

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Genetické pozadí obezity a její léčba bariatrickou chirurgií
The genetic background of obesity and its treatment with bariatric surgery

Dizertační práce

Mgr. Olga Lischková (roz. Bradnová)

Školitelka: Doc. RNDr. Běla Bendlová, CSc.

V Praze 2016

Dizertační práce byla vypracována v Endokrinologickém ústavu na Oddělení molekulární endokrinologie (vedoucí odd.: Mgr. Josef Včelák; zástupkyně vedoucího: RNDr. Markéta Vaňková, PhD.) v letech 2008–2016.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně pod odborným vedením vedoucí práce a uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Poděkování:

Můj velký dík za trpělivost, vstřícnost a obětavost patří mé školitelce doc. Běle Bendlové, která mě provází světem vědy již přes deset let a je od počátku mým vzorem.

Ráda bych poděkovala Dr. Markétě Vaňkové, Dr. Petře Lukášové, Dr. Daniele Vejražkové, Dr. Hance Zamrazilové a našemu vedoucímu Mgr. Josefu Včelákovi, kteří mi pomáhali zorientovat se na poli genetického výzkumu a vždy mi ochotně poradili.

Děkuji kolegyním Dr. Vlastě Sýkorové, Dr. Elišce Václavíkové, Mgr. Gábině Vacínové, Dr. Šárce Dvořákové, Aleně Tošnarové a Zuzce Chroustové, které mi byly nejen výbornými spolupracovnicemi, ale především přítelkyněmi.

Zvláštní poděkování patří doc. Janě Vrbíkové, doc. Vojtěchu Hainerovi a prof. Marii Kunešové, kteří mě svým přehledem a zkušenostmi motivovali k další práci a pomáhali mi pochopit klinický význam vědeckých poznatků.

Poděkování patří i všem lékařům, sestřičkám a laborantkám Endokrinologického ústavu a všech spolupracujících pracovišť, bez jejichž péle, ochoty a preciznosti by nemohly validní studie vznikat.

Ten největší dík ale patří mým rodičům Dagmar a Jindřichu Bradnovým a mému muži Martinovi Lischkovi za jejich podporu a pochopení.

Obsah:	
1 Úvod	11
2 Literární přehled	14
2.1 Etiologie a klasifikace obezity	14
2.2 Komplikace obezity	16
2.3 Hormonální regulace energetické rovnováhy	17
2.3.1 Melanokortinový systém	19
2.4 Genetika obezity	22
2.4.1 Celogenomové asociační studie	23
2.5 Léčba obezity	29
2.5.1 Bariatrická chirurgie.....	30
3 Hypotézy a cíle	36
3.1 Hypotéza pro první část dizertační práce – genetické pozadí obezity	36
3.2 Hypotéza pro druhou část dizertační práce – metabolické a hormonální změny u pacientů po bariatrické operaci	37
4 Soubory a metody	39
4.1 Soubory	39
4.2 Metody	40
5 Výsledky.....	46
5.1 Vliv varianty rs12970134 v blízkosti genu <i>MC4R</i> na metabolické a hormonální parametry sledované v souvislosti s obezitou.....	46
5.2 Varianty v genu <i>FTO</i> jsou spojeny s vyšší hladinou růstového hormonu a ovlivňují metabolický profil štíhlých žen.....	57
5.3 Asociace polymorfismů kandidátních genů pro obezitu s metabolickým syndromem a s ním souvisejících parametrů u 1443 českých adolescentů	67
5.4 Vliv gastrické plikace na metabolický profil obézních diabetiček 2. typu	79
5.5 Efekt bariatrické léčby na metabolismus glukózy ve vztahu k metabolismu mastných kyselin po 2 letech	90
6 Diskuze	103
6.1 Genetické pozadí běžné obezity	103
6.2 Bariatrická chirurgie v léčbě obezity	108
7 Závěr.....	111
8 Publikace a prezentace.....	113
9 Seznam použité literatury	120

Seznam zkratek:

ACTH	adrenokortikotropní hormon (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AgRP	<i>Agouti-related protein</i>
α -MSH	hormon stimulující α -melanocyty (<i>α-melanocytes stimulating hormone</i>)
BAI	<i>body adiposity index</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BPD	biliopankreatická diverze
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CI	konfidenční interval (<i>confidence interval</i>)
CNV	<i>copy number variant</i>
DM2	diabetes mellitus 2. typu
EWL	úbytek nadměrné tělesné hmotnosti (<i>excess weight loss</i>)
FTO	<i>fat mass and obesity associated</i>
GH	růstový hormon (<i>growth hormone</i>)
GIP	<i>glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>
GLP-1	<i>glucagon-like peptide – 1</i>
GPR39	<i>G-protein coupled receptor – 39</i>
GWAS	celogenomové asociační studie (<i>genome-wide association studies</i>)
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HOMA-F	<i>homeostatic model assessment – β-cell function</i>
HOMA-IR	<i>homeostatic model assessment – insulin resistance</i>
IGF-1	<i>insulin growth factor – 1</i>
KCTD15	<i>potassium channel tetramerization domain-containing protein 15</i>
LAGB	laparoskopická gastrická bandáž
LCL	dolní konfidenční limit (<i>lower confidence limit</i>)

LEP	leptin
LEPR	leptinový receptor
LGP	laparoskopická gastrická plikace
LSG	laparoskopická sleeve gastrektomie
MC3R	melanokortinový receptor 3. typu (<i>melanocortin-3 receptor</i>)
MC4R	melanokortinový receptor 4. typu (<i>melanocortin-4 receptor</i>)
MMTT	<i>mixed meal tolerance test</i>
MS	metabolický syndrom
NPY	<i>neuropeptide Y</i>
NTRK2	<i>neurotrophic tyrosin kinase receptor type 2</i>
OGTT	<i>oral glucose tolerance test</i>
PC	prohormon konvertáza (<i>prohormon convertase</i>)
PCOS	syndrom polycystických ovárií (<i>polycystic ovary syndrom</i>)
PCSK1	<i>preprotein convertase, subtilisin/kexin-type 1</i>
POMC	proopiomelanokortin (<i>proopiomelanocortin</i>)
SDS	standardní skóre deviace (<i>standard deviation score</i>)
SEC16B	<i>Sacharomyces cerevisiae homolog 16B</i>
SH2B1	<i>Src-homology 2 adaptor protein</i>
SIM 1	<i>single-minded homolog 1</i>
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
TMEM18	<i>transmembrane protein 18</i>
UCL	horní konfidenční limit (<i>upper confidence limit</i>)
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organization</i>)
WHR	poměr pasu k bokům (<i>waist-to-hip ratio</i>)

Abstrakt

Obezita je velmi rozšířená metabolická choroba, která vyvolává mnoho dalších zdravotních i socioekonomických komplikací. Vzniká v důsledku nadměrného příjmu energie a nedostatečného výdeje, navíc je silně geneticky podmíněna. Běžná obezita má polygenní, multifaktoriální charakter, kdy jednotlivé geny interagují mezi sebou i s faktory prostředí, což velmi ztěžuje jejich identifikaci. Celogenomové asociační studie, provedené v letech 2006–09, vedly k odhalení desítek genových lokusů, které predisponují jedince k obezitě. Nejsilnější signály byly zachyceny u polymorfismů v genu *FTO* (*fat mass and obesity associated gene*) a blízko genu *MC4R* (*melanocortin-4 receptor*). Příspěvky těchto variant k fenotypu obezity jsou ale velmi malé, proto je nutné výsledky takovýchto robustních studií validovat. Odhalování účinků variant takových genů je velice důležité pro pochopení molekulárních mechanismů energetického metabolismu.

Studie předkládané v této práci referují o souvislostech polymorfismů vybraných genů s antropometrickými a metabolickými ukazateli pacientů Endokrinologického ústavu a zdravých dobrovolníků, kteří podstupovali funkční testy. Soubor zahrnuje i reprezentativní vzorek české dětské populace (studie COPAT). Vzorky DNA byly genotypizovány pro vybrané jednonukleotidové polymorfismy. V souboru normoglykemických žen jsme našli asociaci polymorfismu blízko genu *MC4R* s hladinou růstového hormonu a leptinu, což vypovídá o jeho komplexní roli v hypothalamických regulacích. Byl zjišťován vliv variability genu *FTO* u štíhlých žen. Haplotypová kombinace čtyř rizikových variant u nich souvisela s mírným zvýšením BMI v rámci souboru. Vysvětlením jejich štíhlého fenotypu by mohl být nálezní vyšší hladiny růstového hormonu. Užívání hormonální antikoncepce metabolický účinek rizikového haplotypu ještě prohloubilo. Asociace vybraných obezitogenů jsme hledali i v souboru adolescentů, jelikož metabolické choroby se stále častěji objevují i u nich. Nalezli jsme souvislost polymorfismů v genech *MC4R* a *BDNF* s metabolickým syndromem. Asociace polymorfismu v genu *FTO* s nadváhou a obezitou byla u adolescentů potvrzena, nově popsána byla souvislost varianty genu *TMEM18* s podváhou. Varianta v genu *PCSK1* korelovala s nižšími hladinami glukózy, a to zejména u chlapců.

Druhá část této práce se zabývá účinky bariatrických operací, které jsou v současnosti považovány za nejefektivnější nástroj v léčbě obezity. Jejich účinkem není jen snížení hmotnosti, ale i léčba dalších vážných, často s obezitou spojovaných onemocnění (diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémie, hypertenze). Mechanismy, jakými dochází ke zlepšení

metabolického profilu již několik dnů po operaci, jsou intenzivně studovány. V našich studiích jsme sledovali účinek tří typů bariatrických operací – laparoskopické gastrické plikace (LGP), laparoskopické gastrické bandáže (LAGB) a biliopankreatické diverze (BPD). Ke snížení hmotnosti a ke zlepšení glukózového metabolismu došlo po všech třech typech operací, nicméně pouze BPD vedla ke kompletní remisi DM2. Po LGP došlo ke změně hladin inkretinů, která byla zřejmě zodpovědná za krátkodobé zlepšení glukózového metabolismu, po dvou letech byl však pozorován vzestup krevní glykémie k původním hladinám.

Při dlouhodobém sledování jsme našli u žen po BPD zvýšenou lipogenezi v tukové tkáni, což naznačuje adaptaci organismu na zhoršenou resorpci mastných kyselin z potravy. Tento typ zákroku vedl k nejspokojivějšímu výsledku, pokud jde o celkový metabolický stav pacientek.

Abstract

Obesity is a frequent metabolic disease that causes many other health and socioeconomic complications. Obesity arises due to excessive energy intake and decrease in energy expenditure, which is a consequence of contemporary lifestyle. Moreover, obesity has a strong genetic component. Common obesity is polygenic, multifactorial disease, in which individual genes interact with each other and with environmental factors. Genome-wide association studies, conducted between 2006-09, led to the discovery of dozens of gene loci that predispose individuals to obesity. The strongest signals were registered for polymorphisms in *FTO* (*fat mass and obesity-associated*) and near a gene *MC4R* (*melanocortin 4 receptor*). However, the contributions of these variations on the phenotype of obesity are very small, therefore, it is necessary to validate the results of such robust studies. It is very important to uncover the effects of genetic variants for understanding the molecular mechanisms of energy metabolism.

The studies presented in this thesis refer about the impact of polymorphisms in selected genes on anthropometric and metabolic parameters of the patients of the Institute of Endocrinology and of healthy volunteers who underwent functional tests. Our cohort includes a representative sample of Czech children (COPAT study). DNA samples were genotyped for the selected single nucleotide polymorphisms. In the group of normoglycaemic women, a significant association of *MC4R* gene with the higher level of growth hormone and leptin and better glucose homeostasis was found. This suggested a complex role of *MC4R* in the hypothalamic regulation. The effect of the *FTO* gene variation in lean women was also investigated. In this group, a haplotype combination of four risk variants was associated with BMI. A likely explanation for their lean phenotype could be the finding of higher levels of growth hormone. The usage of oral contraceptives has deepened the metabolic effect of the risk haplotype. We searched the associations of selected genes also in the cohort of adolescents, as the metabolic diseases are increasingly emerging by adolescents too. We found a correlation of polymorphisms in genes *MC4R* and *BDNF* with metabolic syndrome. Association of polymorphism in the *FTO* gene overweight and obesity has been confirmed. A gene variant in *TMEM18* was associated with underweight and variant in *PCSK1* was associated with lower glucose levels, esp. in boys.

The next part of this thesis focuses on effects of bariatric operations, which are currently considered the most effective tool in the treatment of obesity. Their effect is not only weight reduction, but also the treatment of other diseases associated with obesity (type 2 diabetes, dyslipidaemia, hypertension). Mechanisms that improve metabolic profile in just a few days after surgery have been studied intensively. In our studies, we investigated the effect of three types of bariatric surgery – laparoscopic gastric plication (LGP), laparoscopic gastric banding (LAGB) and biliopancreatic diversion (BPD). Reduced weight and improved glucose metabolism occurred after all three operations, but only BPD led to the complete remission of type 2 diabetes. After LGP, incretin levels have changed. This was apparently responsible for short-term improvement in glucose metabolism. However, two years after LGP blood glucose levels have increased to the baseline levels. In women after BPD, we found increased lipogenesis in adipose tissue, indicating an adaptation of the organism to degraded resorption of fatty acids from food. This type of surgery has led to the most satisfying overall metabolic status of patients.

1 Úvod

Světová zdravotnická organizace (*World Health Organization*; WHO) definuje nadváhu a obezitu jako abnormální nebo nadměrnou akumulaci tělesného tuku, která je výsledkem nerovnováhy mezi energetickým příjmem a výdejem. Nadměrná hmotnost výrazně zvyšuje nemocnost, zhoršuje kvalitu života a souvisí i se socioekonomickými problémy. S obezitou jsou spojena vážná zdravotní rizika, obezita přímo přispívá zejména k vysokému riziku rozvoje diabetes mellitus 2. typu (DM2), hypertenze, dyslipidémie, kardiovaskulárních chorob a k riziku předčasného úmrtí.

Od 90. let minulého století došlo k prudkému nárůstu prevalence obezity jak v rozvinutých, tak i v rozvojových zemích a začalo se hovořit o celosvětové epidemii obezity. V roce 2014 dosáhl celosvětově počet lidí s nadváhou 1,9 miliardy a počet obézních osob 600 miliónů. Téměř 40 % světové dospělé populace má nadváhu (38 % mužů a 40 % žen) a 13 % světové populace je obézní (11 % mužů a 15 % žen) (WHO, 2015) (**obrázek 1 a 2**). V posledních několika letech ale její prevalence roste v poněkud volnějším tempu, než se původně předpovídalo (Finkelstein *et al.*, 2012).

Z výzkumu provedeném v letech 2008 až 2009 na reprezentativním vzorku české populace (n=2058) vyplynulo, že 52 % sledovaných osob má nadměrnou hmotnost, přičemž 35 % spadá do kategorie nadváhy a 17 % je obézních (Matoulek *et al.*, 2010).

Závažným problémem je stále vzrůstající prevalence dětské obezity. Přibližně 80 % obézních dětí si totiž přenesou chorobu i do dospělosti (Whitaker *et al.*, 1997). V roce 2010 byl celosvětový výskyt dětské obezity odhadnutý na 43 milionů (6,7 %) předškolních dětí s nadváhou nebo obezitou. Do roku 2020 je očekáván nárůst až na 60 milionů obézních dětí (9,1 %) (de Onis, 2010).

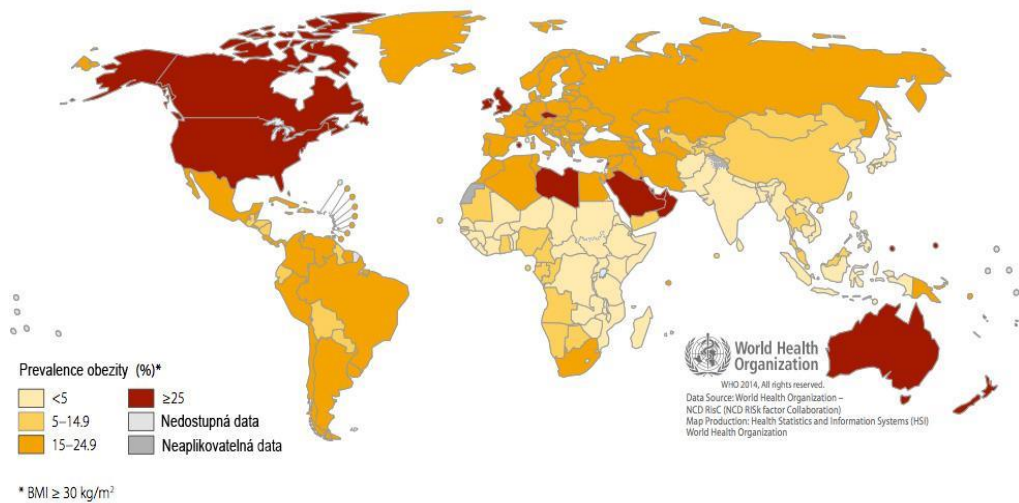
Mezi lety 2002 až 2014 došlo k výraznému zvýšení prevalence nadváhy a obezity i u českých adolescentů. U chlapců se zvýšila prevalence obezity z 18,3 % v roce 2002 na 24,8 % v roce 2014 a u dívek se zvýšila z 8,3 % v roce 2002 na 11,9 % v roce 2014 (Sigmund *et al.*, 2015).

Obezita souvisí jednak s vyšší dostupností vysokokalorických potravin (zvýšená konzumace tuků a sladkých nápojů), ale především se sníženou habituální aktivitou, tzv. sedavým způsobem života (Chaput *et al.*, 2011). Faktorem ale je, že ne u každého jedince, žijícího v takovémto „obezogenním“ prostředí, se nadváha nebo obezita objeví.

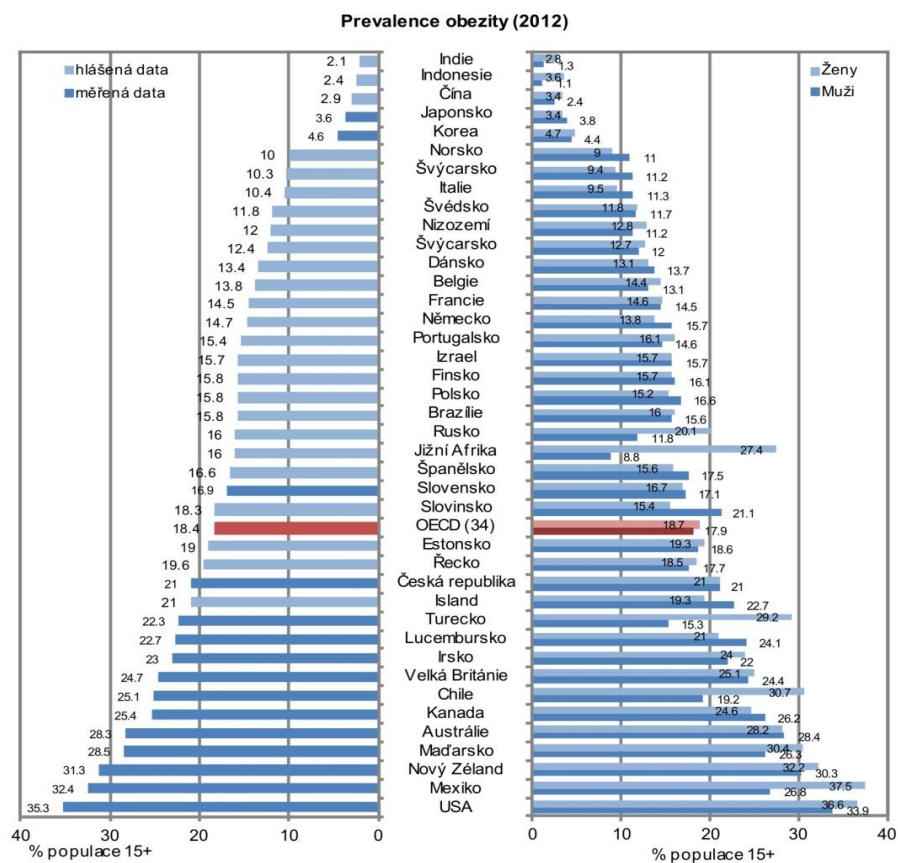
Tato interindividuální variabilita je výsledkem účinku genů, které interagují se složkami obezogenního prostředí (Hofker a Wijmenga, 2010).

Nejběžnějším typem obezity je obezita polygenní. Jde o heterogenní, multifaktoriální onemocnění s komplexním typem dědičnosti. Příspěvky jednotlivých genů jsou často velmi malé, navíc interagují mezi sebou i s faktory prostředí. Znalost genů zodpovědných za vznik obezity a jejich interakce s vlivy prostředí může pomoci nalézt vhodnou intervenci a stanovit efektivní nutriční i lékařskou terapii. Použití nových technologií umožňuje identifikaci množství genetických variant či nových genů souvisejících s obezitou a pomáhá objasnit mechanismy patogenetických cest a případné cíle pro farmakoterapii (Bendlová *et al.*, 2007).

V posledních dvou dekadách jsou efektivním nástrojem léčby obezity bariatrické operace. Bariatrické operace pomáhají léčit nejen obezitu samotnou, ale i s obezitou související komorbidity, jako je DM2, hypertenze a kardiovaskulární onemocnění. Ne zcela zodpovězenou otázkou v současnosti zůstává, jaký je přesný mechanismus účinku jednotlivých operací a jaké jsou dlouhodobé důsledky těchto zákroků.



Obrázek 1 – Geografický výskyt obezity u dospělé populace *Zdroj:* World Health Organization, 2014 (upraveno)



Obrázek 2 – Prevalence obezity (hlášená data bývají často podhodnocena; data z roku 2012). *Zdroj:* OECD, 2014 (upraveno)

2 Literární přehled

2.1 Etiologie a klasifikace obezity

Obezita je výsledkem pozitivní energetické bilance. Důležitými faktory v její etiologii jsou biologické cesty regulace chuti, regulace metabolismu a adipogeneze. Energetický výdej zahrnuje bazální metabolismus, energii potřebnou pro vstřebávání živin a výdej energie při fyzické námaze. Pokud energie získaná z jídla a nápojů ve formě kalorií výrazně převyšuje energetický výdej, dochází k pozitivní energetické nerovnováze a k ukládání nadbytečné energie ve formě triacylglycerolů do tukové tkáně. Naopak při negativní energetické nerovnováze, kdy výdej energie převyšuje její příjem, dochází k mobilizaci energie z tukových zásob (Hainer *et al.*, 2011; Hill *et al.*, 2012). Kromě obsahu energie v jídle se uplatňuje i složení stravy, tzn. podíl jednotlivých základních živin (proteinů, lipidů a sacharidů), jejich původ (živočišné nebo rostlinné bílkoviny), složení mastných kyselin v triacylglycerolech, obsah sacharidů (mono-, di-, polysacharidy), vlákniny a mikronutrientů (vitamíny, minerály) (Kunešová *et al.*, 2011).

Nejrozšířenějším měřítkem pro klasifikaci obezity je **index tělesné hmoty** (BMI – *body mass index*) s použitím pro obě pohlaví a pro různý dospělý věk. Spočítá se jako podíl tělesné hmotnosti v kilogramech a druhé mocniny tělesné výšky v metrech. Optimální rozmezí je mezi 18,5 až 24,9 kg/m². Rozmezí od 25,0 do 29,9 kg/m² charakterizujeme jako nadváhu a již lze počítat se zvýšeným rizikem vzniku zdravotních komplikací. Od hodnoty BMI 30 kg/m² je toto riziko již vysoké a hovoříme o obezitě. Obezitu bylo původně možné rozdělit do tří podskupin: obezita I. stupně (BMI 30–34,9 kg/m²), obezita II. stupně (BMI 35–39,9 kg/m²) a obezita III. stupně (BMI ≥ 40 kg/m²), kterou nazýváme také těžkou, extrémní či morbidní (Poirier *et al.*, 2006). V posledních letech bylo nutné vzít v úvahu nárůst pacientů s extrémní obezitou a došlo k zavedení dalších dvou stupňů: obezita IV. stupně (BMI ≥ 50 kg/m²) a obezita V. stupně (BMI ≥ 60 kg/m²) (Poirier *et al.*, 2009 *et* 2011).

Hodnocení obezity podle BMI není dostatečné. Dr. Goméz-Ambrozi ve své studii provedené na 6000 jedincích zjistil u 80 % osob s nadváhou a u 29 % osob s normální hodnotou BMI srovnatelné množství relativního zastoupení tukové hmoty s obézními jedinci (Gómez-Ambrosi *et al.*, 2012). Dalšími metodami klasifikace obezity je měření tloušťky základních **kožních řas** (např. nad bicipsem, nad tricipsem, na břicho, subskapulární, suprailiální). Abdominální obezita je hodnocena podle délky **obvodu**

pasu, která je spojená se zvýšeným zdravotním rizikem počínaje hodnotou 94 cm u mužů a 80 cm u žen, vysoké riziko hrozí od hodnoty 102 cm u mužů a 88 cm u žen (Alberti *et al.*, 2009). Dále je hodnocen poměr pasu k bokům (**WHR** – *waist-to-hip ratio*), jehož normální hodnota je u mužů do 1,0 a u žen do 0,85. Index tělesné adipozity (**BAI** – *body adiposity index*) vyjadřuje odhad procenta tělesné adipozity a dobře koreluje s výsledky získanými z měření duální rentgenovou absorpciometrií ($BAI = [\text{obvod boků/výška}^{1,5}] - 18$ [%]) (Bergman *et al.* 2011). Bioimpedanční analýza (**BIA**) měří složení těla využitím rozdílné vodivosti různých tělesných struktur, které kladou různý odpor při průchodu elektrického proudu nízké intenzity a vysoké frekvence. Duální rentgenová absorpciometrie (**DEXA** – *Dual Energy X-Ray Absorptiometry*) je považována za nejlepší referenční metodu. Vychází z odlišné absorpce záření o dvou různých energiích, což umožňuje rozlišení kostních minerálů od měkkých tkání a rozdělení na tuk a tukuprostou hmotu. Počítačová tomografie a nukleární magnetická rezonance jsou dalšími zobrazovacími metodami, jejichž využití je ovšem vzhledem k jejich vysoké ceně a nedostatečné dostupnosti malé (Hainer *et al.*, 2011).

Abdominální obezita (také centrální či androidní, tj. typická pro muže) je metabolicky velmi aktivní a z hlediska kardiovaskulárních komplikací rizikovější. Vzniká v době, kdy adipocyty v subkutánní tukové tkáni již nejsou schopny vycíkat cirkulující triacylglyceroly získané z potravy. Ty pak setrvávají v oběhu a usazují se na ektopických místech (tj. ve viscerální tukové tkáni, v játrech, ve svalech, v ledvinách i v epikardu), což vede k lipotoxicitě (Gray a Vidal-Puig, 2007), inzulínové rezistenci a hyperinzulinémii (Després *et al.*, 2008). Tukové buňky mají v závislosti na své velikosti a lokalizaci různé metabolické vlastnosti a rozdílnou schopnost exkrece adipocytokinů, které vedou k různým stupňům kardiometabolického rizika (od protektivního přes neutrální až po riziko velmi vysoké). Pro ženy je typický spíše gynoidní typ obezity, který je dán nárůstem subkutánní tukové tkáně v oblasti boků a hýždí (Hainer *et al.*, 2011).

Zvláštní skupinou jedinců je přibližně 30 % obézních s tzv. **metabolicky „zdravou“ obezitou**. Ta je charakterizovaná hodnotou BMI vyšší než 30 kg/m², ale bez přítomnosti další metabolické poruchy jako je DM2, dyslipidémie nebo hypertenze. Doporučené postupy pro léčbu obezity nerozlišují mezi metabolicky zdravými obézními a jedinci s metabolicky rizikovou obezitou. Je pravděpodobné, že metabolicky „zdravá“ obezita je pouze přechodný stav, dokud se nevyčerpá absorpční kapacita adipocytů pro triacylglyceroly (Hainer *et al.*, 2015).

O diagnóze obezity by mělo rozhodovat více aspektů, nejen hodnota BMI a abdominální obezita, nejčastěji měřená pomocí obvodu pasu. Pro výběr vhodné léčebné strategie obezity je navíc nutné vzít v úvahu i další rizikové faktory, jako jsou různé hormonální dysfunkce a přítomnost dalších onemocnění, např. DM2.

2.2 Komplikace obezity

S obezitou je spojena celá řada dalších zdravotních komplikací. Závažné formy obezity a s ní související komorbidity mnohonásobně zvyšují riziko předčasného úmrtí ve srovnání s životní prognózou stejně starých neobézních jedinců (Banegas *et al.*, 2003). Podle Dr. Kitahary *et al.* (2014) je délka života u jedinců s hodnotou BMI 40–44,9 kg/m² zkrácena o 6,5 roku, u obézních s hodnotou BMI 45–49,9 kg/m² o 8,9 let, u obézních s hodnotou BMI 50–54,9 kg/m² o 9,8 let a u obézních s hodnotou BMI mezi 55 a 59,9 kg/m² zkrácena dokonce o 13,7 let.

Onemocnění, která často doprovází vyšší stupně obezity, jsou diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémie, hypertenze, srdeční selhávání, syndrom spánkové apnoe, některé druhy malignit, poruchy fertility a deprese. Těžká obezita s sebou přináší nejen rizika přímého ohrožení na životě, ale také závažné psychosociální a ekonomické dopady na jednotlivce i na celou společnost (Von Lengereke *et al.*, 2006).

Tato dizertační práce je zaměřena na metabolické komplikace obezity, především na inzulinovou rezistenci a diabetes 2. typu.

Obezita, konkrétně abdominální obezita, je základním symptomem **metabolického syndromu**, neboli syndromu inzulinové rezistence. Kromě obezity patří k dalším charakteristikám metabolického syndromu vysoký krevní tlak, dyslipidémie (vysoká hladina triacylglycerolů a nízká hladina HDL cholesterolu) a DM2 (Reaven, 1988). Podle definice NCEP ATP III (*The US National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III*) musí být pro diagnózu metabolického syndromu, krom přítomnosti abdominální obezity (obvod pasu: ženy ≥ 88 cm; muži ≥ 102 cm), splněny minimálně tři z pěti následujících kritérií: lačná glykémie $\geq 5,56$ mmol/l, systolický krevní tlak ≥ 130 mmHg nebo diastolický krevní tlak ≥ 85 mmHg, hladina triacylglycerolů $\geq 1,70$ mmol/l, hladina HDL cholesterolu $< 1,30$ mmol/l u žen a $< 1,04$ mmol/l u mužů (Alberti *et al.*, 2009). U dětí a adolescentů je metabolický

syndrom definován na základě kritérií International Diabetes Federation (Zimmet *et al.*, 2007).

Inzulínová rezistence periferních tkání, která vzniká v důsledku obezity, může a také často vede ke vzniku DM2. Vznik DM2 je podmíněn kombinací inzulínové rezistence a porušené inzulínové sekrece. Léčbu obézních diabetiků komplikuje fakt, že mnoho běžně užívaných antidiabetik podporuje růst hmotnosti, např. deriváty sulfonylurey, glitazony a inzulín. Přitom více než 80 % diabetiků 2. typu má nadměrnou hmotnost a 50 % je obézních (Diabetes overview, 2012).

Stejně jako vzrůstá prevalence obezity, vzrůstá i prevalence DM2. Nárůst obou onemocnění se bohužel týká čím dál mladších jedinců a bohužel i dětí. Počet případů diagnostikovaného DM2 dosáhl celosvětově v roce 2011 366 miliónů a odhaduje se, že v roce 2030 to bude již 552 miliónů osob s DM2 (Weinert, 2012).

2.3 Hormonální regulace energetické rovnováhy

Energetickou homeostázu zajišťují komplexní interakce periferních signálů a centrálního nervového systému, které regulují chuť k jídlu. Příjem potravy je řízen centrem hladu a sytosti ve ventromediálním a laterálním hypothalamu. Tato centra přijímají hormonální signály z pankreatu (např. inzulín), tukové tkáně (např. leptin) a z gastrointestinálního traktu (např. GIP, GLP-1, ghrelin), které jsou zahrnuty v přenosu informací o energetickém stavu neurohumorální osou spojující žaludek s centrem v hypothalamu a v mozkovém kmeni. Přijímají i další metabolické signály jako je hladina glykémie, hladiny aminokyselin a ketolátek (Lenard *et al.*, 2008; Hainer *et al.*, 2011).

Inzulín je produkován β -buňkami pankreatu (Bagdade *et al.*, 1967) a je nezbytný při údržbě glukózové homeostázy. Je uvolňován po jídle. Má schopnost zprostředkovat příjem glukózy tkáněmi a tím snižovat hladinu cukru v krvi. Dokáže prostupovat hematoencefalickou bariérou, vázat se na svůj receptor v hypothalamu a působit zpětně na snižování potravinového příjmu (Rushing *et al.*, 2000). Lačné i postprandiální hladiny inzulínu jsou vyšší u obézních ve srovnání se štíhlými jedinci (Björntorp *et al.*, 1987), přičemž množství viscerální tukové negativně koreluje s inzulínovou senzitivitou (Maffeis *et al.*, 2008). Může dojít k centrální inzulínové rezistenci, která je důsledkem především zvýšeného příjmu tuků v potravě (Qatanani *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007).

Leptin je anorexigenní hormon, syntetizovaný v tukové tkáni (Zhang *et al.*, 1994), který se účastní regulace energetického příjmu a výdeje prostřednictvím melanokortinové cesty.

Leptin prostupuje hematoencefalickou bariéru a informuje hypothalamická centra o metabolickém stavu v periférii. Po navázání leptinu na leptinový receptor se snižuje exprese neuropeptidů, stimulujících chuť k jídlu (*neuropeptide Y* – NPY, *Agouti related protein* – AgRP) a naopak se zvyšuje exprese anorexigenních peptidů (*proopiomelanocortin* – POMC a *α-melanocyte-stimulating hormone* – α-MSH) (Maffei *et al.*, 1995; Mizuno *et al.*, 1998). Při obezitě jsou hladiny leptinu zvýšené, přičemž je zhoršena leptinová senzitivita, což vede k potřebě dalšího zvyšování leptinu pro utlumení chuti k jídlu (viz **obrázek 4**).

Gastrointestinální trakt uvolňuje při procesech trávení potravy a absorpce živin hormony – tzv. **inkretiny**, které hrají důležitou roli v regulacích hladiny krevního cukru, střevní motility a pocitu sytosti. Dva z nich, *glucagon-like peptide-1* (**GLP-1**) a *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (**GIP**), jsou secernovány enteroendokrinními buňkami ve střevním epitelu. GIP je produkován K-buňkami v duodenu a GLP-1 L-buňkami distální části tenkého střeva (Holst *et al.*, 2007). Tyto inkretinové peptidy pomáhají koordinovat odpovědi metabolismu na příjem potravy, a to především svojí schopností zesilovat sekreci inzulínu, stimulovat růst a vitalitu β-buněk pankreatu, inhibovat uvolňování glukagonu a potlačovat chuť k jídlu (Tang-Christensen *et al.*, 2001). Sekrece peptidů je výsledkem přítomnosti živin ve střevě a to kromě glukózy, lipidů a proteinů i přítomností žlučových kyselin (Parker *et al.*, 2010 *et* 2012). Hladiny GLP-1 jsou vyšší u štíhlých jedinců ve srovnání s obézními (Verdich *et al.*, 2001).

Ghrelín („hormon hladu“) je endogenní ligand receptoru pro růstový hormon a je zapojen do regulace uvolňování růstového hormonu, nikoliv však do jeho syntézy (Kojima *et al.*, 1999). Ghrelín je orexigenní peptid produkováný žaludeční stěnou. Působí prostřednictvím ghrelinových receptorů na hypothalamických neuronech a podílí se tak na centrálním metabolickém účinku (Korbonits *et al.*, 2001, Delhanty *et al.*, 2011). Ghrelín zvyšuje chuť k jídlu i celkový příjem potravy (Wren *et al.*, 2001). Nejvyšší hladiny bývají měřeny před jídlem a po jídle klesají (Cummings *et al.*, 2002). Negativně korelují s BMI a při hubnutí se hladiny ghrelinu zvyšují (Tschöp *et al.*, 2001). Ghrelín se dále podílí na regulaci glukózového metabolismu (Reed *et al.*, 2008), stimulaci žaludeční motility a sekreci žaludečních šťáv (Asakawa *et al.*, 2001). Zjistilo se, že sekrece ghrelinu může být stimulována i prostřednictvím receptorů spřažených s G-proteiny, mezi které patří i receptor pro melanokortin 4 (MC4R) (Engelstoft *et al.*, 2013). Různé typy bariatrických

operací mají na sekreci ghrelinu různý vliv, pravděpodobně kvůli anatomickým změnám, omezujícím kontakt pozřené potravy se žaludeční stěnou (Meek *et al.*, 2016).

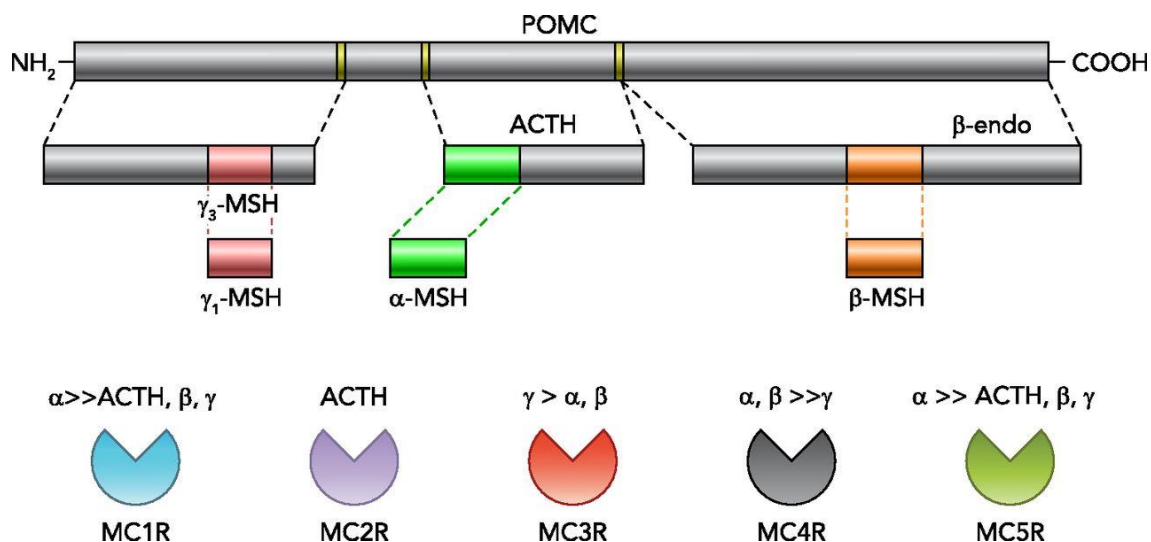
Obestatin byl objeven v roce 2005 při studiu preprohormonů. Je odvozen z konzervované oblasti preproghrelinu, vzniká jeho alternativním sestřihem. Má opačné účinky než ghrelin: snižuje chuť k jídlu i tělesnou hmotnost, díky čemuž získal i svůj název. Obestatin se váže na receptor GPR39 (*G-protein coupled receptor 39*), který je exprimován především v žaludku, ve střevech a v hypothalamu. Obestatin podporuje životnost a funkci β -buněk pankreatu a pravděpodobně reguluje i metabolismus adipocytů a adipogenezi (Zhang *et al.*, 2005).

2.3.1 Melanokortinový systém

Hypothalamický melanokortinový systém, je jedním z nejkompexnějších systémů v endokrinologii člověka. Jeho peptidy regulují energetický příjem a výdej, rovnováhu mezi utilizací a skladováním bílkovin a udržují tělesnou hmotnost.

Melanokortiny hrají roli v mimořádně rozmanitém množství fyziologických funkcí, jako jsou pigmentace, steroidogeneze, energetická homeostáza, exokrinní sekrece, pohlavní funkce, analgémie, zánět, imunomodulace, kontrola termogeneze, kardiovaskulární regulace a neuromuskulární regenerace. Objev melanokortinů vzbudil zájem v souvislosti s obezitou, anorexií, kachexií, erektilní dysfunkcí, bolestí a poškozením nervů, ale také v souvislosti s vývojem léčby rakoviny kůže a dalších kožních poruch (Tao, 2010).

Melanokortiny, neboli ligandy melanokortinových receptorů, jsou posttranslačními produkty proopiomelanokortinu (POMC). Obsahují aminokyselinovou sekvenci His-Phe-Arg-Trp, která je klíčovou pro biologickou funkci těchto peptidů. Posttranslační modifikace prohormonu POMC je tkáňově specifická, a tak je tímto prohormonem zajištěna kontrola různých fyziologických funkcí (**obrázek 3, tabulka 1**).

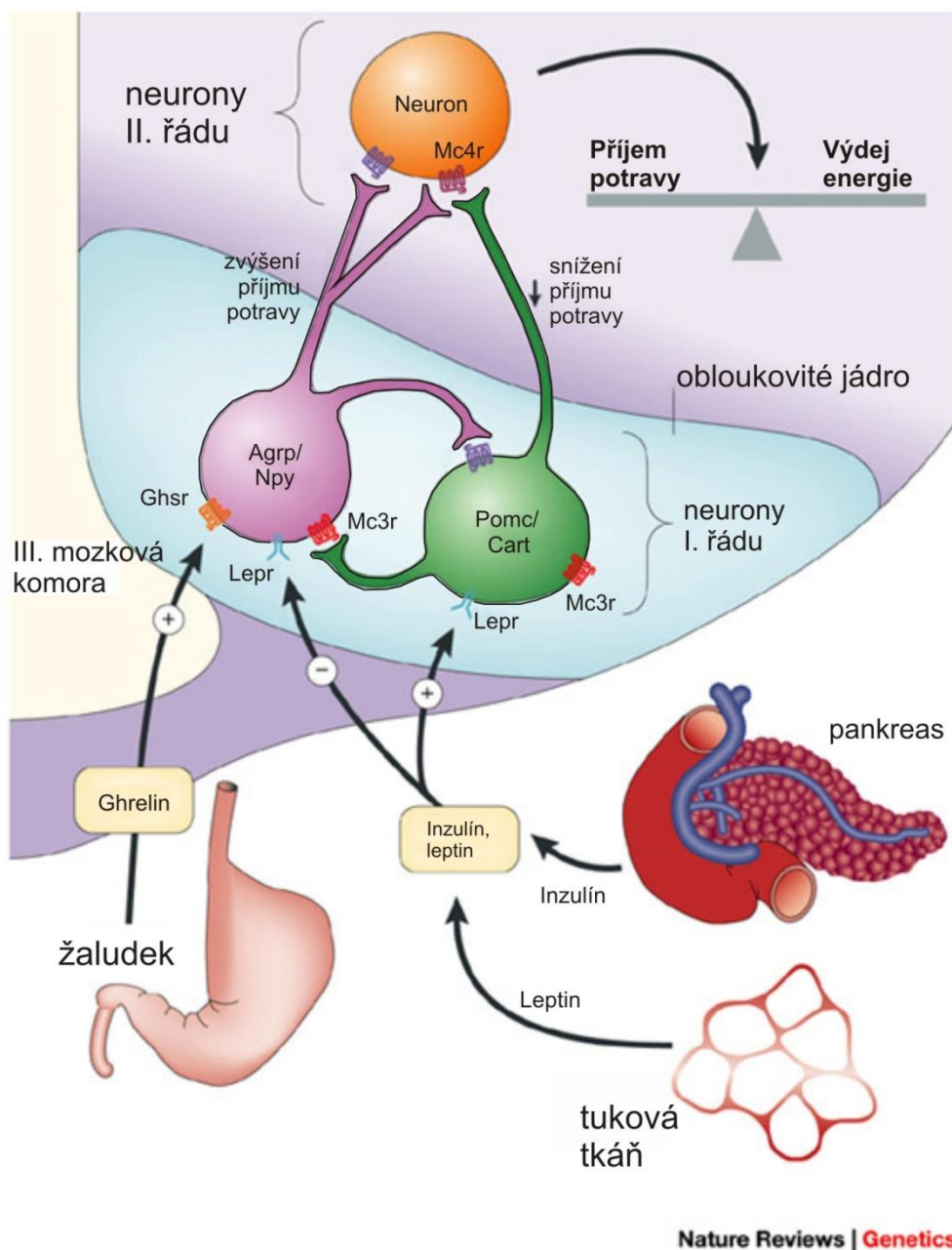


Obrázek 3 – Schématické znázornění štěpení proopiomelanokortinu za vzniku ligandů s různou afinitou pro jednotlivé melanokortinové receptory (MC1R–MC5R); ACTH (adrenokortikotropní hormon); β-endo (β-endorfin); MSH (hormon stimulující melanocyty); POMC (proopiomelanokortin). *Zdroj: da Silva et al., 2014 Physiology (Betscheda)*

Melanokortinové receptory se od sebe odlišují rozdílnou afinitou pro melanokortiny a jejich endogenní antagonisty, jimiž jsou Agouti a AgRP.

Tabulka 1 – Přehled melanokortinových receptorů

	místo exprese	ligand	funkce
MC1R	melanocyty, leukocyty	α-MSH	pigmentace kůže a vlasů; imunomodulace
MC2R	kůra nadledvin	ACTH	produkce kortikoidů (kortizol, aldosteron)
MC3R	hypothalamus	α-, β-, γ-MSH, ACTH	suprese ukládání do tukových zásob
MC4R	hypothalamus	α-MSH a ACTH	regulace energetické homeostázy
MC5R	mozek, kůže	α-MSH a ACTH	sekrece mazových žláz



Obrázek 4 – Schéma leptin–melanokortinového systému. *Zdroj:* Barsh a Schwartz, 2002 (upraveno)

Leptin přenáší signál o stavu výživy z adipocytů tukové tkáně do CNS prostřednictvím vazby na leptinové receptory přítomné v jádrech hypothalamu. Po této vazbě dochází ke stimulaci osy anorexigenních neuropeptidů (POMC) a k inhibici osy orexigenních neuropeptidů (NPY, AgRP), jak již bylo zmíněno dříve. Molekula POMC se za pomoci enzymů prohormonkonvertázy 1, 2 a 3 (PC1–3) štěpí na několik funkčních peptidů, z nichž některé jsou ligandy melanokortinových receptorů: tři typy hormonů stimulujících

melanocyty (α -, β - a γ -MSH), adrenokortikotropní hormon (ACTH), β - a γ -lipoprotein a β -endorfin. Na regulaci energetické rovnováhy se pak α -MSH podílí tím, že aktivuje osu anorexigenních neuropeptidů svojí vazbou na melanokortinové receptory 3. a 4. typu. Následkem této aktivace je snížení příjmu potravy a zvýšení energetického výdeje (**obrázek 4**).

2.4 Genetika obezity

Běžná obezita je komplexní metabolickou poruchou, která je způsobená genetickými i negenetickými faktory. Takováto onemocnění jsou označována jako multifaktoriální či polygenní. Jsou prezentovány mnoha geny s malým účinkem, přičemž spolu fungují aditivním způsobem a ještě interagují s faktory prostředí. Výsledkem takových interakcí je v případě obezity pozitivní energetická bilance a nárůst tělesné hmotnosti (Sandholt *et al.*, 2010).

Genetická determinace fyzických rysů jako je tělesná hmotnost, porodní hmotnost či obvod pasu byla popsána ve studiích na monozygotních a dizygotních dvojčatech již v 50. letech (Clark, 1956). Na počátku 60. let formuloval prof. Neel teorii o spořivých genech, která vysvětluje, jak geny přispívají ke vzniku obezity v určitém prostředí. Akumulace těchto „spořivých genů“ umožnila v minulosti svému nositeli efektivněji využít kalorie a hromadit tukové zásoby během období relativního dostatku potravy a výrazně tak zvyšovala jeho šanci na přežití (Neel, 1962). Z této hypotézy vyplývá, že jedinec nesoucí „spořivé geny“, které jeho předkům mohly pomoci překonat hladomor, má v dnešní společnosti s konstantním přebytkem jídla a sedavým způsobem života vyšší riziko rozvoje obezity.

Pro studium genetické podmíněnosti obezity bylo dříve hojně využíváno **modelu dvojčat**. Podle původních studií prof. Stunkarda je heritabilita BMI v případě monozygotních dvojčat vysoká (77 %) a s věkem se zvyšuje až na 84 % (Stunkard *et al.*, 1986). Při studiu úspěšnosti monozygotních dvojčat po 40-denním redukčním programu popsal doc. Hainer v roce 2001 velmi silnou korelaci úbytku hmotnosti ($p = 0,001$) a tukové hmoty ($p = 0,001$) uvnitř párů, přičemž variabilita mezi páry byla obrovská (5,9–12,4 kg; resp. 3,1–12,4 kg) (Hainer *et al.*, 2001). Konkordance pro tukovou hmotu byla stanovena u monozygotních dvojčat v rozpětí 70–90 % a u dizygotních 35–45 % (Hebebrand *et al.*, 2003; Farooqi *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2005).

Hledání kandidátních genů a vazebné studie, mapující výskyt onemocnění v rodinách byly metody používané na přelomu tisíciletí. Díky nim byly identifikovány rizikové genetické varianty zodpovědné za dědičnost obézního fenotypu. Přestože měly mnohá omezení, jako je malá statistická síla nebo nedostatek genetických a biologických znalostí (Bell *et al.*, 2005), dokázaly identifikovat 127 kandidátních genů pro obezitu. Tyto geny ovšem nebyly všeobecně validovány (Rankinen *et al.*, 2006). Pouze čtvrtina z nich byla ověřena v dalších nezávislých studiích. Zjistilo se, že většina genů asociovaných s BMI je silně exprimována v centrálním nervovém systému, zatímco geny asociující s distribucí tuku jsou exprimovány především v tukové tkáni (Schmuelli *et al.*, 2003). Obecně bylo stanoveno, že geny, přispívající ke vzniku běžné obezity, jsou zodpovědné za 40–70 % heritability BMI napříč populacemi (Day a Loos, 2011). Dědičnost obezity je patrná již od časného dětství, kdy je interakce obezogenů s prostředím nejsilnější (Dubois *et al.*, 2012).

2.4.1 Celogenomové asociační studie

K pokroku v oblasti genetiky obezity došlo s příchodem nové technologie, tzv. celogenomových asociačních studií (*Genome-wide association study*, GWAS). První GWAS zaměřená na obezitu byla provedena v roce 2006 (Herbert *et al.*, 2006) a další proběhly v následujících čtyřech letech (Scott *et al.*, 2007; Willer *et al.*, 2009; Thorliefsson *et al.*, 2009; Meyre *et al.*, 2009; Speliotes *et al.*, 2010; Scherag *et al.*, 2010). Tyto studie nevyžadují hypotézu. Jsou založeny na asociaci genetické varianty s určitým fenotypem. Metoda využívá souboru stovek tisíc sond jednonukleotidových polymorfismů (*single nucleotide polymorphism-arrays* – SNPs), které pokrývají téměř celý genom. GWAS studie využívají polymorfismů s frekvencí výskytu nad 5 %. Soubory musejí být značně rozsáhlé (desetitisíce jedinců), aby bylo dosaženo dostatečné statistické síly. Výsledky by měly být validovány nezávislými studiemi a metaanalýzami.

Byly objeveny geny asociující nejen s BMI a s morbidní obezitou, ale i s dalšími fenotypovými znaky obezity jako je obvod pasu a poměr pasu a boků (WHR). Výsledkem metaanalýz prvních GWAS projektů byla identifikace 43 genových lokusů asociujících s obezitou a 18 lokusů predisponujících k viscerální akumulaci tuku (Sandholt *et al.*, 2012). Do současnosti byly identifikovány již stovky genetických variant asociovaných s chorobou, představují ovšem pouze malou frakci z odhadované heritability obezity. Z poslední metaanalýzy čítající téměř 350 tisíc jedinců vyplývá, že 97 rizikových

lokusů vysvětluje 2,7 % interindividuální variability BMI, kdy je každá riziková alela zodpovědná za zvýšení hodnoty BMI o 0,1 kg/m², což při výšce 160–180 cm odpovídá nárůstu hmotnosti o 260–320 g (Locke *et al.*, 2015).

Většina nalezených polymorfismů leží v nekódujících oblastech (v intronech nebo mezi geny). Některé z nich mohou být kauzální, jiné mohou ležet ve vazebné nerovnováze se skutečnou kauzální variantou, která však nebyla GWAS studii zachycena. V případě, že změny v alelické struktuře nejsou detekovány GWAS studii, hovoříme o skryté neboli chybějící heritabilitě (Gibson, 2010). Mohou jí vysvětlit interakce genů mezi sebou a interakce genů s prostředím (van Vliet-Ostaptschouk *et al.*, 2012), např. přímé nutriční interakce s rizikovými variantami genů či vliv fyzické aktivity na funkci a expresi některých genů (Andreasen *et al.*, 2008). Dalším vysvětlením mohou být i epigenetické změny jako např. methylace DNA či modifikace histonů. Epigenetika představuje pojitko mezi genetickými předpoklady a environmentálními faktory (Ober a Vercelli, 2011). Do jaké míry přispívají epigenetické modifikace k celkové dědičnosti obezity není zatím zcela objasněno. Súdium komplikuje fakt, že epigenetické změny jsou vysoce dynamické a vykazují tkáňovou specifitu (Barros a Offenbacher, 2009). Detailnější obrázek o vlivu epigenetických faktorů na tělesné složení by mohly přinést novodobé technologie, jako je analýza na mikročipech (*micro-arrays*) a možnost celogenomového sekvenování.

V následujícím přehledu jsou blíže popsány kandidátní geny identifikované prostřednictvím GWAS, které mají přímou souvislost se zaměřením dizertační práce. Jedná se o kandidátní geny spojené s chorobami jako je obezita, DM2 nebo syndrom polycystických ovárií (PCOS).

Nejvýznamnější asociace s obezitou byla zjištěna s genem *FTO* (Frayling *et al.*, 2007). O rok později byl zachycen další velmi silný asociační signál blízko genu pro MC4R (Loos *et al.*, 2008). Oba výsledky byly potvrzeny mnoha replikačními studii. Další relativně silné asociace s obezitou, potvrzené nezávislými studii, vykazovaly např. geny *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF* a *SEC16B* (Renström *et al.*, 2009; Holzapfel *et al.*, 2010). Některé z nalezených predisponujících genů mají přímou funkční souvislost s obezitou, jiné jsou přednostně exprimovány v hypothalamu v centrech regulace příjmu potravy, ovšem jejich přesná biologická funkce zatím není jasná a jsou předmětem intenzivního výzkumu.

Gen *FTO* (*fat mass and obesity associated gene*; 16q12.2) je hojně exprimován v rozmanitých lidských tkáních (např. v ostrůvcích pankreatu, kosterním svalu, v játrech a v tukové tkáni), ale nejvyšší hladiny jsou nalézány v jádrech hypothalamu, kde se nachází klíčové regulační centrum energetické homeostázy. Jeho hladina je regulována střídáním stavů hladovění a nasycení (Dina *et al.* 2007, Frayling *et al.* 2007; Gerken *et al.*, 2007). Gen *FTO* kóduje Fe II- a 2-oxoglutarát-dependentní dioxygenázu, která funguje jako katalyzátor demethylace nukleotidových bází (Gerken *et al.*, 2007).

Několik laboratoří nezávisle na sobě detekovalo řadu jednonukleotidových polymorfismů v prvním intronu genu se silným dopadem na adipozitu (Dina *et al.*, 2007; Frayling *et al.*, 2007). Následně byla asociace genu *FTO* s obezitou potvrzena u různých populací po celém světě a byla objevena i spojitost tohoto genu s DM2 (Frayling *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007) a syndromem PCOS (Attaoua *et al.* 2008, Barber *et al.* 2008). Asociace variant v genu pro *FTO* byla dále popsána v souvislosti s cerebrokortikální inzulínovou rezistencí, která se objevuje u obézních jedinců (Tschritter *et al.* 2007). Riziková alela genu *FTO* (rs9939609) vede ke zvýšení BMI o 0,36 kg/m² a představuje zvýšení rizika vzniku obezity o 31 % (odds ratio [OR] 1,31; 95% CI 1,23–1,39) (Frayling *et al.*, 2007).

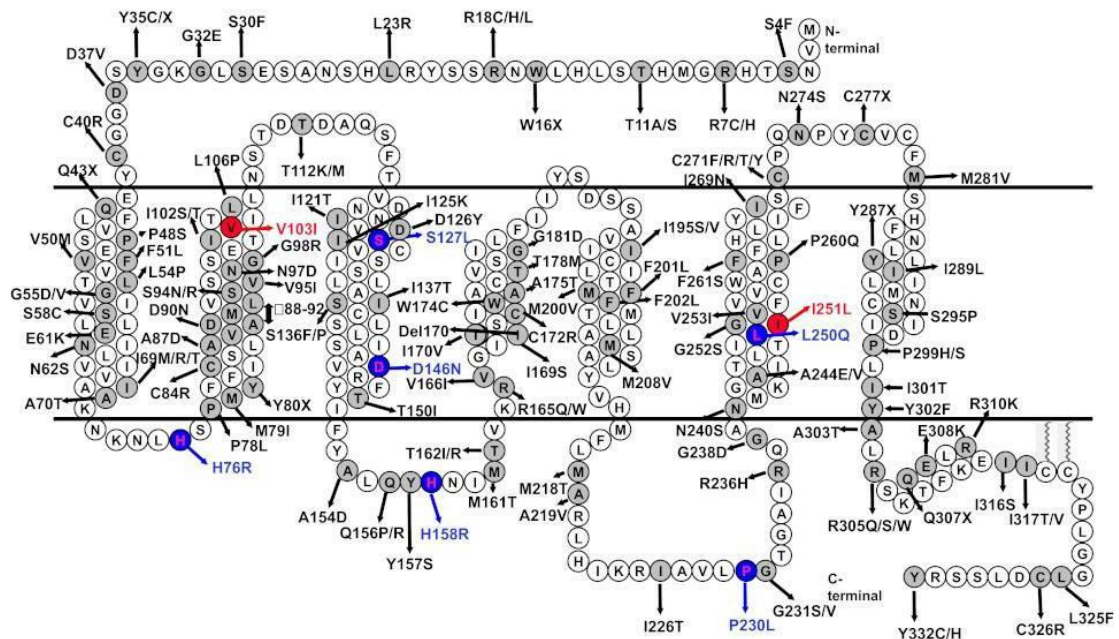
Na krysích modelech byla prokázána interakce genu *FTO* s prostředím ve vztahu k přibývání na váze (Tung *et al.*, 2010). Bylo zjištěno, že exprese a funkční množství proteinu Fto v hypothalamu ovlivňuje chuť k jídlu.

Varianta v genu *FTO* je spojena se zvýšenou či preferenční konzumací vysokoenergetických potravin, především jídel obohacených o nasycené mastné kyseliny (Cecil *et al.*, 2008; Timpson *et al.*, 2008; Bauer *et al.*, 2009). Přibývání na váze je tedy výsledkem potravního chování, které je charakterizováno ztrátou kontroly nad požíváním tučné stravy (den Hoed *et al.*, 2009). Snížené množství funkčního proteinu Fto bylo asociováno se štíhlým fenotypem u myši. Naopak zvýšená exprese tohoto proteinu vede ke zvýšení adipozity, tělesné hmotnosti a glukózové intolerance, vyplývající ze zvýšené konzumace potravin (Church *et al.*, 2010).

Gen **MC4R** (*melanocortin-4 receptor*; 18q21.3) je tvořen jediným exonem (999 bp) (Gantz *et al.*, 1993). V hypothalamu exprimovaný protein, dlouhý 332 aminokyselin, patří do rodiny 7-transmembránových G-proteinů. Tyto receptory aktivují adenylátcyklázu k produkci cyklického adenosinmonofosfátu během signální transdukce (Magenis *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000). MC4R je členem leptin-melanokortinové signalizační dráhy a účastní se regulace příjmu potravy a dlouhodobé energetické homeostázy integrací signálů prostřednictvím svého ligandu, α -melanocyty stimulujícího hormonu (α -MSH) a svého antagonisty, peptidu příbuznému Agouti (AgRP) (Barsch a Schwartz, 2002; Garfield *et al.*, 2009).

První důkazy o spojitosti genu *MC4R* s regulací energetické rovnováhy se objevily v 90. letech (Bultman *et al.*, 1992; Huszar *et al.*, 1997). Ukázalo se, že myši heterozygotní pro gen *MC4R* (*MC4R* +/-) měly ve srovnání s homozygotními (*MC4R* +/+ a *MC4R* -/-) střední hmotnostní přírůstek. To naznačuje kodominantní model dědičnosti pro fenotyp. U *MC4R* -/- byla pozorována hyperfágie a pozměněný energetický výdej charakterizovaný sníženou aktivitou a termogenezí (Butler *et al.* 2001). Podle studie Butlera a Cone (2003) se hyperfágie vyvinula pouze u těch *MC4R* -/- myší, které byly živěny vysokotukovou dietou. To je důkazem interakce genu *MC4R* s potravou, tedy s vlivem prostředí, v souvislosti s přírůstkem hmotnosti.

V roce 1998 dvě skupiny vědců objevily nezávisle na sobě v genu pro MC4R mutaci s posunem čtecího rámce, která vedla ke vzniku extrémní obezity u dětí (Vaisse *et al.*, 1998; Yeo *et al.*, 1998). Od té doby bylo v genu objeveno více než 150 variant ve skupinách pacientů různých etnických původů. Zahrnují 122 variant, které způsobují záměnu aminokyseliny (missense), dvě delece, 7 variant tvořících předčasný terminační kodón (nonsense) a 12 variant s posunem čtecího rámce (frameshift) (**obrázek 5**).



Obrázek 5 – Obrázek znázorňuje nalezené varianty v genu *MC4R* u různých pacientů. Červeně znázorněné polymorfismy působí vůči obezitě protektivně. Modře znázorněné varianty způsobují neustálou aktivaci receptoru, jejímž výsledkem by měl být spíše štíhlý fenotyp. V těchto případech ale AgRP působí jako inverzní agonista receptoru s orexigenním účinkem, schopným potlačit aktivitu *MC4R*, což vede k obezitogennímu efektu. Zdroj: Tao, 2010

Nedostatek funkčního proteinu *MC4R* je nejčastější příčinou monogenní obezity u lidí. Přesný fenotyp definovala prof. I. S. Farooqi v roce 2000: rozvoj obezity před 10. rokem života, zvýšené množství tukové i tukuprosté hmoty, zvýšený lineární růst a zrychlené růstové tempo, zachovalé reprodukční funkce, zvýšená hustota kostních minerálů, dále hyperfágie a hyperinzulinémie, které s věkem klesají (Farooqi a O'Rahilly, 2000 *et al.* 2005). Ve většině případů se dědí autozomálně dominantně s různým stupněm expresivity a penetrance (Dubner *et al.*, 2001; Santini *et al.*, 2004).

Výskyt *MC4R* mutací závisí na etnickém původu. U britských dětí byly mutace nalezeny ve více než 6 % (Farooqi *et al.*, 2003), naopak nejnižší frekvence byla zjištěna u belgických obézních dětí a dospělých (0 %) (Beckers *et al.*, 2006). Mutace genu *MC4R* byly přítomné u 1,9 % německých obézních dětí a adolescentů (Hinney *et al.*, 2003), u 1,8 % finských obézních dětí (Valli-Jaakola *et al.*, 2004), u 4,6 % indiánů kmene Pima (Ma *et al.*, 2004) a u 2,3 % obézních jedinců v Severní Americe (Calton *et al.*, 2009).

Velkou většinu variant v genu *MC4R* nalézáme v heterozygotním stavu, avšak bylo zachyceno i několik jedinců s homozygotní variantou *MC4R*. Dr. Irena Hainerová ve své studii z roku 2007 popisuje hypogonadotropní hypogonadismus u homozygotního nositele mutace Gly181Asp (Hainerova *et al.*, 2007).

U nositelů variantního genu *MC4R* se velmi často vyskytuje neobvyklé potravní chování tzv. „*binge eating*“, které je zodpovědné za zvýšenou hmotnost jedince. Jedná se o konzumaci nepřiměřeně velkého množství jídla v krátkém časovém intervalu bez pocitu hladu a s následným pocitem viny, zahanbením a depresí. Vyskytuje se u 2–10 % neobézních a u 30–90 % obézních jedinců (Branson *et al.*, 2003; Farooqi *et al.*, 2003; Potoczna *et al.*, 2004). Varianty v genu *MC4R* se tak podílejí na regulaci tělesné hmotnosti, a to jak zvýšeným příjmem energie, tak i snížením energetického výdeje (Cai *et al.*, 2006; Cole *et al.*, 2010). Nicméně studie založené na metodách kandidátních genů odhalily také dvě nesynonymní varianty s nízkou frekvencí, které zatím neznámým způsobem podporují rezistenci k obezitě: Ile251Leu snižuje riziko rozvoje obezity o 48 % a Val103Ile snižuje riziko rozvoje obezity o 20 % (Geller *et al.*, 2004; Stutzmann *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010).

Gen *TMEM18* (*transmembrane protein 18*) je lokalizován do oblasti 2p25.3 (Hartz, 2010). Metaanalýza 15 GWAS odhalila asociaci varianty rs6548238 s BMI, přičemž každá alela je zodpovědná za zvýšení hodnoty BMI o 0,26 kg/m² (Willer *et al.*, 2009). *TMEM18* je malá molekula o 140 aminokyselinách, která se váže na specifické sekvence DNA, a tím potlačuje transkripci (Jurvansuu *et al.*, 2011). Podle další studie varianty v tomto genu souvisí s časným rozvojem DM2, nezávisle na BMI (Kalnina *et al.*, 2013).

Gen *SH2B1* (*Src-homology 2 adaptor protein*) je umístěn v oblasti 16p11.2. Existují 4 isofomy proteinu SH2B, které jsou tkáňově specifické a vážou se na tyrozinkinázové domény zahrnuté v inzulinové i leptinové signalizaci. U myši s vyřazeným genem pro SH2B se vyvíjí hyperlipidemie, leptinová rezistence, hyperfágie, hyperglykémie, obezita a glukózová intolerance (Duan *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2007)

Gen *KCTD15* (*potassium channel tetramerization domain-containing protein 15*) leží v oblasti 19q11.13 (Hartz, 2013). Protein KCTD15 inhibuje transkripční faktor TFAP-2 α , který se podílí také na genové expresi při diferenciaci adipocytů (Tsukada *et al.*, 2006) a účastní se formace neurální lišty během embryonálního vývoje (Zarelli a Dawid, 2013).

Gen **PCSK1** (*preprotein convertase, subtilisin/kexin-type 1*) je lokalizován na 5q15 (Seidah *et al.*, 1991). Patří do rodiny serinových endoproteáz, které zpracovávají prekurzorové proteiny na bioaktivní látky. Účastní se například konverze proinzulínu na inzulín a proglukagonu na glukagon v pankreatických β -buňkách (Jansen *et al.*, 1995). Homozygotní mutace Ser307Leu popsaná u několika dětím má za následek těžkou hyperfágií a obezitou (Farooqi *et al.*, 2007). Metaanalýza publikovaná v roce 2014 potvrdila asociaci **PCSK1** s obezitou (Stijnen *et al.*, 2014), především u bělošské populace. Potvrdila také silnější asociaci polymorfismu rs6232 s dětskou obezitou, než s obezitou u dospělých.

Gen **BDNF** (*brain-derived neurotrophic factor*) je lokalizován na 11p14.1 (Zuccato *et al.*, 2001). Secernovaný protein BDNF je zahrnutý v diferenciaci neuronů, podporuje jejich růst a synaptogenezi. Na myších modelech bylo zjištěno, že ovlivňuje také řadu rozmanitých buněk v těle, zahrnutých v glukózovém metabolismu (např. podporuje zvýšení produkce inzulínu v pankreatických β -buňkách, snížení produkce glukózy v hepatocytech a zvýšení inzulinové senzitivity v buňkách kosterního svalu (Yamanaka *et al.*, 2006; Matthews *et al.*, 2009). Deficience BDNF vyvolává hyperfágií a těžkou monogenní obezitou u lidí (Gray *et al.*, 2006). Následná GWAS studie potvrdila souvislost i s běžnou polygenní obezitou (Thorlieffson *et al.*, 2009).

Gen **SEC16B** (*S. Cerevisiae homolog 16B*) leží v oblasti 1q25.2 (Misawa a Yamaguchi, 2001). Produktem genu je savčí homolog kvasinkového Sec16 (*Saccharomyces cerevisiae* 16). Protein je umístěn v membráně endoplasmatického retikula a účastní se transportu proteinů (Bhattacharyya a Glick, 2007). Čínská studie ukázala souvislost genu **SEC16B** s obezitou a preferencí pokrmů u dětí (Lv *et al.*, 2015).

2.5 Léčba obezity

Při léčbě obezity nejde jen o snížení hmotnosti, ale především o zlepšení zdravotního stavu a zkvalitnění života jedince. Léčba obezity vyžaduje komplexní přístup a správně zvolený redukční program. **Konzervativní léčba** zahrnuje doporučení na změnu životosprávy, zejména pokud jde o způsob stravování a pohybový režim. Spolupráce pacienta a jeho motivace ke změně životního stylu je vždy podmínkou úspěšné léčby. Pacient musí být informován, že i mírný pokles tělesné hmotnosti vede ke zlepšení metabolických parametrů. V některých případech je možné léčbu doplnit užíváním léků, viz níže.

Dieta je při léčbě obezity založena na redukci příjmu kalorií pro navození mírné negativní energetické bilance. Samotné nízkoenergetické stravovací programy přinášejí sice krátkodobé úbytky hmotnosti, nicméně udržení takového stavu je z dlouhodobého pohledu náročné (Li *et al.*, 2003). Je důležité, aby doporučení změn životosprávy zahrnovalo nejen správnou dietu, ale i přiměřenou fyzickou aktivitu. **Fyzická aktivita** má v redukčním režimu důležitou roli, především při udržování snížené tělesné hmotnosti. Nejefektivnějším způsobem cvičení je zapojení velkých svalů – tj. rychlá chůze, běhání, cyklistika atd. (Hansen *et al.*, 2007). Úspěšnost udržení hmotnostních úbytků po delší dobu je nízká, pouze 2–20 % (Wing a Phelan, 2005). Dlouhodobé výsledky u morbidně obézních, které byly dosaženy pomocí konzervativní léčby, jsou často nedostatečné. Z farmakologických preparátů je v současné době na evropském trhu dostupný pouze xenical a kombinace bupropion/naltrexon. **Xenical** (Tetrahydrolipstatin, Orlistat, Alli) patří do skupiny blokátorů vstřebávání živin ze zažívacího traktu. Funguje jako inhibitor gastrointestinálních lipáz a je schopen snížit absorpci tuků z potravy až o 30 %. Účinná látka lipstatin je produktem plísně *Streptomyces toxytricini*. Léčba je kombinována s redukční dietou s nižším obsahem tuků. Xenical byl zkoušen v řadě několikaletých studií u tisíců pacientů s velmi dobrými výsledky (Ballinger a Peikin, 2002). Kromě schopnosti snižovat hmotnost má xenical i pozitivní vliv na lipidové spektrum. Snižuje poměr LDL ku HDL cholesterolu, zlepšuje kompenzaci DM2, vede ke snížení inzulinémie a také ke snížení dávek antidiabetik a zlepšení hypertenze. Navíc brání opětovnému navýšení hmotnosti po skončení diety. **Bupropion** je antagonist opioidových receptorů a **naltrexon** je inhibitor zpětného vychytávání dopaminu a norepinefrinu. Jejich kombinace snižuje chuť k jídlu a usnadňuje úbytek hmotnosti. Původně byl přípravek registrován jako antidepresivum a jako podpůrný lék při odvykání kouření (Serretti *et al.*, 2010).

Díky vedlejším účinkům v současnosti dostupných léků není farmakologická léčba obezity vhodná pro všechny pacienty. V případech, kde konzervativní léčba i farmakoterapie selhává, především pak u III. stupně obezity, je možnou volbou bariatrická operace.

2.5.1 Bariatrická chirurgie

Bariatrické operace byly zavedeny za účelem léčby III. a vyšších stupňů obezity. V posledních dvaceti letech se staly jedním z neúspěšnějších léčebných postupů, které poskytují výrazné a dlouhodobé hmotnostní úbytky u naprosté většiny pacientů (Buchwald

et al., 2007). Po bariatrickém zákroku dochází k významnému zlepšení či úplnému vymizení některých chorob přidružených k obezitě, např. DM2, dyslipidémie, hypertenze a kardiovaskulárních onemocnění. U více než 80 % diabetiků 2. typu dochází po bariatrické operaci ke zlepšení či k úplnému vymizení diabetu. Z toho důvodu lze hovořit i o tzv. metabolické chirurgii (Buchwald *et al.*, 2004 *et* 2005). Velikost úbytků hmotnosti je ovšem mezi jedinci velice rozmanitá. Účinek léčby mohou ovlivňovat klinické i genetické faktory.

Základními kritérii pro **indikaci** pacienta k bariatrickému výkonu je neúspěšný pokus o redukci obezity konzervativním způsobem, hodnota BMI nad 40 kg/m² nebo hodnota BMI nad 35 kg/m² u pacientů, kteří trpí i dalšími závažnými komorbiditami souvisejícími s obezitou, a věk mezi 18–65 lety. Na indikačním procesu se spolupodílí celý multidisciplinární tým odborníků včetně obezitologa, psychologa, dietologa, gastroenterologa, diabetologa nebo endokrinologa, internisty, anesteziologa a nutričního poradce. Výběr konkrétního typu operace závisí na hodnotě BMI, věku, pohlaví, distribuci tělesného tuku, přítomnosti DM2 (délka jeho trvání, předoperační koncentrace HbA1c a C-peptidu nalačno, farmakologická léčba), přítomnosti dyslipidémie, snížené inteligenci, ale také na očekávání a reálných cílech pacienta (Fried *et al.*, 2014).

Bariatrické operace můžeme rozdělit do tří základních skupin (Fried *et al.*, 2011):

restrikční zákroky, tj. operace, při nichž se zmenší kapacita žaludku. Příjem i malého množství potravy zaplní zmenšený žaludek a rychle vyvolá pocit sytosti (např. sleeve gastrektomie, gastrická plikace, gastrická bandáž);

malabsorpční zákroky, které vyřadí tenké střevo z procesu trávení, a tak omezí využití přijaté energie z potravy (např. biliopankreatická diverze);

kombinované, které využívají obou výše zmíněných mechanismů (např. Roux-en-Y gastrický bypass).

Laparoskopická adjustabilní gastrická bandáž (LAGB) patří mezi nejjednodušší restriční metody. Dlouhodobé výsledky ukazují velmi nízkou morbiditu a téměř nulovou mortalitu. Výsledná ztráta nadměrné hmotnosti se udává kolem 30 %, ovšem po odstranění bandáže může dojít k opětovnému nárůstu hmotnosti (Snyder *et al.*, 2009; Christou *et al.*, 2009). Principem metody je nasazení bandáže na horní část žaludku, kterou se ze žaludku

oddělí menší proximální vak. Se zbývající větší distální částí žaludku je proximální vak spojen úzkým kanálem. Po příjmu malého množství potravy se vak v proximální části žaludku naplní a pomalu se vyprázdňuje do distální části žaludku přes spojovací kanál. Zmenšený objem horní části žaludku a úzký spojovací kanál způsobují pomalé vyprazdňování a pomáhají tak snižovat celkový denní kalorický příjem. Metoda umožňuje individuální nastavení zaškrcení žaludku tak, aby účinek bandáže byl optimální (**obrázek 6**).



Obrázek 6 – Laparoskopická gastrická bandáž (LAGB) *Zdroj: Fried, 2010*

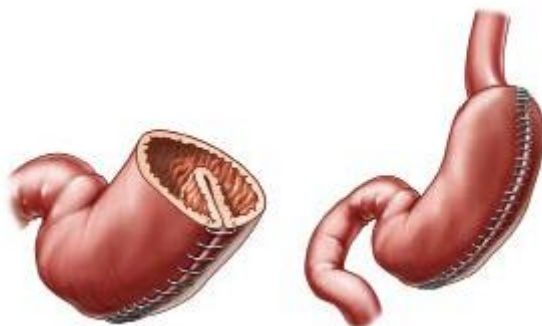
Laparoskopická sleeve gastrektomie (LSG), neboli rukávová resekce žaludku, patří k restriktivním zákrokům. Spočívá ve zmenšení žaludku zhruba o 80 %. Toho je dosaženo nevratným odstraněním části těla a fundu žaludku. Pacient pak není schopen pojmout větší množství potravy a pocit sytosti se dostaví velice brzy. Na redukci hmotnosti se po tomto typu operace podílí kromě změny hladin některých hormonů a inkretinů, které souvisejí s obezitou (Benedix *et al.*, 2011) a zmenšení objemů jednotlivých porcí jídla i výrazně urychlené vyprazdňování tubulizovaného žaludku a zrychlený průchod potravy zažívacím traktem (Melissas *et al.*, 2008). Nevýhodou LSG je, kromě nevratného odstranění podstatné části žaludku, nutnost dodržování dietního omezení, jelikož zmenšená část žaludku se může opět roztahovat (**obrázek 7**).



Obrázek 7 – Laparoskopická sleeve gastrektomie (LSG) *Zdroj: Fried, 2010*

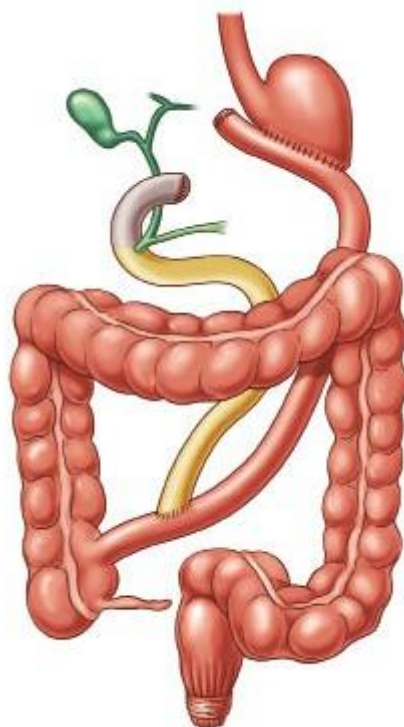
Techniku **laparoskopické gastrické plikace (LGP)** publikoval v roce 2007 Dr. Talebpour (Talebpour *et al.*, 2007). V České republice byla LGP poprvé provedena prof. Friedem a Dr. Doležalovou koncem roku 2009. Jedná se o restriční typ výkonu, při kterém je redukce objemu žaludku dosaženo zanořením velkého zakřivení žaludku do lumen žaludku a podélným sešitím. Tento postup se opakuje až 3x. Délka sešití je asi 20 cm. Začíná těsně pod bránicí, asi 3–5 cm od přechodu jícnu v žaludek a končí 7–9 cm před pylorem. Zanořená tkáň tak ještě více zmenšuje prostor uvnitř žaludku (**obrázek 8**).

LGP je méně radikální než podobný zákrok – tubulizace žaludku (LSG). Obě operace mají srovnatelné výsledky hmotnostních úbytků (Holéczy *et al.*, 2011). Výhodou této techniky je, že není nutná implantace cizorodého materiálu do těla, který by mohl působit dlouhodobá rizika. Je ekonomicky mnohem méně nákladná, co se týče operace i následné ambulantní péče, než ostatní bariatrické operace. Zákrok je velmi dobře snášen a má výrazný supresivní efekt na pocit hladu. Má širší využití u pacientů s nejistou spoluprací (Fried *et al.*, 2011).



Obrázek 8 – Laparoskopická gastrická plikace (LGP) *Zdroj: Fried et al., 2011*

Biliopankreatická diverze (BPD) patří k malabsorpčním typům operací a zároveň je nejradikálnějším chirurgickým výkonem v léčbě těžké obezity. Poprvé byla provedena prof. Scopinarem v roce 1976 (Scopinaro *et al.*, 1976). Principem metody je kombinace resekce žaludku a jejunoileálního bypassu. K trávení dochází ve velmi krátkém úseku distální části tenkého střeva, kde dochází ke smíchání potravy se žlučovými kyselinami a pankreatickými enzymy. Většina živin tak prochází tenkým střevem v neresorbovatelném stavu. Po zákroku dochází k nižšímu vstřebávání proteinů, vitamínů a některých minerálů a proto hrozí riziko vzniku nutričních poruch. Pacienti proto musí být dobře kompenzováni a doživotně užívat doplňky s obsahem vitamínů rozpustných v tucích, vápník a železo (Kasalický *et al.*, 2009). BPD je obecně provázena velkými váhovými úbytky (70–90 % ztráty nadměrné hmotnosti). Je spojena s vyšší možností vzniku závažných až život ohrožujících komplikací, jako je proteinová malnutrice, anastomózy, hypoalbuminémie, edémy a asthenie (Picot *et al.*, 2009) (**obrázek 9**).



Obrázek 9 – Biliopankreatická diverze (BPD) Zdroj: Haluzík a Svačina, 2010

Kritéria pro posouzení účinku bariatrické operace na **optimalizaci metabolického stavu** a některých dalších provázejících onemocnění jsou hodnota HbA1c (hemoglobin A1c) do 42 mmol/mol, nepřítomnost hypoglykémie, koncentrace celkového cholesterolu nižší než 4,0 mmol/l, koncentrace LDL cholesterolu nižší než 2,3 mmol/l, koncentrace triacylglycerolů nižší než 2,2 mmol/l, krevní tlak nižší než 135/85 mmHg, snížení hmotnosti alespoň o 15 % anebo snížení HbA1c alespoň o 20 % při omezení medikace oproti předoperačnímu stavu (Buse *et al.*, 2009).

Kritéria pro posouzení účinku bariatrické operace na remisi DM2 jsou pro **částečnou remisi** – HbA1c vyšší než 42 mmol/mol, ale nižší než 47,5 mmol/mol a glykémie na lačno 5,6-7 mmol/l po dobu nejméně jednoho roku bez farmakoterapie či jiné léčby, pro **kompletní remisi** – HbA1c v normálním rozmezí, tj. nižší než 42 mmol/mol, glykémie na lačno nižší než 5,6 mmol/l po dobu nejméně jednoho roku bez farmakoterapie či jiné léčby, pro **prodlouženou kompletní remisi** – kompletní remise trvající alespoň 5 let (Buse *et al.*, 2009). Míra remise DM2 se v závislosti na typu bariatrického výkonu uvádí v rozmezí 57–95 % (Colquitt *et al.*, 2009).

3 Hypotézy a cíle

3.1 Hypotéza pro první část dizertační práce – genetické pozadí obezity

Genetická analýza polygenního typu obezity je složitější, než je tomu u monogenních chorob. U komplexních onemocnění se nedědí nemoc sama o sobě, ale spíše náchylnost k ní.

Závažným problémem je jen kusá znalost patofyziologie a patobiochemie. Je zřejmé, že ke stejnému patologickému fenotypu vede několik různých biochemických cest. Dalším úskalím je i nepřeberné množství kandidátních genů, které se potenciálně mohou uplatňovat v rozvoji onemocnění.

Monogenní formy obezity jsou z hlediska celkové prevalence obezity minoritní, nicméně možnost cílené účinné léčby těchto pacientů je obrovským přínosem a podněcuje vývoj podobných typů terapie i u běžné formy obezity.

Recentní publikace založené na celogenomových asociačních studiích (GWAS) ukázaly asociaci mnoha genetických variant s běžnou polygenně podmíněnou obezitou. Hypotézou předkládané dizertační práce je, že efekt těchto genetických variant se promítá do energetických drah a hormonálních charakteristik i zatím neobézních osob a predisponuje je k rozvoji obezity v budoucnosti. Testovali jsme proto metabolické a hormonální efekty běžných obezitogénů u vzorku adolescentní populace i u dospělé populace s různou úrovní inzulínové senzitivity a variabilní tělesnou hmotností.

1. Zjistit metabolické efekty genetické varianty rs12970134 v genu *MC4R*, především v souvislosti s parametry glukózového metabolismu a inzulínové senzitivity v souboru žen s různou glukózovou tolerancí (ženy se syndromem polycystických ovárií, ženy s gestačním diabetem v anamnéze, ženy s diagnózou diabetes mellitus 2. typu) a v souboru zdravých normoglykemických kontrol.

Publikace: BRADNOVÁ O, VEJRAŽKOVÁ D, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, STANICKÁ S, DVOŘÁKOVÁ K, BENDLOVÁ B. Metabolic and hormonal consequences of the "obesity risk" MC4R variant (rs12970134) in Czech women. *Physiol Res.* 2015; **64**(2): 187-95. IF=1,293

2. Zjistit zda a jaký mají vliv genetické varianty rs1421085, rs1121980, rs17817449, rs9939609 v genu *FTO*, které jsou prezentovány jako rizikové pro obezitu, na antropometrické, metabolické a hormonální parametry u štíhlých jedinců.

Publikace: LUKÁŠOVÁ P, VAŇKOVÁ M, VČELÁK J, VEJRAŽKOVÁ D, BRADNOVÁ O, STANICKÁ S, HAINER V, BENDLOVÁ B. Fat mass and obesity associated gene variants are associated with increased growth hormone levels and affect glucose and lipid metabolism in lean women. *Physiol Res.* 2015; **64**(2): 177-85. IF=1,293

3. Zjistit vliv genetických variant kandidátních genů pro obezitu *TMEM18* (rs7561317), *SH2B1* (rs7498665), *KCTD15* (rs29941), *PCSK1*(rs6232, rs6235), *BDNF* (rs925946, rs4923461), *SEC16B* (rs10913469), *MC4R* (rs12970134, rs17782313) a *FTO* (rs9939609) na antropometrické parametry a parametry metabolického syndromu u českých adolescentů s variabilní tělesnou hmotností (podváha, normální váha, nadváha a obezita).

Publikace: DUŠÁTKOVÁ L, ZAMRAZILOVÁ H, SEDLÁČKOVÁ B, VČELÁK J, HLAVATÝ P, ALDHOON HAINEROVÁ I, KORENKOVÁ V, BRADNOVÁ O, BENDLOVÁ B, KUNEŠOVÁ M, HAINER V. Association of obesity susceptibility gene variants with metabolic syndrome and related traits in 1,443 Czech adolescents. *Folia Biol (Praha).* 2013; **59**(3): 123-33. IF=1,000

3.2 Hypotéza pro druhou část dizertační práce – metabolické a hormonální změny u pacientů po bariatrické operaci

Při léčbě obezity nejde jen o snížení hmotnosti, ale především o zlepšení zdravotního stavu a zlepšení kvality života obézního pacienta. Léčba obezity je komplexní proces, který zahrnuje individuální přístup, vytvoření vhodného léčebného programu a volbu léčebných metod.

Konzervativní léčba se skládá ze stravovacích, pohybových rad a doporučení na změnu životosprávy. Možnost farmakologické léčby je v současnosti omezená.

U pacientů s morbidní obezitou konzervativní léčba často nestačí a právě v těchto případech lze obezitu léčit chirurgicky. Bariatrická léčba obezity může přinést trvalé řešení, významně pomáhá léčit diabetes 2. typu a významně snižuje kardiovaskulární riziko. Prvotní cíl bariatrické chirurgie je tedy snížení zdravotních rizik těžké obezity.

Otázky, které je třeba ještě zodpovědět v souvislosti s úspěchy bariatrické chirurgie, jsou především metabolické a hormonální dopady jednotlivých typů operací na výsledný stav pacienta a dlouhodobé důsledky této léčby.

4. Zjistit vliv nového typu bariatrické operace, laparoskopické gastrické plikace, na glukózový metabolismus a na hladiny inkretinů a gastrointestinálních hormonů u morbidně obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu.

Publikace: BRADNOVÁ O, KYROU I, HAINER V, VČELÁK J, HÁLKOVÁ T, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, MCTERNAN P, KUMAR S, HILL M, KUNEŠOVÁ M, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J. Laparoscopic greater curvature plication in morbidly obese women with type 2 diabetes: effects on glucose homeostasis, postprandial triglyceridemia and selected gut hormones. *Obes Surg.* 2014, **24**(5): 718-26. IF = 3,747

5. Zjistit vliv bariatrických operací na složení mastných kyselin v tukové tkáni u morbidně obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu.

Publikace: KUNEŠOVÁ M, SEDLÁČKOVÁ B, BRADNOVÁ O, TVRZICKÁ E, STAŇKOVÁ B, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, KALOUSKOVÁ P, HLAVATÝ P, HILL M, BENDLOVÁ B, FRIED M, HAINER V, VRBÍKOVÁ J. Fatty acid composition of adipose tissue triglycerides in obese diabetic women after bariatric surgery: a 2-year follow up. *Physiol Res.* 2015; **64**(2): 155-66. IF = 1,293

4 Soubory a metody

4.1 Soubory

Díky projektům zaměřeným na výzkum genetického pozadí polygenních onemocnění, včetně obezity, byly v Endokrinologickém ústavu již dříve shromážděny rozsáhlé soubory osob s různým rizikem DM2 nebo glukózové intolerance obecně.

Pro zachování kompatibility nashromážděných anamnestických a metabolicko-biochemických parametrů byla v maximální možné míře zachována kontinuita analytických metod.

Protokoly všech studií byly schváleny Etickou komisí Endokrinologického ústavu, stejně jako informovaný souhlas s účastí ve studiích, včetně genetického vyšetření. Každý účastník studie byl vždy lékařem podrobně informován o účelu studie, o průběhu vyšetření, s obsahem dotazníků, s průběhem antropometrického měření a odběrem krve ke genetickému vyšetření. Účastníci byli poučeni o tom, že osobní i anamnestická data nebudou poskytnuta další osobě, že data budou statisticky vyhodnocována a publikována v odborném tisku bez uvedení osobních údajů a budou použita pouze k výzkumným účelům. Účastníci byli informováni o možnosti kdykoliv ze studie vystoupit bez udání důvodu. Souhlas s účastí ve studii stvrdili účastníci podpisem (v případě dětí jejich zákonní zástupci).

Všichni účastníci studie se podrobili bazálnímu vyšetření biochemických a hormonálních parametrů, antropometrickému měření zaměřenému na stanovení tělesného složení a vyplnili dotazníky sledující osobní, rodinnou, případně gynekologickou anamnézu, standardizované dotazníky hodnotící skóre deprese nebo kvalitu života, dotazník jídelních zvyklostí a dotazník hodnotící pohybovou aktivitu.

Endokrinologický ústav v Praze zajistil kompletizaci a velmi podrobnou fenotypickou charakterizaci sledovaných souborů dospělých jedinců. Provádělo se zde biochemické a antropometrické vyšetřování zdravých normoglykemických kontrol, potomků pacientů s DM2, žen s gestačním diabetem a žen se syndromem polycystických ovárií v osobní anamnéze a dalších osob s různou glukózovou tolerancí.

Studie Endokrinologického ústavu **COPAT** (Childhood Obesity, Prevalence And Treatment) probíhala po celém území České republiky a zabývala se problematikou obezity a jejích zdravotních komplikací u dětí a adolescentů ve věku 13–18 let. Dílčí

studie, která je součástí dizertační práce, byla provedena na souboru adolescentů shromážděných v této studii.

Bariatrické operace byly provedeny na **OB klinice a.s.** u souboru vybraných extrémně obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu a odběr tukové tkáně byl proveden tamtéž. Opakované sledování a vyšetřování těchto pacientek probíhalo v Endokrinologickém ústavu v Praze.

Charakteristiky a výběrová kritéria pro konkrétní soubory jsou podrobně popsány v jednotlivých studiích.

4.2 Metody

Antropometrické vyšetření

Antropometrické vyšetření zahrnovalo základní parametry: tělesnou hmotnost a výšku, obvodové rozměry (obvod pasu, břicha, gluteální obvod) a kožní řasy (suprailiackální, subskapulární, nad bicepsem, nad tricepsem). Pro hodnocení tělesného složení byly vypočítány indexy BMI (*body mass index*), WHR (*waist to hip ratio*) a BAI (*body adiposity index*) a dále provedena bioimpedanční analýza (TANITA BC 418 MA, Tokyo, Japan) a u bariatrické studie navíc duální rentgenová absorpciometrie (DEXA – *Dual Energy X-Ray Absorptiometry*). V bariatrické studii bylo vypočítáno procento úbytku nadměrné hmotnosti (% EWL – *excess weight loss*) a procento úbytku BMI (% EBL – *excess BMI loss*).

Podváha, normální hmotnost, nadváha a obezity byly u dětí a adolescentů definovány dle percentilů BMI odvozených z českých národních referenčních dat (Kobzová *et al.*, 2004). U této věkové kategorie bylo hodnoceno standardní skóre deviace (SDS).

Konkrétní použité antropometrické metody jsou podrobně popsány v jednotlivých studiích.

Biochemické analýzy

Po 10–12 hodinovém lačnění byly účastníkům studií odebrány vzorky periferní žilní krve nebo byl proveden některý z funkčních testů. Stanoveny byly následující parametry uvedené v tabulce 2.

U vybraných hormonů, např. adipokinů nebo gastrointestinálních hormonů byla použita multiplexová metoda stanovení, která umožňuje analyzovat najednou více analytů. Principem je vazba specifické protilátky opatřené fluorescenční značkou na magnetické

kuličky. Stanovení jsou prováděna přístrojem Luminex 200™ System (Luminex Corporation, Texas, USA).

Konkrétní použité biochemické metody jsou podrobně popsány v jednotlivých studiích.

Tabulka 2 – Stanovované biochemické parametry (abecedně)

Parametr	Jednotky	Metoda stanovení
Androstendion	nmol/l	RIA, vlastní metoda
Celkový cholesterol	mmol/l	Absorpční spektrofotometrie CHOD – PAP, Cobas Integra, Roche Diagnostics
C-peptid	nmol/l	ECLIA, Cobas Integra, Roche Diagnostics
Glykémie	mmol/l	Absorpční spektrofotometrie-UV – hexokinázová metoda, Cobas Integra, Roche Diagnostics
Glykovaný hemoglobin	mmol/mol	Imunoturbidimetrie, Cobas Integra, Roche Diagnostics
Glukagon	pmol/l	RIA, Euria-Glucagon EuroDiagnostica
HDL cholesterol	mmol/l	Homogenní enzymatická kolorimetrická metoda, Cobas Integra, Roche Diagnostics
IGFI	ng/ml	IRMA, Immunotech
Inzulín	mIU/l	ECLIA, Cobas Integra, Roche Diagnostics
Kortizol	nmol/l	RIA, vlastní metoda
LDL cholesterol	mmol/l	celkový cholesterol - (triacylglyceroly/2,2) – HDL cholesterol
Leptin	ng/ml	RIA, DRG Instruments GmbH
Proinzulín	pmol/l	ELISA, DRG Instruments GmbH

Růstový hormon (STH)	mIU/l	IRMA, Immunotech
SHBG	nmol/l	IRMA, Immunotech
Testosteron	nmol/l	RIA, vlastní metoda
Triacylglyceroly	mmol/l	Enzymatický kolorimetrický test s LPL, Cobas Integra, Roche Diagnostics
TSH	mIU/l	ECLIA, Cobas Integra, Roche Diagnostics
Volný trijodtyronin (fT3)	pmol/l	ECLIA, Cobas Integra, Roche Diagnostics
Volný tyroxin (fT4)	pmol/l	ECLIA, Cobas Integra, Roche Diagnostics

Funkční testy

Lidský organismus disponuje mnoha kompenzačními mechanismy, které jsou schopny zajistit rovnováhu vnitřního prostředí za klidových podmínek i při poruchách jednotlivých složek regulačního systému. Funkční a dynamické testy v endokrinologii slouží k tomu, aby dosud kompenzovaná porucha byla odhalena v časných fázích vývoje.

Orální glukózový toleranční test (OGTT) – slouží k odкрыtí manifestního diabetu mellitu 2. typu nebo porušené glukózové tolerance. Tento test ukazuje reakci organismu na podání 75 g glukózy *per os* a hodnotí, zda je organismus schopen po zátěži glukózou udržet její hladinu v krvi v normálním rozmezí.

Mixed-meal tolerance test (MMTT) – je obdobou OGTT, ale místo glukózy je pacientům podáván proteinový nápoj s přesně definovaným obsahem živin.

Euglykemický hyperinzulinemický clamp – je metoda používaná v diabetologii k vyšetřování účinnosti inzulínu *in vivo*. Vzhledem k náročnosti provedení testu je používán především ve výzkumu. Při standardně navozené hyperinzulinémii se hodnotí množství glukózy spotřebované k udržení glykémie na požadované hodnotě.

Indexy inzulínové rezistence, resp. senzitivity, a funkce β -buněk – byly vypočítány z lačných hodnot (HOMA-IR a Quicki pro inzulínovou rezistenci, resp. senzitivitu;

HOMA-F pro sekreci inzulínu) i z glukózou stimulovaných hodnot OGTT (Cederholmův index a Matsudův index pro inzulínovou senzitivitu, inzulínogenní index pro sekreci inzulínu).

Stanovení mastných kyselin v tukové tkáni extrémně obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu

Subkutánní tuková tkáň byla poprvé odebrána při operaci na OB klinice a následná excize tukové tkáně po šesti měsících od operace byla provedena tamtéž. Po dvou letech byla provedena biopsie tenkou jehlou v Endokrinologickém ústavu. Spektrum mastných kyselin (tabulka 3) bylo stanoveno metodou plynové chromatografie (Trace GC/AS 2000 autosampler, Thermo Finnigan, USA) na IV. interní klinice 1. lékařské fakulty UK.

Tabulka 3 Spektrum stanovených mastných kyselin

Zkratka	Název
Nasyčené mastné kyseliny SFA [$\mu\text{mol/l}$]	
12:0	laurová
14:0	myristová
16:0	palmitová
18:0	stearová
20:0	arachidová
Monoenové mastné kyseliny MUFA [$\mu\text{mol/l}$]	
14:1(n-5)	myristolová
16:1(n-9)	palmitolejová (n-9)
16:1(n-7)	palmitolejová (n-7)
18:1t	transelaidová
18:1(n-9)	olejová

18:1(n-7)	vakcenová
20:1(n-9)	eikosanová
Polyenové mastné kyseliny PUFA [$\mu\text{mol/l}$]	
18:2(n-6)	linoleová
18:3(n-3)	α -linoleová
18:3(n-6)	γ -linoleová
20:2(n-6)	eikosadienová
20:3(n-6)	homo- γ -linoleová
20:4(n-6)	arachidonová
20:5(n-3)	eikosapentaenová (EPA)
22:5(n-3)	dokosapentaenová (DPA), ω 3
22:5(n-6)	dokosapentaenová (DPA), ω 6
22:6(n-3)	dokosaheptaenová (DHA)

Genetická analýza

Genomická DNA byla izolována z leukocytů nesrážlivé periferní krve použitím kitu QuickGene Whole Blood kit L (Kurabo Industries Ltd., Japan) a přístroje QuickGene 610L (FujiFilm, Life Science, Japan). Po změření koncentrace a ověření čistoty (poměr absorbancí DNA 260 nm/proteiny 280 nm) byly roztoky DNA naředěny na pracovní koncentraci 10 ng/ μl v TE pufru a použity pro následné PCR amplifikace.

Genotypizace byla provedena pomocí specificky značených sond *TaqMan genotyping assays* (Life Technologies, Waltham, MA, USA) na přístroji Real-time PCR (LightCycler 480TM, Roche, Mannheim, Německo), který umožňuje kromě kvantitativní PCR i genotypizaci polymorfismů.

Konkrétní studované genetické varianty kandidátních genů jsou uvedeny v jednotlivých studiích.

Statistická analýza

Interaktivní statistické analýzy byly konzultovány se statistikem Endokrinologického ústavu. Konkrétní metody statistické analýzy jsou vždy zmíněny u jednotlivých dílčích studií.

K vyhodnocení frekvenčního zastoupení alel u stanovených polymorfismů byly sestrojeny frekvenční tabulky testované χ^2 -kvadrát testem nebo Fisherovým exaktním testem. Těmito testy byla ověřena i Hardy-Weinbergova rovnováha.

Rozdíly v biochemických a antropometrických údajích mezi skupinami byly z důvodu nenormálního rozložení dat porovnávány pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu. V případech, kdy charakter hodnocených parametrů vyžadoval adjustace dat například na věk, pohlaví, BMI či délku trvání DM2, byla distribuce dat normalizována (logaritmičká či mocninná transformace) a vlastní testování bylo provedeno metodou analýzy kovariance (ANCOVA).

Pokud byly použity jiné metody statistické analýzy, je to zmíněno v jednotlivých dílčích studií.

Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí programů: NCSS 2004 (Statistical Solutions, Saugus, MA, USA) a Statgraphics Centurion version XVI Statpoint (Herndon, MD, USA).

5 Výsledky

5.1 Vliv varianty rs12970134 v blízkosti genu *MC4R* na metabolické a hormonální parametry sledované v souvislosti s obezitou

BRADNOVÁ O, VEJRAŽKOVÁ D, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, STANICKÁ S, DVOŘÁKOVÁ K, BENDLOVÁ B. *Physiol Res.* 2015; **64**(2):187-95. IF=1,293

Mutace v genu pro *MC4R* jsou nejčastější příčinou monogenní formy obezity. Nicméně vliv varianty rs12970134 (A/G) byl popsán v souvislosti s běžnou obezitou a s inzulínovou rezistencí, výsledky studií jsou však nekonzistentní a komplexní metabolicko-hormonální analýza vlivu této varianty nebyla u lidí provedena. Cílem studie bylo zjistit asociaci varianty rs12970134 v genu *MC4R* s obezitou, dále s hladinami vybraných hormonů a s parametry glukózového metabolismu ve skupině žen s různou glukózovou tolerancí a tělesným složením. Náš soubor zahrnoval 850 normoglykemických žen (věk: 30,4 [LCL: 29,6; UCL: 31,3] let; BMI: 22,8 [22,5; 23,3] kg/m²), 423 žen s diagnózou syndromu polycystických ovárií (PCOS) (věk: 27,6 [26,7; 28,2] let; BMI: 25,4 [24,7; 26,1] kg/m²), 402 žen s diagnózou gestačního diabetu v anamnéze (věk: 33,4 [32,9; 33,8] let; BMI: 23,1 [22,5; 23,6] kg/m²) a 250 žen s diabetem 2. typu (DM2) (věk: 60,6 [59,8; 61,5] let; BMI: 31,1 [30,5; 32,9] kg/m²).

Asociaci studované varianty rs12970134 s obezitou jsme ve skupině normoglykemických žen nepotvrdili. Nicméně z dotazníkových dat vyplynulo, že nositelky alely A měly vyšší maximální i minimální tělesnou hmotnost dosaženou v dospělosti oproti ženám s genotypem GG ($p = 0,04$; resp. $p = 0,03$). Ve skupině žen s PCOS jsme však zjistili vliv variantní alely A na vyšší hodnotu obvodu pasu ($p = 0,049$), gluteálního obvodu ($p = 0,01$) a indexu tukové hmoty (BAI; $p = 0,01$). U normoglykemických nositelek alely A jsme pozorovali nižší hladinou glykémie ($p = 0,001$), inzulínu ($p = 0,005$) a C-peptidu ($p = 0,04$) na lačno a s nižší hodnotou indexu HOMA-IR ($p = 0,002$) oproti nositelkám GG genotypu. U normoglykemických nositelek alely A byla dále zjištěna vyšší hladina růstového hormonu ($p = 0,002$), leptinu ($p = 0,04$) a nižší hladiny volného trijodtyroninu ($p = 0,002$) ve srovnání s nositelkami genotypu GG. V podskupině žen, které neužívaly kontraceptiva, měly nositelky alely A nižší hladiny plazmatického testosteronu ($p = 0,04$) a androstendionu ($p = 0,03$) a vyšší hladinu SHBG ($p = 0,002$).

Naše studie naznačuje, že variabilita genu *MC4R* se uplatňuje nejen v regulaci energetického metabolismu, ale i v komplexnějších hypothalamických regulacích.

V této studii jsem se podílela asistencí při OGTT, účastníky studie jsem antropologicky měřila a zajišťovala preanalytickou fázi sbíraných vzorků, provedla jsem genetickou analýzu, statisticky vyhodnotila data a sepsala rukopis.

Metabolic and Hormonal Consequences of the „Obesity Risk“ MC4R Variant (rs12970134) in Czech Women

O. BRADNOVÁ^{1,2}, D. VEJRAŽKOVÁ¹, M. VAŇKOVÁ¹, P. LUKÁŠOVÁ¹, J. VČELÁK¹, S. STANICKÁ¹, K. DVOŘÁKOVÁ¹, B. BENDLOVÁ¹

¹Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic, ²Department of Anthropology and Human Genetics, Faculty of Natural Science, Charles University, Prague, Czech Republic

Received July 2, 2015

Accepted July 16, 2015

Summary

Although the mutations in *MC4R* gene became known as the most common genetic cause of human obesity, the effect of rs12970134 A/G near *MC4R* gene on insulin resistance has been described. The aim of this study was to determine the effect of rs12970134 on obesity, hormone levels, and glucose metabolism in a cohort of women varying in glucose tolerance: 850 normoglycemic women, 423 diagnosed with polycystic ovary syndrome (PCOS), 402 gestational diabetics (GDM), and 250 type 2 diabetic (T2D) women. We did not confirm the explicit effect of rs12970134 on obesity. However, the influence of the A-allele on body adiposity index was observed in a cohort of women diagnosed with PCOS. In normoglycemic women, the A-allele carriership was associated with lower fasting levels of glucose, insulin, C-peptide, and index of insulin resistance. Furthermore, higher levels of growth hormone, leptin and SHBG, and lower levels of FT3, testosterone, and androstenedione were recorded in normoglycemic A-allele carriers. In conclusion, the study presents the evidence of the impact of rs12970134 on complex hypothalamic regulations.

Key words

MC4R variant (rs12970134) • Obesity • Glucose metabolism • Leptin • Growth hormone • Thyroid hormones

Corresponding author

O. Bradnová, Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Narodni 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. Fax: +420 224 905 325. E-mail: obradnova@endo.cz

Introduction

The *MC4R* (melanocortin-4 receptor) gene, encoding G-protein-coupled, seven-transmembrane receptor, is expressed predominantly in the brain. *MC4R* was the first locus described in association with dominantly inherited morbid human obesity and was the most common genetic cause of human obesity described before the era of genome wide association studies (Grant *et al.* 2009).

The melanocortins are involved in a variety of physiological processes, including pigmentation, steroidogenesis – especially glucocorticoid production, exocrine secretion, sexual function, analgesia, inflammation, immunomodulation or cardiovascular regulation. They have also important functions in the central and peripheral nervous systems including the regulation of energy homeostasis and body weight through its role in appetite and energy expenditure *via* leptin, ghrelin and agouti related protein, a potent endogenous antagonist of MC4R (Huszar *et al.* 1997, Yang *et al.* 1999).

The genetic defects of various steps of melanocortin signaling were studied very intensively and the five-year evidence, supporting their role in the control of appetite and body weight in humans, was summarized by O’Rahilly’s group (Yeo *et al.* 2000).

Human monogenic forms of obesity are linked to mutations in genes involved in the leptin/melanocortin axis. Homozygous mutations of leptin and leptin receptor gene causing hyperphagia and a severe early onset obesity associated with pituitary dysfunction were published (Farooqi *et al.* 2002,

Clement *et al.* 1998) as well as a phenotype of patient with complete absence of MC4R activity (Lubrano-Bertheliet *et al.* 2004). Heterozygous mutations in *MC4R* are found in 2-6 % of severe obesity cases and they represent the most frequent genetic cause of human severe obesity (Vaisse *et al.* 2000, Dubern *et al.* 2001, Farooqi *et al.* 2003, Yeo *et al.* 2003, Hinney *et al.* 2003, Hainerová *et al.* 2007, Calton *et al.* 2009). However, the functional analysis of the mutant *MC4R* indicates that the receptor defects range from loss of function to constitutive activation and that the expressivity of MC4R-associated obesity is very variable (Vaisse *et al.* 2000).

Although previous studies have reported several rare *MC4R* mutations in the development of extreme and early-onset obesity, recent publications based on the genome-wide association studies (GWAS) have identified several common genetic polymorphisms near *MC4R* gene contributing to the common obesity (Loos *et al.* 2008, Chambers *et al.* 2008, Thorliefsson *et al.* 2009). Among these variants, the rs17782313 and rs12970134 were studied most often. However, the results have been inconsistent, esp. among East Asians and Africans. Although majority of studies showed significant association with obesity-related traits, several studies revealed non-significant association (Sherag *et al.* 2010, Xi *et al.* 2012a, Bazzi *et al.* 2014, Albuquerque *et al.* 2014, Fernandez *et al.* 2015).

Unclear remains also an influence of genetic variants of *MC4R* on glucose metabolism. Although an association of rs12970134 *MC4R* variant with insulin resistance was published (Chambers *et al.* 2008), it was not confirmed by other studies (Zobel *et al.* 2009, Kring *et al.* 2010, Bazzi *et al.* 2014).

We aimed to determine the prevalence of rs12970134 polymorphism in groups of thoroughly characterized Czech adult women differing in glucose tolerance and to study wide range of the anthropometric and metabolic consequences of the minor A-allele, with a special attention focused on glucose metabolism and insulin sensitivity.

Methods

Study subjects

The influence of the MC4R variant rs12970134 on anthropometric and biochemical parameters was evaluated in 850 women with normal glucose tolerance (median and upper and lower confidence limit of age was

30.4 [29.6; 31.3] years, BMI 22.8 [22.5; 23.3] kg/m², minimum: 16 kg/m²; maximum: 49.3 kg/m²).

To evaluate the influence of the SNP in women varying in glucose tolerance, it was assessed also in a group of 423 women (age: 27.6 [26.7; 28.2] years; BMI: 25.4 [24.7; 26.1] kg/m²) diagnosed with polycystic ovary syndrome (PCOS), disorder characterized by impaired glucose tolerance, in 402 women with a positive history of gestational diabetes mellitus (GDM) (age: 33.4 [32.9; 33.8] years; BMI: 23.1 [22.5; 23.6] kg/m²), and in 250 women diagnosed with type 2 diabetes mellitus (T2D) (age: 60.6 [59.8; 61.5] years; BMI: 31.1 [30.5; 32.9] kg/m²).

Anthropometric and biochemical characterization

Body weight, height, waist, abdominal and gluteal circumferences were measured. Anthropometric indices were calculated: body mass index (BMI)=weight [kg]/height [m]², waist-to-hip ratio (WHR) and body adiposity index (BAI)=(hip circumference [cm])/((height [m])^{1.5} - 18).

Oral glucose tolerance test (oGTT) with 75 g of glucose was performed in each woman except T2D group. Blood samples were taken before the beginning of the oGTT and then every 30 min during a period of 3 h. In this time points, glycemia, insulinemia, and C-peptide were evaluated. Furthermore, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, triacylglycerols and glycated hemoglobine (HbA1c) were assessed [Cobas 6000, Roche Diagnostics]. Fasting levels of leptin [RIA; DRG], growth hormone, sex-hormone binding globuline (SHBG), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) [IRMA; Beckman Coulter], glucagon [RIA; Eurodiagnostica], free triiodothyronine (fT3), free thyroxine (fT4), thyroid-stimulating hormone (TSH) [Cobas 6000; Roche Diagnostics], cortisol, testosterone and androstenedione [RIA; Beckman Coulter] were also measured.

Indices of glucose homeostasis (HOMAR= $I_0 \times G_0 / 22.5$; Quicki= $1 / (\log(\text{fasting insulin } \mu\text{U/ml}) + \log(\text{fasting glucose mg/dl}))$; HOMA $\beta = 20 \times I_0 / (G_0 - 3.5)$; insulinogenic index= $(I_{30} - I_0) / (G_{30} - G_0)$; Cederholm= $[75000 + (G_0 - G_{120}) \times 1,15 \times 180 \times 0,19 \times \text{weight}] / [120 \times G_{\text{mean}} \times \log(I_{\text{mean}})]$; Matsuda= $10^4 / \sqrt{(I_{\text{mean}} \times G_{\text{mean}} \times G_0 \times I_0)}$) and areas under curves (AUCs) of blood glucose, insulin, and C-peptide were calculated.

All women signed informed consent approved by Ethics Committee of the Institute of Endocrinology.

Genetic analysis

DNA was isolated from the peripheral blood using automatic device QuickGene 610L (FujiFilm Life Science, Japan) and commercial kit (QuickGene Whole Blood kit L, Kurabo Industries Ltd., Japan). Endpoint genotyping of the polymorphism rs12970134 near MC4R

was performed using TaqMan assays (Applied Biosystems, LightCycler 480 System, Roche).

Statistical analysis

For the comparison of the genotypic frequencies between the groups, a chi-square test was used. For the

Table 1. Associations of rs12970134 with anthropometric parameters in normoglycemic, PCOS, GDM and T2D women.

Normoglycemic (n=850)	GG (n=468)	AA+AG (n=382)	p
<i>Age (years)</i>	28.9(28.2;30.0)	29.6(28.3;30.5)	0.15
<i>Height (cm)</i>	168(167;168)	168(167;169)	0.38
<i>Abdominal circumference (cm)</i>	82.5(81.3;84.1)	81.5(80.2;83)	0.21
<i>Waist circumference (cm)</i>	75(74;76)	74(73;76)	0.51
<i>Gluteal circumference (cm)</i>	100(99;101)	100(99;101)	0.92
<i>BMI (kg/m²)</i>	23.1(22.5;23.5)	22.6 (22.3;23.3)	0.3
<i>BAI</i>	27.4(26.9;27.9)	27.4(26.8;28.1)	0.93
<i>WHR</i>	0.84(0.83;0.84)	0.83(0.81;0.84)	0.29
PCOS (n=423)	GG (n=253)	AA+AG (n=170)	p
<i>Age (years)</i>	27.0(26.2;28.3)	27.5(26.0;28.3)	0.69
<i>Height (cm)</i>	168(167;169)	167(166;169)	0.38
<i>Abdominal circumference (cm)</i>	87(84;89)	91(86;98)	0.07
<i>Waist circumference (cm)</i>	79(76;80)	84(80;88)	0.049
<i>Gluteal circumference (cm)</i>	101(100;103)	106(104;110)	0.01
<i>BMI (kg/m²)</i>	25.2(24.1;26.1)	26(24.7;28.1)	0.09
<i>BAI</i>	28.5(27.5;29.6)	31.1(29.4;33.0)	0.01
<i>WHR</i>	0.76(0.76;0.77)	0.79(0.76;0.81)	0.16
GDM (n=402)	GG (n=211)	AA+AG (n=191)	p
<i>Age (years)</i>	32.9(32;33.7)	33.3(32.3;34)	0.29
<i>Height (cm)</i>	167(166;168)	168(167;168)	0.91
<i>Abdominal circumference (cm)</i>	85(82.4;87.1)	85.4(83;88)	0.88
<i>Waist circumference (cm)</i>	75(74;77)	76(75;79)	0.65
<i>Gluteal circumference (cm)</i>	98(97;101)	98(97;101)	0.76
<i>BMI (kg/m²)</i>	23(22.4;23.8)	23.4(22.3;24.3)	0.49
<i>BAI</i>	27.4(26.8;28.6)	27.8(26.6;28.9)	0.66
<i>WHR</i>	0.77(0.76;0.79)	0.78(0.77;0.79)	0.55
T2D (n=250)	GG (n=120)	AA+AG (n=130)	p
<i>Age (years)</i>	60.6(59.1;62.2)	59.1(57.3;61.0)	0.58
<i>Height (cm)</i>	162(160;164)	160(159;162)	0.07
<i>Abdominal circumference (cm)</i>	108(102;111)	106(98;109)	0.72
<i>Waist circumference (cm)</i>	101(97;104)	100(99;104)	0.46
<i>Gluteal circumference (cm)</i>	113(111;116)	116(112;117)	0.74
<i>BMI (kg/m²)</i>	31.2(29.8;33.2)	31.3(30.5;32.4)	0.71
<i>BAI</i>	36.4(35.8;38.1)	37.8(37.1;39.3)	0.08
<i>WHR</i>	0.87(0.86;0.89)	0.87(0.86;0.89)	0.74

Levels are presented as a median (95 % LCL; 95 % UCL); Mann-Whitney test.

evaluation of the differences in anthropometric and biochemical parameters, a robust non-parametric Mann-Whitney test was used (NCSS, 2004). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

The allelic frequencies did not differ between groups ($\chi^2=4.99$; $p=0.29$). Genotype frequencies of a whole cohort (GG/AG/AA: 55.7 % / 37.8 % / 6.5 %) were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.95$), the minor A-allele frequency was 25 %.

In a cohort of normoglycemic women, no association of the polymorphism rs12970134 near *MC4R* with obesity or with obesity-related traits has been found (dominant model, Table 1). However, in a part of this cohort, in which questionnaire data were available, carriers of the minor A-allele had significantly higher maximal and minimal body weight achieved in adulthood (GG (n=183) vs. AG+AA (n=169): maximal 64 (62; 68) vs. 70 (65; 75) kg, $p=0.04$; minimal 54 (52; 56) vs. 57 (55; 61) kg, $p=0.01$, resp.).

Nevertheless, the influence of A-allele on obesity-related traits was clearly expressed in women diagnosed with PCOS. Carriers of the minor A-allele had significantly higher BAI ($p=0.01$), waist ($p=0.049$) and gluteal ($p=0.01$) circumferences (Table 1). Further anthropometric parameters such as BMI and abdominal

circumference were also higher in carriers of the A-allele compared to non-carriers, although these findings did not achieve statistical significance. A trend towards higher BAI in A-allele carriers was observed also in the group of T2D women (Table 1).

An association with glucose metabolism has been found in the cohort of women with normal glucose tolerance (Table 2): carriers of the A-allele had lower fasting blood glucose ($p=0.001$), insulin ($p=0.005$) and C-peptide ($p=0.038$), lower percentage of HbA1c ($p=0.043$) and higher value of glucose to insulin ratio ($p=0.035$) compared to non-carriers. No differences were found in stimulated parameters (AUCs). Carriers of the A-allele were more insulin sensitive – they had significantly lower value of insulin resistance index (HOMAR; $p=0.002$) and higher value of insulin sensitivity index (Quicki; $p=0.002$). However, indices of insulin sensitivity derived from stimulated values measured during oGTT did not differ (Table 2).

Concerning other hormones, normoglycemic women carrying A-allele had significantly higher level of leptin compared to women with GG genotype ($p=0.036$) and higher level of growth hormone ($p=0.002$) with trend to higher IGF1. They had also lower level of free triiodothyronine ($p=0.002$), but similar TSH and free T4 levels (Table 3).

After exclusion of women using hormonal contraception, the A-allele carriers had slightly lower

Table 2. Associations of rs12970134 with glucose metabolism in normoglycemic women.

Parameters	GG (n=468)	AA+AG (n=382)	p
Glycemia (mmol/l)	4.7(4.6;4.8)	4.6(4.6;4.7)	0.001
C-peptide (nmol/l)	0.63(0.6;0.66)	0.59(0.56;0.61)	0.04
Insulin (mIU/l)	6.6(6.2;7.0)	5.8(5.5;6.2)	0.005
HbA1c (%)	4.2(4.1;4.4)	4.1(4.0;4.2)	0.04
Glycemia/Insulin (mmol/mIU)	0.71(0.67;0.77)	0.78(0.74;0.86)	0.04
AUC glycemia (mmol/l*180min)	971(948;1002)	972(952;1003)	0.67
AUC C-peptide (nmol/l*180min)	364(342;387)	363(345;374)	0.86
AUC insulin (mIU/l*180min)	4972(4600;5434)	4836(4539;5241)	0.95
AUC glycemia/insuline (mmol/mIU)	0.19(0.17;0.21)	0.20(0.18;0.21)	0.82
HOMA-IR (mIU*mmol/l ²)	1.37(1.29;1.48)	1.18(1.1;1.28)	0.002
HOMA-F (mIU/mmol)	112(105;122)	115(106;122)	0.98
Insulinogenic index (mIU/mmol)	14.6(13.4;15.9)	14.0(12.8;15.1)	0.14
Matsuda index	142(134;154)	148(136;161)	0.51
Cederholm index	73.6(70.4;77.3)	73.7(68.9;76.3)	0.47
Quicki index	0.67(0.65;0.68)	0.70(0.68;0.72)	0.002

Levels are presented as a median (95 % LCL; 95 % UCL); Mann-Whitney test.

Table 3. Associations of rs12970134 with lipid spectrum and other hormonal parameters in normoglycemic women.

Parameters	GG (n=468)	AA+AG (n=382)	p
Triacylglycerols (mmol/l)	0.88(0.81;0.94)	0.82(0.78;0.89)	0.78
LDL-cholesterol (mmol/l)	2.56(2.46;2.67)	2.41(2.34;2.59)	0.04
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.49(1.44;1.54)	1.47(1.42;1.52)	0.68
Total cholesterol (mmol/l)	4.5(4.4;4.6)	4.4(4.3;4.5)	0.14
Glucagon (pmol/l)	36.1(34.5;37.5)	35.5(33.9;37.1)	0.42
Leptin (mg/nl)	7.5(6.6;9.4)	9.5(8.1;10.7)	0.04
Growth hormone (mIU/l)	1.8(1.1;2.6)	3.8(2.5;5.7)	0.002
IGF-1 (ng/nl)	247(227;273)	267(253;285)	0.09
ft4 (pmol/l)	15.6(15.2;15.9)	15.6(15.3;15.9)	0.74
ft3 (pmol/l)	5.2(5.1;5.3)	4.9(4.8;5.1)	0.002
TSH (mIU/l)	2.12(2.01;2.25)	2.28(2.09;2.45)	0.24
Women not using contraceptives	GG (n=388)	AA+AG (n=288)	p
Cortisol (nmol/l)	476(454;491)	442.5(423;464)	0.31
SHBG (nmol/l)	37.2(34.6;39.1)	43.1(39.5;47.8)	0.002
Testosterone (nmol/l)	2.6(2.5;2.8)	2.1(1.9;2.5)	0.04
Androstenedione (nmol/l)	6.8(6.4;7.2)	6.2(5.8;6.6)	0.03

Levels are presented as a median (95 % LCL; 95 % UCL); Mann-Whitney test.

testosterone ($p=0.04$) and androstenedione ($p=0.03$) levels with significantly increased SHBG ($p=0.002$) in comparison to GG homozygotes (Table 3).

No significant differences in biochemical parameters between the genotypes were observed in women diagnosed with PCOS, in women with positive history of GDM, and in T2D women.

Discussion

MC4R deficiency is the most common monogenic form of human obesity which phenotype defined by I. S. Farooqi includes: early-onset obesity, increased body fat and fat-free mass, increased linear growth, preserved reproductive function, increased mineral bone density as well as hyperphagia and hyperinsulinemia which declined with age (Farooqi *et al.* 2000, 2003).

Later genome-wide association studies revealed that also common allelic variants in *MC4R* locus are associated with obesity-related phenotypes (Loos *et al.* 2008, Chambers *et al.* 2008) and their impact on anthropometric and metabolic functions had been studied.

Although most studies describe the association of the rs12970134 (A-allele) with increased risk of

obesity and obesity-related traits (Loos *et al.* 2008, Chambers *et al.* 2008, Thorliefsson *et al.* 2009, Kring *et al.* 2010, Cha *et al.* 2009), there are several studies which did not confirm such association (Sherag *et al.* 2010, Xi *et al.* 2012a, Bazzi *et al.* 2014, Albuquerque *et al.* 2014, Fernandez *et al.* 2015). In our cohort of 850 normoglycemic adult women with BMI ranging from 16 to 49.3 kg/m², no association of the minor A-allele (in dominant model) either with BMI, or with height, abdominal, waist and gluteal circumferences, WHR, subcutaneous fat and muscle mass was found. However, the higher maximum and minimum weight achieved in the adulthood was detected in women carrying the minor A-allele. Moreover, the influence of A-allele on obesity related traits was apparent in women with polycystic ovary syndrome and a trend towards higher BAI in A-allele carriers was observed also in the group of T2D women. The relation of rs12970134 and other SNPs near *MC4R* to T2D and PCOS was documented, but the potential association of these SNPs with T2D and PCOS was abolished after adjustment for BMI, indicating that a diabetogenic effect might be mediated *via* an increase in BMI (Zobel *et al.* 2009, Ewens *et al.* 2011, Louwers *et al.* 2014) However, recent meta-analysis confirmed the significant association of the rs17782313 polymorphism

near the *MC4R* gene with type 2 diabetes risk, which was independent of BMI (Xi *et al.* 2012b).

Regarding glucose metabolism, the lower fasting glycemia accompanied with lower C-peptide and insulin levels in A-allele carriers was found among normoglycemic women. These women were more insulin sensitive (HOMA-IR, Quicki indices were lower), however, these trends were not apparent after glucose administration. HOMA-IR and Quicki indices reflect rather the basal metabolic state and the increased hepatic insulin sensitivity than the peripheral/whole body one. Possible explanation suggests better hepatic function in A-allele carriers which could be influenced by preserved liver fat accumulation that was described for SNP rs17782313 near *MC4R* (Haupt *et al.* 2009).

The minor A-allele carriership was also associated with almost twice higher levels of growth hormone in normoglycemic women. In spite of high GH levels, the achieved body height in the adulthood was the same in both genotypic groups. Also other studies describe no association of rs12970134 with achieved body height but without any comment on growth hormone levels (Zobel *et al.* 2009, Kring *et al.* 2010). The study of the somatotroph axis in obese *MC4R*-deficient patients revealed increased pulsatile and total GH secretion in these patients, suggesting a role for *MC4R* in controlling hypothalamic somatostatinergic tone (Martinelli *et al.* 2011). Our data support the involvement of *MC4R* rs12970134 in regulation of somatotroph axis.

A-allele carriership was associated with higher leptin levels in our study although the BMI, WHR and subcutaneous fat did not differ from GG genotype. It could be explained by decreased leptin binding or decreased function of variant *MC4R* and moderate leptin resistance in these women. In patients with mutations of *MC4R*, serum leptin concentrations were appropriate for fat mass (Farooqi *et al.* 2003). Cole *et al.* (2010) found modest leptin resistance in some Hispanic children with *MC4R* haploinsufficiency.

Studies in rodents suggest that leptin controls the thyroid axis (Kim *et al.* 2000). Leptin communicates nutritional status to the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis through thyrotropin-releasing hormone (TRH). In fasting state, neuropeptide Y (NPY) and *MC4R* signaling reduce thyroid hormone levels through both central pathway and peripheral hepatic circuit. Fasting-induced suppression of the HPT axis is an adaptive response in order to decrease energy expenditure

during food deprivation (Vella *et al.* 2011). In our study, free triiodothyronine levels were also affected by the *MC4R* genotype but not TSH and fT4 ones. The A-allele carriers had lower levels of peripheral fT3. This indicates the influence of *MC4R* genotype on activity of deiodases or peripheral hepatic T4 metabolism rather than on central TSH secretion. It is of note that T3 exerts the negative feedback on hypothalamic *MC4R* expression in mice (Decherf *et al.* 2010).

Melanocortins play also a role in steroidogenesis and sex function (Gantz *et al.* 2003). In our study, cortisol levels did not depend on the genotype, on the other hand, women with the minor A-allele who are not using contraceptives showed lower androgene levels such as testosterone and androstenedione compared to their GG counterparts. There are not many studies reporting influence of *MC4R* variability on steroid levels. *MC4R* deficiency due to mutated *MC4R* was associated with normal 24-h urine free cortisol, gonadal secretion, concentrations of sex steroids, and secondary sexual characteristics were appropriate for age of the affected children (Farooqi *et al.* 2003) contrary to patients with *LEPR* mutations, who manifest delayed puberty due to hypogonadotropic hypogonadism (Farooqi *et al.* 2009).

This study is a contribution to the knowledge on functional impact of variant rs12970134, which is located near *MC4R* gene, on anthropometric, metabolic and hormonal parameters. Many associations of rs12970134 found in our study were not described previously but they are in a good accordance with known functional consequences of melanocortin system and the features of hypothalamic obesity (Hochberg and Hochberg 2010).

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

Grant support IGA MH CR NT/13544-4/2012 and RVO MH CR 00023761 (Institute of Endocrinology).

Abbreviations

AUC, area under the curve; BAI, body adiposity index; BMI, body mass index; fT3, free triiodothyronine; fT4, free thyroxine; GDM, gestational diabetes mellitus; HbA1c, glycated hemoglobin A1c; HOMA-IR, homeostatic model assessment – insulin resistance; HOMA-F, homeostatic model assessment – beta-cell function; IGF-1, insulin-like growth factor-1; *MC4R*,

melanocortin-4 receptor; oGTT, oral glucose tolerance test; PCOS, polycystic ovary syndrome; SHBG, sex-hormone binding globuline; SNP, single nucleotide polymorphism; T2D, type 2 diabetes; TSH, thyroid-stimulating hormone; WHR, waist to hip ratio.

References

- ALBUQUERQUE D, NÓBREGA C, RODRÍGUEZ-LÓPEZ R, MANCO L: Association study of common polymorphisms in MSRA, TFAP2B, MC4R, NRXN3, PPARGC1A, TMEM18, SEC16B, HOXB5 and OLFM4 genes with obesity-related traits among Portuguese children. *J Hum Genet* **59**: 307-313, 2014.
- BAZZI MD, NASR FA, ALANAZI MS, ALAMRI A, TURJOMAN AA, MOUSTAFA AS, ALFADDA AA, PATHAN AA, PARINE NR: Association between FTO, MC4R, SLC30A8, and KCNQ1 gene variants and type 2 diabetes in Saudi population. *Genet Mol Res* **13**: 10194-10203, 2014.
- CALTON MA, ERSOY BA, ZHANG S, KANE JP, MALLOY MJ, PULLINGER CR, BROMBERG Y, PENNACCHIO LA, DENT R, McPHERSON R, AHITUV N, VAISSE C: Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet* **18**: 1140-1147, 2009.
- CHA S, KOO I, PARK BL, JEONG S, CHOI SM, KIM KS, SHIN HD, KIM JY: Genetic effects of FTO and MC4R polymorphisms on body mass in constitutional types. *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**: 106390, 2011.
- CHAMBERS JC, ELLIOTT P, ZABANEH D, ZHANG W, LI Y, FROGUEL P, BALDING D, SCOTT J, KOONER JS: Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat Genet* **40**: 716-718, 2008.
- CLÉMENT K, VAISSE C, LAHLOU N, CABROL S, PELLOUX V, CASSUTO D, GOURMELEN M, DINA C, CHAMBAZ J, LACORTE JM, BASDEVANT A, BOUGNÈRES P, LEBOUÇ Y, FROGUEL P, GUY-GRAND B: A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**: 398-401, 1998.
- COLE SA, BUTTE NF, VORUGANTI VS, CAI G, HAACK K, KENT JW JR, BLANGERO J, COMUZZIE AG: Evidence that multiple genetic variants of MC4R play a functional role in the regulation of energy expenditure and appetite in Hispanic children. *Am J Clin Nutr* **91**: 191-199, 2010.
- DECHERF S, SEUGNET I, KOUIDHI S, LOPEZ-JUAREZ A, CLERGET-FROIDEVAUX MS, DEMENEIX BA: Thyroid hormone exerts negative feedback on hypothalamic type 4 melanocortin receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4471-4476, 2010.
- DUBERN B, CLÉMENT K, PELLOUX V, FROGUEL P, GIRARDET JP, GUY-GRAND B, TOUNIAN P: Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *J Pediatr* **139**: 204-209, 2001.
- EWENS KG, JONES MR, ANKENER W, STEWART DR, URBANEK M, DUNAIF A, LEGRO RS, CHUA A, AZZIZ R, SPIELMAN RS, GOODARZI MO, STRAUSS JF: FTO and MC4R gene variants are associated with obesity in polycystic ovary syndrome. *PLoS One* **6**: e16390, 2011.
- FAROOQI IS, YEO GS, KEOGH JM, AMINIAN S, JEBB SA, BUTLER G, CHEETHAM T, O'RAHILLY S: Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* **106**: 271-279, 2000.
- FAROOQI IS, MATARESE G, LORD GM, KEOGH JM, LAWRENCE E, AGWU C, SANNA V, JEBB SA, PERNA F, FONTANA S, LECHLER RI, DePAOLI AM, O'RAHILLY S: Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* **110**: 1093-1103, 2002.
- FAROOQI IS, KEOGH JM, YEO GS, LANK EJ, CHEETHAM T, O'RAHILLY S: Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* **348**: 1085-1095, 2003.

- FAROOQI IS, WANGENSTEEN T, COLLINS S, KIMBER W, MATARESE G, KEOGH JM, LANK E, BOTTOMLEY B, LOPEZ-FERNANDEZ J, FERRAZ-AMARO I, DATTANI MT, ERCAN O, MYHRE AG, RETTERSTOL L, STANHOPE R, EDGE JA, MCKENZIE S, LESSAN N, GHODSI M, DE ROSA V, PERNA F, FONTANA S, BARROSO I, UNDLIEN DE, O'RAHILLY S: Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* **356**: 237-247, 2007.
- FERNANDES AE, DE MELO ME, FUJIWARA CT, PIOLTINE MB, MATIOLI SR, SANTOS A, CERCATO C, HALPERN A, MANCINI MC: Associations between a common variant near the MC4R gene and serum triglyceride levels in an obese pediatric cohort. *Endocrine* **49**: 653-658, 2015.
- GANTZ I, FONG TM: The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: E468-E474, 2003.
- GRANT SF, BRADFIELD JP, ZHANG H, WANG K, KIM CE, ANNAIAH K, SANTA E, GLESSNER JT, THOMAS K, GARRIS M, FRACKELTON EC, OTIENO FG, SHANER JL, SMITH RM, IMIELINSKI M, CHIAVACCI RM, LI M, BERKOWITZ RI, HAKONARSON H: Investigation of the locus near MC4R with childhood obesity in Americans of European and African ancestry. *Obesity (Silver Spring)* **17**: 1461-1465, 2009.
- HAINEROVÁ I, LARSEN LH, HOLST B, FINKOVÁ M, HAINER V, LEBL J, HANSEN T, PEDERSEN O: Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response, and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 3689-3696, 2007.
- HAUPT A, THAMER C, HENI M, TSCHRITTER O, MACHANN J, SCHICK F, MACHICAO F, HÄRING HU, STAIGER H, FRITSCHKE A: Impact of variation near MC4R on whole-body fat distribution, liver fat, and weight loss. *Obesity (Silver Spring)* **17**: 1942-1945, 2009.
- HINNEY A, HOHMANN S, GELLER F, VOGEL C, HESS C, WERMTER AK, BROKAMP B, GOLDSCHMIDT H, SIEGFRIED W, REMSCHMIDT H, SCHÄFER H, GUDERMANN T, HEBEBRAND J: Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 4258-4267, 2003.
- HOCHBERG I, HOCHBERG Z: Hypothalamic obesity. In: *Pediatric Neuroendocrinology*. LOCHE S, CAPP A M, GHIZZONI L, MAGHNIÉ M, SAVAGE MO (eds), Karger, Basel (*Endocr Dev* **17**: 185-196, 2010).
- HUSZAR D, LYNCH CA, FAIRCHILD-HUNTRESS V, DUNMORE JH, FANG Q, BERKEMEIER LR, GU W, KESTERSON RA, BOSTON BA, CONE RD, SMITH FJ, CAMPFIELD LA, BURN P, LEE F: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88**: 131-141, 1997.
- KIM MS, SMALL CJ, STANLEY SA, MORGAN DG, SEAL LJ, KONG WM, EDWARDS CM, ABUSNANA S, SUNTER D, GHATEI MA, BLOOM SR: The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest* **105**: 1005-1011, 2000.
- KRING SI, HOLST C, TOUBRO S, ASTRUP A, HANSEN T, PEDERSEN O, SØRENSEN TI: Common variants near MC4R in relation to body fat, body fat distribution, metabolic traits and energy expenditure. *Int J Obes (Lond)* **34**: 182-189, 2010.
- LOOS RJ, LINDGREN CM, LI S, WHEELER E, ZHAO JH, PROKOPENKO I, INOUE M, FREATHY RM, ATTWOOD AP, BECKMANN JS, BERNDT SI; PROSTATE, LUNG, COLORECTAL, AND OVARIAN (PLCO) CANCER SCREENING TRIAL, JACOBS KB, CHANOCK SJ, HAYES RB, BERGMANN S, ET AL.: Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* **40**: 768-775, 2008.
- LOUWERS YV, RAYNER NW, HERRERA BM, STOLK L, GROVES CJ, BARBER TM, UITTERLINDEN AG6, FRANKS S, LAVEN JS, MCCARTHY MI: BMI-associated alleles do not constitute risk alleles for polycystic ovary syndrome independently of BMI: a case-control study. *PLoS One* **9**: e87335, 2014.
- LUBRANO-BERTHELIER C, LESTUNFF C, BOUGNÈRES P, VAISSE C: A homozygous null mutation delineates the role of the melanocortin-4 receptor in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 2028-2032, 2004.

- MARTINELLI CE, KEOGH JM, GREENFIELD JR, HENNING E, VAN DER KLAUW AA, BLACKWOOD A, O'RAHILLY S, ROELFSEMA F, CAMACHO-HÜBNER C, PIJL H, FAROOQI IS: Obesity due to melanocortin 4 receptor (MC4R) deficiency is associated with increased linear growth and final height, fasting hyperinsulinemia, and incompletely suppressed growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **96**: E181-E188, 2011.
- SCHERAG A, JARICK I, GROTHE J, BIEBERMANN H, SCHERAG S, VOLCKMAR AL, VOGEL CI, GREENE B, HEBEBRAND J, HINNEY A: Investigation of a genome wide association signal for obesity: synthetic association and haplotype analyses at the melanocortin 4 receptor gene locus. *PLoS One* **5**: e13967, 2010.
- THORLEIFSSON G, WALTERS GB, GUDBJARTSSON DF, STEINTHORSDOTTIR V, SULEM P, HELGADOTTIR A, STYRKARSDOTTIR U, GRETARSDOTTIR S, THORLACIUS S, JONSDOTTIR I, JONSDOTTIR T, OLAFSDOTTIR EJ, OLAFSDOTTIR GH, JONSSON T, JONSSON F, BORCH-JOHNSEN K, HANSEN T, ANDERSEN G, JØRGENSEN T, LAURITZEN T, ABEN KK, VERBEEK AL, ROELEVELD N, KAMPMAN E, YANEK LR, BECKER LC, TRYGGVADOTTIR L, RAFNAR T, BECKER DM, GULCHER J, KIEMENEY LA, PEDERSEN O, KONG A, THORSTEINSDOTTIR U, STEFANSSON K: Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* **41**: 18-24, 2009.
- VAISSE C, CLEMENT K, DURAND E, HERCBERG S, GUY-GRAND B, FROGUEL P: Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* **106**: 253-262, 2000.
- VELLA KR, RAMADOSS P, LAM FS, HARRIS JC, YE FD, SAME PD, O'NEILL NF, MARATOS-FLIER E, HOLLENBERG AN: NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways. *Cell Metab* **14**: 780-790, 2011.
- XI B, CHANDAK GR, SHEN Y, WANG Q, ZHOU D: Association between common polymorphism near the MC4R gene and obesity risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **7**: e45731, 2012a.
- XI B, TAKEUCHI F, CHANDAK GR, KATO N, PAN HW; AGEN-T2D CONSORTIUM, ZHOU DH, PAN HY, MI J: Common polymorphism near the MC4R gene is associated with type 2 diabetes: data from a meta-analysis of 123,373 individuals. *Diabetologia* **55**: 2660-2666, 2012b.
- YANG YK, DICKINSON CJ, ZENG Q, LI JY, THOMPSON DA, GANTZ I: Contribution of melanocortin receptor exloops to agouti-related protein binding. *J Biol Chem* **274**: 14100-14106, 1999.
- YEO GS, FAROOQI IS, CHALLIS BG, JACKSON RS, O'RAHILLY S: The role of melanocortin signalling in the control of body weight: evidence from human and murine genetic models. Review. *Q J Med* **93**: 7-14, 2000.
- YEO GS, LANK EJ, FAROOQI IS, KEOGH J, CHALLIS BG, O'RAHILLY S: Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum Mol Genet* **12**: 561-574, 2003.
- ZOBEL DP, ANDREASEN CH, GRARUP N, EIBERG H, SØRENSEN TI, SANDBAEK A, LAURITZEN T, BORCH-JOHNSEN K, JØRGENSEN T, PEDERSEN O, HANSEN T: Variants near MC4R are associated with obesity and influence obesity-related quantitative traits in a population of middle-aged people: studies of 14,940 Danes. *Diabetes* **58**: 757-764, 2009.

5.2 Varianty v genu *FTO* jsou spojeny s vyšší hladinou růstového hormonu a ovlivňují metabolický profil štíhlých žen

LUKÁŠOVÁ P, VAŇKOVÁ M, VČELÁK J, VEJRAŽKOVÁ D, BRADNOVÁ O, STANICKÁ S, HAINER V, BENDLOVÁ B. *Physiol Res.* 2015; **64**(2): 177-85. IF=1,293

Genetická variabilita v prvním intronu v genu *FTO* má velmi silný dopad na obezitu, což bylo potvrzeno studiiemi na různých populacích po celém světě (Dina *et al.* 2007, Frayling *et al.* 2007; Scott *et al.*, 2007, Scuteri *et al.*, 2007). Při obezitě je hladina *FTO* zvýšená, secernovaný protein se účastní lipolýzy v tukových buňkách (Wählen *et al.*, 2008).

V této studii jsme se zaměřili na štíhlé ženy nesoucí rizikový haplotyp sestavený z variant rs1421085 (T/C), rs1121980 (G/A), rs17817449 (T/G) a rs9939609 (T/A) a zjišťovali jeho dopad na antropometrické, hormonální a metabolické parametry.

Asociační studii genotypu s fenotypem jsme provedli u 172 štíhlých žen (BMI $\geq 18,5$ a < 25 kg/m²; věk $26,8 \pm 7,26$ let), 77 z nich užívalo hormonální antikoncepci. V našem souboru štíhlých žen jsme potvrdili asociaci rizikového haplotypu CAGA s mírným zvýšením BMI ($p = 0,038$), nicméně nepotvrdili jsme vliv na další antropometrické parametry a ukazatele, charakterizující tělesné složení (jako např. obvod pasu, WHR a procento tělesného tuku). Na lačno měly nositelky genotypu CAGA oproti ostatním ženám vyšší hladinu růstového hormonu a nižší hladinu LDL cholesterolu a celkového cholesterolu. V průběhu OGTT měly nositelky genotypu CAGA stále vyšší hladinu růstového hormonu a dále měly vyšší hladinu glykémie (ve 120. minutě), inzulínu (ve 150. minutě) a C-peptidu (ve 120. a 150. minutě) v průběhu OGTT. Užívání hormonální antikoncepce ještě zvyšovalo zjištěné hormonální a metabolické účinky nositelství CAGA haplotypu.

Vyšší hladiny růstového hormonu zřejmě chrání štíhlé nositelky rizikového haplotypu před rozvojem obezity.

Na této práci jsem se podílela asistencí při oGTT, účastníky studie jsem antropologicky měřila a zajišťovala preanalytickou fázi sbíraných vzorků.

Fat Mass and Obesity Associated Gene Variants Are Associated With Increased Growth Hormone Levels and Affect Glucose and Lipid Metabolism in Lean Women

P. LUKÁŠOVÁ¹, M. VAŇKOVÁ¹, J. VČELÁK¹, D. VEJRAŽKOVÁ¹, O. BRADNOVÁ¹, S. STANICKÁ¹, V. HAINER¹, B. BENDLOVÁ¹

¹Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Received June 2, 2015

Accepted June 16, 2015

Summary

First intron variability of the fat mass and obesity associated gene (*FTO*) has strong impact on adiposity. We focused on lean women carrying the most "obesity-risk" haplotype to study their anthropometric parameters and hormonal and metabolic profile. Genotype-phenotype correlation was performed in a group of 172 lean women (body mass index (BMI) ≥ 18.5 and < 25 kg/m²; age 26.8 ± 7.26 years), 77 of them used hormonal contraceptives. Even in lean women the association of the risk haplotype CAGA with BMI was confirmed but it did not influence the anthropometric indices of body composition. CAGA carriers compared to non-carriers had significantly higher both fasting ($p=0.016$) and post glucose load ($p<0.001$) levels of growth hormone (GH), significantly higher glucose, insulin and C-peptide levels in the late phase of oGTT and lower fasting concentration of total cholesterol and LDL-cholesterol. Administration of hormonal contraceptives further increased observed hormonal and metabolic effects in CAGA carriers. We conclude that higher levels of GH in lean women carrying the *FTO* "obesity risk" haplotype could protect them from the development of obesity. The relation between the *FTO* gene variability and GH secretion has to be elucidated. This is the first study demonstrating the interaction of *FTO* genotype with hormonal contraception.

Key words

Fat mass and obesity associated gene • Gene variants • Glucose metabolism • Growth hormone • Hormonal contraception

Corresponding author

P. Lukášová, Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. Fax: +420 224 905 325. E-mail: plukasova@endo.cz

Introduction

Genome-wide association studies have led to the identification of a number of candidate genes related to worldwide diseases such as type 2 diabetes mellitus or obesity and polycystic ovary syndrome. In 2007, the fat mass and obesity associated gene (*FTO*) was identified as a gene with strong obesity-related traits. Several independent laboratories detected a range of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the first intron of the gene with a great impact on adiposity (Dina *et al.* 2007, Frayling *et al.* 2007, Scuteri *et al.* 2007). Consequently, the association of the *FTO* gene with obesity was confirmed in various populations around the world. Through its association with obesity, *FTO* was also confirmed as a susceptibility gene for diabetes mellitus type 2 (DM2) (Frayling *et al.* 2007, Scott *et al.* 2007) and polycystic ovary syndrome (PCOS) (Attaoua *et al.* 2008, Barber *et al.* 2008). However, the effects of these intronic variants on *FTO* function are still unclear.

FTO is a member of the AlkB-related non-heme iron- and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase family. Studies in mice suggest that it may be involved in nucleic acid demethylation (Gerken *et al.* 2007, Sanchez-Pulido and Andrade-Navarro 2007) and that it functions as a transcriptional coactivator playing a role in the epigenetic regulation of the development and maintenance of fat tissue (Gerken *et al.* 2007).

The *FTO* gene (16q12.2) is widely expressed in a variety of human tissues, with the highest levels in the brain, particularly in hypothalamic nuclei, a

well-defined key regulatory centre of energy homeostasis (Dina *et al.* 2007, Frayling *et al.* 2007). Its mRNA level is regulated by the energy balance in response to feeding or fasting (Gerken *et al.* 2007, Frederiksson *et al.* 2008). The association of *FTO* gene variants with cerebrocortical insulin resistance typical for obese humans was documented as well (Tschritter *et al.* 2007).

FTO is also expressed in pancreatic islets, skeletal muscle, in liver as well as in adipose tissue (Dina *et al.* 2007, Grunnet *et al.* 2009). The expression of *FTO* in adipose tissue was usually higher in obese individuals. The role of *FTO* in peripheral fat lipolysis by which the gene could affect the body weight regulation was also reported (Wählén *et al.* 2008). The study of skeletal muscle biopsies revealed increased energy efficiency and potentially increased mitochondrial coupling in risk allele (rs9939609, intron 1) carriers vs. non-carriers which may contribute to the increased risk of obesity and DM2 (Grunnet *et al.* 2009). However, *FTO* genotype did not influence the mRNA expression either in skeletal muscle or in adipose tissue (Wählén *et al.* 2008, Grunnet *et al.* 2009).

In our previous study which included 1388 Czech adults of Caucasian origin an association of 4 SNPs in the 1st intron of *FTO* gene with BMI ($p < 0.001$), waist circumference ($p < 0.001$) as well as with leptin level ($p = 0.003$) and glucose levels at the 60th, 90th and 120th min of the oGTT ($p < 0.005$) was confirmed (Vcelak *et al.* 2008). In this study we focused on a group of lean healthy control women to evaluate the associations of the most risk haplotype CAGA with anthropometric data, parameters of glucose and lipid metabolism, selected hormones and adipokines. We also studied the possible role of interaction of the genotype with hormonal contraception which has been underestimated until now.

Materials and Methods

Subjects characteristics

Our study cohort consisted of 172 lean (BMI ≥ 18.5 and < 25 kg/m²) healthy women carrying combinations of two major *FTO* haplotypes TGTT and CAGA (BMI 21.5 ± 1.99 kg/m²; age 26.8 ± 7.26 years). Subjects with family history of DM2, gestational diabetes, PCOS and impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance were excluded from the study. Seventy-seven women used hormonal

contraceptives (HC): 52 % women used low-dose oral contraceptives (OC; ethinylestradiol (EE) or estradiol-valerate (E2V) below 30 ug); 42 % combined OC (with 30-35 ug EE and third-generation progestogens) and the remaining 6 % contraceptive coil.

The protocol of the study was approved by the Ethic Committee of the Institute of Endocrinology and all subjects gave their informed consent.

Anthropometric measurements

Body weight, height, waist and hip circumference were measured in all subjects, body mass index (BMI) and waist-to-hip ratio (WHR) were calculated. To reflect the percentage of body fat we used body adiposity index (BAI, $BAI = [\text{hip circumference}/\text{height}^{1.5}] - 18$ [%]) (Bergman *et al.* 2011).

Metabolic and hormonal characteristics

The baseline levels of glucose, C-peptide, immunoreactive insulin, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL-) and low-density lipoprotein (LDL-) cholesterol, triglycerides and glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}) [Cobas Integra, Roche Diagnostics], proinsulin [ELISA, DRG Diagnostics, Germany], glucagon [RIA, IBL], growth hormone (GH) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) [IRMA, Immunotech], plasma renin activity (PRA) [RIA, Immunotech] and leptin [RIA, LINCO research] were assessed. Free fatty acids concentrations and their composition were measured by HPLC. All women underwent 3-h oral glucose tolerance test (oGTT) with 75 g glucose dose; during the test levels of glucose, C-peptide, insulin (in 30 min intervals), proinsulin, glucagon, free fatty acids (at 0, 60th, 180th min) and growth hormone (at 0, 60th, 120th min) were determined. Areas under the curves for glucose, C-peptide and insulin were calculated (AUC). To assess insulin sensitivity and beta-cell function, homeostasis models assessments (HOMA R and HOMA F, Matsuda index, Cederholm index and insulinogenic index) were used and derived disposition indices (beta-cell function*insulin sensitivity) were calculated (Matthews *et al.* 1985, Cederholm and Wibell 1990, Matsuda and DeFronzo 1999).

Genotyping

DNA was extracted from peripheral leukocytes using the commercial kit (QIAamp DNA Blood Kit, QIAGEN, Germany). The four intronic single nucleotide polymorphisms (SNPs), rs1421085 (T/C),

rs1121980 (G/A), rs17817449 (T/G) and rs9939609 (T/A) in the *FTO* gene were assessed by ABI TaqMan SNP Genotyping Assays (LightCycler 480 System, Roche). Haplotype combinations were generated using a programme PHASE version 2.1. (<http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>).

Statistical analyses

For statistical evaluation NCSS 2004 (Statistical Solutions, Saugus, USA) software was used. Data are given as means \pm SDs and as percentages. Data in Figures are shown as medians. The Chi-square test was used to assess deviation from Hardy-Weinberg equilibrium of the genotypic frequencies by calculating expected frequencies of genotype. Differences in biochemical and anthropometric data between subgroups were tested by non-parametric Mann-Whitney test, the two tailed p values <0.05 were considered to be significant.

Results

FTO gene haplotypes

The component obesity risk SNPs: rs142108 (T/C); rs1121980 (G/A); rs17817449 (T/G) and rs9939609 (T/A) are located within 19.6 kb region in intron 1 of the *FTO* gene and they are in linkage disequilibrium, however, programme PHASE generated 10 haplotype combinations in the cohort of our pilot study. For this study we selected 172 lean women – carriers of two major haplotypes TGTT and CAGA – 54 (31.4 %) were TGTT homozygotes; 78 were TGTT/CAGA heterozygotes (45.3 %) and 40 (23.3 %) were CAGA homozygotes.

Anthropometric and metabolic parameters in carriers and non-carriers of the FTO risk haplotype

Anthropometric and hormonal parameters were compared in carriers of the most risk haplotype CAGA (CAGA/CAGA homozygotes together with TGTT/CAGA heterozygotes) vs. CAGA non-carriers (TGTT homozygotes). Even in a subgroup of 172 lean women the association of the CAGA risk haplotype carriership with a higher BMI was apparent (CAGA carriers 21.7 ± 1.98 kg/m² vs. non-carriers 21.1 ± 1.94 kg/m²; $p=0.038$). However, the CAGA carriers vs. non-carriers did not differ in waist circumference, WHR and percentage of body fat.

We demonstrated that the CAGA-carriers had

significantly higher levels of glucose, insulin and C-peptide in the late phase of the oGTT in comparison with CAGA non-carriers. The CAGA carriers had a tendency to increased proinsulin levels at 60th and 180th min of the oGTT. CAGA carriership was also associated with higher growth hormone levels in the fasting state and at 60th min of the oGTT (Fig. 1). CAGA carriers had significantly lower levels of total cholesterol (4.2 ± 0.81 vs. 4.5 ± 0.75 mmol/l, $p=0.030$) and LDL-cholesterol (2.2 ± 0.71 vs. 2.4 ± 0.69 mmol/l, $p=0.011$). There were no differences in IGF-1, PRA, glucagon, leptin, HDL-cholesterol, free fatty acids concentrations and their composition. Lean women with and without CAGA haplotype did not differ in beta-cell function (HOMA F, insulinogenic index), insulin sensitivity (HOMA R, Matsuda index, Cederholm index) and disposition indices derived from oGTT (data not shown).

Anthropometric and metabolic parameters with respect to HC administration

In our cohort of women, 77 of them were using the hormonal contraceptives (HC). There was no significant effect of HC itself on anthropometric parameters. We assume that HC usage had similar influence on metabolic parameters as risk haplotype carriership (Fig. 2). Women with HC (without respect to *FTO* haplotype – the distribution of CAGA carriers was similar in subgroups of HC users and non-users; chi-square test, NS) had higher levels of glucose, insulin and C-peptide in the late phase of the oGTT and had also higher GH levels in response to glucose load. In addition, women with HC had significantly higher levels of proinsulin in all phases of the oGTT compared to HC non-users. Regarding the other tested parameters, the HC usage was also associated with increased triglycerides (1.05 ± 0.374 vs. 0.75 ± 0.328 mmol/l, $p<0.001$) and increased PRA (0.94 ± 0.174 vs. 0.64 ± 0.076 ng/ml*h, $p=0.016$). The HC influenced neither the insulin secretion nor the insulin sensitivity indices except of Cederholm index which was significantly lower in women using HC in comparison with non-users (81.3 ± 18.15 vs. 86.4 ± 19.89 kg*1/mIU, $p=0.045$). In spite of a demonstrated impact of HC on GH levels, there was no difference in IGF-1 levels between HC users and non-users.

The role played by a different composition of contraceptives has not been studied.

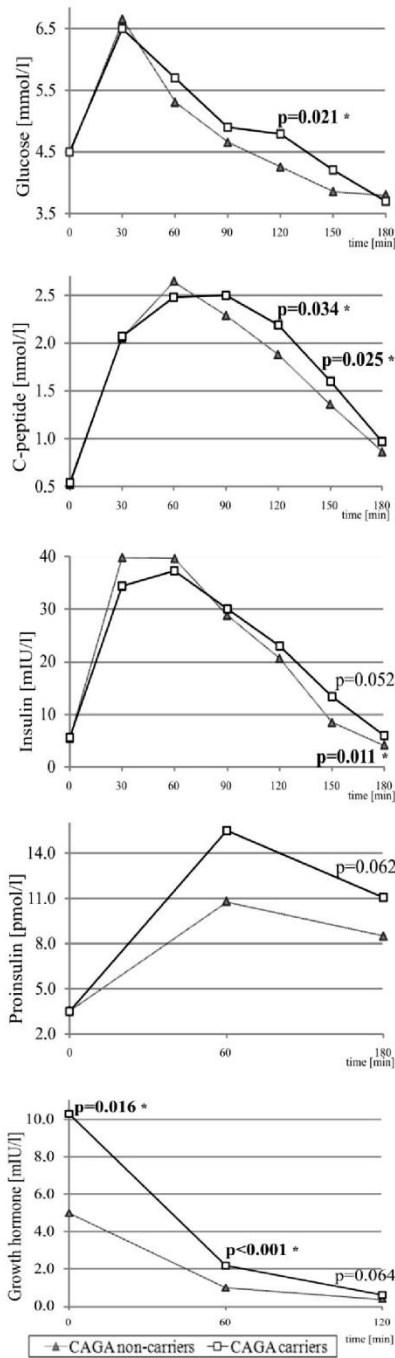


Fig. 1. Metabolic parameters during oGTT in lean women with respect to *FTO* gene CAGA carriership.

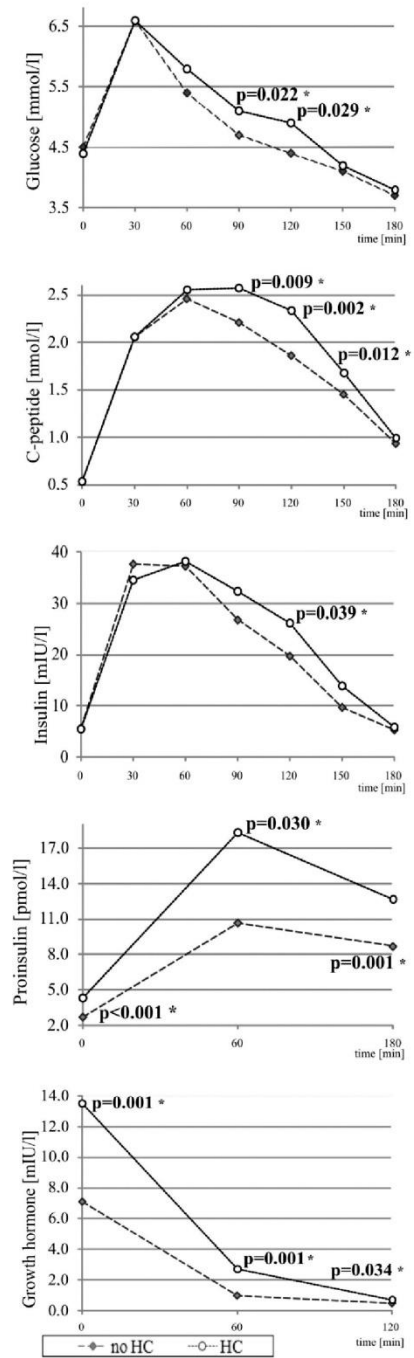


Fig. 2. Metabolic parameters during oGTT in lean women with respect to hormonal contraception (HC) usage.

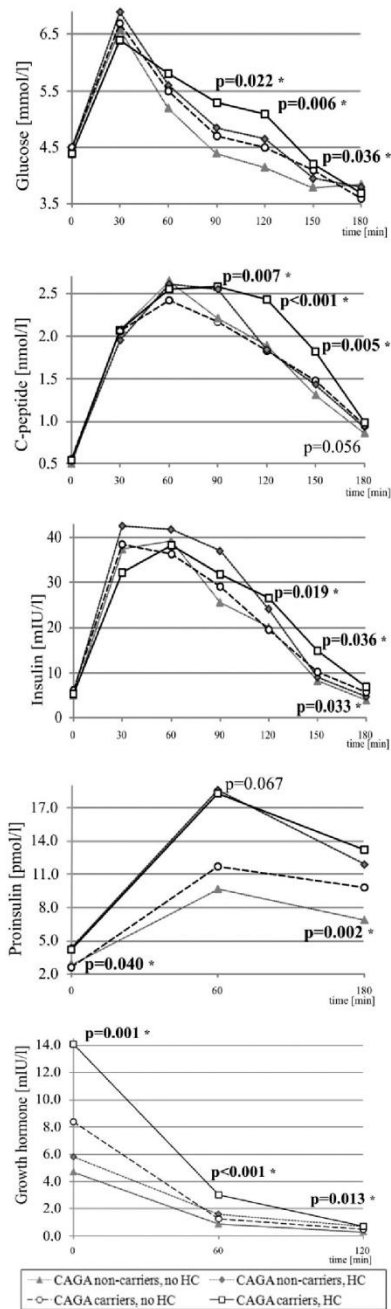


Fig. 3. Metabolic parameters during oGTT in lean women with respect to CAGA carriership and hormonal contraception usage (* statistical significance between CAGA non-carriers without HC and CAGA carriers with HC).

Anthropometric and metabolic parameters with respect to FTO gene CAGA carriership and HC usage

The interaction of the risk FTO haplotype carriership and hormonal contraception is shown in Figure 3. The CAGA carriers using HC had the highest blood glucose, insulin and C-peptide levels in the late phase of oGTT. They also have the highest fasting as well as post glucose load levels of proinsulin and GH in comparison with the other groups, especially with CAGA non-carriers without HC.

When we assessed the effect of HC usage in risk-haplotype carriers (Fig. 3, these p levels are not shown there): the HC users had higher level of glucose at 90th and 120th min (NS, $p=0.030$), C-peptide at 90th, 120th and 150th min ($p=0.040$; 0.001 and 0.004) and proinsulin in all phases of the oGTT ($p=0.008$, NS and 0.041) than HC non-users. Similarly, levels of GH were increased in HC users in all phases of the oGTT ($p=0.002$ and 0.010, NS). Nevertheless, no significant effect of HC was apparent in the subgroup of CAGA non-carriers.

There seems to be an additive effect of risk-haplotype carriership and HC usage on these metabolic parameters.

Discussion

Though there have been many published studies that uniformly document the association of FTO gene variants in intron 1 with obesity, the mechanisms by which these variants affect FTO function and how the FTO gene itself contributes to the development of obesity are still not well understood.

The following questions were raised in our study: 1) what are the anthropometric and metabolic consequences of CAGA carriership in lean women, 2) could they be influenced by hormonal contraception and 3) how are lean women carrying the obesity risk FTO haplotype protected from obesity?

Association of the risk haplotype with BMI was detected but not with other anthropometric measurements. It confirms the globally observed association of variants in the first intron of FTO gene with increased BMI, which was also reported in the Czech general population (Vcelak *et al.* 2008, Hubacek *et al.* 2008, 2009).

In previously published studies genetic variations in the FTO gene were associated not only with increased body weight, but also with other metabolic traits like increased insulin secretion, leptin levels,

reduced insulin sensitivity and impaired lipid profile. However, these influences on metabolic traits mostly lost their statistical significance after adjustment for the independent effects of obesity (Fall *et al.* 2013). Our results indicated that even in lean women, the risk CAGA haplotype was associated with increased stimulated glucose, insulin and C-peptide during the late phase of oGTT. Interestingly, CAGA carriership was strongly associated with higher levels of growth hormone (GH) both in the fasting state and in response to glucose load. This is a novel finding regarding metabolic associations of *FTO* variants. However, Roskopf *et al.* (2011) proposed that the GH/IGF-1 axis could be a mediator for the relationship between *FTO* and BMI.

In fact, increased GH levels could be responsible for the leanness of the studied women carrying the obesity risk CAGA haplotype as well as for the detected metabolic effects found in these women.

GH is synthesized and secreted by somatotrophic cells in the anterior pituitary. It plays a key role in the control of several complex physiological processes, including growth and metabolism. GH stimulates protein anabolism, enhances fat utilization by enhancing triglyceride breakdown and oxidation in adipocytes. GH has anti-insulin activity; it suppresses the glucose uptake in peripheral tissues and enhances glucose synthesis in the liver. In human obesity, the GH/IGF-1 axis is altered at different levels. Increased adiposity is characterized by blunted GH secretion which is coupled with low, normal or high serum IGF-1 levels (Savastano *et al.* 2014, Cordoba-Chacon *et al.* 2015, Pena-Bello *et al.* 2015). GH fragments as well as the GH-releasing hormone analogue were suggested as possible anti-obesity agents (Kokshoorn *et al.* 2011, Berryman *et al.* 2013).

We suggest that the elevated beta-cell secretion in the late phase of the oGTT as well as the decreased total- and LDL-cholesterol found in our lean CAGA carriers could be a consequence of increased GH levels in these women (Rudling and Angelin 2001, Weltman *et al.* 2003, Freathy *et al.* 2008, Kokshoorn *et al.* 2011). It could be speculated that the increased GH levels protect women carrying the obesity risk *FTO* haplotype from the development of obesity (Pena-Bello *et al.* 2015). The reason of the elevated GH levels in these women is not known. The IGF-1 levels were not elevated in CAGA carriers. The cause of the dissociation of GH/IGF-1 axis is unclear. It could arise from impaired hepatic IGF-1 production (Ho *et al.* 2003), the role of IGF binding

proteins has also to be considered (Ruan and Lai *et al.* 2010).

A similar finding was obtained in women using hormonal contraception (HC) *per se*. HC users had elevated GH levels compared to HC non-users but these two groups did not differ in the IGF-1 levels. It has already been published that hormonal contraceptives can modulate the GH/IGF-1-axis by reducing IGF-1 levels and increasing diurnal integrated mean GH plasma concentrations (Balogh *et al.* 2000, Ho *et al.* 2003). In our study, the HC users did not differ in anthropometric measurements from non-users. In agreement with published findings (Wynn and Doar 1996, Wynn *et al.* 1996), they had higher levels of triglycerides as well as increased fasting and oGTT stimulated proinsulin and higher late phase glucose, insulin and C-peptide levels, together with modestly impaired insulin sensitivity. Our HC users had increased PRA but without consequent influence on blood pressure.

This study demonstrated for the first time the interaction of *FTO* genotype with hormonal contraception. HC usage potentiated the influence of CAGA carriership on the metabolic parameters or vice versa (Fig. 3). Our data suggest that the response of proinsulin to glucose load is probably more influenced by HC than by *FTO* genotype in contrary to the fasting GH levels where the influence of *FTO* genotype seems to be more determining than HC usage (Fig. 3).

In conclusion, we showed an association of *FTO* risk haplotype CAGA with increased GH levels in lean women which could protect them from obesity. Increased levels of blood glucose, insulin and C-peptide in the late phase of oGTT as well as lower cholesterol and LDL-cholesterol could be a metabolic consequence of elevated GH levels. The HC usage *per se* induced similar metabolic effects and the interaction of CAGA haplotype with HC augmented the impact upon observed biochemical parameters.

The cause of elevated GH levels in lean CAGA carriers as well as a possible role of the *FTO* gene in the complex regulatory network of hypothalamic GH secretion should be further elucidated.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank all the subjects who participated in this study and all our colleagues for their excellent

nursing and laboratory assistance. This study was supported by grants IGA MH CZ NT/13544-4 and MH CZ - DRO (Institute of Endocrinology - EU, 00023761) from the Ministry of Health of the Czech Republic.

Abbreviations

BAI, body adiposity index; BMI, body mass index; DM2, diabetes mellitus type 2; E2V, estradiol-valerate; EE,

ethinylestradiol; FTO, fat mass and obesity associated gene; GH, growth hormone; HDL, high-density lipoprotein; HC, hormonal contraceptives; IGF-1, insulin-like growth factor 1; LDL, low-density lipoprotein; OC, oral contraceptives; oGTT, oral glucose tolerance test; PRA, plasma renin activity; PCOS, polycystic ovary syndrome; SNPs, single nucleotide polymorphisms; WHR, waist to hip ratio.

References

- ATTAOUA R, AIT EL MKADEM S, RADIAN S, FICA S, HANZU F, ALBU A, GHEORGHU M, COCULESCU M, GRIGORESCU F: FTO gene associates to metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **373**: 230-234, 2008.
- BALOGH A, KAUF E, VOLLANTH R, GRÄSER G, KLINGER G, OETTEL M: Effects of two oral contraceptives on plasma levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and growth hormone (hGH). *Contraception* **62**: 259-269, 2000.
- BARBER TM, BENNETT AJ, GROVES CJ, SOVIO U, RUOKONEN A, MARTIKAINEN H, POUTA A, HARTIKAINEN AL, ELLIOTT P, LINDGREN CM, FREATHY RM, KOCH K, OUWEHAND WH, KARPE F, CONWAY GS, WASS JA, JÄRVELIN MR, FRANKS S, MCCARTHY MI: Association of variants in the fat mass and obesity associated (FTO) gene with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia* **51**: 1153-1158, 2008.
- BERGMAN RN, STEFANOVSKI D, BUCHANAN TA, SUMNER AE, REYNOLDS JC, SEBRING NG, XIANG AH, WATANABE RM: A better index of body adiposity. *Obesity* **19**: 1083-1089, 2011.
- BERRYMAN DE, GLAD CA, LIST EO, JOHANSSON G: The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. *Nat Rev Endocrinol* **9**: 346-356, 2013.
- CEDERHOLM J, WIBELL L: Insulin release and peripheral sensitivity at the oral glucose tolerance test. *Diabetes Res Clin Pract* **10**: 167-175, 1990.
- CORDOBA-CHACON J, MAJUMDAR N, POKALA NK, GAHETE MD, KINEMAN RD: Islet insulin content and release are increased in male mice with elevated endogenous GH and IGF-I, without evidence of systemic insulin resistance or alterations in β -cell mass. *Growth Horm IGF Res* **25**: 189-195, 2015.
- DINA C, MEYRE D, GALLINA S, DURAND E, KÖRNER A, JACOBSON P, CARLSSON LM, KIESS W, VATIN V, LECOEUR C, DELPLANQUE J, VAILLANT E, PATTOU F, RUIZ J, WEILL J, LEVY-MARCHAL C, HORBER F, POTOCZNA N, HERCBERG S, LE STUNFF C, BOUGNÈRES P, KOVACS P, MARRE M, BALKAU B, CAUCHI S, CHÈVRE JC, FROGUEL P: Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* **39**: 724-726, 2007.
- FALL T, HÄGG S, MÄGI R, PLONER A, FISCHER K, HORIKOSHI M, SARIN AP, THORLEIFSSON G, LADENVALL C, KALS M, KUNINGAS M, DRAISMA HH, RIED JS, VAN ZUYDAM NR, HUIKARI V, ET AL.; EUROPEAN NETWORK FOR GENETIC AND GENOMIC EPIDEMIOLOGY (ENGAGE) CONSORTIUM: The role of adiposity in cardiometabolic traits: a Mendelian randomization analysis. *PLoS Med* **10**: e1001474, 2013.
- FRAYLING TM, TIMPSON NJ, WEEDON MN, ZEGGINI E, FREATHY RM, LINDGREN CM, PERRY JR, ELLIOTT KS, LANGO H, RAYNER NW, SHIELDS B, HARRIES LW, BARRETT JC, ELLARD S, GROVES CJ, KNIGHT B, PATCH AM, NESS AR, EBRAHIM S, LAWLOR DA, RING SM, BENSLOMO Y, JÄRVELIN MR, SOVIO U, BENNETT AJ, MELZER D, FERRUCCI L, LOOS RJ, BARROSO I, WAREHAM NJ, KARPE F, OWEN KR, CARDON LR, WALKER M, HITMAN GA, PALMER CN, DONEY AS, MORRIS AD, SMITH GD, HATTERSLEY AT, MCCARTHY MI: A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* **316**: 889-894, 2007.

- FREATHY RM, TIMPSON NJ, LAWLOR DA, POUTA A, BEN-SHLOMO Y, RUOKONEN A, EBRAHIM S, SHIELDS B, ZEGGINI E, WEEDON MN, LINDGREN CM, LANGO H, MELZER D, FERRUCCI L, PAOLISSO G, NEVILLE MJ, KARPE F, PALMER CN, MORRIS AD, ELLIOTT P, JARVELIN MR, SMITH GD, MCCARTHY MI, HATTERSLEY AT, FRAYLING TM: Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes* **57**: 1419-1426, 2008.
- FREDRIKSSON R, HÄGGLUND M, OLSZEWSKI PK, STEPHANSSON O, JACOBSSON JA, OLSZEWSKA AM, LEVINE AS, LINDBLOM J, SCHIÖTH HB: The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* **149**: 2062-2071, 2008.
- GERKEN T, GIRARD CA, TUNG YC, WEBBY CJ, SAUDEK V, HEWITSON KS, YEO GS, McDONOUGH MA, CUNLIFFE S, McNEILL LA, GALVANOVSKIS J, RORSMAN P, ROBINS P, PRIEUR X, COLL AP, MA M, JOVANOVIC Z, FAROOQI IS, SEDGWICK B, BARROSO I, LINDAHL T, PONTING CP, ASHCROFT FM, O'RAHILLY S, SCHOFIELD CJ: The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* **318**: 1469-1472, 2007.
- GRUNNET LG, NILSSON E, LING C, HANSEN T, PEDERSEN O, GROOP L, VAAG A, POULSEN P: Regulation and function of FTO mRNA expression in human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Diabetes* **58**: 2402-2408, 2009.
- HO KK, O'SULLIVAN AJ, WOLTERS T, LEUNG KC: Metabolic effects of oestrogens: impact of the route of administration. *Ann Endocrinol* **64**: 170-177, 2003.
- HUBACEK JA, BOHUSLAVOVA R, KUTHANOVA L, KUBINOVA R, PEASEY A, PIKHART H, MARMOT MG, BOBAK M: The FTO gene and obesity in a large Eastern European population sample: the HAPIEE study. *Obesity* **16**: 2764-2766, 2008.
- HUBACEK JA, PITHA J, ADAMKOVA V, LANSKA V, POLEDNE R: A common variant in the FTO gene is associated with body mass index in males and postmenopausal females but not in premenopausal females. Czech post-MONICA and 3PMFs studies. *Clin Chem Lab Med* **47**: 387-390, 2009.
- KOKSHOORN NE, BIERMASZ NR, ROELFSEMA F, SMIT JW, PEREIRA AM, ROMIJN JA: GH replacement therapy in elderly GH-deficient patients: a systematic review. *Eur J Endocrinol* **164**: 657-665, 2011.
- MATSUDA M, DEFRONZO RA: Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* **22**: 1462-1470, 1999.
- 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 concentration in man. *Diabetologia* **28**: 412-419, 1985.
- PENA-BELLO L, PERTEGA-DIAZ S, OUTEIRIÑO-BLANCO E, GARCIA-BUELA J, TOVAR S, SANGIAO-ALVARELLOS S, DIEGUEZ C, CORDIDO F: Effect of oral glucose administration on rebound growth hormone release in normal and obese women: the role of adiposity, insulin sensitivity and ghrelin. *PLoS One* **10**: e0121087, 2015.
- ROSSKOPF D, SCHWAHN C, NEUMANN F, BORNHORST A, RIMMBACH C, MISCHKE M, WOLF S, GEISLER I, KOCHER T, GRABE HJ, NAUCK M, HEBEBRAND J, KROEMER HK, FRIEDRICH N, VÖLZKE H, WALLASCHOFSKI H: The growth hormone-IGF-I axis as a mediator for the association between FTO variants and body mass index: results of the Study of Health in Pomerania. *Int J Obes* **35**: 364-372, 2011.
- RUAN W, LAI M: Insulin-like growth fact binding protein: a possible marker for metabolic syndrome? *Acta Diabetol* **47**: 5-14, 2010.
- RUDLING M, ANGELIN B: Growth hormone reduces plasma cholesterol in LDL receptor-deficient mice. *FASEB J* **15**: 1350-1356, 2001.
- SANCHEZ-PULIDO L, ANDRADE-NAVARRO MA: The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem* **8**: 23, 2007.
- SAVASTANO S, DI SOMMA C, BARREA L, COLAO A: The complex relationship between obesity and the somatropic axis: the long and winding road. *Growth Horm IGF Res* **24**: 221-226, 2014.

- SCOTT LJ, MOHLKE KL, BONNYCASTLE LL, WILLER CJ, LI Y, DUREN WL, ERDOS MR, STRINGHAM HM, CHINES PS, JACKSON AU, PROKUNINA-OLSSON L, DING CJ, SWIFT AJ, NARISU N, HU T, PRUIM R, XIAO R, LI XY, CONNEELY KN, RIEBOW NL, SPRAU AG, TONG M, WHITE PP, HETRICK KN, BARNHART MW, BARK CW, GOLDSTEIN JL, WATKINS L, XIANG F, SARAMIES J, BUCHANAN TA, WATANABE RM, VALLE TT, KINNUNEN L, ABECASIS GR, PUGH EW, DOHENY KF, BERGMAN RN, TUOMILEHTO J, COLLINS FS, BOEHNKE M: A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* **316**: 1341-1345, 2007.
- SCUTERI A, SANNA S, CHEN WM, UDA M, ALBAI G, STRAIT J, NAJJAR S, NAGARAJA R, ORRÚ M, USALA G, DEI M, LAI S, MASCHIO A, BUSONERO F, MULAS A, EHRET GB, FINK AA, WEDER AB, COOPER RS, GALAN P, CHAKRAVARTI A, SCHLESSINGER D, CAO A, LAKATTA E, ABECASIS GR: Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* **3**: e115, 2007.
- TSCHRITTER O, PREISSL H, YOKOYAMA Y, MACHICAO F, HÄRING HU, FRITSCHKE A: Variation in the FTO gene locus is associated with cerebrocortical insulin resistance in humans. *Diabetologia* **50**: 2602-2603, 2007.
- VCELAK, J, LUKASOVA P, VANKOVA M, VEJRAZKOVA D, KVASNICKOVA H, VRBIKOVA J, VONDRA K, BENDLOVA B: FTO gene is associated not only with obesity-related quantitative traits but also with higher OGTT stimulated glycaemia and leptin levels. *Diabetologia* **51** (Suppl 1): 326, 2008.
- WÄHLÉN K, SJÖLIN E, HOFFSTEDT J: The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res* **49**: 607-611, 2008.
- WELTMAN A, DESPRES JP, CLASEY JL, WELTMAN JY, WIDEMAN L, KANALEY J, PATRIE J, BERGERON J, THORNER MO, BOUCHARD C, HARTMAN ML: Impact of abdominal visceral fat, growth hormone, fitness, and insulin on lipids and lipoproteins in older adults. *Metabolism* **52**: 73-80, 2003.
- WYNN V, DOAR J: Some effects of oral contraceptives on carbohydrate metabolism. *Lancet* **2**: 715-719, 1996.
- WYNN V, DOAR J, MILLS G: Some effects of oral contraceptives on serum-lipid and lipoprotein levels. *Lancet* **2**: 720-723, 1996.

5.3 Asociace polymorfismů kandidátních genů pro obezitu s metabolickým syndromem a s ním souvisejících parametrů u 1443 českých adolescentů

DUŠÁTKOVÁ L, ZAMRAZILOVÁ H, SEDLÁČKOVÁ B, VČELÁK J, HLA VATÝ P, ALDHOON HAINEROVÁ I, KORENKOVÁ V, BRADNOVÁ O, BENDLOVÁ B, KUNEŠOVÁ M, HAINER V. *Folia Biol (Praha)*. 2013; **59**(3): 123-33. IF=1,000

Celogenomové asociační studie odhalily řadu genetických variant spojených s obezitou, ovšem pouze několik dalších studií zkoumalo jejich souvislost i s metabolickým syndromem.

Cílem této studie bylo stanovit genotypy jedenácti variant uvnitř nebo v blízkosti osmi genů (*TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R* a *FTO*) a zjistit jejich vliv na rozvoj obezity, metabolického syndromu a dalších parametrů u 1443 českých adolescentů, z nichž bylo 661 chlapců a 782 děvčat ve věku od 13,0 do 17,9 let. Soubor tvořilo 60 adolescentů s podváhou, 713 s normální hmotností, 194 s nadváhou a 476 obézních adolescentů.

Potvrdili jsme asociaci varianty rs9939609 v genu *FTO* s nadváhou (OR=1,27; 95% CI: 1,01–1,59; p = 0,046) a obezitou (OR=1,46; 95% CI:1,24–1,73; p < 0,001), naopak varianta rs7561317 v genu *TMEM18* souvisela s fenotypem podváhy (OR=1,78; 95% CI: 1,14–2,79; p = 0,015). Varianty rs925946 v genu *BDNF* a rs17782313 v genu *MC4R* zvyšovaly riziko vzniku metabolického syndromu (OR = 1,53; 95% CI: 1,14–2,04; p = 0,005; resp. OR = 1,51; 95% CI 1,12–2,04; p = 0,009). Varianta rs6235 v genu *PCSK1* negativně korelovala s hladinou krevní glukózy (OR = 0,69; 95 % CI 0,49–0,97; p = 0,04).

V této studii jsme potvrdili asociace běžných variant v genu *FTO* s nadváhou a obezitou i v populaci českých adolescentů. Zjistili jsme asociace variant v genech *MC4R* a *BDNF* se zvýšeným rizikem vzniku metabolického syndromu, pravděpodobně v důsledku jejich vlivu na abdominální obezitu. Naopak varianta v genu pro *PCSK1* má zřejmě protektivní účinek proti rozvoji glukózové intolerance.

Na této studii jsem se podílela sběrem dat a provedením genotypické analýzy variant rs12970134 a rs17782313 v genu MC4R.

Original Article

Association of Obesity Susceptibility Gene Variants with Metabolic Syndrome and Related Traits in 1,443 Czech Adolescents

(single-nucleotide polymorphism / *FTO* gene / obesity, metabolic syndrome / adolescence)

L. DUŠÁTKOVÁ^{1,2}, H. ZAMRAZILOVÁ¹, B. SEDLÁČKOVÁ^{1,3}, J. VČELÁK⁴,
P. HLAVATÝ¹, I. ALDHOON HAINEROVÁ^{1,5}, V. KORENKOVÁ⁶, O. BRADNOVÁ^{4,7},
B. BENDLOVÁ⁴, M. KUNEŠOVÁ¹, V. HAINER¹

Institute of Endocrinology, ¹Obesity Management Centre, ⁴Department of Molecular Endocrinology, Prague, Czech Republic

Faculty of Science, Charles University in Prague, ²Department of Genetics and Microbiology,

³Department of Biochemistry, ⁷Department of Anthropology and Human Genetics, Prague, Czech Republic

⁵Department of Paediatrics and Centre for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

⁶Laboratory of Gene Expression, Institute of Biotechnology AS CR, v. v. i., Prague, Czech Republic

Abstract. Genome-wide association studies have revealed several gene variants associated with obesity; however, only a few studies have further investigated their association with metabolic syndrome. We performed a study of eleven variants in/near genes *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R*, and *FTO* in Czech adolescents and analysed their association with obesity, metabolic syndrome

and related traits. Genotyping was performed in 1,443 adolescents aged 13.0–17.9 years. Anthropometric parameters, biochemical parameters and blood pressure were assessed. Metabolic syndrome was defined according to the International Diabetes Federation. The *FTO* rs9939609 variant was associated with overweight/obesity (OR 1.40, 95% CI 1.21–1.63, $P < 0.001$). The minor allele of *TMEM18* rs7561317 was related to underweight (OR 1.78, 95% CI 1.14–2.79, $P = 0.015$). *BDNF* rs925946 and *MC4R* rs17782313 were associated with metabolic syndrome (OR 1.53, 95% CI 1.14–2.04, $P = 0.005$; 1.51, 95% CI 1.12–2.04, $P = 0.009$). The *PCSK1* rs6235 variant was negatively related to increased blood glucose (OR 0.69, 95% CI 0.49–0.97, $P = 0.040$). In conclusion, the *FTO* variant was associated with overweight/obesity in Czech adolescents. Moreover, *MC4R* and *BDNF* variants increased the risk of metabolic syndrome, probably through their effect on abdominal obesity. The *PCSK1* variant may have a protective role in the development of type 2 diabetes.

Received January 16, 2013. Accepted February 26, 2013.

This study was supported by GAUK 370911 of the Charles University Grant Agency, NT/13792 of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, 7F08077 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant of the Danone Institute and CZ0123 from Norway through the Norwegian Financial Mechanisms.

Corresponding author: Lenka Dušátková, Obesity Management Centre, Institute of Endocrinology, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. Phone: (+420) 723 519 898; Fax: (+420) 224 905 325; e-mail: ldusatkova@gmail.com

Abbreviations: BDNF – brain-derived neurotrophic factor, BMI – body mass index, CI – confidence intervals, COPAT – Childhood Obesity Prevalence And Treatment, FTO – fat mass and obesity associated, GWAS – genome-wide association studies, HDL – high-density lipoprotein, IDF – International Diabetes Federation, KCTD15 – potassium channel tetramerization domain containing 15, LDL – low-density lipoprotein, MC4R – melanocortin 4 receptor, MS – metabolic syndrome, OR – odds ratio, PCSK1 – proprotein convertase subtilisin/kexin type 1, SDS – standard deviation score, SEC16B – SEC16 homologue B, SH2B1 – SH2B adaptor protein 1, SNP – single-nucleotide polymorphism, TMEM18 – transmembrane protein 18.

Introduction

The prevalence of obesity has been increasing worldwide in children and adolescents (Lobstein et al., 2004). This trend is alarming because obesity in childhood tends to persist to adulthood with a high incidence of cardiometabolic complications (Katzmarzyk et al., 2001). Metabolic syndrome (MS) is a cluster of risk factors for cardiometabolic diseases that includes abdominal obesity, dyslipidaemia, impaired glucose metabolism and hypertension (Zimmet et al., 2007). Due to the

current obesity epidemic, MS is often diagnosed already in children and adolescents (Bokor et al., 2008).

Genome-wide association studies (GWAS) have identified several loci associated with body mass index (BMI) and obesity. In 2007, a variant of the fat mass and obesity associated gene (*FTO*) demonstrating a strong association with BMI was discovered and until now has been considered as one of the most studied genes related to obesity (Frayling et al., 2007). The following year, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) near the melanocortin 4 receptor gene (*MC4R*) (Loos et al., 2008) and the proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 gene (*PCSK1*) were designated as candidate genes for obesity (Benzinou et al., 2008). Thanks to extensive GWAS, 10 other obesity susceptibility loci were identified, e.g. transmembrane protein 18 (*TMEM18*), SH2B adaptor protein 1 (*SH2B1*), potassium channel tetramerization domain containing 15 (*KCTD15*), brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*), and SEC16 homologue B (*SEC16B*) (Thorleifsson et al., 2009; Willer et al., 2009). The last GWAS focusing on BMI associations confirmed 14 previously reported loci and revealed 18 new loci (Speliotes et al., 2010). Most of the mentioned SNPs have been replicated in children and adolescents with a similar effect on BMI (Zhao et al., 2009; den Hoed et al., 2010). Confirmation and extension of findings from GWAS in selected population represents the next step of further investigations.

The aim of the present study was to explore the association of 11 previously reported variants in/near genes *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R* and *FTO* with different body weight statuses (underweight, normal weight, overweight, obesity), abdominal obesity, MS and related traits in Czech adolescents.

Material and Methods

Subjects

The total of 1,443 adolescents (661 boys, 782 girls) aged 13.0–17.9 years were recruited from the Czech Childhood Obesity Prevalence And Treatment (COPAT) project, focused on risk factors for obesity and MS in the adolescence. The COPAT project was conducted in different regions across the Czech Republic and included a representative cohort (N = 1,533) established by the stratified random selection and overweight/obese adolescents (N = 562) that had undergone a 4-week weight management programme in specialized clinical settings.

The present study included participants from both cohorts: 60 underweight, 713 normal weight, 194 overweight and 476 obese adolescents characterized in Table 1. Underweight, normal weight, overweight and obesity were defined by BMI percentiles according to the Czech national reference data (Kobzova et al., 2004): $\leq 10^{\text{th}}$, $10^{\text{th}}-90^{\text{th}}$, $90^{\text{th}}-97^{\text{th}}$, $\geq 97^{\text{th}}$, respectively. The standard deviation scores (SDS) of anthropometric parameters were assessed according to the national reference data (Kobzova et al., 2004). The reference percentiles of German adolescent population were used for the waist circumference (Haas et al., 2011). MS was defined according to the International Diabetes Federation (IDF) criteria for children and adolescents (Zimmet et al., 2007).

The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology and was performed in accordance with the Helsinki Declaration. All participants and their parent(s) provided written informed consent.

Anthropometric and biochemical characteristics

Body height was measured by a stadiometer (precision 0.1 cm); body weight was measured by Tanita

Table 1. Characteristics of the studied cohort

Variable	Underweight	Normal weight	Overweight	Obese
Number	60	713	194	476
Boys/girls	23/37	337/376	85/109	216/260
Age (years)	16.4 (15.5–17.1)	16.0 (15.1–16.9)	15.8 (14.6–17)	15.4 (14.2–16.6)
Height-SDS	-0.3 (-0.9–0.3)	-0.1 (-0.7–0.6)	0.0 (-0.5–0.8)	0.2 (-0.6–0.8)
Weight-SDS	-1.4 (-1.7–1.0)	-0.1 (-0.6–0.5)	1.5 (1.1–1.9)	3.2 (2.4–4.4)
BMI-SDS	-1.4 (-1.6–1.2)	0.0 (-0.5–0.5)	1.5 (1.3–1.8)	3.3 (2.6–4.6)
Waist circumference-SDS	-1.3 (-1.6–1.0)	-0.4 (-0.8–0)	0.7 (0.4–1.2)	2.3 (1.5–3.1)
Abdominal circumference-SDS	-0.5 (-1–0.2)	0.4 (-0.1–1)	2.3 (1.6–2.8)	4.3 (3.3–5.4)
Hip circumference-SDS	-1.2 (-1.4–0.7)	0.0 (-0.5–0.6)	1.4 (1.1–1.9)	2.8 (2.1–3.7)
Arm circumference-SDS	-1.3 (-1.7–0.9)	0.1 (-0.3–0.7)	1.7 (1.2–2.2)	3.1 (2.4–3.9)
Total body fat (%)	15.2 (12.4–18.5)	20.1 (15.1–24.4)	29.3 (23.1–32.1)	35.4 (30.6–40)
Trunk fat (%)	11 (8.1–13)	15.2 (11.3–19.5)	23.8 (19.4–27.3)	30.4 (25.8–35.9)
Systolic blood pressure (mmHg)	114 (105–124)	121 (111–128)	120 (111–128)	122 (113–131)
Diastolic blood pressure (mmHg)	76 (69–81)	77 (72–83)	76 (72–82)	78 (73–84)
Glucose (mmol/l)	5.0 (4.7–5.4)	5.0 (4.7–5.2)	5.0 (4.7–5.3)	5.0 (4.7–5.3)
C-peptide (mmol/l)	0.7 (0.6–0.8)	0.7 (0.6–0.8)	0.8 (0.7–0.9)	0.9 (0.7–1.2)
Insulin (mmol/l)	9.2 (6.4–12.8)	9.7 (7.3–12.8)	11.8 (8.8–15.4)	14.7 (10.7–21.5)
Triglycerides (mmol/l)	0.7 (0.6–1.0)	0.8 (0.6–1.1)	0.9 (0.7–1.1)	1.1 (0.8–1.6)
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.5 (1.2–1.7)	1.4 (1.2–1.6)	1.3 (1.1–1.5)	1.2 (1–1.4)
Total cholesterol (mmol/l)	4.3 (3.7–4.6)	4.0 (3.6–4.6)	4.1 (3.7–4.7)	4.3 (3.7–4.9)
LDL-cholesterol (mmol/l)	2.1 (1.7–2.5)	2.1 (1.7–2.6)	2.3 (1.9–2.8)	2.4 (2.0–3.0)

Data are expressed as a median (lower–upper quartile).

BC-418 MA (Tanita Corporation, Tokyo, Japan; precision 0.1 kg). Body circumferences were determined by a tape measure (precision 0.1 cm) in a horizontal level; waist circumference midway between the upper iliac crest and the lower rib, abdominal circumference at the level of umbilicus, hip circumference over the maximum buttocks diameter, arm circumference in the middle of relaxed arm. The percentage of total body and trunk fat was measured by bioelectric impedance Tanita BC-418 MA and Tanita AB-140 ViScan (Tanita Corporation, Tokyo, Japan). We previously demonstrated that trunk fat determined by bioelectric impedance in Czech adolescents highly correlated with both dual-energy X-ray absorptiometry and magnetic resonance imaging measurements (Zamrazilova et al., 2010).

Peripheral blood samples were taken from the cubital vein after an overnight fast. Glucose, insulin, C-peptide, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and triglycerides were determined using the Cobas® 6000 instrument and commercial kits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Blood pressure was measured by the arm sphygmomanometer with appropriate cuff size. Two sets of measurements were performed and an average value was calculated.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using QuickGene DNA whole blood kit (Fujifilm, Tokyo, Japan). Genotyping of SNPs: rs7561317 (*TMEM18*), rs7498665 (*SH2B1*), rs29941 (*KCTD15*), rs6232 and rs6235 (*PCSK1*), rs925946 and rs4923461 (*BDNF*), rs10913469 (*SEC16B*), rs12970134 and rs17782313 (*MC4R*), rs9939609 (*FTO*) was performed using the TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). The assays were run in a Biomark instrument (Fluidigm, South San Francisco, CA) and rs12970134, rs17782313, and rs9939609 in a LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland). To ensure consistency among runs, samples of known genotypes and negative controls were used in every run. The genotype distributions of all SNPs followed the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.2$). The SNPs located in *PCSK1* (rs6232, rs6235) and *BDNF* (rs925946, rs4923461) were incompletely linked ($r^2 = 0.16$ and 0.11 , respectively). The SNPs near *MC4R* (rs12970134, rs17782313) were in high linkage disequilibrium ($r^2 = 0.79$).

Statistical analysis

The statistical software NCSS 2004 (NCSS LLC, Kaysville, Utah) and Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) were used. P values (two-tailed) < 0.05 were considered statistically significant. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the χ^2 test. Linkage disequilibrium was estimated using Haploview V3.2. (Barrett et al., 2005). Genotype and allele frequencies were compared by χ^2 test with Yates

correction. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CI) were calculated to determine associations of each SNP and weight status (underweight, overweight, obesity) using normal weight subjects as controls; for MS and its components, non-carriers were used as controls. Association of SNPs and quantitative traits (anthropometric, biochemical characteristics, blood pressure) were analysed by general linear models after adjustments for sex and age. Anthropometric traits were additionally adjusted for BMI. Due to the non-Gaussian distribution, data are expressed as medians with lower and upper quartiles.

Results

Associations with body weight categories

The observed genotype and allele frequencies of SNPs in the overweight/obese and underweight/normal weight adolescents are shown in Table 2. Significant differences were found for the *FTO* rs9939609 variant ($P < 0.001$) and the *SEC16B* rs10913469 variant ($P = 0.033$). The *FTO* rs9939609 A-allele was associated with overweight and/or obesity (Table 3). ORs were 1.27 (95% CI 1.01–1.59, $P = 0.046$) for overweight and 1.46 (95% CI 1.24–1.73, $P < 0.001$) for obesity. No other variants showed significant associations. In the case of *SEC16B* rs10913469 there was a tendency towards an association with overweight and obesity (OR 1.21, 95% CI 0.99–1.47, $P = 0.066$).

Associations between each SNP and underweight are demonstrated in Table 3. The *TMEM18* rs7561317 variant was found to be significantly related to underweight. The minor allele increased the risk of underweight (OR 1.78, 95% CI 1.14–2.79, $P = 0.015$).

Associations with metabolic syndrome

The prevalence of MS in our cohort of 1,443 Czech adolescents was 7.7 % (65 boys, 46 girls). MS was only present in overweight and obese adolescents in whom its prevalence reached 16.6 %. Table 3 shows associations of the 11 investigated variants with MS. The *BDNF* rs925946 T-allele ($P = 0.005$), the *MC4R* rs12970134 A-allele ($P = 0.035$), and the *MC4R* rs17782313 C-allele ($P = 0.009$) increased the risk of MS. However, the gender-specific analyses revealed that the increased risk was only significant in boys with OR of 1.77 (95% CI 1.22–2.59, $P = 0.004$ vs. girls $P = 0.412$) for *BDNF* rs925946 and OR of 1.56 (95% CI 1.05–2.33, $P = 0.036$ vs. $P = 0.156$) for *MC4R* rs17782313. The same tendency for the *MC4R* rs12970134 variant ($P = 0.069$) was also demonstrated in boys only.

A detailed case-control study was performed to determine the association of gene variants with individual risk factors of MS (carriers vs. non-carriers). Abdominal obesity was significantly related to the *FTO* variant (OR 1.39, 95% CI 1.19–1.64, $p < 0.001$). Furthermore, only in boys the minor alleles of *BDNF* rs925946 (OR 1.42, 95% CI 1.09–1.84, $p = 0.010$), *MC4R* rs12970134 (OR

Table 2. Differences of genotype and allele frequencies between overweight/obese and underweight/normal weight adolescents

Variant	Locus	Group	Genotypes (N)			P ^a	RAF (%)	P ^a
			AA	AG	GG			
rs7561317	TMEM18						G	
		UW/NW	14	208	551	0.611	84.7	0.477
		OW/OB	13	165	492		85.7	
rs7498665	SH2B1		AA	AG	GG		G	
		UW/NW	249	388	136	0.461	42.7	0.235
		OW/OB	234	329	106		40.4	
rs29941	KCTD15		AA	AG	GG		G	
		UW/NW	63	328	369	0.853	70.1	0.876
		OW/OB	57	274	326		70.5	
rs6232	PCSK1		CC	CT	TT		C	
		UW/NW	3	65	702	0.143	4.6	0.098
		OW/OB	2	77	589		6.1	
rs6235	PCSK1		CC	CG	GG		G	
		UW/NW	407	316	49	0.243	26.8	0.514
		OW/OB	375	246	49		25.7	
rs925946	BDNF		GG	GT	TT		T	
		UW/NW	401	318	54	0.520	27.6	0.831
		OW/OB	359	257	53		27.1	
rs4923461	BDNF		AA	AG	GG		A	
		UW/NW	468	263	40	0.673	77.8	0.859
		OW/OB	415	215	39		78.1	
rs10913469	SEC16B		CC	CT	TT		C	
		UW/NW	18	208	546	0.080	15.8	0.033
		OW/OB	20	213	437		18.9	
rs12970134	MC4R		AA	AG	GG		A	
		UW/NW	46	281	437	0.412	24.4	0.309
		OW/OB	51	241	364		26.1	
rs17782313	MC4R		CC	CT	TT		C	
		UW/NW	59	297	407	0.554	27.2	0.337
		OW/OB	51	256	312		28.9	
rs9939609	FTO		AA	AT	TT		A	
		UW/NW	139	387	240	<0.001	43.4	<0.001
		OW/OB	176	338	152		51.8	

^aP value was calculated by χ^2 test with Yates correction.

OW/OB – overweight/obese adolescents; UW/NW – underweight/normal weight adolescents; RAF – risk allele frequency

1.39, 95% CI 1.06–1.82, $p = 0.020$) and *MC4R* rs17782313 (OR 1.40, 95% CI 1.07–1.83, $P = 0.018$) increased the risk of abdominal obesity. Increased blood glucose was negatively associated with *PCSK1* rs6235

(OR 0.69, 95% CI 0.49–0.97, $P = 0.040$). The protective effect of this variant was only found in boys (OR 0.61, 95% CI 0.39–0.95, $P = 0.035$).

Table 3. Association of 11 SNPs with underweight, overweight and/or obesity, and metabolic syndrome

Variant	Locus	Risk allele	RAF (%)	Underweight		Overweight		Obesity		Overweight/obesity		Metabolic syndrome	
				OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
rs7561317	TMEM18	G	85	0.56 (0.36-0.88)	0.015	1.08 (0.78-1.49)	0.704	1.01 (0.80-1.27)	0.998	1.03 (0.83-1.27)	0.846	0.89 (0.61-1.29)	0.611
rs7498665	SH2B1	G	42	1.23 (0.85-1.79)	0.311	0.96 (0.76-1.20)	0.754	0.91 (0.77-1.08)	0.310	0.93 (0.80-1.08)	0.342	0.99 (0.75-1.30)	0.984
rs29941	KCTD15	G	71	0.75 (0.51-1.12)	0.190	1.10 (0.86-1.42)	0.480	0.95 (0.80-1.14)	0.630	0.99 (0.84-1.17)	0.969	0.84 (0.63-1.13)	0.283
rs6232	PCSK1	C	5	0.89 (0.35-2.26)	0.988	1.48 (0.93-2.37)	0.128	1.26 (0.87-1.82)	0.253	1.32 (0.95-1.85)	0.117	0.57 (0.26-1.22)	0.191
rs6235	PCSK1	G	27	0.70 (0.44-1.10)	0.152	0.86 (0.67-1.12)	0.292	0.94 (0.78-1.13)	0.563	0.92 (0.78-1.09)	0.349	0.87 (0.63-1.20)	0.459
rs925946	BDNF	T	28	0.71 (0.45-1.11)	0.162	0.90 (0.70-1.16)	0.469	0.98 (0.81-1.17)	0.838	0.95 (0.81-1.13)	0.618	1.53 (1.14-2.04)	0.005
rs4923461	BDNF	A	78	1.04 (0.66-1.63)	0.965	1.09 (0.83-1.43)	0.598	1.00 (0.82-1.22)	0.970	1.02 (0.85-1.22)	0.839	1.20 (0.85-1.70)	0.337
rs10913469	SEC16B	C	16	0.69 (0.39-1.22)	0.245	1.26 (0.95-1.69)	0.127	1.19 (0.96-1.47)	0.136	1.21 (0.99-1.47)	0.066	1.06 (0.74-1.51)	0.819
rs12970134	MC4R	A	24	1.06 (0.69-1.63)	0.877	0.99 (0.76-1.29)	0.975	1.15 (0.95-1.39)	0.162	1.10 (0.93-1.31)	0.295	1.40 (1.03-1.89)	0.035
rs17782313	MC4R	C	27	1.04 (0.69-1.59)	0.930	0.97 (0.75-1.25)	0.849	1.15 (0.95-1.39)	0.157	1.09 (0.92-1.30)	0.328	1.51 (1.12-2.04)	0.009
rs9939609	FTO	A	43	1.03 (0.71-1.50)	0.957	1.27 (1.01-1.59)	0.046	1.46 (1.24-1.73)	<0.001	1.40 (1.21-1.63)	<0.001	1.02 (0.77-1.34)	0.961

RAF – risk allele frequency

Table 4. Association of FTO and SEC16B genotypes with anthropometric parameters

FTO rs9939609	AT		AA	P
	β est ± SE	β est ± SE	β est ± SE	
Weight-SDS	0.25 ± 0.12	0.61 ± 0.15	0.61 ± 0.15	<0.001
BMI-SDS	0.28 ± 0.12	0.58 ± 0.15	0.58 ± 0.15	<0.001
Waist circumference-SDS	0.22 ± 0.10	0.46 ± 0.11	0.46 ± 0.11	<0.001
Abdominal circumference-SDS	0.33 ± 0.13	0.69 ± 0.16	0.69 ± 0.16	<0.001
Hip circumference-SDS	0.13 ± 0.11	0.47 ± 0.13	0.47 ± 0.13	<0.001
Arm circumference-SDS	0.23 ± 0.11	0.49 ± 0.13	0.49 ± 0.13	<0.001
Total body fat (%)	1.10 ± 0.53	2.68 ± 0.64	2.68 ± 0.64	<0.001
Trunk fat (%)	1.16 ± 0.57	2.89 ± 0.68	2.89 ± 0.68	<0.001

SEC16B rs10913469	CT		CC	P
	β est ± SE	β est ± SE	β est ± SE	
Weight-SDS	0.30 ± 0.11	0.22 ± 0.33	0.22 ± 0.33	0.033
BMI-SDS	0.31 ± 0.12	0.22 ± 0.33	0.22 ± 0.33	0.024
Abdominal circumference-SDS	0.32 ± 0.12	0.27 ± 0.35	0.27 ± 0.35	0.032
Arm circumference-SDS	0.28 ± 0.10	0.28 ± 0.28	0.28 ± 0.28	0.018

P values were calculated by generalized linear regression using an additive model adjusted for sex and age. ^aParameters were additionally adjusted for BMI.

β est – coefficient estimate (compared to the wild-type genotype); SE – standard error

Associations with anthropometric and biochemical parameters

Only significant associations of anthropometric and biochemical parameters with the studied gene variants are presented in Table 4. The *FTO* rs9939609 genotype was strongly related to body weight, BMI, body circumferences, total body and trunk fat ($P < 0.001$). The *SEC16B* rs10913469 genotype was associated with an increased body weight, BMI, abdominal and arm circumferences ($P < 0.05$). Gender-stratified analyses revealed further associations. Only in boys, associations of body weight with *MC4R* rs12970134 ($P = 0.004$) and *MC4R* rs17782313 ($P = 0.014$) and an association of abdominal circumference with the rs17782313 variant ($P = 0.032$) were found. However, after additional ad-

justment for BMI, none of the above-mentioned associations remained statistically significant.

Discussion

We evaluated 11 previously reported gene variants and their associations with weight statuses in 1,443 Czech adolescents. The association of *FTO* variants in Czech adults has already been confirmed (Hubacek et al., 2008), in contrast to the other obesity susceptibility locus in insulin-induced gene 2, which was not associated (Hubáček et al., 2010). This is the first study of other obesity gene variants performed in Czech adolescents. We confirmed the strong association of *FTO* rs9939609 with overweight and obesity with a similar effect as in previously published studies performed in European descendants (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007). The 10 remaining SNPs have not been found to be related to obesity. These associations have already been confirmed in children and adolescents; however, mostly in larger studies and meta-analyses (Zhao et al., 2009; den Hoed et al., 2010). We assumed that we were not able to replicate the small effects (mostly explaining 1.12 % of the total variation for BMI Z-score) of the SNPs (Zhao et al., 2009). The *SEC16B* rs10913469 variant showed the same tendency as the *FTO* variant. We demonstrated that this SNP was associated with increased anthropometric parameters. However, we suppose that the low number of minor homozygotes in our cohort might have been limiting. Variants near *MC4R* were related to body weight and abdominal circumference, but only in boys. A recent study of eight common obesity variants also found gender-specific differences (Wang et al., 2012).

Our studied population included all weight categories (obese, overweight, normal weight and underweight), and thus we were also able to perform the case-control study with underweight as the opposite extreme of BMI variability. In the GWAS of Willer et al. (2009), the major allele of *TMEM18* rs7561317 was described as the obesity risk allele. Surprisingly, the results of our study demonstrated that the minor allele of this variant significantly increased the risk of being underweight. *TMEM18* is a DNA-binding protein that could possibly affect repression of the transcription of chromatin (Jurvansuu and Goldman, 2011). However, its involvement in the pathogenesis of obesity has not yet been elucidated. Our findings have to be confirmed by other independent studies. We are aware of the low frequency of the *TMEM18* minor allele. Nonetheless, we emphasize the importance of focusing further investigations on underweight individuals as well. Jacquemont et al. (2011) have recently published a study in which they suggested that severe obesity and underweight might share similar genetic background.

Metabolic syndrome

Abdominal obesity defined by waist circumference is usually considered as a crucial marker of MS (Bitsori et al., 2009). The prevalence of MS has been rapidly in-

creasing in overweight and obese individuals (Weiss et al., 2004). In our study, only overweight and obese adolescents fulfilled the IDF criteria for MS. Although several GWAS have identified SNPs related to the various metabolic traits in recent years (Newton-Cheh et al., 2009; Fox et al., 2012; Tukiainen et al., 2012), there is still a lack of studies focused on MS as a complex disorder.

We found an association between the *FTO* variant and abdominal obesity. However, the association did not remain significant after the adjustment for BMI, similarly to other studied anthropometric parameters. It seems that the *FTO* variant has an effect on BMI in general, but does not influence the body fat distribution (e.g. abdominal obesity) and related metabolic risks. Several studies investigated the association of SNPs in *FTO* with metabolic traits (Liem et al., 2010), but their findings were not consistent. In agreement with our results, Müller et al. (2008) found no association between the *FTO* variant and biochemical parameters. According to the meta-analyses performed by Wang et al. (2011) and Zhou et al. (2012), *FTO* variants were associated with MS but dependent on the used definition for the MS. A significant association in adult Europeans was only found when the Third Report of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel criteria (2002) of MS were applied.

According to our results, the *BDNF* rs925946 and the *MC4R* rs12970134 and rs17782313 variants increased the risk of MS. However, the association of *MC4R* rs12970134 seems to be mediated through *MC4R* rs17782313 because of the observed high linkage disequilibrium between these SNPs and a weaker association with MS for the rs12970134 variant. *BDNF* and *MC4R* variants found only in boys probably play a role in the development of abdominal obesity. *BDNF*, a member of the nerve growth factor family, is necessary for survival of striatal neurons in the brain and should be an important mediator of energy balance regulated by the *MC4R* gene (Zuccato et al., 2001; Xu et al., 2003). Evidences about the involvement of *BDNF* in the pathogenesis of MS have so far only been at the experimental level. Heterozygous knockout mice exhibited elevated levels of glucose, insulin and leptin (Duan et al., 2003). Human studies focused on the association of plasma *BDNF* with MS showed discrepancies (Levinger et al., 2008; Corripio et al., 2012). Sandholt et al. (2011) revealed association of *BDNF* rs925946 with elevated blood glucose, although more likely mediated through BMI. G protein-coupled *MC4R* is the key factor in the regulation of food intake and energy homeostasis in the hypothalamus (Marsh et al., 1999). rs17782313 is mapped at 188 kb downstream of the *MC4R* gene, but it is still unclear whether it modulates *MC4R* expression (Loos et al., 2008). The association of *MC4R* variants with MS and related traits has not been clearly demonstrated. However, in studies of males, rs17782313 was shown to be associated with lower HDL cholesterol (Kring et al., 2010) and elevated diastolic blood pres-

sure (Vogel et al., 2011). In agreement with our results, Zobel et al. (2009) found no associations with blood glucose, insulin, C-peptide and lipids in the study of 14,940 Danes.

PCSK1 is a neuroendocrine convertase that activates hormones and neuropeptides. Mutations in the *PCSK1* gene cause monogenic obesity accompanied by malabsorption and impaired glucose homeostasis (Jackson et al., 1997). In our cohort, the obesity risk allele of *PCSK1* rs6235 was less frequent in subjects with elevated blood glucose. A similar finding was shown in a study of middle-aged Danes, in whom the risk allele carriers had significantly lower fasting glucose (Gjesing et al., 2011). Our data support the finding of Gjesing and the hypothesis that the variants in *PCSK1* may be protective against type 2 diabetes.

In our study, most of the associations were only observed in boys, who further demonstrated a higher frequency of MS in comparison to girls. It is well known that abdominal obesity as the key component for MS is characteristic for men, in contrast to the gynoid obesity, which is more prevalent in women and is characterized by rare cardiometabolic complications (Canoy et al., 2004). Therefore, the gender-specific effect of obesity-related SNPs should be considered in the pathogenesis of abdominal obesity and MS. GWAS focused on abdominal subcutaneous and visceral fat or the waist-to-hip ratio also revealed some loci with strong sex interactions (Heid et al., 2010; Fox et al., 2012). Further studies are necessary to confirm these findings and extend knowledge about the involvement and possible interaction of *MC4R*, *BDNF* and *PCSK1* variants in the regulation of energy metabolism. Moreover, according to our results, we could hypothesize that *PCSK1* and *TMEM18* variants may contribute to the metabolically healthy obesity (Stefan et al., 2008).

In conclusion, in our cohort of 1,443 Czech adolescents, of the 11 studied gene variants, an association with obesity was only confirmed for the *FTO* variant. Interestingly, the *TMEM18* variant was associated with underweight. *MC4R* and *BDNF* variants increased the risk of MS, probably through their effect on fat distribution represented by abdominal obesity. The *PCSK1* variant was negatively associated with elevated blood glucose, and thus seems to have a protective role in the development of type 2 diabetes.

Acknowledgement

The authors report no conflicts of interest.

References

- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., Daly, M. J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263-265.
- Benzinou, M., Creemers, J. W., Choquet, H., Lobbens, S., Dina, C., Durand, E., Guerardel, A., Boutin, P., Jouret, B., Heude, B., Balkau, B., Tichet, J., Marre, M., Potoczna, N., Horber, F., Le Stunff, C., Czernichow, S., Sandback, A., Lauritzen, T., Borch-Johnsen, K., Andersen, G., Kiess, W., Komer, A., Kovacs, P., Jacobson, P., Carlsson, L. M., Walley, A. J., Jorgensen, T., Hansen, T., Pedersen, O., Meyre, D., Froguel, P. (2008) Common nonsynonymous variants in *PCSK1* confer risk of obesity. *Nat. Genet.* **40**, 943-945.
- Bitsori, M., Linardakis, M., Tabakaki, M., Kafatos, A. (2009) Waist circumference as a screening tool for the identification of adolescents with the metabolic syndrome phenotype. *Int. J. Pediatr. Obes.* **4**, 325-331.
- Bokor, S., Frelut, M. L., Vania, A., Hadjiathanasiou, C. G., Anastasakou, M., Malecka-Tendera, E., Matusik, P., Molnar, D. (2008) Prevalence of metabolic syndrome in European obese children. *Int. J. Pediatr. Obes.* **3** (Suppl 2), 3-8.
- Canoy, D., Luben, R., Welch, A., Bingham, S., Wareham, N., Day, N., Khaw, K. T. (2004) Fat distribution, body mass index and blood pressure in 22,090 men and women in the Norfolk cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk) study. *J. Hypertens.* **22**, 2067-2074.
- Corripio, R., Gonzalez-Clemente, J. M., Jacobo, P. S., Silvia, N., Luis, G., Joan, V., Assumpta, C. (2012) Plasma brain-derived neurotrophic factor in prepubertal obese children: results from a 2-year lifestyle intervention programme. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **77**, 715-720.
- den Hoed, M., Ekelund, U., Brage, S., Grontved, A., Zhao, J. H., Sharp, S. J., Ong, K. K., Wareham, N. J., Loos, R. J. (2010) Genetic susceptibility to obesity and related traits in childhood and adolescence: influence of loci identified by genome-wide association studies. *Diabetes* **59**, 2980-2988.
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Komer, A., Jacobson, P., Carlsson, L. M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoeur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., Bougneres, P., Kovacs, P., Marre, M., Balkau, B., Cauchi, S., Chevre, J. C., Froguel, P. (2007) Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet.* **39**, 724-726.
- Duan, W., Guo, Z., Jiang, H., Ware, M., Mattson, M. P. (2003) Reversal of behavioral and metabolic abnormalities, and insulin resistance syndrome, by dietary restriction in mice deficient in brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology* **144**, 2446-2453.
- Fox, C. S., Liu, Y., White, C. C., Feitosa, M., Smith, A. V., Heard-Costa, N., Lohman, K., Johnson, A. D., Foster, M. C., Greenawald, D. M., Griffin, P., Ding, J., Newman, A. B., Tylavsky, F., Miljkovic, I., Kritchevsky, S. B., Launer, L., Garcia, M., Eiriksdottir, G., Carr, J. J., Gudnason, V., Harris, T. B., Cupples, L. A., Borecki, I. B. (2012) Genome-wide association for abdominal subcutaneous and visceral adipose reveals a novel locus for visceral fat in women. *PLoS Genet.* **8**, e1002695.
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A. M., Ness, A. R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., Ring, S. M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M. R., Sovio, U., Bennett, A. J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R. J., Barroso, I., Wareham, N. J., Karpe, F., Owen, K. R., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Palmer, C. N., Doney, A. S., Morris, A. D., Smith, G. D., Hattersley, A. T., McCarthy, M. I. (2007) A

- common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* **316**, 889-894.
- Gjesing, A. P., Vestmar, M. A., Jorgensen, T., Henri, M., Holst, J. J., Witte, D. R., Hansen, T., Pedersen, O. (2011) The effect of PCSK1 variants on waist, waist-hip ratio and glucose metabolism is modified by sex and glucose tolerance status. *PLoS One* **6**, e23907.
- Haas, G. M., Liepold, E., Schwandt, P. (2011) Percentile curves for fat patterning in German adolescents. *World J. Pediatr.* **7**, 16-23.
- Heid, I. M., Jackson, A. U., Randall, J. C., Winkler, T. W., Qi, L., Steinthorsdottir, V., Thorleifsson, G., Zillikens, M. C., Speliotes, E. K., Magi, R., Workalemahu, T., White, C. C., Bouatia-Naji, N., Harris, T. B., Berndt, S. I., Ingelsson, E., Willer, C. J., Weedon, M. N., Luan, J., Vedantam, S., Esko, T., Kilpelainen, T. O., Kutalik, Z., Li, S., Monda, K. L., Dixon, A. L., Holmes, C. C., Kaplan, L. M., Liang, L., Min, J. L., Moffatt, M. F., Molony, C., Nicholson, G., Schadt, E. E., Zondervan, K. T., Feitosa, M. F., Ferreira, T., Lango Allen, H., Weyant, R. J., Wheeler, E., Wood, A. R., Estrada, K., Goddard, M. E., Lettre, G., Mangino, M., Nyholt, D. R., Purcell, S., Smith, A. V., Visscher, P. M., Yang, J., McCarroll, S. A., Nemes, J., Voight, B. F., Absher, D., Amin, N., Aspelund, T., Coin, L., Glazer, N. L., Hayward, C., Heard-Costa, N. L., Hottenga, J. J., Johansson, A., Johnson, T., Kaakinen, M., Kapur, K., Ketkar, S., Knowles, J. W., Kraft, P., Kraja, A. T., Lamina, C., Leitzmann, M. F., McKnight, B., Morris, A. P., Ong, K. K., Perry, J. R., Peters, M. J., Polasek, O., Prokopenko, I., Rayner, N. W., Ripatti, S., Rivadeneira, F., Robertson, N. R., Sanna, S., Sovio, U., Surakka, I., Teumer, A., van Wingerden, S., Vitart, V., Zhao, J. H., Cavalcanti-Proenca, C., Chines, P. S., Fisher, E., Kulzer, J. R., Lecoeur, C., Narisu, N., Sandholt, C., Scott, L. J., Silander, K., Stark, K., Tammesoo, M. L., Teslovich, T. M., Timpon, N. J., Watanabe, R. M., Welch, R., Chasman, D. I., Cooper, M. N., Jansson, J. O., Kettunen, J., Lawrence, R. W., Pellikka, N., Perola, M., Vandenput, L., Alavere, H., Almgren, P., Atwood, L. D., Bennett, A. J., Biffar, R., Bonnycastle, L. L., Bornstein, S. R., Buchanan, T. A., Campbell, H., Day, I. N., Dei, M., Dorr, M., Elliott, P., Erdos, M. R., Eriksson, J. G., Freimer, N. B., Fu, M., Gaget, S., Geus, E. J., Gjesing, A. P., Grallert, H., Grassler, J., Groves, C. J., Guiducci, C., Hartikainen, A. L., Hassanali, N., Havulinna, A. S., Herzig, K. H., Hicks, A. A., Hui, J., Igl, W., Jousilahti, P., Jula, A., Kajantie, E., Kinnunen, L., Kolcic, I., Koskinen, S., Kovacs, P., Kroemer, H. K., Krzjelj, V., Kuusisto, J., Kvaloy, K., Laitinen, J., Lantieri, O., Lathrop, G. M., Lokki, M. L., Luben, R. N., Ludwig, B., McArdle, W. L., McCarthy, A., Morken, M. A., Nelis, M., Neville, M. J., Pare, G., Parker, A. N., Peden, J. F., Pichler, I., Pietilainen, K. H., Platou, C. G., Pouta, A., Ridderstrale, M., Samani, N. J., Saramies, J., Sinisalo, J., Smit, J. H., Strawbridge, R. J., Stringham, H. M., Swift, A. J., Teder-Laving, M., Thomson, B., Usala, G., van Meurs, J. B., van Ommen, G. J., Vatin, V., Volpato, C. B., Wallaschofski, H., Walters, G. B., Widen, E., Wild, S. H., Willemssen, G., Witte, D. R., Zgaga, L., Zitting, P., Beilby, J. P., James, A. L., Kahonen, M., Lehtimäki, T., Nieminen, M. S., Ohlsson, C., Palmer, L. J., Raitakari, O., Ridker, P. M., Stumvoll, M., Tonjes, A., Viikari, J., Balkau, B., Ben-Shlomo, Y., Bergman, R. N., Boeing, H., Smith, G. D., Ebrahim, S., Froguel, P., Hansen, T., Hengstenberg, C., Hveem, K., Isomaa, B., Jorgensen, T., Karpe, F., Khaw, K. T., Laakso, M., Lawlor, D. A., Marre, M., Meitinger, T., Metspalu, A., Midthjell, K., Pedersen, O., Salomaa, V., Schwarz, P. E., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Valle, T. T., Wareham, N. J., Arnold, A. M., Beckmann, J. S., Bergmann, S., Boerwinkle, E., Boomsma, D. I., Caulfield, M. J., Collins, F. S., Eiriksdottir, G., Gudnason, V., Gyllensten, U., Hamsten, A., Hattersley, A. T., Hofman, A., Hu, F. B., Illig, T., Iribarren, C., Jarvelin, M. R., Kao, W. H., Kaprio, J., Launer, L. J., Munroe, P. B., Oostra, B., Penninx, B. W., Pramstaller, P. P., Psaty, B. M., Quertermous, T., Rissanen, A., Rudan, I., Shuldiner, A. R., Soranzo, N., Spector, T. D., Syvanen, A. C., Uda, M., Uitterlinden, A., Volzke, H., Vollenweider, P., Wilson, J. F., Witteman, J. C., Wright, A. F., Abecasis, G. R., Boehnke, M., Borecki, I. B., Deloukas, P., Frayling, T. M., Groop, L. C., Haritunians, T., Hunter, D. J., Kaplan, R. C., North, K. E., O'Connell, J. R., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D. P., Hirschhorn, J. N., Assimes, T. L., Wichmann, H. E., Thorsteinsdottir, U., van Duijn, C. M., Stefansson, K., Cupples, L. A., Loos, R. J., Barroso, I., McCarthy, M. I., Fox, C. S., Mohlke, K. L., Lindgren, C. M. (2010) Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nat. Genet.* **42**, 949-960.
- Hubacek, J. A., Bohuslavova, R., Kuthanova, L., Kubinova, R., Peasey, A., Pikhart, H., Marmot, M. G., Bobak, M. (2008) The FTO gene and obesity in a large Eastern European population sample: the HAPIEE study. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 2764-2766.
- Hubáček, J. A., Kuthanová, L., Bohuslavová, R., Adámková, V., Lánská, V., Meitinger, T., Pfeuffer, A. (2010) INSG2 promoter variant, obesity markers and lipid parameters – no association in a large Slavonic Caucasian population sample. *Folia Biol. (Praha)* **56**, 131-134.
- Jackson, R. S., Creemers, J. W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M. L., Sanders, L., Montague, C. T., Hutton, J. C., O'Rahilly, S. (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* **16**, 303-306.
- Jacquemont, S., Reymond, A., Zufferey, F., Harewood, L., Walters, R. G., Kutalik, Z., Martinet, D., Shen, Y., Valsesia, A., Beckmann, N. D., Thorleifsson, G., Belfiore, M., Bouquillon, S., Campion, D., de Leeuw, N., de Vries, B. B., Esko, T., Fernandez, B. A., Fernandez-Aranda, F., Fernandez-Real, J. M., Gratacos, M., Guilmatre, A., Hoyer, J., Jarvelin, M. R., Kooy, R. F., Kurg, A., Le Caignec, C., Mannik, K., Platt, O. S., Sanlaville, D., Van Haelst, M. M., Villatoro Gomez, S., Walha, F., Wu, B. L., Yu, Y., Aboura, A., Addor, M. C., Alembik, Y., Antonarakis, S. E., Arveiler, B., Barth, M., Bednarek, N., Bena, F., Bergmann, S., Beri, M., Bernardini, L., Blaumeiser, B., Bonneau, D., Bottani, A., Boute, O., Brunner, H. G., Cailley, D., Callier, P., Chiesa, J., Chrast, J., Coin, L., Coutton, C., Cuisset, J. M., Cuvellier, J. C., David, A., de Freminville, B., Delobel, B., Delrue, M. A., Demeer, B., Descamps, D., Didelot, G., Dieterich, K., Disciglio, V., Doco-Fenzy, M., Drunat, S., Duban-Bedu, B., Dubourg, C., El-Sayed Moustafa, J. S., Elliott, P., Faas, B. H., Faivre, L., Faudet, A., Fellmann, F., Ferrarini, A., Fisher, R., Flori, E., Forer, L., Gaillard, D.,

- Gerard, M., Gieger, C., Gimelli, S., Gimelli, G., Grabe, H. J., Guichet, A., Guillin, O., Hartikainen, A. L., Heron, D., Hippolyte, L., Holder, M., Homuth, G., Isidor, B., Jaillard, S., Jaros, Z., Jimenez-Murcia, S., Helas, G. J., Jonveaux, P., Kaksonen, S., Keren, B., Kloss-Brandstatter, A., Knoers, N. V., Koolen, D. A., Kroisel, P. M., Kronenberg, F., Labalme, A., Landais, E., Lapi, E., Layet, V., Legallie, S., Leheup, B., Leube, B., Lewis, S., Lucas, J., MacDermot, K. D., Magnusson, P., Marshall, C., Mathieu-Dramard, M., McCarthy, M. I., Meitinger, T., Mencarelli, M. A., Merla, G., Moerman, A., Mooser, V., Morice-Picard, F., Mucciolo, M., Nauck, M., Ndiaye, N. C., Nordgren, A., Pasquier, L., Petit, F., Pfundt, R., Plessis, G., Rajcan-Separovic, E., Ramelli, G. P., Rauch, A., Ravazzolo, R., Reis, A., Renieri, A., Richart, C., Ried, J. S., Rieubland, C., Roberts, W., Roetzler, K. M., Rooryck, C., Rossi, M., Saemundsen, E., Satre, V., Schurmann, C., Sigurdsson, E., Stavropoulos, D. J., Stefansson, H., Tengstrom, C., Thorsteinsdottir, U., Tinahones, F. J., Touraine, R., Vallee, L., van Binsbergen, E., Van der Aa, N., Vincent-Delorme, C., Visvikis-Siest, S., Vollenweider, P., Volzke, H., Vulto-van Silfhout, A. T., Waeber, G., Wallgren-Pettersson, C., Witwicki, R. M., Zwolinski, S., Andrieux, J., Estivill, X., Gusella, J. F., Gustafsson, O., Metspalu, A., Scherer, S. W., Stefansson, K., Blakemore, A. I., Beckmann, J. S., Froguel, P. (2011) Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* **478**, 97-102.
- Jurvansuu, J. M., Goldman, A. (2011) Obesity risk gene TMEM18 encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *PLoS One* **6**, e25317.
- Katzmarzyk, P. T., Perusse, L., Malina, R. M., Bergeron, J., Despres, J. P., Bouchard, C. (2001) Stability of indicators of the metabolic syndrome from childhood and adolescence to young adulthood: the Quebec Family Study. *J. Clin. Epidemiol.* **54**, 190-195.
- Kobzova, J., Vignerova, J., Blaha, P., Krejcovsky, L., Riedlova, J. (2004) The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent. Eur. J. Public Health* **12**, 126-130.
- Kring, S. I., Holst, C., Toubro, S., Astrup, A., Hansen, T., Pedersen, O., Sorensen, T. I. (2010) Common variants near MC4R in relation to body fat, body fat distribution, metabolic traits and energy expenditure. *Int. J. Obes. (Lond.)* **34**, 182-189.
- Levinger, I., Goodman, C., Matthews, V., Hare, D. L., Jerums, G., Garnham, A., Selig, S. (2008) BDNF, metabolic risk factors, and resistance training in middle-aged individuals. *Med. Sci. Sports Exerc.* **40**, 535-541.
- Liem, E. T., Vonk, J. M., Sauer, P. J., van der Steege, G., Oosterom, E., Stolk, R. P., Snieder, H. (2010) Influence of common variants near INSIG2, in FTO, and near MC4R genes on overweight and the metabolic profile in adolescence: the TRAILS (TRacking Adolescents' Individual Lives Survey) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 321-328.
- Lobstein, T., Baur, L., Uauy, R. (2004) Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes. Rev.* **5** (Suppl 1), 4-104.
- Loos, R. J., Lindgren, C. M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J. H., Prokopenko, I., Inouye, M., Freathy, R. M., Attwood, A. P., Beckmann, J. S., Berndt, S. I., Jacobs, K. B., Chanock, S. J., Hayes, R. B., Bergmann, S., Bennett, A. J., Bingham, S. A., Bochud, M., Brown, M., Cauchi, S., Connell, J. M., Cooper, C., Smith, G. D., Day, I., Dina, C., De, S., Dermizakis, E. T., Doney, A. S., Elliott, K. S., Elliott, P., Evans, D. M., Sadaf Farooqi, I., Froguel, P., Ghorji, J., Groves, C. J., Gwilliam, R., Hadley, D., Hall, A. S., Hattersley, A. T., Hebebrand, J., Heid, I. M., Lamina, C., Gieger, C., Illig, T., Meitinger, T., Wichmann, H. E., Herrera, B., Hinney, A., Hunt, S. E., Jarvelin, M. R., Johnson, T., Jolley, J. D., Karpe, F., Keniry, A., Khaw, K. T., Luben, R. N., Mangino, M., Marchini, J., McArdle, W. L., McGinnis, R., Meyre, D., Munroe, P. B., Morris, A. D., Ness, A. R., Neville, M. J., Nica, A. C., Ong, K. K., O'Rahilly, S., Owen, K. R., Palmer, C. N., Papadakis, K., Potter, S., Pouta, A., Qi, L., Randall, J. C., Rayner, N. W., Ring, S. M., Sandhu, M. S., Scherag, A., Sims, M. A., Song, K., Soranzo, N., Speliotes, E. K., Syddall, H. E., Teichmann, S. A., Timpson, N. J., Tobias, J. H., Uda, M., Vogel, C. I., Wallace, C., Waterworth, D. M., Weedon, M. N., Willer, C. J., Wraight, Yuan, X., Zeggini, E., Hirschhorn, J. N., Strachan, D. P., Ouwehand, W. H., Caulfield, M. J., Samani, N. J., Frayling, T. M., Vollenweider, P., Waeber, G., Mooser, V., Deloukas, P., McCarthy, M. I., Wareham, N. J., Barroso, I., Kraft, P., Hankinson, S. E., Hunter, D. J., Hu, F. B., Lyon, H. N., Voight, B. F., Ridderstrale, M., Groop, L., Scheet, P., Sanna, S., Abecasis, G. R., Albai, G., Nagaraja, R., Schlessinger, D., Jackson, A. U., Tuomilehto, J., Collins, F. S., Boehnke, M., Mohlke, K. L. (2008) Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat. Genet.* **40**, 768-775.
- Marsh, D. J., Holloper, G., Huszar, D., Laufer, R., Yagaloff, K. A., Fisher, S. L., Burn, P., Palmiter, R. D. (1999) Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat. Genet.* **21**, 119-122.
- Müller, T. D., Hinney, A., Scherag, A., Nguyen, T. T., Schreiner, F., Schafer, H., Hebebrand, J., Roth, C. L., Reinhr, T. (2008) 'Fat mass and obesity associated' gene (FTO): no significant association of variant rs9939609 with weight loss in a lifestyle intervention and lipid metabolism markers in German obese children and adolescents. *BMC Med. Genet.* **9**, 85.
- Newton-Cheh, C., Johnson, T., Gateva, V., Tobin, M. D., Bochud, M., Coin, L., Najjar, S. S., Zhao, J. H., Heath, S. C., Eyheramendy, S., Papadakis, K., Voight, B. F., Scott, L. J., Zhang, F., Farrall, M., Tanaka, T., Wallace, C., Chambers, J. C., Khaw, K. T., Nilsson, P., van der Harst, P., Polidoro, S., Grobbee, D. E., Onland-Moret, N. C., Bots, M. L., Wain, L. V., Elliott, K. S., Teumer, A., Luan, J., Lucas, G., Kuusisto, J., Burton, P. R., Hadley, D., McArdle, W. L., Brown, M., Dominiczak, A., Newhouse, S. J., Samani, N. J., Webster, J., Zeggini, E., Beckmann, J. S., Bergmann, S., Lim, N., Song, K., Vollenweider, P., Waeber, G., Waterworth, D. M., Yuan, X., Groop, L., Orho-Melander, M., Allione, A., Di Gregorio, A., Guarrera, S., Panico, S., Ricceri, F., Romanazzi, V., Sacerdote, C., Vineis, P., Barroso, I., Sandhu, M. S., Luben, R. N., Crawford, G. J., Jousilahti, P., Perola, M., Boehnke, M., Bonnycastle, L. L., Collins, F. S., Jackson, A. U., Mohlke, K. L., Stringham, H. M., Valle, T. T., Willer, C. J., Bergman, R. N., Morken, M. A., Doring, A., Gieger, C., Illig, T., Meitinger, T., Org, E., Pfeufer, A., Wichmann, H. E., Kathiresan, S., Marrugat, J., O'Donnell, C. J., Schwartz, S. M., Siscovick, D. S., Subirana, I., Freimer, N. B.,

- Hartikainen, A. L., McCarthy, M. I., O'Reilly, P. F., Peltonen, L., Pouta, A., de Jong, P. E., Snieder, H., van Gilst, W. H., Clarke, R., Goel, A., Hamsten, A., Peden, J. F., Seedorf, U., Syvanen, A. C., Togtoni, G., Lakatta, E. G., Sanna, S., Scheet, P., Schlessinger, D., Scuteri, A., Dorr, M., Ernst, F., Felix, S. B., Homuth, G., Lorbeer, R., Reffelmann, T., Rettig, R., Volker, U., Galan, P., Gut, I. G., Hercberg, S., Lathrop, G. M., Zelenika, D., Deloukas, P., Soranzo, N., Williams, F. M., Zhai, G., Salomaa, V., Laakso, M., Elosua, R., Forouhi, N. G., Volzke, H., Uiterwaal, C. S., van der Schouw, Y. T., Numans, M. E., Matullo, G., Navis, G., Berglund, G., Bingham, S. A., Kooner, J. S., Connell, J. M., Bandinelli, S., Ferrucci, L., Watkins, H., Spector, T. D., Tuomilehto, J., Altshuler, D., Strachan, D. P., Laan, M., Meneton, P., Wareham, N. J., Uda, M., Jarvelin, M. R., Mooser, V., Melander, O., Loos, R. J., Elliott, P., Abecasis, G. R., Caulfield, M., Munroe, P. B. (2009) Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat. Genet.* **41**, 666-676.
- Sandholt, C. H., Vestmar, M. A., Bille, D. S., Borglykke, A., Almind, K., Hansen, L., Sandback, A., Lauritzen, T., Witte, D., Jorgensen, T., Pedersen, O., Hansen, T. (2011) Studies of metabolic phenotypic correlates of 15 obesity associated gene variants. *PLoS One* **6**, e23531.
- Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., Lango Allen, H., Lindgren, C. M., Luan, J., Magi, R., Randall, J. C., Vedantam, S., Winkler, T. W., Qi, L., Workalemahu, T., Heid, I. M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H. M., Weedon, M. N., Wheeler, E., Wood, A. R., Ferreira, T., Weyant, R. J., Segre, A. V., Estrada, K., Liang, L., Nemesi, J., Park, J. H., Gustafsson, S., Kilpelainen, T. O., Yang, J., Bouatia-Naji, N., Esko, T., Feitosa, M. F., Kutalik, Z., Mangino, M., Raychaudhuri, S., Scherag, A., Smith, A. V., Welch, R., Zhao, J. H., Aben, K. K., Absher, D. M., Amin, N., Dixon, A. L., Fisher, E., Glazer, N. L., Goddard, M. E., Heard-Costa, N. L., Hoesel, V., Hottenga, J. J., Johansson, A., Johnson, T., Ketkar, S., Lamina, C., Li, S., Moffatt, M. F., Myers, R. H., Narisu, N., Perry, J. R., Peters, M. J., Preuss, M., Ripatti, S., Rivadeneira, F., Sandholt, C., Scott, L. J., Timpson, N. J., Tyrer, J. P., van Wingerden, S., Watanabe, R. M., White, C. C., Wiklund, F., Barlassina, C., Chasman, D. I., Cooper, M. N., Jansson, J. O., Lawrence, R. W., Pellikka, N., Prokopenko, I., Shi, J., Thiering, E., Alavere, H., Alibrandi, M. T., Almgren, P., Arnold, A. M., Aspelund, T., Atwood, L. D., Balkau, B., Balmforth, A. J., Bennett, A. J., Ben-Shlomo, Y., Bergman, R. N., Bergmann, S., Biebermann, H., Blakemore, A. I., Boes, T., Bonnycastle, L. L., Bornstein, S. R., Brown, M. J., Buchanan, T. A., Busonero, F., Campbell, H., Cappuccio, F. P., Cavalcanti-Proenca, C., Chen, Y. D., Chen, C. M., Chines, P. S., Clarke, R., Coin, L., Connell, J., Day, I. N., den Heijer, M., Duan, J., Ebrahim, S., Elliott, P., Elosua, R., Eiriksdottir, G., Erdos, M. R., Eriksson, J. G., Facheris, M. F., Felix, S. B., Fischer-Posovszky, P., Folsom, A. R., Friedrich, N., Freimer, N. B., Fu, M., Gaget, S., Gejman, P. V., Geus, E. J., Gieger, C., Gjesing, A. P., Goel, A., Goyette, P., Grallert, H., Grassler, J., Greenawald, D. M., Groves, C. J., Gudnason, V., Guiducci, C., Hartikainen, A. L., Hassanali, N., Hall, A. S., Havulinna, A. S., Hayward, C., Heath, A. C., Hengstenberg, C., Hicks, A. A., Hinney, A., Hofman, A., Homuth, G., Hui, J., Igl, W., Iribarren, C., Isomaa, B., Jacobs, K. B., Jarick, I., Jewell, E., John, U., Jorgensen, T., Jousilahti, P., Jula, A., Kaakinen, M., Kajantie, E., Kaplan, L. M., Kathiresan, S., Kettunen, J., Kinnunen, L., Knowles, J. W., Kolcic, I., Konig, I. R., Koskinen, S., Kovacs, P., Kuusisto, J., Kraft, P., Kvaloy, K., Laitinen, J., Lantieri, O., Lanzani, C., Launer, L. J., Lecocour, C., Lehtimäki, T., Lettre, G., Liu, J., Lokki, M. L., Lorentzon, M., Luben, R. N., Ludwig, B., Manunta, P., Marek, D., Marre, M., Martin, N. G., McArdle, W. L., McCarthy, A., McKnight, B., Meitinger, T., Melander, O., Meyre, D., Midthjell, K., Montgomery, G. W., Morken, M. A., Morris, A. P., Mulic, R., Ngwa, J. S., Nelis, M., Neville, M. J., Nyholt, D. R., O'Donnell, C. J., O'Rahilly, S., Ong, K. K., Oostra, B., Pare, G., Parker, A. N., Perola, M., Pichler, I., Pictiläinen, K. H., Platou, C. G., Polasek, O., Pouta, A., Rafelt, S., Raitakari, O., Rayner, N. W., Ridderstrale, M., Rief, W., Ruokonen, A., Robertson, N. R., Rzehak, P., Salomaa, V., Sanders, A. R., Sandhu, M. S., Sanna, S., Saramies, J., Savolainen, M. J., Scherag, S., Schipf, S., Schreiber, S., Schunkert, H., Silander, K., Sinisalo, J., Siscovick, D. S., Smit, J. H., Soranzo, N., Sovio, U., Stephens, J., Surakka, I., Swift, A. J., Tammesoo, M. L., Tardif, J. C., Teder-Laving, M., Teslovich, T. M., Thompson, J. R., Thomson, B., Tonjes, A., Tuomi, T., van Meurs, J. B., van Ommen, G. J., Vatín, V., Viikari, J., Visvikis-Siest, S., Vitart, V., Vogel, C. I., Voight, B. F., Waite, L. L., Wallaschofski, H., Walters, G. B., Widen, E., Wiegand, S., Wild, S. H., Willemsen, G., Witte, D. R., Witteman, J. C., Xu, J., Zhang, Q., Zgaga, L., Ziegler, A., Zitting, P., Beilby, J. P., Farooqi, I. S., Hebebrand, J., Huikuri, H. V., James, A. L., Kahonen, M., Levinson, D. F., Macciardi, F., Nieminen, M. S., Ohlsson, C., Palmer, L. J., Ridker, P. M., Stumvoll, M., Beckmann, J. S., Boeing, H., Boerwinkle, E., Boomsma, D. I., Caulfield, M. J., Chanock, S. J., Collins, F. S., Cupples, L. A., Smith, G. D., Erdmann, J., Froguel, P., Gronberg, H., Gyllenstein, U., Hall, P., Hansen, T., Harris, T. B., Hattersley, A. T., Hayes, R. B., Heinrich, J., Hu, F. B., Hveem, K., Illig, T., Jarvelin, M. R., Kaprio, J., Karpe, F., Khaw, K. T., Kiemeny, L. A., Krude, H., Laakso, M., Lawlor, D. A., Metspalu, A., Munroe, P. B., Ouwehand, W. H., Pedersen, O., Penninx, B. W., Peters, A., Pramstaller, P. P., Quertermous, T., Reinchr, T., Rissanen, A., Rudan, I., Samani, N. J., Schwarz, P. E., Shuldiner, A. R., Spector, T. D., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A., Valle, T. T., Wabitsch, M., Waeber, G., Wareham, N. J., Watkins, H., Wilson, J. F., Wright, A. F., Zillikens, M. C., Chatterjee, N., McCarroll, S. A., Purcell, S., Schadt, E. E., Visscher, P. M., Assimes, T. L., Borecki, I. B., Deloukas, P., Fox, C. S., Groop, L. C., Haritunians, T., Hunter, D. J., Kaplan, R. C., Mohlke, K. L., O'Connell, J. R., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D. P., van Duijn, C. M., Wichmann, H. E., Frayling, T. M., Thorsteinsdottir, U., Abecasis, G. R., Barroso, I., Boehnke, M., Stefansson, K., North, K. E., McCarthy, M. I., Hirschhorn, J. N., Ingelsson, E., Loos, R. J. (2010) Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet.* **42**, 937-948.
- Stefan, N., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Thamer, C., Rittig, K., Balletshofer, B., Machicao, F., Fritsche, A., Haring, H. U. (2008) Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch. Intern. Med.* **168**, 1609-1616.

- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. (2002) *Circulation* **106**, 3143-3421.
- Thorleifsson, G., Walters, G. B., Gudbjartsson, D. F., Steintorsdottir, V., Sulem, P., Helgadóttir, A., Styrkarsdóttir, U., Gretarsdóttir, S., Thorlacius, S., Jonsdóttir, I., Jonsdóttir, T., Olafsdóttir, E. J., Olafsdóttir, G. H., Jonsson, T., Jonsson, F., Borch-Johnsen, K., Hansen, T., Andersen, G., Jorgensen, T., Lauritzen, T., Aben, K. K., Verbeek, A. L., Roeleveld, N., Kampman, E., Yanek, L. R., Becker, L. C., Tryggvadóttir, L., Rafnar, T., Becker, D. M., Gulcher, J., Kiemene, L. A., Pedersen, O., Kong, A., Thorsteinsdóttir, U., Stefansson, K. (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat. Genet.* **41**, 18-24.
- Tukiainen, T., Kettunen, J., Kangas, A. J., Lyytikäinen, L. P., Soininen, P., Sarin, A. P., Tikkanen, E., O'Reilly, P. F., Savolainen, M. J., Kaski, K., Pouta, A., Jula, A., Lehtimäki, T., Kahonen, M., Viikari, J., Taskinen, M. R., Jauhiainen, M., Eriksson, J. G., Raitakari, O., Salomaa, V., Jarvelin, M. R., Perola, M., Palotie, A., Ala-Korpela, M., Ripatti, S. (2012) Detailed metabolic and genetic characterization reveals new associations for 30 known lipid loci. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1444-1455.
- Vogel, C. I., Boes, T., Reinehr, T., Roth, C. L., Scherag, S., Scherag, A., Hebebrand, J., Hinney, A. (2011) Common variants near MC4R: exploring gender effects in overweight and obese children and adolescents participating in a lifestyle intervention. *Obes. Facts* **4**, 67-75.
- Wang, H., Dong, S., Xu, H., Qian, J., Yang, J. (2011) Genetic variants in FTO associated with metabolic syndrome: a meta- and gene-based analysis. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 5691-5698.
- Wang, J., Mei, H., Chen, W., Jiang, Y., Sun, W., Li, F., Fu, Q., Jiang, F. (2012) Study of eight GWAS-identified common variants for association with obesity-related indices in Chinese children at puberty. *Int. J. Obes. (Lond.)* **36**, 542-547.
- Weiss, R., Dziura, J., Burgert, T. S., Tamborlane, W. V., Taksali, S. E., Yockel, C. W., Allen, K., Lopes, M., Savoye, M., Morrison, J., Sherwin, R. S., Caprio, S. (2004) Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2362-2374.
- Willer, C. J., Speliotes, E. K., Loos, R. J., Li, S., Lindgren, C. M., Heid, I. M., Berndt, S. I., Elliott, A. L., Jackson, A. U., Lamina, C., Lettre, G., Lim, N., Lyon, H. N., McCarroll, S. A., Papadakis, K., Qi, L., Randall, J. C., Rocaasecca, R. M., Sanna, S., Scheet, P., Weedon, M. N., Wheeler, E., Zhao, J. H., Jacobs, L. C., Prokopenko, I., Soranzo, N., Tanaka, T., Timpson, N. J., Almgren, P., Bennett, A., Bergman, R. N., Bingham, S. A., Bonnycastle, L. L., Brown, M., Burt, N. P., Chines, P., Coin, L., Collins, F. S., Connell, J. M., Cooper, C., Smith, G. D., Dennison, E. M., Deodhar, P., Elliott, P., Erdos, M. R., Estrada, K., Evans, D. M., Gianniny, L., Gieger, C., Gillson, C. J., Guiducci, C., Hackett, R., Hadley, D., Hall, A. S., Havulinna, A. S., Hebebrand, J., Hofman, A., Isomaa, B., Jacobs, K. B., Johnson, T., Jousilahti, P., Jovanovic, Z., Khaw, K. T., Kraft, P., Kuokkanen, M., Kuusisto, J., Laitinen, J., Lakatta, E. G., Luan, J., Luben, R. N., Mangino, M., McArdle, W. L., Meitinger, T., Mulas, A., Munroe, P. B., Narisu, N., Ness, A. R., Northstone, K., O'Rahilly, S., Purmann, C., Rees, M. G., Ridderstrale, M., Ring, S. M., Rivadeneira, F., Ruokonen, A., Sandhu, M. S., Saramies, J., Scott, L. J., Scuteri, A., Silander, K., Sims, M. A., Song, K., Stephens, J., Stevens, S., Stringham, H. M., Tung, Y. C., Valle, T. T., Van Duijn, C. M., Vimalaswaran, K. S., Vollenweider, P., Waeber, G., Wallace, C., Watanabe, R. M., Waterworth, D. M., Watkins, N., Witteman, J. C., Zeggini, E., Zhai, G., Zillikens, M. C., Alshuler, D., Caulfield, M. J., Chanock, S. J., Farooqi, I. S., Ferrucci, L., Guralnik, J. M., Hattersley, A. T., Hu, F. B., Jarvelin, M. R., Laakso, M., Mooser, V., Ong, K. K., Ouwehand, W. H., Salomaa, V., Samani, N. J., Spector, T. D., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A. G., Wareham, N. J., Deloukas, P., Frayling, T. M., Groop, L. C., Hayes, R. B., Hunter, D. J., Mohlke, K. L., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D. P., Wichmann, H. E., McCarthy, M. I., Boehnke, M., Barroso, I., Abecasis, G. R., Hirschhorn, J. N. (2009) Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* **41**, 25-34.
- Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R., Tecott, L. H., Reichardt, L. F. (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* **6**, 736-742.
- Zamrazilova, H., Hlavaty, P., Dusatkova, L., Sedlackova, B., Hainerova, I. A., Kunesova, M., Skoch, A., Hajek, M., Hainer, V. (2010) A new simple method for estimating trunk and visceral fat by bioelectrical impedance: comparison with magnetic resonance imaging and dual X-ray absorptiometry in Czech adolescents. *Cas. Lek. Cesk.* **149**, 417-422. (in Czech)
- Zhao, J., Bradfield, J. P., Li, M., Wang, K., Zhang, H., Kim, C. E., Annaiah, K., Glessner, J. T., Thomas, K., Garris, M., Frackelton, E. C., Otieno, F. G., Shaner, J. L., Smith, R. M., Chiavacci, R. M., Berkowitz, R. L., Hakonarson, H., Grant, S. F. (2009) The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 2254-2257.
- Zhou, D., Liu, H., Zhou, M., Wang, S., Zhang, J., Liao, L., He, F. (2012) Common variant (rs9939609) in the FTO gene is associated with metabolic syndrome. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 6555-6561.
- Zimmet, P., Alberti, K. G., Kaufman, F., Tajima, N., Silink, M., Arslanian, S., Wong, G., Bennett, P., Shaw, J., Caprio, S. (2007) The metabolic syndrome in children and adolescents – an IDF consensus report. *Pediatr. Diabetes* **8**, 299-306.
- Zobel, D. P., Andreassen, C. H., Grarup, N., Eiberg, H., Sorensen, T. I., Sandback, A., Lauritzen, T., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Pedersen, O., Hansen, T. (2009) Variants near MC4R are associated with obesity and influence obesity-related quantitative traits in a population of middle-aged people: studies of 14,940 Danes. *Diabetes* **58**, 757-764.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., Timmusk, T., Sipione, S., Cattaneo, E. (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* **293**, 493-498.

5.4 Vliv laparoskopické gastrické plikace na metabolický profil obézních diabetiček 2. typu

BRADNOVÁ O, KYROU I, HAINER V, VČELÁK J, HÁLKOVÁ T, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, MCTERNAN P, KUMAR S, HILL M, KUNEŠOVÁ M, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J. *Obes Surg.* 2014; **24**(5): 718-26. IF=3,747

Laparoskopická gastrická plikace (LGP) umožňuje redukci žaludečního objemu bez nutnosti implementace cizího materiálu (jako u laparoskopické gastrické bandáže – LAGB) nebo bez nevratné resekce žaludeční stěny (jako u laparoskopické sleeve gastrektomie – LSG).

Cílem této studie bylo zjistit změny v lačných i postprandiálních hodnotách glukózového a lipidového metabolismu a změny u vybraných hormonů gastrointestinálního traktu u extrémně obézních diabetiček 2. typu v době prvních měsíců od operace. Do naší pilotní studie bylo vybráno 13 obézních diabetiček 2. typu (věk: $53 \pm 8,7$ let; BMI: $40,1 \pm 4,59$ kg/m²), které byly vyšetřeny nejprve před operací a následně 1. měsíc a 6. měsíc po zákroku. V těchto časových bodech podstoupily všechny ženy MMTT. V průběhu MMTT jsme sledovali hladinu glukózy, inzulínu, C-peptidu, triacylglycerolů, GIP, GLP-1, ghrelinu a obestatinu.

Všechny pacientky významně snížily svou hmotnost již po 1. měsíci od operace. Snižování hmotnosti pokračovalo i po 6. měsíci od operace, kdy pacientky dosáhly 30 % EWL (*excess weight loss*). Po 6 měsících došlo ke zlepšení lačné glykémie a inzulinémie ($p < 0,05$) a zároveň ke zlepšení inzulinové senzitivity, vyjádřené indexem HOMA-IR ($p < 0,0001$) a k poklesu hodnoty HbA1c ($p < 0,0001$). U pacientek jsme naměřili nižší hladiny postprandiální glykémie ($p < 0,0001$) a triacylglycerolů ($p < 0,001$), vyjádřené výpočtem ploch pod křivkou v průběhu MMTT po 6 měsících od zákroku.

V 1. i 6. měsíci od operace byly postprandiální hladiny GIP významně zvýšeny ($p < 0,0001$), zatímco u GLP-1 nedošlo k významným změnám. Zjistili jsme dále výrazné snížení postprandiálních hladin ghrelinu ($p < 0,0001$). U obestatinu jsme žádné změny nepozorovali.

Zjistili jsme, že laparoskopická gastrická plikace pomáhá obézním diabetičkám 2. typu výrazně snížit hmotnost a zlepšit jejich metabolický profil, včetně postprandiálního snížení hladin ghrelinu a zvýšení hladin GIP.

Na této studii jsem se podílela asistencí při MMTT, účastnice studie jsem antropologicky měřila a zajišťovala jsem preanalytickou fázi sbíraných vzorků plasmy a séra, organizačně zajišťovala zahraniční spolupráci – zejména odběr, zpracování a zaslání vzorků plasmy, séra a tukové tkáně. Prováděla multiplexovou analýzu, vyhodnotila získaná data, statisticky zpracovala a sepsala publikaci.



Laparoscopic Greater Curvature Plication in Morbidly Obese Women with Type 2 Diabetes: Effects on Glucose Homeostasis, Postprandial Triglyceridemia and Selected Gut Hormones

Olga Bradnova · Ioannis Kyrou · Vojtech Hainer · Josef Vcelak · Tereza Halkova · Petra Sramkova · Karin Dolezalova · Martin Fried · Philip McTernan · Sudhesh Kumar · Martin Hill · Marie Kunesova · Bela Bendlova · Jana Vrbikova

Published online: 5 December 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract

Background Laparoscopic greater curvature plication (LGCP) is an emerging bariatric procedure that reduces the gastric volume without implantable devices or gastrectomy. The aim of this study was to explore changes in glucose homeostasis, postprandial triglyceridemia, and meal-stimulated secretion of selected gut hormones [glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), glucagon-like peptide-1 (GLP-1), ghrelin, and obestatin] in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) at 1 and 6 months after the procedure.

Methods Thirteen morbidly obese T2DM women (mean age, 53.2 ± 8.76 years; body mass index, 40.1 ± 4.59 kg/m²) were prospectively investigated before the LGCP and at 1- and 6-month follow-up. At these time points, all study patients underwent a standardized liquid mixed-meal test, and blood was sampled for assessment of plasma levels of glucose, insulin, C-peptide, triglycerides, GIP, GLP-1, ghrelin, and obestatin.

Results All patients had significant weight loss both at 1 and 6 months after the LGCP ($p \leq 0.002$), with mean percent excess weight loss (%EWL) reaching 29.7 ± 2.9 % at the 6-month follow-up. Fasting hyperglycemia and hyperinsulinemia improved significantly at 6 months after the LGCP ($p < 0.05$), with parallel improvement in insulin sensitivity and HbA1c levels ($p < 0.0001$). Meal-induced glucose plasma levels were significantly lower at 6 months after the LGCP ($p < 0.0001$), and postprandial triglyceridemia was also ameliorated at the 6-month follow-up ($p < 0.001$). Postprandial GIP plasma levels were significantly increased both at 1 and 6 months after the LGCP ($p < 0.0001$), whereas the overall meal-induced GLP-1 response was not significantly changed after the procedure ($p > 0.05$). Postprandial ghrelin plasma levels decreased at 1 and 6 months after the LGCP ($p < 0.0001$) with no significant changes in circulating obestatin levels.

Conclusion During the initial 6-month postoperative period, LGCP induces significant weight loss and improves the metabolic profile of morbidly obese T2DM patients, while it also decreases circulating postprandial ghrelin levels and increases the meal-induced GIP response.

Keywords Gastric plication · Morbid obesity · Type 2 diabetes

O. Bradnova and I. Kyrou contributed equally to this work.

O. Bradnova (✉) · V. Hainer · J. Vcelak · T. Halkova · M. Hill · M. Kunesova · B. Bendlova · J. Vrbikova (✉)
Institute of Endocrinology, Narodni 8, Prague 1 116 94, Czech Republic
e-mail: obradnova@endo.cz
e-mail: JVrbikova@endo.cz

I. Kyrou · P. McTernan · S. Kumar
Division of Metabolic & Vascular Health, Warwick Medical School,
University of Warwick, UHCW, Coventry, UK

P. Sramkova · K. Dolezalova · M. Fried
OB Clinic, Prague, Czech Republic

O. Bradnova · T. Halkova
Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

Introduction

Obesity plays an important role in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (T2DM). Morbidly obese patients are at higher risk of T2DM, hypertension, hyperlipidemia, and cardiovascular disease. Bariatric surgery is currently the most effective treatment for weight loss and is also shown to lead to rapid and prolonged improvement in

insulin resistance and hyperglycemia in the majority of morbidly obese T2DM patients [1].

Laparoscopic greater curvature plication (LGCP; also referred to as laparoscopic gastric plication, total gastric vertical plication, or gastric imbrication) is an emerging bariatric procedure, introduced as a relatively less invasive restrictive technique compared to sleeve gastrectomy since no gastric or intestinal resection is required [2–8]. LGCP reduces the stomach volume by laparoscopic plication/infolding of the greater gastric curvature through placement of one or two rows of nonabsorbable sutures or staples. Thus, LGCP results in elimination of the greater curvature and formation of a gastric tube, achieving a restrictive effect without utilizing implantable devices (e.g., band), gastrectomy, or intestinal bypass. In addition, LGCP is potentially reversible, if required.

Current reports have shown that LGCP results in effective weight loss in the short and medium term [2–8], with percent excess weight loss (%EWL) reaching up to 32 % at 6 months and almost 50 % at 18 months postoperatively in a recent series of 244 patients [2]. Notably, in this study, 96.9 % of patients with T2DM exhibited significant improvement or resolution of their diabetic status at 6 months after the procedure [2]. Furthermore, LGCP is also shown to have a good safety profile without major safety concerns in the short- and medium-term, as low complication rates have been reported so far; however more evidence is required in order to establish the long-term efficacy and safety of this novel bariatric procedure [2–8].

To date, there is a lack of studies focusing on the effects of LGCP in T2DM patients. Particularly, there are no reports regarding the metabolic and hormonal changes that are associated with improvement of T2DM following LGCP. The aim of this study was to explore changes in glucose homeostasis, postprandial triglyceridemia, and meal-stimulated secretion of selected gastrointestinal hormones [namely, glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP), glucagon-like peptide-1 (GLP-1), ghrelin, and obestatin) in T2DM patients at 1 and 6 months after LGCP.

Methods and Materials

Study Cohort and Protocol

The study cohort included Caucasian adult women with morbid obesity [body mass index (BMI) ≥ 35 kg/m²] and T2DM who were operated at the OB Clinic, Prague, Czech Republic, between 2009 and 2012. The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic, and informed consent was obtained from all study participants, in accordance with the Declaration of Helsinki. For the purposes of this study, all patients were prospectively investigated before the LGCP (baseline) and at 1 and 6 months following the procedure. Women on

incretin mimetics and/or insulin for T2DM treatment were excluded from this study.

Anthropometric measurements were performed for all patients at the three study time points (baseline, 1 month post-op, and 6 months post-op), as per protocol. Body weight was measured to the nearest 0.5 kg and height to the nearest 1 cm. BMI was calculated as body weight in kilograms divided by the square of the height in meters. Percent excess weight loss (%EWL) and percent of excess BMI lost (%EBL) were calculated according to the following equations: (1) %EWL = [(preoperative weight – follow-up weight) / preoperative weight – ideal body weight] \times 100; and (2) %EBL = [(preoperative BMI – follow-up BMI) / (preoperative BMI – 25)] \times 100; as previously described [2, 9–11]. Body fat mass was also assessed using a standardized calibrated bioimpedance instrument (Tanita TBF-300; Tanita Corporation).

For the purposes of this study, all patients underwent a standardized liquid mixed-meal test [300 ml; 375 kcal; 1,581 kJ; 30 % (28.2 g) protein, 25 % (10.5 g) fat, 45 % (42 g) carbohydrate] at each of the three time points of the study, namely, at baseline (exam 1), at 1 month (exam 2), and at 6 months (exam 3) after the LGCP. All patients were examined in the morning after an overnight fast, and venous blood was sampled for assessing GIP, GLP-1, ghrelin, and obestatin levels at 0, 30, 60, 90, 120, and 180 min after the liquid meal ingestion. These blood samples were collected into chilled ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) containing tubes with aprotinin. Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor (Millipore, Billerica, MA, USA) was also added immediately after blood sampling. Blood samples were also collected into chilled EDTA containing tubes without aprotinin for assessment of glucose, insulin, and C-peptide levels at –15, –10, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, and 180 min. All samples were immediately cooled, and plasma was prepared, aliquoted, and stored at –80 °C until assayed. Plasma levels of blood glucose, insulin, C-peptide, HbA1c, and triglycerides were measured using the Cobas 6000 analyzer. Plasma concentrations of GIP, GLP-1, and total ghrelin were assessed using a multiplex assay (Bio-Plex Pro™ Human Diabetes Assay Panel, BioPlex 200 System, Bio-Rad Laboratories). Obestatin levels were also determined by a commercially available RIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., California, USA) according to the manufacturer's protocol. Finally, the homeostatic model assessment (HOMA) method was used to assess insulin resistance (HOMA-IR), as previously described [12], according to the following equation: HOMA-IR = [fasting glucose (mmol/L) \times fasting insulin (mIU/L)] / 22.5.

Surgical Technique

All study participants underwent a LGCP procedure for weight loss, as previously described [2]. Briefly, our technique consisted of dissection of the greater gastric curvature;

beginning 3–5 cm proximally from the pylorus, proceeding towards the angle of Hiss, and stopping approximately 2 cm below the angle of Hiss, thus preserving the first one to two short gastric vessels. Through this dissection, the fundus and gastric body were mobilized, allowing the greater curvature to be infolded and secured with continuous polypropylene sutures into two plication rows, one on top of the other. A 36-F bougie was used for calibration during suturing in order to maintain a standardized stomach lumen under its guidance. None of the patients in our study cohort exhibited any major intraoperative and/or postoperative complications.

Statistical Analysis

Results are presented as median (lower confidence limit and upper confidence limit) or mean±standard error, unless otherwise stated. Due to skewed distribution in most variables, these were transformed by a power transformation in order to stabilize the variance and obtain normal distribution, while the homogeneity of the transformed data was verified using residual analysis, as previously described [13, 14]. Values for the area under the curve (AUC) were calculated using the trapezoidal rule. For statistical analyses, end points were compared by repeated measures analysis of variance (ANOVA) consisting of subject factor and within-subject factor tests (StatGraphix Centurion XVI, 2009), or by the Wilcoxon test (NCSS, 2004), as appropriate. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Weight Loss Outcomes

Thirteen morbidly obese T2DM women were recruited into this study [age,55 (47, 60)years]. The duration of T2DM for

the study cohort was 3 (1.8, 10)years. All study participants had statistically significant weight loss both at 1 and 6 months following the LGCP compared to baseline, exhibiting significant reductions in body weight, BMI, %EWL, and %EBL ($p \leq 0.002$). Table 1 presents the weight loss outcomes for our study cohort, including the significant reductions noted in body fat mass and in waist and hip circumference.

Glucose Homeostasis and Triglycerides

Figure 1 presents the statistically significant improvement in fasting hyperglycemia and hyperinsulinemia at 6 months after the LGCP ($p < 0.0001$), and the parallel improvement in insulin resistance as expressed by the significant reduction in HOMA-IR ($p < 0.003$). Of note, HbA1c significantly declined in the period after the operation ($p < 0.0001$) (Fig. 1), with only one of the 13 patients not achieving statistically significant reduction in HbA1c during the study follow-up.

Furthermore, both at 1 and 6 months after the LGCP a left shift of the postprandial glucose curve was noted in response to the liquid mixed-meal test, exhibiting an earlier peak (at 45 min) compared to the postprandial glucose curve at baseline (peak at 60 min) (Fig. 2). Overall, the total AUC for plasma glucose levels in response to the liquid mixed-meal test was also significantly reduced at 6 months after the LGCP ($p < 0.05$). In addition, at 1 month after the LGCP, higher postprandial levels of insulin at 30 min and C-peptide at 30, 45, and 60 min were noted ($p < 0.05$), but not at 6 months (Fig. 2). Moreover, although the total AUC for C-peptide significantly increased at 1 month after the LGCP ($p < 0.05$), the total AUC for insulin postprandial levels was not significantly changed both at 1 and 6 months after the operation compared to baseline ($p > 0.05$) (Fig. 2).

Finally, significant improvement in postprandial triglyceridemia was also noted at 6 months after the LGCP, with significantly lower plasma triglycerides in response to

Table 1 Weight loss outcomes for the study cohort ($n=13$) at 1 month and 6 months after laparoscopic greater curvature plication (LGCP)

	Baseline	1-month after LGCP		6-months after LGCP	
		Absolute values	Change from baseline	Absolute values	Change from baseline
Body weight (kg)	106.2 (98.5, 122.5)	99.5 (89.6, 108.7)*	-7.8 (-5, -10.4)*	95.5 (90.5, 107.6)* [‡]	-12.5 (-8.2, -14.9)* [‡]
BMI (kg/m ²)	37.7 (36.9, 46.2)	36.1 (34.1, 42.5)*	-2.9 (-1.7, -3.6)*	34.9 (32.2, 41.4)* [‡]	-4.7 (-2.7, -5.4)* [‡]
Body fat mass (kg)	52.5 (44.9, 61.8)	49.2 (39.1, 54.9)*	-5.2 (-3.4, -7.2)*	42.9 (34.2, 50.9)* [‡]	-10.7 (-5.2, -11.1)* [‡]
Waist circumference (cm)	115 (112, 119)	112 (99.5, 116)*	-5.3 (-4, -12)*	106 (98, 110)* [‡]	-6.8 (-4, -14)* [‡]
Hip circumference (cm)	131 (125, 141)	125 (116, 132)*	-5.7 (-4, -10)*	120 (106.5, 129.5)* [‡]	-9.8 (-8.5, -14)* [‡]
%EWL (%)			19.1 (13.1, 23.9)*		30.2 (22.6, 34.2)* [‡]
%EBL (%)			18.7 (13.1, 23.9)*		30.2 (18.4, 35.4)* [‡]

Data are expressed as median (95 % lower confidence limit, LCL; and 95 % upper confidence limit, UCL)

LGCP laparoscopic greater curvature plication, BMI body mass index, %EWL percent excess weight loss, %EBL percent of excess BMI lost

* $p < 0.05$ compared to baseline; [‡] $p < 0.05$ compared to 1-month after LGCP; comparison performed by Wilcoxon test

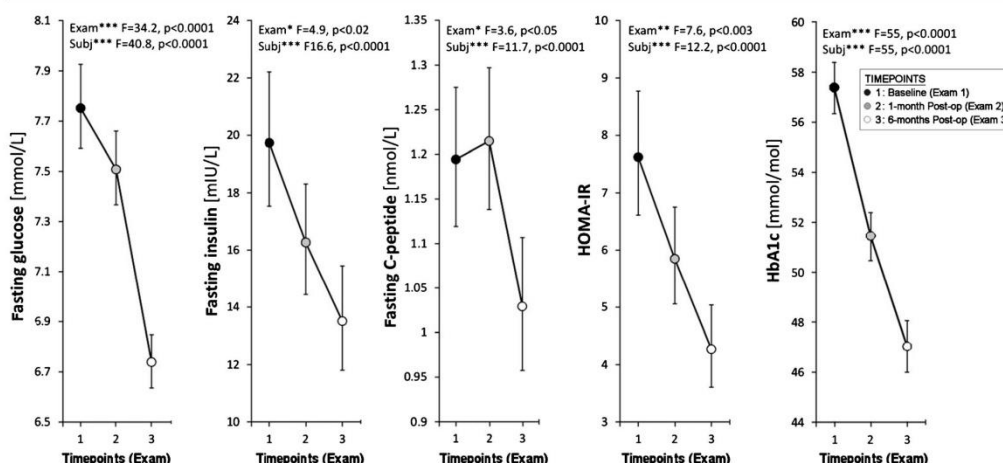


Fig. 1 Improvement in fasting hyperglycemia, hyperinsulinemia, homeostatic model assessment-insulin resistance (*HOMA-IR*), and glycated hemoglobin (*HbA1c*) levels at 1 month (exam 2) and 6 months (exam 3) after laparoscopic greater curvature plication (*LGCP*), compared to baseline (exam 1) [Full, gray, and empty circles represent retransformed mean values with their 95 % confidence intervals at baseline, 1 month, and 6 months, respectively. Comparison performed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA); exam, influence of time after *LGCP*; Subj, subject factor. * $p < 0.05$]

the liquid mixed-meal test compared to baseline levels ($p \leq 0.001$) (Fig. 3).

Gastrointestinal Hormones

Higher meal-stimulated GIP levels were noted after the *LGCP* ($p < 0.0001$), with (1) the total AUC for GIP at 1 month (exam 2) being significantly higher compared to baseline (exam 1); and (2) the total AUC for GIP at 6 months (exam 3) being significantly higher compared to both baseline and 1 month values (Fig. 4a). Of note, postprandial GIP levels at 1 and at 6 months after the operation exhibited an earlier peak (at 30 min) compared to the meal-stimulated GIP response at baseline, which peaked at 60 min. Furthermore, the drop of postprandial GIP levels following the corresponding peak was more rapid at baseline (exam 1) and at 1 month (exam 2) compared to 6 months (exam 3) after the *LGCP* (Fig. 4a).

GLP-1 plasma levels peaked at 60 min after meal ingestion during the 1 month meal-test, whereas at 6 months, the postprandial GLP-1 levels reached a peak at 30 min, as was also noted for the postprandial GLP-1 response at baseline (Fig. 4b). However, contrary to GIP, the total AUC for the meal-stimulated GLP-1 response at 1 and 6 months after the *LGCP* did not significantly change compared to the baseline value ($p > 0.05$) (Fig. 4b).

In addition, significantly decreased postprandial ghrelin plasma levels were observed during the mixed-meal test at 1 month after the *LGCP*, with more pronounced reduction at 6 months compared to the preoperative baseline levels ($p <$

0.0001) (Fig. 5). Overall, the total AUC for the postprandial ghrelin response tended to decrease at the 1 month follow-up and was significantly lower at 6 months compared to the baseline value ($p < 0.05$) (Fig. 5). Contrary to ghrelin, there were no significant changes in circulating obestatin levels in response to the ingested meal preoperatively at baseline, and this lack of postprandial obestatin response remained both at 1 and 6 months after the *LGCP* (figure not shown).

Discussion

The objective of this study was to report novel data regarding the effects of *LGCP* in T2DM patients, focusing on changes in fasting and postprandial plasma levels of glucose, insulin, triglycerides, and selected gastrointestinal hormones at 1 and 6 months after the procedure. In accord with the existing literature, our results showed that *LGCP* induces significant weight loss in morbidly obese T2DM patients during the initial 6-month postoperative period. Based on published data, including series with nondiabetic and T2DM obese patients, the mean %EWL following *LGCP* is reported to reach 32–66 %, 50–79 %, and 60–74 % at 6, 12, and 24 months, respectively [2–8]. Indeed, in our cohort of T2DM women, the %EWL reached 30.2 % (22.6, 34.2) at 6 months after the *LGCP*, approaching the reported range of 6-month %EWL outcomes.

Weight loss following *LGCP* is considered to be mainly the result of restricted food intake, due to reduced volume

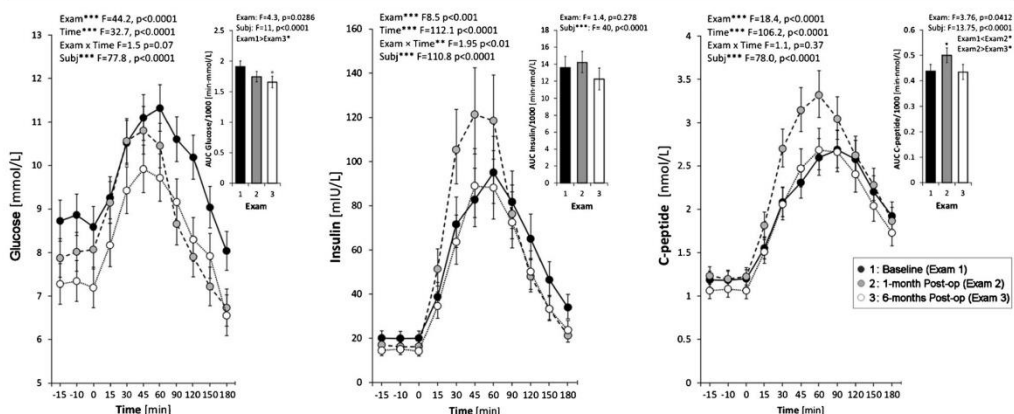


Fig. 2 Plasma glucose, insulin, and C-peptide levels in response to a standardized liquid mixed-meal test at baseline (exam 1), 1 month (exam 2), and 6 months (exam 3) after laparoscopic greater curvature plication (LGCP) [Full, gray, and empty circles represent retransformed mean values with their 95 % confidence intervals at baseline, 1 month, and

6 months, respectively. Comparison performed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA); exam, influence of time after LGCP; time, influence of time during the meal test; exam×time, interaction of time after LGCP and time after meal ingestion; Subj, subject factor. *AUC* area under the curve. **p*<0.05]

capacity of the plicated stomach. Thus, LGCP can be classified as an alternative restrictive bariatric procedure, which, to a certain extent, simulates the effects of laparoscopic sleeve

gastrectomy (LSG) [2–8]. Importantly, mounting evidence indicates that LSG is not merely a restrictive procedure but also affects the secretion of several orexigenic (e.g., ghrelin) and anorexigenic (e.g., PYY) gut hormones inducing appetite suppression and other metabolic/endocrine effects [15–17]. In LSG, the resection of the gastric fundus, where most of the ghrelin-secreting cells of the gastric mucosa are located, leads to marked and sustained reductions in circulating ghrelin levels [15–17]. Furthermore, LSG is also shown to increase the secretion of certain gastrointestinal hormones that exert potent satiety effects (e.g., PYY), presumably due to faster gastric emptying and/or less well-digested chyme entering the duodenum [15–17].

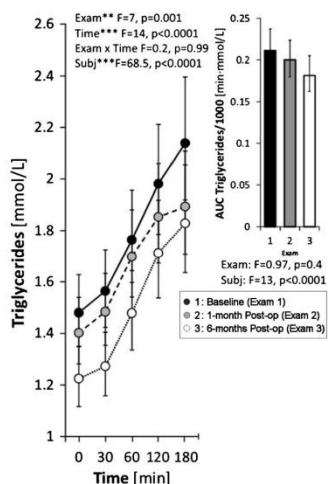


Fig. 3 Plasma triglyceride levels in response to a standardized liquid mixed-meal test at baseline (exam 1), 1 month (exam 2), and 6 months (exam 3) after laparoscopic greater curvature plication (LGCP) [Full, gray, and empty circles represent retransformed mean values with their 95 % confidence intervals at baseline, 1 month, and 6 months, respectively. Comparison performed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA); exam, influence of time after LGCP; time, influence of time during the meal test; exam×time, interaction of time after LGCP and time after meal ingestion; Subj, subject factor. *AUC* area under the curve. **p*<0.05]

Contrary to LSG, LGCP preserves the gastric mucosa since the greater gastric curvature is imbricated/infolded into the body of the stomach. However, it may be hypothesized that the devascularization and infolding of the highly vascular gastric fundus as part of the LGCP may result in decreased vascular perfusion of the mucosal cells, potentially affecting their endocrine function and leading to ghrelin hyposecretion. Accordingly, in our study, we documented decreased post-prandial plasma levels of ghrelin during the initial 6-month postoperative period after the LGCP compared to preoperative levels (Fig. 5). In contrast, we observed no significant changes in circulating obestatin levels, either basal or postprandial, before and after the LGCP. Obestatin, which shares a common precursor with ghrelin, i.e., proghrelin, was initially described as an anorexigenic peptide opposing the effects of ghrelin [18]. Although the secretion pattern of obestatin and its physiological role in appetite regulation remains controversial, it has been proposed that the circulating ghrelin/

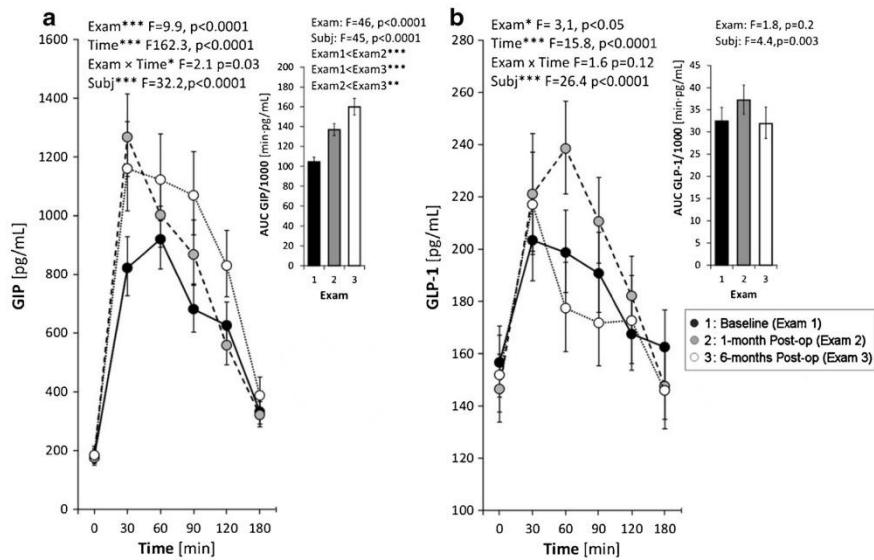


Fig. 4 Plasma levels of **a** glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) and **b** glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in response to a standardized liquid mixed-meal test at baseline (exam 1), 1 month (exam 2), and 6 months (exam 3) after laparoscopic greater curvature plication (LGCP) [Full, gray, and empty circles represent retransformed mean values with their 95 % confidence intervals at baseline, 1 month, and 6 months, respectively. Comparison performed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA); exam, influence of time after LGCP; time, influence of time during the meal test; exam×time, interaction of time after LGCP and time after meal ingestion; Subj, subject factor. AUC area under the curve. * $p < 0.05$]

obestatin ratio may be implicated in the regulation of feeding behavior and body weight [18]. Thus, the marked decrease in circulating ghrelin levels, and the corresponding decrease in the ghrelin/obestatin ratio, noted in our cohort after the LGCP, may also account for the postoperative weight loss through enhanced appetite suppression. Notably, ghrelin has also been shown to exert various diabetogenic effects [15, 19, 20], and so decreased circulating ghrelin levels may additionally contribute to improved glucose homeostasis after the LGCP.

In parallel with weight loss, all but one patient in our study (92.3 %) achieved significant reductions in HbA1c during the 6-month postoperative follow-up. This agrees with published data by Fried et al. [2] reporting that 96.9 % of T2DM patients exhibited at least improvement of their preoperative diabetic status at 6 months after LGCP. In our cohort, the amelioration of glucose homeostasis was characterized by markedly decreased fasting glucose and insulin plasma levels and increased insulin sensitivity as assessed by HOMA-IR (Fig. 1). In addition, our results show that the postprandial plasma levels of glucose also peaked earlier (peak at 45 min) at 1 and 6 months after the LGCP, with the AUC for the meal-induced glucose response being significantly lower at 6 months compared to baseline (Fig. 2).

Changes of the incretin response in T2DM patients after the LGCP may also improve glucose homeostasis. GIP is secreted

postprandially from enteroendocrine cells of the small intestine (K cells; located mainly in the duodenum and upper jejunum) and rapidly stimulates insulin secretion from the pancreatic beta-cells, while it also exerts multiple effects in other organs (e.g., adipose tissue, brain) promoting glucose and lipid storage [21, 22]. Importantly, the incretin effect of GIP is deficient in T2DM due to relative beta-cell GIP resistance [22]. Our results document a significant rise in postprandial GIP levels at 1 month after the LGCP, which was even more pronounced at 6 months (Fig. 4). Interestingly, Romero et al. [23] have reported increased postprandial GIP levels in morbidly obese T2DM patients at 6 weeks after LSG. It is also noteworthy that, although reports on fasting and postprandial GIP levels after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) are also inconsistent, there are data suggesting that meal-induced GIP levels in T2DM patients may be increased early (1 month) following RYGB and decreased in the longer-term [15]. Regarding the mechanism that could induce the higher meal-induced GIP levels after LGCP noted in our study, it can be hypothesized that this GIP response may reflect overstimulation of the K cells in the duodenum due to either accelerated gastric emptying or/and contact with less well-digested chyme, as it has also been hypothesized for LSG. However, this hypothesis remains to be elucidated, and additional long-term studies will be required in order to explore

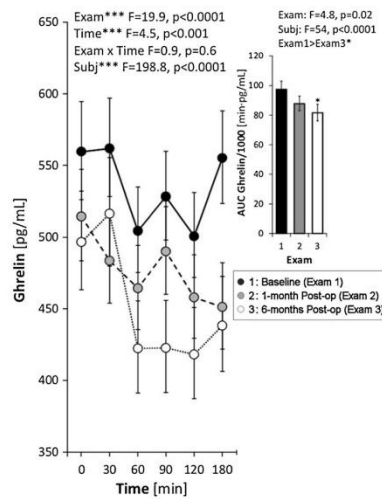


Fig. 5 Plasma levels of ghrelin in response to a standardized liquid mixed-meal test at baseline (exam 1), 1 month (exam 2), and 6 months (exam 3) after laparoscopic greater curvature plication (LGCP) [Full, gray, and empty circles represent retransformed mean values with their 95 % confidence intervals at baseline, 1 month, and 6 months, respectively. Comparison performed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA); exam, influence of time after LGCP; time, influence of time during the meal test; exam × time, interaction of time after LGCP and time after meal ingestion; Subj, subject factor. AUC area under the curve. **p*<0.05]

whether the rise in postprandial GIP levels that we noted during the initial 6-month period following the LGCP is sustained in the longer term.

GLP-1 is secreted from the enteroendocrine L cells (located mainly in the distal small bowel) in response to the presence of nutrients in the lumen of the small intestine, particularly of carbohydrates and fat [21]. In addition to its insulinotropic actions, GLP-1 also suppresses glucagon secretion, delays gastric emptying, increases satiety, and may improve insulin sensitivity. GLP-1 postprandial secretion is markedly decreased in T2DM; however, its insulinotropic effect is preserved [21, 22]. In our study, postprandial GLP-1 levels exhibited a higher peak at 60 min after meal ingestion at 1-month following the LGCP, but this finding was not preserved at the 6-month follow-up (Fig. 4b). Moreover, we found no change in the total AUC of the meal-stimulated GLP-1 response both at 1 and 6 months following the procedure. Contrary, several reports have shown increased meal-stimulated GLP-1 secretion early after LSG, which is also sustained in the longer term [16, 23–27]. However, this effect after LSG may be less pronounced than the well-documented rise in postprandial GLP-1 levels after RYGB [15]. Recently, it has been suggested that additional mechanisms other than faster gastric emptying may account for the changes in

GLP-1 levels after LSG (e.g., increased secretion of foregut hormones such as cholecystokinin) [16, 28, 29]. Whether such additional mechanisms play a role in the meal-stimulated GLP-1 response after LGCP needs to be further studied.

Finally, the improved metabolic profile of our T2DM patients after the LGCP was also characterized by ameliorated postprandial hypertriglyceridemia, which is recognized as an independent risk factor for early atherosclerosis, ischemic heart disease, myocardial infarction, and death [30–32]. Indeed, we noted a decrease in postprandial triglyceride levels that was apparent at 1 month and achieved significance at 6 months after the LGCP (Fig. 5). This is in accord with the available evidence showing that LSG results in improved circulating triglyceride levels in T2DM patients [27, 33, 34]. Notably, Stefater et al. [35] have demonstrated that sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipidemia in a weight-independent manner due to reduced intestinal secretion of triglycerides following ingestion of a lipid meal.

In conclusion, our results show that LGCP in morbidly obese T2DM women leads to significant weight loss during the initial 6-month postoperative period. During this follow-up period, our study patients also achieved significant improvement in glucose homeostasis and postprandial hypertriglyceridemia, reflecting primarily the result of the significant weight loss due to the restrictive effect of the operation on food intake. Importantly, we further demonstrated that postprandial plasma levels of ghrelin are decreased at 1 and 6 months after the LGCP, a finding that has also been noted after other bariatric operations such as sleeve gastrectomy, vertical banded gastroplasty and biliopancreatic diversion with duodenal switch [15, 36], whereas increased circulating ghrelin levels have been shown following gastric banding and with diet alone [15, 36, 37]. Finally, it is of note that meal-induced GIP secretion was also increased after the LGCP in our study, a change that has also been reported after certain bariatric operations such as sleeve gastrectomy and gastric bypass and cannot be attributed to caloric restriction and weight loss alone [15, 38].

Bearing in mind the limitations of our study, such as the relatively limited size of our cohort, the lack of a controlled comparison group and the relatively short duration of follow-up, our study suggests that LGCP can offer an effective addition to the arsenal of bariatric surgery with effects that may extend beyond gastric volume restriction. Larger and long-term studies are required to further explore the spectrum of metabolic/hormonal effects of LGCP and establish the role of this bariatric technique in the treatment of obesity and T2DM.

Acknowledgments The EFSD funded this study through the New Horizons Collaborative Research Initiative (EFSD New Horizons research grant no. 1113 09).

Conflict of Interest Professor S. Kumar declares support from Novo Nordisk for research and honoraria for lectures and research consultancy. Dr. O. Bradnova, Dr. I. Kyrou, Dr. V. Hainer, Dr. J. Vcelak, Dr. T. Halkova, Dr. P. Sramkova, Dr. K. Dolezalova, Dr. Fried, Dr. P. McTeman, Dr. M. Hill, Dr. M. Kunesova, Dr. B. Bendlova, and Dr. J. Vrbikova have no conflict of interest to declare.

References

- Dixon JB, le Roux CW, Rubino F, et al. Bariatric surgery for type 2 diabetes. *Lancet*. 2012;379(9833):2300–11. PMID: 22683132.
- Fried M, Dolezalova K, Buchwald JN, et al. Laparoscopic greater curvature plication (LGCP) for treatment of morbid obesity in a series of 244 patients. *Obes Surg*. 2012;22(8):1298–307. PMID: 22648797.
- Mui WL, Lee DW, Lam KK, et al. Laparoscopic greater curve plication in Asia: initial experience. *Obes Surg*. 2013;23(2):179–83. PMID: 22968832.
- Niaz M, Maleki AR, Talebpour M. Short-term outcomes of laparoscopic gastric plication in morbidly obese patients: importance of postoperative follow-up. *Obes Surg*. 2013;23(1):87–92. PMID: 23007660.
- Skrekas G, Antiochos K, Stafyla VK. Laparoscopic gastric greater curvature plication: results and complications in a series of 135 patients. *Obes Surg*. 2011;21(11):1657–63. PMID: 21898042.
- Ramos A, Galvao Neto M, Galvao M, et al. Laparoscopic greater curvature plication: initial results of an alternative restrictive bariatric procedure. *Obes Surg*. 2010;20(7):913–8. PMID: 20407932.
- Brethauer SA, Harris JL, Kroh M, et al. Laparoscopic gastric plication for treatment of severe obesity. *Surg Obes Relat Dis*. 2011;7(1):15–22. PMID: 21144804.
- Abdelbaki TN, Huang CK, Ramos A, et al. Gastric plication for morbid obesity: a systematic review. *Obes Surg*. 2012;22(10):1633–9. PMID: 22960951.
- Lee DY, Guend H, Park K, et al. Outcomes of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass versus laparoscopic adjustable gastric banding in adolescents. *Obes Surg*. 2012;22(12):1859–64. PMID: 22923312.
- Montero PN, Stefanidis D, Norton HJ, et al. Reported excess weight loss after bariatric surgery could vary significantly depending on calculation method: a plea for standardization. *Surg Obes Relat Dis*. 2011;7(4):531–4. PMID: 21159563.
- Deitel M, Gawdat K, Melissas J. Reporting weight loss 2007. *Obes Surg*. 2007;17(5):565–8. PMID: 17658011.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412–9. PMID: 3899825.
- Meloun M, Hill M, Militký J, et al. Transformation in the PC-aided biochemical data analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(6):553–9. PMID: 10987205.
- Meloun M, Hill M, Militký J, et al. New methodology of influential point detection in regression model building for the prediction of metabolic clearance rate of glucose. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(3):311–22. PMID: 15080566.
- Scott WR, Batterham RL. Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: understanding weight loss and improvements in type 2 diabetes after bariatric surgery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;301(1):R15–27. Review. PMID: 21474429.
- Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, et al. Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial. *Obes Surg*. 2012;22(5):740–8. PMID: 22354457.
- Karamanakos SN, Vagenas K, Kalfarentzos F, et al. Weight loss, appetite suppression, and changes in fasting and postprandial ghrelin and peptide-YY levels after Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a prospective, double blind study. *Ann Surg*. 2008;247(3):401–7. PMID: 18376181.
- Zizzari P, Hassouna R, Grouelle D, et al. Physiological roles of preproghrelin-derived peptides in GH secretion and feeding. *Peptides*. 2011;32(11):2274–82. PMID: 21530598.
- Broglio F, Arvat E, Benso A, et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):5083–6. PMID: 11600590.
- Sun Y, Asnicar M, Saha PK, et al. Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab*. 2006;3(5):379–86. PMID: 16679295.
- Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1409–39. Review. PMID: 17928588.
- Paschetta E, Hvalbyg M, Musso G. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide: from pathophysiology to therapeutic opportunities in obesity-associated disorders. *Obes Rev*. 2011;12(10):813–28. Review. PMID: 21815989.
- Romero F, Nicolau J, Flores L, et al. Comparable early changes in gastrointestinal hormones after sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass surgery for morbidly obese type 2 diabetic subjects. *Surg Endosc*. 2012;26(8):2231–9. PMID: 22302537.
- Dimitriadis E, Daskalakis M, Kampa M, et al. Alterations in gut hormones after laparoscopic sleeve gastrectomy: a prospective clinical and laboratory investigational study. *Ann Surg*. 2013;257(4):647–54. PMID: 23108120.
- Papamargaritis D, le Roux CW, Sioka E, et al. Changes in gut hormone profile and glucose homeostasis after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis*. 2013;9(2):192–201. PMID: 23183113.
- Rubino F, Gagner M, Gentileschi P, et al. The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. *Ann Surg*. 2004;240(2):236–42. PMID: 15273546.
- Tsoli M, Chronaiou A, Kehagias I, Kalfarentzos F, Alexandrides TK. Hormone changes and diabetes resolution after biliopancreatic diversion and laparoscopic sleeve gastrectomy: a comparative prospective study. *Surg Obes Relat Dis*. 2013;9:667–77.
- Melissas J, Daskalakis M, Koukouraki S, et al. Sleeve gastrectomy—a “food limiting” operation. *Obes Surg*. 2008;18(10):1251–6. PMID: 18663545.
- Gaylinn BD, Thoner MO. Luminal influences to orchestrate gastroenterological hormone secretion: the fat, long-chain fatty acid, cholecystokinin, glucagon-like peptide 1 axis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(2):503–4. PMID: 20133469.
- Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, et al. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 2007;298(3):299–308. PMID: 17635890.
- Bansal S, Buring JE, Rifai N, et al. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA*. 2007;298(3):309–16. PMID: 17635891.
- Teno S, Uto Y, Nagashima H, et al. Association of postprandial hypertriglyceridemia and carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2000;23(9):1401–6. PMID: 10977041.
- Leonetti F, Capoccia D, Coccia F, et al. Obesity, type 2 diabetes mellitus, and other comorbidities: a prospective cohort study of laparoscopic sleeve gastrectomy vs medical treatment. *Arch Surg*. 2012;147(8):694–700. PMID: 22508671.

34. Moustarah F, Gilbert A, Després JP, et al. Impact of gastrointestinal surgery on cardiometabolic risk. *Curr Atheroscler Rep*. 2012;14(6): 588–96. PMID: 23054664.
35. Stefater MA, Sandoval DA, Chambers AP, Wilson-Pérez HE, Hofmann SM, Jandacek R, Tso P, Woods SC, Seeley RJ. Sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipid clearance by reducing intestinal triglyceride secretion. *Gastroenterology*. 2011 Sep;141(3): 939–949.e1–4. PMID: 21699773.
36. Kotidis EV, Koliakos GG, Baltzopoulos VG, et al. Serum ghrelin, leptin and adiponectin levels before and after weight loss: comparison of three methods of treatment—a prospective study. *Obes Surg*. 2006;16(11):1425–32. PMID: 17132406.
37. Chandarana K, Gelegen C, Karra E, et al. Diet and gastrointestinal bypass-induced weight loss: the roles of ghrelin and peptide YY. *Diabetes*. 2011;60(3):810–8. PMID: 21292870.
38. Laferrère B, Teixeira J, McGinty J, et al. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(7):2479–85. PubMed PMID: 18430778.

5.5 Efekt bariatrické léčby na metabolismus glukózy ve vztahu k metabolismu mastných kyselin po 2 letech

KUNEŠOVÁ M, SEDLÁČKOVÁ B, BRADNOVÁ O, TVRZICKÁ E, STAŇKOVÁ B, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, KALOUSKOVÁ P, HLAVATÝ P, HILL M, BENDLOVÁ B, FRIED M, HAINER V, VRBÍKOVÁ J. *Physiol Res.* 2015; **64**(2): 155-66. IF=1,293

Cílem studie bylo zjistit vliv tří typů bariatrických zákroků (laparoskopická gastrická bandáž – LAGB; laparoskopická gastrická plikace – LGP; biliopankreatická diverze – BPD) na remisi diabetes mellitus 2. typu (DM2) a složení mastných kyselin v podkožní tukové tkáni. Soubor tvořily ženy s DM2, 8 žen bylo po BPD, 9 žen po LAGB a 12 žen po LGP. Antropometrické charakteristiky a složení mastných kyselin jsme zjišťovali před operací, 6 měsíců a po 2 letech od operace. Nejúčinnější operací ve vztahu k remisi DM2 se jeví BPD ($p < 0,004$) ve srovnání s LAGB a LGP. Po dvou letech dosáhlo remise 7 z 8 žen po BPD a 6 z 9 žen po LAGB. Po LGP nedošlo k remisi ani u jedné z 12 pacientek. Dva roky po BPD jsme zjistili významně vyšší hladiny kyseliny laurové (12:0), myristolejové (14:1n-5) a palmitolejové (16:1n-7) a delta-9 desaturázy v tukové tkáni pacientek, což naznačuje vyšší lipogenezi. Po BPD došlo dále k významnému zvýšení kyseliny dokosatetraenové (22:4n-6), zatímco při hodnocení koncentrace kyseliny dokosapentaenové (22:5n-3) jsme zjistili po 6 měsících od operace signifikantní pokles a následně po dvou letech výrazný nárůst. Snižená koncentrace kyseliny dokosapentaenové (22:5n-3) byla pozorována i 6 měsíců po LAGB. Po dvou letech od LAGB a LGP jsme nezjistili významné změny v koncentraci mastných kyselin v tukové tkáni.

V závislosti na typu operace dochází ke změnám ve složení mastných kyselin v tukové tkáni po šesti měsících i při dlouhodobém sledování po dvou letech od operace.

Na této studii jsem se podílela asistencí při MMTT a zajištěním preanalytické fáze sbíraných vzorků plasmy, séra a tukové tkáně.

Fatty Acid Composition of Adipose Tissue Triglycerides in Obese Diabetic Women After Bariatric Surgery: a 2-Year Follow up

M. KUNEŠOVÁ^{1,2}, B. SEDLÁČKOVÁ¹, O. BRADNOVÁ¹, E. TVRZICKÁ²,
B. STAŇKOVÁ², P. ŠRÁMKOVÁ³, K. DOLEŽALOVÁ^{3,4}, P. KALOUSKOVÁ¹,
P. HLAVATÝ^{1,3}, M. HILL¹, B. BENDLOVÁ¹, M. FRIED^{3,4}, V. HAINER¹, J. VRBÍKOVÁ¹

¹Institute of Endocrinology Obesity Management Centre, Prague, Czech Republic, ²Fourth Department of Internal Medicine, First Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic, ³OB Clinic, Prague, Czech Republic, ⁴First Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic

Received July 13, 2015

Accepted July 27, 2015

Summary

Bariatric surgery is the most effective method in the treatment of obesity and type 2 diabetes (T2DM). The aim of this study was to evaluate the effects of different types of bariatric procedures on remission of T2DM and on the fatty acid composition in subcutaneous adipose tissue. Patients included obese diabetic women who underwent bariatric surgery: biliopancreatic diversion (BPD), n=8, laparoscopic gastric banding (LAGB), n=9 or laparoscopic greater curvature plication (LGCP), n=12. Anthropometric characteristics and fatty acid composition of adipose tissue (FA AT) were analyzed before surgery, then 6 months and 2 years after surgery. FA AT was analyzed by gas chromatography. Diabetes remission was estimated. BPD was most efficient in inducing a remission of diabetes ($p=0.004$). Significantly higher increases in lauric (12:0), myristoleic (14:1n-5) and palmitoleic (16:1n-7) acids and delta-9 desaturase were found two years after BPD, suggesting higher lipogenesis in adipose tissue. Docosatetraenoic acid (22:4n-6) increased significantly after BPD, while docosapentaenoic acid (22:5n-3) decreased 6 months after BPD and increased after 2 years. No changes were found after LAGB and LGCP after 2 years. Bariatric surgery led to significant changes in the fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue in severely obese diabetic women after six months and two years, and was partly influenced by the type of surgery used.

Key words

Obesity • Adipose tissue • Bariatric surgery • Palmitoleic acid • Fatty acids

Corresponding author

M. Kunešová, Institute of Endocrinology, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. E-mail: mkunesova@endo.cz

Introduction

Bariatric surgery is the most efficient method for the management of type 2 diabetes mellitus in obese subjects (Buchwald *et al.* 2004, 2009, Scheen *et al.* 2009). Various methods are used for the bariatric management of obese diabetics, with the differences of individual surgical procedures resulting in different weight loss and metabolic changes. Biliopancreatic diversion (BPD) is the most effective metabolic surgical procedure due to its mechanism of action including effects on the incretin production of GLP 1 (Tsoli *et al.* 2013), bile acid secretion (Ferrannini *et al.* 2015), and gut microbiota (Calvani *et al.* 2010, Clemente-Postigo *et al.* 2015). Acute caloric restriction may also be involved (Plourde *et al.* 2014). Laparoscopic adjustable gastric banding (LAGB) is one of the most frequently used restrictive methods, and its effect is mediated mainly by weight loss (Svane and Madsbad 2014). Laparoscopic greater curvature plication (LGCP) was recently introduced as a method of metabolic surgery (Talebpoor *et al.* 2012, Fried *et al.* 2012). Subsequent decreases in ghrelin and increases in GIP could make this method effective in treating type 2 diabetes (Bradnova *et al.* 2014).

Obesity and type 2 diabetes are often associated with dyslipidemia and an altered composition of fatty

acids in serum and adipose tissue lipids. The fatty acid composition of adipose tissue triglycerides (AT TG) reflects not only the composition of fat in food, but also the metabolic processing of fat, such as endogenous lipogenesis and lipid oxidation.

The aim of this study was to compare effect of three bariatric methods – biliopancreatic diversion (BPD), laparoscopic adjustable gastric banding (LAGB) and laparoscopic greater curvature plication (LGCP) on serum lipids and the composition of adipose triglycerides in obese type 2 diabetic women after 6 months and 2 years. The effect on glucose metabolism will be presented elsewhere.

Methods

Subjects

The study included 29 morbidly obese women with T2DM (age: 39-66 years; duration of diabetes: 1-14 years) that underwent BPD (8 subjects), LAGB (9 subjects) or LGCP (12 subjects). The patients were enrolled over time, as they were indicated for the operations. T2DM patients eligible for bariatric surgery were allocated to different bariatric procedures according to the consecutive numbers they received as they entered the process for study enrolment. Antidiabetic treatment for the patients was as follows: diet only in 3 cases, metformin in 26 cases, sulphonylurea in 8 cases and insulin in 3 cases. Exclusion criteria were treatment with either glitazones, DPP-IV inhibitors or GLP1 agonists, active cancer or an acute medical condition requiring hospitalization, evidence or history of clinically significant cardiovascular, pulmonary, endocrine (other than obesity and T2DM), hematological, renal, gastrointestinal, hepatic (other than NAFLD), neurologic, psychiatric, or severe allergic disease, pregnancy, breastfeeding, weight change more than 5 % of body weight over the preceding 12 weeks, or recent changes in exercise intensity or frequency over the preceding 4 weeks. All subjects signed an informed consent approved by the local ethical committee before entering the study.

Study design

One month before entering the study the subjects were put on a hypocaloric diet with 5000 kJ/day. Oral antidiabetic drugs were discontinued 3 days before examinations and long-acting insulin 24 h before examinations.

The following bariatric procedures were performed: laparoscopic adjustable gastric banding, laparoscopic greater curvature plication and biliopancreatic diversion.

Body composition

Anthropometric measurements were performed for all patients. Body weight was measured to the nearest 0.5 kg and height to the nearest 1 cm. BMI was calculated as body weight in kilograms divided by the square of the height in meters. Waist circumference was measured in the standing position, at half of the distance between the lower ribs and the crest of the pelvis. Hip circumference was measured as the widest gluteal circumference. Body composition was assessed by DEXA (GE LUNAR iDXA, GE Healthcare Technology, USA).

Adipose fatty acid analysis

Total lipids were extracted from 3-5 mg of adipose tissue by the method of Folch and coworkers (Folch *et al.* 1957) using dichloromethane instead of chloroform (Carlson 1985). Samples were transmethylated to FAME with 1M sodium methoxide in dry methanol under nitrogen atmosphere in darkness, for 60 min at ambient temperature. The reaction mixture was then neutralized with 1M acetic acid, methyl esters were extracted into hexane and passed through a column (5x20 mm) of anhydrous sodium sulphate. Extracts were dried under nitrogen, dissolved in an appropriate volume of isooctane and stored at -80 °C until analyzed.

Gas chromatography was performed with a Trace GC gas chromatograph combined with an AS 2000 autosampler (Thermo Finnigan, USA). The chromatograph was equipped with a capillary split/splitless injector and flame ionization detector (FID).

Analysis of FAME was performed on a fused-silica capillary column coated with 0.25 µm chemically bonded stationary phase Select FAME (100 m, 0.25 mm I.D., Agilent Technologies, The Netherlands). The oven temperature was programmed from 80 °C to 120 °C at 4 °/min, to 270 °C at 2 °/min, then isothermal for 25 min. The injector and detector temperatures were 250 and 270 °C, respectively. Hydrogen carrier gas was maintained at a head pressure of 70 kPa and split flow 10 ml/min, splitless time 0.25 min.

Integration software Clarity (Data Apex Ltd. Prague, Czech Republic) was used for data acquisition and handling.

Plasma samples

Blood samples were collected into chilled EDTA-containing tubes for assessment of glucose, insulin C-peptide levels, hsCRP and blood lipids. All samples were immediately cooled, and plasma was prepared, aliquoted, and stored at -80°C until assayed. Plasma levels of blood glucose, insulin, C-peptide and HbA1c were measured using the Cobas 6000 analyzer. Plasma concentrations of serum lipids and hsCRP were analyzed using standard laboratory methods.

Statistics

The relationships between individual metric variables and factors were evaluated by ANOVA models followed by least significant difference multiple comparisons. The model consisted of a subject factor (separating inter-individual variability from the remaining factors), the between-subject factors Operation, Age over median, BMI over median, initial value of dependent variable over median, within-subject factor Exam and Operation \times Exam interaction. The original data were transformed by power transformations to attain symmetric data distribution and constant variance (Meloun *et al.* 2000). The homogeneity of data was checked using residual analysis as explained elsewhere (Meloun *et al.* 2002, 2004). These analyses were performed in Statgraphics Centurion v. XV (Statpoint Inc., Herndon, Maryland, USA) statistical software.

The statistical software SIMCA-P+ Version 12.0.0.0 from Umetrics AB (Umeå, Sweden) was used for further data analysis. This software enabled us to find the number of the relevant components utilizing the prediction error sum of squares, and also allowed the detection of multivariate non-homogeneities and testing the multivariate normal distribution and homoscedasticity (homogeneity of variance).

The relationships between diabetes remission after individual bariatric procedures was tested using log-linear model (frequency analysis) using statistical software NCSS 2007, Kaysville, Utah, USA.

The results are given as means (lower limit of CI; upper limit of CI at the 95 % level) unless stated otherwise.

Due to significant differences between groups the results were evaluated after adjustment for age, BMI and initial level of the variable.

Diabetes remission was estimated according to Buse *et al.* (2009).

The study was approved by the Ethical Committee of the Institute of Endocrinology in Prague.

Results

Changes of anthropometric parameters and body composition after individual procedures are shown in Table 1. Significant differences in weight and body fat loss among individual types of surgeries were found, with the highest loss observed after BPD as expected due to the mechanism of action of this method.

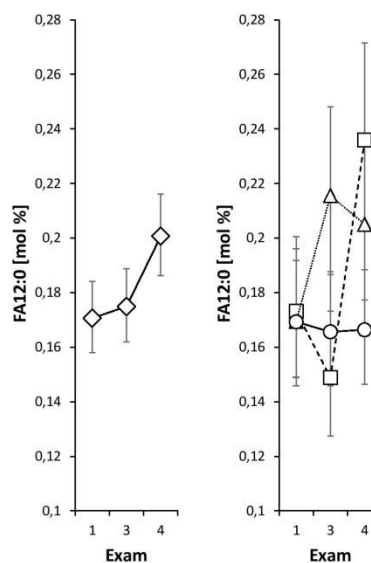


Fig. 1a. Lauric acid (12:0) in adipose tissue before the surgery (1), after 6 months (3) and after 2 years (4). Squares BPD, triangles LAGB, circles LGCP. Exam: $F=2.7$, $p=0.073$, Oper \times Exam: $F=2.7$, $p=0.037$.

Changes in the individual fatty acid composition of adipose tissue triglycerides, blood lipids and hsCRP are given in Tables 2-4. D-6 desaturase activity calculated as a product/precursor ratio did not differ significantly (data not shown). When evaluating differences between individual bariatric procedures we found significant differences in the following saturated and monounsaturated fatty acids: lauric acid (12:0), myristoleic acid (14:1n-5), palmitoleic acid (16:1n-7) and stearic acid (18:0) (Table 2, Fig. 1a and 1b). Concurrently, a significant difference was found in the activity of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1, delta-9 desaturase) calculated as product/precursor ratio (14:1n-5/14:0, D9-14, $p=0.014$, 18:1n-9/18:0, D9-18, $p=0.021$) (Fig. 2). After BPD, there was an increase in the

percentage of lauric, myristoleic and palmitoleic acid after 2 years concurrent with an increase SCD1 activity, suggesting increased lipogenic activity 2 years after the surgery. After LAGB, increased levels were found 6 months after surgery followed mostly by a decrease to the initial levels after 2 years. Gastric plication did not induce significant changes.

For polyunsaturated fatty acids we found significant differences among individual bariatric methods in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids.

Significant differences were found in changes of docosatraenoic acid (22:4n-6, DTA) and in docosapentaenoic acid (22:5n-3, DPA) (Table 3, Fig. 3). In the BPD group, there was an increase in DTA two years after the surgery, while no change was found in subjects after LAGB and LGCP. Representative of n-3 PUFA, DPA decreased after 6 months in the BPD and LAGB groups, followed by an increase after 2 years. In LGCP group the level of DPA did not change (Table 3, Fig. 3).

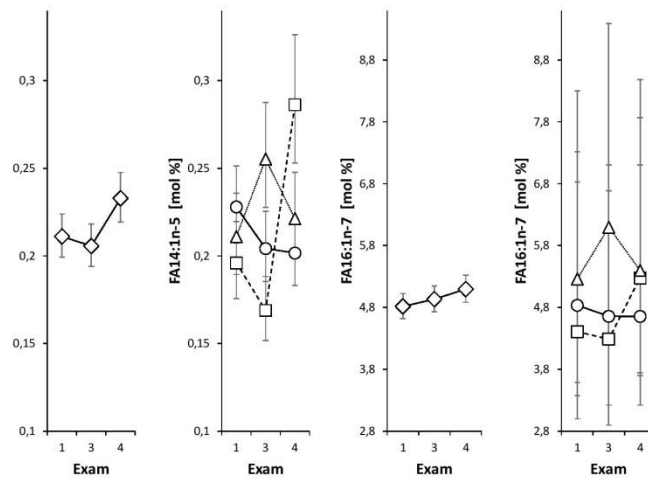


Fig. 1b. Myristoleic (14:1n-5) and palmitoleic (16:1n-7) acid in adipose tissue before the surgery (1), after 6 months (3) and after 2 years (4). Squares BPD, triangles LAGB, circles LGCP. 14:1n-5: Exam: $F=2.5$, $p=0.094$, Oper x Exam: $F=6.7$, $p<0.001$. 16:1n-7: Exam: $F=0.9$, $p=0.412$, Oper x Exam: $F=3.0$, $p=0.027$.

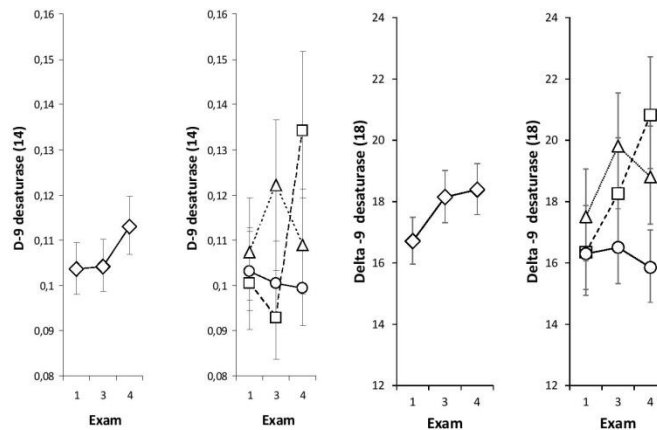


Fig. 2. Delta-9 desaturase 14:1n-5/14:0 and 18:1n-9/18:0 in adipose tissue before the surgery (1), after 6 months (3) and after 2 years (4). Squares BPD, triangles LAGB, circles LGCP. Delta-9 desaturase (14:1n-5/14:0): Exam: $F=1.5$, $p=0.227$, Oper x Exam: $F=3.4$, $p=0.014$. Delta-9 desaturase (18:1n-9/18:0): Exam: $F=4.6$, $p=0.013$, Oper x Exam: $F=3.1$, $p=0.021$.

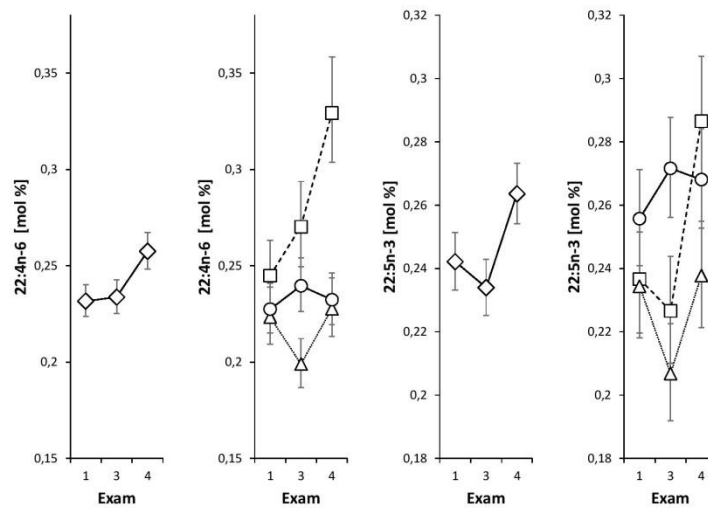


Fig. 3. Docosahexaenoic (22:4n-6) and docosapentaenoic (22:5n-3) acid in adipose tissue before the surgery (1), after 6 months (3) and after 2 years (4). Squares BPD, triangles LAGB, circles LGCP. 22:4n-6: Exam: $F=5.3$, $p=0.008$, Oper x Exam: $F=4.0$, $p=0.006$. 22:5n-3: Exam: $F=5.6$, $p<0.006$, Oper x Exam: $F=2.8$, $p<0.034$.

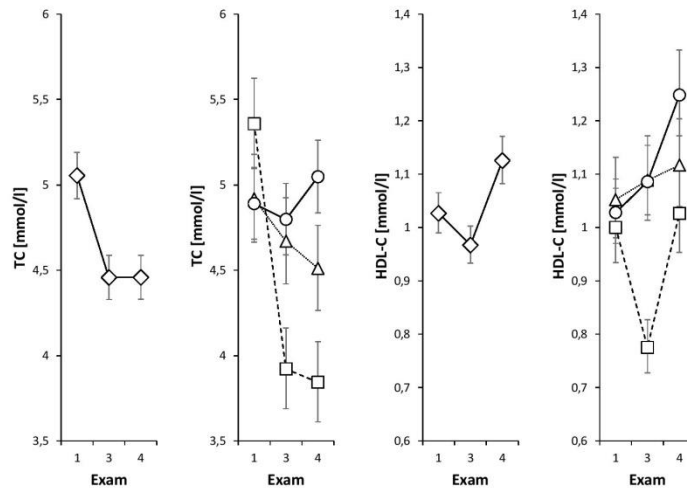


Fig. 4. Total cholesterol and HDL-cholesterol in serum before the surgery (1), after 6 months (3) and after 2 years (4). Squares BPD, triangles LAGB, circles LGCP. TC: Exam: $F=13.8$, $p<0.001$, Oper x Exam: $F=8.8$, $p<0.001$. HDL-C: Exam: $F=8.3$, $p<0.001$, Oper x Exam: $F=4.7$, $p=0.002$.

For serum lipids, a significant decrease in total cholesterol was found in the BPD group only, while HDL cholesterol increased significantly after LGCP (Table 4, Fig. 4). The inflammatory marker hsCRP decreased significantly in the BPD group, but only an insignificant decrease was found in the LAGB and LGCP groups (Table 4, Fig. 5).

A significantly higher remission of type 2 diabetes was found after biliopancreatic diversion (in 7 of 8 subjects) in comparison with laparoscopic gastric banding (6 of 9 subjects) and laparoscopic greater curvature plication (0/12), $P=0.0004$. Most of the subjects in the gastric plication group were treated by metformin only (7 of 12 subjects).

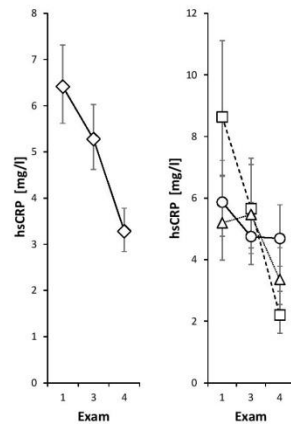


Fig. 5. Hs C-reactive protein in serum before the surgery (1), after 6 months (3) and after 2 years (4). Squares BPD, triangles LAGB, circles LGCP. Exam: $F=12.8$, $p<0.001$, Oper x Exam: $F=3.7$, $p=0.01$.

Table 1. Characteristic of the subjects and effect of bariatric procedures.

Parameter	Surgery	Exam			ANOVA **	
		1*	3	4	F-ratio	p-value
Age (years)	BPD	52 (48.8, 54.8)	-----	-----	9.8	<0.001
	LAGB	61.5 (59.4, 63.5)	-----	-----		
	GP	53.6 (51.2, 55.8)	-----	-----		
Height (cm)	BPD	166 (163, 169)	-----	-----	0.5	0.603
	LAGB	164 (161, 167)	-----	-----		
	GP	166 (164, 168)	-----	-----		
BMI (kg/m^2)	BPD	46.4 (44.9, 47.9)	38.5 (37.5, 39.6)	36 (35, 37)	5.5**	0.001
	LAGB	44.8 (43.5, 46.1)	39.6 (38.6, 40.7)	38.4 (37.5, 39.4)		
	GP	38.7 (37.8, 39.7)	34.7 (34.1, 35.4)	35.9 (35.2, 36.7)		
Weight (kg)	BPD	127 (124, 131)	106 (103, 109)	99.1 (96.5, 102)	6.5	<0.001
	LAGB	120 (117, 123)	107 (104, 109)	104 (101, 106)		
	GP	107 (104, 109)	95.7 (93.8, 97.6)	99 (97.1, 101)		
Waist (cm)	BPD	124 (121, 127)	112 (109, 115)	108 (105, 111)	2.6	0.049
	LAGB	125 (122, 128)	117 (115, 120)	114 (112, 117)		
	GP	111 (109, 113)	103 (101, 105)	106 (104, 108)		
Hip (cm)	BPD	141 (138, 144)	128 (125, 131)	122 (119, 125)	4.3	0.005
	LAGB	138 (136, 141)	133 (130, 135)	130 (127, 132)		
	GP	129 (127, 131)	120 (118, 123)	124 (122, 127)		
Body fat (%)	BPD	53 (51.8, 54.2)	45.6 (44.3, 46.9)	43.7 (42.2, 45.2)	6.9	<0.001
	LAGB	51.9 (50.8, 53)	48.9 (47.7, 50)	48.3 (47.2, 49.5)		
	GP	50.8 (49.8, 51.7)	47.7 (46.6, 48.7)	47.7 (46.6, 48.7)		
SBP (mm Hg)	BPD	128 (121, 135)	115 (109, 122)	117 (110, 124)	1.3	0.285
	LAGB	130 (123, 138)	120 (113, 127)	117 (110, 124)		
	GP	131 (125, 137)	118 (112, 124)	118 (112, 124)		
DBP (mm Hg)	BPD	80.1 (76, 84.4)	71.4 (67.6, 75.3)	68 (64.4, 71.8)	2.9	0.065
	LAGB	81.9 (77.8, 86.3)	82.6 (78.4, 87)	75.1 (70.9, 79.6)		
	GP	79.5 (76.2, 83)	73 (69.9, 76.3)	73 (69.9, 76.3)		
HR (/min)	BPD	82.3 (78.4, 86.3)	75 (71.4, 78.7)	70.8 (67.5, 74.4)	0.7	0.512
	LAGB	78.5 (74.7, 82.5)	72.9 (69.4, 76.7)	71.6 (68.1, 75.3)		
	GP	75.7 (72.5, 78.9)	71 (68, 74.2)	71 (68, 74.2)		

*mean (lower limit of CI, upper limit of CI at 95 % level); ** ANOVA model Oper x Exam; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate.

Table 2. Changes in adipose tissue saturated and monounsaturated fatty acids.

Variable	Oper	Exam			ANOVA model					
		1	3	4	Oper		Exam		Oper × Exam	
					F-ratio	p-value	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value
12:0	BPD	0.17 (0.15, 0.2)	0.15 (0.13, 0.17)	0.24 (0.2, 0.27)						
	LAGB	0.17 (0.15, 0.2)	0.22 (0.19, 0.25)	0.2 (0.18, 0.24)	1.3	0.278	2.7	0.073	2.7	0.037
	LGCP	0.17 (0.15, 0.19)	0.17 (0.15, 0.19)	0.17 (0.15, 0.19)						
14:0	BPD	2.1 (1.99, 2.21)	1.95 (1.85, 2.05)	2.28 (2.17, 2.41)						
	LAGB	1.96 (1.86, 2.06)	2.1 (2, 2.21)	2.03 (1.93, 2.14)	0.6	0.557	2	0.142	2.5	0.054
	LGCP	2.11 (2.02, 2.2)	2.07 (1.98, 2.16)	2.07 (1.98, 2.16)						
14:1n-5	BPD	0.2 (0.18, 0.22)	0.17 (0.15, 0.19)	0.29 (0.25, 0.33)						
	LAGB	0.21 (0.19, 0.24)	0.26 (0.23, 0.29)	0.22 (0.2, 0.25)	0.7	0.52	2.5	0.094	6.7	<0.001
	LGCP	0.23 (0.21, 0.25)	0.2 (0.19, 0.23)	0.2 (0.19, 0.23)						
16:0	BPD	22.8 (22.2, 23.4)	21.8 (21.1, 22.5)	21.5 (20.8, 22.1)						
	LAGB	21.8 (21.1, 22.4)	21.7 (21.1, 22.3)	21.3 (20.6, 21.9)	12.8	<0.001	1.6	0.206	1.2	0.323
	LGCP	23.1 (22.7, 23.6)	23.4 (22.9, 23.8)	23.4 (22.9, 23.8)						
16:1n-9	BPD	0.82 (0.78, 0.86)	0.89 (0.84, 0.93)	0.98 (0.94, 1)						
	LAGB	0.77 (0.74, 0.81)	0.78 (0.74, 0.82)	0.87 (0.83, 0.92)	7.9	<0.001	12.1	<0.001	1.5	0.21
	LGCP	0.79 (0.76, 0.82)	0.82 (0.79, 0.85)	0.82 (0.79, 0.85)						
16:1n-7	BPD	4.41 (3.0, 6.83)	4.29 (2.89, 6.68)	5.28 (3.74, 7.87)						
	LAGB	5.26 (3.58, 8.3)	6.09 (4.27, 9.39)	5.4 (3.7, 8.48)	5.8	0.005	0.9	0.412	3	0.027
	LGCP	4.83 (3.37, 7.32)	4.66 (3.22, 7.11)	4.66 (3.22, 7.11)						
18:0	BPD	16.3 (15.3, 17.5)	18.3 (17, 19.6)	20.8 (19.5, 22.2)						
	LAGB	17.5 (16.4, 18.7)	19.8 (18.6, 21.1)	18.8 (17.6, 20)	8.4	<0.001	4.6	0.013	3.1	0.021
	LGCP	16.3 (15.4, 17.2)	16.5 (15.6, 17.4)	16.5 (15.6, 17.4)						
18:1t	BPD	0.54 (0.51, 0.58)	0.46 (0.44, 0.49)	0.43 (0.41, 0.46)						
	LAGB	0.49 (0.46, 0.51)	0.46 (0.43, 0.48)	0.44 (0.41, 0.46)	12.7	<0.001	11.8	<0.001	1	0.408
	LGCP	0.57 (0.54, 0.6)	0.56 (0.53, 0.59)	0.56 (0.53, 0.59)						
18:1n-9	BPD	46.5 (45.8, 47.1)	47.6 (47, 48.3)	47.3 (46.7, 47.9)						
	LAGB	46.3 (45.7, 46.9)	46 (45.3, 46.6)	47.4 (46.8, 48.1)	0.9	0.414	1.8	0.174	2.2	0.079
	LGCP	46.8 (46.3, 47.4)	46.9 (46.4, 47.5)	46.9 (46.4, 47.5)						
18:1n-7	BPD	2.72 (2.61, 2.84)	2.71 (2.6, 2.83)	2.97 (2.85, 3.09)						
	LAGB	2.8 (2.69, 2.91)	2.84 (2.73, 2.96)	2.75 (2.64, 2.87)	13.1	<0.001	0.3	<0.754	1.9	<0.117
	LGCP	2.54 (2.44, 2.63)	2.55 (2.46, 2.64)	2.55 (2.46, 2.64)						
20:0	BPD	0.068 (0.062, 0.074)	0.064 (0.058, 0.07)	0.057 (0.053, 0.063)						
	LAGB	0.072 (0.066, 0.078)	0.064 (0.059, 0.07)	0.07 (0.064, 0.076)	1	0.382	2.3	0.108	1	0.417
	LGCP	0.066 (0.062, 0.071)	0.066 (0.061, 0.071)	0.066 (0.061, 0.071)						
20:1n-9	BPD	0.69 (0.65, 0.74)	0.71 (0.67, 0.76)	0.76 (0.72, 0.8)						
	LAGB	0.69 (0.65, 0.73)	0.66 (0.62, 0.71)	0.73 (0.69, 0.78)	6.1	0.004	1.4	0.257	1.1	0.391
	LGCP	0.65 (0.62, 0.69)	0.65 (0.61, 0.68)	0.65 (0.61, 0.68)						

*mean (lower limit of CI, upper limit of CI at 95 % level).

Discussion

The main result of the study was the significant difference among bariatric procedures in changes of saturated and monounsaturated fatty acids as well as stearoyl CoA desaturase (SCD1) activity evaluated as the product/precursor ratio. The increases in lauric (12:0), myristoleic (14:1n-5) and palmitoleic (16:1n-7) acid

concurrently with the increased activity of SCD1 in the biliopacreatic diversion group suggests lasting enhanced lipogenic activity 2 years after the surgery, in contrast to the LAGB and LGCP subjects. A strong association between the SCD1 product/precursor ratio and mRNA expression has been found in abdominal subcutaneous adipose tissue (Pinnick *et al* 2012).

Table 3. Changes in adipose tissue polyunsaturated fatty acids and sums of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids.

Variable	Oper	Exam			ANOVA model					
		1	3	4	Oper		Exam		Oper × Exam	
					F-ratio	p-value	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value
18:2n-6	BPD	13 (12.4, 13.5)	12.8 (12.3, 13.4)	12.5 (12, 13)						
	LAGB	13.3 (12.8, 13.8)	13.1 (12.6, 13.6)	12.5 (12.1, 13)	0.4	0.658	1.9	0.164	0.4	0.793
	LGCP	12.9 (12.5, 13.4)	12.4 (12, 12.9)	12.4 (12, 12.9)						
18:3n-6	BPD	0.03 (0.025, 0.036)	0.025 (0.021, 0.03)	0.036 (0.03, 0.043)						
	LAGB	0.041 (0.034, 0.049)	0.041 (0.035, 0.049)	0.038 (0.032, 0.046)	3.1	0.053	0.5	0.632	0.9	0.445
	LGCP	0.037 (0.032, 0.043)	0.036 (0.031, 0.042)	0.036 (0.031, 0.042)						
18:3n-3	BPD	0.81 (0.76, 0.85)	0.69 (0.65, 0.73)	0.71 (0.67, 0.75)						
	LAGB	0.8 (0.76, 0.84)	0.8 (0.76, 0.84)	0.76 (0.72, 0.8)	1.7	0.185	4.7	0.013	1.7	0.16
	LGCP	0.78 (0.74, 0.82)	0.72 (0.69, 0.75)	0.72 (0.69, 0.75)						
20:2n-6	BPD	0.25 (0.24, 0.27)	0.26 (0.25, 0.28)	0.27 (0.26, 0.29)						
	LAGB	0.26 (0.25, 0.27)	0.25 (0.24, 0.27)	0.24 (0.23, 0.26)	12.6	<0.001	0	0.961	1.1	0.371
	LGCP	0.23 (0.22, 0.24)	0.23 (0.22, 0.24)	0.23 (0.22, 0.24)						
20:3n-6	BPD	0.38 (0.36, 0.41)	0.38 (0.35, 0.41)	0.46 (0.42, 0.5)						
	LAGB	0.35 (0.33, 0.38)	0.32 (0.3, 0.34)	0.36 (0.33, 0.38)	9.6	<0.001	3.3	0.044	2	0.111
	LGCP	0.35 (0.33, 0.37)	0.35 (0.33, 0.37)	0.35 (0.33, 0.37)						
20:4n-6	BPD	0.57 (0.55, 0.6)	0.56 (0.53, 0.59)	0.61 (0.58, 0.64)						
	LAGB	0.59 (0.56, 0.62)	0.58 (0.55, 0.61)	0.6 (0.57, 0.62)	2.1	0.128	1.5	0.235	0.5	0.731
	LGCP	0.57 (0.54, 0.59)	0.55 (0.53, 0.57)	0.55 (0.53, 0.57)						
20:5n-3	BPD	0.054 (0.048, 0.06)	0.045 (0.04, 0.051)	0.053 (0.047, 0.06)						
	LAGB	0.057 (0.05, 0.064)	0.051 (0.046, 0.057)	0.051 (0.045, 0.057)	14.7	<0.001	3.2	0.047	0.6	0.674
	LGCP	0.071 (0.065, 0.077)	0.062 (0.057, 0.068)	0.062 (0.057, 0.068)						
22:4n-6	BPD	0.24 (0.23, 0.26)	0.27 (0.25, 0.29)	0.33 (0.3, 0.36)						
	LAGB	0.22 (0.21, 0.24)	0.2 (0.19, 0.21)	0.23 (0.21, 0.24)	15.3	<0.001	5.3	0.008	4	0.006
	LGCP	0.23 (0.22, 0.24)	0.24 (0.23, 0.25)	0.24 (0.23, 0.25)						
22:5n-6	BPD	0.037 (0.033, 0.042)	0.037 (0.033, 0.043)	0.043 (0.037, 0.05)						
	LAGB	0.034 (0.03, 0.038)	0.031 (0.028, 0.035)	0.033 (0.03, 0.038)	7.1	0.002	0.8	0.45	0.5	0.762
	LGCP	0.029 (0.026, 0.031)	0.031 (0.028, 0.034)	0.031 (0.028, 0.034)						
22:5n-3	BPD	0.24 (0.22, 0.25)	0.23 (0.21, 0.24)	0.29 (0.27, 0.31)						
	LAGB	0.23 (0.22, 0.25)	0.21 (0.19, 0.22)	0.24 (0.22, 0.25)	5.8	0.005	5.6	0.006	2.8	0.034
	LGCP	0.26 (0.24, 0.27)	0.27 (0.26, 0.29)	0.27 (0.26, 0.29)						
22:6n-3	BPD	0.14 (0.13, 0.15)	0.12 (0.11, 0.13)	0.14 (0.12, 0.15)						
	LAGB	0.13 (0.12, 0.14)	0.12 (0.11, 0.13)	0.12 (0.11, 0.13)	14.2	<0.001	0.4	0.669	0.9	0.467
	LGCP	0.15 (0.14, 0.17)	0.16 (0.15, 0.18)	0.16 (0.15, 0.18)						
SFA	BPD	27.5 (26.7, 28.3)	26 (25, 26.9)	25.7 (24.8, 26.6)						
	LAGB	26.9 (26.1, 27.7)	26.6 (25.8, 27.4)	26.3 (25.5, 27.1)	24.1	<0.001	1.5	0.236	1.1	0.359
	LGCP	29 (28.4, 29.6)	29.2 (28.6, 29.8)	29.2 (28.6, 29.8)						
MFA	BPD	56.3 (55.5, 57.1)	57.3 (56.5, 58.2)	58.3 (57.5, 59.2)						
	LAGB	56.6 (55.8, 57.4)	57.1 (56.3, 57.9)	58 (57.2, 58.9)	9.4	<0.001	4	0.024	1	0.431
	LGCP	55.5 (54.9, 56.2)	55.5 (54.8, 56.2)	55.5 (54.8, 56.2)						
PUFAn-6	BPD	14.6 (13.9, 15.2)	14.5 (13.8, 15.2)	14.3 (13.7, 15)						
	LAGB	14.5 (13.9, 15.1)	14.2 (13.6, 14.8)	13.7 (13.2, 14.3)	0.5	0.586	0.4	0.664	0.5	0.771
	LGCP	14.6 (14, 15.1)	14.4 (13.9, 15)	14.4 (13.9, 15)						
PUFAn-3	BPD	1.24 (1.19, 1.29)	1.09 (1.05, 1.13)	1.19 (1.15, 1.24)						
	LAGB	1.24 (1.19, 1.29)	1.17 (1.13, 1.21)	1.16 (1.12, 1.21)	3.7	0.032	7.2	0.002	1.5	0.204
	LGCP	1.27 (1.22, 1.31)	1.22 (1.19, 1.27)	1.22 (1.19, 1.27)						

*mean (lower limit of CI, upper limit of CI at 95 % level).

Table 4. Changes in blood lipids and hsCRP.

Variable	Oper	Exam			ANOVA model					
		1	3	4	Oper		Exam		Oper × Exam	
					F-ratio	p-value	F-ratio	p-value	F-ratio	p-value
TC	BPD	5.36 (5.1, 5.62)	3.92 (3.69, 4.16)	3.84 (3.61, 4.08)	8.7	<0.001	13.8	<0.001	8.8	<0.001
	LAGB	4.92 (4.66, 5.18)	4.67 (4.42, 4.92)	4.51 (4.26, 4.76)						
	LGCP	4.89 (4.68, 5.1)	4.8 (4.59, 5.01)	4.8 (4.59, 5.01)						
HDL	BPD	1 (0.934, 1.07)	0.775 (0.728, 0.827)	1.03 (0.953, 1.11)	12.7	<0.001	8.3	<0.001	4.7	0.002
	LAGB	1.05 (0.981, 1.13)	1.09 (1.01, 1.17)	1.12 (1.04, 1.2)						
	LGCP	1.03 (0.97, 1.09)	1.09 (1.02, 1.15)	1.09 (1.02, 1.15)						
TG	BPD	1.24 (1.07, 1.44)	1.42 (1.22, 1.66)	1.01 (0.876, 1.17)	2.2	0.123	3.5	0.038	1.8	0.143
	LAGB	1.68 (1.44, 1.99)	1.31 (1.11, 1.54)	1.4 (1.2, 1.64)						
	LGCP	1.38 (1.22, 1.57)	1.08 (0.957, 1.21)	1.08 (0.957, 1.21)						
hsCRP	BPD	8.63 (6.7, 11.1)	5.66 (4.38, 7.29)	2.21 (1.61, 2.97)	0.2	0.819	12.8	<0.001	3.7	0.01
	LAGB	5.19 (3.99, 6.74)	5.47 (4.2, 7.09)	3.36 (2.54, 4.39)						
	LGCP	5.87 (4.76, 7.22)	4.75 (3.84, 5.86)	4.75 (3.84, 5.86)						

*mean (lower limit of CI, upper limit of CI at 95 % level); TC, total cholesterol; HDL, HDL cholesterol; TG, triglycerides; hsCRP, high sensitivity C-reactive protein.

The relationship of circulating palmitoleate to insulin sensitivity has been broadly discussed in animals as well as in humans, but with unequivocal conclusions. A large study in Finnish men using proton magnetic spectroscopy for analysis of serum FA profiles showed that an increased percentage of saturated but also n-7 and n-9 monounsaturated FA in serum were biomarkers for an increased risk of the development of hyperglycemia and type 2 diabetes (Mahendran *et al.* 2013). On the other hand, Stefan *et al.* (2010) showed a positive correlation of serum palmitoleate (16:1n-7) with insulin sensitivity measured by oGTT and euglycemic hyperinsulinemic clamp in subjects with increased risk for type 2 diabetes. Additionally, no influence of palmitoleate availability on insulin sensitivity assessed by euglycemic hyperinsulinemic clamp was reported in obese insulin sensitive and insulin resistant subjects (Fabbrini *et al.* 2011).

We found the highest lipogenesis in subjects with the highest weight loss after 2 years, i.e. in the BPD group. This corresponds to the results of the pan-European Diogenes study, where obese subjects were treated by a low calorie diet for two months followed by a six-month weight maintenance regimen (Larsen *et al.* 2010). Significant higher weight loss after 8 months was found in subjects with lower baseline monounsaturated fatty acids (14:1n-5, 16:1n-7 and trans 16:1n-7) in adipose tissue triglycerides (Kunešová *et al.* 2012). When evaluating the relationship of fatty acid composition with mRNA expression from the same biopsy of adipose tissue

in the Diogenes study, the central role of myristoleic acid after LCD was associated with the down-regulation of genes involved in fatty acid biosynthesis (SCD, FADS1 and FADS2). After the weight maintenance period, there was a significant positive relationship of 14:1n-5 with genes involved in *de novo* lipogenesis (AACS, FASN, SCD, FADS1, FADS2 and ELOVL5) only in subjects with continuing weight loss in contrast to subjects who regained weight (Monastier *et al.* 2015), suggesting enhanced lipogenesis in subjects with continuing weight loss.

The role of palmitoleate as a possible lipokine has been widely discussed in the past few years. The recent review of Hodson and Karpe (2013) summarized the current knowledge on palmitoleate and emphasized the different roles of palmitoleate in blood and adipose tissue. The localization of adipose tissue was shown to play a major role in the release of palmitoleic acid, with a higher contribution from gluteofemoral subcutaneous fat in comparison with abdominal subcutaneous fat. This difference may be the result of enhanced SCD1 mRNA expression in gluteal adipose tissue (Pinnick *et al.* 2012). In this context, the increase of myristoleic and palmitoleic acids in abdominal subcutaneous fat found in our study could reflect a positive metabolic effect of BPD. A similar result was found in a study comparing overweight and obese subjects in which lower monounsaturated FAs and palmitoleic acid content were found in subcutaneous and visceral adipose tissue, respectively, with increasing adiposity (Garaulet *et al.* 2011).

Polyunsaturated fatty acids are a minor FA component of triglycerides in adipose tissue. An enhanced percentage of docosatetraenoic acid (22:4n-6) in AT was shown in the BPD group after 2 years, in contrast to the LAGB and LGCP groups. This could be the result of a better supply of this FA in food. Better resorption is less probable due to the malabsorptive character of the surgery. Enhanced elongation of arachidonic acid (20:4n-6) or reduced oxidation of n-6 PUFA could be other contributing factors.

The decreased percentage of docosapentaenoic acid (22:5n-3) in the BPD and LAGB groups 6 months after surgery could reflect the increased oxidation of n-3 PUFA or their lower supply from circulation due to decreased intake or absorption. After 2 years, the levels returned to baseline.

Type 2 DM remission

We found significant differences in type 2 diabetes mellitus remission (T2DMR) after individual bariatric procedures. BPD resulted in the highest remission followed by LAGB, while in the LGCP group most subjects were treated by metformin two years after the surgery. Robert *et al.* (2013) did not find differences in T2DMR when comparing Roux-en-Y gastric bypass, sleeve gastrectomy and LAGB. They showed rather that preoperative BMI ≤ 50 kg/m², duration of type 2 diabetes ≤ 4 years, glycated hemoglobin ≤ 7.1 %, fasting glucose < 1.14 g/l and absence of insulin therapy were positive predictors of diabetes remission. Concurrently, a short duration of diabetes and good preoperative glycemic control increased the rates of T2DM remission. Their

results suggest that preoperative metabolic data could be of greater importance than the choice of bariatric procedure. Steven *et al.* (2015) did not distinguish between individual bariatric procedures, but patients in that study mostly (63 %) underwent Roux-en-Y gastric bypass. Significant predictors were maximum percentage of weight loss and baseline HbA1c. Preoperative BMI, diabetes duration and age were not significant predictors. This result was also supported by a meta-analysis that found that diabetes remission is unrelated to basal BMI (Panunzi *et al.* 2015).

Conclusion

Significant differences in the fatty acid composition of adipose tissue triglycerides were found among three methods of bariatric surgery. Biliopancreatic diversion lead to an increase of saturated (12:0, 18:0) and monounsaturated (14:1n-5 and 16:1n-7) fatty acids and stearoyl CoA desaturase 1 after 2 years, suggesting enhanced lipogenesis. The highest type 2 diabetes mellitus remission was found after BPD. In contrast, minor changes were found after laparoscopic gastric banding and laparoscopic greater curvature plication.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The study was supported by grant IGA NT-13735-4, Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- BRADNOVA O, KYROU I, HAINER V, VCELAK J, HALKOVA T, SRAMKOVA P, DOLEZALOVA K, FRIED M, MCTERNAN P, KUMAR S, HILL M, KUNESOVA M, BENDLOVA B, VRBIKOVA J: Laparoscopic greater curvature plication in morbidly obese women with type 2 diabetes: effects on glucose homeostasis, postprandial triglyceridemia and selected gut hormones. *Obes Surg* **24**: 718-726, 2014.
- BUCHWALD H, AVIDOR Y, BRAUNWALD E, JENSEN MD, PORIES W, FAHRBACH K, SCHOEELLES K: Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **292**: 1724-1737, 2004.
- BUCHWALD H, ESTOK R, FAHRBACH K, BANEL D, JENSEN MD, PORIES WJ, BANTLE JP, SLEDGE I: Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med* **122**: 248-256, 2009.
- BUSE JB, CAPRIO S, CEFALU WT, CERIELLO A, DEL PRATO S, INZUCCHI SE, MCLAUGHLIN S, PHILLIPS GL 2ND, ROBERTSON RP, RUBINO F, KAHN R, KIRKMAN MS: How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care* **32**: 2133-2135, 2009.
- CALVANI R, MICCHELI A, CAPUANI G, TOMASSINI MICCHELI A, PUCETTI C, DELFINI M, IACONELLI A, NANNI G, MINGRONE G: Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. *Int J Obes (Lond)* **34**: 1095, 2010.

- CARLSON LA: Extraction of lipids from human whole serum and lipoproteins and from rat liver tissue with methylene chloride-methanol: a comparison with extraction with chloroform-methanol. *Clin Chim Acta* **149**: 89-93, 1985.
- CLEMENTE-POSTIGO M, ROCA-RODRIGUEZ MDEL M, CAMARGO A, OCAÑA-WILHELMI L, CARDONA F, TINAHONES FJ: Lipopolysaccharide and lipopolysaccharide-binding protein levels and their relationship to early metabolic improvement after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis* **11**: 933-939, 2015.
- FABBRINI E, MAGKOS F, SU X, ABUMRAD NA, NEJEDLY N, COUGHLIN CC, OKUNADE AL, PATTERSON BW, KLEIN S: Insulin sensitivity is not associated with palmitoleate availability in obese humans. *J Lipid Res* **52**: 808-812, 2011.
- FERRANNINI E, CAMASTRA S, ASTIARRAGA B, NANNIPIERI M, CASTRO-PEREZ J, XIE D, WANG L, CHAKRAVARTHY M, HAEUSLER RA: Increased bile acid synthesis and deconjugation after biliopancreatic diversion. *Diabetes* in press 2015.
- FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**: 497-509, 1957.
- FRIED M, DOLEZALOVA K, BUCHWALD JN, MCGLENNON TW, SRAMKOVA P, RIBARIC G: Laparoscopic greater curvature plication (LGCP) for treatment of morbid obesity in a series of 244 patients. *Obes Surg* **22**: 1298-1307, 2012.
- GARAULET M, HERNANDEZ-MORANTE JJ, TEBAR FJ, ZAMORA S: Relation between degree of obesity and site-specific adipose tissue fatty acid composition in a Mediterranean population. *Nutrition* **27**: 170-176, 2011.
- HILL M, PAŘÍZEK A, CIBULA D, KANCHEVA R, JIRÁSEK JE, JIRKOVSKÁ M, VELÍKOVÁ M, KUBÁTOVÁ J, KLÍMKOVÁ M, PAŠKOVÁ A, ZIŽKA Z, KANCHEVA L, KAZIHNITKOVÁ H, ZAMRAZILOVÁ L, STÁRKA L: Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor. *J Steroid Biochem Mol Biol* **121**: 594-610, 2010.
- HODSON L, KARPE F: Is there something special about palmitoleate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **16**: 225-231, 2013.
- KUNEŠOVÁ M, HLAVATÝ P, TVRZICKÁ E, STAŇKOVÁ B, KALOUSKOVÁ P, VIGUERIE N, LARSEN TM, VAN BAAK MA, JEBB SA, MARTINEZ JA, PFEIFFER AF, KAFATOS A, HANDJIEVA-DARLENSKA T, HILL M, LANGIN D, ZÁK A, ASTRUP A, SARIS WH: Fatty acid composition of adipose tissue triglycerides after weight loss and weight maintenance: the DIOGENES study. *Physiol Res* **61**: 597-607, 2012.
- LARSEN TM, DALSKOV SM, VAN BAAK M, JEBB SA, PAPADAKI A, PFEIFFER AF, MARTINEZ JA, HANDJIEVA-DARLENSKA T, KUNESOVA M, PIHLSGARD M, STENDERS, HOLST C, SARIS WH, ASTRUP A: Diets with high or low protein content and glycaemic index for weight-loss maintenance. *N Engl J Med* **363**: 2102-2113, 2010.
- MAHENDRAN Y, CEDERBERG H, VANGIPURAPU J, KANGAS AJ, SOININEN P, KUUSISTO J, UUSITUPA M, ALA-KORPELA M, LAAKSO M: Glycerol and fatty acids in serum predict the development of hyperglycemia and type 2 diabetes in Finnish men. *Diabetes Care* **36**: 3732-3738, 2013.
- MELOUN M, HILL M, MILITKY J, KUPKA K: Transformation in the PC-aided biochemical data analysis. *Clin Chem Lab Med* **38**: 553-559, 2000.
- MELOUN M, MILITKY J, HILL M, BRERETON RG: Crucial problems in regression modelling and their solutions. *Analyst* **127**: 433-450, 2002.
- MELOUN M, HILL M, MILITKY J, VRBIKOVA J, STANICKA S, SKRHA J: New methodology of influential point detection in regression model building for the prediction of metabolic clearance rate of glucose. *Clin Chem Lab Med* **42**: 311-322, 2004.
- MONTASTIER E, VILLA-VIALANEIX N, CASPAR-BAUGUIL S, HLAVATY P, TVRZICKA E, GONZALEZ I, SARIS WH, LANGIN D, KUNESOVA M, VIGUERIE N: System model network for adipose tissue signatures related to weight changes in response to calorie restriction and subsequent weight maintenance. *PLoS Comput Biol* **11**: e1004047, 2015.
- OKADA T, FURUHASHI N, KUROMORI Y, MIYASHITA M, IWATA F, HARADA K: Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. *Am J Clin Nutr* **82**: 747-750, 2005.

- PANUNZI S, DE GAETANO A, CARNICELLI A, MINGRONE G: Predictors of remission of diabetes mellitus in severely obese individuals undergoing bariatric surgery: do BMI or procedure choice matter? A meta-analysis. *Ann Surg* **261**: 459-467, 2015.
- PINNICK KE, NEVILLE MJ, FIELDING BA, FRAYN KN, KARPE F, HODSON L: Gluteofemoral adipose tissue plays a major role in production of the lipokine palmitoleate in humans. *Diabetes* **61**: 1399-1403, 2012.
- PLOURDE CÉ, GRENIER-LAROUCHE T, CARON-DORVAL D, BIRON S, MARCEAU S, LEBEL S, BIERTHO L, TCHERNOF A, RICHARD D, CARPENTIER AC: Biliopancreatic diversion with duodenal switch improves insulin sensitivity and secretion through caloric restriction. *Obesity (Silver Spring)* **22**: 1838-1846, 2014.
- ROBERT M, FERRAND-GAILLARD C, DISSE E, ESPALIEU P, SIMON C, LAVILLE M, GOULLAT C, THIVOLET C: Predictive factors of type 2 diabetes remission 1 year after bariatric surgery: impact of surgical techniques. *Obes Surg* **23**: 770-775, 2013.
- SCHEEN AJ, DE FLINES J, DE ROOVER A, PAQUOT N: Bariatric surgery in patients with type 2 diabetes: benefits, risks, indications and perspectives. *Diabetes Metab* **35**: 537-543, 2009.
- STEFAN N, KANTARTZIS K, CELEBI N, STAIGER H, MACHANN J, SCHICK F, CEGAN A, ELCNEROVA M, SCHLEICHER E, FRITSCHER A, HÄRING HU: Circulating palmitoleate strongly and independently predicts insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care* **33**: 405-407, 2010.
- STEVEN S, CAREY PE, SMALL PK, TAYLOR R: Reversal of Type 2 diabetes after bariatric surgery is determined by the degree of achieved weight loss in both short- and long-duration diabetes. *Diabet Med* **32**: 47-53, 2015.
- SVANE MS, MADSBAD S: Bariatric surgery - effects on obesity and related co-morbidities. *Curr Diabetes Rev* **10**: 208-214, 2014.
- TALEBPOUR M, MOTAMEDI SM, TALEBPOUR A, VAHIDI H: Twelve year experience of laparoscopic gastric plication in morbid obesity: development of the technique and patient outcomes. *Ann Surg Innov Res* **6**: 7, 2012.
- TSOLI M, CHRONAIOU A, KEHAGIAS I, KALFARENTZOS F, ALEXANDRIDES TK: Hormone changes and diabetes resolution after biliopancreatic diversion and laparoscopic sleeve gastrectomy: a comparative prospective study. *Surg Obes Relat Dis* **9**: 667-677, 2013.

6 Diskuze

6.1 Genetické pozadí běžné obezity

Běžná obezita je multifaktoriální metabolická choroba s komplexním typem dědičnosti a neúplnou penetrancí, což její studium velmi ztěžuje. Patogeneze obezity zahrnuje mnohonásobné interakce mezi behaviorálními, environmentálními, genetickými i epigenetickými faktory, které také mohou vysvětlovat interindividuální rozdíly v rozvoji obezity (van-Vliet Ostaptschouk, 2012). Genetický podklad obezity dokazuje familiární výskyt, adopční studie a studie na dvojčatech, které posloužily pro odhad heritability BMI. Dalším užitečným modelem pro studium genetiky bylo popsání několika syndromů, v jejichž hlavních rysech se objevil i fenotyp obezity (Prader-Willi, Bardet-Biedel, Alström a další). Studium **monogenní obezity** je mnohem snazší, protože je způsobena mutací v jediném genu, které jsou ovšem velice vzácné. Nejčastěji se jedná o mutace v genech *MC4R*, *MC3R*, *POMC*, *LEP*, *LEPR*, *SIM1*, *PC1* a *NTRK2*. Produkty těchto genů hrají důležitou roli v integraci periferních a neurálních signálů prostřednictvím leptin–melanokortinových drah, jsou zodpovědné za udržení energetické rovnováhy (Farooqi a O'Rahilly, 2005)

V případě **polygenní obezity** je odhalování souvisejících genů nesmírně složité, především z důvodu jejich malého účinku. Navíc tyto geny nepůsobí samostatně, ale v interakci s dalšími geny či v kombinaci s vlivy prostředí. Velkým převratem byl technologický pokrok v podobě analýzy na mikročipech a bylo provedeno několik celogenomových asociačních studií (GWAS). Bylo sice nalezeno několik zajímavých lokusů, které ale mohou vysvětlit pouze malou část heritability obezity, což pro klinickou praxi nemělo velký význam. Přesto je důležité poznat biologickou funkci odhalených genů asociačními studiemi a pochopit molekulární a biochemické procesy při rozvoji obezity a zajistit tak co nejúčinnější „personalizovanou“ léčbu.

Nejvýznamnější asociace BMI byly zjištěny s geny *FTO* a *MC4R*, které byly opakovaně potvrzeny mnoha replikačními studiemi. Další relativně silné asociace s obezitou, potvrzené nezávislými studiemi, byly například s geny *TMEM18*, *SH2B1*, *PCSK1*, *SEC16B*, *BDNF* a *KCTD15* (Renström *et al.*, 2009; Holzapfel *et al.*, 2010). Některé z nalezených predisponujících genů mají přímou funkční souvislost s obezitou. Například *MC4R* je důležitý v regulaci příjmu potravy, *BDNF* hraje roli při poruchách příjmu

potravy, SH2B1 se účastní leptinové a inzulínové signalizace, TMEM18 se účastní neurálního vývoje. Další geny jsou přednostně exprimovány v hypothalamu v centrech regulace příjmu potravy, ovšem jejich přesná biologická funkce zatím není jasná a proto jsou předmětem intenzivního výzkumu. Ukazuje se, že varianty v těchto genech jsou spojeny nejen s antropometrickými, metabolickými či behaviorálními ukazateli, ale například i se schopností snižovat hmotnost během intervenčního programu, včetně léčby bariatrickou operací. Velmi zajímavé je sledovat vliv variant, spojených s obezitou u štíhlých jedinců a odhalit, co je před rozvojem choroby chrání.

Výsledkem GWAS studie z roku 2009 byl silný asociační signál polymorfismu rs12970134, lokalizovaný 154 kb za genem *MC4R*, který souvisí se zvýšeným rizikem obezity a inzulínové rezistence, a to nezávisle na BMI (Chambers *et al.*, 2008). V našem souboru 850 normoglykemických žen s variabilním BMI, nebyla pozorována asociace alely A s BMI, ani s jinými sledovanými antropometrickými parametry (**příloha 5.1**). Nicméně jsme z dotazníkových dat zjistili, že nositelky minoritní alely A měly vyšší maximální i minimální hmotnost dosaženou v dospělosti a navíc, že vliv alely A na parametry spojené s obezitou je patrný především u žen se syndromem polycystických ovárií (PCOS), které měly vyšší obvod pasu, boků a indexu BAI. Tendence k vyššímu indexu BAI byla pozorována také ve skupině diabetiček 2. typu.

Zjistilo se, že varianty v genu *MC4R* nebo v jeho blízkosti neovlivňují ukládání tukových zásob do rizikových oblastí těla, jako je viscerální tuková tkáň a játra, ale postihují především subkutánní akumulaci tukové tkáně, což má velmi malý dopad na inzulínovou rezistenci (Haupt *et al.*, 2009). Polymorfismus rs12970134 přispívá k „metabolicky benigní“ obezitě. To by mohlo také vysvětlit, proč tyto polymorfismy nebyly zachyceny GWAS studiemi jako rizikové pro DM2, podobně jako *FTO*. Nicméně ve studii na 15 000 Dánech byla nalezena hraniční asociace rs12970134 s DM2 (OR = 1,08) (Zobel *et al.*, 2009). My jsme u nositelek s variantní alelou A pozorovali nižší hladinu krevního cukru na lačno, spolu s nižší hladinou inzulínu i C-peptidu a nižší hodnotu indexu HOMA-IR, což naznačilo lepší inzulínovou senzitivitu, a to spíše jaterní, nežli celotělovou. Vysvětlením pro lepší hepatickou funkci nositelek alely A může být snížená akumulace tuku v játrech, jak bylo popsáno u varianty *MC4R* rs177782313 (Haupt *et al.*, 2009). Nositelství alely A bylo dále spojeno s téměř dvakrát vyšší hladinou růstového hormonu, zatímco dosažená tělesná výška byla v obou porovnávaných skupinách totožná. Vliv této

varianty na tělesnou výšku nepotvrdili ani jiní autoři (Zobel *et al.*, 2009; Kring *et al.*, 2010). Studium somatotropní osy u obézních MC4R-deficientních pacientů odhalilo zvýšenou pulsatilní i celkovou sekreci růstového hormonu (Martinelli *et al.*, 2011). Naše data hovoří pro roli MC4R v regulaci somatotropní osy. Nositelky minoritní alely A měly vyšší hladinu leptinu ve srovnání s nenošitelkami, ačkoliv žádný rozdíl nebyl pozorován v hodnotě BMI, WHR ani v množství tělesného tuku, ze kterého je leptin uvolňován. Vysvětlením může být snížená schopnost leptinu vázat se ke svému receptoru, anebo snížená funkčnost receptoru MC4R či leptinová rezistence, často pozorovaná u obézních osob. V případě pacientů s mutacemi genu *MC4R* odpovídala hladina leptinu množství jejich tukové hmoty (Farooqi *et al.*, 2003); nicméně u obézních hispánských dětí s haploinsufiencí MC4R byla pozorována středně těžká leptinová rezistence (Cole *et al.*, 2010).

Nepotvrdili jsme sice asociaci polymorfismu rs12970134 s obezitou ani s žádným ze sledovaných antropometrických parametrů, našli jsme však asociaci alely A s lepším glukózovým metabolismem a s vyššími hladinami leptinu a růstového hormonu. Naše studie naznačuje, že variabilita MC4R se uplatňuje nejen v regulaci energetického metabolismu, ale i v komplexnějších hypothalamických regulacích.

V oblasti obezitologie byl dalším z nejzajímavějších výsledků celogenomových asociačních studií silný asociační signál v genu *FTO* s BMI a obezitou obecně. Funkce *FTO* v organismu není ještě zcela objasněna. Sekvenační analýzy ho zařazují do rodiny nehemových dioxygenáz, spekuluje se o jeho možném ovlivnění metylací DNA u obézních osob. Našemu kolektivu se podařilo již dříve zjistit, že polymorfismus rs9939609 v genu pro *FTO* silně asociuje s BMI a dalšími rysy obezity i v naší populaci. Ve velké studii provedené u 1388 osob jsme již v roce 2008 zjistili, že gen *FTO* je asociován nejen s kvantitativními znaky charakterizujícími obezitu (zejména s BMI, hmotností a obvodem břicha), ale i s vyššími hladinami glukózy a leptinu v průběhu OGTT, což bylo nejvíce patrné u žen (Včelák *et al.*, 2008).

Zjistili jsme, že i mezi štíhlými ženami jsou nositelky rizikových alel genu *FTO*. Zajímalo nás proto, jaké jsou antropometrické a metabolické konsekvence pro obezitu rizikového haplotypu (CAGA) genu *FTO* u štíhlých žen a jak jsou jeho nositelky chráněny před rozvojem obezity. Studovali jsme u těchto žen i případnou interakci hormonální antikoncepce (HA) s genotypem *FTO*. Ve studii (**příloha 5.2**) na štíhlých ženách s průměrnou hodnotou BMI $21,5 \pm 1,99$ kg/m², jsme zjistili asociaci rizikového CAGA

haplotypu s vyšším BMI, ale s dalšími antropometrickými parametry nikoliv. Nicméně i u takto štíhlých žen – nositelek CAGA haplotypu, byla pozorována zvýšená sekrece β -buněk v pozdní fázi OGTT a snížená hladina celkového a LDL cholesterolu. Nejsilnější pozorovaná asociace spojená s nositelstvím CAGA haplotypu u štíhlých žen byla s hladinami růstového hormonu, a to jak lačnými, tak stimulovanými glukózou v rámci funkčního testu. Na základě popsáných účinků růstového hormonu (Rudling a Angelin, 2001; Freathy *et al.* 2008, Kokshoorn *et al.* 2011; Pena-Bello *et al.* 2015) je pravděpodobné, že právě zvýšené hladiny růstového hormonu mohou ovlivnit hladiny lipidů, sekreci inzulínu a že chrání tyto ženy před rozvojem obezity. Co je ale příčinou zvýšených hladin růstového hormonu u štíhlých žen s rizikovým haplotypem genu *FTO*, zůstává neodhaleno. Hladiny IGF-1 u nositelek CAGA zvýšené nebyly. U lidské obezity je osa GH/IGF-1 alterována. Zvýšená adipozita je spojena s útlumem sekrece GH, přitom hladina IGF-1 může být snížená, normální nebo zvýšená (Savastano *et al.*, 2014; Cordoba-Chacon *et al.*, 2015; Pena-Bello *et al.*, 2015). Hypotéza, že osa GH/IGF-1 je pravděpodobným mediátorem vztahu mezi *FTO* a BMI, již byla publikována (Roskopf *et al.*, 2011). Překvapilo nás, že užívání HA samo o sobě vyvolává podobné metabolické účinky nezávisle na genotypu *FTO*, interakce rizikového haplotypu CAGA v genu *FTO* s užíváním HA ještě prohlubuje dopad na sledované metabolické parametry.

Ve studii (**příloha 5.3**) jsme sledovali efekt genetických variant genů *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R* a *FTO* v souboru 1433 adolescentů ve věku 13–18 let. I v této studii byla potvrzena silná asociace polymorfismu rs9939609 genu *FTO* s nadváhou a obezitou, podobně jako je popisováno v mnoha jiných populacích, včetně studií provedených na české dospělé populaci (Dina *et al.*, 2007; Frayling *et al.*, 2007; Včelák *et al.*, 2008; Hubáček *et al.*, 2008). Nalezli jsme také asociaci mezi variantou genu *FTO* s abdominální obezitou a s dalšími antropometrickými parametry. Tyto asociace však vymizely po adjustaci na BMI. Zdá se proto, že variantní *FTO* má obecně vzato vliv na BMI, ale neovlivňuje přímo distribuci tuku v těle (Haupt *et al.*, 2010). U ostatních studovaných variant jsme vliv na obezitu v našem souboru nepotvrdili, i když studie a metaanalýzy provedené u velkých kohort dětí a adolescentů na BMI potvrdily (Zhao *et al.*, 2009; den Hoed *et al.*, 2010). Vzhledem k velmi malým účinkům těchto variant na celkovou variabilitu Z-skóre BMI jsme nemohli tyto slabé asociace v našem souboru prokázat. Minoritní alela genu *TMEM18* (rs7561317) naopak asociovala s podváhou (OR=1,78), přičemž majoritní alela byla popsána v souvislosti s obezitou

(Willer *et al.*, 2009). Podle práce Jacquemonta *et al.* (2011) mohou protichůdné fenotypy (těžká obezita a podváha) sdílet genetický podklad. Dále bylo zjištěno, že varianta v genu *FTO* souvisí s abdominální obezitou bez ohledu na pohlaví (OR=1,39) a že minoritní varianty v genech *BDNF* (rs925946: OR=1,42) a *MC4R* (rs12970134: OR=1,39; rs17782313: OR=1,40) souvisejí se zvýšeným rizikem vzniku abdominální obezity, ovšem pouze u chlapců.

Alarmující je zjištění, že už u adolescentů ve věku mezi 13–18 lety je prevalence metabolického syndromu 7,7 %. Metabolický syndrom (MS) se ale vyskytoval pouze ve skupinách adolescentů s nadváhou a obezitou, kde prevalence MS činila 16,6 %. Vliv variant *FTO* na metabolické parametry jsme neprokázali, podobně jako např. Müller *et al.* (2008). Nicméně dvě provedené metaanalýzy (Wang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012) prokázaly asociaci variant *FTO* s metabolickým syndromem, která ale závisela na použité definici metabolického syndromu. Dle recentních studií biologické funkce *FTO* se zdá, že některé jeho varianty ovlivňují diferenciaci a vlastnosti tukové tkáně a hrají roli v „hnědnutí adipocytů” a bazální termogenezi (Claussnitzer *et al.*, 2015), Riziko vzniku MS u chlapců zvyšovala alela T polymorfismu rs925946 v genu *BDNF* (OR=1,77) a alela C polymorfismu rs17782313 v *MC4R* (OR=1,56). Byla nalezena souvislost polymorfismů v genech *BDNF* (rs925946) a *MC4R* (rs17782313) s metabolickým syndromem (OR=1,53; resp. 1,51), což podporuje zjištění dalších studií, při kterých se ukázala souvislost polymorfismu rs17782313 se sníženou hladinou HDL cholesterolu (Kring *et al.*, 2010) a se zvýšeným diastolickým krevním tlakem (Vogel *et al.*, 2011).

Kromě pozorovaných souvislostí sledovaných variant s fenotypem obezity bylo zjištěno, že variantní alela v genu *PCSK1* (rs6235) negativně asociuje s vyšší hladinou glykémie (OR 0,69) podobně jako ve studii Gjesinga *et al.* (2011), což naznačuje protektivní úlohu této varianty v rozvoji DM2.

Byla prokázána souvislost polymorfismů rs12970134 a rs17782313 blízko genu *MC4R* a rs925946 v genu *BDNF* s tělesnou hmotností a obvodem břicha, a tedy i se zvýšeným rizikem rozvoje abdominální obezity a vzniku MS u chlapců. U nich byla také zjištěna vyšší frekvence MS ve srovnání s děvčaty. Jak známo, abdominální obezita je klíčovou složkou MS a vyskytuje se častěji u mužů, narozdíl od gynoidního typu obezity, který je charakteristický pro ženy.

6.2 Bariatrická chirurgie v léčbě obezity

Bariatrické operace jsou v současnosti nejefektivnější nástrojem k léčbě obezity, ale i komorbidit s ní spojených. Ačkoliv jsou k ní indikováni pacienti starší 18 let s hodnotou BMI nad 40 kg/m² nebo 35 kg/m² s přítomností další komplikace, stále více je diskutována možnost provedení zákroku i u osob s nižší hodnotou BMI. V klinické praxi totiž většina diabetiků 2. typu není extrémně obézních, ale jejich BMI se pohybuje obvykle mezi 25 a 35 kg/m². Dále se uvažuje o operacích adolescentů, jelikož obezita a DM2 se vyskytuje stále častěji i u nich.

Samotný chirurgický výkon ovlivňuje homeostázu glukózy bez závislosti na snížení tělesné hmotnosti, protože remise diabetu nastává již několik dní po výkonu. Vysvětlením může být tzv. inkretinový efekt. K mechanismům přímého antidiabetického vlivu operace patří zvýšení stimulace uvolňování inkretinů živinami (např. GLP-1), oslabení sekrece ghrelinu a zlepšení inzulínové senzitivity v játrech z důvodu snížení energetického příjmu a zvýšení inzulínové senzitivity v periferních tkáních v důsledku poklesu tělesné hmotnosti (Thaler *et al.*, 2009; Chiellini *et al.*, 2009; Nannipieri *et al.*, 2011). Uplatňují se také změny rychlosti konzumace potravy a vyprazdňování žaludku, doba průchodu potravy střevem, detekce a absorpce živin a metabolismus žlučových kyselin (Laferrere *et al.*, 2011).

Výsledek bariatrické operace závisí na vstupním BMI pacienta, délce trvání DM2 a záleží také na dalších charakteristikách samotného pacienta. Obecně lze ale říci, že čím vyšší BMI pacient má, tím výraznějšího metabolického účinku operace lze dosáhnout. Ukázalo se totiž, že pacienti s nadváhou dosáhnou jeden rok po BPD remise DM2 pouze ve 40 %, zatímco obézní pacienti I. stupně v 70 %, což naznačuje, že operace sama o sobě metabolický účinek nemá. Nicméně u extrémně obézních dochází k revitalizaci β -buněk, takže při dostatečném množství cirkulujícího inzulínu a díky výraznému snížení potravinového příjmu dochází k obnovení inzulínové senzitivity (Scopinaro *et al.*, 2011; Cordera *et al.*, 2016).

Velmi žádoucí jsou při studiu efektu bariatrických operací dlouhodobé výsledky, takových je ale zatím poskromnu. V případě LGP máme k dispozici unikátní detailně charakterizovaný soubor s dlouhodobým sledováním (4 roky).

Naše studie (**příloha 5.4**) popisuje dosažené výsledky 13 žen půl roku po LGP. Všechny dosáhly významného snížení hmotnosti (30 % EWL), zlepšení glukózového metabolismu

a postprandiální triacylglycerolémie, pravděpodobně v důsledku omezení potravinového příjmu.

Zjistili jsme významné zlepšení lačné glykémie a inzulinémie v šestém měsíci od operace. Došlo ke zlepšení inzulinové rezistence (HOMA-IR; $p < 0,003$). Výrazně poklesla i hladina glykovaného hemoglobinu (HbA1c; $p < 0,0001$), přičemž pouze u jedné pacientky nebylo dosaženo statistické významnosti po šesti měsících.

Zajímalo nás, jak LGP ovlivní hladiny ghrelinu. Ghrelin je vylučován žaludeční sliznicí. Při operaci je provedeno zmenšení kapacity žaludku zavínutím velkého zakřivení dovnitř žaludku a zajištěním v nové poloze. Dochází ke sníženému krevnímu zásobení slizničních buněk a tak může být poškozena jejich endokrinní schopnost, vedoucí ke snížené sekreci ghrelinu. Po prvním i po šestém měsíci od operace došlo k významnému snížení postprandiálních hladin ghrelinu ($p < 0,0001$), a tím jsme potvrdili naše domněnky. Snížené hladiny ghrelinu mohou mít vliv na snížení hmotnosti prostřednictvím potlačení chuti k jídlu. Bylo zjištěno, že ghrelin má diabetogenní účinky (Scott *et al.*, 2011), a proto snížené hladiny ghrelinu mohou přispívat ke zlepšení glukózové homeostázy po LGP.

Co se týče hladin inkretinů, pozorovali jsme významné zvýšení hladiny GIP už první měsíc od operace a k dalšímu nárůstu došlo i při sledování v 6. měsíci od operace, přičemž zlepšení se projevilo i posunem vrcholu stimulované hladiny GIP do časnější fáze (tj. z 60. na 30. minutu). Navíc byl následující pokles rychlejší na začátku sledování a po 1. měsíci ve srovnání se stavem po půl roce. Vysvětlením může být rychlejší vyprazdňování žaludku a nadměrná stimulace K-buněk v tenkém střevu nedostatečně natrávenou potravou a jejím rychlejším průchodem trávicím traktem.

Hladina GLP-1 se po stimulaci proteinovým nápojem v průběhu MMTT signifikantně neměnila, zaznamenali jsme pouze výrazné zvýšení hladin GLP-1 ve 30. minutě MMTT jeden měsíc po operaci, což mohlo mít za následek i velmi vysokou hladinu inzulinu v tomto časovém bodě.

Naše výsledky potvrzují, že LGP vede k významnému hmotnostnímu úbytku, zlepšení glukózové homeostázy a postprandiální hypertriacylglycerolémie, která je považována za rizikový faktor pro rozvoj atherosklerózy, ischemické choroby srdeční a infarktu myokardu (Nordestgaard *et al.*, 2007; Bansal *et al.*, 2007). Hladiny ghrelinu se snížily, podobně jako po LSG a BPD, zatímco po gastrické bandáži a dietě samotné dochází ke zvýšení hladin ghrelinu (Chandarana *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2011; Kotidis *et al.*,

2006). Podle našich výsledků se sekrece GIP po LGP zvýšila, stejně jako v jiných studiích po LSG a gastrickém bypassu (Scott *et al.*, 2011; Laferrère *et al.*, 2008).

Bohužel se ale ukazuje, že po prvních měsících kompenzace po LGP dochází k opětovnému zhoršení glukózového metabolismu. V poslední předkládané studii jsou hodnoceny remise DM2 po dvou letech od tří typů bariatrických operací (**příloha 5.5**). BPD vedla k nejvyššímu počtu dosažených remisí DM2 (7 z 8 pacientek), co do úspěšnosti ji následovala LAGB (6 z 9 pacientek) a po LGP nedospěla ani jedna z 12 pacientek remise DM2, přitom ale 7 z nich bylo léčeno pouze metforminem.

Faktem je, že obezita a DM2 jsou choroby často spojované s dyslipidémií a pozměněným složením mastných kyselin. Složení mastných kyselin obsažené v triacylglycerolech tukové tkáně odráží nejen složení tuků, přijatých v potravě, ale i metabolické zpracování tuků organismem, jako je endogenní lipogeneze a oxidace lipidů. Mezi zastoupením mastných kyselin (MK) v lipidech séra, membrán a triacylglycerolech tukové tkáně a metabolickými chorobami je úzký vztah. Charakteristický je vyšší obsah nasycených mastných kyselin a nižší obsah polyenových MK u osob s obezitou a DM2. Nejvíce změn bylo pozorováno ve skupině žen po BPD. U nich byla naměřena vyšší koncentrace kyseliny laurové (12:0), myristolejové (14:1n-5) a palmitolejové (16:1n-7), dále byla zjištěna zvýšená aktivita steroyl-CoA desaturázy 1 (SCD1), což naznačuje zvýšenou lipogenezi v subkutánní tukové tkáni. Příčinou může být adaptace organismu na zhoršenou absorpci tuků ze stravy. Bylo zjištěno, že palmitolejová kyselina je spíše uvolňována z gluteofemorálního podkožního tuku, nežli z abdominálního, přičemž tento rozdíl je dán zesílenou expresí delta-9 desaturázy v gluteofemorální tukové tkáni (Pinnick *et al.*, 2012). Metabolický efekt BPD se tedy odráží ve zvýšeném zastoupení myristolejové a palmitolejové kyseliny v triacylglycerolech tukové tkáně.

Dalším zajímavým zjištěním byla nižší koncentrace dokosapentaenové kyseliny (22:5n-3) v 6. měsíci po BPD a LAGB, což značí zvýšenou oxidaci n-3 polynenasycených MK nebo jejich nižší vstřebávání z důvodu nižšího potravinového příjmu či jejich nižší absorpce z trávicího traktu.

7 Závěr

Souhrnná forma dizertační práce sestává z pěti impaktovaných publikací. První tři se zabývají validací nejzajímavějších výsledků z celogenomových asociačních studií a podrobnější charakterizací vlivu nalezených variant na antropometrický a biochemický profil jedinců ve studovaných souborech, přičemž bylo objeveno mnoho nových poznatků.

Byla potvrzena asociace rizikové varianty rs9939609 v genu *FTO* s obezitou u souboru české dětské i dospělé populace. U štíhlých žen, nesoucích rizikový haplotyp CAGA, byla zjištěna zvýšená hladina glykémie, inzulínu a C-peptidu při zátěžovém testu a překvapivě i vyšší hladina růstového hormonu, která tyto ženy zřejmě chrání před obezitou a zlepšuje i jejich lipidový metabolismus. Užívání hormonální antikoncepce tento efekt ještě zesílilo.

Ačkoliv nebyla pozorována souvislost variantní alely polymorfismu rs12970134 blízko genu *MC4R* s obezitou ani s žádným z antropometrických parametrů, byla objevena asociace alely A s glukózovým metabolismem a s vyššími hladinami leptinu a růstového hormonu u normoglykemických žen, což odpovídá komplexnímu působení *MC4R* v hypothalamu.

Dalším zajímavým poznatkem je, že polymorfismy blízko *MC4R* (rs12970134 a rs17782313) a v *BDNF* (rs925946) mají souvislost se vznikem metabolického syndromu u adolescentů a navíc u chlapců souvisí s rozvojem abdominální obezity. Naopak varianta v genu pro *TMEM18* souvisela s podváhou a varianta v genu pro *PCSK1* asociovala s nižší hladinou krevního cukru, což může znamenat protektivní účinek genu *PCSK1* v rozvoji DM2.

Následující dvě studie se zabývaly léčbou obezity bariatrickou operací. První z nich potvrdila, že půl roku po LGP dochází k významnému poklesu hmotnosti, zlepšení metabolického profilu obézních diabetiček 2. typu a odhalila, že po tomto zákroku dochází ke snížení hladiny ghrelinu (hormonu hladu) a zvýšení hladiny GIP (inkretinu s antidiabetogenním účinkem) při zátěžovém MMT testu, jako následek plikování žaludku a rychlejšího průchodu potravy žaludkem.

V poslední studii byla porovnávána laparoskopická gastrická plikace (LGP) s laparoskopickou gastrickou bandáží (LAGB) a biliopankreatickou diverzí (BPD). Inzulínová senzitivita se vylepšila po všech třech typech operací, ale pouze BPD vedla k významnému poklesu v celkové sekreci inzulínu a byla také účinnější při léčbě DM2, než LAGB a LGP. Remise diabetu mellitu 2. typu u obézních žen byla po 2 letech nejčastější

po BPD, k remisi došlo ve většině případů po LAGB, zatímco po LGP došlo z větší části případů „pouze“ ke zlepšení ukazatelů diabetu 2. typu.

Velmi zajímavým poznatkem z hlediska adaptability organismu na bariatrický výkon BPD byla zvýšená lipogeneze v tukové tkáni, charakterizovaná významně vyšším zastoupením nasycených a mononenasycených mastných kyselin a delta-9 desaturázy-1 ve srovnání s LAGB a LGP. Ke zvýšení syntézy mastných kyselin dochází zřejmě v důsledku nedostatečnosti příjmu mastných kyselin v potravě a/nebo v důsledku malabsorpčního typu operace.

Z výsledků je zcela zřejmé, že biliopankreatická diverze je dlouhodobě nejúčinnější bariatrickou operací, po které došlo k největšímu počtu remisí DM2.

8 Publikace a prezentace

Publikace související s touto prací:

1: BRADNOVÁ O, VEJRAŽKOVÁ D, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, STANICKÁ S, DVOŘÁKOVÁ K, BENDLOVÁ B. Metabolic and hormonal consequences of the "obesity risk" MC4R variant (rs12970134) in Czech women. *Physiol Res.* 2015; **64**(2): 187-95. IF=1,293

2: LUKÁŠOVÁ P, VAŇKOVÁ M, VČELÁK J, VEJRAŽKOVÁ D, BRADNOVÁ O, STANICKÁ S, HAINER V, BENDLOVÁ B. Fat mass and obesity associated gene variants are associated with increased growth hormone levels and affect glucose and lipid metabolism in lean women. *Physiol Res.* 2015; **64**(2): 177-85. IF=1,293

3: KUNEŠOVÁ M, SEDLÁČKOVÁ B, BRADNOVÁ O, TVRZICKÁ E, STAŇKOVÁ B, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, KALOUSKOVÁ P, HLAVATÝ P, HILL M, BENDLOVÁ B, FRIED M, HAINER V, VRBÍKOVÁ J. Fatty acid composition of adipose tissue triglycerides in obese diabetic women after bariatric surgery: a 2-year follow up. *Physiol Res.* 2015;64 Suppl 2:S155-66. IF=1,293

4: BRADNOVA O, KYROU I, HAINER V, VCELAK J, HALKOVA T, SRAMKOVA P, DOLEZALOVA K, FRIED M, MCTERNAN P, KUMAR S, HILL M, KUNESOVA M, BENDLOVA B, VRBIKOVA J. Laparoscopic greater curvature plication in morbidly obese women with type 2 diabetes: effects on glucose homeostasis, postprandial triglyceridemia and selected gut hormones. *Obes Surg.* 2014; **24**(5): 718-26. IF=3,747

BRADNOVA O. Reply to letter to the editor by dr. Dimitrios Tsamis. *Obes Surg.* 2014; **24**(8): 1399.

5: DUŠÁTKOVÁ L, ZAMRAZILOVÁ H, SEDLÁČKOVÁ B, VČELÁK J, HLAVATÝ P, ALDHOON HAINEROVÁ I, KORENKOVÁ V, BRADNOVÁ O, BENDLOVÁ B, KUNEŠOVÁ M, HAINER V. Association of obesity susceptibility gene variants with metabolic syndrome and related traits in 1,443 Czech adolescents. *Folia Biol (Praha).* 2013; **59**(3): 123-33. IF=1,000

6: BENDLOVÁ B, LUKÁŠOVÁ P, VAŇKOVÁ M, VEJRAŽKOVÁ D, BRADNOVÁ O, VČELÁK J, STANICKÁ S, ZAMRAZILOVÁ H, ALDHOON-HAINEROVÁ I, DUŠÁTKOVÁ L, KUNEŠOVÁ M, HAINER V. Genetic background in common forms of obesity - from studies on identical twins to candidate genes of obesity. *Cas Lek Cesk.* 2014; **153**(4): 193-9.

Publikace nesouvisející s touto prací:

7: ŠRÁMKOVÁ M, DUŠKOVÁ M, VÍTKŮ J, VČELÁK J, MATUCHA P, BRADNOVÁ O, DE CORDEIRO J, STÁRKA L. Levels of adipokines and some steroids during the menstrual cycle. *Physiol Res.* 2015; **64**(2): 147-54. IF=1,293

8: VEJRAŽKOVÁ D, LUKÁŠOVÁ P, VAŇKOVÁ M, BRADNOVÁ O, VACÍNOVÁ G, VČELÁK J, CIRMANOVÁ V, ANDĚLOVÁ K, KREJČÍ H, BENDLOVÁ B. Gestational diabetes – metabolic risks of adult women with respect to birth weight. *Physiol Res.* 2015; **64**(2): 135-45. IF=1,293

9: VEJRAŽKOVÁ D, LUKÁŠOVÁ P, VAŇKOVÁ M, VČELÁK J, BRADNOVÁ O, CIRMANOVÁ V, ANDĚLOVÁ K, KREJČÍ H, BENDLOVÁ B. MTNR1B Genetic Variability Is Associated with Gestational Diabetes in Czech Women. *Int J Endocrinol.* 2014; ID 508923. IF = 1,948

10: VEJRAŽKOVÁ D, VČELÁK J, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, BRADNOVÁ O, HÁLKOVÁ T, KANCHEVA R, BENDLOVÁ B. Steroids and insulin resistance in pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; **139**: 122-9. IF=3,628

11: VČELÁK J, VEJRAŽKOVÁ D, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, BRADNOVÁ O, HÁLKOVÁ T, BEŠŤÁK J, ANDĚLOVÁ K, KVASNIČKOVÁ H, HOSKOVCOVÁ P, VONDRA K, VRBÍKOVÁ J, BENDLOVÁ B. T2D risk haplotypes of the TCF7L2 gene in the Czech population sample: the association with free fatty acids composition. *Physiol Res.* 2012; **61**(3): 229-40. IF=1,293

12: VEJRAŽKOVÁ D, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, BRADNOVÁ O, PRAŽÁKOVÁ S, KVASNIČKOVÁ H, BENDLOVÁ B. Birth weight and genetic risk of type 2 diabetes in Czech population. *Vnitr Lek.* 2010; **56**(12): 1303-9.

13: VAŇKOVÁ M, PRAŽÁKOVÁ S, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, VEJRAŽKOVÁ D, BRADNOVÁ O, DVOŘÁKOVÁ K, VRBÍKOVÁ J, BENDLOVÁ B. Extremely low SHBG level in consequence of Pro156Leu SHBG polymorphism--case reports of two women with polycystic ovary syndrome. *Vnitr Lek.* 2010; **56**(12): 1292-5.

14: VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, BRADNOVÁ O, VČELÁK J, DVOŘÁKOVÁ K, BENDLOVÁ B. Relation between insulin secretion and action--study of genetic determination. *Cas Lek Cesk.* 2010; **149**(11): 526-32.

15: PRAŽÁKOVÁ S, VAŇKOVÁ M, BRADNOVÁ O, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, DVOŘÁKOVÁ K, VONDRA K, VRBÍKOVÁ J, BENDLOVÁ B. (TTTTA), polymorphism in the promoter of the CYP11A1 gene in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Cas Lek Cesk.* 2010; **149**(11): 520-5.

Celkový impakt faktor: 18,081

H-index: 4

Prezentace na zahraničních konferencích:

BRADNOVÁ O, SEDLÁČKOVÁ B, VRBÍKOVÁ J, HAINER V, BENDLOVÁ B, KUNEŠOVÁ M. Two years after bariatric surgery: Effect of three types of operation on anthropometry, glucose and lipid metabolism. *Obesity Facts.* 2015; **8**(1): 222.

22nd European Congress on Obesity (ECO2015), 6.–9. 5. 2015, Praha (poster)

BRADNOVÁ O, KYROU I, HAINER V, VČELÁK J, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, MCTERNAN P, KUMAR S, HILL M, KUNEŠOVÁ M, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J. Laparoscopic greater curvature plication in morbidly obese women with type 2 diabetes: Effect on glucose homeostasis, postprandial triglyceridemia and selected gut hormones. *Obesity Rev.* 2014; **15**(2): 131.

XII. International Congress on Obesity, 17.–20. 3. 2014, Kuala Lumpur, Malaysia (poster)

BRADNOVÁ O, HÁLKOVÁ T, VČELÁK J, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VEJRAŽKOVÁ D, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, KYROU I, MCTERNAN P, KUMAR S, HILL M1, KUNEŠOVÁ M, HAINER V, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J. The early effect of laparoscopic gastric plication on anthropometric parameters and on postprandial triglyceride and hormonal response in obese women with type 2 diabetes. *Obesity Facts*. 2013; **6**(1): 94.

20th European Congress on Obesity, 12.–16. 5. 2013, Liverpool, United Kingdom (poster)

BRADNOVÁ O, HÁLKOVÁ T, VČELÁK J, VAŇKOVÁ M, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, KYROU I, MCTERNAN P, KUMAR S, HILL M, KUNEŠOVÁ M, HAINER V, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J. Vliv gastrické plikace na metabolický a antropometrický profil obézních diabetiček 2. typu. *DMEV*. 2012; **15**(3): 3.

XXXV. Endokrinologické dni s medzinárodnou účasťou, 4.–6. 10. 2012 Bratislava, Slovensko (poster)

BRADNOVÁ O, HÁLKOVÁ T, VČELÁK J, VAŇKOVÁ M, DVOŘÁKOVÁ K, GRIMMICOVÁ T, STANICKÁ S, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, KYROU I, HILL M, HAINER V, BENDLOVÁ B, MCTERNAN P, KUMAR S and VRBÍKOVÁ J. Effect of two different types of bariatric surgery on metabolic profile in obese type 2 diabetic women. *Endocrine Abstracts*. 2012; **29**: 1221.

15th International/14th European Congress of Endocrinology, 5.–9. 5. 2012 Florence, Italy (poster)

BRADNOVÁ O, VEJRAŽKOVÁ D, LUKÁŠOVÁ P, VAŇKOVÁ M, VČELÁK J, KVASNIČKOVÁ H, BENDLOVÁ B. Different predisposition of Type 2 Diabetes Mellitus in subjects with lower versus higher birth weight. *Diabetes Abstracts*. 2011; **60**(1): 368.

71st Scientific session, American Diabetes Association, 24.–28.6.2011, San Diego, California (poster)

BRADNOVÁ O, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, KVASNIČKOVÁ H, BENDLOVÁ B. Variant of MC4R gene rs17782313 (C/T) is associated with increased creatinine levels and muscle mass in women. *HVD Abstract book*. 2010; **1**: 97.

1st Heart, Vessels and Diabetes – The European Conference, 9.–11.12.2010, Lisbon, Portugal (poster)

BRADNOVÁ O, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, KVASNIČKOVÁ H, VONDRA K, VRBÍKOVÁ J, BENDLOVÁ B. MC4R gene variant rs17782313 (C/T) is associated with increased muscle mass in lean women. *Diabetologia*. 2010; **53**(1): 140.

46th Annual Meeting of the European Association of the Study of Diabetes, 20.–24. 9. 2010 Stockholm, Sweden (poster)

BRADNOVÁ O, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, KVASNIČKOVÁ H, VONDRA K, VRBÍKOVÁ J, BENDLOVÁ B. Melanocortin-4 receptor gene polymorphism (rs12970134) influences glucose metabolism, leptin and growth hormone in women. *Endocrine Abstracts*. 2010; **22**: 703.

12th European Congress of Endocrinology, 24.–28. 4. 2010, Prague (poster)

Prezentace na domácích konferencích a sympoziích:

BRADNOVÁ O, HAINER V, VČELÁK J, SEDLÁČKOVÁ B, ŠRÁMKOVÁ P, FRIED M, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J, KUNEŠOVÁ M. Dva roky po bariatrické operaci: extrémně obézní diabetičky 2. typu. *DMEV*. 2014; **17**(1): 34.

L. Diabetologické dny, 10.–12. dubna 2014, Luhačovice (přednáška)

BRADNOVÁ O, SEDLÁČKOVÁ B, HAINER V, VČELÁK J, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J, KUNEŠOVÁ M. Metabolické důsledky bariatrické operace. *Sborník abstrakt XXXV. IAD*: 49.

XXXV. Imunoanalytické dny, XIV. CECHTUMA, 6.–8. dubna 2014, Plzeň (přednáška)

BRADNOVÁ O: Metabolické důsledky různých bariatrických operací (přednáška)
Seminář Endokrinologického ústavu, 8.11.2014, Praha

BRADNOVÁ O, KYROU I, HAINER V, VČELÁK J, HÁLKOVÁ T, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, MCTERNAN P, KUMAR S, HILL M, KUNEŠOVÁ M, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J. Laproskopická gastrická plikace: vliv na glukózový metabolismus, triacylglyceroly a vybrané hormony gastrointestinálního traktu.

XXXVI. Endokrinologické dny, 10.–12. října 2013, Plzeň (poster)

BRADNOVÁ O, SEDLÁČKOVÁ B, HAINER V, VČELÁK J, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, HILL M, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J, KUNEŠOVÁ M. Dlouhodobý vliv bariatrických operací u obézních diabetiček 2. typu.

Obezitologie & Bariatrie, 17.–19.10.2013, Hradec Králové (poster)

BRADNOVÁ O, KYROU I, HAINER V, VČELÁK J, ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, FRIED M, HILL MI, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J, KUNEŠOVÁ M. Vliv laproskopické gastrické plikace na glukózový metabolismus, triacylglyceroly a vybrané hormony gastrointestinálního traktu.

Obezitologie & Bariatrie, 17.–19.10.2013, Hradec Králové (poster)

BRADNOVÁ O, VEJRAŽKOVÁ D, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, KVASNIČKOVÁ H, BENDLOVÁ B. Predispozice k diabetu 2. typu u jedinců s vyšší vs. nižší porodní hmotností – efekt genetické složky. *DMEV*. 2011; **14**(2): 40.

XXXIV. Endokrinologické dny, 20.–22. 10. 2011, Brno (poster)

BRADNOVÁ O., ŠRÁMKOVÁ P, DOLEŽALOVÁ K, KYROU I, VČELÁK J, BENDLOVÁ B, VRBÍKOVÁ J: Sledování vlivu bariatrických operací na hladiny vaspinu, omentinu, chemerinu a FGF-21. *DMEV*. 2011; **14**(1):18.

XLVII. Diabetologické dny, 14.–16. 4. 2011, Luhačovice (přednáška)

BRADNOVÁ O, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, KVASNIČKOVÁ H, BENDLOVÁ B. Variabilita receptoru pro melanokortin-4 ovlivňuje glukózový metabolismus, hladiny leptinu a růstového hormonu u žen. *CD Sborník abstrakt Obezitologie a bariatrie 2010*; 26.

Obezitologie a bariatrie 2010, 14.–16. 10. 2010, České Budějovice (přednáška)

BRADNOVÁ O, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, KVASNIČKOVÁ H, VONDRA K, VRBÍKOVÁ J, BENDLOVÁ B: Polymorfismus v genu pro receptor pro melanokortin-4 ovlivňuje glukózový metabolismus, hladiny leptinu a růstového hormonu u žen. *DMEV*. 2010; **13**(1): 50.

XLVI. Diabetologické dny, 22.–24. 4.2010, Luhačovice (poster)

BRADNOVÁ O, VAŇKOVÁ M, LUKÁŠOVÁ P, VČELÁK J, KVASNIČKOVÁ H, VONDRA K, BENDLOVÁ B. Asociace polymorfismu Gly482Ser v genu pro PGC-1 alfa s inzulínovou rezistencí. *DMEV*. 2009; **12**(1): 55.

XLV. Diabetologické dny, 23.–25. 4. 2009, Luhačovice (poster)

9 Seznam použité literatury

Monografie:

BENDLOVÁ Běla. *Pokroky v genetice endokrinopatií - DNA diagnostika a možnosti genové terapie v endokrinologii*. In: STÁRKA Luboslav. *Pokroky v endokrinologii*. 1. vyd. Praha, Maxdorf, 2007, 785 s., ISBN: 80-7345-129-5.

FRIED Martin a kol. *Bariatrická a metabolická chirurgie. Nové postupy v léčbě obezity a metabolických poruch*, 1. vyd. Praha, Mladá fronta a. s., 2011, 268 s., ISBN 978-80-204-2424-2.

HALUZÍK Martin, SVAČINA Štěpán. *Inkretinová léčba diabetu*. 1. vyd. Praha : Mladá fronta a.s., 2010. 135 s. ISBN: 978-80-204-2247-7.

HAINER Vojtěch a kol.: *Základy klinické obezitologie*, 2. vyd. Praha. Grada Publishing, a.s., 2011, 464 s. ISBN: 978-80-247-3252-7.

KUNEŠOVÁ Marie. *Léčba obezity dietou*. In: HAINER Vojtěch a kol.: *Základy klinické obezitologie*, 2. vyd. Praha. Grada Publishing, a.s., 2011, 464 s. ISBN: 978-80-247-3252-7.

Internetové zdroje:

Diabetes overview. National Diabetes Information Clearinghouse website.
<http://www.niddk.nih.gov/health-information/health-topics/diabetes/Pages/default.aspx>.
Updated April 4, 2012. Accessed May 15, 2012. Discontinued 2014.

WHO, Fact sheet No. 311, January, 2015
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

Originální práce:

ALBERTI KG, ECKEL RH, GRUNDY SM, ZIMMET PZ, CLEEMAN JI, DONATO KA, FRUCHART JC, JAMES WP, LORIA CM, SMITH SC JR; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION TASK FORCE ON EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION; NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE; AMERICAN HEART ASSOCIATION; WORLD HEART FEDERATION; INTERNATIONAL ATHEROSCLEROSIS SOCIETY; INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY. HARMONIZING THE METABOLIC SYNDROME: A JOINT INTERIM STATEMENT OF THE INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION TASK FORCE ON EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION; NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE; AMERICAN HEART ASSOCIATION; WORLD HEART FEDERATION; INTERNATIONAL ATHEROSCLEROSIS SOCIETY; AND INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation

Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; **120**(16):1640-5.

ANDREASEN CH, STENDER-PETERSEN KL, MOGENSEN MS, TOREKOV SS, WEGNER L, ANDERSEN G, NIELSEN AL, ALBRECHTSEN A, BORCH-JOHNSEN K, RASMUSSEN SS, CLAUSEN JO, SANDBAEK A, LAURITZEN T, HANSEN L, JØRGENSEN T, PEDERSEN O, HANSEN T. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes*. 2008; **57**(1):95-101.

ASAKAWA A, INUI A, KAGA T, YUZURIHA H, NAGATA T, UENO N, MAKINO S, FUJIMIYA M, NIJIMA A, FUJINO MA, KASUGA M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 2001;**120** (2):337-45.

ATTAOUA R, AIT EL MKADEM S, RADIAN S, FICA S, HANZU F, ALBU A, GHEORGHIU M, COCULESCU M, GRIGORESCU F. FTO gene associates to metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; **373**(2):230-4.

BAGDADE JD, BIERMAN EL, PORTE D JR. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest*. 1967; **46**(10):1549-57.

BALLINGER A, PEIKIN SR. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol*. 2002; **440**(2-3):109-17.

BANEGAS JR, LÓPEZ-GARCÍA E, GUTIÉRREZ-FISAC JL, GUALLAR-CASTILLÓN P, RODRÍGUEZ-ARTALEJO F. A simple estimate of mortality attributable to excess weight in the European Union. *Eur J Clin Nutr*. 2003; **57**(2):201-8.

BANSAL S, BURING JE, RIFAI N, MORA S, SACKS FM, RIDKER PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA*. 2007;**298**(3):309-16.

BARBER TM, BENNETT AJ, GROVES CJ, SOVIO U, RUOKONEN A, MARTIKAINEN H, POUTA A, HARTIKAINEN AL, ELLIOTT P, LINDGREN CM, FREATHY RM, KOCH K, OUWEHAND WH, KARPE F, CONWAY GS, WASS JA, JÄRVELIN MR, FRANKS S, MCCARTHY MI. Association of variants in the fat mass and obesity associated (FTO) gene with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia*. 2008;**51**(7):1153-8.

BARROS SP, OFFENBACHER S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res*. 2009; **88**(5): 400-8.

BARSH GS, SCHWARTZ MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet*. 2002; **3**(8): 589-600.

BAUER F, ELBERS CC, ADAN RA, LOOS RJ, ONLAND-MORET NC, GROBBEE DE, VAN VLIET-OSTAPTCHOUK JV, WIJMENGA C, VAN DER SCHOUW YT. Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference. *Am J Clin Nutr*. 2009; **90**(4): 951-9.

BECKERS S, MERTENS I, PEETERS A, VAN GAAL L, VAN HUL W. Screening for melanocortin-4 receptor mutations in a cohort of Belgian morbidly obese adults and children. *Int J Obes (Lond)*. 2006; **30**(2): 221-5.

BELL CG, WALLEY AJ, FROGUEL P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*. 2005; **6**(3): 221-34.

BENDLOVÁ B, VANKOVÁ M, LUKÁSOVÁ P, VCELÁK J, VEJRAZKOVÁ D, KUNESOVÁ M, VRBÍKOVÁ J, ZAJÍČKOVÁ K, ZOFKOVÁ I, VONDRA K, HAINER V. Study of the genetic causes of polygenetically determined endocrinopathies--patience can bring success. *Cas Lek Cesk*. 2007; **146**(3): 198-204.

BENEDIX F, WESTPHAL S, PATSCHKE R, GRANOWSKI D, LULEY C, LIPPERT H, WOLFF S. Weight loss and changes in salivary ghrelin and adiponectin: comparison between sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass and gastric banding. *Obes Surg*. 2011; **21**(5): 616-24.

BERGMAN RN, STEFANOVSKI D, BUCHANAN TA, SUMNER AE, REYNOLDS JC, SEBRING NG, XIANG AH, WATANABE RM. A better index of body adiposity. *Obesity (Silver Spring)*. 2011; **19**(5): 1083-9.

BHATTACHARYYA D1, GLICK BS. Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Mol Biol Cell*. 2007; **18**(3): 839-49.

BJÖRNTORP P. Adipose tissue distribution, plasma insulin, and cardiovascular disease. *Diabete Metab*. 1987; **13**(3 Pt 2): 381-5.

BRANSON R, POTOCZNA N, KRAL JG, LENTES KU, HOEHE MR, HORBER FF. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med*. 2003; **348**(12): 1096-103.

BUCHWALD H, AVIDOR Y, BRAUNWALD E, JENSEN MD, PORIES W, FAHRBACH K, SCHOELLES K. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2004; **292**(14): 1724-37.

BUCHWALD H, ESTOK R, FAHRBACH K, BANEL D, SLEDGE I. Trends in mortality in bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Surgery*. 2007; **142**(4): 621-32.

BUCHWALD H. Consensus Conference Panel. Consensus conference statement bariatric surgery for morbid obesity: health implications for patients, health professionals, and third-party payers. *Surg Obes Relat Dis*. 2005; **1**(3): 371-81.

BULTMAN SJ, MICHAUD EJ, WOYCHIK RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*. 1992; **71**(7): 1195-204.

BUSE JB, CAPRIO S, CEFALU WT, CERIELLO A, DEL PRATO S, INZUCCHI SE, MCLAUGHLIN S, PHILLIPS GL 2ND, ROBERTSON RP, RUBINO F, KAHN R, KIRKMAN MS. How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care*. 2009; **32**(11): 2133-5.

BUTLER AA, CONE RD. Knockout studies defining different roles for melanocortin receptors in energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; **994**: p. 240-5.

BUTLER AA, MARKS DL, FAN W, KUHN CM, BARTOLOME M, CONE RD. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat Neurosci*. 2001; **4**(6): 605-11.

CAI G, COLE SA, BUTTE N, BACINO C, DIEGO V, TAN K, GÖRING HH, O'RAHILLY S, FAROOQI IS, COMUZZIE AG. A quantitative trait locus on chromosome 18q for physical activity and dietary intake in Hispanic children. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; **14**(9): 1596-604.

CALTON MA, ERSOY BA, ZHANG S, KANE JP, MALLOY MJ, PULLINGER CR, BROMBERG Y, PENNACCHIO LA, DENT R, MCPHERSON R, AHITUV N, VAISSE C. Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet*. 2009; **18**(6): 1140-7.

CECIL JE, TAVENDALE R, WATT P, HETHERINGTON MM, PALMER CN. An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med*. 2008; **359**(24): 2558-66.

CHAMBERS JC, ELLIOTT P, ZABANEH D, ZHANG W, LI Y, FROGUEL P, BALDING D, SCOTT J, KOONER JS. Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat Genet.* 2008; **40**(6): 716-8.

CHANDARANA K, GELEGEN C, KARRA E, CHOUDHURY AI, DREW ME, FAUVEAU V, VIOLLET B, ANDREELLI F, WITHERS DJ, BATTERHAM RL. Diet and gastrointestinal bypass-induced weight loss: the roles of ghrelin and peptide YY. *Diabetes.* 2011; **60**(3): 810-18.

CHAPUT JP, KLINGENBERG L, ASTRUP A, SJÖDIN AM. Modern sedentary activities promote overconsumption of food in our current obesogenic environment. *Obes Rev.* 2011; **12**(5): 12-20.

CHIELLINI C, IACONELLI A, FAMILIARI P, RICCIONI ME, CASTAGNETO M, NANNI G, COSTAMAGNA G, MINGRONE G. Study of the effects of transoral gastroplasty on insulin sensitivity and secretion in obese subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010; **20**(3): 202-7.

CHRISTOU N, EFTHIMIOU E. Five-year outcomes of laparoscopic adjustable gastric banding and laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass in a comprehensive bariatric surgery program in Canada. *Can J Surg.* 2009; **52**(6): 249-58.

CHURCH C, MOIR L, MCMURRAY F, GIRARD C, BANKS GT, TEBOUL L, WELLS S, BRÜNING JC, NOLAN PM, ASHCROFT FM, COX RD. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet.* 2010; **42**(12): 1086-92.

CLARK PJ. The heritability of certain anthropometric characters as ascertained from measurements of twins. *Am J Hum Genet.* 1956; **8**(1): 49-54.

CLAUSSNITZER M, DANKEL SN, KIM KH, QUON G, MEULEMAN W, HAUGEN C, GLUNK V, SOUSA IS, BEAUDRY JL, PUVIINDRAN V, ABDENNUR NA, LIU J, SVENSSON PA, HSU YH, DRUCKER DJ, MELLGREN G, HUI CC, HAUNER H, KELLIS M. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Engl J Med.* 2015; **373**(10): 895-907.

COLE SA, BUTTE NF, VORUGANTI VS, CAI G, HAACK K, KENT JW JR, BLANGERO J, COMUZZIE AG, MCPHERSON JD, GIBBS RA. Evidence that multiple genetic variants of MC4R play a functional role in the regulation of energy expenditure and appetite in Hispanic children. *Am J Clin Nutr.* 2010; **91**(1): 191-9.

COLQUITT JL, PICOT J, LOVEMAN E, CLEGG AJ. Surgery for obesity. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; (2): CD003641.

CORDERA R, ADAMI GF. From bariatric to metabolic surgery: Looking for a "disease modifier" surgery for type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 2016; **7**(2): 27-33.

CORDOBA-CHACON J, MAJUMDAR N, POKALA NK, GAHETE MD, KINEMAN RD. Islet insulin content and release are increased in male mice with elevated endogenous GH and IGF-I, without evidence of systemic insulin resistance or alterations in β -cell mass. *Growth Horm IGF Res*. 2015; **25**(4):189-95.

CUMMINGS DE, WEIGLE DS, FRAYO, RS, BREEN PA, MA MK, DELLINGER EP, PURNELL JQ Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New Eng. J. Med*. 2002; **346**: 1623-1630.

DA SILVA AA, DO CARMO JM, WANG Z, HALL JE. The brain melanocortin system, sympathetic control, and obesity hypertension. *Physiology (Bethesda)*. 2014; **29**(3): 196-202.

DAY FR, LOOS RJ. Developments in obesity genetics in the era of genome-wide association studies. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011; **4**(4): 222-38.

DE ONIS M, BLÖSSNER M, BORGHINI E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr*. 2010; **92**(5): 1257-64.

DELHANTY PJ, VAN DER LELY AJ. Ghrelin and glucose homeostasis. *Peptides*. 2011; **32**(11): 2309-18.

DEN HOED M, WESTERTERP-PLANTENGA MS, BOUWMAN FG, MARIMAN EC, WESTERTERP KR. Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. *Am J Clin Nutr*. 2009; **90**(5): 1426-32.

DESPRÉS JP, LEMIEUX I, BERGERON J, PIBAROT P, MATHIEU P, LAROSE E, RODÉS-CABAU J, BERTRAND OF, POIRIER P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; **28**(6): 1039-49.

DINA C, MEYRE D, GALLINA S, DURAND E, KÖRNER A, JACOBSON P, CARLSSON LM, KIESS W, VATIN V, LECOEUR C, DELPLANQUE J, VAILLANT E, PATTOU F, RUIZ J, WEILL J, LEVY-MARCHAL C, HORBER F, POTOCZNA N, HERCBERG S, LE STUNFF C, BOUGNÈRES P, KOVACS P, MARRE M, BALKAU B, CAUCHI S, CHÈVRE JC, FROGUEL P. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*. 2007; **39**(6): 724-6.

DUAN C, YANG H, WHITE MF, RUI L. Disruption of the SH2-B gene causes age-dependent insulin resistance and glucose intolerance. *Mol Cell Biol*. 2004; **24**(17): 7435-43.

DUBERN B, CLÉMENT K, PELLOUX V, FROGUEL P, GIRARDET JP, GUY-GRAND B, TOUNIAN P. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *J Pediatr*. 2001; **139**(2): 204-9.

DUBOIS L, OHM KYVIK K, GIRARD M, TATONE-TOKUDA F, PÉRUSSE D, HJELMBORG J, SKYTTHE A, RASMUSSEN F, WRIGHT MJ, LICHTENSTEIN P, MARTIN NG. Genetic and environmental contributions to weight, height, and BMI from birth to 19 years of age: an international study of over 12,000 twin pairs. *PLoS One*. 2012; **7**(2): e30153.

ENGELSTOFT MS, PARK WM, SAKATA I, KRISTENSEN LV, HUSTED AS, OSBORNE-LAWRENCE S, PIPER PK, WALKER AK, PEDERSEN MH, NØHR MK, PAN J, SINZ CJ, CARRINGTON PE, AKIYAMA TE, JONES RM, TANG C, AHMED K, OFFERMANN S, EGEROD KL, ZIGMAN JM, SCHWARTZ TW. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. *Mol Metab*. 2013; **2**(4): 376-92.

FAROOQI IS, KEOGH JM, YEO GS, LANK EJ, CHEETHAM T, O'RAHILLY S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med*. 2003; **348**(12): 1085-95.

FAROOQI IS, O'RAHILLY S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med*. 2005; **56**: 443-58.

FAROOQI IS, O'RAHILLY S. Recent advances in the genetics of severe childhood obesity. *Arch Dis Child*. 2000; **83**(1): 31-4.

FAROOQI IS, VOLDERS K, STANHOPE R, HEUSCHKEL R, WHITE A, LANK E, KEOGH J, O'RAHILLY S, CREEMERS JW. Hyperphagia and early-onset obesity due to a novel homozygous missense mutation in prohormone convertase 1/3. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; **92**(9): 3369-73.

FAROOQI IS. Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005; **19**(3): 359-74.

FINKELSTEIN EA, KHAVJOU OA, THOMPSON H, TROGDON JG, PAN L, SHERRY B, DIETZ W. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med*. 2012; **42**(6): 563-70.

FRAYLING TM, TIMPSON NJ, WEEDON MN, ZEGGINI E, FREATHY RM, LINDGREN CM, PERRY JR, ELLIOTT KS, LANGO H, RAYNER NW, SHIELDS B, HARRIES LW, BARRETT JC, ELLARD S, GROVES CJ, KNIGHT B, PATCH AM,

NESS AR, EBRAHIM S, LAWLOR DA, RING SM, BEN-SHLOMO Y, JARVELIN MR, SOVIO U, BENNETT AJ, MELZER D, FERRUCCI L, LOOS RJ, BARROSO I, WAREHAM NJ, KARPE F, OWEN KR, CARDON LR, WALKER M, HITMAN GA, PALMER CN, DONEY AS, MORRIS AD, SMITH GD, HATTERSLEY AT, MCCARTHY MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007; **316**(5826): 889-94.

FREATHY RM, TIMPSON NJ, LAWLOR DA, POUTA A, BEN-SHLOMO Y, RUOKONEN A, EBRAHIM S, SHIELDS B, ZEGGINI E, WEEDON MN, LINDGREN CM, LANGO H, MELZER D, FERRUCCI L, PAOLISSO G, NEVILLE MJ, KARPE F, PALMER CN, MORRIS AD, ELLIOTT P, JARVELIN MR, SMITH GD, MCCARTHY MI, HATTERSLEY AT, FRAYLING TM. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes*. 2008; **57**(5): 1419-26.

FRIED M, DOLEZALOVA K. Metabolic surgery--a new approach to the management of selected diseases. *Vnitr Lek*. 2011; **57**(4): 402-4.

FRIED M, YUMUK V, OPPERT JM, SCOPINARO N, TORRES A, WEINER R, YASHKOV Y, FRÜHBECK G; International Federation for Surgery of Obesity and Metabolic Disorders-European Chapter (IFSO-EC); European Association for the Study of Obesity (EASO); European Association for the Study of Obesity Obesity Management Task Force (EASO OMTF). Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes Surg*. 2014; **24**(1): 42-55.

FRIED M. Metabolic surgery. *Vnitr Lek*. 2010; **56**(10): 1065-8.

GANTZ I, MIWA H, KONDA Y, SHIMOTO Y, TASHIRO T, WATSON SJ, DELVALLE J, YAMADA T. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem*. 1993; **268**(20): 15174-9.

GARFIELD AS, LAM DD, MARSTON OJ, PRZYDZIAL MJ, HEISLER LK. Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; **20**(5): 203-15.

Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am J Clin Nutr*. 1992; **55**(2): 615-619.

GELLER F, REICHWALD K, DEMPFLER A, ILLIG T, VOLLMERT C, HERPERTZ S, SIFFERT W, PLATZER M, HESS C, GUDERMANN T, BIEBERMANN H, WICHMANN HE, SCHÄFER H, HINNEY A, HEBEBRAND J. Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am J Hum Genet*. 2004; **74**(3): 572-81.

GERKEN T, GIRARD CA, TUNG YC, WEBBY CJ, SAUDEK V, HEWITSON KS, YEO GS, MCDONOUGH MA, CUNLIFFE S, MCNEILL LA, GALVANOVSKIS J, RORSMAN P, ROBINS P, PRIEUR X, COLL AP, MA M, JOVANOVIĆ Z, FAROOQI IS, SEDGWICK B, BARROSO I, LINDAHL T, PONTING CP, ASHCROFT FM, O'RAHILLY S, SCHOFIELD CJ. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 2007; **318**(5855): 1469-72.

GIBSON G. Hints of hidden heritability in GWAS. *Nat Genet*. 2010; **42**(7): 558-60.

GJESING AP, VESTMAR MA, JØRGENSEN T, HENI M, HOLST JJ, WITTE DR, HANSEN T, PEDERSEN O. The effect of PCSK1 variants on waist, waist-hip ratio and glucose metabolism is modified by sex and glucose tolerance status. *PLoS One*. 2011; **6**(9): e23907.

GÓMEZ-AMBROSI J, SILVA C, GALOFRÉ JC, ESCALADA J, SANTOS S, MILLÁN D, VILA N, IBAÑEZ P, GIL MJ, VALENTÍ V, ROTELLAR F, RAMÍREZ B, SALVADOR J, FRÜHBECK G. Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *Int J Obes (Lond)*. 2012; **36**(2): 286-94.

GRAY J, YEO GS, COX JJ, MORTON J, ADLAM AL, KEOGH JM, YANOVSKI JA, EL GHARBAWY A, HAN JC, TUNG YC, HODGES JR, RAYMOND FL, O'RAHILLY S, FAROOQI IS. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes*. 2006; **55**(12): 3366-71.

GRAY SL, VIDAL-PUIG AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev*. 2007; **65**(6 Pt 2): 7-12.

HAINER V, STUNKARD A, KUNESOVÁ M, PARÍZKOVÁ J, STICH V, ALLISON DB. A twin study of weight loss and metabolic efficiency. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 Apr; **25**(4): p. 533-7.

HAINER V, ZAMRAZILOVÁ H, ALDHOON-HAINEROVÁ I Existuje metabolicky zdravá obezita? *DMEV* 2015; **18**(3): 112-120.

HAINEROVÁ I, LARSEN LH, HOLST B, FINKOVÁ M, HAINER V, LÉBL J, HANSEN T, PEDERSEN O. Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response, and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Sep; **92**(9): 3689-96.

HANSEN D, DENDALE P, BERGER J, VAN LOON LJ, MEEUSEN R. The effects of exercise training on fat-mass loss in obese patients during energy intake restriction. *Sports Med*. 2007; **37**(1): 31-46.

HARTZ PA Personal Communication. *Baltimore*, Md. 5/20/2013.

HAUPT A, THAMER C, HENI M, TSCHRITTER O, MACHANN J, SCHICK F, MACHICAO F, HÄRING HU, STAIGER H, FRITSCHKE A. Impact of variation near MC4R on whole-body fat distribution, liver fat, and weight loss. *Obesity (Silver Spring)*. 2009; **17**(10): 1942-5.

HEBEBRAND J, FRIEDEL S, SCHÄUBLE N, GELLER F, HINNEY A. Perspectives: molecular genetic research in human obesity. *Obes Rev*. 2003; **4**(3): 139-46.

HERBERT A, GERRY NP, MCQUEEN MB, HEID IM, PFEUFER A, ILLIG T, WICHMANN HE, MEITINGER T, HUNTER D, HU FB, COLDITZ G, HINNEY A, HEBEBRAND J, KOBERWITZ K, ZHU X, COOPER R, ARDLIE K, LYON H, HIRSCHHORN JN, LAIRD NM, LENBURG ME, LANGE C, CHRISTMAN MF. A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science*. 2006; **312**(5771): 279-283.

HILL JO, WYATT HR, PETERS JC. Energy balance and obesity. *Circulation*. 2012 Jul 3; **126**(1): p. 126-32.

HINNEY A, HOHMANN S, GELLER F, VOGEL C, HESS C, WERMTER AK, BROKAMP B, GOLDSCHMIDT H, SIEGFRIED W, REMSCHMIDT H, SCHÄFER H, GUDERMANN T, HEBEBRAND J. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; **88**(9): 4258-67.

HOFKER M, WIJMENGA C. A supersized list of obesity genes. *Nat Genet*. 2009; **41**(2): 139-40.

HOLÉCZY P, BOLEK M, FOJTÍK P, CHRIPKOVÁ J, KRIŠTOF J, ŠEVČÍKOVÁ J. Laparoskopická plikace žaludku - nová naděje v léčbě závažné obezity. *Endoskopie* 2011; **20**(1): p. 17-19.

HOLST JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*. 2007; **87**(4): 1409-39.

HOLZAPFEL C, GRALLERT H, HUTH C, WAHL S, FISCHER B, DÖRING A, RÜCKERT IM, HINNEY A, HEBEBRAND J, WICHMANN HE, HAUNER H, ILLIG T, HEID IM. Genes and lifestyle factors in obesity: results from 12,462 subjects from MONICA/KORA. *Int J Obes (Lond)*. 2010; **34**(10): 1538-45.

HUBACEK JA, BOHUSLAVOVA R, KUTHANOVA L, KUBINOVA R, PEASEY A, PIKHART H, MARMOT MG, BOBAK M. The FTO gene and obesity in a large Eastern European population sample: the HAPIEE study. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; **16**(12): 2764-6.

HUSZAR D, LYNCH CA, FAIRCHILD-HUNTRESS V, DUNMORE JH, FANG Q, BERKEMEIER LR, GU W, KESTERSON RA, BOSTON BA, CONE RD, SMITH FJ, CAMPFIELD LA, BURN P, LEE F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 1997; **88**(1): 131-41.

JACQUEMONT S, REYMOND A, ZUFFEREY F, HAREWOOD L, WALTERS RG, KUTALIK Z, MARTINET D, SHEN Y, VALSESIA A, BECKMANN ND, THORLEIFSSON G, BELFIORE M, BOUQUILLON S, CAMPION D, DE LEEUW N, DE VRIES BB, ESKO T, FERNANDEZ BA, FERNÁNDEZ-ARANDA F, FERNÁNDEZ-REAL JM, GRATACÒS M, GUILMATRE A, HOYER J, JARVELIN MR, KOOY RF, KURG A, LE CAIGNEC C, MÄNNIK K, PLATT OS, SANLAVILLE D, VAN HAELEST MM, VILLATORO GOMEZ S, WALHA F, WU BL, YU Y, ABOURA A, ADDOR MC, ALEMBIK Y, ANTONARAKIS SE, ARVEILER B, BARTH M, BEDNAREK N, BÉNA F, BERGMANN S, BERI M, BERNARDINI L, BLAUMEISER B, BONNEAU D, BOTTANI A, BOUTE O, BRUNNER HG, CAILLEY D, CALLIER P, CHIESA J, CHRAST J, COIN L, COUTTON C, CUISSET JM, CUVELLIER JC, DAVID A, DE FREMINVILLE B, DELOBEL B, DELRUE MA, DEMEER B, DESCAMPS D, DIDELOT G, DIETERICH K, DISCIGLIO V, DOCOFENZY M, DRUNAT S, DUBAN-BEDU B, DUBOURG C, EL-SAYED MOUSTAFA JS, ELLIOTT P, FAAS BH, FAIVRE L, FAUDET A, FELLMANN F, FERRARINI A, FISHER R, FLORI E, FORER L, GAILLARD D, GERARD M, GIEGER C, GIMELLI S, GIMELLI G, GRABE HJ, GUICHET A, GUILLIN O, HARTIKAINEN AL, HERON D, HIPPOLYTE L, HOLDER M, HOMUTH G, ISIDOR B, JAILLARD S, JAROS Z, JIMÉNEZ-MURCIA S, HELAS GJ, JONVEAUX P, KAKSONEN S, KEREN B, KLOSS-BRANDSTÄTTER A, KNOERS NV, KOOLEN DA, KROISEL PM, KRONENBERG F, LABALME A, LANDAIS E, LAPI E, LAYET V, LEGALLIC S, LEHEUP B, LEUBE B, LEWIS S, LUCAS J, MACDERMOT KD, MAGNUSSON P, MARSHALL C, MATHIEU-DRAMARD M, MCCARTHY MI, MEITINGER T, MENCARELLI MA, MERLA G, MOERMAN A, MOOSER V, MORICE-PICARD F, MUCCIOLO M, NAUCK M, NDIAYE NC, NORDGREN A, PASQUIER L, PETIT F, PFUNDT R, PLESSIS G, RAJCAN-SEPAROVIC E, RAMELLI GP, RAUCH A, RAVAZZOLO R, REIS A, RENIERI A, RICHART C, RIED JS, RIEUBLAND C, ROBERTS W, ROETZER KM, ROORYCK C, ROSSI M, SAEMUNDSSEN E, SATRE V, SCHURMANN C, SIGURDSSON E, STAVROPOULOS DJ, STEFANSSON H, TENGSTRÖM C, THORSTEINSDÓTTIR U, TINAHONES FJ, TOURAINE R, VALLÉE L, VAN BINSBERGEN E, VAN DER AA N, VINCENT-DELORME C, VISVIKIS-SIEST S, VOLLENWEIDER P, VÖLZKE H, VULTO-VAN SILFHOUT AT, WAEBER G, WALLGREN-PETTERSSON C, WITWICKI RM, ZWOLINKSI S, ANDRIEUX J,

ESTIVILL X, GUSELLA JF, GUSTAFSSON O, METSPALU A, SCHERER SW, STEFANSSON K, BLAKEMORE AI, BECKMANN JS, FROGUEL P. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature*. 2011; **478**(7367): 97-102.

JANSEN, E., AYOUBI, T. A. Y., MEULEMANS, S. M. P., VAN DE VEN, W. J. M. Neuroendocrine-specific expression of the human prohormone convertase 1 gene: hormonal regulation of transcription through distinct cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 15391-15397.

JURVANSUU JM, GOLDMAN A. Obesity risk gene TMEM18 encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *PLoS One*. 2011; **6**(9): e25317.

KALNINA I, ZAHARENKO L, VAIVADE I, ROVITE V, NIKITINA-ZAKE L, PECULIS R, FRIDMANIS D, GELDNERE K, JACOBSSON JA, ALMEN MS, PIRAGS V, SCHIÖTH HB, KLOVINS J. Polymorphisms in FTO and near TMEM18 associate with type 2 diabetes and predispose to younger age at diagnosis of diabetes. *Gene*. 2013; **527**(2): 462-8.

KASALICKÝ M, BARINKA A, BENO P, CERNL S, CIERNY M, DOSTALÍK J, HOLÉČZY P, HROCH T, HRUBÝ M, KARNOS V, MICHALSKÝ D, PACHOLÍK K, REJHOLEC J, SVOBODA L, TVARŮZEK J, VERNER T, VOLSANSKÝ P, VRANÝ M. Czech bariatry in 2010. *Rozhl Chir*. 2011; **90**(4): 222-5.

KITAHARA CM, FLINT AJ, BERRINGTON DE GONZALEZ A, BERNSTEIN L, BROTZMAN M, MACINNIS RJ, MOORE SC, ROBIEN K, ROSENBERG PS, SINGH PN, WEIDERPASS E, ADAMI HO, ANTON-CULVER H, BALLARD-BARBASH R, BURING JE, FREEDMAN DM, FRASER GE, BEANE FREEMAN LE, GAPSTUR SM, GAZIANO JM, GILES GG, HÅKANSSON N, HOPPIN JA, HU FB, KOENIG K, LINET MS, PARK Y, PATEL AV, PURDUE MP, SCHAIRER C, SESSO HD, VISVANATHAN K, WHITE E, WOLK A, ZELENIUCH-JACQUOTTE A, HARTGE P. Association between class III obesity (BMI of 40-59 kg/m²) and mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. *PLoS Med*. 2014; **11**(7): e1001673.

KOBZOVÁ J, VIGNEROVÁ J, BLÁHA P, KREJCOVSKÝ L, RIEDLOVÁ J. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Public Health*. 2004; **12**(3): 126-30.

KOJIMA, M., HOSODA, H., DATE, Y., NAKAZATO, M., MATSUO, H., KANGAWA, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; **402**(6762): 656-60.

KOKSHOORN NE, BIERMASZ NR, ROELFSEMA F, SMIT JW, PEREIRA AM, ROMIJN JA: GH replacement therapy in elderly GH-deficient patients: a systematic review. *Eur J Endocrinol*. 2011; **164**(5): 657-65.

KORBONITS M, BUSTIN SA, KOJIMA M, JORDAN S, ADAMS EF, LOWE DG, KANGAWA K, GROSSMAN AB. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; **86**(2): 881-7.

KOTIDIS EV, KOLIAKOS GG, BALZPOULOS VG, IOANNIDIS KN, YOVOS JG, PAPA VRAMIDIS ST. Serum ghrelin, leptin and adiponectin levels before and after weight loss: comparison of three methods of treatment--a prospective study. *Obes Surg*. 2006; **16**(11): 1425-32.

KRING SI, HOLST C, TOUBRO S, ASTRUP A, HANSEN T, PEDERSEN O, SØRENSEN TI. Common variants near MC4R in relation to body fat, body fat distribution, metabolic traits and energy expenditure. *Int J Obes (Lond)*. 2010; **34**(1): 182-9.

LAFERRÈRE B, TEIXEIRA J, MCGINTY J, TRAN H, EGGER JR, COLARUSSO A, KOVACK B, BAWA B, KOSHY N, LEE H, YAPP K, OLIVAN B. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; **93**(7): 2479-85.

LAFERRÈRE B. Diabetes remission after bariatric surgery: is it just the incretins? *Int J Obes (Lond)*. 2011; **35**(3): 22-5.

LENARD NR, BERTHOUD HR. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; **16**(3): 11-22.

LI Z, HONG K, YIP I, HUERTA S, BOWERMAN S, WALKER J, WANG H, ELASHOFF R, GO VL, HEBER D. Body weight loss with phentermine alone versus phentermine and fenfluramine with very-low-calorie diet in an outpatient obesity management program: a retrospective study. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2003; **64**(7): 447-60.

LOCKE AE, KAHALI B, BERNDT SI, JUSTICE AE, PERS TH, DAY FR, POWELL C, VEDANTAM S, BUCHKOVICH ML, YANG J, CROTEAU-CHONKA DC, ESKO T, FALL T, FERREIRA T, GUSTAFSSON S, KUTALIK Z, LUAN J, MÄGI R, RANDALL JC, WINKLER TW, WOOD AR, WORKALEMAHU T, FAUL JD, SMITH JA, HUA ZHAO J, ZHAO W, CHEN J, FEHRMANN R, HEDMAN ÅK, KARJALAINEN J, SCHMIDT EM, ABSHER D, AMIN N, ANDERSON D, BEEKMAN M, BOLTON JL, BRAGG-GRESHAM JL, BUYSKE S, DEMIRKAN A, DENG G, EHRET GB, FEENSTRA B, FEITOSA MF, FISCHER K, GOEL A, GONG J, JACKSON AU, KANONI S, KLEBER ME, KRISTIANSSEN K, LIM U, LOTAY V, MANGINO M,

MATEO LEACH I, MEDINA-GOMEZ C, MEDLAND SE, NALLS MA, PALMER CD, PASKO D, PECHLIVANIS S, PETERS MJ, PROKOPENKO I, SHUNGIN D, STANČÁKOVÁ A, STRAWBRIDGE RJ, JU SUNG Y, TANAKA T, TEUMER A, TROMPET S, VAN DER LAAN SW, VAN SETTEN J, VAN VLIET-OSTAPTCHOUK JV, WANG Z, YENGO L, ZHANG W, ISAACS A, ALBRECHT E, ÄRNLÖV J, ARSCOTT GM, ATTWOOD AP, BANDINELLI S, BARRETT A, BAS IN, BELLIS C, BENNETT AJ, BERNE C, BLAGIEVA R, BLÜHER M, BÖHRINGER S, BONNYCASTLE LL, BÖTTCHER Y, BOYD HA, BRUINENBERG M, CASPERSEN IH, IDA CHEN YD, CLARKE R, DAW EW, DE CRAEN AJ, DELGADO G, DIMITRIOU M, DONEY AS, EKLUND N, ESTRADA K, EURY E, FOLKERSEN L, FRASER RM, GARCIA ME, GELLER F, GIEDRAITIS V, GIGANTE B, GO AS, GOLAY A, GOODALL AH, GORDON SD, GORSKI M, GRABE HJ, GRALLERT H, GRAMMER TB, GRÄSSLER J, GRÖNBERG H, GROVES CJ, GUSTO G, HAESSLER J, HALL P, HALLER T, HALLMANS G, HARTMAN CA, HASSINEN M, HAYWARD C, HEARD-COSTA NL, HELMER Q, HENGSTENBERG C, HOLMEN O, HOTTENGA JJ, JAMES AL, JEFF JM, JOHANSSON Å, JOLLEY J, JULIUSDOTTIR T, KINNUNEN L, KOENIG W, KOSKENVUO M, KRATZER W, LAITINEN J, LAMINA C, LEANDER K, LEE NR, LICHTNER P, LIND L, LINDSTRÖM J, SIN LO K, LOBBENS S, LORBEER R, LU Y, MACH F, MAGNUSSON PK, MAHAJAN A, MCARDLE WL, MCLACHLAN S, MENNI C, MERGER S, MIHAILOV E, MILANI L, MOAYYERI A, MONDA KL, MORKEN MA, MULAS A, MÜLLER G, MÜLLER-NURASYID M, MUSK AW, NAGARAJA R, NÖTHEN MM, NOLTE IM, PILZ S, RAYNER NW, RENSTROM F, RETTIG R, RIED JS, RIPKE S, ROBERTSON NR, ROSE LM, SANNA S, SCHARNAGL H, SCHOLTENS S, SCHUMACHER FR, SCOTT WR, SEUFFERLEIN T, SHI J, VERNON SMITH A, SMOLONSKA J, STANTON AV, STEINTHORSDDOTTIR V, STIRRUPS K, STRINGHAM HM, SUNDSTRÖM J, SWERTZ MA, SWIFT AJ, SYVÄNEN AC, TAN ST, TAYO BO, THORAND B, THORLEIFSSON G, TYRER JP, UH HW, VANDENPUT L, VERHULST FC, VERMEULEN SH, VERWEIJ N, VONK JM, WAITE LL, WARREN HR, WATERWORTH D, WEEDON MN, WILKENS LR, WILLENBORG C, WILSGAARD T, WOJCZYNSKI MK, WONG A, WRIGHT AF, ZHANG Q; LIFELINES COHORT STUDY, BRENNAN EP, CHOI M, DASTANI Z, DRONG AW, ERIKSSON P, FRANCO-CERECEDA A, GÅDIN JR, GHARAVI AG, GODDARD ME, HANDSAKER RE, HUANG J, KARPE F, KATHIRESAN S, KEILDSON S, KIRYLUK K, KUBO M, LEE JY, LIANG L, LIFTON RP, MA B, MCCARROLL SA, MCKNIGHT AJ, MIN JL, MOFFATT MF, MONTGOMERY GW, MURABITO JM, NICHOLSON G, NYHOLT DR, OKADA Y, PERRY JR, DORAJOO R, REINMAA E, SALEM RM, SANDHOLM N, SCOTT RA, STOLK L, TAKAHASHI A, TANAKA T, VAN'T HOOFT FM, VINKHUYZEN AA, WESTRA HJ, ZHENG W, ZONDERVAN KT; ADIPOGEN CONSORTIUM; AGEN-BMI WORKING GROUP; CARDIOGRAMPLUSC4D CONSORTIUM; CKDGEN CONSORTIUM; GLGC; ICBP; MAGIC INVESTIGATORS; MUTHER CONSORTIUM; MIGEN CONSORTIUM; PAGE CONSORTIUM; REPROGEN CONSORTIUM; GENIE CONSORTIUM; INTERNATIONAL

ENDOGENE CONSORTIUM, HEATH AC, ARVEILER D, BAKKER SJ, BEILBY J, BERGMAN RN, BLANGERO J, BOVET P, CAMPBELL H, CAULFIELD MJ, CESANA G, CHAKRAVARTI A, CHASMAN DI, CHINES PS, COLLINS FS, CRAWFORD DC, CUPPLES LA, CUSI D, DANESH J, DE FAIRE U, DEN RUIJTER HM, DOMINICZAK AF, ERBEL R, ERDMANN J, ERIKSSON JG, FARRALL M, FELIX SB, FERRANNINI E, FERRIÈRES J, FORD I, FOROUHI NG, FORRESTER T, FRANCO OH, GANSEVOORT RT, GEJMAN PV, GIEGER C, GOTTESMAN O, GUDNASON V, GYLLENSTEN U, HALL AS, HARRIS TB, HATTERSLEY AT, HICKS AA, HINDORFF LA, HINGORANI AD, HOFMAN A, HOMUTH G, HOVINGH GK, HUMPHRIES SE, HUNT SC, HYPPÖNEN E, ILLIG T, JACOBS KB, JARVELIN MR, JÖCKEL KH, JOHANSEN B, JOUSILAHTI P, JUKEMA JW, JULA AM, KAPRIO J, KASTELEIN JJ, KEINANEN-KIUKAANNIEMI SM, KIEMENEY LA, KNEKT P, KOONER JS, KOOPERBERG C, KOVACS P, KRAJA AT, KUMARI M, KUUSISTO J, LAKKA TA, LANGENBERG C, LE MARCHAND L, LEHTIMÄKI T, LYSSSENKO V, MÄNNISTÖ S, MARETTE A, MATISE TC, MCKENZIE CA, MCKNIGHT B, MOLL FL, MORRIS AD, MORRIS AP, MURRAY JC, NELIS M, OHLSSON C, OLDEHINKEL AJ, ONG KK, MADDEN PA, PASTERKAMP G, PEDEN JF, PETERS A, POSTMA DS, PRAMSTALLER PP, PRICE JF, QI L, RAITAKARI OT, RANKINEN T, RAO DC, RICE TK, RIDKER PM, RIOUX JD, RITCHIE MD, RUDAN I, SALOMAA V, SAMANI NJ, SARAMIES J, SARZYNSKI MA, SCHUNKERT H, SCHWARZ PE, SEVER P, SHULDINER AR, SINISALO J, STOLK RP, STRAUCH K, TÖNJES A, TRÉGOUËT DA, TREMBLAY A, TREMOLI E, VIRTAMO J, VOHL MC, VÖLKER U, WAEBER G, WILLEMSSEN G, WITTEMAN JC, ZILLIKENS MC, ADAIR LS, AMOUYEL P, ASSELBERGS FW, ASSIMES TL, BOCHUD M, BOEHM BO, BOERWINKLE E, BORNSTEIN SR, BOTTINGER EP, BOUCHARD C, CAUCHI S, CHAMBERS JC, CHANOCK SJ, COOPER RS, DE BAKKER PI, DEDOUSSIS G, FERRUCCI L, FRANKS PW, FROGUEL P, GROOP LC, HAIMAN CA, HAMSTEN A, HUI J, HUNTER DJ, HVEEM K, KAPLAN RC, KIVIMAKI M, KUH D, LAAKSO M, LIU Y, MARTIN NG, MÄRZ W, MELBYE M, METSPALU A, MOEBUS S, MUNROE PB, NJØLSTAD I, OOSTRA BA, PALMER CN, PEDERSEN NL, PEROLA M, PÉRUSSE L, PETERS U, POWER C, QUERTERMOUS T, RAURAMAA R, RIVADENEIRA F, SAARISTO TE, SALEHEEN D, SATTAR N, SCHADT EE, SCHLESSINGER D, SLAGBOOM PE, SNIEDER H, SPECTOR TD, THORSTEINSDOTTIR U, STUMVOLL M, TUOMILEHTO J, UITTERLINDEN AG, UUSITUPA M, VAN DER HARST P, WALKER M, WALLASCHOFSKI H, WAREHAM NJ, WATKINS H, WEIR DR, WICHMANN HE, WILSON JF, ZANEN P, BORECKI IB, DELOUKAS P, FOX CS, HEID IM, O'CONNELL JR, STRACHAN DP, STEFANSSON K, VAN DUIJN CM, ABECASIS GR, FRANKE L, FRAYLING TM, MCCARTHY MI, VISSCHER PM, SCHERAG A, WILLER CJ, BOEHNKE M, MOHLKE KL, LINDGREN CM, BECKMANN JS, BARROSO I, NORTH KE, INGELSSON E, HIRSCHHORN JN, LOOS RJ, SPELIOTES EK. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015; **518**(7538): 197-206.

LOOS RJ, LINDGREN CM, LI S, WHEELER E, ZHAO JH, PROKOPENKO I, INOUE M, FREATHY RM, ATTWOOD AP, BECKMANN JS, BERNDT SI; PROSTATE, LUNG, COLORECTAL, AND OVARIAN (PLCO) CANCER SCREENING TRIAL, JACOBS KB, CHANOCK SJ, HAYES RB, BERGMANN S, BENNETT AJ, BINGHAM SA, BOCHUD M, BROWN M, CAUCHI S, CONNELL JM, COOPER C, SMITH GD, DAY I, DINA C, DE S, DERMITZAKIS ET, DONEY AS, ELLIOTT KS, ELLIOTT P, EVANS DM, SADAF FAROOQI I, FROGUEL P, GHORI J, GROVES CJ, GWILLIAM R, HADLEY D, HALL AS, HATTERSLEY AT, HEBEBRAND J, HEID IM; KORA, LAMINA C, GIEGER C, ILLIG T, MEITINGER T, WICHMANN HE, HERRERA B, HINNEY A, HUNT SE, JARVELIN MR, JOHNSON T, JOLLEY JD, KARPE F, KENIRY A, KHAW KT, LUBEN RN, MANGINO M, MARCHINI J, MCARDLE WL, MCGINNIS R, MEYRE D, MUNROE PB, MORRIS AD, NESS AR, NEVILLE MJ, NICA AC, ONG KK, O'RAHILLY S, OWEN KR, PALMER CN, PAPADAKIS K, POTTER S, POUTA A, QI L; NURSES' HEALTH STUDY, RANDALL JC, RAYNER NW, RING SM, SANDHU MS, SCHERAG A, SIMS MA, SONG K, SORANZO N, SPELIOTES EK; DIABETES GENETICS INITIATIVE, SYDDALL HE, TEICHMANN SA, TIMPSON NJ, TOBIAS JH, UDA M; SARDINIA STUDY, VOGEL CI, WALLACE C, WATERWORTH DM, WEEDON MN; WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM, WILLER CJ; FUSION, WRAIGHT, YUAN X, ZEGGINI E, HIRSCHHORN JN, STRACHAN DP, OUWEHAND WH, CAULFIELD MJ, SAMANI NJ, FRAYLING TM, VOLLENWEIDER P, WAEBER G, MOOSER V, DELOUKAS P, MCCARTHY MI, WAREHAM NJ, BARROSO I, JACOBS KB, CHANOCK SJ, HAYES RB, LAMINA C, GIEGER C, ILLIG T, MEITINGER T, WICHMANN HE, KRAFT P, HANKINSON SE, HUNTER DJ, HU FB, LYON HN, VOIGHT BF, RIDDERSTRALE M, GROOP L, SCHEET P, SANNA S, ABECASIS GR, ALBAI G, NAGARAJA R, SCHLESSINGER D, JACKSON AU, TUOMILEHTO J, COLLINS FS, BOEHNKE M, MOHLKE KL. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet.* 2008; **40**(6): 768-75.

LV D, ZHANG DD, WANG H, ZHANG Y, LIANG L, FU JF, XIONG F, LIU GL, GONG CX, LUO FH, CHEN SK, LI ZL, ZHU YM. Genetic variations in SEC16B, MC4R, MAP2K5 and KCTD15 were associated with childhood obesity and interacted with dietary behaviors in Chinese school-age population. *Gene.* 2015; **560**(2): 149-55.

MA L, TATARANNI PA, BOGARDUS C, BAIER LJ. Melanocortin 4 receptor gene variation is associated with severe obesity in Pima Indians. *Diabetes.* 2004; **53**(10): 2696-9.

MAFFEI M., HALAAS J., RAVUSSIN E., PRATLEY R. E., LEE G. H., ZHANG Y., FEI H., KIM S., LALLONE R., RANGANATHAN S., KERN P. A., FRIEDMAN J. M. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med.* 1995; **1**: 1155-61.

MAFFEIS C, MANFREDI R, TROMBETTA M, SORDELLI S, STORTI M, BENUZZI T, BONADONNA RC. Insulin sensitivity is correlated with subcutaneous but not visceral body fat in overweight and obese prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; **93**(6): 2122-8.

MAGENIS RE, SMITH L, NADEAU JH, JOHNSON KR, MOUNTJOY KG, CONE RD. Mapping of the ACTH, MSH, and neural (MC3 and MC4) melanocortin receptors in the mouse and human. *Mamm Genome.* 1994; **5**(8): 503-8.

MARTINELLI CE, KEOGH JM, GREENFIELD JR, HENNING E, VAN DER KLAUW AA, BLACKWOOD A, O'RAHILLY S, ROELFSEMA F, CAMACHO-HÜBNER C, PIJL H, FAROOQI IS. Obesity due to melanocortin 4 receptor (MC4R) deficiency is associated with increased linear growth and final height, fasting hyperinsulinemia, and incompletely suppressed growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; **96**(1): e181-8.

MATOULEK M, SVACINA S, LAJKA J. The incidence of obesity and its complications in the Czech Republic. *Vnitr Lek.* 2010; **56**(10): 1019-27.

MATTHEWS VB, ASTRÖM MB, CHAN MH, BRUCE CR, KRABBE KS, PRELOVSEK O, AKERSTRÖM T, YFANTI C, BROHOLM C, MORTENSEN OH, PENKOWA M, HOJMAN P, ZANKARI A, WATT MJ, BRUUNSGAARD H, PEDERSEN BK, FEBBRAIO MA. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia.* 2009; **52**(7): 1409-18.

MEEK CL, LEWIS HB, VERGESE B, PARK A, REIMANN F, GRIBBLE F. The effect of encapsulated glutamine on gut peptide secretion in human volunteers. *Peptides.* 2016; **77**: p. 38-46.

MELISSAS J, DASKALAKIS M, KOUKOURAKI S, ASKOXYLAKIS I, METAXARI M, DIMITRIADIS E, STATHAKI M, PAPADAKIS JA. Sleeve gastrectomy-a "food limiting" operation. *Obes Surg.* 2008; **18**(10): 1251-6.

MEYRE D, DELPLANQUE J, CHEVRE JC, LECOEUR C, LOBBENS S, GALLINA S, ET AL. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet.* 2009; **41**: 157-159.

MISAWA, H., YAMAGUCHI, M. Molecular cloning and sequencing of the cDNA coding for a novel regucalcin gene promoter region-related protein in rat, mouse and human liver. *Int. J. Molec. Med.* 2001; **8**: 513-520.

MIZUNO TM, KLEOPOULOS SP, BERGEN HT, ROBERTS JL, PRIEST CA, MOBBS CV. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes*. 1998; **47**(2): 294-7.

MÜLLER TD, HINNEY A, SCHERAG A, NGUYEN TT, SCHREINER F, SCHÄFER H, HEBEBRAND J, ROTH CL, REINEHR T. Fat mass and obesity associated' gene (FTO): no significant association of variant rs9939609 with weight loss in a lifestyle intervention and lipid metabolism markers in German obese children and adolescents. *BMC Med Genet*. 2008; **9**: 85.

NANPIERI M, MARI A, ANSELMINO M, BALDI S, BARSOTTI E, GUARINO D, CAMASTRA S, BELLINI R, BERTA RD, FERRANNINI E. The role of beta-cell function and insulin sensitivity in the remission of type 2 diabetes after gastric bypass surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; **96**(9): e1372-9.

NEEL JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*. 1962; **14**: 353-62.

NORDESTGAARD BG, BENN M, SCHNOHR P, TYBJAERG-HANSEN A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 2007; **298**(3): 299-308.

OBER C, VERCELLI D. Gene-environment interactions in human disease: nuisance or opportunity? *Trends Genet*. 2011; **27**(3): 107-15.

PARKER HE, REIMANN F, GRIBBLE FM. Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion. *Expert Rev Mol Med*. 2010; **12**: 922-927.

PARKER HE, WALLIS K, LE ROUX CW, WONG KY, REIMANN F, GRIBBLE FM. MOLECULAR mechanisms underlying bile acid-stimulated glucagon-like peptide-1 secretion. *Br J Pharmacol*. 2012; **165**(2): 414-23.

PENA-BELLO L, PERTEGA-DIAZ S, OUTEIRIÑO-BLANCO E, GARCIA-BUELA J, TOVAR S, SANGIAO-ALVARELLOS S, DIEGUEZ C, CORDIDO F: Effect of Oral Glucose Administration on Rebound Growth Hormone Release in Normal and Obese Women: The Role of Adiposity, Insulin Sensitivity and Ghrelin. *PLoS One*. 2015; **10**(3): E0121087.

PICOT J, JONES J, COLQUITT JL, GOSPODAREVSKAYA E, LOVEMAN E, BAXTER L, CLEGG AJ. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2009 Sep; **13**(41): 1-190, 215-357.

PINNICK KE, NEVILLE MJ, FIELDING BA, FRAYN KN, KARPE F, HODSON L. Gluteofemoral adipose tissue plays a major role in production of the lipokine palmitoleate in humans. *Diabetes*. 2012; **61**(6): 1399-403.

POIRIER P, ALPERT MA, FLEISHER LA, THOMPSON PD, SUGERMAN HJ, BURKE LE, MARCEAU P, FRANKLIN BA; American Heart Association Obesity Committee of Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Cardiopulmonary Perioperative and Critical Care, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, Council on Cardiovas. Cardiovascular evaluation and management of severely obese patients undergoing surgery: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation*. 2009; **120**(1): 86-95.

POIRIER P, CORNIER MA, MAZZONE T, STILES S, CUMMINGS S, KLEIN S, MCCULLOUGH PA, REN FIELDING C, FRANKLIN BA. American Heart Association Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Bariatric surgery and cardiovascular risk factors: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011; **123**(15): 1683-701.

POIRIER P, GILES TD, BRAY GA, HONG Y, STERN JS, PI-SUNYER FX, ECKEL RH. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; **26**(5): 968-76.

POTOCZNA N, BRANSON R, KRAL JG, PIEC G, STEFFEN R, RICKLIN T, HOEHE MR, LENTES KU, HORBER FF. Gene variants and binge eating as predictors of comorbidity and outcome of treatment in severe obesity. *J Gastrointest Surg*. 2004; **8**(8): 971-81.

QATANANI M, LAZAR MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. 2007; **21**(12): 1443-55.

RANKINEN T, ZUBERI A, CHAGNON YC, WEISNAGEL SJ, ARGYROPOULOS G, WALTZ B, PÉRUSSE L, BOUCHARD C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; **14**(4): 529-644.

REAVEN GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; **37**(12): 1595-607.

REED JA, BENOIT SC, PFLUGER PT, TSCHÖP MH, D'ALESSIO DA, SEELEY RJ. Mice with chronically increased circulating ghrelin develop age-related glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; **294** (4): 752-60.

REN D, ZHOU Y, MORRIS D, LI M, LI Z, RUI L. Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2007; **117**(2): 397-406.

RENSTRÖM F, PAYNE F, NORDSTRÖM A, BRITO EC, ROLANDSSON O, HALLMANS G, BARROSO I, NORDSTRÖM P, FRANKS PW; GIANT CONSORTIUM. Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet.* 2009; **18**(8): 1489-96.

ROSSKOPF D, SCHWAHN C, NEUMANN F, BORNHORST A, RIMMBACH C, MISCHKE M, WOLF S, GEISSLER I, KOCHER T, GRABE HJ, NAUCK M, HEBEBRAND J, KROEMER HK, FRIEDRICH N, VÖLZKE H, WALLASCHOFSKI H. The growth hormone-IGF-I axis as a mediator for the association between FTO variants and body mass index: results of the Study of Health in Pomerania. *Int J Obes.* 2011; **35**(3): 364-372.

RUDLING M, ANGELIN B: Growth hormone reduces plasma cholesterol in LDL receptor-deficient mice. *FASEB J.* 2001; **15**(8): 1350-56.

RUSHING PA, LUTZ TA, SEELEY RJ, WOODS SC. Amylin and insulin interact to reduce food intake in rats. *Horm Metab Res.* 2000; **32**(2): 62-5.

SANDHOLT CH, SPARSØ T, GRARUP N, ALBRECHTSEN A, ALMIND K, HANSEN L, TOFT U, JØRGENSEN T, HANSEN T, PEDERSEN O. Combined analyses of 20 common obesity susceptibility variants. *Diabetes.* 2010; **59**(7): 1667-73.

SANDHOLT CH, HANSEN T, PEDERSEN O. Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. *Nutr Diabetes.* 2012; **2**(7): e37.

SANTINI F, MAFFEI M, CECCARINI G, PELOSINI C, SCARTABELLI G, ROSELLINI V, CHIELLINI C, MARSILI A, LISI S, TONACCHERA M, AGRETTI P, CHIOVATO L, MAMMOLI C, VITTI P, PINCHERA A. Genetic screening for melanocortin-4 receptor mutations in a cohort of Italian obese patients: description and functional characterization of a novel mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 ;**89**(2): p. 904-8.

SAVASTANO S, DI SOMMA C, BARREA L, COLAO A. The complex relationship between obesity and the somatotropic axis: the long and winding road. *Growth Horm IGF Res.* 2014; **24**(6): 221-26.

SCHERAG A, DINA C, HINNEY A, VATIN V, SCHERAG S, VOGEL CI, ET AL. Two new loci for body-weight regulation identified in a joint analysis of genome-wide association studies for early-onset extreme obesity in French and German study groups. *PLoS Genet.* 2010; **6**(4): e1000916.

SCOPINARO N, ADAMI GF, PAPADIA FS, CAMERINI G, CARLINI F, BRIATORE L, D'ALESSANDRO G, PARODI C, WEISS A, ANDRAGHETTI G, CATALANO M, CORDERA R. The effects of biliopancreatic diversion on type 2 diabetes mellitus in

patients with mild obesity (BMI 30-35 kg/m²) and simple overweight (BMI 25-30 kg/m²): a prospective controlled study. *Obes Surg.* 2011; **21**(7): 880-8.

SCOPINARO N, GIANETTA E, PANDOLFO N, ANFOSSI A, BERRETTI B, BACHI V. Bilio-pancreatic bypass. Proposal and preliminary experimental study of a new type of operation for the functional surgical treatment of obesity. *Minerva Chir.* 1976; **31**(10): 560-6.

SCOTT LJ, MOHLKE KL, BONNYCASTLE LL, WILLER CJ, LI Y, DUREN WL, ERDOS MR, STRINGHAM HM, CHINES PS, JACKSON AU, PROKUNINA-OLSSON L, DING CJ, SWIFT AJ, NARISU N, HU T, PRUIM R, XIAO R, LI XY, CONNEELY KN, RIEBOW NL, SPRAU AG, TONG M, WHITE PP, HETRICK KN, BARNHART MW, BARK CW, GOLDSTEIN JL, WATKINS L, XIANG F, SARAMIES J, BUCHANAN TA, WATANABE RM, VALLE TT, KINNUNEN L, ABECASIS GR, PUGH EW, DOHENY KF, BERGMAN RN, TUOMILEHTO J, COLLINS FS, BOEHNKE M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science.* 2007; **316**(5829): 1341-5.

SCOTT WR, BATTERHAM RL. Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: understanding weight loss and improvements in type 2 diabetes after bariatric surgery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; **301**(1): 15-27.

SCUTERI A, SANNA S, CHEN WM, UDA M, ALBAI G, STRAIT J, NAJJAR S, NAGARAJA R, ORRÚ M, USALA G, DEI M, LAI S, MASCHIO A, BUSONERO F, MULAS A, EHRET GB, FINK AA, WEDER AB, COOPER RS, GALAN P, CHAKRAVARTI A, SCHLESSINGER D, CAO A, LAKATTA E, ABECASIS GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 2007; **3**(7): e115.

SEIDAH, N. G., MATTEI, M. G., GASPAR, L., BENJANNET, S., MBIKAY, M., CHRETIEN, M. Chromosomal assignments of the genes for neuroendocrine convertase PC1 (NEC1) to human 5q15-21, neuroendocrine convertase PC2 (NEC2) to human 20p11.1-11.2, and furin (mouse 7[D1-E2] region). *Genomics.* 1991; **11**: 103-107.

SERRETTI A, MANDELLI L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. *J Clin Psychiatry.* 2010; **71**(10): 1259-72.

SHMUELI O, HORN-SABAN S, CHALIFA-CASPI V, SHMOISH M, OPHIR R, BENJAMIN-RODRIG H, SAFRAN M, DOMANY E, LANCET D. GeneNote: whole genome expression profiles in normal human tissues. *C R Biol.* 2003; **326**(10-11): 1067-72.

SIGMUND E, SIGMUNDOVÁ D, BADURA P, KALMAN M, HAMRIK Z, PAVELKA J. Temporal Trends in Overweight and Obesity, Physical Activity and Screen Time among

Czech Adolescents from 2002 to 2014: A National Health Behaviour in School-Aged Children Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; **12**(9): 11848-68.

SNYDER B, NGUYEN A, SCARBOUROUGH T, YU S, WILSON E. Comparison of those who succeed in losing significant excessive weight after bariatric surgery and those who fail. *Surg Endosc*. 2009; **23**(10): 2302-6.

SPELIOTES EK, WILLER CJ, BERNDT SI, MONDA KL, THORLEIFSSON G, JACKSON AU, LANGO ALLEN H, LINDGREN CM, LUAN J, MÄGI R, RANDALL JC, VEDANTAM S, WINKLER TW, QI L, WORKALEMAHU T, HEID IM, STEINTHORSDDOTTIR V, STRINGHAM HM, WEEDON MN, WHEELER E, WOOD AR, FERREIRA T, WEYANT RJ, SEGRÈ AV, ESTRADA K, LIANG L, NEMESH J, PARK JH, GUSTAFSSON S, KILPELÄINEN TO, YANG J, BOUATIA-NAJI N, ESKO T, FEITOSA MF, KUTALIK Z, MANGINO M, RAYCHAUDHURI S, SCHERAG A, SMITH AV, WELCH R, ZHAO JH, ABEN KK, ABSHER DM, AMIN N, DIXON AL, FISHER E, GLAZER NL, GODDARD ME, HEARD-COSTA NL, HOESEL V, HOTTENGA JJ, JOHANSSON A, JOHNSON T, KETKAR S, LAMINA C, LI S, MOFFATT MF, MYERS RH, NARISU N, PERRY JR, PETERS MJ, PREUSS M, RIPATTI S, RIVADENEIRA F, SANDHOLT C, SCOTT LJ, TIMPSON NJ, TYRER JP, VAN WINGERDEN S, WATANABE RM, WHITE CC, WIKLUND F, BARLASSINA C, CHASMAN DI, COOPER MN, JANSSON JO, LAWRENCE RW, PELLIKKA N, PROKOPENKO I, SHI J, THIERING E, ALAVERE H, ALIBRANDI MT, ALMGREN P, ARNOLD AM, ASPELUND T, ATWOOD LD, BALKAU B, BALMFORTH AJ, BENNETT AJ, BEN-SHLOMO Y, BERGMAN RN, BERGMANN S, BIEBERMANN H, BLAKEMORE AI, BOES T, BONNYCASTLE LL, BORNSTEIN SR, BROWN MJ, BUCHANAN TA, BUSONERO F, CAMPBELL H, CAPPUCCIO FP, CAVALCANTI-PROENÇA C, CHEN YD, CHEN CM, CHINES PS, CLARKE R, COIN L, CONNELL J, DAY IN, DEN HEIJER M, DUAN J, EBRAHIM S, ELLIOTT P, ELOSUA R, EIRIKSDOTTIR G, ERDOS MR, ERIKSSON JG, FACHERIS MF, FELIX SB, FISCHER-POSOVSZKY P, FOLSOM AR, FRIEDRICH N, FREIMER NB, FU M, GAGET S, GEJMAN PV, GEUS EJ, GIEGER C, GJESING AP, GOEL A, GOYETTE P, GRALLERT H, GRÄSSLER J, GREENAWALT DM, GROVES CJ, GUDNASON V, GUIDUCCI C, HARTIKAINEN AL, HASSANALI N, HALL AS, HAVULINNA AS, HAYWARD C, HEATH AC, HENGSTENBERG C, HICKS AA, HINNEY A, HOFMAN A, HOMUTH G, HUI J, IGL W, IRIBARREN C, ISOMAA B, JACOBS KB, JARICK I, JEWELL E, JOHN U, JØRGENSEN T, JOUSILAHTI P, JULA A, KAAKINEN M, KAJANTIE E, KAPLAN LM, KATHIRESAN S, KETTUNEN J, KINNUNEN L, KNOWLES JW, KOLCIC I, KÖNIG IR, KOSKINEN S, KOVACS P, KUUSISTO J, KRAFT P, KVALØY K, LAITINEN J, LANTIERI O, LANZANI C, LAUNER LJ, LECOEUR C, LEHTIMÄKI T, LETTRE G, LIU J, LOKKI ML, LORENTZON M, LUBEN RN, LUDWIG B; MAGIC, MANUNTA P, MAREK D, MARRE M, MARTIN NG, MCARDLE WL, MCCARTHY A, MCKNIGHT B, MEITINGER T, MELANDER O, MEYRE D, MIDTHJELL K, MONTGOMERY GW, MORKEN MA, MORRIS AP,

MULIC R, NGWA JS, NELIS M, NEVILLE MJ, NYHOLT DR, O'DONNELL CJ, O'RAHILLY S, ONG KK, OOSTRA B, PARÉ G, PARKER AN, PEROLA M, PICHLER I, PIETILÄINEN KH, PLATOU CG, POLASEK O, POUTA A, RAFELT S, RAITAKARI O, RAYNER NW, RIDDERSTRÅLE M, RIEF W, RUOKONEN A, ROBERTSON NR, RZEHAK P, SALOMAA V, SANDERS AR, SANDHU MS, SANNA S, SARAMIES J, SAVOLAINEN MJ, SCHERAG S, SCHIPF S, SCHREIBER S, SCHUNKERT H, SILANDER K, SINISALO J, SISCOVICK DS, SMIT JH, SORANZO N, SOVIO U, STEPHENS J, SURAKKA I, SWIFT AJ, TAMMESOO ML, TARDIF JC, TEDER-LAVING M, TESLOVICH TM, THOMPSON JR, THOMSON B, TÖNJES A, TUOMI T, VAN MEURS JB, VAN OMMEN GJ, VATIN V, VIKARI J, VISVIKIS-SIEST S, VITART V, VOGEL CI, VOIGHT BF, WAITE LL, WALLASCHOFSKI H, WALTERS GB, WIDEN E, WIEGAND S, WILD SH, WILLEMSSEN G, WITTE DR, WITTEMAN JC, XU J, ZHANG Q, ZGAGA L, ZIEGLER A, ZITTING P, BEILBY JP, FAROOQI IS, HEBEBRAND J, HUIKURI HV, JAMES AL, KÄHÖNEN M, LEVINSON DF, MACCIARDI F, NIEMINEN MS, OHLSSON C, PALMER LJ, RIDKER PM, STUMVOLL M, BECKMANN JS, BOEING H, BOERWINKLE E, BOOMSMA DI, CAULFIELD MJ, CHANOCK SJ, COLLINS FS, CUPPLES LA, SMITH GD, ERDMANN J, FROGUEL P, GRÖNBERG H, GYLLENSTEN U, HALL P, HANSEN T, HARRIS TB, HATTERSLEY AT, HAYES RB, HEINRICH J, U FB, HVEEM K, ILLIG T, JARVELIN MR, KAPRIO J, KARPE F, KHAW KT, KIEMENEY LA, KRUDE H, LAAKSO M, LAWLOR DA, METSPALU A, MUNROE PB, OUWEHAND WH, PEDERSEN O, PENNINX BW, PETERS A, PRAMSTALLER PP, QUERTERMOUS T, REINEHR T, RISSANEN A, RUDAN I, SAMANI NJ, SCHWARZ PE, SHULDINER AR, SPECTOR TD, TUOMILEHTO J, UDA M, UITTERLINDEN A, VALLE TT, WABITSCH M, WAEBER G, WAREHAM NJ, WATKINS H; PROCARDIS CONSORTIUM, WILSON JF, WRIGHT AF, ZILLIKENS MC, CHATTERJEE N, MCCARROLL SA, PURCELL S, SCHADT EE, VISSCHER PM, ASSIMES TL, BORECKI IB, DELOUKAS P, FOX CS, GROOP LC, HARITUNIANS T, HUNTER DJ, KAPLAN RC, MOHLKE KL, O'CONNELL JR, PELTONEN L, SCHLESSINGER D, STRACHAN DP, VAN DUIJN CM, WICHMANN HE, FRAYLING TM, THORSTEINSDOTTIR U, ABECASIS GR, BARROSO I, BOEHNKE M, STEFANSSON K, NORTH KE, MCCARTHY MI, HIRSCHHORN JN, INGELSSON E, LOOS RJ. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet.* 2010; **42**(11): 937-48.

STIJNEN P, TUAND K, VARGA TV, FRANKS PW, AERTGEERTS B, CREEMERS JW. The association of common variants in PCSK1 with obesity: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2014; **180**(11): 1051-65.

STUNKARD AJ, FOCH TT, HRUBEC Z. A twin study of human obesity. *JAMA.* 1986; **256**(1): 51-4.

STUTZMANN F, VATIN V, CAUCHI S, MORANDI A, JOURET B, LANDT O, TOUNIAN P, LEVY-MARCHAL C, BUZZETTI R, PINELLI L, BALKAU B, HORBER F, BOUGNÈRES P, FROGUEL P, MEYRE D. Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene. *Hum Mol Genet.* 2007; **16**(15): 1837-44.

TALEBPOUR M, AMOLI BS. Laparoscopic total gastric vertical plication in morbid obesity. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2007; **17**(6): 793-8.

TANG-CHRISTENSEN M, VRANG N, LARSEN PJ. Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; **25**(5): 42-7.

TAO YX. The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocr Rev.* 2010; **31**(4): 506-43.

THALER JP, CUMMINGS DE. Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology.* 2009; **150**(6): 2518-25.

THORLEIFSSON G, WALTERS GB, GUDBJARTSSON DF, STEINTHORSDOTTIR V, SULEM P, HELGADOTTIR A, STYRKARSDOTTIR U, GRETARSDOTTIR S, THORLACIUS S, JONSDOTTIR I, JONSDOTTIR T, OLAFSDOTTIR EJ, OLAFSDOTTIR GH, JONSSON T, JONSSON F, BORCH-JOHNSEN K, HANSEN T, ANDERSEN G, JORGENSEN T, LAURITZEN T, ABEN KK, VERBEEK AL, ROELEVELD N, KAMPMAN E, YANEK LR, BECKER LC, TRYGGVADOTTIR L, RAFNAR T, BECKER DM, GULCHER J, KIEMENEY LA, PEDERSEN O, KONG A, THORSTEINSDOTTIR U, STEFANSSON K. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet.* 2009; **41**(1): 18-24.

TIMPSON NJ, EMMETT PM, FRAYLING TM, ROGERS I, HATTERSLEY AT, MCCARTHY MI, DAVEY SMITH G. The fat mass- and obesity-associated locus and dietary intake in children. *Am J Clin Nutr.* 2008; **88**(4): 971-8.

TSCHÖP M, WEYER C, TATARANNI PA, DEVANARAYAN V, RAVUSSIN E, HEIMAN ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes.* 2001; **50**(4): 707-9.

TSCHRITTER O, PREISSL H, YOKOYAMA Y, MACHICAO F, HÄRING HU, FRITSCHÉ A. Variation in the FTO gene locus is associated with cerebrocortical insulin resistance in humans. *Diabetologia.* 2007; **50**(12): 2602-3.

TSUKADA S, TANAKA Y, MAEGAWA H, KASHIWAGI A, KAWAMORI R, MAEDA S. Intronic polymorphisms within TFAP2B regulate transcriptional activity and

affect adipocytokine gene expression in differentiated adipocytes. *Mol Endocrinol*. 2006; **20**(5): 1104-11.

TUNG YC, AYUSO E, SHAN X, BOSCH F, O'RAHILLY S, COLL AP, YEO GS. Hypothalamic-specific manipulation of Fto, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats. *PLoS One*. 2010; **5**(1): e8771.

VAISSE C, CLEMENT K, GUY-GRAND B, FROGUEL P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet*. 1998; **20**(2): 113-4.

VALLI-JAAKOLA K, LIPSANEN-NYMAN M, OKSANEN L, HOLLENBERG AN, KONTULA K, BJØRBAEK C, SCHALIN-JÄNTTI C. Identification and characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in morbidly obese finnish children and adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; **89**(2): 940-5.

VAN VLIET-OSTAPTCHOUK JV, SNIEDER H, LAGOU V. Gene-Lifestyle Interactions in Obesity. *Curr Nutr Rep*. 2012; **1**(3): 184-196.

VCELAK J, LUKASOVA P, VANKOVA M, VEJRAZKOVA D, KVASNICKOVA H, VRBIKOVA J, VONDRA K, BENDLOVA B. FTO gene is associated not only with obesity-related quantitative traits but also with higher OGTT stimulated glycaemia and leptin levels. *Diabetologia*. 2008; **51**(1): 326.

VERDICH C, TOUBRO S, BUEMANN B, LYSGÅRD MADSEN J, JUUL HOLST J, ASTRUP A. The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety--effect of obesity and weight reduction. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001; **25**(8): 1206-14.

VOGEL CI, BOES T, REINEHR T, ROTH CL, SCHERAG S, SCHERAG A, HEBEBRAND J, HINNEY A. Common variants near MC4R: exploring gender effects in overweight and obese children and adolescents participating in a lifestyle intervention. *Obes Facts*. 2011; **4**(1): 67-75.

VON LENGERKE T. Public health is an interdiscipline, and about wholes and parts: indeed, critical health psychology needs to join forces. *J Health Psychol*. 2006; **11**(3): 395-9.

WÅHLÉN K, SJÖLIN E, HOFFSTEDT J. The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res*. 2008; **49**(3): 607-11.

WANG D, MA J, ZHANG S, HINNEY A, HEBEBRAND J, WANG Y, WANG HJ. Association of the MC4R V103I polymorphism with obesity: a Chinese case-control study and meta-analysis in 55,195 individuals. *Obesity (Silver Spring)*. 2010; **18**(3): 573-9.

WEINERT LS. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy: comment to the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. *Diabetes Care*. 2010; **33**(7): e97

WHITAKER RC, WRIGHT JA, PEPE MS, SEIDEL KD, DIETZ WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med*. 1997; **337**(13): 869-73.

WILLER CJ, SPELIOTES EK, LOOS RJ, LI S, LINDGREN CM, HEID IM, BERNDT SI, ELLIOTT AL, JACKSON AU, LAMINA C, LETTRE G, LIM N, LYON HN, MCCARROLL SA, PAPADAKIS K, QI L, RANDALL JC, ROCCASECCA RM, SANNA S, SCHEET P, WEEDON MN, WHEELER E, ZHAO JH, JACOBS LC, PROKOPENKO I, SORANZO N, TANAKA T, TIMPSON NJ, ALMGREN P, BENNETT A, BERGMAN RN, BINGHAM SA, BONNYCASTLE LL, BROWN M, BURTT NP, CHINES P, COIN L, COLLINS FS, CONNELL JM, COOPER C, SMITH GD, DENNISON EM, DEODHAR P, ELLIOTT P, ERDOS MR, ESTRADA K, EVANS DM, GIANNINY L, GIEGER C, GILLSON CJ, GUIDUCCI C, HACKETT R, HADLEY D, HALL AS, HAVULINNA AS, HEBEBRAND J, HOFMAN A, ISOMAA B, JACOBS KB, JOHNSON T, JOUSILAHTI P, JOVANOVIC Z, KHAW KT, KRAFT P, KUOKKANEN M, KUUSISTO J, LAITINEN J, LAKATTA EG, LUAN J, LUBEN RN, MANGINO M, MCARDLE WL, MEITINGER T, MULAS A, MUNROE PB, NARISU N, NESS AR, NORTHSTONE K, O'RAHILLY S, PURMANN C, REES MG, RIDDERSTRÅLE M, RING SM, RIVADENEIRA F, RUOKONEN A, SANDHU MS, SARAMIES J, SCOTT LJ, SCUTERI A, SILANDER K, SIMS MA, SONG K, STEPHENS J, STEVENS S, STRINGHAM HM, TUNG YC, VALLE TT, VAN DUJN CM, VIMALESWARAN KS, VOLLENWEIDER P, WAEBER G, WALLACE C, WATANABE RM, WATERWORTH DM, WATKINS N; WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM, WITTEMAN JC, ZEGGINI E, ZHAI G, ZILLIKENS MC, ALTSHULER D, CAULFIELD MJ, CHANOCK SJ, FAROOQI IS, FERRUCCI L, GURALNIK JM, HATTERSLEY AT, HU FB, JARVELIN MR, LAAKSO M, MOOSER V, ONG KK, OUWEHAND WH, SALOMAA V, SAMANI NJ, SPECTOR TD, TUOMI T, TUOMILEHTO J, UDA M, UITTERLINDEN AG, WAREHAM NJ, DELOUKAS P, FRAYLING TM, GROOP LC, HAYES RB, HUNTER DJ, MOHLKE KL, PELTONEN L, SCHLESSINGER D, STRACHAN DP, WICHMANN HE, MCCARTHY MI, BOEHNKE M, BARROSO I, ABECASIS GR, HIRSCHHORN JN; Genetic Investigation of ANthropometric Traits Consortium. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet*. 2009; **41**(1): 25-34.

WING RR, PHELAN S. Long-term weight loss maintenance. *Am J Clin Nutr*. 2005; **82**(1): 222-225.

WREN AM, SEAL LJ, COHEN MA, BRYNES AE, FROST GS, MURPHY KG, DHILLO WS, GHATEI MA, BLOOM SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; **86**(12): 5992.

YAMANAKA M, ITAKURA Y, INOUE T, TSUCHIDA A, NAKAGAWA T, NOGUCHI H, TAJI M. Protective effect of brain-derived neurotrophic factor on pancreatic islets in obese diabetic mice. *Metabolism.* 2006; **55**(10): 1286-92.

YANG H, LI Y, CHENG L, HE JS. Effect of electroacupuncture and diet adjusting on insulin resistance in rats with nutrition obesity. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2007; **5**(5): 546-9.

YANG YK, FONG TM, DICKINSON CJ, MAO C, LI JY, TOTA MR, MOSLEY R, VAN DER PLOEG LH, GANTZ I. Molecular determinants of ligand binding to the human melanocortin-4 receptor. *Biochemistry.* 2000; **39**(48): 14900-11.

YEO GS, FAROOQI IS, AMINIAN S, HALSALL DJ, STANHOPE RG, O'RAHILLY S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet.* 1998; **20**(2): 111-2.

ZARELLI, V. E., DAWID, I. B. Inhibition of neural crest formation by Kctd15 involves regulation of transcription factor AP-2. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2013; **110**(8): 2870-75.

ZHANG JV, REN P-G, AVSIAN-KRETCHMER O, LUO C-W, RAUCH R, KLEIN C, HSUEH AJW. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science.* 2005; **310**(11): 996-999.

ZIMMET P, ALBERTI KG, KAUFMAN F, TAJIMA N, SILINK M, ARSLANIAN S, WONG G, BENNETT P, SHAW J, CAPRIO S; IDF CONSENSUS GROUP. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes.* 2007; **8**(5): 299-306.

ZOBEL DP, ANDREASEN CH, GRARUP N, EIBERG H, SØRENSEN TI, SANDBAEK A, LAURITZEN T, BORCH-JOHNSEN K, JØRGENSEN T, PEDERSEN O, HANSEN T. Variants near MC4R are associated with obesity and influence obesity-related quantitative traits in a population of middle-aged people: studies of 14,940 Danes. *Diabetes.* 2009; **58**(3): 757-64.

ZUCCATO C, CIAMMOLA A, RIGAMONTI D, LEAVITT BR, GOFFREDO D, CONTI L, MACDONALD ME, FRIEDLANDER RM, SILANI V, HAYDEN MR, TIMMUSK T, SIPPIONE S, CATTANEO E. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science.* 2001; **293**(20): 493-498.