

Endokrinologický ústav
Centrum pro diagnostiku a léčbu obezity

1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

OBEZITA A ENERGETICKÝ METABOLISMUS

MUDr. Radka Braunerová

Doktorská dizertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního studia biomedicíny, oboru fyziologie a patofyziologie člověka, na Endokrinologickém ústavu, III. interní klinice 1. LF UK a VFN, a Fyziologickém ústavu AV ČR v Praze.

Praha 2006

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji všem, kteří mi pomáhali během mé práce, zejména

- svému školiteli, doc. MUDr. Vojtěchu Hainerovi, CSc., za odborné vedení a pomoc během celého mého postgraduálního studia,
- doc. MUDr. Marii Kunešové, CSc. za spolupráci a cenné rady,
- MUDr. Janu Kopeckému, DrSc. za umožnění práce na Oddělení biologie tukové tkáně Fyziologického ústavu AVČR a odborné vedení,
- všem svým spolupracovníkům z Centra pro diagnostiku a léčbu obezity, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout,
- a své rodině, především manželovi a rodičům, za podporu během studia a ochotnou pomoc v péči o Anežku při psaní dizertační práce.

Tato dizertační práce je založena na následujících publikacích:

1. Hainer, V., Kunešová, M., Stunkard, A.J., Pařízková, J., Štich, V., Mikulová, R., and Stárka, L. (2001) The within-pair resemblance in serum levels of androgens, sex hormone-binding globulin and cortisol in female obese identical twins - effect of negative energy balance induced by very low calorie diet. *Horm. Metab. Res.* 33, 417-422
2. Hainer, V., Kunešová, M., Pařízková, J., Štich, V., Mikulová, R., and Slabá, Š. (2000) Respiratory quotient in obesity: Its association with an ability to retain weight loss and with parental obesity. *Sb. Lek.* 101, 99-104
3. Šponarová, J., Mustard, K.J., Horáková, O., Flachs, P., Rossmeisl, M., Brauner, P., Bardová, K., Thomason-Hughes, M., Braunerová, R., Janovská, P., Hardie, D.G., and Kopecký, J. (2005) Involvement of AMP-activated protein kinase in fat depot-specific metabolic changes during starvation. *FEBS Lett.* 579, 6105-6110
4. Kunešová, M., Braunerová, R., Hlavatý, P., Tvrzická, E., Staňková, B., Škrha, J., Hilgertová, J., Hill, M., Kopecký, J., Wagenknecht, M., Hainer, V., Matoulek, M., Pařízková, J., Žák, A., and Svačina, Š. (2005) The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet (VLCD) during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. *Physiol. Res.* in press
5. Mikulová-Braunerová, R., Hainer, V., Kunešová, M., Pařízková, J., Slabá, Š, and Wagenknecht, M. (2003) Influence of vitamin A consumption on resting metabolic rate and fasting respiratory quotient in severely obese subjects. *Med. Princ. Pract.* 12, 189-192
6. Hainer, V., Kunešová, M., Bellisle, F., Hill, M., Braunerová, R., Wagenknecht, M., and STO Study Group (2005) Psychobehavioral and nutritional predictors of weight loss in obese women treated with sibutramine. *Int. J. Obes. (Lond)* 29, 208-216

Dále byly do této práce zahrnuty výsledky ze dvou projektů, které byly prezentovány ve formě posterů na konferencích: 12th European Congress on Obesity, 2003, Helsinky a 13th European Congress on Obesity, 2004, Praha.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	6
1. Literární přehled	8
1.1. Vliv genetických faktorů na vznik obezity	8
1.2. Regulace energetické rovnováhy	10
1.3. Energetický výdej	11
1.3.1. Klidový energetický výdej	12
1.3.2. Výdej energie spojený s fyzickou aktivitou	14
1.3.3. Postprandiální výdej energie	15
1.3.4. Chladem aktivovaný výdej energie	16
1.3.5. Uncoupling proteiny	18
1.3.5.1. Uncoupling protein 1	19
1.3.5.2. Uncoupling protein 2	20
1.3.5.3. Uncoupling protein 3	25
1.4. Energetický příjem	26
1.4.1. Polynenasycené mastné kyseliny	27
1.4.2. Vápník	28
1.4.3. Retinoidy	32
2. Cíle práce	36
3. Výsledky předložených prací	37
3.1. Vliv dědičnosti na hladiny steroidních hormonů v séru – efekt negativní energetické bilance u obézních jednovaječných dvojčat	37
3.2. Respirační kvocient u obézních: souvislost se schopností udržet hmotnostní pokles a s výskytem obezity u rodičů	38
3.3. Role AMP-aktivované proteinové kinázy v rozdílné metabolické odpovědi epidydimální a dorsolumbální tukové tkáně na hladovění	39
3.4. Vliv n-3 polynenasycených mastných kyselin a velmi přísné nízkoenergetické diety na snížení hmotnosti a složení mastných kyselin v séru u obézních žen	41
3.5. Vliv vitamínu A na klidový energetický výdej a respirační kvocient u obézních pacientů	43

3.6.	Vliv vitamínu A na klidový energetický výdej a expresi UCP2 a FAS	44
3.7.	Vliv příjmu vápníku a makronutrientů na hmotnost obézních pacientů	48
3.8.	Psychobehaviorální a nutriční faktory ovlivňující snížení hmotnosti u obézních žen léčených sibutraminem.....	50
4.	Závěry.....	52
5.	Diskuse	54
6.	Literatura.....	58

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-dihydroxycholecalciferol
AA	kyselina arachidonová
ACE	enzym konvertující angiotenzin
ADH	antidiuretický hormon
PAEE	výdej energie spojený s fyzickou aktivitou (physical activity-induced energy expenditure)
AMPK	AMP-aktivovaná proteinová kináza
aP2	lipid-binding protein
BAT	hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue)
BDI	Dotazník skóre deprese dle Becka (Beck Depression Inventory)
BMCP1	brain mitochondrial carrier protein 1 (= UCP5)
BMI	body mass index
BMR	bazální metabolický obrat (basal metabolic rate)
CE	estery cholesterolu
CRBP	buněčný vazebný protein pro retinol (cellular retinol-binding protein)
CRH	kortikoliberin (corticotropin releasing hormone)
DEE, též DIT	postprandiální termogeneze (diet-induced energy expenditure, diet-induced thermogenesis)
DHA	kyselina dokosaheptaenová (docosahexaenoic acid)
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEA-S	dehydroepiandrosteronsulfát
DNP	2,4-dinitrofenol
EPA	kyselina eikosapentaenová (eicosapentaenoic acid)
FAS	syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)
FFA	volné mastné kyseliny (free fatty acids)
FFM	beztuková tělesná hmota (fat free mass)
GLUT	glukózový přenašeč (glucose transporter)
HPLC	vysokotlaká kapalinná chromatografie (high performance liquid chromatography)
MCR	receptor pro melanokortin
NRF	jaderný respirační faktor (nuclear respiratory factor)
nVDR	jaderný receptor pro vitamin D

PG	prostaglandiny
PGC	koaktivátor receptoru PPAR γ (PPAR gamma coactivator)
PL	fosfolipidy
POMC	pro-opiomelanokortin
PPAR	receptor aktivovaný peroxisomálními proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptor)
PTH	parathormon
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
RA	kyselina retinová (retinoic acid)
RAR	receptor pro kyselinu retinovou (retinoic acid receptor)
RBP	vazebný protein pro retinol (retinol-binding protein)
REE	klidový energetický výdej (resting energy expenditure)
RMR	klidový metabolický obrat (resting metabolic rate)
RQ	respirační kvocient
RXR	receptor pro retinoidy (retinoid-X receptor)
SHBG	globulin vázající pohlavní hormony (sex hormone-binding globulin)
SNS	sympatický nervový systém
TEE	celkový energetický výdej (total energy expenditure)
TFEQ, též EI	Třísložkový dotazník jídelních zvyklostí (Three Factor Eating Questionnaire či Eating Inventory)
TG	triglyceridy
TNF	tumour necrosis factor
UCP	rozpřahující, též odpřahující protein (uncoupling protein)
VLCD	velmi přísná nízkoenergetická (nízkokalorická) dieta (very low calorie diet)
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins)
WAT	bílá tuková tkáň (white adipose tissue)

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Obezita je nejrozšířenější metabolickou chorobou současnosti. Její výskyt stále roste a zejména v posledních letech se hovoří dokonce o celosvětové epidemii [1]. V evropských zemích se prevalence obezity (BMI > 30) pohybuje mezi 10-40%. Ani Česká republika nezůstává pozadu, a to i přes pokles energetického příjmu, který byl pozorován začátkem devadesátých let.

Příčinou obezity je pozitivní energetická bilance, tedy stav, kdy příjem energie převyšuje její výdej. Obě tyto složky jsou ovlivňovány jak zevními, tak vnitřními (zejména genetickými) faktory. Mluvíme proto o multifaktoriální etiopatogenezi obezity. Za příčinu pozitivní energetické bilance je považováno jak snížení pohybové aktivity spojené se změnou životního stylu tak zvýšená konzumace energeticky denzních potravin. Obezita se stává problémem i v oblastech, kde se v minulosti téměř nevyskytovala, a to zejména v souvislosti s přejímáním konzumního způsobu života. Paradoxně roste také v zemích, kde řada lidí trpí podvýživou, jako např. v Indii.

Obezita zvyšuje morbiditu i mortalitu a je doprovázena řadou zdravotních komplikací (zejména metabolických, endokrinních, kardiovaskulárních, respiračních, onkologických a ortopedických, ale také kožních či psychosociálních). Jako nejrizikovější se jeví těžká obezita v mladém a středním věku. S rostoucím BMI se zvyšuje úmrtnost zejména díky diabetu, kardiovaskulárním onemocněním a některým nádorům. Obézní mají také horší kvalitu života, a to jak z pohledu fyzického, tak psychického.

1.1. Vliv genetických faktorů na vznik obezity

V lidském organismu existují regulační mechanismy zajišťující stálou tělesnou hmotnost, které jsou ale účinnější v obraně před energetickým deficitem než před nadbytkem energie a vzestupem hmotnosti. Jsou výsledkem fylogeneze z dob dávno minulých, kdy se obezita vyskytovala zřídka a naopak bylo třeba snížit nároky organismu během období hladu (uvažuje se o selekci populace s úspornými, tzv. *thrifty* geny, která je nyní náchylná k obezitě). Tyto mechanismy jsou schopné zvládnout pouze krátkodobou pozitivní energetickou bilanci a v případě dlouhodobého nadbytečného příjmu energie selhávají, a to i u jedinců bez genetické predispozice ke vzniku obezity.

V současnosti se odhaduje, že se genetické faktory podílejí na rozvoji obezity ze

40-70% [2]. Mají vliv nejen na tělesnou hmotnost, ale také na distribuci tukových dep, která je důležitým rizikovým faktorem pro vznik druhotných zdravotních komplikací (např. nadbytek viscerálního tuku představuje vyšší zdravotní riziko než nadbytek tuku gluteálního). Zpravidla se nejedná o poruchy (mutace) v pravém slova smyslu, ale o nastavení exprese celé skupiny nebo skupin genů na hladinu, která preferuje ukládání energie před „zbytečným plýtváním“ a zajišťuje úsporné hospodaření s energetickými rezervami. Případy, kdy je příčinou obezity mutace jediného genu (monogenní porucha), jsou velmi řídké. Přesto bylo během posledních let několik takových genů identifikováno. Pravděpodobně nejznámější je kongenitální deficit leptinu, nejčastější monogenní formou lidské obezity je však mutace genu pro melanokortinový receptor 4 (MC4-R). Dále se jedná např. o gen pro leptinový receptor, pro-opiomelanokortin (POMC) a receptor pro melanokortin 3 (MC3-R) [3]. Případy, kdy je obezita způsobena interakcemi více genů, se označují jako oligogenní či polygenní. Kandidátních genů je celá řada, v roce 2004 to bylo již přes 600 genů, markerů a chromozomálních oblastí, u kterých se předpokládá spojitost s obezitou [4]. Geneticky determinovány jsou jak faktory související s příjmem a zpracováním základních živin (mimo jiné regulace příjmu potravy, preference potravin, respirační kvocient), tak faktory týkající se energetického výdeje (klidový energetický výdej, postprandiální energetický výdej a spontánní pohybová aktivita) [5]. Vliv dědičnosti na RQ jsme ověřovali i na našem pracovišti – viz kapitola 3.2.

Jako model pro studium vlivu genetických faktorů na rozvoj obezity dobře slouží dvojčata. Byly to právě srovnávací studie jednovaječných a dvojvaječných dvojčat, které upozornily na význam dědičnosti v etiopatogenezi obezity. Například studie sledující vývoj obezity u monozygotních dvojčat potvrdily vysokou korelaci BMI dvojčat bez ohledu na to, zda žila od narození společně či v rozdílném prostředí [6]. Vliv dědičnosti je patrný též na změnách tělesné hmotnosti, a to jak při jejím zvyšování, tak snižování. V Bouchardově intervenční studii u jednovaječných normostenických dvojčat byl sledován vliv zvýšení energetického příjmu (o cca 1000 kcal/den) na tělesnou hmotnost. Po 84 dnech došlo k průměrnému zvýšení hmotnosti o 8,1 kg. Mezi páry byly pozorovány značné rozdíly, ale přírůstky hmotnosti uvnitř párů byly velmi podobné. Zvýšení množství tukové hmoty korelovalo dokonce ještě těsněji [7]. Další práce zjišťovala odpověď na negativní energetickou bilanci (způsobenou zvýšenou fyzickou aktivitou). Studie se zúčastnila monozygotní dvojčata mužského pohlaví s nadváhou (průměrný BMI 27,1). I v tomto případě vykazoval hmotnostní pokles významnou genetickou determinaci [8].

Na našem pracovišti probíhala podobná studie u monozygotních dvojčat, sledující vliv negativní energetické bilance na tělesnou hmotnost. V tomto případě ovšem bylo negativní energetické bilance dosaženo redukčním režimem s velmi přísnou nízkenergetickou dietou (VLCD, z angl. very low calorie diet). Čtrnáct párů obézních jednovaječných dvojčat ženského pohlaví (věk $39,0 \pm 1,7$ let, BMI $34,2 \pm 7,8$ kg/m²) bylo hospitalizováno na metabolické jednotce po dobu 40 dnů. VLCD o energetickém obsahu 1600 kJ/den vedla k poklesu hmotnosti o $8,8 \pm 1,9$ kg a ke snížení tukové hmoty o $6,5 \pm 2,3$ kg. I zde byly velké individuální rozdíly (úbytek hmotnosti se pohyboval od 5,9 do 12,4 kg), nicméně uvnitř párů dvojčat pokles hmotnosti významně koreloval. Podobnost redukce hmotnosti uvnitř párů byla 12x větší než mezi páry, v případě redukce tukové hmoty dokonce 17x [9]. V rámci této dizertační práce jsme navázali na tuto studii – viz kapitola 3.1.

Co se týče vlivu genetických faktorů na distribuci tukové tkáně, podle Boucharda [10] jsou geny zodpovědné za 51% podíl při určování množství abdominálního tuku (měřeného pomocí počítačové tomografie). Ukazuje se, že u žen je efekt genotypu větší než u mužů - například obvod pasu (jakožto antropometrický ukazatel abdominální tukové tkáně) je u mužů geneticky determinován ze 46%, zatímco u žen ze 66%.

S distribucí tukové tkáně úzce souvisí hladina steroidních hormonů. Bylo prokázáno, že kortizol a androgeny se účastní regulace rozložení tukové tkáně u žen [11]. Příznivé změny v rozložení tukové tkáně vyvolané redukčním režimem by mohly být částečně zprostředkovány změnami v jejich sekreci. Krotkiewski [12] našel zvýšení plazmatické hladiny testosteronu v důsledku negativní energetické bilance při VLCD; Pritchard [13] pozoroval stejný efekt při energetickém deficitu způsobeném zvýšením pohybové aktivity. Byly však publikovány také studie, které demonstrují snížení hladiny androgenů či žádný efekt na jejich hladinu po redukci hmotnosti [14; 15]. Jak bazální plazmatické hladiny androgenů i kortikosteroidů tak diurnální sekrece kortizolu či reakce na psychologický stres jsou významně ovlivněny genetickými faktory [13; 16–19].

1.2. Regulace energetické rovnováhy

Jak již bylo zmíněno výše, v lidském organismu existují mechanismy schopné zvládnout krátkodobé výkyvy v příjmu a výdeji energie. Ty však v případě dlouhodobé pozitivní energetické bilance selhávají a dochází k nárůstu tělesné hmotnosti. Existují sice

jedinci, kteří jsou schopní udržet si stálou hmotnost i po dobu 40 let, ačkoli snědli teoreticky až 20 tun potravy navíc, většina lidí však v případě dlouhodobého „přejídání“ tloustne. Existenci mechanismů regulujících energetickou rovnováhu potvrzují např. experimenty s omezením potravy u laboratorních krys. Při krátkodobé restrikci dochází k poklesu hmotnosti, ten je ale rychle vykompenzován a hmotnost se zase vrací k normálu. Dlouhodobá restrikce ovšem už může vést k trvalému snížení tělesné váhy [20].

Regulace energetické rovnováhy je složitý proces, na kterém se podílí řada faktorů. Centrální úlohu má hypothalamus. Centrum hladu se nachází v laterálním hypothalamu, centrum sytosti ve ventromediálním hypothalamu. Kromě neurohumorálních signálů se na regulaci energetické rovnováhy podílejí také signály ze zažívacího traktu, ať už mechanické, dané rozepětím trávicího traktu, či nutriční, dané složením potravy. Nezanedbatelnou úlohu hrají také signály termogenní, které upozorňují na změny vnější i vnitřní teploty. Z množství neurohumorálních faktorů jmenujme pro ilustraci alespoň leptin a insulin. Jejich koncentrace v krvi odpovídá množství tělesného tuku a charakteru energetické bilance. Oba v hypothalamu potlačují anabolické okruhy, které stimulují příjem potravy a inhibují výdej energie, a zároveň aktivují katabolické okruhy inhibující příjem potravy a zvyšující energetický výdej. Snížení hladin těchto hormonů v mozku během hubnutí vede ke zvýšenému příjmu potravy a snížení energetického výdeje, po požití jídla dochází k opačnému jevu [21].

1.3. Energetický výdej

Celkový energetický výdej (TEE, z angl. total energy expenditure) je tvořen několika složkami:

- klidovým energetickým výdejem
- energetickým výdejem spojeným s fyzickou aktivitou – spontánní a vědomou
- energetickým výdejem spojeným s mentální aktivitou a stresem
- adaptivní termogenezi (chladem aktivovanou a postprandiální)
- eventuelně energetický výdej spojený s požitím kofeinu či s kouřením

Na úrovni tkáňové a buněčné se jedná o metabolickou tvorbu tepla (zahrnuje indukovatelnou netřesovou termogenezi), svalovou práci a svalový třes (třesovou termogenezi).

Pro měření celkového energetického výdeje je možné použít techniku *měření „dvojitě značenou vodou“*, založenou na rozdílu mezi obratem $^2\text{H}_2\text{O}$ a H_2^{18}O v tělesné vodě. Po nastolení rovnováhy je izotop ^{18}O vylučován z těla rychleji - ve formě jak H_2^{18}O tak CO^{18}O , zatímco ^2H pouze ve formě $^2\text{H}_2\text{O}$. Rozdíl určuje produkci CO_2 . Ta se stanovuje 2-3 týdny po aplikaci „dvojitě značené vody“. Výhodou této metody je přesnost, nevýhodou finanční nákladnost a obtížná dostupnost. TEE lze měřit také v metabolické komoře pomocí přímé nebo nepřímé kalorimetrie (viz dále), ale zde je narušena běžná denní aktivita vyšetřovaného.

1.3.1. Klidový energetický výdej

Klidový energetický výdej (REE, z angl. resting energy expenditure, často označovaný také jako RMR, z angl. resting metabolic rate) se podílí na celkovém energetickém výdeji z 55-70% [5] a označuje výdej energie nutný k zajištění normálních tělesných funkcí a homeostázy v klidu, nalačno a při termoneutrální teplotě. Pokud je splněna podmínka postabsorpčního stavu, je RMR považován za ekvivalent bazálního metabolického obratu (BMR, z angl. basal metabolic rate) [22].

Na molekulární úrovni jde jen zhruba 10% z RMR na vrub spotřeby kyslíku mimo mitochondrie (např. oxidace mastných kyselin v peroxisomech), vše ostatní se odehrává v mitochondriích. Většina procesů v lidském těle vyžaduje kontinuální přívod energie ve formě ATP. ATP vzniká zejména při oxidaci substrátů procesem zvaným oxidační fosforylace, který představuje 70-80% RMR. Nejvíce ATP se spotřebuje na fungování Na^+/K^+ -ATPázy, na syntézu proteinů, glukoneogenezi a na svalovou kontrakci. Zbývajících 10-20% RMR odpovídá „nedokonalé“ konverzi energie na vnitřní mitochondriální membráně [23], kterou ovlivňují mimo jiné i tzv. „uncoupling“ proteiny (někteří autoři překládají jako odpráhující či rozpřáhující proteiny, ale anglický název v odborné literatuře převažuje). Bylo prokázáno, že při dlouhodobém působení může i drobný posun v energetické účinnosti o 1-2% ovlivnit celkovou energetickou bilanci a tím i tělesnou hmotnost.

Na orgánové úrovni největší podíl celotělového RMR (cca 58%) pochází z orgánů s vysokou metabolickou aktivitou jako jsou játra, ledviny, mozek a srdce, ačkoliv představují pouze malou část celkové tělesné hmoty (dohromady přibližně 5%) [22]. Při přepočtu na jednotku hmotnosti mají ledviny a srdce metabolický obrat zhruba 2x větší než

játra a mozek, a 35x větší než kosterní sval. Přesto kosterní svaly, kterých je cca 28 kg (u průměrného 70kg vážícího muže; 40% tělesné hmotnosti), přispívají do celotělového RMR přibližně 22%. S věkem se množství svalové hmoty mění a proto ani RMR na jednotku hmotnosti není v průběhu života konstantní [24]. Tuková tkáň jakožto tkáň s nejmenší metabolickou aktivitou na jednotku hmotnosti se na RMR u neobézních jedinců podílí pouhými 4%. Toto číslo ale může u obézních vzrůst na 10% i více. Za zbývajících 16% celotělového RMR odpovídají kůže, střeva, kosti a plíce.

Na RMR má vliv tělesné složení. Za nejvýznamnější faktor určující variabilitu RMR mezi jedinci je považována beztuková tělesná hmota (FFM, z angl. fat free mass). U obézních se zvyšuje především množství tuku, zároveň ale také mírně stoupá FFM. Obě tyto složky mají za následek vyšší absolutní RMR u obézních jedinců.

Dalšími faktory ovlivňujícími RMR jsou např. pohlaví, věk či některé hormony. Bylo prokázáno, že ženy mají RMR nižší než muži o 3-10%, a to i po adjustaci na FFM, tukovou hmotu a věk [25]. Také stárnutí vede k poklesu energetického výdeje (ve srovnání s mladými jedinci až o 13%), a to i po adjustaci na FFM [26]. Důvod tohoto poklesu dodnes není uspokojivě vysvětlen. Co se týče hormonů, na RMR mají vliv především katecholaminy (cestou sympatického nervového systému – viz dále), růstový hormon a thyroideální hormony. Zvýšení RMR u pacientů s hyperthyreózou může dosáhnout až 180% standardní referenční hodnoty [22].

Klidový energetický výdej organismu lze měřit přímo jako produkci tepla (přímá kalorimetrie) nebo nepřímo jako množství spotřebovaného kyslíku (nepřímá kalorimetrie).

Přímá kalorimetrie spočívá v měření ztrát tepla. Používá se zejména pro studie posuzující termoregulační odpovědi organismu.. Za různých okolností se však produkce tepla od tepelných ztrát liší. Např. po podání potravy začíná produkce tepla stoupat za 20-30 min po začátku jídla, zatímco ztráty tepla se zvyšují až později. Důsledkem tohoto zpoždění je zvýšení tělesné teploty.

Pojem *nepřímá kalorimetrie* pramení z faktu, že teplo uvolněné při chemických procesech v organismu může být nepřímo vypočteno ze spotřeby kyslíku. Tuto metodu lze použít jak pro stanovení klidového energetického výdeje, tak pro stanovení postprandiální termogeneze a energetického výdeje spojeného s fyzickou aktivitou. Provádí se u ležícího či sedícího pacienta pomocí ventilovaného poklopu, který pokrývá hlavu a horní část hrudníku, obličejové masky nebo náústku. Jinou možností je metabolická komora, tj. izolovaná místnost s konstantním příívodem čistého vzduchu. Při určování RMR by měření

mělo probíhat po celonočním hladovění a klidu na lůžku, v klidném, termoneutrálním prostředí. Pacient by neměl být v psychickém stresu. Vyšetření trvá minimálně 20 min, výsledky z prvních 5-10 min se obvykle nehodnotí. Výhodou nepřímé kalorimetrie je bezprostřední odpověď měřené spotřeby kyslíku na reálnou spotřebu kyslíku ve tkáních. Ke zpoždění nedochází, neboť zásoby kyslíku v organismu jsou minimální. Další předností této metody je možnost určit míru oxidace jednotlivých živin. Poměr vydechovaného CO₂ a vdechovaného O₂ se označuje jako respirační kvocient (RQ). Jednotlivé substráty mají odlišný RQ: sacharidy 1,0, tuky 0,710, bílkoviny 0,835, alkohol 0,667. Z toho vyplývá, že pokud jsou oxidovány převážně sacharidy, blíží se RQ 1,0, pokud jsou oxidovány zejména tuky, blíží se 0,7. Oxidaci bílkovin lze stanovit pomocí exkrece dusíku močí. Vysoký respirační kvocient (vyjadřující zhoršenou schopnost spalovat tuky) se jeví jako rizikový faktor pro zvyšování hmotnosti u obézních a postobézních osob [27]. Vztah RQ ke schopnosti udržet redukci hmotnosti jsme sledovali v naší studii – viz kapitola 3.2. Za rovnovážných podmínek u jedince v klidu a nalačno odpovídá produkce tepla měřená nepřímou kalorimetrií ztrátám tepla měřeným přímou kalorimetrií.

Ačkoliv se klidový energetický výdej měří nalačno, může se složení stravy z předešlých dní promítnout do výsledků měření. Např. množství sacharidů v dietě při stejném energetickém obsahu ovlivní RQ. Krátkodobé přejídání zvyšuje jak RQ, tak RMR, velikost tohoto zvýšení závisí na délce přejídání [22].

1.3.2. Výdej energie spojený s fyzickou aktivitou

Výdej energie spojený s fyzickou aktivitou (PAEE, z angl. physical activity-induced energy expenditure) tvoří při současném převážně sedavém stylu života přibližně 20-40% TEE, i když v extrémních situacích může představovat až 75%. Jeho velikost závisí na druhu pohybové aktivity, její intenzitě a době trvání. PAEE lze měřit pomocí nepřímé kalorimetrie s přenosným modulem nebo pomocí pulzmetrů nebo sporttesterů (což ovšem není příliš přesné).

O vlivu fyzické aktivity na klidový energetický výdej se stále vedou spory. Řada autorů prokázala, že prolongovaná fyzická zátěž o vysoké intenzitě zvyšuje REE na několik hodin [20; 28], ale není jasné, zda k podobnému efektu vede také mírné zvýšení pohybové aktivity. Při negativní energetické bilanci dosažené zvýšením fyzické zátěže však nedochází ke snížení REE jako při omezení příjmu potravy. A při doplnění dietního redukčního režimu pohybovou aktivitou je snížení REE mírnější než při pouhé dietní

léčbě.

Během tělesné aktivity dochází ke změnám v utilizaci substrátů. Zpočátku jsou zdrojem energie sacharidy, po několika minutách přibývá zastoupení tuků. Oxidace tuků je největším zdrojem energie při hodnotách 50-70% maximální aerobní kapacity, cvičení o vyšší intenzitě vyžaduje větší zastoupení sacharidů. Proto je pro prevenci či léčbu obezity vhodnější pohybová aktivita o nižší intenzitě, která maximalizuje oxidaci tuků [28].

Adaptivní termogeneze je definovaná jako produkce tepla v závislosti na příjmu potravy a okolní teplotě a slouží k regulaci energetické bilance při změnách diety a ochraně organismu před chladem. Zahrnuje postprandiální a chladem aktivovaný výdej energie.

1.3.3. Postprandiální výdej energie

Postprandiální výdej energie nebo též dietou indukovaná či postprandiální termogeneze (DEE, z angl. diet-induced energy expenditure, či DIT, diet-induced thermogenesis) přispívá do celkového energetického výdeje 8-12%. Tento termický efekt potravy, jak je také označován, byl poprvé pozorován již Lavoisierem před 200 lety. Skládá se ze dvou komponent – z obligatorní postprandiální termogeneze, která souvisí s trávením, absorpcí, metabolismem a ukládáním živin, a z fakultativní postprandiální termogeneze, která je daná aktivací sympatického nervového systému (SNS).

Během jídla u lidí i hlodavců stoupá energetický výdej o 25-40%. Dlouhodobé přejídání zvyšuje i klidový energetický výdej, ovšem tento ochranný mechanismus výrazně závisí na genetickém pozadí. Všeobecně je uznáváno, že DIT je větší při konzumaci jídla bohatého na sacharidy a zejména na bílkoviny, na rozdíl od jídla obsahujícího velké množství tuků [28]. Při vyjádření v procentech energetického obsahu jednotlivých živin tvoří termický efekt glukózy 8%, tuků 2%, proteinů 20-30% a etanolu 22% [22]. Jak je vidět, nejefektivněji je využívána energie z tuků. DIT se snižuje při omezení počtu jídel, ve kterých je potrava podávána [20]. Na postprandiální termogenezi nemá vliv pohlaví ani věk (po adjustaci na FFM). Studie zaměřené na možné defekty DIT u obézních pacientů přinesly nejednoznačné výsledky. V některých případech byla termogenní odpověď po podání potravy snižena, v jiných nezměněna [22]. Zdá se ale, že termogenní defekt může přispívat k přírůstku hmotnosti po skončení dietní terapie [29]. Snižovanou termogenní odpověď mají také obézní jedinci s insulinovou rezistencí.

Na rozdíl od indukce termogeneze po přijetí potravy dochází při hladovění ke snížení klidového energetického výdeje, a to až o 40%. K poklesu dochází i při dietě dostatečné k udržení 10% redukce hmotnosti [30]. Při nedostatku potravy je takováto odpověď organismu výhodná, ale v případě léčby obezity je kontraproduktivní a významně přispívá k neuspokojivým dlouhodobým výsledkům.

Sympatický nervový systém významně ovlivňuje nejen postprandiální termogenezi, ale také úroveň klidového energetického výdeje a spontánní fyzické aktivity. Při podávání sympatomimetik se energetický výdej zvyšuje, β -sympatolytika vedou k jeho snížení. Již od roku 1978, kdy Landsberg a Young [31] popsali snížení sympatické nervové aktivity během hladovění u krys, se uvažovalo o možné roli porušené sympatoadrenální regulace metabolismu a termogeneze v etiopatogenezi obezity. Reakce sympatického nervového systému je do značné míry předurčena geneticky, snížený tonus sympatiku je přítomen např. u kmene Pima indiánů, který je známý svou náchylností k obezitě [32]. Bylo prokázáno, že SNS tonicky stimuluje energetický výdej cestou β -adrenergních receptorů [33]. Tato tonická stimulace je snížena u žen, při sedavém způsobu života a ve vyšším věku [34]. Sympatická nervová aktivita v kosterních svalech je přímo úměrná množství abdominálního tuku bez ohledu na celkové množství tělesného tuku [35]. Chronicky zvýšená aktivita SNS při stoupajícím množství celkového nebo abdominálního tuku může vést k desenzitizaci a snížení počtu β -adrenergních receptorů, a tak ke snížení jejich reaktivity. S tím souvisí menší zvýšení energetického výdeje v odpověď na β -adrenergní stimulaci u obézních [36].

Informace o postprandiální termogenezi získáme tak, že změříme RMR, poté pacientovi podáme standardní potravu a pokračujeme v měření energetického výdeje během dalších 3-5 hodin. Jinou možností je změřit energetický výdej během 3-5 hodin po jídle a hodnotu porovnat s kontrolním testem provedeným během stejné doby po podání nápoje s nulovou energetickou hodnotou [22].

1.3.4. Chladem aktivovaný výdej energie

Vystavení organismu chladu či spíše teplotám nižším než termoneutrálním vede ke zvýšení energetického výdeje, a to opět díky aktivaci sympatického nervového systému. Odpověď na chlad je zprostředkována třesovou a netřesovou tvorbou tepla. Jak již název napovídá, za třesovou termogenezi je zodpovědný svalový třes, za netřesovou pak převážně hnědá tuková tkáň. Při krátkodobé expozici chladu za velkou část zvýšeného

energetického výdeje odpovídá třes. Po delší době však třes postupně ustupuje a do popředí se dostává netřesová termogeneze.

U hlodavců stoupá v chladu spotřeba kyslíku 2-4x [37]. U lidí je tento efekt menší. Lidé obecně mají oproti hlodavcům širokou termoneutrální zónu s relativně malými změnami v metabolickém obratu (částečně díky behaviorální odpovědi, jako je např. změna oblečení). Vliv termoregulační termogeneze na celkový energetický výdej ilustruje také pětinašobně vyšší RMR u endotermních živočichů oproti exotermním stejné velikosti a nepřímá závislost mezi klidovým energetickým výdejem (vztaženým na jednotku hmotnosti) a velikostí organismu. Čím je jedinec menší, tím má relativně větší tělesný povrch a ztráty tepla.

Hnědá tuková tkáň (BAT, z angl. brown adipose tissue) je jediným orgánem savců, který je specializovaný na tvorbu tepla. Vyskytuje se v relativně malých depech, zejména kolem velkých cév, perirenálně a mezi krčními svaly. U hlodavců se největší depo nalézá mezi lopatkami, u primátů včetně lidí v axilární oblasti. Hnědá tuková tkáň hraje důležitou roli u malých savců, kterým pomáhá udržet konstantní tělesnou teplotu, a u hibernantů, jímž umožňuje zahřátí a probuzení ze zimního spánku. U člověka je nezbytná k překonání poporodního chladového stresu. V tomto období dosahuje 1% celkové tělesné hmotnosti. S růstem organismu a menšími tepelnými nároky ztrácí svůj význam a přibližně po roce života přestává být aktivní. Ovšem malá rezidua hnědé tukové tkáně v organismu zůstávají a je možné je indukovat - ať už za fyziologických podmínek, jako je tomu při chronické expozici chladu (bylo prokázáno ve Finsku u tzv. outdoor workers – lidí pracujících venku [38]), anebo za patologického stavu – např. při nadprodukci katecholaminů u pacientů s feochromocytomem [39]. Navíc buňky hnědé tukové tkáně (tzv. hnědé adipocyty) nejsou omezeny pouze na typické oblasti, ale jsou také rozptýleny v depech bílého tuku. BAT má bohatou vaskularizaci a inervaci - většina jejích adipocytů má vlastní nervové zakončení sympatiku. Hnědé adipocyty jsou multilokulární (mají mnoho malých tukových kapének) s centrálně uloženým jádrem, obsahují mnoho mitochondrií (přítomnost vysokého množství mitochondriálních cytochromů dává tkáni hnědé zbarvení) a jsou metabolicky aktivnější než adipocyty bílého tuku. Ovšem pokud BAT není aktivní, buňky přestávají být multilokulární a začínají se více podobat adipocytům bílé tukové tkáně. Ty jsou obvykle větší a unilokulární (většinu jejich buněčného objemu vyplňuje jedna tuková kapénka, která vytlačuje jádro a ostatní organely na periferii a je obklopena tenkým lemem cytoplazmy). Na molekulární úrovni lze adipocyty bílé a hnědé tukové tkáně jednoduše odlišit přítomností tzv. „uncoupling proteinu 1“ v BAT.

1.3.5. *Uncoupling proteiny*

Aby organismus mohl využít energii uskladněnou v zásobních látkách, musí ji nejprve přeměnit na ATP, což se děje převážně cestou oxidační fosforylace na vnitřní mitochondriální membráně. Při tomto procesu nejdříve enzymy dýchacího řetězce transformují energii uvolněnou během oxidace substrátů na protonový gradient na membráně. Následně je tento gradient hnací silou pro tvorbu ATP prostřednictvím ATP-syntázy. Kdyby veškerý zpětný tok protonů probíhal přes fosforylaci ADP, spřažení oxidace substrátů s tvorbou ATP by bylo úplné. Bylo však zjištěno, že oxidační fosforylace nikdy neprobíhá se stoprocentní účinností. Část protonů se vrací do mitochondrie bez tvorby ATP; zároveň se energie uvolňuje ve formě tepla. Rozpřažení oxidační fosforylace bylo pozorováno již v 60. letech 20. století [40; 41], ale vysvětlení tohoto jevu přišlo až v roce 1976, kdy D. Nicholls a D. Ricquier zjistili, že za zvýšenou propustnost mitochondrií hnědého tuku je zodpovědný 32-kDa transmembránový protein, který nazvali uncoupling proteinem (dnes ho označujeme jako UCP1) [42; 43]. Tento protein bylo možné indukovat chladem a potlačit návratem do pokojové teploty. V roce 1979 Rothwell a Stock popsali u laboratorních zvířat indukci UCP, resp. tvorby tepla, při podávání „cafeteria diet“, která sestává z velmi chutných vysoce energetických jídel [44]. Díky „zmaření“ energie prostřednictvím UCP krysy krmené touto dietou přibývaly na váze mnohem méně, než by se dalo odhadnout na základě jejich energetického příjmu. A tak se UCP stal vedle role v chladem indukované termogenezi také slibným cílem pro farmakologickou léčbu obezity. Využití mitochondriálního rozpřažení by však nebylo úplnou novinkou, chemický rozpřahovač *2,4-dinitrofenol* (DNP) byl v léčbě obezity využíván několik let. Poprvé si vědci účinků jeho derivátů všimli již v roce 1885; jako lék byl DNP využíván ve 30. letech 20. století a zaznamenal značný úspěch. Schopnost dinitrofenolu redukovat váhu bez nutnosti dietních restrikcí vedla k jeho velkému rozšíření. V roce 1938 byl však stažen z trhu pro vedlejší účinky (např. katarakta, neuropatie) a dokonce i úmrtí z předávkování [45].

Až donedávna byl UCP pozorován pouze v hnědé tukové tkáni a molekulární mechanismus rozpřažení mitochondriální respirace v ostatních tkáních nebyl znám. V roce 1996 však byly publikovány 2 práce, které vedly k hledání UCP či jeho homologů v kosterním svalu a dalších tkáních. 1) Nagase *et al.* zjistil, že podání β_3 -adrenergických

agonistů vede k redukci hmotnosti spojené s expresí UCP v kosterním svalu a bílé tukové tkáni (WAT, z angl. white adipose tissue) [46] a 2) Rolfe a Brand oznámili, že fenomén „úniku protonů“ v mitochondriích není přítomen výlučně v BAT, jak se původně myslelo, ale vyskytuje se i v jiných tkáních. Např. v kosterním svalu může k produkci tepla v klidu přispívat až 50% [47]. Hledáním v genetických databázích byly v roce 1997 objeveny UCP2 a UCP3, které jsou u člověka z 59%, resp. 57% sekvenčně identické s UCP1 (další nejbližší mitochondriální transportní protein, 2-oxoglutarát/malátový přenašeč, je identický s UCP1 pouze ze 32%) [48; 49]. Na rozdíl od UCP1 se UCP2 nachází v řadě tkání, zejména v bílé tukové tkáni a v orgánech bohatých na makrofágy nebo významných pro imunitu (thymus, slezina), dále např. v kosterním svalu, hnědém tuku, β -buňkách pankreatu, srdci a ledvinách. UCP3 je exprimován převážně v kosterním svalstvu a hnědé tukové tkáni, v menší míře také v srdci. Vzhledem k tomu, že kosterní svalstvo a bílá tuková tkáň hrají důležitou roli v celkové energetické bilanci organismu, znovu se zvažuje význam UCP v etiopatogenezi, eventuálně léčbě obezity. Hledání uncoupling proteinů stále pokračuje, další v pořadí byly UCP4 a UCP5 (nazývaný také BMCP, brain mitochondrial carrier protein 1) vyskytující se v nervové tkáni, hlavně v mozku [50; 51]. Homologa UCP1 byla popsána u ptáků, ryb a dokonce i v rostlinách a houbách [52].

1.3.5.1. Uncoupling protein 1

Jak již bylo uvedeno, UCP1 se u savců vyskytuje v hnědé tukové tkáni. Vystavení organismu chladu nebo nadměrnému příjmu potravy vede ke stimulaci hnědé tukové tkáně a ta funguje jako termogenní orgán. K aktivaci termogeneze dochází prostřednictvím sympatického nervového systému. Z jeho nervových zakončení na adipocytech se uvolňuje noradrenalin, který působením na β -receptory (zejména na β_1 - a β_3 -receptory) stimuluje hormon senzitivní lipázu a uvolňuje mastné kyseliny z endogenních triacylglycerolů, a ty aktivují UCP1. Adrenergní stimulace tak vede ke zvýšení lipolýzy a termogeneze. Snahou je využít tento jev ve farmakoterapii obezity a diabetu. U experimentálních zvířat podání specifických agonistů β_3 -adrenergních receptorů zvyšuje energetický výdej a výrazně redukuje obezitu, současně zvyšuje citlivost k inzulinu a působí protektivně na aktivní tělesnou hmotu. Dochází k indukci diferenciaci hnědotukových preadipocytů a pravděpodobně též ke konverzi některých adipocytů bílé tukové tkáně na multilokulární buňky s vysokým obsahem mitochondrií, UCP1 a UCP3 [5]. Bohužel v léčbě obezity u

lidí se i přes 20-letý výzkum zatím tyto perspektivní léky neuplatnily, neboť buď byly málo účinné nebo nedosáhly dostatečně specifické vazby na β_3 -adrenergní receptory. Současná stimulace β_1 - a β_2 -receptorů způsobovala nežádoucí účinky (zejména kardioexcitační).

Význam UCP1 v udržování tělesné teploty a hmotnosti ukazují studie různých myších modelů. Např. myši se specifickou inaktivací (tzv. knockout) UCP1 jsou velmi citlivé na chlad a při vystavení nízkým teplotám hynou [53]. Zajímavé je, že nejsou obézní, a to pravděpodobně díky určitému kompenzačnímu mechanismu, který stimuluje energetický výdej v jiných tkáních, např. ve svalu. Dochází také k mimořádně vysoké expresi UCP2 v hnědé tukové tkáni. Jiným modelem je transgenní myš, která exprimuje UCP1 ektopicky v bílé tukové tkáni pod kontrolou $\alpha 2$ promotoru. Při krmení standardní dietou mají tyto myši stejnou hmotnost jako myši kontrolní, ale při podávání vysokotukové diety se projeví jejich částečná odolnost vůči obezitě – váhové přírůstky jsou výrazně nižší než v kontrolní skupině, a to díky aktivaci oxidace a inhibici syntézy mastných kyselin v tukových buňkách [54].

Ačkoli se zdá, že UCP1 se u dospělých velkých savců (včetně člověka) v podstatě nevyskytuje, myšlenka využití regulované exprese UCP1 k terapii obezity nebyla dodnes opuštěna a pokračují pokusy o nalezení indukovatelné exprese UCP1 i v jiných buněčných typech než je hnědý adipocyt. Např. v roce 2001 Nibbelink *et al.* [55] popsali pravděpodobně specifickou expresi UCP1 v longitudinální hladké svalovině dělohy, ovšem přibližně 1000x nižší než v BAT. Posledním objevem v této oblasti je nalezení intramyofibrilárních dep hnědého tuku v oxidativních svalech myši (Ronald Kahn, přednáška na sympóziu Obesity, Keystone, CO, USA, 2005).

1.3.5.2. *Uncoupling protein 2*

Ačkoliv byl UCP2 objeven v roce 1997, stále ještě není zcela jasná jeho funkce. Je to za prvé proto, že se vyskytuje, přinejmenším na úrovni RNA, v mnoha tkáních, zejména ve tkáních bohatých na makrofágy (slezina, žaludek, plíce, tenké střevo), dále v bílém a hnědém tuku, kosterním a srdečním svalu, ledvinách, játrech, mozku a dalších. Proto je obtížné určit specifické faktory nebo podmínky, které ovlivňují jeho expresi či aktivitu. A za druhé se ukázalo, že je velmi složité vyvinout dostatečně citlivé a zároveň specifické protilátky proti UCP2. Z tohoto důvodu je UCP2 studován většinou na úrovni RNA, což může být zkreslující, neboť se předpokládá jeho regulace také na úrovni translace. Navíc se

zdá, že funkce UCP2 se může lišit v závislosti na typu buněk, kde je exprimován. Zatím nejslibnější výsledky přinesly modely myši s inaktivovaným genem pro UCP2, jedna studie se týkala UCP2 v makrofázích, druhá v β -buňkách pankreatu, bohužel obě proběhly na myších s nejednotným genetickým pozadím a zatím nebyly potvrzeny na definovaném genotypu. Práce z posledních let se povětšinou shodují na tom, že UCP2 i UCP3 skutečně fungují jako rozpřahující proteiny.

První náznak, že by UCP2 mohl hrát roli v regulaci tělesné hmotnosti, přinesla studie myši s inaktivovaným UCP1. Jak již bylo napsáno výše, tyto myši jsou citlivé na chlad, ale ne obézní a bylo u nich pozorováno 14-ti násobné zvýšení exprese UCP2. Což by mohlo znamenat kompenzaci za chybějící UCP1 [53]. Takovýchto experimentů ovšem není mnoho; většina studií sledujících funkci UCP2 v tukové tkáni je asociační - sleduje asociaci fenotypu s variantami genu pro UCP2 nebo s úrovní jeho exprese. Geny pro UCP2 a UCP3 se u člověka nacházejí v chromozomálním lokusu 11q13 (zřejmě vznikly genovou duplikací) ve stejné oblasti jako řada genů vztahujících se k metabolismu lipidů a obezitě. Vysoce signifikantní vztah *Ucp2/Ucp3* lokusu ke klidovému energetickému výdeji nalezla Bouchardova studie [56]. Podobná vazba byla zjištěna též u pacientů s mentální anorexií [57]. Zdá se, že některé polymorfismy *Ucp2* genu by mohly přispívat k již zmíněnému *thrifty* genotypu (viz výše). Byly nalezeny asociace mezi polymorfismy genu pro *Ucp2* a energetickým výdejem a oxidací tuků [58; 59], sníženým rizikem vzniku obezity [60] a hladinou leptinu v séru [61].

Řada prací sleduje korelaci exprese UCP2 s biologickými parametry. Exprese UCP2 např. pozitivně korelovala s klidovým energetickým výdejem obézních žen při podávání velmi přísné nízkoenergetické diety [62]. U obézních jedinců bylo dále pozorováno snížení termogeneze v podkožní tukové tkáni [63] a snížení exprese UCP2 v omentálním tuku [64]. Fleury *et al.* jako první ukázal, že exprese UCP2 v bílé tukové tkáni stoupá s příjmem tuku v potravě [48].

Studie týkající se UCP2 se ovšem zdaleka neomezují jen na tukovou tkáň a obezitu. Řada prací se zabývá jeho funkcí v makrofázích a vztahu k imunitě (např. [65]). Přírodním vedlejším produktem energetického metabolismu je superoxid. Jeho produkce pozitivně koreluje a velmi citlivě reaguje na změny mitochondriálního membránového potenciálu. Snížením mitochondriálního membránového potenciálu UCP2 zvyšuje rychlost oxidačních procesů dýchacího řetězce a tak snižuje tvorbu volných kyslíkových radikálů. Může hrát tedy roli jakéhosi fyziologického antioxidantu či ochránce před reaktivními

formami kyslíku [66; 67]. Při patologických stavech by se tak podílel na nespecifických obranných reakcích organismu a mohl by mít význam i při apoptotické smrti buňky. Vzhledem k tomu, že superoxid zároveň působí jako aktivátor UCP2 a UCP3 [67], dochází k regulaci na principu negativní zpětné vazby: vysoký mitochondriální membránový potenciál zvýší produkci superoxidu, který indukuje UCP-zprostředkovaný transport protonů, čímž se potenciál, resp. tvorba superoxidu sníží [68]. Vztah k imunitě podpořila také studie s geneticky pozměněnou myší – v roce 2000 byla vytvořena první myš s inaktivovaným genem pro UCP2. Za standardních podmínek u ní nebyly pozorovány žádné fenotypové změny. Ovšem po expozici infekci *Toxoplasma gondii* bylo zjištěno, že na rozdíl od divokého typu myši, které infekci podlehly, jsou k ní tyto myši zcela rezistentní. Makrofágy *Ucp2^{-/-}* myši produkovaly o 80% kyslíkových radikálů více [69].

S makrofágy souvisí také práce popisující UCP2 v játrech. U hlodavců i u člověka byla pozorována vysoká exprese UCP2 v játrech před porodem (UCP2 ovšem není za normálních podmínek obsažen v hepatocytech, ale pouze v monocytech/makrofázích, převážně v Kupfferových buňkách), krátce po porodu však hladina UCP2 prudce klesá. Autoři uvádějí možný vztah UCP2 k jaterní hematopoéze [70]. Zajímavé je také zvýšení exprese UCP2 polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA, z angl. polyunsaturated fatty acids) a inhibice této indukce aspirinem [71]. R. Faggioni se ve své práci zabývala vysvětlením mechanismu zvýšeného energetického výdeje a produkce tepla během infekce. Objevila indukci exprese UCP2 ve svaly, bílé tukové tkáni a hepatocytech bakteriálním endotoxinem *lipopolysacharidem*; UCP2 by tak mohl fungovat jako infekcí stimulovaný zdroj tepla [72]. Na závěr této podkapitoly malé shrnutí: UCP2 může přispívat k boji s infekcí dvěma způsoby - za prvé snížení jeho exprese v makrofázích způsobené bakteriálními endotoxiny může vést ke stimulaci baktericidních procesů, za druhé jeho zvýšení v hepatocytech může aktivovat apoptotické procesy a vést ke smrti buňky.

UCP2 by mohl být zapojen také do regulace insulinové sekrece. Jako první si toho všiml M. Shimabukuro *et al.*, který zjistil, že agonista PPAR γ (z angl. peroxisome proliferator-activated receptor) troglitazon zvyšuje expresi UCP2 v Langerhansových ostrůvcích pankreatu [73]. Jiní autoři lokalizovali UCP2 do β -buněk [74]. Bereme-li v úvahu, že UCP2 funguje jako rozpřahující protein a předpokládáme negativní efekt na tvorbu ATP v β -buňkách, UCP2 je považován za negativní regulátor insulinové sekrece.

Tato hypotéza byla podpořena též pokusy na kulturách z ostrůvků pankreatu – zvýšená exprese UCP2 narušovala produkci ATP v mitochondriích a byla spojena s defektní sekrecí insulinu po stimulaci glukózou [75]. Na druhou stranu absence UCP2 způsobila větší odpověď β -buněk na glukózu, a to i u myši s geneticky indukovanou obezitou a diabetem (*ob/ob* myši, myši s inaktivovaným genem pro leptin) [76]. Jiná práce prokázala přímý stimulační efekt mastných kyselin na expresi UCP2 a inhibici této stimulace antagonistou PPAR γ [77]. Tyto studie tak společně stanovily UCP2 jako pojítko mezi obezitou (nadbytek mastných kyselin) a DM 2. typu (porucha β -buněk). Není snadné si představit, že by UCP2 v β -buněkách pouze negativně ovlivňoval jejich funkci. Pravděpodobně jeho skutečná role nebude „ničit“ β -buňky, ale chránit je před úplným vyčerpáním zásob insulinu.

Vzhledem k podobnosti s UCP1 se i u UCP2 předpokládala funkce v adaptivní termogenezi. Po expozici chladu skutečně dochází k vzestupu UCP2 mRNA v hnědé tukové tkáni, srdci a kosterním svalu, což odpovídá předpokladu. Ovšem v kosterním svalu (v BAT a srdci ne) byl zjištěn vzestup exprese UCP2 také v důsledku hladovění ([78]; potvrzeno též v naší studii – viz kapitola 3.3), při kterém se energetický výdej snižuje. Obdobně se chová také UCP3. Tento zdánlivý paradox lze na molekulární úrovni vysvětlit změnami v koncentraci volných mastných kyselin (FFA, z angl. free fatty acids), které jsou hlavními induktory exprese UCP. Hladovění snižuje aktivitu sympatiku, což v BAT vede ke snížení aktivity lipolytických enzymů, a tedy i hladiny intracelulárních mastných kyselin. Exprese UCP v BAT se snižuje. Naopak v kosterním svalstvu není koncentrace FFA dána lipolýzou *in situ*, ale je odpovědí na hladinu cirkulujících mastných kyselin. Ta během hladovění roste stejně jako exprese UCP2 a UCP3. Umělé zvýšení hladiny cirkulujících FFA infúzí „Intralipidu“ napodobilo efekt hladovění na expresi UCP3 ve svalu [79]. Naopak podání kyseliny nikotinové, která zvýšení FFA při hladovění blokuje, expresi UCP2 i 3 ve svalu snížilo [80]. Zvýšení exprese obou homologů ve svalu bylo pozorováno i v dalších situacích, ve kterých dochází ke zvýšení hladiny FFA v krvi: fyzická aktivita [81], obezita [82] a podávání diety s vysokým obsahem tuku [83]. Je pravděpodobné, že oba uncoupling proteiny hrají roli v metabolismu lipidů.

Molekulární mechanismus působení UCP na aktivity enzymů, resp. genovou expresi není jasný. Předpokládáme-li ale, že UCP snižují mitochondriální membránový potenciál, snižují též tzv. energetický náboj buňky, daný poměrem ATP/ADP, resp. ATP/AMP, čímž mimo jiné aktivují AMP-aktivovanou proteinovou kinázu (AMPK).

AMPK tak může být hledaným prostředníkem mezi rozpřažením oxidační fosforylace a pozorovanými metabolickými, resp. fenotypovými projevy.

AMPK je klíčovou komponentou kaskády proteinových kináz, které hrají důležitou roli v regulaci energetického metabolismu. Jedná se o heterotrimerní enzym, který je silně konzervován v celém systému eukaryotických organismů. Homologa všech tří jeho podjednotek byla nalezena u rostlin, kvasinek, červů, hmyzu i savců. Studie na savčích buňkách prokázaly, že AMPK je aktivovaná v důsledku procesů, které spotřebovávají zásoby ATP, a spouští sérii odpovědí, jejichž cílem je obnova těchto zásob. Zjednodušeně řečeno AMPK blokuje metabolické procesy, které jsou energeticky náročné (např. syntézu mastných kyselin nebo sterolů), a naopak aktivuje dráhy, které generují ATP (např. oxidaci mastných kyselin). Někteří autoři s oblibou označují AMPK jako metabolický „master switch“ [84] [85].

AMPK je aktivovaná, dochází-li k nárůstu buněčného AMP a současnému poklesu ATP. Díky téměř rovnovážné reakci katalyzované adenylát kinázou ($2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$) se buněčný poměr ATP/AMP mění s mocninou změny poměru ATP/ADP, což činí z poměru ATP/AMP, potažmo AMPK citlivý senzor energetického stavu buňky. AMP aktivuje AMPK třemi způsoby: allostericky, podporou fosforylace AMPK nadřazenou kinázou (tzv. AMPK kinázou, AMPKK) a inhibicí defosforylace AMPK protein fosfatázami. Díky trojímu způsobu aktivace AMPK citlivě reaguje na změny buněčného AMP. Všechny způsoby aktivace AMPK prostřednictvím AMP jsou antagonistovány vysokými hladinami ATP [86].

Uncoupling proteiny jsou tedy díky své schopnosti modulovat mitochondriální membránový potenciál a s tím související energetický náboj buňky vynikajícími aktivátory AMPK. Vyslovili jsme hypotézu, že AMPK (aktivovaná v důsledu zvýšené exprese UCP2) může hrát roli v rozdílné metabolické odpovědi jednotlivých dep bílé tukové tkáně na hladovění. Hypotézu jsme ověřili ve studii, jejíž výsledky jsou součástí této práce a jsou shrnuty v kapitole 3.3.

UCP2 se vyskytuje také v mozku, většinou v nízkých koncentracích, ale existují oblasti, ve kterých byla UCP2 mRNA nalezena ve značném množství – jedná se o limbický systém a některé části hypothalamu. Na modelu myši s inaktivovaným genem pro UCP2 byly pozorovány změny podporující roli UCP2 v regulaci příjmu potravy [87].

1.3.5.3. *Uncoupling protein 3*

UCP3 se nachází v kosterním svalstvu a v hnědé tukové tkáni, v mnohem menších koncentracích byl detekován v srdci. UCP3 není exprimován během fetálního vývoje, jeho exprese se objevuje těsně po porodu v závislosti na prvním příjmu potravy obsahující tuky, kterou zpravidla bývá mateřské mléko [88; 89]. U pokusných zvířat, jimž byla podána umělá výživa postrádající mastné kyseliny, k vzestupu UCP3 nedošlo [90].

Stejně jako v případě UCP2 ani fyziologická role UCP3 zatím není zcela objasněna. V hnědé tukové tkáni UCP3 mRNA reaguje na stejné podněty jako UCP1. Za situací, kdy je stimulována oxidace mastných kyselin, jako je vystavení organismu chladu, exprese stoupá, a naopak v termoneutrálním prostředí klesá. Během hladovění je UCP3 mRNA v BAT snížena, pravděpodobně díky supresi sympatického nervového systému. V kosterním svalstvu exprese UCP3 odráží hladinu cirkulujících mastných kyselin za všech situací, které byly dosud studovány. Na začátku chladové expozice přechodně vzrůstá, stejně jako plazmatické mastné kyseliny [91]. Ke zvýšení dochází také po cvičení [92] a při hladovění [79]. Naopak snížení hladiny plazmatických mastných kyselin a exprese UCP3 ve svalu bylo pozorována během laktace [93] a u diabetu 2. typu [94]. S úlohou UCP3 v metabolismu mastných kyselin koresponduje též zvýšení jeho exprese po aplikaci β -adrenergických agonistů a po podávání diety s vysokým obsahem tuků. V obou těchto případech je exprese indukována nepřímo, přes zvýšení hladiny mastných kyselin [95]. Kromě mastných kyselin mají stimulační vliv na expresi UCP3 ve svalu také léky ze skupiny hypolipidemik – fibráty. K indukci dochází prostřednictvím vazby mastných kyselin a fibrátů na transkripční faktor PPAR α [5].

K ozřejmění funkce UCP3 byly vytvořeny myši s inaktivovaným genem a naopak transgenní zvířata s nadprodukcí UCP3. Myši s chybějícím UCP3 nevykazovaly žádné fenotypové změny. Nadprodukce UCP3 se však projevila snížením hmotnosti, hyperfagií, zvýšením RMR, zlepšením glukozové tolerance a snížením celkového cholesterolu [96].

Vztah UCP3 ve svalu k energetickému výdeji naznačila studie u Pima indiánů, která prokázala signifikantní korelaci UCP3 mRNA s BMI (negativní) a RMR (pozitivní) [97]. Jiná studie zjistila, že hyperthyreóza, charakterizovaná zvýšeným energetickým výdejem, je spojena s nižším mitochondriálním membránovým potenciálem a naopak. Podání tyroxinu bylo následováno zvýšenou expresí UCP3 a současným zvýšením RMR [95]. Tudíž se zdá, že zvýšený energetický výdej je zodpovědný právě UCP3. Řada

genetických studií se snažila najít vztah polymorfismů genu pro UCP3 k markerům energetického metabolismu a obezité. V některých z nich tento vztah nalezen byl, v jiných nikoli [98].

UCP3 ovšem neovlivňuje pouze metabolismus mastných kyselin, ale zasahuje také do metabolismu glukózy. Stimuluje vychytávání glukózy a translokaci glukózového přenašeče 4 (GLUT 4) do plazmatické membrány [99]. Předpokládá se, že k tomu dochází díky ovlivnění poměru ATP/AMP a následné stimulaci AMP-aktivované proteinové kinázy.

1.4. Energetický příjem

Energetický příjem je daný množstvím, složením a vstřebáváním potravy. Příjem potravy je výrazně ovlivněn jídelními zvyklostmi. Bylo zjištěno, že obézní jedinci mívají často odlišné vzorce jídelního chování. K posouzení jídelního chování se používá „Three Factor Eating Questionnaire“ (TFEQ) neboli „Eating Inventory“ (EI). Tento dotazník hodnotí 3 složky: „restraint“ skóre posuzuje vědomé omezování příjmu potravy, skóre „disinhibice“ odráží stravovací návyky, které vedou ke kolísání hmotnosti (jo-jo fenomén) a bývají charakterizovány střídáním krátkodobých diet a následného přejídání, v důsledku ztráty kontroly nad příjmem potravy zejména při depresi, stresu, úzkosti či nadměrné konzumaci alkoholu. Třetí složkou je skóre hladu, které kvantifikuje individuální pocit hladu. Vztah mezi hodnotami EI a změnami hmotnosti byl potvrzen řadou studií týkajících se jak dietní, tak chirurgické léčby obezity [100–102]. Disinhibice je spojena s BMI a s obvodem pasu (tj. ukazatelem abdominální obezity), jakož i s výskytem hypertenze, kardiiovaskulárních onemocnění a hyper/dyslipidémie [103]. Psychobehaviorální ukazatele byly testovány také v rámci farmakologické léčby obezity, např. fenfluraminem, fenterminem a kofeinem s efedrinem [104]. Pacienti s vysokým restraint skóre a skóre hladu měli menší pravděpodobnost, že během šesti měsíců zhubnou. Na našem pracovišti jsme sledovali psychobehaviorální ukazatele během léčby sibutraminem (inhibitor zpětného vychytávání noradrenalinu a serotoninu) - viz kapitola 3.8. Vliv na redukci hmotnosti má také přítomnost deprese, která se jeví jako negativní prognostický faktor [105]. Depresivní nálada často spouští rizikové chování ve smyslu přejídání, což podporuje přibývání na váze. Sklon k depresi lze zhodnotit pomocí „Beck Depression Inventory“ (BDI) [106].

Co se týče složení stravy, je z hlediska energetické bilance a epidemiologie obezity významný zejména příjem tuků. Vzhledem k tomu, že organismus není schopen na větší příjem tuků ihned zareagovat vzestupem jejich oxidace, dochází k jejich ukládání do tukových zásob. Na druhou stranu příjem tuků potravou do určité míry inhibuje syntézu mastných kyselin. Tuto schopnost mají především n-3 (též n-3) polynenasycené mastné kyseliny (zvláště z mořských ryb), proto v současné době probíhají studie týkající se jejich možného využití v léčbě obezity a metabolického syndromu (viz dále). Na rozdíl od tuků mají sacharidy, a v ještě větší míře bílkoviny, dobrou sytící schopnost a zvyšují postprandiální termogenezi, takže obvykle nebývají hlavní příčinou obezity. Nicméně v poslední době se zvažuje vliv vysoké konzumace jednoduchých cukrů (především fruktózy) na rozvoj obezity u dětí [107].

1.4.1. Polynenasycené mastné kyseliny

Polynenasycené mastné kyseliny jsou esenciálními strukturními složkami biomembrán. Díky přítomnosti dvojných vazeb v konfiguraci *cis* způsobují fluiditu membrán, čímž mimo jiné modulují funkčnost řady enzymů, receptorů a transportních systémů s membránami spojených. V obzvlášť vysokých koncentracích se nachází v mozku a v membránách nervových buněk.

Z hlediska regulace energetického metabolismu jsou nejdůležitější dvě řady PUFA, které jsou vzájemně nezaměnitelné. Podle polohy nejbližší dvojně vazby ke koncovému ω -uhlíku je označujeme n-3 a n-6. Typickými představiteli skupiny n-3 jsou kyselina α -linolenová, obsažená ve velkém množství například ve lněném oleji, a kyseliny eikosapentaenová (EPA) a dokosaheptaenová (DHA), obsažené ve vysokých množstvích v olejích z mořských ryb. Do skupiny n-6 řadíme zejména kyselinu linolovou (majoritní součást běžných potravinových olejů, např. slunečnicového, kukuřičného a sójového oleje) a kyselinu arachidonovou. Přeměny mastných kyselin v rámci jednotlivých řad obstarávají enzymy elongázy, desaturázy a enzymy peroxisomální β -oxidace, přičemž obě řady PUFA kompetují o stejné sady enzymů. Nadbytek n-6 PUFA v potravě inhibuje přeměny n-3 PUFA a naopak. Obě řady PUFA jsou pro lidský organismus esenciální, neboť náš metabolismus nedovede vnést první dvojnou vazbu blíže než na 9. uhlík od karboxylového konce, a tedy tyto mastné kyseliny musí být dodávány v potravě.

Kromě účinku na strukturu biomembrán jsou obě řady PUFA prekurzory pro tvorbu

prostaglandinů (PG). V závislosti na poměru n-3 a n-6 PUFA v potravě dochází k přednostní tvorbě protizánětlivých PG₁ (převaha n-3) nebo prozánětlivých PG₂ (převaha n-6). Pro rozvoj obezity má zásadní význam PGI₂ (vznikající z n-6 kyseliny arachidonové), který je jedním z hlavních adipogenních faktorů v krvi. Epidemiologické studie provedené u eskymáků, jejichž potrava obsahuje vysoké množství olejů z mořských ryb, prokázaly příznivý vliv n-3 PUFA na hladinu krevních lipidů, cholesterolu a na riziko výskytu ischemické choroby srdeční [108]. V souvislosti se zlepšením lipidového spektra zmírnilo podávání n-3 PUFA projevy inzulinové rezistence [109]. Primární příčinou snížené lipidémie v krvi je zřejmě vyšší metabolická aktivita bílé tukové tkáně a s tím související vyšší kapacita bílého tuku na vychytávání krevních lipidů [110].

Studie provedené v rámci spolupráce Oddělení biologie tukové tkáně FgÚ AV ČR a norské firmy Pronova Biocare na laboratorních myších krměných vysokotukovou dietou prokázaly, že obohacení diety koncentrátem n-3 PUFA na bázi oleje z mořských ryb (nazvaným EPAX 1050 TG) snižuje tělesnou hmotnost, zmenšuje velikost (zvláště nitrobřišních) tukových dep a snižuje hladinu krevních triglyceridů, insulinu a leptinu, a to při nezměněném kalorickém příjmu [111]. V tukové tkáni EPAX zvyšuje expresi genů kódujících klíčové komponenty mitochondriální oxidační fosforylace a expresi odpovídajících transkripčních faktorů NRF1 (z angl. nuclear respiratory factor) a PGC1 α (PPAR gamma coactivator), to znamená, že indukuje mitochondriální biogenezi. Dále stimuluje β -oxidaci a inhibuje biosyntézu mastných kyselin [112]. Předpokládáme, že všechny tyto změny souvisí s aktivací AMPK. Detailní mechanismus působení n-3 PUFA, resp. aktivace AMPK prostřednictvím n-3 PUFA, je v současné době předmětem intenzivního výzkumu.

Na lidských pacientech způsobilo jednorázové injekční podání n-3 PUFA akutní aktivaci AMPK v podkožním bílém tuku. Ve spolupráci našeho pracoviště a Oddělení biologie tukové tkáně FgÚ AVČR byla dále provedena studie, ve které byl pacientům orálně podáván komerčně dostupný preparát n-3 PUFA (Omega 3 forte, SVUS Pharma). Klinická část výsledků je uvedena v kapitole 3.4. V poslední době byla tato spolupráce rozšířena i o firmu Pronova a probíhá další studie, ve které je pacientům podáván EPAX.

1.4.2. Vápník

Do energetické bilance a metabolických drah mohou zasahovat také mikronutrienty

– uvažuje se zejména o vápníku a vitamínu A. Již před 10 lety byly publikovány studie týkající se vlivu vápníku na obezitu u krys. Např. Metz *et al.* zjistil při zvýšeném příjmu vápníku redukcí tukové hmoty u dvou kmenů hypertenzních krys [113]. Jiným modelem pro studium této problematiky byly aP2-agouti transgenní myši (exprimují tzv. agouti protein specificky v tukových buňkách pod kontrolou aP2 promotoru) [114; 115]. Tyto myši mají při standardní dietě normální váhu, ale stávají se obézními při hyperinzulinémii indukované aplikací inzulínu nebo dietou s vysokým obsahem sacharózy. Při pokusném podávání diety s vysokým obsahem tuků a sacharózy a sníženým množstvím vápníku u nich došlo k rychlému zvýšení hmotnosti, tukové hmoty a hladiny intracelulárních Ca^{2+} iontů. Skupina myší, která přešla na dietu obohacenou vápníkem, měla signifikantně nižší hmotnostní přírůstky; při dietě s vysokým obsahem mléčných produktů byl tento efekt ještě výraznější [116]. Vzhledem k tomu, že se nezměnil energetický příjem a zároveň stoupla tělesná teplota, pravděpodobně došlo ke snížení účinnosti energetického metabolismu. Spekuluje se, že by tento efekt mohl být zprostředkován uncoupling proteinem 2, jehož exprese byla dietou zvýšená. Pozorováno bylo také zmenšení tukové tkáně doprovázené nárůstem lipolýzy a poklesem lipogeneze. Podobné účinky byly zjištěny také při pokusech s energetickou restrikcí. Větší redukce hmotnosti i tukové hmoty byla pozorována u myší, kterým bylo podáváno kalcium ve zvýšené míře. Došlo také k normalizaci hladiny intracelulárních Ca^{2+} iontů. Vápník z mléčných výrobků měl přibližně dvojnásobný efekt jak na metabolismus lipidů v adipocytech, tak na tělesnou hmotnost. Při podávání potravy *ad libitum*, které následovalo po energetické restrikci, dieta s vyšším obsahem vápníku zabránila poklesu lipolýzy a oxidace tuků v tukové tkáni, ke kterému obvykle dochází, a zároveň zvýšila oxidaci tuků v kosterních svalech [117].

Klinické studie ukázaly, že při dodržování doporučených dávek pro příjem vápníku se riziko přibývání na váze výrazně snižuje a dokonce dochází k mírnému poklesu váhy. Vztah vápníku k tukové tkáni prokázala řada autorů. Např. M. Zemel [116] provedl analýzu údajů z rozsáhlé studie NHANES III (National Health and Nutritional Examination Survey), která probíhala v letech 1988-1994 a zúčastnilo se jí přes 7000 lidí, a našel nepřímou úměrnost mezi příjmem kalcia a mléčných výrobků na jedné straně a množstvím tělesného tuku na straně druhé. Také K. M. Davies [118] zjistil po vyhodnocení několika studií zaměřených původně na stav kostí významný negativní vztah mezi příjmem vápníku a tělesnou hmotností. Ve skupinách lišících se v příjmu vápníku o 1000 mg/den byl rozdíl v průměrné tělesné hmotnosti 8 kg. V jiné studii u mladých žen

příjem kalcia neměl vliv na hmotnost ve skupině s nadprůměrným příjmem energie, ovšem ve skupině s podprůměrným energetickým příjmem (méně než cca 7800 kJ) předpovídal změny hmotnosti i tukové hmoty. Při příjmu vápníku 1000 mg/den došlo k úbytku hmotnosti o 2,6 kg, při příjmu 500 mg/den naopak ke zvýšení hmotnosti o 1,8 kg za 2 roky [119]. Tento výsledek týkající se mladých zdravých žen by mohl být důležitý zejména pro prevenci obezity. Také v intervenční 24-týdenní studii [120] dieta s vyšším obsahem vápníku signifikantně zvýšila úbytek hmotnosti při kalorické restrikci (o 26%) a dieta obohacená 3-4 porcemi mléčných výrobků denně dokonce o 70% proti kontrolní skupině. Rozdílný příjem vápníku měl vliv rovněž na distribuci tukové hmoty – v kontrolní skupině se podílel tuk z abdominální oblasti na celkové ztrátě tělesného tuku 19%, ve skupině s vyšším obsahem vápníku 50% a ve skupině s přidávanými mléčnými výrobky 66%, která provází energetickou restrikci. Ve skupině s vyšším příjmem mléčných výrobků byla také pozorována 31% redukce ztráty beztukové tělesné hmoty a zlepšení insulinové senzitivity, glukózové tolerance a krevního tlaku.

Pokud jsou mléčné výrobky přidány do diety bez náležité kompenzace energetického příjmu, vedou samozřejmě k nárůstu hmotnosti, ovšem k menšímu, než by odpovídalo nadbytečnému příjmu energie [37]. To by mohlo znamenat posun v energetické rovnováze. Ve studii [121] příjem vápníku pozitivně koreloval s oxidací tuků během 24 hodin, ve spánku i při lehké fyzické aktivitě a negativně s respiračním kvocientem. Po adjustaci na tukovou hmotu, příjem tuku a energetickou rovnováhu byl vápník zodpovědný za 10 % variabilitu v oxidaci tuků. Na rozdíl od těchto příkladů ale existují i studie, které signifikantní vliv vápníku na hmotnost neprokázaly např. [122; 123].

V současné době se intenzivně zkoumá mechanismus působení vápníku. Zdá se, že zasahuje do fyziologických dějů na několika místech. Za prvé zvyšuje vylučování tuků stolicí. Tento účinek je obvykle mírný, ztráty tuků stoupnou pouze o několik procent, ale v případě diety s vysokým obsahem tuků může být významný [124].

Další mechanismus je zprostředkován parathormonem (PTH) a 1,25-dihydroxycholekalCIFerolem ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) [116; 117]. Oba tyto hormony zvyšují vstup Ca^{2+} do adipocytů. Hladina intracelulárních Ca^{2+} iontů funguje jako regulátor metabolismu lipidů v tukových buňkách. Zvýšená hladina $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimuluje expresi a aktivitu lipogenních enzymů a snižuje lipolýzu, což vede ke zvýšené akumulaci tuků v adipocytech. Dieta obsahující větší množství kalcia způsobí snížení hladiny

1,25-dihydroxycholekalCIFerolu, menší vstup Ca^{2+} do buněk a díky tomu také menší akumulaci lipidů v tukových buňkách. Bylo zjištěno, že lidské adipocyty obsahují membránový receptor pro vitamin D, který zprostředkovává rychlou odpověď $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na 1,25-dihydroxycholekalCIFerol [125]. Také agouti protein (viz výše) zvyšuje influx vápníku do buněk. Obezita indukovaná u transgenních myší nadměrnou expresí tohoto proteinu může být výrazně omezena podáváním blokátorů kalciových kanálů. Vztah vitaminu D k obezitě naznačuje mimo jiné polymorfismus genu pro *nVDR* (jaderný receptor pro vitamin D), který je u některých pacientů spojen s náchylností k obezitě, nebo zvýšení hladiny vitaminu D u obézních pacientů. Rovněž insulinotropní účinky vitaminu D mohou přispívat k rozvoji obezity [126].

1,25-dihydroxycholekalCIFerol dále zvyšuje expresi 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenázy 1 v adipocytech a následně lokální hladinu kortizolu, a snižuje expresi UCP2. Při jeho supresi prostřednictvím diety s vysokým obsahem vápníku dochází ke snížení produkce kortizolu, což může přispívat k přednostní redukci viscerálního tuku [127], a ke zvýšení exprese UCP2, což stimuluje termogenezi [114]. Snížení mitochondriálního membránového potenciálu v důsledku zvýšené exprese UCP2 společně se změnami hladin cytosolického i mitochondriálního Ca^{2+} může rovněž přispívat ke značnému zvýšení adipocytární apoptózy.

Nitrobuněčný vápník ovlivňuje diferenciaci adipocytů [128]. Jeho efekt ovšem závisí na stupni diferenciace buněk. Zvýšení Ca^{2+} v časných stádiích diferenciace tento proces inhibuje. Naopak v pozdějších fázích dochází k urychlení vývoje tukových buněk. Zatím není jasné, proč se role vápníku takto mění.

Intracelulární kalcium hraje důležitou roli také v dalších metabolických chorobách jako je arteriální hypertenze, hypertrofie levé komory srdeční či inzulinová rezistence a hyperinzulinémie, které jsou běžně sdruženy s obezitou. Zdá se, že porucha v regulaci hladiny intracelulárního vápníku je společným jmenovatelem všech těchto chorob [129]. Úprava zvýšené hladiny Ca^{2+} v buňkách vedla k jejich klinickému zlepšení [130].

Mléčné výrobky mají většinou znatelně větší účinek na množství tělesného tuku než samotný vápník, a to jak u myší, tak u člověka. Mechanismus působení ani aktivní složka nejsou zatím jasné, ale regulace se odehrává spíše na úrovni metabolické než na úrovni vstřebávání tuků. Bioaktivní složky jsou prisuzovány hlavně syrovátkové frakci. Bílkoviny syrovátky obsahují vysoké procento (cca 26%) rozvětvených aminokyselin (valin, leucin, isoleucin). Tyto aminokyseliny hrají významnou úlohu v syntéze bílkovin a

jako energetické substráty. Jejich vysoké koncentrace, a leucinu zvláště, v mléčných výrobcích mohou být důležité pro přerozdělování energie z tukové tkáně do svalu, a tak přispívat ke zvýšení beztukové tělesné hmoty a snížení množství tělesného tuku [117].

Bílkoviny syrovátky dále působí inhibičně na ACE (angiotenzin konvertující enzym) a aktivátor FAS (syntáza mastných kyselin) [125]. Ve většině dosavadních studií nebyl zjišťován možný vliv příjmu fosfátů v mléčných výrobcích na energetický metabolismus. V minulosti byl prokázán určitý termogenní efekt fosfátu [131], dokonce se na trhu objevila i některá dietetika s obsahem fosfátů mající za cíl zabránit vzniku energetické úspornosti v průběhu redukčních diet.

Ze všech těchto poznatků vyplývá důležitost dostatečného příjmu vápníku jak v prevenci obezity, tak při její léčbě. Vyloučení mléčných výrobků z redukční diety může být jeden z důvodů jejího selhání.

1.4.3. Retinoidy

Dalším faktorem, u kterého je zvažován vliv na obezitu, je vitamín A a jeho deriváty (retinoidy). Tyto látky jsou nepostradatelné pro řadu pochodů v lidském organismu, např. pro embryonální vývoj, reprodukci, hematopoézu, zrak a diferenciaci epitelálních a mesenchymálních buněk. Z nedávno provedených studií vyplývá, že se mohou podílet také na regulaci tukových zásob, a to díky ovlivnění diferenciaci adipocytů, termogeneze a oxidace tuků. Pro zrak je hlavním retinoidem retinol, většinu ostatních funkcí zprostředkovává kyselina retinová (RA, z angl. retinoic acid), která se vyskytuje ve dvou biologicky aktivních izomerech - *all-trans* RA a *9-cis* RA [132]. Biologická aktivita retinoidů je modulována pomocí jaderných receptorů. Existují dva typy těchto receptorů: RAR (z angl. retinoic acid receptor) a RXR (z angl. retinoid-X receptor); oba mají 3 podtypy: α , β a γ . RAR je aktivován *all-trans* retinovou kyselinou, což je hlavní produkt intracelulární oxidace vitamínu A. Aby došlo k indukci transkripce, musí RAR nejprve vytvořit heterodimer s RXR. RXR je aktivován *9-cis* RA a tvoří jak homodimery, tak heterodimery, a to nejen s RAR, ale i s řadou dalších jaderných receptorů, jako je receptor pro vitamín D, receptory pro thyroidální hormony a PPAR [133]. Odlišení těchto dvou drah aktivace (RAR a RXR) má velký význam při hledání látek využitelných v léčbě obezity či diabetu 2. typu. Situace je ovšem komplikována tím, že i *9-cis* RA může aktivovat RAR a *all-trans* RA je schopna izomerizace na *9-cis* RA ve většině doposud

studovaných buněčných typů, čímž může ovlivnit aktivitu RXR. Jak bílá tak hnědá tuková tkáň obsahují RAR i RXR receptory; zastoupeny jsou také v kosterní svalovině, což i jí činí citlivou k účinku retinoidů.

Nejdůležitější místo v metabolismu retinoidů mají játra, která koordinují jejich skladování i homeostázu. Ve formě retinylesterů je zde uloženo přibližně 50-80% z celkového množství retinoidů [134]. Hepatocyty hydrolyzují retinylestery na retinol, ten je pak v endoplazmatickém retikulu navázán na RBP (z angl. retinol-binding protein) a sekretován do krevního řečiště. Také bílá a hnědá tuková tkáň jsou důležité pro skladování retinoidů, dohromady obsahují 15-20% jejich zásob, ale hrají také aktivní roli v jejich mobilizaci a transportu [135]. Retinol je pro tukovou tkáň získáván dvěma způsoby – buď hydrolýzou retinylesterů obsažených v chylomikronech (prostřednictvím lipoproteinové lipázy) anebo je adipocyty vychytáván přímo z krve, kde cirkuluje navázaný na RBP. Do cílových buněk se retinol dostává prostřednictvím CRBP (z angl. cellular retinol-binding protein). Komplex retinol-CRBP je považován za optimální substrát jak pro esterifikaci, tak pro oxidaci na retinovou kyselinu. Kyselina retinová je v krvi vázána na albumin anebo vzniká oxidací retinolu přímo ve tkáni. Tuková tkáň obsahuje kyselinu retinovou v obdobných koncentracích jako játra, což vzhledem k celkovému množství tukové tkáně může být důležité pro metabolismus RA.

Bylo prokázáno, že kyselina retinová inhibuje diferenciaci adipocytů. Poprvé byl tento efekt pozorován v roce 1980 [136]. Přidání *all-trans* RA k buněčným liniím preadipocytů vedlo k potlačení akumulace lipidů a molekulárních znaků adipogeneze (např. lipoproteinové lipázy). Na druhou stranu existují studie, ve kterých nízké dávky *all-trans* RA diferenciaci adipocytů stimulovaly [137]. Novější studie používající ligandy specifické pro RAR nebo RXR odhalily, že adipogeneze je inhibována agonisty RAR, zatímco agonisté RXR diferenciaci adipocytů podporují [138; 139]. Zdá se, že výsledný efekt závisí na poměru kyseliny retinové a dostupných RAR a RXR receptorů a také na stupni diferenciaci, stejně jako tomu bylo v případě vápníku. V souhrnu lze říci, že *in vitro* studie podporují klíčovou roli kyseliny retinové jak v časných, tak pozdních fázích adipogeneze. Obdobných studií *in vivo* zatím není mnoho. Myši krmené dietou s deficitem vitamínu A měly mírně zvýšenou váhu, ale značně zvýšené množství tuku, které korelovalo s vyšší expresí PPAR γ v bílé tukové tkáni [140]. Léčba těchto myší kyselinou *all-trans* retinovou vedla k redukci tělesné hmotnosti a „tučnosti“, což korelovalo se snížením exprese transkripčních faktorů adipogeneze ve WAT. Podobně krysy dlouhodobě

krmené dietou doplněnou vitamínem A vykazovaly nižší množství tuku a nižší expresi a sérové koncentrace leptinu [141]. I přes výrazný efekt retinoidů na diferenciaci adipocytů *in vitro* nejsou přirozené ani syntetické retinoidy působící přes RAR zatím využívány k léčbě obezity. Příčinou je častý výskyt dyslipidémie, který je pozorován např. při terapii akné a psoriázy kyselinou all-*trans* retinovou. Pro svůj antiproliferativní efekt je RA účinná také v léčbě promyelocytární leukémie. Látky, které by selektivně aktivovaly RAR v tukové tkáni bez zásahu do ostatních drah, však zatím nebyly vyvinuty [133].

Během několika posledních let došlo k průlomům ve využití agonistů RXR (rexinoidů) k léčbě metabolických chorob, zejména diabetu mellitu 2. typu. Běžným lékem se staly thiazolidindiony, které cestou aktivace PPAR γ zvětšují populaci nově syntetizovaných adipocytů. Tyto malé adipocyty vychytávají triacylglyceroly z krevního řečiště účinněji než větší adipocyty. Dochází také k modulaci sekrece resistinu, TNF α a adiponektinu. Díky tomu se zvyšuje citlivost k insulinu [142]. Účinky podobné thiazolidindionům (snížení hyperglykémie, hypertriglyceridémie a hyperinsulinémie) byly pozorovány u myši po aplikaci syntetických aktivátorů RXR [133]. F. Facchini [143] studoval vztah mezi příjmem vitamínu A a inzulínovou rezistencí. Čím vyšší byl příjem vitamínu A, tím vyšší byla citlivost na inzulín. U jedinců s příjmem vitamínu A nad 10 000 IU/den byla zjištěna signifikantně nižší glykémie.

Na rozdíl od thiazolidindionů aktivátory RXR snižují tělesnou hmotnost a jejich působení je rozšířeno na více tkání (důležitým cílem jsou např. svaly a játra). Aktivace RXR však může mít díky heterodimerizaci i s jinými nukleárními receptory než je PPAR γ také škodlivé účinky. Mezi nejčastější komplikace patří hypertriglyceridémie a hypothyreóza. Poněkud nečekaná hypertriglyceridémie není způsobena zvýšenou produkcí triglyceridů v játrech, ale omezeným periferním zpracováním VLDL (z angl. very low density lipoproteins) [144]. Molekulární podklad hypothyreózy způsobené agonisty RXR není zcela jasný. Podávání rexinoidů snižuje TSH, zřejmě díky napodobení inhibičních zpětnovazebných signálů [133]. Další vývoj rexinoidů jako léků pro metabolické choroby by měl pokračovat směrem k molekulám s více specifickým účinkem, zachovávajícím aktivaci PPAR γ /RXR a PPAR α /RXR, ale inaktivním vůči ostatním heterodimerům i homodimerům.

Kyselina all-*trans* retinová či syntetické retinoidy v hnědé tukové tkáni indukují transkripci UCP1 [145]. Také obohacení diety vitamínem A vede k indukci UCP1 [141]; naopak deficit vitamínu A má za následek snížení jeho exprese v hnědé tukové tkáni

[146]. Gen pro UCP1 je regulován nejen přes RAR, ale také přes RXR. Navíc kyselina retinová působí přímo na UCP1 (protein) v mitochondriích. Retinoidy ovlivňují i expresi UCP2 a UCP3. Byla prokázána indukce exprese UCP2 agonisty RXR v hnědotukových adipocytech [147] a kyselinou retinovou v buněčných kulturách myocytů [148]. Zároveň kyselina retinová (stejně jako v případě UCP1) přímo stimuluje aktivitu UCP2 [149]. Zvýšení exprese UCP3 po podání retinoidů bylo popsáno jak *in vitro* [150], tak *in vivo* (při krátkodobé aplikaci kyseliny retinové i při chronickém podávání vitamínu A [151]). Vliv vitamínu A na hmotnost i expresi UCP2 jsme sledovali také v našich studiích – viz kapitoly 3.5 a 3.6.

2. CÍLE PRÁCE

- i) Ověřit vliv genetických faktorů na hladiny steroidních hormonů (tj. hormonálních ukazatelů distribuce tukové tkáně) před i po redukci hmotnosti pomocí VLCD a zhodnotit změny v jejich hladinách v důsledku této hmotnostní redukce.
- ii) Posoudit roli genetických faktorů v regulaci RQ a určit, zda RQ působí na výkyvy tělesné hmotnosti.
- iii) Na myším modelu ověřit vliv hladovění na metabolické vlastnosti epididymální a podkožní tukové tkáně a zjistit, zda AMPK a UCP2 hrají roli v regionálně odlišné metabolické odpovědi WAT na hladovění.
- iv) Zhodnotit efekt podávání n-3 PUFA na redukci hmotnosti, regionální distribuci tukové tkáně a složení mastných kyselin v séru.
- v) Zhodnotit vliv vitamínu A na tělesnou hmotnost a energetický metabolismus u obézních pacientů.
- vi) Zjistit, zda se zvýšení příjmu vitamínu A odrazí ve změně energetického výdeje, oxidace substrátů a exprese vybraných genů energetického a lipidového metabolismu v tukové tkáni obézních pacientů.
- vii) Ověřit vliv vápníku na tělesnou hmotnost.
- viii) Stanovit, zda psychobehaviorální a nutriční parametry mají vztah k úspěšnosti komplexní léčby obezity zahrnující podávání sibutraminu.

3. VÝSLEDKY PŘEDLOŽENÝCH PRACÍ

3.1. Vliv dědičnosti na hladiny steroidních hormonů v séru – efekt negativní energetické bilance u obézních jednovaječných dvojčat

Hainer, V., Kunešová, M., Stunkard, A.J., Pařízková, J., Štich, V., Mikulová, R., and Stárka, L. (2001) The within-pair resemblance in serum levels of androgens, sex hormone-binding globulin and cortisol in female obese identical twins - effect of negative energy balance induced by very low calorie diet. Horm. Metab. Res. 33, 417-422

Genetické faktory velkou měrou ovlivňují jak tělesnou hmotnost a distribuci tukové tkáně, tak její odpověď na změny energetické bilance. Regulace rozložení tukové hmoty se účastní mimo jiné kortizol a androgeny [11]. Proto je možné, že změny v sekreci steroidních hormonů částečně zprostředkovávají příznivý vliv negativní energetické bilance na distribuci tělesného tuku. Cílem této práce bylo na modelu monozygotních dvojčat zhodnotit změny v hladinách steroidních hormonů v séru v závislosti na redukci hmotnosti po léčbě velmi přísnou nízkoenergetickou dietou (VLCD) a pomocí eventuálních korelací uvnitř párů dvojčat ozřejmit vliv genotypu na hladiny steroidů a SHBG (z angl. *sex hormone-binding globulin*).

Dvanáct párů obézních jednovaječných dvojčat se zúčastnilo redukčního pobytu za hospitalizace v délce 40 dnů. Jednalo se o premenopauzální ženy s pravidelným menstruačním cyklem. Jejich věk byl $39,4 \pm 7,4$ let, BMI $34,9 \pm 8,2$ kg/m², hmotnost $96,2 \pm 21,9$ kg. Výkyvy hmotnosti po dobu čtyř měsíců před zahájením studie nepřevyšovaly 2 kg. Jedenáct párů žilo odděleně 10-25 let, pouze jeden pár žil před zahájením studie společně. Pobyt byl rozdělen do tří částí: 1) 7 dní - adaptace na nemocniční prostředí a vstupní vyšetření, 2) 28 dní - vlastní redukční režim 3) 5 dní - závěrečná vyšetření po redukci hmotnosti. Redukční režim spočíval především v podávání VLCD Redita[®] [152] o energetickém obsahu 1 600 kJ/den (obsah bílkovin 37 g, sacharidů 50 g a tuků 3,8 g). Na začátku a na konci hospitalizace byla provedena tato vyšetření: antropometrie a hydrodenzitometrie k určení tělesného složení, ultrazvukové vyšetření k zjištění množství intraabdominální tukové tkáně. Pacientkám byla odebrána krev ke stanovení hladiny kortizolu, testosteronu, dehydroepiandrosteronu (DHEA) dehydroepiandrosteronsulfátu (DHEA-S) a SHBG v séru.

Podávání VLCD vedlo k signifikantnímu snížení všech antropometrických ukazatelů i ke snížení tukové hmoty a beztukové hmoty (Tabulka 1). Změny v ukazatelích rozložení tukové tkáně (obvodu pasu a sagitálním abdominálním rozměru ve výši L4/5) korelovaly uvnitř párů dvojčat pouze hraničně. Významná nitropárová podobnost byla nalezena při posouzení ztráty intraabdominálního tuku. V důsledku redukce hmotnosti došlo k vzestupu testosteronu a SHBG, zatímco hladiny kortizolu, DHEA a DHEA-S v séru nebyly významně změněny (Tabulka 3). Signifikantní korelace uvnitř párů dvojčat před i po léčbě VLCD byly pozorovány u DHEA-S a testosteronu, u kortizolu měřeného v 7 hodin (před léčbou) a u kortizolu měřeného ve 21 hodin (po léčbě) a DHEA (Tabulka 2). Co se týče změny sérových hladin většiny měřených hormonů v závislosti na VLCD, signifikantně korelovaly pouze změny kortizolu v 7, 13 a 21 hodin a změny hladiny SHBG (Tabulka 3, Graf 1 a 2).

S výjimkou testosteronu nebyla nalezena významná asociace mezi změnami v hladinách steroidů a SHBG v séru a změnami v tělesném složení a distribuci tukové tkáně. Zvýšení hladiny testosteronu v séru bylo nepřímo úměrné beztukové tělesné hmotě.

Signifikantní korelace uvnitř párů jednovaječných dvojčat prokázaná u androgenů a kortizolu ukazuje na roli genetických faktorů v regulaci jejich hladin v séru. Naopak v případě regulace bazální hladiny SHBG hraje genotyp pravděpodobně pouze malou roli, neboť korelace nebyla zjištěna. Výsledky této studie vedou mimo jiné k závěru, že faktory kontrolující bazální hladiny kortizolu a SHBG jsou odlišné od faktorů ovlivňujících jejich reakci na negativní bilanci vyvolanou VLCD.

3.2. Respirační kvocient u obézních: souvislost se schopností udržet hmotnostní pokles a s výskytem obezity u rodičů.

Hainer, V., Kunešová, M., Pařízková, J., Štich, V., Mikulová, R., and Slabá, Š. (2000) Respiratory quotient in obesity: Its association with an ability to retain weight loss and with parental obesity. Sb. Lek. 101, 99-104

Vysoký respirační kvocient je spojen s rizikem vzestupu váhy u obézních osob [58]. Prvním cílem této studie bylo zjistit, jakou roli hraje stupeň oxidace tuků (vyjádřený respiračním kvocientem) v náchylnosti k opětovnému zvýšení hmotnosti po její redukci. Druhým cílem bylo zhodnotit roli genetických faktorů ve schopnosti oxidovat tuky, neboť bylo zjištěno, že vysoký příjem tuků v potravě je spojen s přírůstkem hmotnosti u obézních

osob pouze v případě, že se obezita vyskytovala i u jejich rodičů [153].

V první části této práce byli studováni obézní pacienti léčení po dobu 4 týdnů velmi přísnou nízkenergetickou dietou (Redita[®], viz kapitola 3.1). Ve druhém, třetím a čtvrtém týdnu léčby byl stanoven RMR a RQ nalačno metodou nepřímé kalorimetrie; pro vyhodnocení byly použity průměrné hodnoty z těchto měření. Pacienti byli dále sledováni po dobu 2 let a podle změn tělesné hmotnosti kvalifikováni jako: „weight losers“ - udrželi váhový úbytek, „weight regainers“ - znovu zvýšili svou hmotnost, „weight cyclers“ - prodělali alespoň 2 cykly snížení a následného zvýšení hmotnosti o více než 10kg, na rozdíl od „weight non-cyclers“. Základní charakteristiky souboru jsou prezentovány v Tabulce 1. Signifikantně vyšší RQ během léčby VLCD byl pozorován u „weight regainers“ v porovnání s „weight losers“ a u „weight cyclers“ v porovnání s „weight non-cyclers“. Vysoký RQ nalačno tak představuje metabolickou abnormalitu, která předpovídá opětovné zvýšení váhy a kolísání hmotnosti. Naopak RMR vyjádřený na kilogram beztukové tělesné hmoty neovlivnil změny hmotnosti sledovaných jedinců (Tabulka 3).

V druhé části této studie zaměřené na genetický podklad obezity byli pacienti rozděleni do čtyř skupin na základě anamnézy obezity u rodičů: 1) obezita u matky, 2) obezita u otce, 3) obezita u obou rodičů, 4) rodiče nebyli obézní. Mezi jednotlivými skupinami nebyly významné rozdíly v průměrném věku, hmotnosti a BMI (viz Tabulka 2). Metodou nepřímé kalorimetrie byl zjištěn RMR a RQ. Průměrný denní příjem energie a makronutrientů byl vypočten na základě 7-denního jídelníčku. Tělesné složení bylo změřeno pomocí bioimpedance. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 4 a 5. Mezi jednotlivými skupinami se nepodařilo prokázat rozdíl v RMR. RQ byl však signifikantně vyšší ve skupinách s obézní matkou nebo oběma rodiči. Pacienti s obezitou u obou rodičů se také 3,3-krát častěji vyskytovali v horním kvintilu RQ než v dolním kvintilu RQ, na rozdíl od pacientů bez rodinné anamnézy obezity, u kterých tomu bylo naopak. Tyto výsledky podporují vliv dědičných faktorů na schopnost oxidovat tuky u obézních osob.

3.3. Role AMP-aktivované proteinové kinázy v rozdílné metabolické odpovědi epididymální a dorsolumbální tukové tkáně na hladovění

Šponarová, J., Mustard, K.J., Horáková, O., Flachs, P., Rossmeisl, M., Brauner, P., Bardová, K., Thomason-Hughes, M., Braunerová, R., Janovská, P., Hardie, D.G., and Kopecký, J. (2005) Involvement of AMP-activated protein kinase in fat depot-specific metabolic changes during starvation. FEBS Lett. 579, 6105-6110

Distribuce tukové tkáně do značné míry ovlivňuje její metabolické vlastnosti a tak představuje nejdůležitější rizikový faktor vzniku komplikací obezity (jak metabolických tak kardiovaskulárních) [154]. Ovšem mechanismy, které jsou zodpovědné za rozdíly v metabolismu jednotlivých dep bílé tukové tkáně, nejsou dosud dobře objasněny.

V této práci jsme se zaměřili na srovnání dorsolumbálního podkožního tuku a epididymálního tuku z hlediska jejich rozdílné odpovědi na hladovění. Naše předchozí studie na myších s ektopickou expresí UCP1 v bílé tukové tkáni prokázaly pokles mitochondriálního membránového potenciálu, pokles exprese adipogenních genů, stimulaci oxidace lipidů a zvýšenou mitochondriální biogenezi, a se všemi těmito změnami související aktivaci AMPK [155–157]. Práce jiných autorů přisuzují AMPK regulační roli v odpovědi bílého tuku na působení fyzické námahy, thiazolidindionů, adiponektinu a leptinu [158–160]. Cílem této práce proto bylo ověřit, zda AMPK způsobuje změny v energetickém a lipidovém metabolismu adipocytů i v závislosti na hladovění, a zda rozdílná odpověď zmíněných tukových dep může být způsobena rozdílnou aktivací AMPK.

Studie byla provedena na 3-4 měsíčních myších samcích kmene C57BL/6J chovaných za standardních podmínek (20°C, světelný režim 12-12, voda a standardní dieta *ad libitum*). S ohledem na přirozené stravovací návyky myši (příjem potravy zejména na počátku temnostní fáze, během světelné fáze potravu prakticky nepřijímají) je obtížné vytvořit definované podmínky pro krátkodobé hladovění. Proto byly provedeny dva nezávislé experimenty. V prvním experimentu bylo žrádlo myším odebíráno průběžně (skupiny hladovějící 6, 12 a 24 hodin) tak, aby hladovění skončilo ve všech skupinách mezi 9. a 10. hodinou ráno. Ve druhém schématu bylo žrádlo myším odebráno na počátku temnostní fáze a po 6 hodinách byl experiment ukončen. Abychom odlišili odpověď organismu na hladovění od možné odpovědi na nižší teplotu okolí (delší hladovění způsobuje pokles energetického výdeje i tělesné teploty), byla v tomto případě jedna skupina myši chována v termoneutrálním prostředí (30°C). Myším byla odebrána krev a depa dorsolumbálního a epididymálního tuku. V krvi byla stanovena hladina volných mastných kyselin. Tuková depa byla zvážena a ve fragmentech bylo provedeno měření oxidace a syntézy mastných kyselin. Z alikvotů tkání byla vyizolována RNA a metodou PCR v reálném čase byla stanovena exprese UCP2, SREBP-1 (z angl. *sterol regulatory element-binding protein*), FAS a PEPCCK (z angl. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*; klíčový enzym glyceroneogeneze). Pomocí imunoblotů (podíl fosforylované a celkové

formy enzymu) a kinázového testu (inkorporace radioaktivně značeného fosfátu do molekuly umělého peptidu) byla stanovena aktivita AMPK α 1. Ta byla dále nepřímo potvrzena stanovením míry fosforylace klíčového regulačního enzymu biosyntézy a oxidace mastných kyselin, acetyl-CoA karboxylázy (ACC).

V prvním experimentu hladovění způsobilo progresivní pokles tělesné hmotnosti a pokles hmotnosti dorsolumbálního tukového depa. V souladu s předpokládaným zvýšením lipolýzy v tukové tkáni byl pozorován nárůst hladiny plazmatických volných mastných kyselin. Překvapivě zejména v gonadálním tuku bylo zjištěno snížení exprese SREBP-1 a FAS a nárůst exprese UCP2 a PEPCK, pokles syntézy mastných kyselin a naopak zvýšená oxidace oleátu. Na úrovni kinázového testu, fosforylace AMPK i fosforylace ACC byl v gonadálním tuku pozorován statisticky významný nárůst aktivity AMPK. Tento nárůst byl potvrzen v obou uspořádáních experimentu, a to bez ohledu na okolní teplotu.

V této studii jsme potvrdili hypotézu, že dorsolumbální a epididymální depa bílé tukové tkáně rozdílně odpovídají na hladovění, přičemž změny metabolismu se projevují více v epididymálním tuku, zatímco úbytek hmotnosti v dorsolumbálním tuku. Změny v epididymálním tuku jsou doprovázeny odpovídající aktivací AMPK. Regulace metabolismu tuků a glukózy prostřednictvím AMPK tak může přispívat k regionálním rozdílům metabolických vlastností bílé tukové tkáně, a následně k rozvoji zdravotních komplikací obezity. Zvýšení exprese UCP2 v epididymální WAT může být jak příčinou, tak následkem aktivace AMPK.

3.4. Vliv n-3 polynenasycených mastných kyselin a velmi přísné nízkenergetické diety na snížení hmotnosti a složení mastných kyselin v séru u obézních žen

*Kunešová, M., Braunerová, R., Hlavatý, P., Tvrzická, E., Staňková, B., Škrha, J., Hilgertová, J., Hill, M., Kopecký, J., Wagenknecht, M., Hainer, V., Matoulek, M., Pařízková, J., Žák, A., and Svačina, Š. (2005) The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet (VLCD) during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. *Physiol. Res. in press**

Polynenasycené mastné kyseliny řady n-3 zvyšují oxidaci lipidů u zdravých lidí [161]. Podávání n-3 PUFA laboratorním zvířatům potencuje účinek kalorické restrikce na tělesnou hmotnost a vede k přednostní ztrátě epididymálního tuku [111; 112; 162]. Cílem

této studie bylo porovnat vliv VLCD s přidáním n-3 PUFA s účinkem samostatné VLCD na pokles hmotnosti, antropometrických parametrů a složení mastných kyselin v séru u lidských pacientů.

Soubor tvořilo 20 obézních žen, které po náhodném výběru dostávaly buď VLCD + n-3 PUFA nebo VLCD + placebo. Skupiny se významně nelišily v BMI ani věku (Tabulka 1). Po jednom týdnu ambulantní eukalorické stabilizace následovaly 3 týdny vlastního redukčního programu za hospitalizace. Během těchto 3 týdnů byla pacientkám podávána VLCD Redita[®] o energetickém obsahu 2200 kJ/den (obsah bílkovin 40 g, sacharidů 70 g a tuků 9 g) a n-3 nenasycené mastné kyseliny v dávce 2,8 g/den (Omega 3 forte[®]; EPA a DHA v poměru 2:1; k prevenci peroxidace mastných kyselin byl přidán vitamin E v dávce 0,9 mg/500 mg) nebo VLCD a placebo (fyziologický roztok). Pacientkám byla doporučena mírná fyzická aktivita v trvání cca 60 min/den. Vzorky krve byly odebrány na začátku a 3., 7. a 21. den redukčního programu. Analýza mastných kyselin v lipidové frakci séra byla (pomocí plynové chromatografie) provedena na začátku a 21. den. Množství tělesného tuku bylo určeno antropometricky a bioimpedancí. Změřen byl též obvod pasu, boků a sagitální abdominální rozměr.

Snížení BMI i obvodu boků bylo signifikantně vyšší ve skupině s přidávanými n-3 PUFA (Tabulka 1). V této skupině bylo také výraznější zvýšení β -hydroxybutyrátu (Graf 1), což ukazuje na vyšší ketogenezi. Zvýšení β -hydroxybutyrátu silně korelovalo se zvýšením kyseliny arachidonové (AA) v sérových fosfolipidech (PL), triglyceridech (TG) i esterech cholesterolu (CE) (Graf 2D). Zvýšení EPA a DHA v TG i PL séra potvrzuje vysokou compliance pacientek k léčbě n-3 PUFA. Vzestup DHA v PL signifikantně koreloval s poklesem BMI (Graf 3B). Ve skupině s n-3 PUFA došlo rovněž k významnému snížení kyseliny palmitoolejové (16:1n-7) a kyseliny vakcenové (18:1n-7) v sérových triglyceridech.

Hlavními závěry této studie je, že přidání n-3 PUFA k VLCD 1) významně prohlubuje pokles BMI a obvodu boků obézních žen a 2) vede k významně vyššímu vzestupu β -hydroxybutyrátu v séru. Ke stimulaci ketogeneze dochází pravděpodobně díky zvýšení oxidace mastných kyselin. Signifikantní korelace mezi poklesem BMI a vzestupem kyseliny dokosahexaenové v sérových fosfolipidech svědčí o tom, že právě tato kyselina je aktivní substancí v použitém přípravku n-3 PUFA.

3.5. Vliv vitamínu A na klidový energetický výdej a respirační kvocient u obézních pacientů

Mikulová-Braunerová, R., Hainer, V., Kunešová, M., Pařízková, J., Slabá, Š, and Wagenknecht, M. (2003) Influence of vitamin A consumption on resting metabolic rate and fasting respiratory quotient in severely obese subjects. Med. Princ. Pract. 12, 189-92

Retinoidy mohou hrát roli v regulaci tukových zásob, a to prostřednictvím ovlivnění termogeneze, oxidace tuků a diferenciací adipocytů. Vzhledem k účasti na regulaci energetického metabolismu by bylo teoreticky možné využít je k léčbě obezity. Cílem této práce proto bylo zjistit, zda množství přijímaného vitamínu A může ovlivnit ukazatele energetického metabolismu a oxidace substrátů u obézních jedinců.

Studie se zúčastnilo 239 obézních jedinců (hmotnost $110,2 \pm 22,7$ kg, BMI $39,1 \pm 7,5$ kg/m²) středního věku ($42,9 \pm 12$ let) sledovaných na našem pracovišti. U všech pacientů bylo změřeno množství tělesného tuku a beztukové hmoty pomocí bioimpedance a provedena antropometrie. Metodou nepřímé kalorimetrie byl stanoven klidový energetický výdej a respirační kvocient. Průměrný denní příjem energie, vitamínu A, tuků, sacharidů a bílkovin byl kalkulován z týdenních záznamů pomocí počítačového programu „Výživa“. Z příjmu makronutrientů byl vypočten FQ („food quotient“, tj. RQ teoreticky produkované dietou).

Pacienti byli podle příjmu vitamínu A rozděleni do kvintilů. Průměrný příjem vitamínu A v celé skupině byl 670 ± 430 IU/den; jedinci v horním kvintilu měli příjem vitamínu A >842 IU/den, jedinci v dolním kvintilu <382 IU/den. Klidový energetický výdej a respirační kvocient po 16-ti hodinovém hladovění byly srovnatelné v obou skupinách (Tabulka 2). To znamená, že se nepodařilo prokázat korelaci mezi příjmem vitamínu A na jedné straně a klidovým energetickým výdejem a respiračním kvocientem na straně druhé, a to ani po adjustaci na věk. Statisticky významné rozdíly nebyly také nalezeny v BMI, hmotnosti, množství tělesného tuku, obvodu pasu (Tabulka 1) a FQ (Tabulka 2). Jedinci v horním kvintilu přijímaného vitamínu A vykazovali signifikantně vyšší energetický příjem než jedinci v dolním kvintilu, a to díky zvýšenému příjmu všech tří základních živin (Tabulka 2). Statisticky signifikantní zvýšení bylo prokázáno u příjmu bílkovin a sacharidů, ale ne u tuků.

Ačkoliv je o roli retinoidů v energetickém metabolismu publikována řada prací,

nám se nepodařilo prokázat, že by příjem vitamínu A ovlivňoval klidový energetický výdej či respirační kvocient u obézních jedinců. Hmotnost v obou skupinách byla srovnatelná, přestože jedinci s vyšším příjmem vitamínu A měli vyšší energetický příjem.

3.6. Vliv vitamínu A na klidový energetický výdej a expresi UCP2 a FAS

Braunerová, R., Hainer, V., Kunešová, M., Pařízková, J., Wagenknecht, M., Šponarová, J., and Kopecký, J. (2003) The effect of vitamin A on energy metabolism and the expression of UCP2 and FAS genes. Int. J. Obes. 27 (Suppl. 1), 44 (Abstrakt z konference 12th European Congress on Obesity, 2003, Helsinky, Finsko)

V této studii jsme pokračovali v ověřování hypotézy o vlivu retinoidů na energetický metabolismus, ovšem tentokrát se jednalo o intervenční studii, kdy jsme podávali vitamin A v tabletové formě. Cílem bylo zjistit, zda takto zvýšený příjem vitamínu A vede ke změnám v klidovém energetickém výdeji, v oxidaci substrátů (vyjádřené respiračním kvocientem) a v expresi některých genů se vztahem k energetickému metabolismu a metabolismu tuků - UCP2 a FAS. FAS byla zvolena jako klíčový enzym biosyntézy mastných kyselin, UCP2 pro svou asociaci s množstvím tukové hmoty a REE.

Vyšetřovaný soubor tvořilo 9 obézních žen s těmito základními charakteristikami: věk $39,8 \pm 4,6$ let, hmotnost $99,0 \pm 4,9$ kg, BMI $36,4 \pm 1,7$ kg/m². Hlavním požadavkem pro zařazení do studie byl snížený příjem vitamínu A (< 500 IU/den) v zaznamenaném 7-denním jídelníčku. Aby nedošlo ke zkreslení výsledků, byly ze studie vyloučeny pacientky léčené anorektiky, β -blokátory, thyroideálními hormony a kortikoidy.

Studie probíhala 4 týdny, po tuto dobu byl pacientkám perorálně podáván vitamin A v dávce 30 tisíc IU denně. Veškerá vyšetření byla provedena dvakrát, tj. před zahájením a po skončení podávání vitamínu A. Zahrnovala antropometrické měření, stanovení množství tělesného tuku pomocí bioimpedance a stanovení hladiny vitamínu A a vitamínu E v krevním séru metodou HPLC (z angl. high performance liquid chromatography). Klidový energetický výdej a respirační kvocient byly určeny metodou nepřímé kalorimetrie. Týdenní jídelníček zapsaný pacientkami byl vyhodnocen pomocí počítačového programu "Výživa". Vzorky podkožní tukové tkáně z abdominální oblasti byly získány jehlovou biopsií v lokální anestezii 1% Mesocainem. Expresie UCP2 a FAS byla stanovena metodou PCR v reálném čase.

Po 4-týdenním podávání vitamínu A došlo k statisticky významnému zvýšení RMR/kg FFM (Tabulka 1, Graf 1). Změny v expresi UCP2 a FAS nebyly statisticky významné, ačkoli byl pozorován trend exprese UCP2 k nárůstu (Tabulka 2, Graf 2) a FAS k poklesu (Graf 4, Tabulka 2). RQ se nezměnilo, stejně jako hladina retinolu a γ -tokoferolu v séru (Tabulka 1).

Zvýšený příjem vitamínu A vedl k významnému zvýšení klidového energetického výdeje přepočteného na kilogram beztukové tělesné hmoty. Vliv na RQ a expresi UCP2 a FAS se v rámci této studie prokázat nepodařilo. Výsledky naznačují roli vitamínu A v regulaci energetického metabolismu.

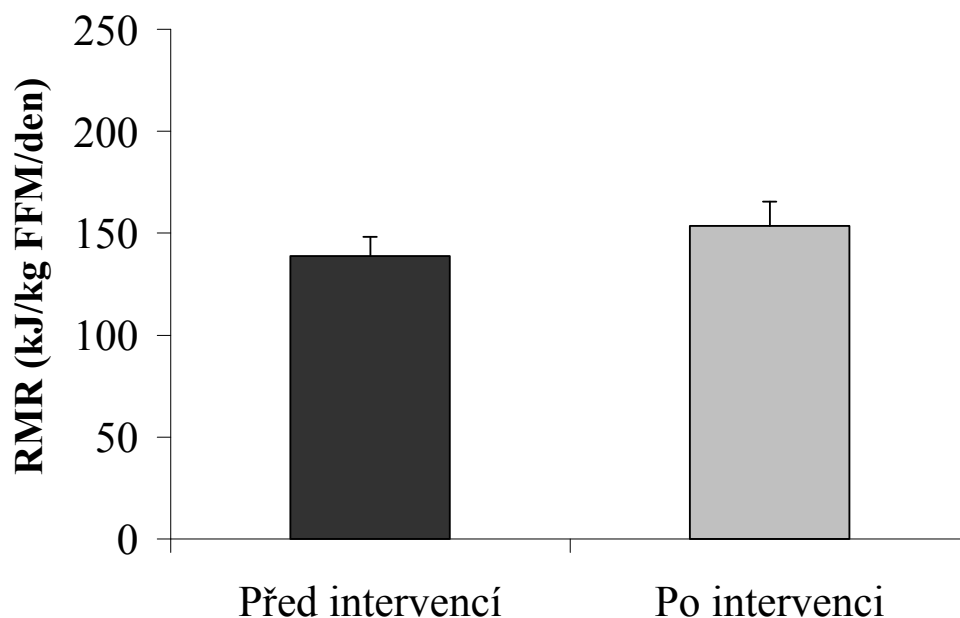
Tabulka 1 -Vliv vitamínu A na RMR, RQ a hladiny retinolu a γ -tokoferolu v séru

	Před intervencí	Po intervencí
RMR (kJ/den)	6649 \pm 200	6954 \pm 169
RMR (kJ/kg FFM/den)	139,0 \pm 9,2	153,7 \pm 11,9
RQ	0,82 \pm 0,02	0,82 \pm 0,02
Retinol v séru (μg/ml)	0,50 \pm 0,03	0,53 \pm 0,04
γ –tokoferol v séru (μg/ml)	1,99 \pm 0,24	2,01 \pm 0,27

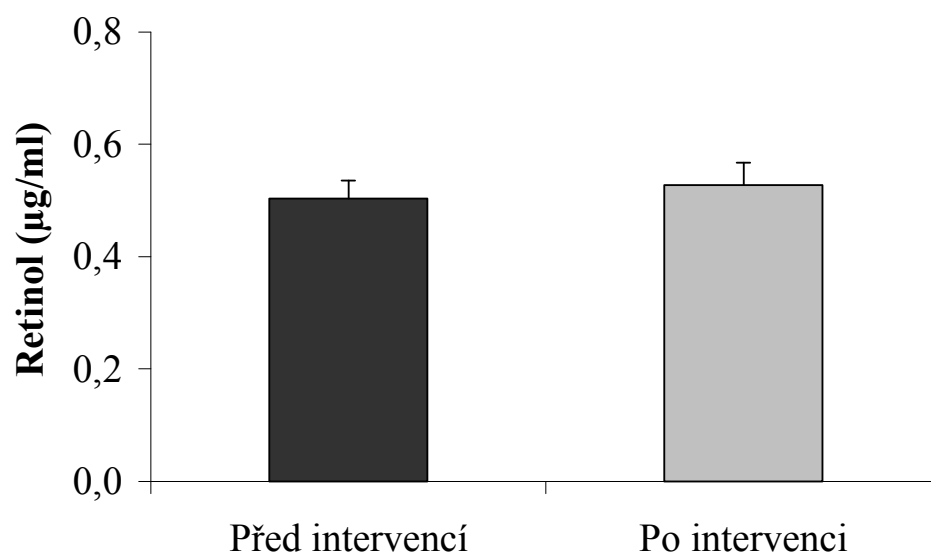
Tabulka 2 - Vliv vitamínu A na expresi UCP2 a FAS

	Před intervencí	Po intervencí
Expresie UCP2 (A.U.)	4,23 \pm 0,81	4,73 \pm 0,94
Expresie FAS (A.U.)	7,77 \pm 1,08	7,40 \pm 1,19

Graf 1 – Vliv vitamínu A na klidový energetický výdej přepočtený na kilogram beztukové tělesné hmoty

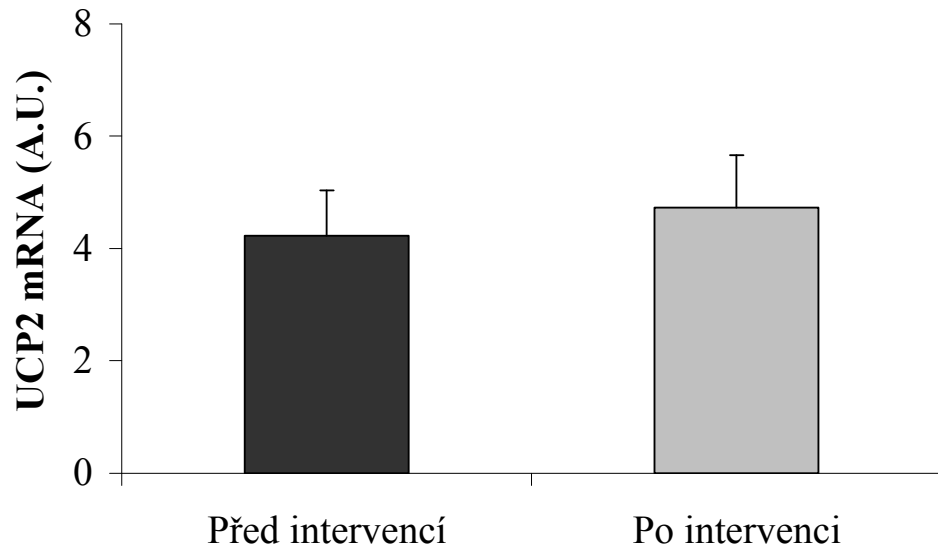


Graf 2 – Vliv vitamínu A na hladinu retinolu v séru

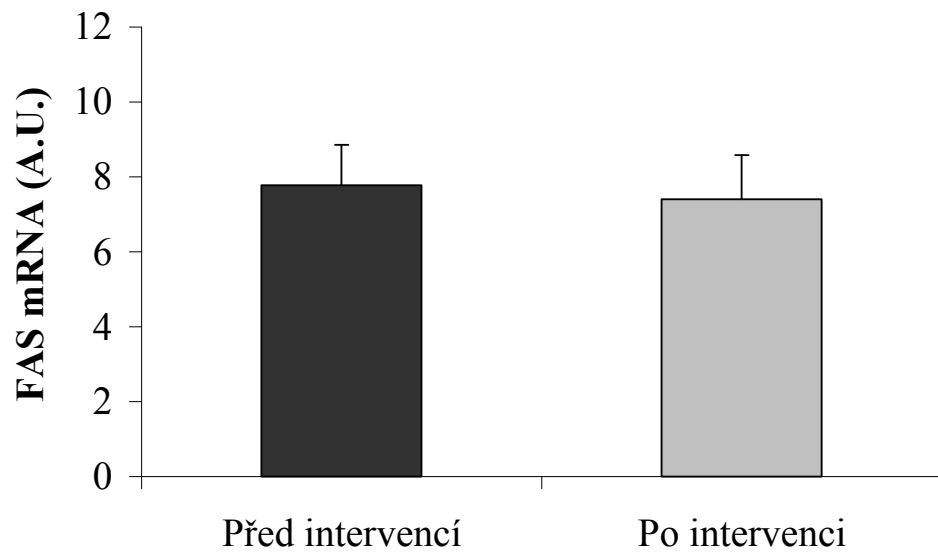


Klidový energetický výdej byl stanoven nalačno metodou nepřímé kalorimetrie, beztuková tělesná hmotnost bioimpedancí. Hladina vitamínu A v séru byla stanovena pomocí HPLC. Hodnoty představují průměr z 9 pacientů ± SE. Rozdíl v RMR/kg FFM je statisticky významný ($p=0,029$), rozdíl v hladině retinolu na hladině 0,05 významný není.

Graf 3 – Vliv vitamínu A na expresi UCP2 v podkožním tuku



Graf 4 – Vliv vitamínu A na expresi FAS v podkožním tuku



Množství UCP2 a FAS mRNA bylo stanoveno metodou RNA v reálném čase. Hodnoty představují průměr z 9 pacientů \pm SE. Žádný z rozdílů není statisticky významný na hladině 0,05.

3.7. Vliv příjmu vápníku a makronutrientů na hmotnost obézních pacientů

Kabrnová, K., Braunerová, R., Aldhoon, B., Hlavatý, P., Wagenknecht, M., Kunešová, M., Pařízková, J., and Hainer, V. (2004) Association of changes in macronutrient and calcium intakes with body weight change in obese subjects. Int. J. Obes. 28 (Suppl. 1), 138 (Abstrakt z konference 13th European Congress on Obesity, 2004, Praha)

Vztah mezi příjmem vápníku a regulací tělesné hmotnosti prokázala řada experimentálních prací. Výsledky klinických studií ovšem nejsou jednoznačné. Naším cílem proto bylo přispět k objasnění vlivu vápníku na hmotnost u obézních pacientů. Sledována byla asociace změn hmotnosti se změnami v příjmu vápníku a v příjmu makronutrientů.

Soubor tvořilo 208 obézních jedinců (BMI $40,0 \pm 7,6 \text{ kg/m}^2$, hmotnost $112,8 \pm 25,6 \text{ kg}$, věk $46,7 \pm 12,3$), kteří byli sledováni během 3-6 měsíců komplexního programu redukce hmotnosti na našem pracovišti. Na základě vypočteného celkového energetického výdeje byla pacientům předepsána dieta o energetickém deficitu 500 kcal/den. Dále jim byla doporučena pohybová aktivita (chůze) v trvání půl hodiny denně. Pacienti pravidelně zaznamenávali svůj jídelníček a jednou měsíčně absolvovali konzultaci s dietní sestrou. Na začátku a na konci redukčního programu byl stanoven příjem energie a nutrientů na základě týdenního jídelníčku vyhodnoceného pomocí počítačového programu „Výživa“.

Komplexní redukční program vedl k významnému snížení jak hmotnosti, tak příjmu energie, všech tří typů makronutrientů a fosforu. Stejná tendence byla patrná v příjmu vápníku (Tabulka 1). Změna tělesné hmotnosti negativně korelovala se změnami v příjmu vápníku a bílkovin a pozitivně se změnami v příjmu tuků a fosforu (Tabulka 2). Mezi změnami v příjmu sacharidů a změnami hmotnosti nebyla nalezena signifikantní korelace.

V souboru 208 obézních pacientů byl zjištěn negativní vztah mezi změnami příjmu vápníku a bílkovin a změnami tělesné hmotnosti. Naopak pozitivní vztah ke změnám hmotnosti v odpověď na negativní energetickou bilanci byl potvrzen v případě příjmu tuků a fosforu.

Tabulka 1. Hmotnost a příjem nutrientů před a po redukčním režimu

	Před redukci	SE	Po redukci	SE	Rozdíl	SD	<i>p</i>
Hmotnost (kg)	112,8	1,8	106,7	1,7	6,1	0,6	<0,001
Energie (kJ/den)	8192	211	6183	140	2009	195	<0,001
Sacharidy (g/den)	252,3	6,3	198,7	4,9	53,6	6,4	<0,001
Tuky (g/den)	70,5	2,3	48,3	1,6	22,2	2,11	<0,001
Bílkoviny (g/den)	70,4	1,6	64,0	1,2	6,4	1,5	<0,001
Fosfor (mg/den)	1222	28,6	1015	17,4	207	26,0	<0,001
Vápník (mg/den)	695	22,5	631	17,4	64	24,5	NS

Tabulka 2. Korelace mezi změnami hmotnosti a změnami v příjmu nutrientů

	r	p
Vápník	- 0,210	0,003
Fosfor	0,195	0,006
Bílkoviny	- 0,289	0,000
Tuky	0,220	0,002
Sacharidy	-0,023	0,750

3.8. Psychobehaviorální a nutriční faktory ovlivňující snížení hmotnosti u obézních žen léčených sibutraminem

Hainer, V., Kunešová, M., Bellisle, F., Hill, M., Braunerová, R., Wagenknecht M., and STO Study Group (2005) Psychobehavioral and nutritional predictors of weight loss in obese women treated with sibutramine. Int. J. Obes. 2, 208-16

Na snížení hmotnosti i její udržení mají kromě genetických a metabolických faktorů vliv i faktory psychobehaviorální a nutriční. Psychobehaviorální charakteristiky hrají klíčovou roli v dodržování redukčního režimu, a tak významně ovlivňují úspěšnost léčby. Výhodou je jejich snadné zjištění i vyhodnocení. Tato studie měla za cíl posoudit, zda vstupní BMI, psychobehaviorální ukazatele (skóre deprese, hladu, disinhibice a restraint skóre) a nutriční charakteristiky (příjem energie a makronutrientů) mohou předpovědět snížení hmotnosti po čtyřech a dvanácti měsících redukčního programu a zda jejich změny ovlivní změny BMI. Redukční program spočíval v nízkoenergetické dietě, zvýšené pohybové aktivitě, kognitivně behaviorální terapii a podávání sibutraminu.

Studie se zúčastnilo 80 obézních žen (věk $43,9 \pm 10,6$ let, BMI $36,7 \pm 4,8$ kg/m²). První 4 měsíce pobíhala dvojitě slepá, placebem kontrolovaná fáze. Po randomizaci dostávalo 38 pacientek sibutramin (v dávce 10 mg/den) a 42 placebo. Poté následovala otevřená fáze, kdy byl sibutramin podáván všem pacientkám do konce 12. měsíce. Pacientkám byla doporučena dieta o energetickém obsahu 5-6 MJ/den, s 50-60 % energie ze sacharidů, 15-20 % z bílkovin a 25-30 % z tuků. Dále byly pacientky poučeny o vhodnosti zvýšení pravidelné fyzické aktivity o minimálně 30 min chůze 5krát týdně. Na začátku studie a na konci 4. a 12. měsíce pacientky vyplnily tříložkový dotazník jídelních zvyklostí a dotazník na zjištění skóre deprese podle Becka. Ve stejných měsících zaznamenaly také týdenní jídelníček, který byl vyhodnocen pomocí počítačového programu „Výživa“. Antropometrie, krevní tlak a puls byly měřeny každý měsíc, stejně jako byly zjišťovány vedlejší účinky. EKG a odběry krve byly provedeny na začátku studie a na konci 4., 8, a 12. měsíce.

Jak je vidět na Grafu 1, hmotnost ve 4. měsíci se významně snížila jak v sibutraminové, tak placebové skupině, nicméně ve skupině pacientek léčených sibutraminem byla signifikantně vyšší (9,0 versus 4,9 kg, $p < 0,001$). Také na konci 12. měsíce byla hmotnost významně nižší než na začátku studie, a to v obou skupinách. Léčba sibutraminem rovněž vedla k poklesu hladiny triglyceridů a aterogenního indexu. K

signifikantním změnám došlo také ve všech parametrech EI i v BDI (Graf 2). Restraint skóre se zvýšilo, zatímco skóre disinhibice a hladu se snížilo. Změny byly opět více vyjádřeny ve skupině pacientek užívajících sibutramin. Od začátku do konce studie došlo ke snížení průměrného příjmu energie o 1729 kJ/den (tj. o 23 %). Poklesl také příjem tuků i jejich podíl na energetickém příjmu. Rovněž množství bílkovin v potravě se zmenšilo, ale jejich podíl na energetickém příjmu byl naopak vyšší než na začátku studie. Snížení BMI na konci 4. měsíce bylo signifikantně ovlivněno způsobem léčby a vstupním BMI, zatímco se vstupním restraint skóre byl nalezen hraniční negativní vztah (Tabulka 1). Prediktory snížení hmotnosti na konci 12. měsíce byly vstupní BMI, skóre deprese, restraint skóre a celkový energetický příjem (Tabulka 2). Pokud byl posuzován vztah mezi snížením BMI a změnami ve všech vyšetřovaných psychobehaviorálních a nutričních ukazatelích na konci 12. měsíce, jediným signifikantním faktorem asociovaným s BMI zůstal pokles skóre disinhibice.

Tato studie naznačuje možnost využití psychobehaviorálních a nutričních parametrů jako prediktorů poklesu tělesné hmotnosti při komplexním programu léčby obezity zahrnujícím podávání sibutraminu.

4. ZÁVĚRY

- i) Uvnitř párů jednovaječných dvojčat byly nalezeny významné korelace v hladinách androgenů a kortizolu v séru, což poukazuje na významný vliv genetických faktorů na jejich regulaci. Signifikantní asociace mezi změnami v hladinách steroidů a změnami tělesného složení byla prokázána pouze v případě testosteronu.
- ii) Pacienti s obézní matkou či oběma rodiči měli významně zvýšený respirační kvocient nalačno, což podporuje vliv dědičnosti na schopnost oxidovat tuky. Vysoký respirační kvocient během léčby VLCD znamenal zvýšené riziko opětovného přibývání na váze a riziko kolísání hmotnosti.
- iii) Odpověď jednotlivých dep WAT na hladovění se liší. Dochází mimo jiné k odlišné aktivaci AMPK (patrná pouze v epididymálním a nikoli v podkožním tuku), která může přispívat k metabolickým rozdílům jednotlivých tukových dep. V epididymálním tuku došlo také ke 4-násobně vyšší stimulaci exprese UCP2 než v tuku podkožním, což může s aktivací AMPK souviset.
- iv) Podávání n-3 PUFA obézním pacientkám při léčbě obezity pomocí VLCD významně zvýšilo pokles BMI, pokles obvodu boků a stimulaci ketogeneze.
- v) Souvislost mezi množstvím přijatého vitamínu A a úrovní klidového energetického výdeje či respiračního kvocientu u obézních osob se v této studii nepodařilo prokázat.
- vi) Podávání vitamínu A obézním pacientům vedlo ke statisticky významnému zvýšení klidového energetického výdeje přepočteného na kilogram beztukové tělesné hmoty; RQ se významně nezměnil. Na metabolické úrovni byl pozorován statisticky nevýznamný nárůst exprese UCP2 a pokles exprese FAS v podkožním depu bílé tukové tkáně
- vii) Změny v příjmu vápníku během redukčního programu byly nepřímě úměrné změnám tělesné hmotnosti.
- viii) Tato studie naznačuje možné využití psychobehaviorálních a nutričních parametrů jako prediktorů poklesu tělesné hmotnosti. A dále, komplexní léčba obezity

zahrnující farmakologickou léčbu sibutraminem vedla k významným změnám psychobehaviorálních (poklesu skóre deprese, hladu a disinhibice a zvýšení restraint skóre) i nutričních parametrů (pokles celkového energetického příjmu a příjmu tuků a bílkovin).

5. DISKUSE

Předložené práce prezentují výsledky výzkumu zaměřeného na etiopatogenezi obezity, a to zejména na genetické a nutriční faktory ovlivňující energetickou bilanci, během různých typů redukčních režimů s ohledem na následné využití v léčbě obezity. Většina prací je klinických, pouze jedna studie byla provedena v rámci primárního výzkumu.

Genetické faktory ovlivňující hormonální ukazatele distribuce tukové tkáně jsme posuzovali na modelu jednovaječných dvojčat při redukčním režimu pomocí velmi přísné nízkoenergetické diety. Čtyřtýdenní léčba VLCD vedla k významnému snížení hmotnosti a všech sledovaných antropometrických parametrů. V důsledku VLCD došlo k významnému vzestupu hladiny testosteronu a SHBG v séru. Hodnoty SHBG po léčbě byly nepřímo úměrné obvodu pasu a sagitálnímu abdominálnímu rozměru ve výši L4/5 jakožto měřítkům intraabdominálního tuku. V souladu se závěry Pasqualiho studie by vzestup SHBG mohl být ukazatelem zlepšení metabolických rizik obezity. Bazální hladina SHBG je pravděpodobně regulována jinými mechanismy než odpověď SHBG na energetický deficit, neboť změny v SHBG významně korelovaly uvnitř párů dvojčat, zatímco jeho hladiny nikoli. Významná role dědičnosti byla prokázána také pro bazální hladinu testosteronu v séru. Na rozdíl od jiné studie, která použila model dlouhodobé negativní energetické bilance navozené fyzickou aktivitou [13], ovšem VLCD vedla ke zvýraznění nitropárové podobnosti. Pod vlivem genetických faktorů je rovněž hladina DHEA-S v séru obézních žen, a to jak před, tak po léčbě VLCD. Zajímavým nálezem byla také významná korelace uvnitř párů dvojčat ve změnách hladiny kortizolu v séru.

Genetické faktory mají vliv také na energetický metabolismus a oxidaci tuků. Nám se podařilo prokázat vztah mezi pozitivní rodinnou anamnézou obezity a RQ, důležitá byla zejména obezita u matky. Pacienti s touto anamnézou měli vyšší RQ, a tedy sníženou schopnost oxidace tuků. To znamená, že jsou oproti jedincům bez výskytu obezity u rodičů náchylnější k přibývání na váze při zvýšeném příjmu tuků. RQ je pravděpodobně ovlivněn i množstvím tělesného tuku, nám se však vztah mezi RQ a obsahem tuku nepodařilo prokázat, zřejmě proto, že všichni námi sledovaní pacienti měli zmnožené množství tuku. Naopak jsme potvrdili souvislost mezi zvýšeným RQ a rizikem kolísání váhy. Pacienti s vyšším RQ během léčby VLCD byli predisponováni k opětovnému zvýšení hmotnosti po její redukci a k jo-jo fenoménu. K podobným závěrům došel také Valtuena [27].

V rozvoji metabolických komplikací obezity hraje důležitou roli distribuce tukové tkáně. V našem experimentu byl potvrzen rozdíl v metabolické odpovědi epididymálního (viscerálního) a dorsolumbálního (subkutánního) depa WAT na hladovění. K výraznějším metabolickým změnám došlo v epididymální tukové tkáni, na druhou stranu v dorsolumbálním depu byl patrný větší pokles hmotnosti. Možné vysvětlení tohoto paradoxu naznačuje rozdílná indukce exprese PEPCCK – zvýšená reesterifikace mastných kyselin v epididymálním tuku zabraňuje rychlejšímu ubývání tukových rezerv, a to i přes relativně vyšší úroveň lipolýzy. Důvod zdánlivě zbytečného cyklického odbourávání a syntézy lipidů není jasný, ale předpokládáme, že tak epididymální tuk může hrát roli mobilizovatelného zdroje energie schopného velmi rychle odpovídat na akutní energetické potřeby organismu. Za rozdílnou odpověď tukových dep by mohla odpovídat AMP-aktivovaná proteinová kináza. V epididymálním depu jsme pozorovali rovněž nárůst exprese UCP2. UCP2 by mohl vést k aktivaci AMPK díky snížení mitochondriálního membránového potenciálu a poměru ATP/ADP. Ovšem na druhou stranu, zvýšení exprese UCP2 by mohlo být naopak důsledkem aktivace AMPK [81]. Jiným vysvětlením je, že zvýšení UCP2 může být mechanismus chránící buňky před cytotoxickým působením zvýšené hladiny mastných kyselin nebo kyslíkových radikálů.

Jak již bylo uvedeno, úspěšnost léčby obezity ovlivňují kromě genetických a metabolických faktorů také faktory nutriční a psychobehaviorální. Jedním z nutričních faktorů sledovaných v rámci této dizertační práce jsou n-3 PUFA. Je známo, že u lidí zvyšují n-3 PUFA oxidaci tuků [161]. V naší studii došlo po přidání n-3 PUFA k VLCD k výraznějšímu poklesu BMI a obvodu boků u obézních pacientek. Zároveň byla patrná i vyšší elevace hladiny β -hydroxybutyrátu v séru. Důvodem byla pravděpodobně vyšší oxidace mastných kyselin, která také zprostředkovává účinek n-3 PUFA na snížení triglyceridů [163]. Pozorované zvýšení hladiny kyseliny arachidonové mohlo být způsobeno jak zvýšeným uvolňováním z tukové tkáně, tak sníženým metabolismem (prokázáno u krys) [164]. Zvýšení AA během VLCD a snížení po jejím skončení u lidí popsal Phiney [165]. U skupiny s n-3 PUFA byla patrná tendence k výraznějšímu snížení hladiny fibrinogenu, což se shoduje s jejich popisovanými protizánětlivými účinky [166].

V rámci výzkumu nutričních parametrů jsme se dále zaměřili na retinoidy. O nich je známo, že mají vliv na diferenciaci adipocytů, termogenezi a oxidaci tuků [167; 168]. Dále bylo publikováno, že mohou zvyšovat expresi i biochemickou aktivitu uncoupling proteinů [168]. Nám se však při vyhodnocení údajů od 239 obézních pacientů nepodařilo

prokázat korelaci mezi příjmem vitamínu A a klidovým energetickým výdejem ani respiračním kvocientem. Příčinou by mohlo být nepřesné zaznamenání příjmu potravy. Jiným vysvětlením je, že retinoidy mohou mít vliv spíše na dietou indukovanou termogenezi než na klidový energetický výdej. Tomu napovídá i zjištění, že ačkoli pacienti v horním kvintilu příjmu vitamínu A měli signifikantně vyšší příjem energie, nebyla jejich hmotnost vyšší než u pacientů s nižším příjmem vitamínu A a energie. Výsledky jsme chtěli ověřit při intervenční studii, kdy byly obézní pacientky suplementovány vitamínem A. U pacientek došlo ke zvýšení klidového energetického výdeje, které bylo po přepočtu na kilogram beztukové tělesné hmoty statisticky významné. Zajímá nás také vliv zvýšeného příjmu vitamínu A na expresi UCP2 a syntázy mastných kyselin, tedy genů účastnících se regulace energetického a lipidového metabolismu. Zde nebyly výsledky statisticky významné. Nicméně byl patrný trend ke zvýšení exprese UCP2, a ke snížení exprese FAS, což by odpovídalo předpokládanému účinku na zvýšení termogeneze a snížení lipogeneze. Příčinou těchto statisticky nesignifikantních výsledků by mohla být vysoká variabilita sledovaných biologických parametrů při relativně malém souboru.

Dalším zkoumaným nutričním faktorem je vápník. O jeho příznivém působení na energetický metabolismus, udržení tělesné hmotnosti či redukci nadváhy byla publikována řada studií, zejména z pracoviště M. Zemela [116; 117; 120]. Na druhou stranu existují práce, které vztah vápníku k obezitě nenalezly. Proto jsme se chtěli zaměřit na souvislost mezi příjmem vápníku a změnami hmotnosti u našich pacientů během komplexního redukčního programu. Sledovali jsme také změny v příjmu fosforu a makronutrientů. Během 3-6 měsíčního programu došlo ke snížení hmotnosti, energetického příjmu i příjmu sledovaných mikronutrientů a makronutrientů. Podařilo se prokázat, že změna hmotnosti nepřímo korelovala s příjmem vápníku a bílkovin a přímo korelovala s příjmem tuků a fosforu. Výsledky jsou tedy v souladu s hypotézou o vlivu vápníku na tělesnou hmotnost. Co se týče příznivého vlivu bílkovin, dospěli jsme k obdobnému závěru jako ve studii s redukčním režimem zahrnujícím podávání sibutraminu (viz dále).

V poslední studii zahrnuté do této dizertační práce jsme se snažili zjistit, zda je možné psychobehaviorální a nutriční parametry využít pro předpověď úspěšnosti komplexní léčby obezity. Redukční režim zahrnoval mimo jiné podávání sibutraminu. Ve studii STORM [169] bylo zjištěno, že na výsledný pokles hmotnosti má vliv vstupní váha, pohlaví, věk, RMR, kouření, předchozí pokusy o redukci váhy a věk při rozvoji obezity. V naší práci jsme prokázali, že restraint skóre, skóre deprese a celkový energetický příjem lze použít jako prediktory hmotnostního poklesu. Např. restraint skóre

ovlivnilo pokles hmotnosti jak po 4 měsících léčby, tak po 1 roce. Při vyšším restraint skóre byla menší pravděpodobnost snížení váhy, zatímco v některých jiných studiích byla naopak jeho vyšší hodnota spojena s lepšími výsledky redukčního programu [170; 171]. Mohlo by to být způsobeno tím, že naši pacienti s vyšším restraint skóre již drželi dietu a do určité míry snížili svou váhu ještě před začátkem studie. Proto během léčby nedosáhli takových úbytků hmotnosti jako ti, kteří začali svůj příjem potravy kontrolovat (a zvýšili restraint skóre) až během studie. Také depresivní nálada hraje roli v úspěšnosti léčby obezity. Vysoké skóre deprese představovalo negativní prognostický faktor pro redukci váhy. Na druhou stranu po komplexní léčbě došlo k poklesu tohoto skóre. Z nutričních faktorů předpovídal nižší váhový pokles vysoký celkový energetický příjem před zahájením studie. Očekávaným výsledkem byl vztah mezi poklesem váhy a snížením příjmu tuků. Příčinou pozitivní asociace příjmu bílkovin a snížení hmotnosti mohlo být jak zvýšení pocitu sytosti, tak zvýšení postprandiální termogeneze. Závěrem lze shrnout, že psychobehaviorální a nutriční charakteristiky mohou být použity pro predikci úbytku hmotnosti v důsledku komplexního redukčního režimu se sibutraminem.

6. LITERATURA

1. (1998) Obesity-preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. WHO/NUT/NCD, Geneva.
2. Comuzzie, A.G. and Allison, D.B. (1998) The search for human obesity genes. *Science* 280, 1374-1377
3. Aldhoon B., Bendlová, B., and Hainer, V. (2005) Úloha genetických faktorů při hmotnostní redukci. *DMEV* 5-11
4. Perusse, L., Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., Walts, B., Snyder, E.E., and Bouchard, C. (2005) The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes. Res.* 13, 381-490
5. Hainer, V. (2004) *Základy klinické obezitologie*. Grada Publishing, a.s., Praha.
6. Stunkard, A.J., Harris, J.R., Pedersen, N.L., and McClearn, G.E. (1990) The body-mass index of twins who have been reared apart. *N. Engl. J. Med.* 322, 1483-1487
7. Bouchard, C., Tremblay, A., Despres, J.P., Nadeau, A., Lupien, P.J., Theriault, G., Dussault, J., Moorjani, S., Pinault, S., and Fournier, G. (1990) The response to long-term overfeeding in identical twins. *N. Engl. J. Med.* 322, 1477-1482
8. Bouchard, C., Tremblay, A., Despres, J.P., Theriault, G., Nadeau, A., Lupien, P.J., Moorjani, S., Prudhomme D., and Fournier, G. (1994) The response to exercise with constant energy intake in identical twins. *Obes. Res.* 400-410
9. Hainer, V., Stunkard, A.J., Kunešová, M., Pařízková, J., Štich, V., and Allison, D.B. (2000) Intrapair resemblance in very low calorie diet-induced weight loss in female obese identical twins. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24, 1051-1057
10. Bouchard, C., Rice, T., Lemieux, S., Despres, J.P., Perusse, L., and Rao, D.C. (1996) Major gene for abdominal visceral fat area in the Quebec Family Study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 20, 420-427

11. Björntorp, P., Holm, G., and Rosmond, R. (1999) The pathogenesis of metabolic syndrome. *In: Progress in obesity research* (Guy-Grand, B. and Ailhaud, G., Eds.), pp. 555-565. J. Libbey, London.
12. Krotkiewski, M., Toss, L., Björntorp, P., and Holm, G. (1981) The effect of a very-low-calorie diet with and without chronic exercise on thyroid and sex hormones, plasma proteins, oxygen uptake, insulin and c peptide concentrations in obese women. *Int. J. Obes.* 5, 287-293
13. Pritchard, J., Despres, J.P., Gagnon, J., Tchernof, A., Nadeau, A., Tremblay, A., and Bouchard, C. (1999) Plasma adrenal, gonadal, and conjugated steroids following long-term exercise-induced negative energy balance in identical twins. *Metabolism* 48, 1120-1127
14. Leenen, R., van der, K.K., Seidell, J.C., Deurenberg, P., and Koppeschaar, H.P. (1994) Visceral fat accumulation in relation to sex hormones in obese men and women undergoing weight loss therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 1515-1520
15. Pasquali, R., Gambineri, A., Biscotti, D., Vicennati, V., Gagliardi, L., Colitta, D., Fiorini, S., Cognigni, G.E., Filicori, M., and Morselli-Labate, A.M. (2000) Effect of long-term treatment with metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with and without the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2767-2774
16. Meikle, A.W., Bishop, D.T., Stringham, J.D., and West, D.W. (1986) Quantitating genetic and nongenetic factors that determine plasma sex steroid variation in normal male twins. *Metabolism* 35, 1090-1095
17. Meikle, A.W., Stringham, J.D., Woodward, M.G., and Bishop, D.T. (1988) Heritability of variation of plasma cortisol levels. *Metabolism* 37, 514-517
18. Linkowski, P., Van Onderbergen, A., Kerkhofs, M., Bosson, D., Mendlewicz, J., and Van Cauter, E. (1993) Twin study of the 24-h cortisol profile: evidence for genetic control of the human circadian clock. *Am. J. Physiol.* 264, E173-E181

19. Kirschbaum, C., Wust, S., Faig, H.G., and Hellhammer, D.H. (1992) Heritability of cortisol responses to human corticotropin-releasing hormone, ergometry, and psychological stress in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 1526-1530
20. Stock, M.J. (1998) Energy balance and animal models of obesity. *In: Clinical obesity* (Kopelman, P.G. and Stock, M.J., Eds.), pp. 50-72. Blackwell Science Ltd..
21. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671
22. Schutz, Y. and Jéquier, E. (1998) Resting energy expenditure, thermic effect of food, and total energy expenditure. *In: Handbook of obesity* (Bray, G.A., Bouchard, C., and James, W.P.T., Eds.), pp. 443-455. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong.
23. Schrauwen, P., Walder, K., and Ravussin, E. (1999) Human uncoupling proteins and obesity. *Obes. Res.* 7, 97-105
24. Weinsier, R.L., Schutz, Y., and Bracco, D. (1992) Reexamination of the relationship of resting metabolic rate to fat-free mass and to the metabolically active components of fat-free mass in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 790-794
25. Arciero, P.J., Goran, M.I., and Poehlman, E.T. (1993) Resting metabolic rate is lower in women than in men. *J. Appl. Physiol.* 75, 2514-2520
26. Benedek, C., Berclaz, P.Y., Jéquier, E., and Schutz, Y. (1995) Resting metabolic rate and protein turnover in apparently healthy elderly Gambian men. *Am. J. Physiol.* 268, E1083-E1088
27. Valtuena, S., Salas-Salvado, J., and Lorda, P.G. (1997) The respiratory quotient as a prognostic factor in weight-loss rebound. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21, 811-817
28. MacDonald, I.A. (1998) Energy expenditure in humans: the influence of activity, diet and the sympathetic nervous system. *In: Clinical obesity* (Kopelman, P.G. and Stock, M.J., Eds.), pp. 112-128. Blackwell Science Ltd..

29. Weinsier, R.L., Bracco, D., and Schutz, Y. (1993) Predicted effects of small decreases in energy expenditure on weight gain in adult women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 17, 693-700
30. Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652-660
31. Landsberg, L. and Young, J.B. (1978) Fasting, feeding and regulation of the sympathetic nervous system. *N. Engl. J. Med.* 298, 1295-1301
32. MacDonald, I.A. (1995) Advances in our understanding of the role of the sympathetic nervous system in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 19 Suppl 7, S2-S7
33. Monroe, M.B., Seals, D.R., Shapiro, L.F., Bell, C., Johnson, D., and Parker, J.P. (2001) Direct evidence for tonic sympathetic support of resting metabolic rate in healthy adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E740-E744
34. Bell, C., Petitt, D.S., Jones, P.P., and Seals, D.R. (2003) Influence of adiposity on tonic sympathetic support of resting metabolism in healthy adults. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27, 1315-1318
35. Alvarez, G.E., Beske, S.D., Ballard, T.P., and Davy, K.P. (2002) Sympathetic neural activation in visceral obesity. *Circulation* 106, 2533-2536
36. Blaak, E.E., van Baak, M.A., Kester, A.D., and Saris, W.H. (1995) Beta-adrenergically mediated thermogenic and heart rate responses: effect of obesity and weight loss. *Metabolism* 44, 520-524
37. Barr, S.I., McCarron, D.A., Heaney, R.P., Dawson-Hughes, B., Berga, S.L., Stern, J.S., and Oparil, S. (2000) Effects of increased consumption of fluid milk on energy and nutrient intake, body weight, and cardiovascular risk factors in healthy older adults. *J. Am. Diet. Assoc.* 100, 810-817
38. Huttunen, P., Hirvonen, J., and Kinnula, V. (1981) The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 46, 339-345

39. Barr, S.I. (2003) Increased dairy product or calcium intake: is body weight or composition affected in humans? *J. Nutr.* 133, 245S-248S
40. Smith, R.E., Roberts, J.C., and Hittelman, K.J. (1966) Nonphosphorylating respiration of mitochondria from brown adipose tissue of rats. *Science* **154**, 653-654
41. Lindberg, O., Peirre, J.d., and Rylander, E. (1967) Studies of the mitochondrial energy-transfer system of brown adipose tissue. *J. Cell. Biol.* **34**, 293-310
42. Heaton, G.M., Wagenvoord, R.J., Kemp, A., Jr., and Nicholls, D.G. (1978) Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* 82, 515-521
43. Ricquier, D. and Kader, J.C. (1976) Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 577-583
44. Rothwell, N.J. and Stock, M.J. (1979) A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281, 31-35
45. Harper, J.A., Dickinson, K., and Brand, M.D. (2001) Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. *Obes. Rev.* 2, 255-265
46. Nagase, I., Yoshida, T., Kumamoto, K., Umekawa, T., Sakane, N., Nikami, H., Kawada, T., and Saito, M. (1996) Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic beta 3-adrenergic agonist. *J. Clin. Invest.* 97, 2898-2904
47. Rolfe, D.F. and Brand, M.D. (1996) Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am. J. Physiol.* 271, C1380-C1389
48. Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Lévi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D., and Warden, C.H. (1997) Uncoupling protein-2: A novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* 15, 269-272

49. Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 408, 39-42
50. Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H., and Pan, G. (1999) UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett.* 443, 326-330
51. Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Gregoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Lévi-Meyrueis, C., Miroux, B., Collins, S., Seldin, M., Richard, D., Warden, C., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (1998) BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 34611-34615
52. Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 161-179
53. Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E., and Kozak, L.P. (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90-94
54. Kopecký, J., Hodný, Z., Rossmeisl, M., Syrový, I., and Kozak, L.P. (1996) Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am. J. Physiol.* 270, E768-E775
55. Nibbelink, M., Moulin, K., Arnaud, E., Duval, C., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2001) Brown fat UCP1 is specifically expressed in uterine longitudinal smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276, 47291-47295
56. Bouchard, C., Perusse, L., Chagnon, Y.C., Warden, C., and Ricquier, D. (1997) Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 gene and resting metabolic rate in humans. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1887-1889
57. Campbell, D.A., Sundaramurthy, D., Gordon, D., Markham, A.F., and Pieri, L.F. (1999) Association between a marker in the UCP-2/UCP-3 gene cluster and genetic susceptibility to anorexia nervosa. *Mol. Psychiatry* 4, 68-70

58. Astrup, A., Toubro, S., Dalgaard, L.T., Urhammer, S.A., Sorensen, T.I., and Pedersen, O. (1999) Impact of the v/v 55 polymorphism of the uncoupling protein 2 gene on 24-h energy expenditure and substrate oxidation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23, 1030-1034
59. Walder, K., Norman, R.A., Hanson, R.L., Schrauwen, P., Neverova, M., Jenkinson, C.P., Easlick, J., Warden, C.H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Ricquier, D., Silver, M.H., Shuldiner, A.R., Solanes, G., Lowell, B.B., Chung, W.K., Leibel, R.L., Pratley, R., and Ravussin, E. (1998) Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima indians. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1431-1435
60. Esterbauer, H., Schneitler, C., Oberkofler, H., Ebenbichler, C., Paulweber, B., Sandhofer, F., Ladurner, G., Hell, E., Strosberg, A.D., Patsch, J.R., Krempler, F., and Patsch, W. (2001) A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat. Genet.* 28, 178-183
61. Cassell, P.G., Neverova, M., Janmohamed, S., Uwakwe, N., Qureshi, A., McCarthy, M.I., Saker, P.J., Albon, L., Kopelman, P., Noonan, K., Easlick, J., Ramachandran, A., Snehalatha, C., Pecqueur, C., Ricquier, D., Warden, C., and Hitman, G.A. (1999) An uncoupling protein 2 gene variant is associated with a raised body mass index but not Type II diabetes. *Diabetologia* 42, 688-692
62. Barbe, P., Millet, L., Larrouy, D., Galitzky, J., Berlan, M., Louvet, J.P., and Langin, D. (1998) Uncoupling protein-2 messenger ribonucleic acid expression during very- low-calorie diet in obese premenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2450-2453
63. Bottcher, H. and Furst, P. (1997) Decreased white fat cell thermogenesis in obese individuals. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21, 439-444
64. Oberkofler, H., Dallinger, G., Liu, Y.M., Hell, E., Krempler, F., and Patsch, W. (1997) Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J. Lipid Res.* 38, 2125-2133

65. Larrouy, D., Laharrague, P., Carrera, G., Viguerie-Bascands, N., Lévi-Meyrueis, C., Fleury, C., Pecqueur, C., Nibbelink, M., André, M., Casteilla, L., and Ricquier, D. (1997) Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 760-764
66. Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 11, 809-815
67. Echtay, K.S., Roussel, D., St Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J.C., and Brand, M.D. (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96-99
68. Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., and Parker, N. (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 755-767
69. Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Gubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S., and Ricquier, D. (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26, 435-439
70. Brauner, P., Nibbelink, M., Flachs, P., Vítková, I., Kopecký, P., Mertelíková, I., Janderová, L., Pénicaud, L., Casteilla, L., Plavka, R., and Kopecký, J. (2001) Fast Decline of Hematopoiesis and Uncoupling Protein 2 Content in Human Liver after Birth: Location of the Protein in Kupffer Cells. *Pediatr. Res.* 49, 440-447
71. Armstrong, M.B. and Towle, H.C. (2001) Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic UCP-2 expression via a PPARalpha-mediated pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1197-E1204
72. Faggioni, R., Shigenaga, J., Moser, A., Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (1998) Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 75-78

73. Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Lee, Y., and Unger, R.H. (1997) Induction of uncoupling protein-2 mRNA by troglitazone in the pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 359-361
74. Chan, C.B., MacDonald, P.E., Saleh, M.C., Johns, D.C., Marban, E., and Wheeler, M.B. (1999) Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes* 48, 1482-1486
75. Chan, C.B., De Leo, D., Joseph, J.W., McQuaid, T.S., Ha, X.F., Xu, F., Tsushima, R.G., Pennefather, P.S., Salapatek, A.M., and Wheeler, M.B. (2001) Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: Mechanism of action. *Diabetes* 50, 1302-1310
76. Zhang, C.Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A.J., Boss, O., Kim, Y.B., Zheng, X.X., Wheeler, M.B., Shulman, G.I., Chan, C.B., and Lowell, B.B. (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105, 745-755
77. Patane, G., Anello, M., Piro, S., Vigneri, R., Purrello, F., and Rabuazzo, A.M. (2002) Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition. *Diabetes* 51, 2749-2756
78. Boss, O., Samec, S., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1997) Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein-2 expression in response to fasting or cold. *FEBS Lett.* 412, 111-114
79. Weigle, D.S., Selfridge, L.E., Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Cummings, D.E., Havel, P.J., Kuijper, J.L., and BeltrandelRio, H. (1998) Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. *Diabetes* 47, 298-302
80. Samec, S., Seydoux, J., and Dulloo, A.G. (1998) Interorgan signaling between adipose tissue metabolism and skeletal muscle uncoupling protein homologs: Is there a role for circulating free fatty acids? *Diabetes* 47, 1693-1698

81. Pedersen, S.B., Lund, S., Buhl, E.S., and Richelsen, B. (2001) Insulin and contraction directly stimulate UCP2 and UCP3 mRNA expression in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 19-25
82. Simoneau, J.A., Kelley, D.E., and Warden, C. (1999) Obesity and increased contractile activity influence the protein content of UCP2 in human skeletal muscle. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23 Suppl 6, S68-S71
83. Schrauwen, P., Hoppeler, H., Billeter, R., Bakker, A.H., and Pendergast, D.R. (2001) Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 449-456
84. Winder, W.W. and Hardie, D.G. (1999) AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: Possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* 277, E1-10
85. Carling, D., Fryer, L.G., Woods, A., Daniel, T., Jarvie, S.L., and Whitrow, H. (2003) Bypassing the glucose/fatty acid cycle: AMP-activated protein kinase. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1157-1160
86. Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1, 15-25
87. Nedergaard, J., Ricquier, D., and Kozak, L.P. (2005) Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Rep.* 6, 917-921
88. Brun, S., Carmona, M.C., Mampel, T., Vinas, O., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (1999) Activators of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth. *Diabetes* 48, 1217-1222
89. Brauner, P., Kopecký, P., Flachs, P., Ruffer, J., Sebroň, V., Plavka, R., Vítková, I., Vorlíček, J., and Kopecký, J. (2003) Induction of uncoupling protein 3 gene expression in skeletal muscle of preterm newborns. *Pediatr. Res.* 53, 691-697

90. Brun, S., Carmona, M.C., Mampel, T., Vinas, O., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (1999) Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids. *FEBS Lett.* 453, 205-209
91. Boss, O., Samec, S., Kuhne, F., Bijlenga, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Giacobino, J.P., and Muzzin, P. (1998) Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J. Biol. Chem.* 273, 5-8
92. Boss, O., Samec, S., Desplanches, D., Mayet, M.H., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1998) Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *FASEB J.* 12, 335-339
93. Pedraza, N., Solanes, G., Carmona, M.C., Iglesias, R., Vinas, O., Mampel, T., Vazquez, M., Giralt, M., and Villarroya, F. (2000) Impaired expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle during lactation: Fibrates and troglitazone reverse lactation-induced downregulation of the uncoupling protein-3 gene. *Diabetes* 49, 1224-1230
94. Schrauwen, P., Hesselink, M.K., Blaak, E.E., Borghouts, L.B., Schaart, G., Saris, W.H., and Keizer, H.A. (2001) Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50, 2870-2873
95. Hesselink, M.K., Mensink, M., and Schrauwen, P. (2003) Human uncoupling protein-3 and obesity: an update. *Obes. Res.* 11, 1429-1443
96. Clapham, J.C., Arch, J.R., Chapman, H., Haynes, A., Lister, C., Moore, G.B., Piercy, V., Carter, S.A., Lehner, I., Smith, S.A., Beeley, L.J., Godden, R.J., Herrity, N., Skehel, M., Changan, K.K., Hockings, P.D., Reid, D.G., Squires, S.M., Hatcher, J., Trail, B., Latcham, J., Rastan, S., Harper, A.J., Cadenas, S., Buckingham, J.A., Brand, M.D., and Abuin, A. (2000) Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406, 415-418

97. Schrauwen, P., Xia, J., Bogardus, C., Pratley, R.E., and Ravussin, E. (1999) Skeletal muscle uncoupling protein 3 expression is a determinant of energy expenditure in Pima Indians. *Diabetes* 48, 146-149
98. Schrauwen, P. and Hesselink, M. (2002) UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J. Exp. Biol.* 205, 2275-2285
99. Huppertz, C., Fischer, B.M., Kim, Y.B., Kotani, K., Vidal-Puig, A., Sliker, L.J., Sloop, K.W., Lowell, B.B., and Kahn, B.B. (2001) Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 276, 12520-12529
100. Foster, G.D., Wadden, T.A., Swain, R.M., Stunkard, A.J., Platte, P., and Vogt, R.A. (1998) The Eating Inventory in obese women: clinical correlates and relationship to weight loss. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22, 778-785
101. Adami, G.F., Gandolfo, P., Meneghelli, A., Gianetta, E., Camerini, G., and Scopinaro, N. (1996) Preoperative eating behavior and weight-loss following gastric banding for obesity. *Obes. Surg.* 6, 244-246
102. Westerterp-Plantenga, M.S., Kempen, K.P., and Saris, W.H. (1998) Determinants of weight maintenance in women after diet-induced weight reduction. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22, 1-6
103. Hainer, V., Kunešová, M., Bellisle, F., Pařízková, J., Braunerová, R., Wagenknecht, M., Lajka, J., Hill, M., and Stunkard, A.J. (2006) The eating inventory, body adiposity and prevalence of diseases in a quota sample of Czech adults. *Int. J. Obes.*
104. Womble, L.G., Williamson, D.A., Greenway, F.L., and Redmann, S.M. (2001) Psychological and behavioral predictors of weight loss during drug treatment for obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 340-345
105. Delahanty, L.M., Meigs, J.B., Hayden, D., Williamson, D.A., and Nathan, D.M. (2002) Psychological and behavioral correlates of baseline BMI in the diabetes prevention program (DPP). *Diabetes Care* 25, 1992-1998

106. Beck, A.T., Ward, C.H., Mendelson, M., Mock, J., and Erbaugh, J. (1961) An inventory for measuring depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 4, 561-571
107. Bray, G.A., Nielsen, S.J., and Popkin, B.M. (2004) Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 537-543
108. Žák, A., Tvrzická, E., Zeman, M., and Vecka, M. (2005) Patofyziologie a klinický význam vícenenasycených mastných kyselin řady n-3. *Cas. Lek. Cesk.* 144 Suppl 1, 6-18
109. Kopecký, J., Flachs, P., Bardová, K., Brauner, P., Pražák, T., and Šponarová, J. (2002) Modulation of lipid metabolism by energy status of adipocytes: implications for insulin sensitivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 88-101
110. Kopecký, J., Rossmeisl, M., Flachs, P., Kmoch S., Bardová K., Brauner, P., Matějková, O., Šponarová, J., Pražák, T., Thomason-Hughes, M., and Hardie, G.D. (2003) UCP1 expression in white adipose tissue and lipid metabolism. *In: Prog. Obes. Res.* 9 (Medeiros-Neto, G., Halpern, A., and Bouchard, C., Eds.), pp. 214-219. John Libbey Eurotext Ltd..
111. Růžičková, J., Rossmeisl, M., Pražák, T., Flachs, P., Šponarová, J., Vecka, M., Tvrzická, E., Bryhn, M., and Kopecký, J. (2004) Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* 39, 1177-1185
112. Flachs, P., Horáková, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal, N., Růžičková, J., Šponarová, J., Drahotka, Z., Vlček, C., Keijer, J., Houštěk, J., and Kopecký, J. (2005) Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia*
113. Metz, J.A., Karanja, N., Torok, J., and McCarron, D.A. (1988) Modification of total body fat in spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats by dietary calcium and sodium. *Am. J. Hypertens.* 1, 58-60

114. Shi, H., Dirienzo, D., and Zemel, M.B. (2001) Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice. *FASEB J.* 15, 291-293
115. Sun, X. and Zemel, M.B. (2004) Calcium and dairy products inhibit weight and fat regain during ad libitum consumption following energy restriction in Ap2-agouti transgenic mice. *J. Nutr.* 134, 3054-3060
116. Zemel, M.B., Shi, H., Greer, B., Dirienzo, D., and Zemel, P.C. (2000) Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.* 14, 1132-1138
117. Zemel, M.B. (2004) Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 907S-912S
118. Davies, K.M., Heaney, R.P., Recker, R.R., Lappe, J.M., Barger-Lux, M.J., Rafferty, K., and Hinders, S. (2000) Calcium intake and body weight. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4635-4638
119. Lin, Y.C., Lyle, R.M., McCabe, L.D., McCabe, G.P., Weaver, C.M., and Teegarden, D. (2000) Dairy calcium is related to changes in body composition during a two-year exercise intervention in young women. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 754-760
120. Zemel, M.B., Thompson, W., Milstead, A., Morris, K., and Campbell, P. (2004) Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes. Res.* 12, 582-590
121. Melanson, E.L., Sharp, T.A., Schneider, J., Donahoo, W.T., Grunwald, G.K., and Hill, J.O. (2003) Relation between calcium intake and fat oxidation in adult humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27, 196-203
122. Shapses, S.A., Heshka, S., and Heymsfield, S.B. (2004) Effect of calcium supplementation on weight and fat loss in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 632-637

123. Bowen, J., Noakes, M., and Clifton, P.M. (2005) Effect of calcium and dairy foods in high protein, energy-restricted diets on weight loss and metabolic parameters in overweight adults. *Int. J. Obes. (Lond)* 29, 957-965
124. Papakonstantinou, E., Flatt, W.P., Huth, P.J., and Harris, R.B. (2003) High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. *Obes. Res.* 11, 387-394
125. Zemel, M.B. (2003) Role of dietary calcium and dairy products in modulating adiposity. *Lipids* 38, 139-146
126. Zemel, M.B. (2002) Regulation of adiposity and obesity risk by dietary calcium: mechanisms and implications. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 146S-151S
127. Morris, K.L. and Zemel, M.B. (2005) 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte glucocorticoid function. *Obes. Res.* 13, 670-677
128. Shi, H., Halvorsen, Y.D., Ellis, P.N., Wilkison, W.O., and Zemel, M.B. (2000) Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol. Genomics* 3, 75-82
129. Zemel, M.B. (1998) Nutritional and endocrine modulation of intracellular calcium: implications in obesity, insulin resistance and hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* 188, 129-136
130. Resnick, L. (1999) The cellular ionic basis of hypertension and allied clinical conditions. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 42, 1-22
131. Nazar, K., Kaciuba-Uscilko, H., Szczepanik, J., Zemba, A.W., Kruk, B., Chwalbinska-Moneta, J., Titow-Stupnicka, E., Bicz, B., and Krotkiewski, M. (1996) Phosphate supplementation prevents a decrease of triiodothyronine and increases resting metabolic rate during low energy diet. *J. Physiol. Pharmacol.* 47, 373-383
132. Villarroya, F., Giralt, M., and Iglesias, R. (1999) Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23, 1-6

133. Villarroya, F., Iglesias, R., and Giralt, M. (2004) Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr. Med. Chem.* 11, 795-805
134. Blomhoff, R., Green, M.H., Berg, T., and Norum, K.R. (1990) Transport and storage of vitamin A. *Science* 250, 399-404
135. Tsutsumi, C., Okuno, M., Tannous, L., Piantedosi, R., Allan, M., Goodman, D.S., and Blaner, W.S. (1992) Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 1805-1810
136. Murray, T. and Russell, T.R. (1980) Inhibition of adipose conversion in 3T3-L2 cells by retinoic acid. *J. Supramol. Struct.* 14, 255-266
137. Safonova, I., Darimont, C., Amri, E.Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U., and Shroot, B. (1994) Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104, 201-211
138. Xue, J.C., Schwarz, E.J., Chawla, A., and Lazar, M.A. (1996) Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1567-1575
139. Schluter, A., Yubero, P., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2002) The chlorophyll-derived metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 1277-1280
140. Ribot, J., Felipe, F., Bonet, M.L., and Palou, A. (2001) Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes. Res.* 9, 500-509
141. Kumar, M.V., Sunvold, G.D., and Scarpace, P.J. (1999) Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. *J. Lipid Res.* 40, 824-829
142. Spiegelman, B.M. (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47, 507-514

143. Facchini, F., Coulston, A.M., and Reaven, G.M. (1996) Relation between dietary vitamin intake and resistance to insulin-mediated glucose disposal in healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 946-949
144. Davies, P.J., Berry, S.A., Shipley, G.L., Eckel, R.H., Hennuyer, N., Crombie, D.L., Ogilvie, K.M., Peinado-Onsurbe, J., Fievet, C., Leibowitz, M.D., Heyman, R.A., and Auwerx, J. (2001) Metabolic effects of rexinoids: tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity. *Mol. Pharmacol.* 59, 170-176
145. Alvarez, R., de Andres, J., Yubero, P., Vinas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (1995) A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J. Biol. Chem.* 270, 5666-5673
146. Bonet, M.L., Oliver, J., Pico, C., Felipe, F., Ribot, J., Cinti, S., and Palou, A. (2000) Opposite effects of feeding a vitamin A-deficient diet and retinoic acid treatment on brown adipose tissue uncoupling protein 1 (UCP1), UCP2 and leptin expression. *J. Endocrinol.* 166, 511-517
147. Carmona, M.C., Valmaseda, A., Iglesias, R., Mampel, T., Vinas, O., Giralt, M., and Villarroya, F. (1998) 9-cis retinoic acid induces the expression of the uncoupling protein-2 gene in brown adipocytes. *FEBS Lett.* 441, 447-450
148. Nagase, I., Yoshida, S., Canas, X., Irie, Y., Kimura, K., Yoshida, T., and Saito, M. (1999) Up-regulation of uncoupling protein 3 by thyroid hormone, peroxisome proliferator-activated receptor ligands and 9-cis retinoic acid in L6 myotubes. *FEBS Lett.* 461, 319-322
149. Rial, E., González-Barroso, M., Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jimenez-Jimenez, J., Ricquier, D., Goubern, M., and Bouillaud, F. (1999) Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *EMBO J.* 18, 5827-5833
150. Solanes, G., Pedraza, N., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2000) The human uncoupling protein-3 gene promoter requires MyoD and is induced by retinoic acid in muscle cells. *FASEB J.* 14, 2141-2143

151. Felipe, F., Bonet, M.L., Ribot, J., and Palou, A. (2003) Up-regulation of muscle uncoupling protein 3 gene expression in mice following high fat diet, dietary vitamin A supplementation and acute retinoic acid-treatment. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27, 60-69
152. Hainer, V., Kunešová, M., Štich, V., Pařízková, J., Žák, A., Hrabák, P., Wernischová, V., and Dědičová, L. (1990) [A Czechoslovak low-energy protein diet in the treatment of obesity]. *Vnitr. Lek.* 36, 368-378
153. Heitmann, B.L., Lissner, L., Sorensen, T.I., and Bengtsson, C. (1995) Dietary fat intake and weight gain in women genetically predisposed for obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 1213-1217
154. Björntorp, P. (1996) The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 20, 291-302
155. Rossmeisl, M., Syrový, I., Baumruk, F., Flachs, P., Janovská, P., and Kopecký, J. (2000) Decreased fatty acid synthesis due to mitochondrial uncoupling in adipose tissue. *FASEB J.* 14, 1793-1800
156. Rossmeisl, M., Barbatelli, G., Flachs, P., Brauner, P., Zingaretti, M.C., Marelli, M., Janovská, P., Horáková, M., Syrový, I., Cinti, S., and Kopecký, J. (2002) Expression of the uncoupling protein 1 from the α P2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo. *Eur. J. Biochem.* 269, 19-28
157. Matějková, O., Mustard, K.J., Šponarová, J., Flachs, P., Rossmeisl, M., Mikšík, I., Thomason-Hughes, M., Hardie, G.D., and Kopecký, J. (2004) Possible involvement of AMP-activated protein kinase in obesity resistance induced by respiratory uncoupling in white fat. *FEBS Lett.* 569, 245-248
158. Wu, X., Motoshima, H., Mahadev, K., Stalker, T.J., Scalia, R., and Goldstein, B.J. (2003) Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52, 1355-1363

159. Saha, A.K., Avilucea, P.R., Ye, J.M., Assifi, M.M., Kraegen, E.W., and Ruderman, N.B. (2004) Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 580-585
160. Orci, L., Cook, W.S., Ravazzola, M., Wang, M.Y., Park, B.H., Montesano, R., and Unger, R.H. (2004) Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2058-2063
161. Couet, C., Delarue, J., Ritz, P., Antoine, J.M., and Lamisse, F. (1997) Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21, 637-643
162. Raclot, T., Groscolas, R., Langin, D., and Ferré, P. (1997) Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J. Lipid Res.* 38, 1963-1972
163. Ukropec, J., Reseland, J.E., Gasperiková, D., Demčáková, E., Madsen, L., Berge, R.K., Rustan, A.C., Klimeš, I., Drevon, C.A., and Šeböková, E. (2003) The hypotriglyceridemic effect of dietary n-3 FA is associated with increased beta-oxidation and reduced leptin expression. *Lipids* 38, 1023-1029
164. Qu, W., Rippe, R.A., Ma, J., Scarborough, P., Biagini, C., Fiedorek, F.T., Travlos, G.S., Parker, C., and Zeldin, D.C. (1998) Nutritional status modulates rat liver cytochrome P450 arachidonic acid metabolism. *Mol. Pharmacol.* 54, 504-513
165. Phinney, S.D., Davis, P.G., Johnson, S.B., and Holman, R.T. (1991) Obesity and weight loss alter serum polyunsaturated lipids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 831-838
166. Browning, L.M. (2003) n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and obesity-related disease. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 447-453
167. Mandrup, S. and Lane, M.D. (1997) Regulating adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 272, 5367-5370

168. Rabelo, R., Reyes, C., Schiffman, A., and Silva, J.E. (1996) A complex retinoic acid response element in the uncoupling protein gene defines a novel role for retinoids in thermogenesis. *Endocrinology* 137, 3488-3496
169. Hansen, D., Astrup, A., Toubro, S., Finer, N., Kopelman, P., Hilsted, J., Rossner, S., Saris, W., Van Gaal, L., James, W., and Goulder For The STORM Study Group (2001) Predictors of weight loss and maintenance during 2 years of treatment by sibutramine in obesity. Results from the European multi-centre STORM trial. Sibutramine Trial of Obesity Reduction and Maintenance. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 496-501
170. LaPorte, D.J. and Stunkard, A.J. (1990) Predicting attrition and adherence to a very low calorie diet: a prospective investigation of the eating inventory. *Int. J. Obes.* 14, 197-206
171. Baucom, D.H. and Aiken, P.A. (1981) Effect of depressed mood in eating among obese and nonobese dieting and nondieting persons. *J. Pers. Soc. Psychol.* 41, 577-585