglyceride, insulin, glycated hemoglobin and atherogenic index were

significantly higher, while serum HDL cholesterol was significantly lower in T2DM group relative to control subjects. Three months of treatment with fenofibrate led to a significant decrease of serum triglyceride concentrations, while blood glucose, HOMA index and glycated hemoglobin slightly but significantly increased. Other parameters including BMI were not affected by fenofibrate treatment. Insulin sensitivity of T2DM group was significantly lower relative to control group and was not affected by fenofibrate treatment (data not shown here, previously described in (Haluzik *et al.* 2009).

The influence of obesity and obesity/type 2 diabetes mellitus on FGF-19 levels and the relationship of FGF-19 levels with anthropometric and metabolic parameters

Circulating concentrations of FGF-19 reached the highest levels in lean control subjects (202.2 ± 16.7 pg/ml), with a non-significant tendency towards lower levels in T2DM group (146.4 ± 15.9 pg/ml) and a further, statistically significant, decrease in the obese non-diabetic group (132.1 ± 12.7 pg/ml, $p < 0.05$). No significant difference in FGF-19 levels was observed between T2DM and obese group (*Figure 1*).

In a combined population of all three groups as well as in the subpopulation of control subjects combined with obese non-diabetic patients FGF-19 concentrations significantly negatively correlated with BMI ($r = -0.309$, $p < 0.05$ for the whole population and $r = -0.343$, $p < 0.05$ for Control + Obese subgroup) and leptin ($r = -0.282$, $p < 0.05$ for the whole population and $r = -0.365$, $p = 0.005$ for Control + Obese subgroup) and significantly positively with adiponectin ($r = 0.289$, $p < 0.05$ for the whole population and $r = 0.289$, $p < 0.05$ for Control + Obese subgroup). In contrast, no such relationship could be seen in the T2DM subgroup. FGF-19 levels were not significantly related to age, serum blood glucose, triglycerides, insulin and cholesterol or HOMA index in any of the studied groups.

The influence of VLCD, fenofibrate treatment and hyperinsulinemia during the clamp on serum FGF-19 levels

Three weeks of VLCD did not significantly influence serum FGF-19 levels in obese group (140.2 ± 19.7 vs. 176.1 ± 27.1 pg/ml, $p=0.369$) (*Figure 2*), while 3 months of treatment with fenofibrate significantly decreased FGF-19 concentrations in T2DM patients (194.6 ± 26.2 vs. 107.5 ± 25.0 pg/ml, $p=0.007$) (*Figure 3*). Three hours of acute hyperinsulinemia during isoglycemic-hyperinsulinemic clamp tended to decrease FGF-19 levels in both healthy and T2DM subjects, but the difference did not reach statistical significance (214.4 ± 15.0 vs. 145.7 ± 19.9 pg/ml, $p=0.130$ for control and 198.6 ± 18.0 vs. 147.2 ± 24.8 pg/ml, $p=0.519$ for diabetic group). Nevertheless, there was a significant drop in FGF-19 concentrations in T2DM group after 90 minutes of the clamp (198.6 ± 18.0 vs. 121.1 ± 21.0 pg/ml, $p<0.001$), while no such change could be seen in the control group (214.4 ± 15.0 vs. 188.0 ± 41.1 pg/ml, $p=0.483$) (*Figure 4*). In T2DM group three months of fenofibrate treatment resulted in markedly decreased initial FGF-19 concentrations with no further change in its levels in the course of the isoglycemic-hyperinsulinemic clamp (95.7 ± 16.5 vs. 114.1 ± 18.0 vs. 112.5 ± 25.8 pg/ml, $p=0.264$) (*Figure 4*).

Discussion

FGF-19 is a novel endocrine and paracrine regulator which plays central role in the suppression of bile acid synthesis and secretion. As bile acid metabolism is tightly connected to other metabolic pathways, especially those of lipids (Insull 2006; Lefebvre *et al.* 2009), FGF-19 was suggested to participate also in the regulation of other processes, including cholesterol, lipoprotein, triglyceride and glucose metabolism (Fu *et al.* 2004; Tomlinson *et al.* 2002). Rodents with FGF-19 overexpression have decreased body weight and improved glucose tolerance and insulin sensitivity compared to their wild-type littermates. FGF-19 over-expressing mice are also protected from high

fat diet-induced weight gain (Tomlinson *et al.* 2002). Similar results were seen in mice treated with exogenous recombinant FGF-19, which display reduced body weight and decreased serum glucose, insulin, cholesterol and triglyceride levels (Fu *et al.* 2004).

In humans, data concerning the relation of FGF-19 to metabolic parameters are less concise. In our previous study, we have demonstrated that FGF-19 levels were not affected by nutritional status in severely underweight patients with anorexia nervosa, nor were they related to any of the investigated metabolic parameters (Dostalova *et al.* 2008a). Schreuder *et al.* did not find any influence of insulin resistance (IR) as assessed by HOMA index on intestinal FGF-19 production in patients with non-alcohol fatty liver disease (NAFLD), though the suppressing effect of FGF-19 on bile acid synthesis was impaired in IR patients (Schreuder *et al.* 2010). In a recently conducted study by Brufau *et al.* FGF-19 levels did not differ between type 2 diabetic patients and control subjects (Brufau *et al.* 2010). In contrast, Reiche *et al.* reported a negative correlation between FGF-19 and fasting glucose in healthy subjects (Reiche *et al.* 2010). Here we show that in our patients FGF-19 levels correlated inversely with body mass index, with the most pronounced differences in serum FGF-19 concentrations being in the most obese patients with BMI over 40. T2DM group with a mean BMI of 36 kg/m² tended to have rather slightly decreased levels of FGF-19. A positive correlation between FGF-19 and adiponectin observed throughout the study population extends similar findings reported previously in chronically hemodialysed patients (Reiche *et al.* 2010). These findings may suggest a possible relationship between FGF-19 and the regulation of endocrine function of adipose tissue that has been in previous studies linked to the regulation of glucose metabolism and insulin sensitivity (Anderlova *et al.* 2006; Ronti *et al.* 2006).

Three weeks of very-low calorie diet in our study significantly reduced body weight along with the decrease in blood glucose, insulin and HOMA index and a tendency to improved lipid profile (*Table 2*). FGF-19 levels tended to increase but the difference did not reach statistical significance. In experimental studies fasting was associated with increased production of FGF-15 (the mouse

orthologue of FGF-19) and decreased liver expression of FGF receptor 4 (FGFR4) in rodents. At the same time fasting increased the expression of CYP7A1, a key regulator enzyme in bile acid synthesis, via pathways independent of FGF-15 – FGFR4 axis (mainly through the decreased insulin-mediated suppression of CYP7A1) (Shin and Osborne 2009). Whether a similar mechanism could be applied to humans and whether FGF-19 could play a role in some adaptive responses to fasting and/or caloric restriction remains to be further determined. Collectively, these findings suggest, that serum FGF-19 is at least partially influenced by nutritional status and body weight, especially in the higher BMI ranges. In contrast, the absence of a clear association of circulating FGF-19 to parameters of glucose metabolism is in line with previous reports in humans, which so far failed to demonstrate an explicit and causal relation between FGF-19 and glucose metabolism disorders (Brufau *et al.* 2010; Schreuder *et al.* 2010).

The metabolism of bile acids on one hand and cholesterol and triglycerides on the other hand is tightly coupled. Bile acids represent the primary pathway for cholesterol catabolism and bile acid sequestration with resins is connected with decreased total and LDL cholesterol, while increasing HDL cholesterol and triglycerides (Beil *et al.* 1982; Insull 2006; Shepherd *et al.* 1980). The most important link between bile acid and lipid metabolism is thought to be Farnesoid X receptor, the activator of FGF-19 synthesis. FXR inhibits the expression of several lipogenic genes, while promoting the activity of lipoprotein lipase and stimulating VLDL receptors (reviewed in (Lefebvre *et al.* 2009; Smelt 2010). FXR also activates PPAR- α receptors promoting thus the catabolism of free fatty acids (Pineda Torra *et al.* 2003). The exact role of FGF-19 in these interplays is currently unknown. In animals, FGF-19 has been shown to inhibit the expression of several rate-limiting enzymes involved in fatty acid synthesis (Fu *et al.* 2004; Tomlinson *et al.* 2002). In humans, Brufau *et al.* have demonstrated that treatment with bile acid sequestrant colesevelam improved diabetic control and decreased basal and postprandial FGF-19 concentrations in both T2DM and healthy subjects. However, no relationships between parameters of glucose metabolism and changes in FGF-

19 levels or bile acid metabolism were found (Brufau *et al.* 2010). In the present study no correlation between FGF-19 levels and the parameters of lipid metabolism could be observed.

As fibrates as triglyceride lowering agents act, similarly to FXR, via activation of PPAR- α , in the third part of our study we examined the influence of three months of fenofibrate administration on serum levels of FGF-19 to test the hypothesis that changes in FGF-19 may contribute to positive effects of fibrate treatment. Fenofibrate administration in hypertriglyceridemic T2DM patients decreased triglyceride levels while body weight, total and HDL cholesterol remained unchanged. FGF-19 levels after fenofibrate treatment markedly decreased. These findings argue against the hypothesis, that fibrate-induced activation of PPAR α might involve also the induction of FGF-19.

A rapidly growing body of evidence is supporting the importance of bile acids and bile acid receptors in the regulation of insulin action (reviewed in (Lefebvre *et al.* 2009)). *In vitro* and animal studies suggest that FXR activation improves insulin sensitivity and insulin-stimulated glucose uptake (Cariou *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006). Stimulation of hepatic FXR resulted in decreased hepatic gluconeogenesis, increased glycogen synthesis and decreased plasma glucose levels (Ma *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006). In mice, insulin was shown to up-regulate hepatic FGF receptor 4 (FGFR4), the major hepatic FGFR isoform (Shin and Osborne 2009). Similarly to FGF-19, insulin also decreases bile acid synthesis by suppressing the expression of its rate-limiting CYP7A1 enzyme. It was demonstrated that the mouse FGF-orthologue, FGF-15, and insulin act in liver partially via the same pathways, with forkhead transcriptional factor 1 (FoxO1), a factor controlling the expression of CYP7A1 as well as several gluconeogenetic genes, being the key converging node (Shin and Osborne 2009). To examine the influence of short-term hyperinsulinemia on circulating FGF-19 levels we performed hyperinsulinemic-isoglycemic clamp in the subgroup of diabetic patients undergoing treatment with fenofibrate and in an age- and sex-matched control group. Starting at comparable levels, in T2DM group FGF-19 showed a steep dropdown at 90 minutes followed by a slow rise towards the end of the procedure. In healthy lean controls FGF-19 slowly

decreased throughout the clamp terminating at almost the exact levels as in T2DM group. Interestingly, with basal levels of FGF-19 almost halved after 3 months of fenofibrate treatment, no significant effect of acute hyperinsulinemia on serum FGF-19 during the clamp was observed. Our current data do not allow us to unravel the exact mechanisms of insulin-mediated FGF-19 regulation and its modulation by fibrate therapy, but these findings suggest the existence of other regulatory pathways, independent of intestinal bile acid actions. A direct effect of insulin on FGF-19 production might be one of the options. However, other factors affected by both procedures (clamp and fenofibrate treatment) could constitute further links between insulin and FGF-19 production. One of the candidates might be free fatty acids (FFA), as they are almost completely inhibited during hyperinsulinemic-isoglycemic clamp (Stumvoll *et al.* 2000) and they are also reduced by fibrate-mediated PPAR α activation. As we did not assess FFA levels during the clamp substudy, this and other possible mechanisms remain subject of further investigations.

Taken together, our study demonstrated that FGF-19 levels correlated inversely with BMI and were significantly increased in severely obese patients compared to lean healthy controls. Very low calorie diet showed no significant effect on FGF-19 levels, while PPAR α agonist treatment decreased them significantly. Acute hyperinsulinemia tended to reduce FGF-19 suggesting the existence of other regulatory pathways besides the well-established intestinal bile acid regulation. Though no significant relationship of FGF-19 to the presence of T2DM or various measures of glucose metabolism and insulin sensitivity could be established, the role of FGF-19 in the complex net of reactions integrating bile acid, lipid and glucose metabolism remains an appealing challenge for further investigations.

Acknowledgements: Supported by MZOVFN2005 and IGA10024-4.

References

- ANDERLOVA K, DOLEZALOVA R, HOUSOVA J, BOSANSKA L, HALUZIKOVA D, KREMEN J, SKRHA J, HALUZIK M: Influence of PPAR-alpha agonist fenofibrate on insulin sensitivity and selected adipose tissue-derived hormones in obese women with type 2 diabetes. *Physiol Res* **56**:579-86, 2007.
- ANDERLOVA K, KREMEN J, DOLEZALOVA R, HOUSOVA J, HALUZIKOVA D, KUNESOVA M, HALUZIK M: The influence of very-low-calorie-diet on serum leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in obese women. *Physiol Res* **55**:277-83, 2006.
- BEIL U, CROUSE JR, EINARSSON K, GRUNDY SM: Effects of interruption of the enterohepatic circulation of bile acids on the transport of very low density-lipoprotein triglycerides. *Metabolism* **31**:438-444, 1982.
- BRUFAU G, STELLAARD F, PRADO K, BLOKS VW, JONKERS E, BOVERHOF R, KUIPERS F, MURPHY EJ: Improved glycemic control with colesevelam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly associated with changes in bile acid metabolism. *Hepatology* **52**:1455-64, 2010.
- CARIOU B, VAN HARMELEN K, DURAN-SANDOVAL D, VAN DIJK TH, GREFFHORST A, ABDELKARIM M, CARON S, TORPIER GR, FRUCHART J-C, GONZALEZ FJ, KUIPERS F, STAELS B: The Farnesoid X Receptor Modulates Adiposity and Peripheral Insulin Sensitivity in Mice. *J Biol Chem* **281**:11039-11049, 2006.
- DOSTALOVA I, KAVALKOVA P, HALUZIKOVA D, LACINOVA Z, MRAZ M, PAPEZOVA H, HALUZIK M: Plasma Concentrations of Fibroblast Growth Factors 19 and 21 in Patients with Anorexia Nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **93**:3627-3632, 2008a.
- FU L, JOHN LM, ADAMS SH, YU XX, TOMLINSON E, RENZ M, WILLIAMS PM, SORIANO R, CORPUZ R, MOFFAT B, VANDLEN R, SIMMONS L, FOSTER J, STEPHAN J-P, TSAI SP, STEWART TA: Fibroblast Growth Factor 19 Increases Metabolic Rate and Reverses Dietary and Leptin-Deficient Diabetes. *Endocrinology* **145**:2594-2603, 2004.
- HALUZIK MM, ANDERLOVA K, DOLEZALOVA R, ADAMIKOVA A, HALUZIKOVA D, HOUSOVA J, SVACINA S, HALUZIK M: Serum adipocyte fatty acid binding protein levels in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of fenofibrate treatment. *Physiol Res* **58**:93-9, 2009.
- HOLT JA, LUO G, BILLIN AN, BISI J, MCNEILL YY, KOZARSKY KF, DONAHEE M, WANG DY, MANSFIELD TA, KLIEWER SA, GOODWIN B, JONES SA: Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* **17**:1581-91, 2003.
- CHOI M, MOSCHETTA A, BOOKOUT AL, PENG L, UMETANI M, HOLMSTROM SR, SUINO-POWELL K, XU HE, RICHARDSON JA, GERARD RD, MANGELSDORF DJ, KLIEWER SA: Identification of a hormonal basis for gallbladder filling. *Nat Med* **12**:1253-5, 2006.
- INAGAKI T, CHOI M, MOSCHETTA A, PENG L, CUMMINS CL, MCDONALD JG, LUO G, JONES SA, GOODWIN B, RICHARDSON JA, GERARD RD, REPA JJ, MANGELSDORF DJ, KLIEWER SA: Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* **2**:217-25, 2005.
- INSULL W, JR.: Clinical Utility of Bile Acid Sequestrants in the Treatment of Dyslipidemia: A Scientific Review. *South Med J* **99**:257-273 10.1097/01.smj.0000208120.73327.db, 2006.
- ITOH N, ORNITZ DM: Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* **20**:563-9, 2004.
- LEFEBVRE P, CARIOU B, LIEN F, KUIPERS F, STAELS B: Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol Rev* **89**:147-191, 2009.

- LUNDASEN T, GALMAN C, ANGELIN B, RUDLING M: Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *J Intern Med* **260**:530-6, 2006.
- MA K, SAHA PK, CHAN L, MOORE DD: Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation* **116**:1102-1109, 2006.
- MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, TURNER RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**:412-9, 1985.
- NISHIMURA T, UTSUNOMIYA Y, HOSHIKAWA M, OHUCHI H, ITOH N: Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochim Biophys Acta* **1444**:148-51, 1999.
- PINEDA TORRA I, CLAUDEL T, DUVAL C, KOSYKH V, FRUCHART J-C, STAELS B: Bile Acids Induce the Expression of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {alpha} Gene via Activation of the Farnesoid X Receptor. *Mol Endocrinol* **17**:259-272, 2003.
- REICHE M, BACHMANN A, LÖSSNER U, BLÜHER M, STUMVOLL M, FASSHAUER M: Fibroblast Growth Factor 19 Serum Levels: Relation to Renal Function and Metabolic Parameters. *Horm Metab Res* **42**:178,181, 2010.
- RONTI T, LUPATTELLI G, MANNARINO E: The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology* **64**:355-365, 2006.
- SHEPHERD J, PACKARD CJ, BICKER S, LAWRIE TDV, MORGAN HG: Cholestyramine Promotes Receptor-Mediated Low-Density-Lipoprotein Catabolism. *N Engl J Med* **302**:1219-1222, 1980.
- SHIN DJ, OSBORNE TF: FGF15/FGFR4 integrates growth factor signaling with hepatic bile acid metabolism and insulin action. *J Biol Chem* **284**:11110-20, 2009.
- SCHAAP FG, VAN DER GAAG NA, GOUMA DJ, JANSEN PL: High expression of the bile salt-homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients with extrahepatic cholestasis. *Hepatology* **49**:1228-35, 2009.
- SCHREUDER TC, MARSMAN HA, LENICEK M, VAN WERVEN JR, NEDERVEEN AJ, JANSEN PL, SCHAAP FG: The hepatic response to FGF19 is impaired in patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**:G440-5, 2010.
- SMELT AHM: Triglycerides and gallstone formation. *Clinica Chimica Acta* **411**:1625-1631, 2010.
- STUMVOLL M, JACOB S, WAHL HG, HAUER B, LOBLEIN K, GRAUER P, BECKER R, NIELSEN M, RENN W, HARING H: Suppression of Systemic, Intramuscular, and Subcutaneous Adipose Tissue Lipolysis by Insulin in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:3740-3745, 2000.
- TOMLINSON E, FU L, JOHN L, HULTGREN B, HUANG X, RENZ M, STEPHAN JP, TSAI SP, POWELL-BRAXTON L, FRENCH D, STEWART TA: Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology* **143**:1741-7, 2002.
- XIE MH, HOLCOMB I, DEUEL B, DOWD P, HUANG A, VAGTS A, FOSTER J, LIANG J, BRUSH J, GU Q, HILLAN K, GODDARD A, GURNEY AL: FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine* **11**:729-35, 1999.
- YU C, WANG F, JIN C, HUANG X, MCKEEHAN WL: Independent repression of bile acid synthesis and activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by activated hepatocyte fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and bile acids. *J Biol Chem* **280**:17707-14, 2005.
- YU C, WANG F, KAN M, JIN C, JONES RB, WEINSTEIN M, DENG C-X, MCKEEHAN WL: Elevated Cholesterol Metabolism and Bile Acid Synthesis in Mice Lacking Membrane Tyrosine Kinase Receptor FGFR4. *J Biol Chem* **275**:15482-15489, 2000.

ZHANG Y, LEE FY, BARRERA G, LEE H, VALES C, GONZALEZ FJ, WILLSON TM, EDWARDS PA: Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1006-11, 2006.

Table 1: Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of control group of healthy women (Control), obese women without type 2 diabetes mellitus (Obese) and type 2 diabetic women (T2DM). Values are means \pm SEM. Statistical significance is from One-way ANOVA or ANOVA on Ranks as appropriate. * $p < 0.05$ vs. control group; $^{\circ} p < 0.05$ T2DM vs. Obese.

Group	Control	Obese	T2DM
Number of subjects	30	29	19
Age (years)	48.4 \pm 2.2	45.9 \pm 1.4	51.4 \pm 1.5
BMI (kg/m²)	23.8 \pm 0.3	44.6 \pm 1.5*	36.7 \pm 1.2* $^{\circ}$
Blood glucose (mmol/l)	4.30 \pm 0.23	5.72 \pm 0.33*	10.07 \pm 0.84* $^{\circ}$
Cholesterol (mmol/l)	5.07 \pm 0.17	4.99 \pm 0.23	4.38 \pm 0.21
Triglycerides (mmol/l)	1.16 \pm 0.11	1.68 \pm 0.15*	2.82 \pm 0.26* $^{\circ}$
Insulin (mIU/l)	14.72 \pm 1.65	24.59 \pm 2.34*	46.60 \pm 4.02* $^{\circ}$
HOMA index	2.50 \pm 0.48	6.06 \pm 0.66*	18.05 \pm 1.46* $^{\circ}$
Leptin (ng/ml)	12.57 \pm 1.54	47.67 \pm 2.19*	28.1 \pm 3.30* $^{\circ}$
Adiponectin (μg/ml)	22.23 \pm 1.88	14.94 \pm 1.19*	13.02 \pm 2.11*

Table 2: Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of control group of healthy women (Control) and obese female subjects before (Obese Baseline) and after (Obese after VLCD) three weeks of VLCD. Values are means \pm SEM. Statistical significance is from One-way ANOVA or ANOVA on Ranks (Obese Baseline or Obese after VLCD vs. Controls) and from Paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test (Obese Baseline vs. Obese after VLCD) as appropriate. * $p < 0.05$ vs. control group; $^{\circ} p < 0.05$ Obese Baseline vs. Obese after VLCD.

Group	Control	Obese	
		Baseline	After VLCD
Number of subjects	30	12	12
BMI (kg/m ²)	23.8 \pm 0.3	49.5 \pm 2.7*	47.1 \pm 2.5* [°]
Blood glucose (mmol/l)	4.30 \pm 0.23	5.91 \pm 0.47*	5.26 \pm 0.26*
Cholesterol (mmol/l)	5.07 \pm 0.17	4.50 \pm 0.23	4.12 \pm 0.22
Triglycerides (mmol/l)	1.16 \pm 0.11	1.37 \pm 0.01	1.17 \pm 0.10
Insulin (mIU/l)	14.72 \pm 1.65	34.03 \pm 3.56*	30.34 \pm 4.11*
HOMA index	2.50 \pm 0.48	8.53 \pm 1.09*	6.57 \pm 0.88* [°]
Leptin (ng/ml)	12.57 \pm 1.54	45.83 \pm 3.89*	42.47 \pm 4.77*
Adiponectin (μ g/ml)	22.23 \pm 1.88	13.66 \pm 1.45*	14.33 \pm 1.52*

Table 3: Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of control group of healthy females (Control) and obese type 2 diabetic women before (T2DM baseline) and after three months of treatment with PPAR- α agonist fenofibrate (T2DM fenofibrate). Values are means \pm SEM. Statistical significance is from One-way ANOVA or ANOVA on Ranks as appropriate (T2DM/Baseline or T2DM/Fenofibrate vs. Controls) and from Paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test (T2DM/Baseline vs. T2DM/Fenofibrate) *p<0.05 vs. control group; $^{\circ}$ p<0.05 T2DM/Fenofibrate vs. T2DM/baseline

Group	Control	T2DM	
		Baseline	Fenofibrate
Number of subjects	10	11	11
BMI (kg/m ²)	23.7 \pm 0.8	36.7 \pm 2.9*	36.5 \pm 2.7*
Blood glucose (mmol/l)	4.97 \pm 0.19	8.48 \pm 0.68*	9.43 \pm 0.84* $^{\circ}$
Glycated Hemoglobin (%)	3.81 \pm 0.08	5.77 \pm 0.56*	6.10 \pm 0.58* $^{\circ}$
Cholesterol (mmol/l)	5.39 \pm 0.24	5.22 \pm 0.32	5.09 \pm 0.25
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.55 \pm 0.28	1.17 \pm 0.11*	1.20 \pm 0.11*
Triglycerides (mmol/l)	0.98 \pm 0.12	2.96 \pm 0.39*	2.17 \pm 0.24* $^{\circ}$
Insulin (mIU/l)	23.0 \pm 2.9	44.2 \pm 7.1*	47.5 \pm 8.0*
HOMA index	5.08 \pm 0.56	16.66 \pm 0.21*	20.12 \pm 0.30* $^{\circ}$
Adiponectin (μ g/ml)	22.41 \pm 1.82	17.46 \pm 4.04	16.53 \pm 2.56
Atherogenic index	1.88 \pm 0.09	3.17 \pm 0.37*	3.02 \pm 0.75*

Figure legend

Figure 1. Serum FGF-19 concentrations in control group (black bar, n=30), obese nondiabetic group (light grey bar, n=29) and type 2 DM group (dark grey bar, n=19). Values are means \pm SEM. Statistical significance is from One-way ANOVA or ANOVA on Ranks as appropriate. *p<0.05 vs. control group

Figure 2. Serum FGF-19 concentrations in control group (black bar, n=30), obese patients before (light grey bar, n=12) and after (dashed bar, n=12) three weeks of very low calorie diet (VLCD). Values are means \pm SEM. Statistical significance is from One-way ANOVA or ANOVA on Ranks and from paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test as appropriate. *p<0.05 vs. control group

Figure 3. Serum FGF-19 concentrations in control group (black bar, n=10), type 2 DM group before (dark grey bar, n=11) and after three months of fenofibrate treatment (dashed bar, n=11). Values are mean \pm SEM. Statistical significance is from One-way ANOVA or ANOVA on Ranks and from paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test as appropriate. *p < 0.05 vs. control group, °p <0.05 vs. T2DM group before treatment

Figure 4. Changes of FGF19 concentrations during isoglycemic-hyperinsulinemic clamp in control group of healthy females (filled circles, n=10) and obese females with type 2 DM before (open circles, n=11) and after three months of treatment with PPAR- α agonist fenofibrate (filled triangles, n=11). Statistical significance is from One-way RM ANOVA on Ranks. * p<0.05 vs. baseline value of the respective group

Figure 1

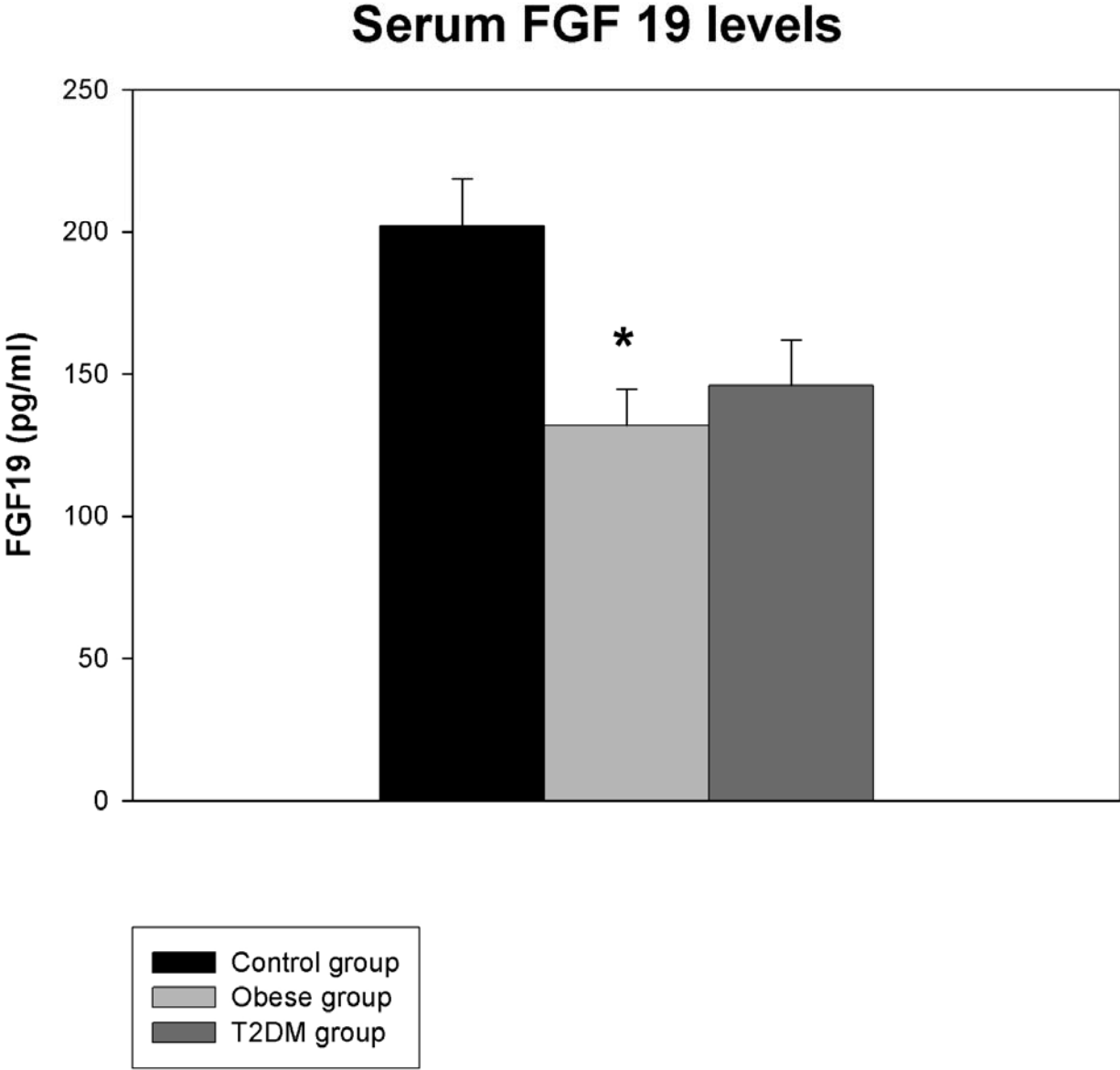


Figure 2

Serum FGF 19 levels

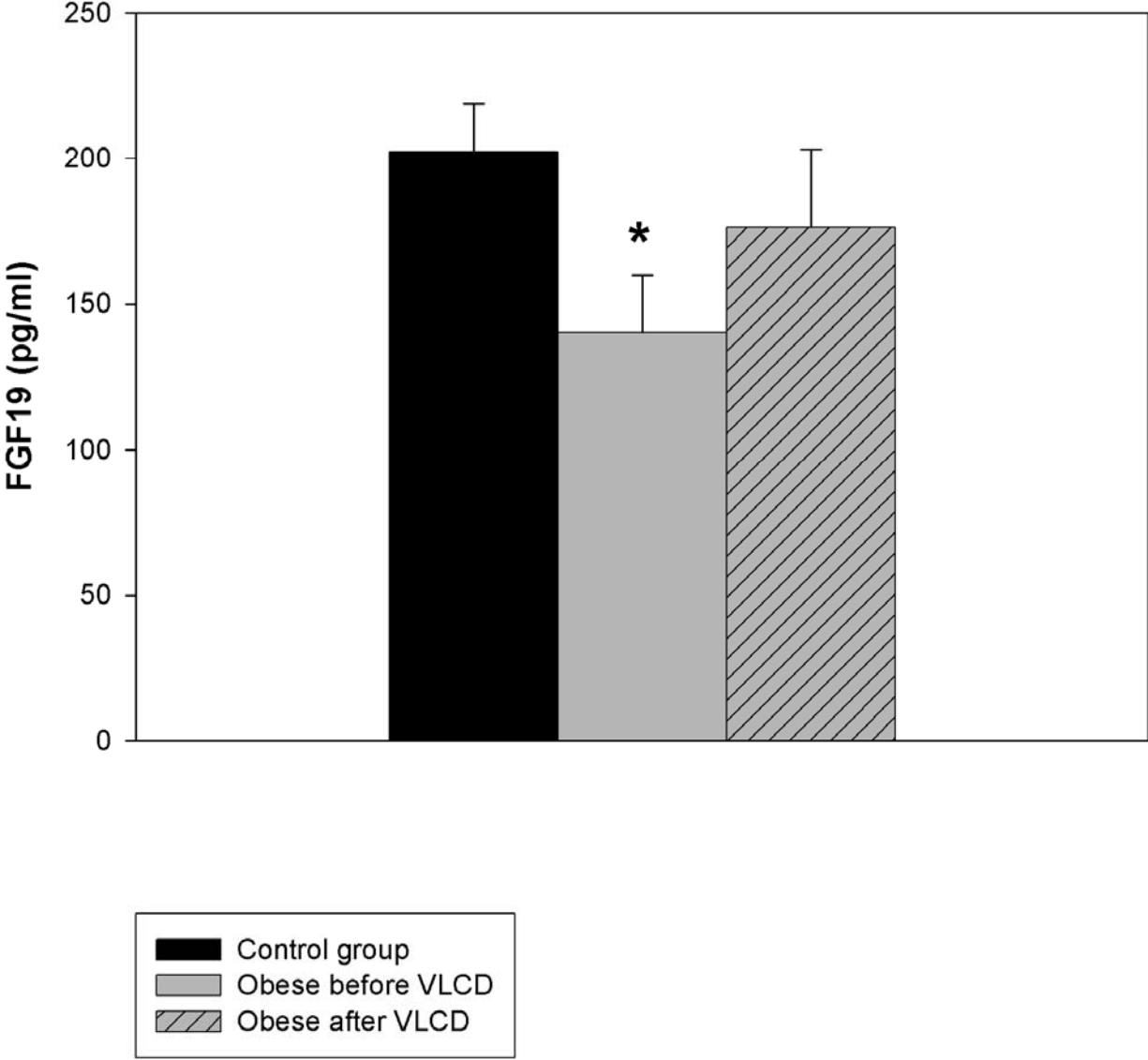


Figure 3

Serum FGF 19 levels

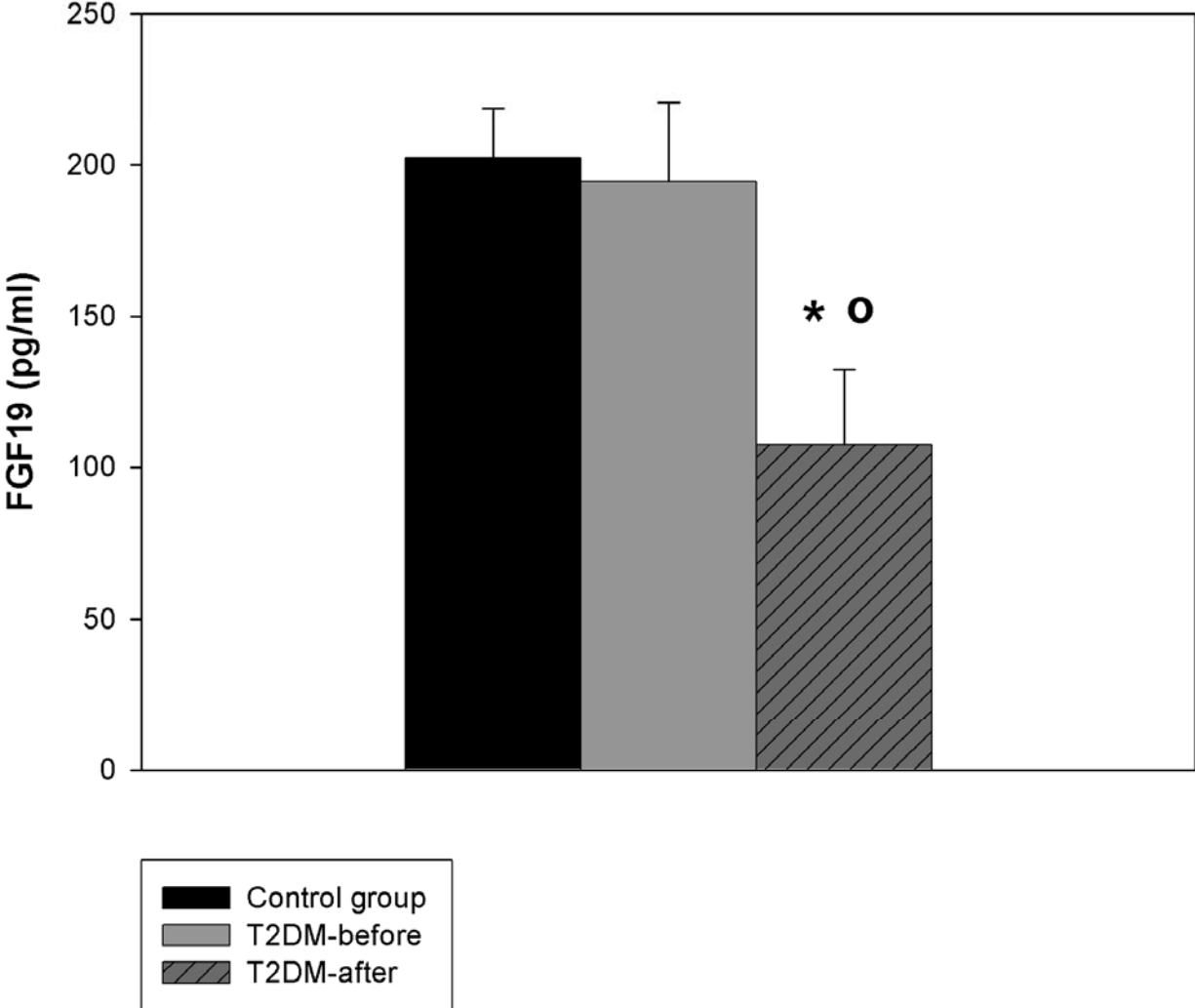


Figure 4

