Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Bc. Michaela Karlická

Vliv váhového úbytku obézních subjektů na sekreční schopnosti adipocytů a analýza markerů stresu endoplazmatického retikula v průběhu adipogeneze

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Lenka Rossmeislová, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svoji závěrečnou práci vypracovala samostatně a uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce nebyla použita k získání jiného akademického titulu.

V Praze dne Podpis

Poděkování: Tímto bych chtěla poděkovat zejména mojí školitelce Lence Rossmeislové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za pomoc při teoretickém i praktickém zvládnutí metod použitých k mé diplomové práci. V neposlední řadě pak děkuji celému kolektivu Ústavu tělovýchovného lékařství 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Obsah

Abstrakt 7

Abstract 8

1. Úvod 10

2. Cíle 11

3. Obezita 12

4. Tuková tkáň 13

4.1. Tuková depa 13

4.2. Buněčné složení tukové tkáně, adipogeneze 14

4.3. Metabolizmus triacylglycerolů 15

4.4. Inzulinová dráha, inzulinová rezistence 17

4.5. Endokrinní funkce tukové tkáně 18

4.5.1. Adiponektin (Acrp30, GBP28, Apml) 19

4.5.2. Interleukin 6 (IL6) 21

4.5.3. Monocytární chemoatraktantní protein 1 (MCP1) 22

4.5.4. Zánět tukové tkáně 22

4.6. Endoplazmatické retikulum 24

4.6.1. Struktura 24

4.6.2. Funkce 24

4.6.3. ER stres 25

5. Materiál a metody 28

5.1. Dietní program 28

5.2. Izolace a expanze lidských preadipocytů z bioptických vzorků tukové tkáně 29

5.2.1. Počítání buněk pomocí Burkerovy komůrky 30

5.2.2. Zamražení 31

5.2.3. Rozmražení 31

5.3. Diferenciace adipocytů 31

5.4. Stanovení celkových proteinů pomocí metody BCA 32

5.5. Fixace a permeabilizace buněk 33

5.6. Barvení ER 33

5.6.1. Barvení ER pomocí primární a sekundární protilátky 33

5.6.2. Barvení ER pomocí ER-Tracker Blue-White DPX 34

5.7. Konfokální mikroskopie 35

5.8. Izolace RNA 35

5.9. Transkripce RNA a Real Time PCR 35

5.9.1. Real Time PCR 36

5.10. Western Blot 37

5.11. ELISA 39

5.11.1. Detekce adiponektinu 39

5.11.2. Detekce IL6 a MCP1 40

5.12. Statistika 40

6. Výsledky 41

6.1. Změny sekrece adiponektinu, IL6 a MCP1 ve vztahu k dietní intervenci 41

6.2. Změny sekrece adiponektinu, IL6 a MCP1 v podmínkách stimulované lipolýzy 41

6.3. Změny izoforem adiponektinu (HMW, MMW, LMW) ve vztahu k dietní intervenci a v závislosti na stimulaci lipolýzy 46

6.4. Výsledek genové exprese faktorů účastnících se stresu ER v průběhu diferenciace adipocytů 47

6.5. Profil diferenciace adipocytů pomocí nepřímé imunofluorescence 51

7. Diskuze 52

7.1. Změny sekrece adiponektinu, IL6 a MCP v reakci na stimulaci lipolýzy a na dietní intervenci 52

7.2. Genová exprese faktorů stresu ER v průběhu diferenciace 56

8. Závěr 58

9. Seznam zkratek 60

10. Seznam použité literatury 64

Abstrakt

Adipocytokiny uvolňované tukovou tkání hrají důležitou roli v regulaci imunitních a zánětlivých reakcí. Při obezitě dochází k dysregulaci jejich produkce, což je jeden z hlavních faktorů podílejících se na navození chronické systemické zánětlivé reakce nízkého stupně, která představuje rizikový faktor pro rozvoj nemocí jako je ateroskleróza nebo diabetes typu 2. Hlavním cílem této práce bylo porovnat sekreci vybraných adipocytokinů (adiponektin, IL6 a MCP1) in vitro diferencovanými adipocyty odvozenými z tukové tkáně před a po dietní intervenci a to v bazálních podmínkách a během stimulované lipolýzy. U adiponektinu byla též analyzována sekrece jeho izoforem. Koncentrace adiponektinu, IL6 a MCP1 byla stanovena pomocí metody ELISA, k určení distribuce izoforem adiponektinu byla použita metoda Western Blot.

Dále byla pozornost věnována genové expresi ATF3, ATF4 a HSPA5, faktorů účastnících se stresu ER, v průběhu diferenciace adipocytů. Změny genové exprese byly měřeny metodou kvantitativní Real Time PCR. Zároveň byl rozvoj endoplazmatického retikula v průběhu adipogeneze monitorován pomocí nepřímé imunofluorescence.

Změny sekrece adipocytokinů (adiponektin, IL6 a MCP1) v důsledku samotné dietou navozené váhové redukce nebyly prokázány. β adrenergní stimulace způsobila redukci sekrece adiponektinu a signifikantní nárůst IL6. Sekrece IL6 byla významně zvýšena též přímým dodáním cAMP. Sekrece MCP1 byla přímým dodáním cAMP naopak snížena. Analýza sekrece izoforem adiponektinu prokázala, že in vitro adipocyty produkují predominantně HMW izoformu, přičemž cAMP snížilo expresi HMW isoformy pouze u adipocytů derivovaných před dietní intervencí.

V průběhu diferenciace adipocytů docházelo k nárůstu exprese genů účastnících se drah aktivovaných zejména stresem ER (ATF3, ATF4 a HSPA5). Tyto výsledky dokazují, že samotná diferenciace adipocytů je spojena s rozvojem ER, popř. i ER stresu.

Klíčová slova: Adipocytokiny, obezita, adiponektin, izoformy, IL6, MCP1, dietní intervence, genová exprese, ER stres, ATF3, ATF4, HSPA5

Abstract

Adipocytokines released by the adipose tissue play an important role in the regulation of immune and inflammatory responses. In obesity their production is dysregulated, which is one of the major factors contributing to the onset of a chronic low-grade systemic inflammation representing a risk factor for the progression of other diseases, such as atherosclerosis or type-2 diabetes. The main goal of this thesis was to analyze the secretion of selected adipocytokines (adiponectin, IL6 and MCP1) by in-vitro differentiated adipocytes, isolated from the adipose tissue prior to and after a dietary intervention, and this under basal conditions and during stimulated lipolysis. In case of adiponectin, the secretion of its isoforms was analyzed too. The concentration of adiponectin, IL6 and MCP1 was determined by the ELISA method, the Western Blot method was used to determine the distribution of the adiponectin isoforms.

The thesis also concentrates on the gene expression of ATF3, ATF4 and HSPA5, factors engaged in the ER stress in the course of the differentiation of adipocytes. The changes in the gene expression were measured by the quantitative Real Time PCR method. At the same time the development of the endoplasmic reticulum (ER) in the course of adipogenesis was monitored by indirect immunofluorescence.

Changes in the secretion of adipocytokines (adiponectin, IL6 and MCP1) resulting from the weight reduction induced by the dietary interventionwere not proven. β-adrenergic stimulation caused a reduction in the secretion of adiponectin and a significant increase in IL6. Direct addition of cAMP led to even a higher secretion of IL6, but the secretion of MCP1 was, on the contrary, decreased. The analysis of the secretion of adiponectin isoforms showed that in vitro adipocytes predominantly produce the HMW isoform, while cAMP-induced decrease of HMW secretion was significant only in adipocytes derived before the dietary intervention.

The differentiation of adipocytes increased the expression of the genes engaged in the pathways activated predominantly by the ER stress (ATF3, ATF4 and HSPA5). These results suggest that the differentiation of adipocytes is related to the development of the ER or the ER stress.

Keywords: adipocytokines, obesity, adiponectin, isoforms, IL6, MCP1, dietary intervention, gene expression, ER stress, ATF3, ATF4, HSPA5

1. Úvod

Tuková tkáň byla po dlouhou dobu považována za pouhé úložiště zásobních látek. Objev leptinu a dalších látek sekretovaných tukovou tkání vedl k docenění funkce tukové tkáně jako endokrinního orgánu. Produkty tukové tkáně adipocytokiny hrají důležitou roli v regulaci mnoha imunitních a zánětlivých reakcí.

Obezita je onemocnění spojené s chronickým zánětem nízkého stupně. Představuje závažný zdravotní i společenský problém, postihující značnou část populace. Je rizikovým faktorem rozvoje mnoha dalších onemocnění jako je např. diabetes mellitus typu 2 a ateroskleróza. Hypertrofie adipocytů a zvýšené uvolňování volných mastných kyselin vede k infiltraci makrofágů do tukové tkáně a spouští řadu zánětlivých drah, které vedou v konečné fázi k narušení základních funkcí tukové tkáně a metabolismu glukózy na úrovni celého organizmu.

Příčina iniciace prozánětlivého stavu tukové tkáně je stále nejasná. Řada nedávných studií naznačuje, že jednou z příčin by mohl být stres endoplazmatického retikula (ER). Dlouhou dobu bylo ER studováno z hlediska mechanismů syntézy a posttranskripčních úprav proteinů. Nyní se ukazuje, že ER je schopno v rámci stresových podmínek regulovat řadu buněčných pochodů díky aktivaci významných signalizačních drah. Mezi ně patří např. NF-κB dráha, která je zásadní pro expresi zánětlivých cytokinů, jež jsou produkovány obézní tukovou tkání. Stres ER zřejmě potlačuje také inzulinovou signalizaci v adipocytech a to prostřednictvím c-Jun N-terminální kinázy (JNK). Předpokládá se tedy, že právě stres ER by mohl být zásadní pro vznik a vývoj symptomů, které jsou spojené s rozvojem obezity.

2. Cíle

Cílem práce bylo navázat na již prezentované výsledky z oblasti vlivu dietních intervencí na genovou expresi a sekreci tukové tkáně a získat nové poznatky o významu úbytku hmotnosti na tyto charakteristiky tukové tkáně. Konkrétní cíle byly následující:

- zjistit, jak se mění sekrece adiponektinu, IL6 a MCP1 adipocyty z obézních žen před a po redukční dietní intervenci v bazálních podmínkách a během lipolýzy

- zjistit, jak se mění zastoupení izoforem adiponektinu na základě stejného profilu pokusu

- změřit genovou expresi faktorů účastnících se stresu ER v průběhu diferenciace adipocytů

- monitorovat změny ER v průběhu diferenciace adipocytů pomocí nepřímé imunofluorescence

3. Obezita

Obezita se stává v poslední době stále častějším problémem rozvinutých zemí. Představuje závažné chronické onemocnění, které postihuje značnou část dnešní populace v ČR, Evropě a Severní Americe (Svačina and Bretšnajdrová, 2008). Obecně používanou metodou klasifikace obezity je body mass index BMI. BMI vychází z poměru váhy v kilogramech a výšky vyjádřené v metrech čtverečních (kg/m²). Nadváha je definovaná jako BMI ≥25 kg/m², obezita pak jako BMI ≥30 kg/m² (Gesta et al., 2007). V současné době trpí nadváhou či obezitou až 2/3 populace USA a v roce 2015 se očekává nárůst o dalších 12,5% (Wang, 2007). V České republice trpí nadváhou či obezitou zhruba 50% jedinců, z toho 20% mužů a 30% žen (Svačina and Bretšnajdrová, 2008). Bohužel alarmující nárůst obezity je zaznamenáván i u dětské populace.

Obezita je chápána jako komplexní choroba, na jejímž vzniku se podílí faktory genetické, environmentální, behaviorální, kulturní a socioekonomické (Hainer et al., 2008). Studie dvojčat či dětí adoptovaných do rodin odhalily, že genetické pozadí vzniku obezity leží někde mezi 40-70% (Stunkard et al., 1990; Barsh et al., 2000). V dnešní době existuje více jak 600 genů a odlišných chromozomálních regionů, které by se mohly podílet na rozvoji obezity (Elliott and Johnson, 2007).

Obezita vzniká nadměrným ukládáním tuku v důsledku imbalance mezi příjmem energie a jejím vydáním. Je rizikovým faktorem mnoha dalších onemocnění jako jsou inzulinová rezistence, diabetes mellitus typu 2, ateroskleróza, hypertenze, kardiovaskulární onemocnění, nádorová onemocnění a degenerativní působení pohybového aparátu (Kopelman, 2000; Guri and Bassaganya-Riera, 2011). Obezita ve většině případů není spojena jen s prostou expanzí tukové tkáně. V tukové tkáni totiž v průběhu nadměrné expanze probíhají změny, které mění významným způsobem její vlastnosti a podmiňují tak rozvoj dalších onemocnění.

Následující kapitola je proto věnována vybraným fyziologickým charakteristikám tukové tkáně, ale i jejich patofyziologickým změnám indukovaným obezitou.

4. Tuková tkáň

Tuková tkáň (TT) je místem ukládání energie ve formě triacylglyceridů. Neméně důležité jsou také její vlastnosti izolační struktury a mechanické ochrany. U savců nacházíme dva typy TT, bílou tukovou tkáň a hnědou tukovou tkáň (Rosen and MacDougald, 2006; Redinger, 2009). Rozvoj hnědé TT začíná během vývoje plodu dříve, maximální velikosti nabývá při narození, s věkem klesá. Bílá TT vzniká uprostřed těhotenství a na rozdíl od hnědé TT narůstá i v dospělosti. Morfologicky lze hnědou TT odlišit na základě výskytu multilokulárních adipocytů s hojnou mitochondriální denzitou a bohatou vaskularizací (Gesta et al., 2007). Adipocyty bílé TT jsou tvořeny jen jednou centrální tukovou kapénkou, vyplňující téměř celý objem buňky, s jádrem a mitochondriemi zatlačenými k okraji (Ganong, 2005). Hnědá TT se u člověka ve větší míře vyskytuje pouze u novorozenců, kde je důležitá pro regulaci tělesné teploty tzv. netřesovou termogenezí (Murray et al., 2002; Ganong, 2005). Některé studie však uvádějí výskyt hnědého tuku u dospělců vystavených dlouhodobému chladu (Weisberg et al., 2006). Diplomová práce je dále zaměřena jen na bílou tukovou tkáň.

4.1. Tuková depa

Bílá TT u zdravého člověka představuje 15-25% tělesné hmotnosti, tento podíl může být navýšen až o více jak 50% u patologické obezity (Müllerová and Kopecký, 2007). V lidském těle je soustředěna převážně ve velkých depech a to v oblasti podkožní a intraabdominální. Nejrozsáhlejší podkožní depo tukové tkáně je na stehnech, hýždích a břichu. Intraabdominální tkáň je soustředěna hlavně kolem předstěry břišní dutiny, střev a ledvin. TT se nachází také v oblasti okolo očí, na tvářích, rukou a v kostní dřeni.

Variace v distribuci tuku TT hrají roli v asociaci s metabolickými komplikacemi (Gesta et al, 2007). Nárůst viscerálního tuku je asociován se zvýšeným rizikem inzulinové rezistence a kardiovaskulárních chorob (Rosen and MacDougald, 2006). Ačkoliv příčina této asociace stále není zřejmá, předpokládá se, že důvodem je zřejmě přímější vliv produktů viscerální tukové tkáně na játra díky uvolňování volných mastných kyselin a adipocytokinů z viscerálního tuku do portálního oběhu. Naproti tomu akumulace TT v dolních částech těla jako jsou hýždě a stehna nemá vážnější následky (Zhu et al., 2002;

Cancelo and Clement, 2006). Distribuce tuku se během života mění a to i u štíhlých jedinců, kteří mají stabilní BMI (Gesta et al., 2007).

4. 2. Buněčné složení tukové tkáně, adipogeneze

Tuková tkáň je mezodermálního původu (Gesta et al., 2007). Jedná se o heterogenní soustavu buněk, složenou z maturovaných adipocytů a buněk tzv. stromavaskulární frakce (SVF), zahrnující preadipocyty, endoteliální buňky, fibroblasty, makrofágy a další imunitní buňky (Ahima et al., 2000; Pokorný, 2002). Tkáň je protkána cévami a je inervovaná sympatickým nervovým systémem. Populace adipocytů je tvořena buňkami variabilních velikostí (Hausman et al., 2001). Tukové buňky jako takové vznikají z kmenových buněk (Rosen and MacDougald, 2006). Není zcela jasné, zda existují samostatné vývojové linie pro jednotlivá depa. Některé studie však naznačují, že tuková úložiště mohou vznikat z odlišných prekurzorových buněk. Nedávné práce naznačují existenci heterogenity i v rámci samotných dep. Tato heterogenita může být dalším potenciálním propojením distribuce tuku a metabolických komplikací (Gesta et al., 2007).

Přeměna preadipocytu na maturovaný adipocyt je řízena transkripční kaskádou, která zahrnuje jaderný receptor PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) a členy rodiny C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) (Gesta et al., 2007). Role PPARγ v adipogenezi je zásadní. Ukazuje se, že je nezbytný a navíc postačující k iniciaci diferenciace a udržení konečného stádia přeměny adipocytu (Hausman et al., 2001). S diferenciací roste exprese genů účastnících se syntézy a metabolizmu lipidů. Jedním z nich je i gen aP2 (neboli FABP4, fatty acid binding protein 4), který zajišťuje transport mastných kyselin. Je považován za typický marker maturace adipocytů (Hausman et al., 2001).

Tuková tkáň se vyvíjí zpočátku hlavně hyperplázií buněk. V dospělosti přibývá převážně hypertroficky. Oba tyto procesy jsou spojovány s pozitivní energetickou bilancí během normálního růstu a během rozvoje obezity (Hausman et al., 2001; Rossmeislová et al., 2012). Buňky tukové tkáně mají přirozený životní cyklus. Adipocyty žijí v průměru 10 let, každoročně je nahrazeno 10% z nich (Spalding et al., 2008). Mrtvé adipocyty jsou odstraňovány makrofágy (Mosser and Edwards, 2008). U obézních jedinců se adipocytní nekróza zvyšuje až na 30-ti násobek (Gesta et al, 2007).

4.3. Metabolizmus triacylglycerolů

Většina energetických reserv člověka je skladována v adipocytech a to ve formě triacylglycerolu (TAG). Syntéza TAG probíhá v tukových buňkách lipogenezí z prekurzorů jako je glukóza nebo z volných mastných kyselin (MK) cirkulujících v krvi (Lafontan and Langin, 2009). TAG představuje zdroj energie v době, kdy nedochází k příjmu potravy nebo kdy jsou nároky na přísun energie vysoké, např. v průběhu fyzické aktivity. Za této situace dochází v adipocytech k procesu lipolýzy, tedy hydrolýze TAG na glycerol a volné mastné kyseliny (Coppack et al., 1994). Glycerol je pak využíván zejména játry v procesu glukoneogeneze. MK jsou krevním oběhem přenášeny do jater, srdce, ledvin a kosterního svalstva (Lafontan and Langin, 2009). MK cirkulují v krvi vázané na albumin a po vstupu do okolních tkání jsou využívané k tvorbě ATP při beta oxidaci nebo jsou zpět zabudované do molekuly TAG (Coppack et al.,1994). MK, které v průběhu lipolýzy neopustily tukovou buňku, mohou být reesterifikovány zpět do TAG (Lafontan and Langin, 2009).

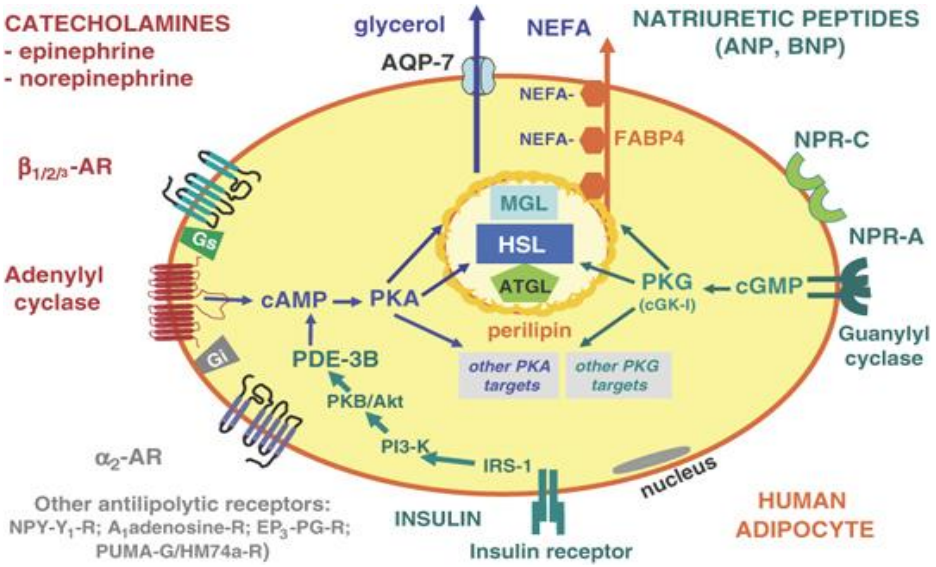
Lipolýza v TT je zajišťována třemi hlavními lipázami (obrázek 1): adipocytární triglyceridovou lipázou (ATGL), hormon senzitivní lipázou (HSL) a monoacylglyceridovou lipázou (MGL) (Coppack et al., 1994). Po dlouhou dobu byla HSL považována za klíčový regulátor degradace TAG. Nedávné studie odhalily, že lipolýza je zahájena ATGL, která hydrolýzou TAG vytvoří MK a diacylglycerol, který je poté hydrolyzován HSL na monoacylglycerol a druhou MK. Třetí molekula MK a glycerol vznikají hydrolýzou monoacylglycerolu pomocí MGL (Ryden et al., 2007; Lafontan and Langin, 2009). MK jsou mobilizovány z TT v závislosti na jejich struktuře. Platí, že mobilizace se snižuje se zvyšující se délkou řetězce pro daný stupeň nenasycenosti a zvyšuje se se zvyšující se nenasyceností pro danou délku řetězce. Bylo zjištěno, že kyselina eikosopentaenová a arachidonová patří mezi nejmobilizovanější mastné kyseliny. Preferenční uvolňování některých MK a nízká zpětná absorpce mohou být částečně vysvětleny nízkým zastoupením TAG v tukové tkáni ve srovnání s jejich výskytem ve stravě (Lafontan and Langin, 2009).

Lipolytické procesy reguluje řada hormonů, mezi nejdůležitější patří katecholaminy a inzulin (Ryden et al., 2007). Katecholaminy, adrenalin a nonadrenalin stimulují lipolýzu. Aktivace se děje přes β adrenoreceptory. Vazba proteinů na receptory aktivuje adenylcyklázu, která generuje cAMP, jež následně aktivuje proteinkinázu A (PKA). PKA

fosforyluje a tak aktivuje HSL. Mezi další potenciální stimulátory lipolýzy patří růstové hormony, glukokortikoidy a tumor nekrózní faktor α (TNFα) (Coppack et al., 1994). Inzulin je hlavním antilipolytickým hormonem, má schopnost inhibovat lipolýzu už ve velmi nízkých koncentracích. Snižuje cAMP prostřednictvím aktivace fosfodiesterázy a tím inhibuje aktivaci proteinkinázy A. Inhibiční vliv na lipolýzu mají také adenosin, prostaglandiny nebo oxid dusíku (Coppack et al., 1994; Mantovani et al., 2004).

Studie in vitro a in vivo ukazují, že existují místně specifické odlišnosti v regulaci lipolýzy. Viscerální depa jsou citlivější na lipolytické procesy, nicméně abdominální podkožní depa jsou hlavním determinantem systemické koncentrace MK (Coppack et al., 1994). V regulaci lipolýzy hraje důležitou roli také věk, fenotyp, či pohlaví jedince (Lafontan and Langin, 2009; Mauriege et al., 1999; Mutch et al., 2007).

Při obezitě dochází k výraznému porušení rovnováhy mezi hydrolýzou a syntézou TAG (Lafontan and Langin, 2009). Tato nerovnováha je charakterizována zvýšenou koncentrací MK a glycerolu v oběhu, vyvolanou zvýšenou mírou lipolýzy. Tato deregulace metabolizmu TT může následně přispívat k rozvoji hyperlipidémie nebo inzulinové rezistence (Coppack et al., 1994).



Obrázek 1: Lipolytická dráha (Převzato Lafontan, 2008).

4.4. Inzulinová dráha, inzulinová rezistence

Inzulinová dráha je důležitá pro regulaci metabolické homeostázy v těle. Inzulin je zásadní hormon, který reguluje transport glukózy do periferních tkání (Muoio and Newgard, 2008). Pankreatické β buňky sekretují inzulin v závislosti na množství glukózy v krvi (Newgard and McGarry, 1995). Primárním místem využití glukózy je kosterní svalstvo. I přes to hraje tuková tkáň v kontrole koncentrace glukózy v krevním oběhu důležitou roli (Guilherme et al., 2008).

Inzulinová signalizace je zahájena vazbou inzulinu na inzulinový receptor, který je přítomen v membráně buněk energetických orgánů jako je TT, kosterní svalstvo, játra nebo například mozek a slinivka (Unger et al., 1991; Goldfine and Williams, 1983). Vazbou inzulinu je spuštěna autofosforylace receptoru, která následně vede k navázání a aktivaci substrátu inzulinového receptoru (IRS) (Zhou et al., 2009). Z mnoha existujících izoforem IRS, klíčovou roli v dráze inzulinu hrají IRS1 a IRS2. IRS1 je zásadní pro anabolické dráhy stimulované ve svalech a TT, zatímco IRS2 řídí tyto dráhy zejména v játrech (Muoio and Newgard, 2008; Zick, 2005). Vazbou receptoru s jeho substrátem se aktivuje řada dalších signálních cest. Mezi ty nejdůležitější patří dráha aktivující protein kinázu B řídící transport glukózy do buněk a syntézu glykogenu, nebo mitogenem aktivovaná protein kinázová dráha MAPK, která kontroluje buněčný růst a diferenciaci (Korc, 2003; Zhou et al., 2009; Avruch, 1998).

Při obezitě dochází k hypertrofii adipocytů, které již nejsou schopny dále efektivně akumulovat lipidy. Volné MK v oběhu jsou proto ukládány v tkáních, které tomu nejsou primárně přizpůsobeny a MK v nich působí toxicky (mluvíme o tzv. lipotoxicitě). Lipotoxicita snižuje citlivost periférních tkání na inzulin, což vede ke sníženému vychytání a utilizaci glukózy buňkami s následnou hyperglykémií a naopak ke zvýšení glukoneogeneze v játrech. Tento stav nazýváme inzulinovou rezistencí (Kahn et al., 2006; Lionetti et al., 2008). Hypertrofie u adipocytů navíc spouští prozánětlivé signální cesty prostřednictvím jaderného transkripčního receptoru NF-κB a c-Jun N-terminální kinázy, které vedou ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů jako je interleukin 6 (IL6), monocytární chemoatraktantní protein 1 (MCP1) nebo TNFα. Tyto cytokiny inhibují inzulinovou dráhu a představují tedy další možnou příčinu vzniku inzulinové rezistence (Kanety et al., 1995; Swaroop et al., 2012). Projevem rezistence na inzulin bývá hyperinzulinémie, tedy zvýšená produkce inzulinu pankreatickými β buňkami v reakci na

zvyšující se koncentraci glukózy. Pokud hladiny glukózy zůstávají dlouhou dobu vysoké, dochází k poškození β buněk a následně vzniku diabetu typu 2 (Boden and Schulman, 2002).

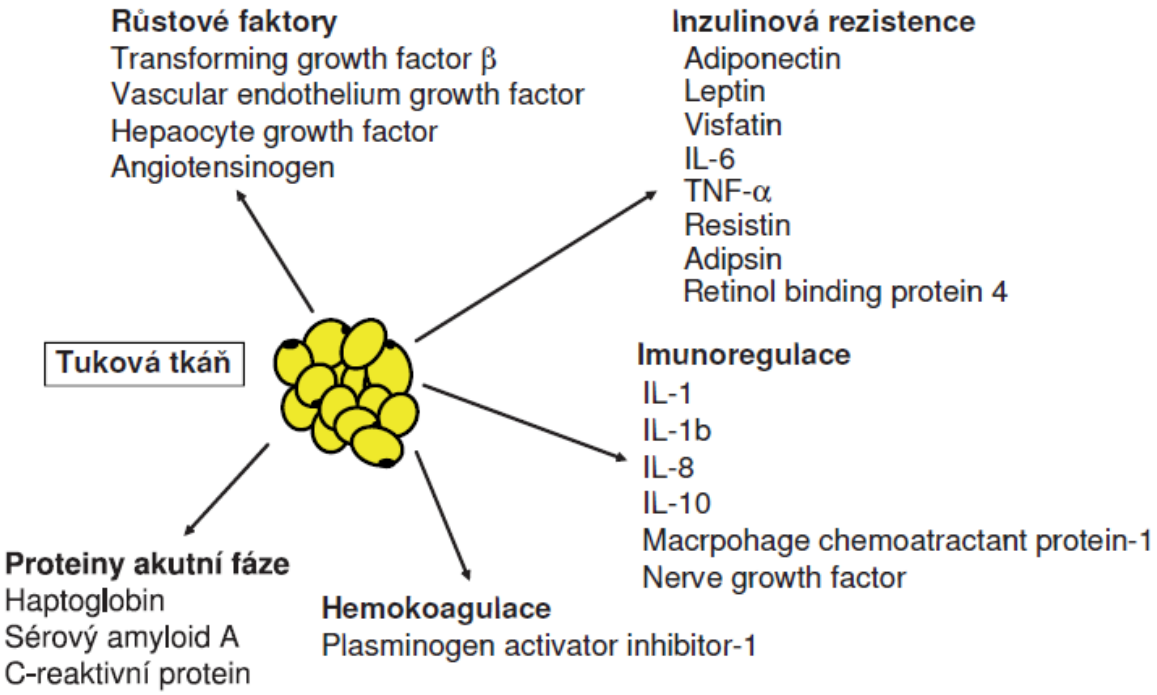
4.5. Endokrinní funkce tukové tkáně

V poslední době se ukazuje, že vlastnosti TT nejsou omezeny jen na ukládání energetických zásob. Je zřejmé, že adipocyty se účastní velkého množství regulačních a homeostatických pochodů a to regulace množství uloženého tuku, energetické rovnováhy, termogeneze, imunitní reakce a zánětlivých pochodů, neuroendokrinních pochodů, reprodukční funkce a mnoha dalších (obrázek 2) (Trayhurn, 2005; Škop et al., 2008). To vše se děje prostřednictvím sekretovaných cytokinů, které působí buď autokrinně, nebo parakrinně na ostatní buňky TT. Většinou jsou ale sekretovány do krve a ovlivňují vzdálené orgány jako např. játra, svaly a mozek. Nazýváme je souhrnně jako adipocytokiny (Polák et al., 2006; Škop et al., 2008).

Toto zásadní zjištění bylo podloženo objevem leptinu v roce 1994, který podnítil zájem hledat další látky produkované tukovou tkání (Zhang et al., 1994). Do dnešní doby bylo objeveno nepřeberné množství aktivních látek sekretovaných adipocyty. Jedná se o chemokiny jako je např. MCP1, růstové faktory jako IGF1, interleukiny (např. IL1, IL6, IL8), proteiny akutní fáze CRP, peptidy jako rezistin, visfatin, a mnoho dalších (Juge-Aubry, 2005). Dnes je však zřejmé, že většina adipocytokinů je produkována také buňkami stromavaskulární frakce a pouze dva, leptin a adiponektin, výhradně adipocyty (Hauner et al., 2005).

Zájem o adipocytokiny je dán zejména s ohledem na jejich vliv na rozvoj inzulinové rezistence. Některé studie adipocytokiny rozdělují podle jejich efektu na inzulinovou senzitivitu a to na ty, co podporují anebo potlačují působení inzulinu. Za normálních fyziologických podmínek jsou obě skupiny v jisté rovnováze, převažujícím vlivem adipocytokinů podporujících činnost inzulinu je stimulován růst tkáně, příjem glukózy a je zabraňováno odbourávání zásob TAG. V důsledku obezity však dochází ke změnám v jejich produkci. Převažuje sekrece cytokinů potlačujících rozvoj TT, způsobujících inzulinovou rezistenci a mnoho dalších metabolických abnormalit s obezitou spojených (Škop et al., 2008; Tilg and Moschen, 2006).

V následujících podkapitolách jsou diskutovány pouze adipocytokiny, které byly v rámci této diplomové práce analyzovány.



Obrázek 2: Produkty tukové tkáně (Převzato Polák et al., 2006).

4.5.1. Adiponektin (Acrp30, GBP28, Apm1)

Adiponektin byl objeven v roce 1995. Jde o protein sekretovaný primárně zralými adipocyty. V menším množství je sekretován svalovými buňkami, endoteliálními buňkami a myocyty (Škop et al., 2008). Adiponektin je složen ze dvou strukturně odlišných oblastí, N terminální kolagenní fibrilární a C terminální globulární domény. Jeho velikost odpovídá 30 kDa, kódován je APM1 genem a v literatuře ho lze najít pod zkratkami Acrp30, GBP28, Apm1 (www.genecards.org).

V lidské plazmě se tento protein vyskytuje ve třech izoformách, trimer známý jako nízká molekulárně váhová forma adiponektinu LMW, hexamer, který vzniká spojením dvou trimérů disulfidickou vazbou a je znám jako střední molekulárně váhová forma MMW a vysokomolekulárně váhová forma HMW, která je složena z více jak 12 molekul

adiponektinu (Antuna-Puente et al., 2007). Tyto izoformy mají odlišné biologické funkce. Některé studie naznačují, že inzulin-senzitizující schopnost má převážně HMW izoforma (Lara-Castro et al., 2006) a uvádějí jako měřítko predikce inzulinové rezistence poměr HMW/LMW (Hara et al., 2006).

Plazmatické hladiny adiponektinu se pohybují okolo 5-10 μg/ml a představují až 0.01% všech plazmatických proteinů (Antuna-Puente et al., 2008). Byly však nalezeny rozdíly mezi plazmatickou hladinou izoforem adiponektinu a jejich sekrecí tukovou tkání (Kováčová et al., 2009). Dále byla shledána vyšší koncentrace adiponektinu v podkožním tuku v porovnání s tukem viscerálním (Koerner et al., 2005) a vyšší koncentrace HMW adiponektinu u žen než u mužů (Polák et al., 2006). Na rozdíl od ostatních cytokinů, hladiny plazmatické koncentrace adiponektinu negativně korelují s BMI, koncentrací triglyceridů, lačnou glykémií a inzulinémií. Plazmatické hladiny jsou tedy výrazně nižší u obézních a pacientů s inzulinovou rezistencí či následným diabetem typu 2 nebo pacientů s ischemickými poruchami (Polák et al., 2006; Ryo et al., 2004). Příčinou může být fakt, že na jeho negativní regulaci se podílejí adipocytokiny, jejichž hladiny jsou u obézních pacientů naopak vyšší, a to IL6 a TNFα. Mezi další inhibitory produkce adiponektinu patří glukokortikoidy, katecholaminy a růstový hormon (Bruun et al., 2003). Signální kaskáda adiponektinu je uskutečňována skrze jeho transmembránový receptor. Byly identifikovány dva receptory, AdipoR1 a AdipoR2. AdipoR1 se vyskytuje převážně ve svalech, AdipoR2 v játrech (Kadowaki et al., 2006). Vazbou adiponektinu na jeho receptor se spouští signální dráhy, jejichž příkladem je aktivace adaptačního proteinu APPL1, která následně spouští řadu signálních kaskád, jako jsou PPARα, MAPK nebo AMPK cesty. Aktivace AMP kinázy, prostřednictvím které adiponektin reguluje oxidaci lipidů či příjem glukózy (Mao et al., 2006), se zdá být hlavním molekulárním mechanismem účinku adiponektinu na inzulinovou senzitivitu (Koerner et al., 2005).

Bylo zjištěno, že adiponektin působí preventivně proti rozvoji aterosklerotických plátů, protože omezuje přeměnu makrofágů v pěnové buňky a brání expresi povrchových molekul makrofágů (Polák et al., 2006). Dále brání infiltraci makrofágů do tukové tkáně (Kim et al., 2007). Některé studie popisují jeho inhibiční vliv na produkci prozánětlivých cytokinů jako TNFα nebo IL6 a naopak pozitivní korelaci s protizánětlými cytokiny (Yokota et al., 2000).

Výraznější rozpor nastává při interpretaci vztahu adiponektinu a jeho forem s dietní intervencí. Někteří autoři popisují možnost ovlivnění hladiny adiponektinu v závislosti na dietě, v jiných pracích naopak zůstává koncentrace adiponektinu beze změny i přes zlepšení metabolických parametrů jako je inzulinová senzitivita (Polák et al., 2008; Polák et al., 2007; Kováčová et al., 2009).

4.5.2. Interleukin 6 (IL6)

IL6 je prozánětlivý cytokin, produkovaný v TT hlavně buňkami stromavaskulární frakce a to T buňkami, monocyty, fibroblasty a buňkami endotelu. Tento cytokin o velikosti 26 kDa se vyskytuje minimálně v pěti izoformách (www.genecards.org).

Byl mezi prvními cytokiny spojovanými s rozvojem inzulinové rezistence a kardiovaskulárními chorobami. Plazmatická koncentrace IL6 je totiž pozitivně korelována s inzulinovou rezistencí. TT za bazálních podmínek zajišťuje 30% jeho celotělové produkce. Jeho sekrece je až třikrát vyšší ve viscerálním než subkutánním tuku (Antuna-Puete et al., 2008).

Vazbou na IL6 receptor je spuštěna signalizační buněčná kaskáda, která vede v játrech a tukové tkáni k degradaci IRS přes supresor cytokinové signalizace SOCS, což následně snižuje působení inzulinu (Rasoli and Kern, 2008). Kontroverzní jsou výsledky působení IL6 v kosterním svalstvu. Fyzická zátěž, kdy obvykle dochází ke zvýšení inzulinové sensitivity, vede u myogenních buněk ke zvýšení hladin IL6, což naznačuje možné protizánětlivé funkce IL6 v kosterním svalstvu (Kristiasen et al., 2005; Ruderman et al., 2006). Zvyšující se hladina IL6 při této zátěži zřejmě zprostředkovává důležitý tok informací mezi pracujícím svalem a tukovou tkání, což umocňuje lipolýzu a přísun volných MK, které jsou potřeba pro dodání energie (Pedersen et al., 2001). U obézních a inzulinorezistentních pacientů je ale plazmatická hladina IL6 zvýšena dlouhodobě a podílí se tak na navození prozánětlivého stavu, který dále vede k rozvoji aterosklerózy a diabetu typu 2 (Krogh-Madsen et al., 2004).

4.5.3. Monocytární chemoatraktantní protein 1 (MCP1)

MCP1 patří do rodiny CC chemokinů a je ligandem CCR2 receptoru (Kanda et al., 2006). Je kódován genem MCP1 a existuje ve více izoformách o délce 9-13 kDa. V TT je MCP1 produkován zejména buňkami stromavaskulární frakce a hypertrofovanými adipocyty (Rasouli and Kern, 2008).

Vazbou na receptor CCR2 se prostřednictvím uvolnění intracelulárního Ca^{2+} a G signalizačních proteinů aktivuje dráha protein kinázy C, která následně vede k mobilizaci imunitních buněk a jejich povolání do tkáně (Melgarejo et al., 2009).

Bylo zjištěno, že myši postrádající MCP1 receptor vykazují sníženou infiltraci makrofágů do tukové tkáně a zlepšení metabolických funkci. Některé studie však naznačují, že MCP1 není esenciálním faktorem makrofágové mobilizace a že existují další látky, které by mohly hrát zásadní roli v této infiltraci (Rasouli and Kern, 2009). MCP1 navíc snižuje inzulinem stimulovaný příjem glukózy, což má vliv na rozvoj inzulinové rezistence. Dále snižuje sekreci leptinu a sám o sobě je regulovaný dalšími zánětlivými cytokiny jako je například TNFα (Fain and Madan, 2005; Boisvert, 2004).

Plazmatické hladiny MCP1 jsou vyšší u pacientů s diabetem typu 2 a obezitou (Sartipy et al., 2003).

4.5.4. Zánět tukové tkáně

Skutečnost o možnosti propojení zánětu, obezity a inzulinové rezistence byla poprvé popsaná v roce 1993 a to v souvislosti s negativním působením zvýšené exprese prozánětlivých cytokinů na inzulinovou senzitivitu u obézních myší (Hotamisligil et al., 1993).

Hlavní iniciátorem zánětu TT je zřejmě velikost adipocytu (Lionetti et al., 2009). Hypertrofované adipocyty vykazují zvýšenou sekreci cytokinů a chemokinů, které spouští infiltraci makrofágů do tukové tkáně (Jernas et al., 2005). Bylo prokázáno, že zvýšené hladiny MCP1 pozitivně korelují s touto infiltrací. Výsledky studií obézních pacientů ukazují na zvýšenou expresi MCP1 po třech týdnech stravy bohaté na tuk (Rossmeislová et al., 2012).

Zvýšené uvolňování MK může působit samo o sobě jako zdroj infiltrace imunitních buněk (Hotamisligil, 2005). MK se mohou vázat na toll-like receptory (TLR), aktivovat serinovou kinázu JNK, která inhibuje IRS. Jinou alternativou působení toll-like receptorů je aktivace zánětlivých cest prostřednictvím IκB kinázy (IKKβ). Aktivace této kinázy vede k stimulaci transkripčního faktoru NF-κβ, což následně vyvolává zvýšení exprese zánětlivých cytokinů. Toto vede v konečné fázi k zvýšení lipolýzy, snížení inzulinové senzitivity a zvýšení zánětlivého stavu tukové tkáně (Nguyen, 2007).

Makrofágy povolané do tukové tkáně dále zvyšují sekreci prozánětlivých cytokinů (MCP1, TNFα, IL6) a podporují infiltraci dalších buněk a zvyšují zánětlivou reakci. V zánětlivém stavu představují makrofágy až 11% SVF (Curat et al., 2004). Makrofágy se shlukují kolem mrtvých adipocytů s cílem odstranit škodlivé buněčné fragmenty a uvolněné tukové kapénky (Cancelo and Clement, 2006; Cinti et al., 2005).

Makrofágy pocházejí z cirkulujících monocytů. Některé studie však naznačují možnost proliferace makrofágů či dokonce diferenciaci z preadipocytů (Bourlier et al., 2008; Arnold, 2007). Tato hypotéza je podpořena schopností makrofágů akumulovat tukové kapénky a velkými překryvy expresních profilů mezi makrofágy a preadipocyty (Wellen and Hotamisligil, 2005). Makrofágy vykazují značnou heterogenitu, která má zřejmě souvislost se změnami, ke kterým v TT dochází. V širokém spektru rozlišujeme dva základní typy makrofágů s odlišnou funkcí a sekrecí cytokinů. Jedná o makrofágy typu M1 a typu M2 (Kováčiková et al., 2010). M1 typ sekretuje prozánětlivé cytokiny a podílí se na zánětlivých reakcích. M2 makrofágy vykazují sekreci protizánětlivých makrofágů a podíl na imunosupresivních stavech (Mantovani et al., 2004; Mosser, 2003).

Makrofágy hrají také důležitou roli v procesu angiogeneze. Stimulují endoteliální buňky, které vstupují do tukové tkáně a vytvářejí nové kapilární sítě (Lacasa et al., 2007). Přesný mechanismus jejich povolávání a role v obezitě a s ní spojených komplikací však zatím nejsou plně definovány (Cancello and Clément, 2006).

Zvýšená poptávka po proteinové syntéze v období přílišného přijmu potravy a chronický nadbytek lipidů a glukózy může zapříčinit stres endoplazmatického retikula (ER) (Zhang and Kaufman, 2008). Má se za to, že stres ER na buněčné úrovni je ukazatelem metabolického stresu a je zapojen v zánětlivých procesech. Jelikož byla potvzena spojitost mezi ER stresem, aktivací dráhy NF-κB a zvýšenou expresí cytokinů

jako je TNFα, ER stres by mohl být jednou z možných příčin dysregulace funkcí TT (Ron and Walter, 2007; Hotamisligil, 2010).

Stále však zůstává mnoho důležitých otázek ohledně příčin ER stresu a jeho účasti v zánětlivých reakcích.

4.6. Endoplazmatické retikulum

4.6.1. Struktura

Endoplazmatické retikulum (ER) je organelou eukaryotických buněk, tvořenou nepravidelným systémem vzájemně propojených cisteren, lamel a sakulů. Vnitřní prostor cisteren je tvořený endoplazmatickou matrix (Alberts et al., 1994). Povrchová plocha organely může být až 40 krát větší než povrch celé buňky. Propojení s perinukleárním systémem zajišťuje vzájemnou komunikaci ER a jádra (Langmajer, 2009). Podle přítomnosti či nepřítomnosti ribosomů vázaných na povrch retikula rozlišujeme drsné a hladké endoplazmatické retikulum (Lodish et al., 2000).

4.6.2 Funkce

Drsné endoplazmatické retikulum má na svém cytoplazmatickém povrchu navázané ribosomy. Je místem syntézy, skládání a postranslačních modifikací proteinů (Lodish et al., 2000). Proteiny vstupující do ER jsou určeny buď samotnému retikulu, nebo následně podle svého určení putují do jiných organel jako např. Golgiho aparátu, lysosomů, endosomů, plasmatické membrány, nebo jsou sekretovány (Alberts et al., 1994). mRNA těchto proteinů nese signální sekvenci, která je rozpoznávána ribonukleoproteinem SRP (signál rozpoznávající částice), jež navede vznikající polypeptid k ER, kde syntéza pokračuje. SRP částice se přitom váže na svůj receptor v membráně ER a z polypeptidového řetězce se uvolní. Samotný vstup do lumen ER je zajišťován pomocí translokačního kanálu. Otevření kanálu zajišťuje již zmíněná N-signální sekvence, která se na translokon váže (Lodish et al., 2000). Po vstupu polypeptidu do lumen je sekvence odbourána signální peptidázou (Alberts et al., 1994). U transmembránových proteinů je proces o něco složitější.

Ve vnitřním prostředí jsou polypeptidové řetězce skládány do nativní konformace. Děje se tak pomocí molekulových chaperonů, které se váží k částečně syntetizovanému řetězci a pomáhají proteiny správně sbalovat. Proteiny, které nejsou správně sbaleny, jsou degradovány a odstraněny z ER. Některé proteiny jsou dále upravovány v procesech oligomerizace a glykosylace. Velká část proteinů je distribuována k dalším úpravám do Golgiho aparátu či sekretována.

Hladké ER nemá na svém povrchu navázané ribosomy. Vzniká z drsného ER a často je propojené s Golgiho aparátem. Dochází zde k syntéze lipidů a steroidů, především fosfolipidů a cholesterolu. Jsou zde lokalizovány četné enzymy, kontrolující některé buněčné pochody jako např. glykogenolýzu (Langmajer, 2009).

Neméně důležitá je schopnost ER akumulovat Ca^{2+}, jehož koncentrace je zde mnohonásobně vyšší než v cytoplazmě. V endoplazmatickém retikulu se Ca^{2+} podílí na prvotních fázích proteinového sbalování, uvolněný do cytosolu ovlivňuje řadu reakcí. Hromadění nesprávně sbalených proteinů v ER způsobuje uvolňování Ca^{2+}, což narušuje buněčnou homeostázu (Zhang et al., 2008).

4.6.3 ER stres

Stres ER je vyvolán nerovnováhou mezi množstvím nesbalených proteinů vstupujících do lumen a funkční kapacitou ER. Důsledek této situace je akumulace nesbalených proteinů (Zhang and Kaufman, 2008). Tento stav může být vyvolán za podmínek ovlivňujících množství syntetizovaných proteinů a možnosti jejich posttranslačních úprav. Konkrétně se jedná např. o nedostatek degradačních proteinů, změnou prostředí v důsledku nedostatku kyslíku, vyčerpání akumulovaného Ca^{2+}, inhibici glykosylace proteinů, která je fyziologicky způsobena např. nedostatkem glukózy, nebo virovou infekcí spouštějící expresi cizích proteinů (Brostrom and Brostrom, 2003). Odezvou na tuto buněčnou nerovnováhu je tzv. odpověď nesbalených proteinů (unfolded protein response, UPR) (Gregor and Hotamisligil, 2007). Při této reakci se aktivují intracelulární signální dráhy mající vliv na buněčné pochody jako je metabolismus proteinů, aminokyselin a lipidů a které regulují expresi mnoha genů důležitých v sekrečních drahách (Gregor et al., 2008).

Kontrola množství proteinů, které vstupují do retikula, je dosažena prostřednictvím senzorů těchto signálních drah, které jsou součástí membrány ER. V savčích buňkách byly identifikovány tři hlavní transmembránové proteiny, které reagují na změny způsobující stres ER: IRE1 (inositol requiring protein 1), ATF6 (activating transcription faktor 6) a PERK (double-stranded RNA-dependent protein kinase, (PKR)-like ER kinase) (Zhang and Kaufman, 2008; Sharma et al., 2009). Ve správně fungujícím retikulu jsou tyto proteiny inaktivovány vazbou s chaperony v jejich intralumenální doméně, karboxyterminální u ATF6 a aminoterminální u IRE1 a PERK. Mezi nejvýznamnější chaperon v savčích buňkách, který inaktivuje všechny tři senzory UPR patří BiP (GRP78, HSPA5). Pokud se v ER začne vyskytovat nadbytek nesbalených proteinů, dochází k preferenční vazbě chaperonu BiP na nascentní polypeptidové řetězce a tím k uvolňování chaperonu z regulačních domén UPR senzorů (Hotamisligil and Erbay, 2010).

Primárním smyslem aktivace UPR je zlepšení funkce ER a tím i znovu nastolení buněčné rovnováhy. K tomu jsou využívány následující mechanismy. Snížením syntézy proteinů a tedy ke snížení translokace do lumen dochází ke snížení množství proteinů vstupujících do ER, dále dochází ke zvýšení kapacity ER, zahrnující transkripční aktivaci cílových UPR genů, včetně těch, které napomáhají sbalování proteinů v ER. Pokud však homeostáza dosažena být nemůže, je spuštěn proces buněčné smrti jako ochrana celého organismu před buňkami s akumulovanými proteiny s nesprávnou konformací, tedy nefunkčními a potenciálně nebezpečnými (Hotamisligil, 2010).

Mezi nejstarší identifikovanou signální dráhu UPR patří dráha zahrnující protein IRE1. Tento protein byl poprvé identifikován v kvasinkách (Ron and Walter, 2007). Po vyvázání chaperonu v důsledku stresu ER dochází k IRE1 oligomerizaci a díky kinázové aktivitě i autofosforylaci. Fosforylací získává protein ribonukleázovou aktivitu. Takto aktivovaný IRE1 vyštěpuje u savců z mRNA transkripčního faktoru XBP1 segment o délce 26 bází. Po vyjmutí fragmentu je mRNA spojena ligázou (Zhang and Kaufman, 2008). Tento sestřih je unikátní, protože se uskutečňuje v cytosolu. Posun čtecího rámce vede následně k translaci sXBP1, který je oproti nesestřižené formě uXBP1 velmi silným transkripčním aktivátorem. U kvasinek je homologem transkripční aktivátor Hac1. XBP1 spouští transkripci genů kódujících chaperony a genů pro proteiny, které hrají důležitou roli v procesech skládání, sekrece a degradace proteinů v ER. Tímto dochází ke zvyšování kapacity pro skládání proteinů a podmínkám zmírnění nebo vyřešení stresu ER. Bylo

zjištěno, že u savců má IRE1 nejspíš ještě další funkce, spojené např. s aktivací JNK (Ron and Walter, 2007).

Paralelně s XBP1 funguje druhý senzor stresu ER, ATF6. Následně po vyvázání chaperonu je transportován z ER do Golgiho aparátu, kde je proteázami S1P (site 1 protease) a S2P (site 2 protease) rozštěpen za vzniku funkčně aktivního fragmentu ATF6. Takto upravený ATF6 je uvolněn do cytosolu, odkud putuje do jádra, kde stimuluje expresi cílových genů UPR, např. transkripčních faktorů ATF4 a ATF3 (Zhang and Kaufman, 2008).

Zdá se, že ATF6 a XBP1 jsou převažujícími regulátory programů transkripční reakce spouštěné během UPR. V nedávné době však byly identifikovány další proteiny, které jsou zakotveny v membráně ER a mají vysoké sekvenční podobnosti s ATF6. Stejně jako tento transkripční faktor procházejí tyto proteiny proteolýzou v Golgiho aparátu a následnou translokací do jádra. Dosud bylo identifikováno pět takovýchto proteinů, které však vykazují vysokou specifičnost aktivačních stimulů, charakteristický aktivační profil, distribuci ve tkáních a konečnou reakci na stres ER, což ve výsledku naznačuje vysokou specifičnost a komplexnost reakcí UPR (Hotamisligil and Erbay, 2010; Hotamisligil, 2010).

Třetím výše zmiňovaným transmembránovým proteinem signální dráhy UPR je PERK. Podobá se strukturně i funkčně IRE1. Osvobozením od chaperonu dochází k oligomerizaci a autofosforylaci, která je následována fosforylací α podjednotky eIF2α na serinu 51 (Zhang and Kaufman, 2008). Byly identifikovány ještě tři další kinázy jiné než PERK, které mají schopnost fosforylovat eIF2α, ale jejich role ve stresu ER zůstává zatím nejasná. Fosforylovaný eIF2α snižuje globální syntézu proteinů atenuací translace a tím redukuje zátěž vstupujících proteinů do již saturovaného retikula. Fosforylace eIF2α navíc přispívá k translaci specifických mRNA. Jedná se například o mRNA kódující proteiny důležité v procesech apoptózy (Wek et al., 2006).

5. Materiál a metody

5.1. Dietní program

Snížení váhy těla o 5-10% u obézních má významný pozitivní vliv na zdraví (Svačina and Bretšnajdrová, 2008; Aucott et al., 2005). Dieta s nízkým příjmem kalorií LCD je založena na redukci hmotnosti bez úbytku svalové hmoty. Přes jednoznačně pozitivní účinky snížení hmotnosti na metabolické zdraví se většina osob podstupujících dietu setkává s obtížemi při dlouhodobém udržení původního váhového úbytku. Uvádí se, že udržet si novou váhu je schopno méně jak 10% pacientů (Hausman et al., 2001). V tomto směru se zdají být jako nejvhodnější dlouhodobé dietní programy, které zahrnují i fázi, kdy se váha neredukuje, ale udržuje. Právě tento typ dietní intervence byl zvolen pro popsanou studii.

Do studie bylo zahrnuto 22 premenopauzálních žen. Kritéria pro vyřazení zahrnovala ztrátu více jak 3 kil během tří měsíců před začátkem studie, dále diabetes, těhotenství, farmakologickou léčbu obezity, účast na jiných studiích, drogovou či alkoholovou závislost. Studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Dobrovolnice byly plně informovány a byl získán jejich písemný souhlas s účastí na studii.

Dietní intervence trvala po dobu pěti až šesti měsíců. Redukční fáze, při které byl příjem kalorií snížen o 600 kcal/den a došlo k úbytku váhy, trvala tři měsíce. Po zbývající 2-3 měsíce ženy udržovaly váhu na základě individuální neredukční diety. Ženy docházely na stanovené konzultace s lékařem a dietní sestrou a vedly si dietní záznam.

Před zahájením a na konci studie byla provedena antropometrická měření, biochemické vyšetření krve ve stavu nalačno dále a byla provedena biopsie podkožní tukové tkáně v oblasti břicha.

Parametry	Baseline	WM	P value
Věk (roky)	40.7±1.79		
Váha (kg)	91.49±2.12	82.5±1.93	**<0.001**
BMI (kg/m^2)	32.97±0.91	29.71±0.82	**<0.001**
FM (%)	39.71±1.1	36.47±1.11	**<0.001**
Obvod pasu (cm)	102.6±2.24	93.04±2.13	**<0.001**
Poměr pas/boky	0.86±0.02	0.84±0.02	**0.011**
Glucosa (mmol/L)	5.42±0.11	5.06±0.13	**0.012**
Insulin (mIU/L)	9.62±0.97	7.27±0.92	**0.002**
HOMA-IR	2.36±0.27	1.71±0.27	**0.002**
Total cholesterol (mmol/L)	5.38±0.27	4.63±0.18	**0.006**
HDL-C (mmol/L)	1.66±0.09	1.44±0.07	**0.007**
Triglyceridy (mmol/L)	1.19±0.09	0.78±0.05	**<0.001**

Tabulka 1: Parametry měřené u 22 prem. žen před a po dietě (BMI- body mass index; FM- fat mass; HOMA-IR- homeostasis model assessment of the insulin resistance index; HDL-C- high-density lipoprotein cholesterol; WM- weight maintenance). Převzato ÚTL 3. LF UK.

5.2. Izolace a expanze lidských preadipocytů z bioptických vzorků tukové tkáně

Vzorky biopsií podkožní TT odebrané z abdominální oblasti byly zpracovány v aseptickém prostředí. Byly promyty PBS a očištěny od konektivní tkáně a krevních kapilár. Tkáň byla zvážena a v 50 ml kónické zkumavce nastříhána tak, aby finální fragmenty nebyly větší než 2 mm². Následně byl přidán roztok kolagenázy (300 U/ml, Biochrom, Německo) v poměru 1:1,5. Zkumavka s tkání a kolagenázou byla vložena do třepací lázně při 37°C, 160 rpm a inkubována po dobu 1 hodiny.

Po inkubaci byl přidán PBS s gentamicínem a buněčná suspenze byla centrifugována po dobu 5 minut, 1300 rpm. Pro kompletní separaci stromavaskulární frakce od adipocytů byla zkumavka se směsí důkladně protřepána a centrifugace byla zopakována. Adipocyty nalézající se v supernatantu a zbylý roztok kolagenázy byly odstraněny. Peleta obsahující buňky stromavaskulární frakce byla inkubována po dobu 10 minut v ELB pufru (2 ml). Tímto krokem byly odstraněny kontaminující červené krvinky.

Po ukončení lyze byla buněčná suspenze naředěna PBS, centrifugována a supernatant byl následně odstraněn.

Peleta byla rozsuspendována v proliferačním médiu PM4 (9,7 ml Basal medium, 250 µl MSC–qualified FBS Invitrogen #12662-011, 0,76 µl inzulin 10 mg/ml, 0,4 µl FGF 25 µg/ml, 1 µl EGF 100 µg/ml). Takto získané buňky byly nasazeny na 35 mm Petriho misky a uloženy do inkubátoru, 37°C, 5% CO_2.

Po dvou dnech po založení primární kultury byly buňky v 35 mm Petriho miskách opláchnuty PBS z důvodu odstranění neadherentních buněk a bylo přidáno čerstvé médium PM4. Médium bylo měněno každé dva dny do dosažení 70% influence (7-8 dní), kdy byla buněčná kultura pasážována (P1). Médium bylo odsáto, buňky dvakrát opláchnuty 2 ml PBS/miska a uvolněny trypsinizací po dobu max. 4 minut (pár kapek 0,05% trypsin-EDTA/miska). Trypsinizace byla zastavena přidáním 2 ml PM4/miska. Buněčná suspenze byla přemístěna do 100 mm Petriho misky a dále naředěna 9 ml nového PM4/miska. Buňky byly dále udržovány v 37°C, 5% CO_2.

Médium PM4 bylo po dvou dnech vyměněno. Po dosažení 70% influence (obvykle 4. den), byly buňky pasážovány (P2). Vzniklá buněčná suspenze byla centrifugována po dobu 5 minut, 1300 rpm. Supernatant byl odstraněn a získaná peleta byla rozsuspendována v 7 ml média PM4. Buňky byly spočítány pomocí Burkerovy komůrky (viz kapitola 5.2.1.). Buňky byly poté nasazeny na 100 mm Petriho misky v denzitně 10 000 buněk na cm^2 růstové plochy. Pasáž č. 3 byla provedena obvyklým způsobem s tím, že část buněk byla zamrazena (viz kapitola 5.2.2) a zbylé buňky nasazeny na experimenty. Další pasáže (maximálně do pasáže č. 6) byly provedeny vždy, když buňky dosáhly 70% influence. Buňky byly využity na plánované pokusy (nasazení kultur na sklíčka pro imunofluorescenční metody kvantifikace ER stresu nebo procesy diferenciace).

5.2.1. Počítání buněk pomocí Burkerovy komůrky

Do Burkerovy komůrky bylo napipetováno 2 krát 9 µl vzorku. Pod mikroskopem s objektivem 10 krát zvětšení byly spočítány buňky ve 4 velkých čtvercích v obou mřížkách. Průměrný počet na čtverec byl násoben 10 000, výsledek dal počet buněk na 1 ml výchozí buněčné suspenze. Toto množství bylo následně vynásobeno celkovým objemem vzorku a

byl zjištěn celkový počet buněk v suspenzi. Podle výsledné hodnoty byly plánovány další pokusy, přičemž buňky byly vždy nasazovány v denzitně 10 000 buněk na cm² růstové plochy.

5.2.2. Zamražení

Buněčná suspenze byla získána trypsinizací (viz kapitola 5.2.). Suspenze obsahující potřebný počet buněk byla centrifugována 5 minut, 1300 rpm a získaná peleta byla rozsuspendována v zamražovacím médiu Cryo-SFM (PromoCell) na finální koncentraci 3 mil buněk/ml. Do jedné zamražovací zkumavky byl pipetován 1 ml suspenze. Zkumavky byly v zamražovacím kontejneru MrFrosty (Nalgene) regulujícím pokles teploty na 1°C za 1 minutu umístěny do -80°C. Druhý den byly vzorky přesunuty do zásobníku s tekutým dusíkem, kde byly dále uchovávány.

5.2.3. Rozmražování

Zamražovací zkumavky byly v laminárním boxu otřeny 70% etanolem a mírně pootevřeny, aby se uvolnil tlak vznikající rozpínáním dusíku potenciálně přítomným ve zkumavce. Zkumavky byly opět pevně uzavřeny a rozmraženy co nejrychleji ve vodní lázni při 37°C. Buňky byly naředěny PM4 médiem a nasazeny na Petriho misky v koncentraci 10 000 buněk/cm² a po 4-8 hodinách bylo médium vyměněno, aby se odstranilo DMSO obsažené v zamražovacím médiu. Dále byly buňky kultivovány standardním způsobem popsaným v kapitole 5.2. tj. každé dva dny bylo měněno médium do dosažení požadované konfluence pro následné pokusy.

5.3. Diferenciace adipocytů

Buňky byly pěstovány do postkonfluentního stavu. Poté byly opatrně opláchnuty DPBS s Mg^{2+}/Ca^{2+}. Diferenciace byla indukována diferenciačním médiem DIFM+ (15 ml Basal medium, 0,58 µl inzulin 10 mg/ml, 7,5 µl Dexamethasone 2 mM, 7,5 µl T3 2 µM, 37,5 µl IBMX 0,1 M, 3 µl Rosiglitazone 5 mM, 150 µl transferin 10 µg/ml). Médium DIFM+ bylo třetí den vyměněno. Šestý den byly buňky opět promyty v DPBS (obohacené o Ca^{2+}, Mg^{2+}) a inkubovány v diferenciačním médiu DIFM (15 ml Basal medium, 0,58 µl

inzulin 10 mg/ml, 7,5 µl T3 2 µM , 15 µl cortisol 0,1 mM, 150 µl transferin 10 µg/ml). Médium DIFM bylo po třech dnech opět vyměněno. 12. den byly buňky plně diferencované a připravené k pokusům.

Indukce lipolýzy

Plně diferencované adipocyty ve 12 jamkové destičce byly opláchnuty DPBS s Mg^{2+}/Ca^{2+} a následující 3 hodiny kultivovány DMEM-F12 médiu, které bylo doplněno o 0,5% BSA bez mastných kyselin a o transferin (objem média 1 ml na jamku). BSA bylo použito s cílem vyvazovat mastné kyseliny uvolňované z buněk v průběhu kultivace. Pro indukci lipolýzy byl do média přidán isoproterenol (finální koncentrace 1 µM), nebo dibutyl cAMP (finální koncentrace 100 µM). Po 3 hodinách bylo médium přepipetováno do 1,5 ml zkumavek, centrifugováno při 3000 rpm, 5 min, 4°C (kvůli odstranění možných buněčných zbytků) a alikvotováno. Médium bylo skladováno v -80°C až do doby analýzy. Buňky byly lyzovány v RIPA lyzačním pufru 150 µl/vzorek (1 M Tris-Cl pH 8 0,5 ml, 0,25 M EDTA 0,2 ml, 0,1 M EGTA 0,25 ml, 10% Triton 5 ml, 10% Na Deoxycholát 0,5 ml, 10% SDS 0,5 ml, 1 M Nacl 7 ml, 85 µl dH_2O, dále přidán inhibitor fosfatáz Phostop (ředění 10 krát) a inhibitory proteáz Pepstatin (ředění 250 krát) a Complete (ředění 7 krát)) a v lyzátu byla stanovena koncentrace proteinů.

5.4. Stanovení celkových proteinů pomocí metody BCA

BCA metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA). Principem je reakce peptidové vazby s měďnatými ionty za alkalických podmínek, kdy dochází k redukci na meďné ionty a komplexaci se solemi kyseliny. Tato komplexace je doprovázena barevnou změnou (fialové zabarvení).

Proteinové lyzáty včetně vytvořených standardů (roztoky BSA o koncentracích 125-2000) byly uchovávány na ledu. Poté byly zvortexovány a přeneseny na 96 jamkovou destičku o objemu 10 µl/jamička. Dále bylo do všech jamek přidáno 200 µl směsi reagentu A (BCA roztok) a reagentu B ($CuSO_4.5H2O$) v poměru 50:1. Destička byla následně inkubována po dobu 30 minut při 37°C. Výsledná absorbance vzorků byla změřena při vlnové délce 562 nm. V programu Logit byla vygenerována standardní křivka a na jejím základě určeny koncentrace proteinů v analyzovaných vzorcích.

5.5. Fixace a permeabilizace buněk

Smyslem fixace je prezervovat buněčné struktury v buňce při zachování jejich antigenicity. Nejšetrnější fixací je použití aldehydů, nejčastěji formaldehydu. Metanolová fixace částečně vede k vysrážení proteinů a současně k permeabilizaci buňky. Permeabilizace umožňuje přístup protilátek do buňky.

Buňky nasazené na krycí sklíčka (12 mm průměr) umístěné ve 24 jamkové destičce byly promyty v 0,5 ml PBS/jamička. Tento krok byl zopakován. Následně byly fixovány 0,5 ml 4% paraformaldehydem naředěným v PBS (zásobní roztok 20% paraformaldehyd) po dobu 20 minut, nebo 0,5 ml 100% methanolem v -20°C 10 minut. Fixace pomocí formaldehydu byla někdy prováděna spolu s permeabilizací v 0,1% Tritonu. Po fixaci byly buňky promyty v PBS (5 minut). Tento krok byl 3 krát zopakován. Fixované buňky byly buď ihned použity pro imunofluorescenční barvení (viz dále kapitola Barvení ER) nebo byly dále permeabilizovány v 0,5 ml 0,5% Tritonu v PBS/jamička (10% zásobního roztok) nebo 0,1% saponinu (10% zásobního roztok) v PBS po dobu 10 minut. Permeabilizace byla ukončena promytím v PBS. Buňky byly promyty následně ještě 2 krát.

5.6. Barvení ER

5.6.1. Barvení ER pomocí primární a sekundární protilátky

Po fixaci a permeabilizaci byly buňky barveny nepřímou imunofluorescencí. Jako primární protilátky byly použity BiP (ředění 50, 100 a 200 krát v PBS + 0,05% Tween), ERp57 (G 117) Rabbit Ab #2881 (stejné ředění), ERp44 Rabbit Ab #2886 (stejné ředění), PDI (ředění 100 krát v PBS + 0,05% Tween, všechny protilátky od Cell Signaling). K detekci ER bylo využito také protilátky PDIA 3 (Sigma), ředění 1000 krát. Jako sekundární protilátka byla použita kozí anti-králičí nebo anti-myší Alexa 448 (ředění 400 krát v PBS + 0,05% Tween, Invitrogen).

30 µl naředěných protilátek/sklíčko bylo naneseno na kousek Parafilmu v inkubační misce. Miska byla obalena alobalem a vlhkým filtračním papírem z důvodu zajištění dostatečné vlhkosti a zabránění průsvitu světla. Jako negativní kontrola bylo použito PBS + 0,05% Tween. Zbytkový PBS na krycích sklech s buňkami byl odsát buničinou a krycí skla přiložena (stranou s buňkami) na kapku s primární protilátkou nebo kontrolní roztok.

Inkubace buněk v ERp57 a ERp44 byly hodinové, v pokojové teplotě. Inkubace u BiP a PDI trvaly 24 hodin ve 4°C. Po inkubaci byla sklíčka zakápnuta PBS + 0,05% Tween, přemístěna do destičky 24 WP (strana s buňkami směřovala vzhůru) a promyta 3 krát v PBS + 0,05% Tween. Interval mezi oplachy byl 5 minut.

Do inkubační misky bylo na čistý parafilm napipetováno 30 µl sekundární protilátky Alexa 448/sklíčko. Sklíčka byla opět osušena a stranou s buňkami přiložena na protilátku. Inkubace ve tmě trvala 45 minut v pokojové teplotě. Následně byla stejným způsobem promyta. Po promytí PBS + 0,05% Tween a čistým PBS byla sklíčka osušena a přiložena na podložní skla s 5 µl kapkou montovacího média Prolong Gold nebo MOWIOL/sklíčko. Po 15 minutové inkubaci ve tmě byly preparáty fixovány lakem na nehty a dále skladovány ve 4°C. Druhý den byly obarvené buňky snímány konfokálním mikroskopem LEICA.

5.6.2. Barvení ER pomocí ER-tracker Blue-White DPX (Invitrogen)

Pro barvení endoplazmatického retikula byl dále použit fluorescenční ER tracker, který se váže na draselné kanálky ER poháněné ATP.

Živé buňky byly ve 24 jamkové destičce barveny přidáním 0,5 ml naředěného ER-tracker Blue-White DPX/jamička (ředění 100 nM, 200 nM, 500 nM a 1µM v DPBS obohaceném Ca^{2+} a Mg^{2+}). Inkubace trvala 30 minut při 37°C. Další manipulace s buňkami byly prováděny s co největším omezením přístupu světla, aby se zabránilo vysvěcování fluorescenční barvy.

Po obarvení byly buňky fixovány v paraformaldehydu (kap. 5.5.). Po fixaci byl proveden mounting na podložní sklo použitím 5 µl ProLong Gold/sklíčko. Následně byla podložní skla s preparáty uložena do 4°C.

5.7. Konfokální mikroskopie

Obarvené preparáty byly snímány konfokálním mikroskopem Leica SP5 II při objektivu HCX pl apo lambda 63 krát 1,4 oil za použití laseru 405 nm (DAPI, ER tracker BlueWhite) a 488 nm (Alexa 488).

5.8. Izolace RNA

Lyzáty buněk v pufru RLT byly po dobu 10 minut inkubovány při 37°C. Pak byly zvortexovány a krátce centrifugovány 1-2 sec., 13 000 rpm. Bylo přidáno 600 µl 70% etanolu/vzorek. Zkumavky se vzorky byly 2-3 krát obráceny a intenzivně zvortexovány, aby došlo k dokonalému promísení etanolu s lyzátem. 650 µl vzorku bylo následně napipetováno do připravených kolonek a odstředěno 60 sec. při 13 000 rpm.

Principem metody je fakt, že RNA se zachytí na kolonce, přefiltrovaná kapalina pak může být odstraněna. Po odstranění kapaliny byl na kolonu nanesen zbývající objem vzorku. Centrifugace a odstranění tekutiny bylo zopakováno. Kolony byly promyty 700 µl pufru RW_1 (vzorky byly stočeny 60 sec. při 13 000 rpm, přefiltrovaná kapalina odstraněna, kolona přemístěna do nové zkumavky) a dvakrát 500 µl RPE (vzorky byly stočeny 60 a 120 sec. při 13 000 rpm, přefiltrovaná kapalina odstraněna, po druhém oplachu kolona přemístěna do nové zkumavky).

Jakékoliv zbytky pufru RPE byly odstraněny další centrifugací 120 sec. při 13 000 rpm a kolona byla umístěna do nové zkumavky. RNA byla eluována 35 µl dH_2O bez RNáz, která byla předtím zahřáta na 50°C. Inkubace trvala 5 minut. Následně proběhla centrifugace 60 sec. při 13 000 rpm. Eluovaná RNA byla znovu aplikována na kolonu, aby se zvýšil výtěžek, a centrifugována 120 sec. při 13 000 rpm. Získaná RNA byla napipetována do popsaných zkumavek a umístěna na led. Koncentrace a čistota RNA byla změřena na Nanodropu 100 pomocí stanovení absorbance ve vlnové délce 260 a 280 nm.

5.9. Transkripce RNA a Real Time PCR

600 ng RNA bylo naředěno dH_2O do objemu 6 µl. Byla přidána směs DNázy (Invitrogen) a jejího pufru (4 µl) pro odstranění genomické DNA. Po 15 minutové inkubaci v pokojové teplotě bylo přidáno 1 µl EDTA/vzorek, aby byla DNázová aktivita

pozastavena. DNáza byla následně denaturována v PCR cykleru po dobu 15 minut při 65°C. Bylo přidáno 9 µl směsi reverzní transkriptázy, náhodných hexamerů a pufru (vše z kitu High-Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems). Reverzní transkripce probíhala opět v PCR cykleru, fáze 10 minut 25°C (nasedání primerů), 120 minut 37°C (transkripce), 5 minut 85°C (teplotní inaktivace enzymu) a konec 4°C. Získaná cDNA byla skladována v -20°C.

5.9.1. Real Time PCR

Real Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) je moderní metoda používaná v molekulární biologii, která umožňuje rychlou, spolehlivou a citlivou detekci a kvantifikaci specifických úseků DNA nebo RNA. Vychází z klasické PCR. Amplifikace nukl. kyseliny je založena na opakované replikaci úseku ohraničeného specifickými primery. Replikace probíhá za pomoci termostabilní DNA polymerázy, zpravidla Taq polymerázy, která je izolovaná z termofilní bakterie. Celý proces je rozdělen na teplotní fáze, denaturace (95°C), nasednutí primerů a syntéza ohraničeného úseku DNA (60°C), a cyklicky se opakuje. V každém cyklu dochází ke zdvojení amplifikovaného úseku, který s přibývajícím počtem opakování exponenciálně narůstá. Real Time PCR je založena na sledování průběhu reakce v tzv. reálném čase pomocí fluorescenčních barviv nebo sond, které zvýšením fluorescence detekují množství produktu. Tato metoda je oproti konvenční PCR přesnější, jelikož odečet rozdílů mezi vzorky probíhá v exponenciální části reakce.

Ke kvantitativnímu stanovení genové exprese byla využita technologie TaqMan a SybrGreen, analýza byla prováděna na přístroji ABI 7500 Fast, s mastermixy TaqMan Gene Expression MM a PowerSybr Green MM od Applied Biosystems.

Vzorky cDNA byly naředěny na finální koncentraci 10 ng/µl a 2 ng/ul. Na 96 jamkovou destičku bylo naneseno 2,5 µl cDNA, pro každý vzorek v duplikátu. Poté bylo do každé jamky přidáno 10 ul Master mixu s mixem primerů a prób (TaqMan), nebo Master mix s primery (gen aP2, SybrGreen). Analyzovány byly geny ATF3, ATF4, GUSB, HSAP5, aP2 a PPARγ. Gen pro GUSB byl použit jako endogenní kontrola nanášky. Rozložení nanášek pro jednotlivé geny je uvedeno v tabulce 2.

	ATF3	ATF4, HSPA5, PPARγ, GUSB	aP2
cDNA templát	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Taq Man Mix 2x	6,25 µl	6,25 µl	-
Sybr green 2x	-	-	6,25 µl
primery AOD	(20x) 0,65 µl	(40x) 0,325 µl	(20x) 0,65 µl
dH_2O	3,1 µl	3,425 µl	3,1 µl

Tabulka 2: Příprava RT-PCR.

K určení relativního zastoupení mRNA zkoumaných genů v daném vzorku byla použita metoda ΔΔCT.

5.10. Western Blot

Western Blot je analytická metoda sloužící k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny. Je založena na gelové elektroforéze, při které dochází k separaci proteinů podle velikosti, dále pak na přenosu na membránu a vlastní detekci pomocí primární a sekundární protilátky konjugované s enzymem a substrátu, který je tímto enzymem štěpen za vzniku chemiluminiscence. Ta je pak zaznamenána na odpovídajícím technickém zařízení (obrázek 3).

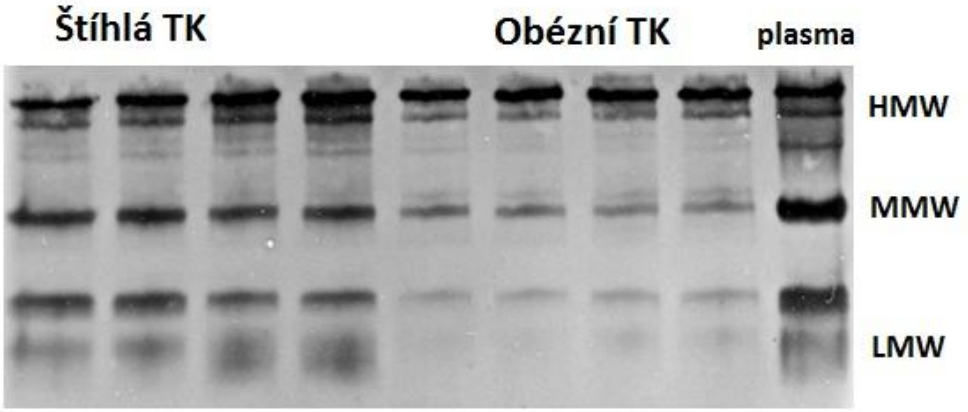
Nativní elektroforéza byla provedena na 7% separačním gelu (5,2 ml dH_2O, 2,4 ml 30% akrylamid, 2,5 ml pufr 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 100 µl 10% APS, 7 µl TEMED) a 5% zaostřovacím gelu (2,8 ml dH_2O, 0,66 ml 30% akrylamid, 0,5 ml pufr 1 M Tris pH 6,8, 40 µl 10% APS, 4 µl TEMED). Elektroforézou bylo separováno 10 µl kondiciovaného média s 5 µl vzorkového pufru (0,1 M Tris/HCl pH 6,8, 20% glycerol, 0,02% bromfenolová modř). Jako standard byla použita lidská plasma. Elektroforéza probíhala za nedenaturujících a neredukujících podmínek v elektrodovém pufru (0,025 M Tris/HCl pH 8,3, 0,25 M glycin) po dobu 3 hodin při napětí 135 V a za stálého chlazení.

Po provedení elektroforézy byly proteiny přeneseny na nitrocelulosovou membránu (Hybond C, Nitrocellulose, Amersham Biosciences). Přenos probíhal 2 hodiny při

nastavení 0,5 A a za stálého chlazení. Membrány byly poté do provedení imunodetekce zamraženy při -20°C.

Membrány byly blokovány 45 minut v roztoku 5% nízkotučného mléka v PBS + 0,05% Tween a inkubovány 1 hodinu v roztoku králičí protilátky proti lidskému adiponektinu (Rabbit polyclonal antibody, Biovendor Laboratory Medicine Inc., Modrice, Czech Republic), ředěné 1:1000 v 5% mléku v PBS + 0,05% Tween. Poté byly membrány promyty 3 krát v PBS + 0,05% Tween po dobu 5 minut a dále inkubovány 35 minut s kozí anti-rabbit protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (Jackson Immuno Research Europe Ltd, Cambridge, UK), ředěnou 1:10 000 v 5% mléku v PBS + 0,05% Tween. Následně opět promyty 3 krát 5 min v PBS + 0,05% Tween. Všechny inkubace byly provedeny za stálého míchání při pokojové teplotě.

Membrány byly osušeny filtračním papírem, potaženy směsí chemiluminiscenčních substrátů West Femto a West Pico v poměru 1:4 (Thermo Scientific) a exponovány pomocí přístroje Gel Logic 4000 PRO (Carestream, Rochester, USA). Získané snímky byly vyhodnoceny v programu Molecular Imaging Software (Carestream, Rochester, USA).



Obrázek 3: Detekce adiponektinových multimerických komplexů metodou WB.

5. 11. ELISA

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) je biochemická metoda používaná k detekci přítomnosti antigenu ve vzorku. Podstatou metody ELISA je nejprve navázání primární protilátky na dno destičky, dále pak samotná vazba s antigenem obsaženým ve vzorku. V dalším kroku dochází k vazbě sekundární protilátky a vytvoření tvz. sendviče. Nezbytným katalyzátorem konečné fáze ELISY je enzym, nejčastěji peroxidáza, který je obsažen v konjugátu, který se váže na sekundární protilátku. Následným přidáním substrátu je zahájena reakce, kdy dochází k barevné změně.

5.11.1. Detekce adiponektinu (kit Adiponectin DuoSet, R&D Biosystems)

96 jamková destička byla potažena 100 µl primární protilátky pro adiponektin/jamička (ředění 180 krát v PBS). Následně byla přelepena fólií a inkubována přes noc při pokojové teplotě (15-16hodin). Druhý den byla destička promyta 3 krát v 200 µl PBS + 0,05% Tween/jamička. Poté bylo přidáno 200 µl Reagent diluentu (1% BSA v PBS) pro zablokování míst s nespecifickou afinitou vůči proteinům a destička byla inkubována 1 hodinu. Oplach byl zopakován. Do každé jamičky bylo přidáno 100 µl vzorků kondiciovaných médií (ředění 100 krát v Reagent diluentu), byly dále naneseny standardy 3,125-2000 pg/ml. Destička byla přelepena fólií a inkubována po dobu 2 hodin v pokojové teplotě. Oplach byl zopakován, poté bylo do destičky přidáno 100 µl detekční protilátky (ředění 180 krát v Reagent diluentu), destička byla přelepena fólií, inkubace trvala opět 2 hodiny. Po inkubaci byl proveden oplach (3 krát). Bylo přidáno 100 µl konjugátu (Streptavidin HRP) ředěného 200 krát. Po 20 minutách působení konjugátu (v temném prostředí) následoval oplach (3 krát). Vzorky byly vystaveny dále působení směsi peroxidu vodíku a tetrametylbenzidinu (1:1). Během této inkubace docházelo k barevné změně vzorků. Reakce byla zastavena přidáním 50 µl 2 M kyseliny sírové.

Následně byla určena optická denzita vzorků přístojem spektrofotometr Versamax (Thermo Scientific) odečtením hodnot změřených při vlnových délkách 450 a 570 nm. Odečtení vlnových délek bylo použito k odstranění možných optických chyb na destičce, jež by mohlo vézt k nepřesným výsledkům. V programu Logit byla vygenerována standardní křivka a na jejím základě určeny koncentrace adiponektinu v analyzovaných vzorcích.

5.11.2. Detekce IL6 a MCP1 (Ready-Go-Set, eBioscience)

Destička byla potažena 100 µl primární protilátky (180 krát ředění v PBS), přelepena fólií a inkubována přes noc v 4°C (15-16 hodin).

Druhý den byla promyta 5 krát v PBS + 0,05% Tween (200 µl/jamička). Dále bylo provedeno blokování po dobu 1 hodiny přidáním 200 µl Assay diluentu. Následoval oplach a poté bylo naneseno 100 µl vzorku a standardů (IL6 3,125-200 pg/ml, MCP1 31,25-2000 pg/ml). Destička byla přelepena, inkubace probíhala po dobu 2 hodin. Destička byla 5 krát promyta a následně bylo naneseno 100 µl detekční protilátky/jamička (180 krát ředění v PBS). Po 1 hodině došlo opět k oplachu (5 krát). Následovala inkubace v konjugátu Avidin-HRP (ředění 180 krát v Assay diluentu) po dobu 30 min. Po působení konjugátu (v temném prostředí) následoval oplach (7 krát) a bylo přidáno 100 µl substrátu/jamička. Barevná reakce byla následně zastavena přidáním 50 µl Stop Solution.

Optická denzita byla určena opět odečtem změření destičky při 450 a 570 nm. V programu Logit byla vygenerována standardní křivka a na jejím základě určeny koncentrace IL6 a MCP1 v analyzovaných vzorcích.

5.12. Statistika

Výsledky ELISA a WB pokusů byly statisticky zpracovány. Pro porovnání efektu isoproterenolu a dbcAMP byl použit nepárový neparametrický Mann Whitneův test, pro porovnání efektu diety byl použit párový neparametrický Wilcoxonův test. Samostatné rozložení izoforem adiponektinu bylo vyhodnoceno pomocí Wilcoxonova testu.

6. Výsledky

6.1. Změny sekrece adiponektinu, IL6 a MCP1 ve vztahu k dietní intervenci

Dietní intervence vedla k signifikatnímu poklesu tělesné hmostnosti a množství tukové tkáně a zlepšení většiny sledovaných metabolických parametrů (viz tabulka 1). Antropometrická měření ale nebyla prováděna v rámci této diplomové práce, a proto nejsou více popisována.

Sekrece vybraných adipocytokinů in vitro diferencovanými adipocyty odvozenými z biopsií TT před a po dietní intervenci byla analyzována metodou ELISA. Analyzované médium bylo kondiciováno adipocyty udržovanými v kontrolním médiu. Hladiny adiponektinu, IL6 ani MCP1 nebyly v kontrolních podmínkách po redukci váhy signifikantně rozdílné oproti stavu před dietní intervencí (tabulka 3), u adiponektinu byl ale patrný trend ke zvýšení sekrece po dietní intervenci.

Sekrece v rámci dietní intervence	**Bazální podmínky**	
	před [pg/ml]	**po [pg/ml]**
Adiponektin	1501,95±570	1870,04±867
IL 6	227,88±197	214,49±113
MCP 1	17,82±8	18,74±9

Tabulka 3: Výsledky sekrece adiponektin, IL6 a MCP1 za bazálních podmínek.

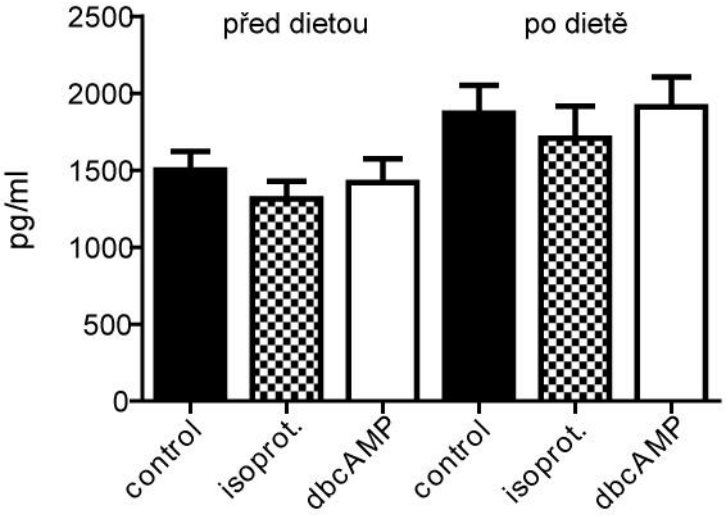
6.2. Změny sekrece adiponektinu, IL6 a MCP1 v podmínkách stimulované lipolýzy

Pro analýzu sekrece adipocytokinů ve stavu stimulované lipolýzy byly buňky opůsobeny 1 μM isoproterenolem nebo 100 μM dibutyryl cAMP, nemetabolizovatelným analogem cAMP, po dobu 3 hodin. Sekrece byla stanovována metodou ELISA (viz kapitola 6.1). Koncentrace adipocytokinů jsou vyjádřeny v pg/ml média, popř. byly dále normalizovány na množství proteinů změřené v buněčných lyzátech a vyjádřeny jako násobek hodnoty v kontrolních podmínkách (fold change).

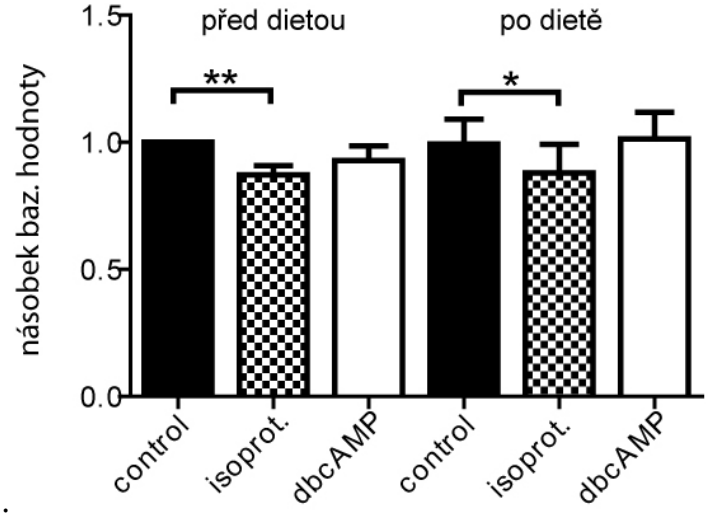
Isoproterenol v buňkách nebyl schopen změnit sekreci ani jednoho z analyzovaných cytokinů. Nicméně signifikantní účinek isoproterenolu byl zaznamenán po normalizaci na množství proteinů pro IL6, kdy isoproterenol sekreci stimuloval, zatímco sekrece adiponektinu byla v přítomnosti isoproterenolu snížena (graf 2 B). Tyto změny byly obdobné před i po dietní intervenci.

Přímé dodání cAMP způsobilo výrazné změny sekrecí IL6 a MCP1 (graf 1 a 3). Sekrece IL6 byla po přímém dodání cAMP znatelně vyšší oproti kontrolnímu stavu před i po dietě (graf 1 A, B). U MCP1 došlo k opačnému účinku, kdy se sekrece před i po redukci váhy výrazně snížila (graf 3 A, B).

A.

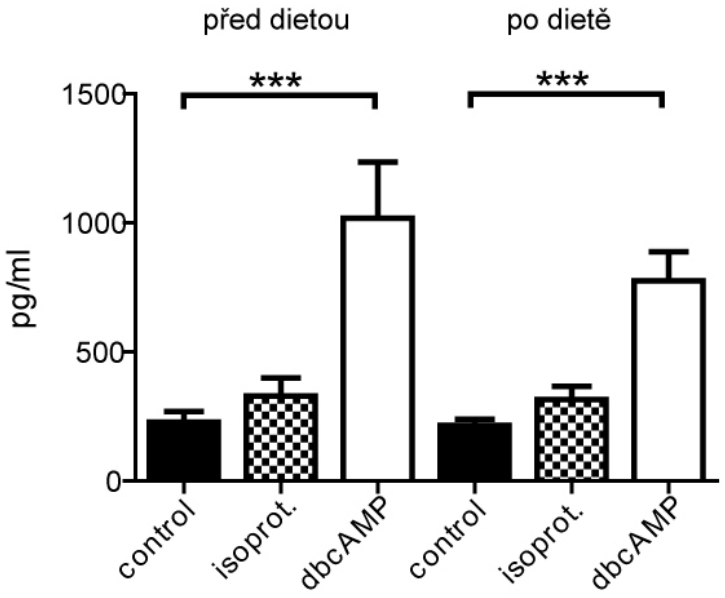


B.

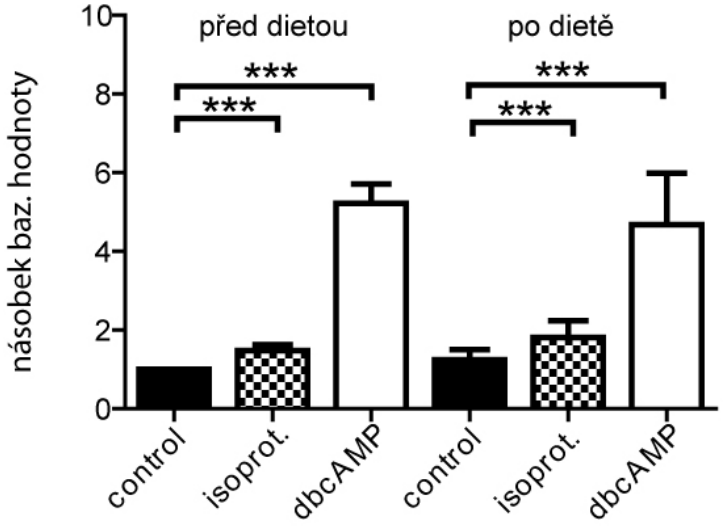


Graf 1: Efekt diety na sekreci adiponektinu u skupiny 23 žen v bazálních podmínkách (control) a stimulací lipolýzy (3 hod.) přidáním 1 µM isoproterenolu a 100 µM dibutyrylu cAMP. A. Vyhodnoceno použitím Mann Whitney testu (pg/ml) B. Normalizace dat na množství proteinu použitím Wilcox testu (násobek baz. hodnoty). * P< 0,05, ** P< 0,01 a *** P< 0,001.

A.

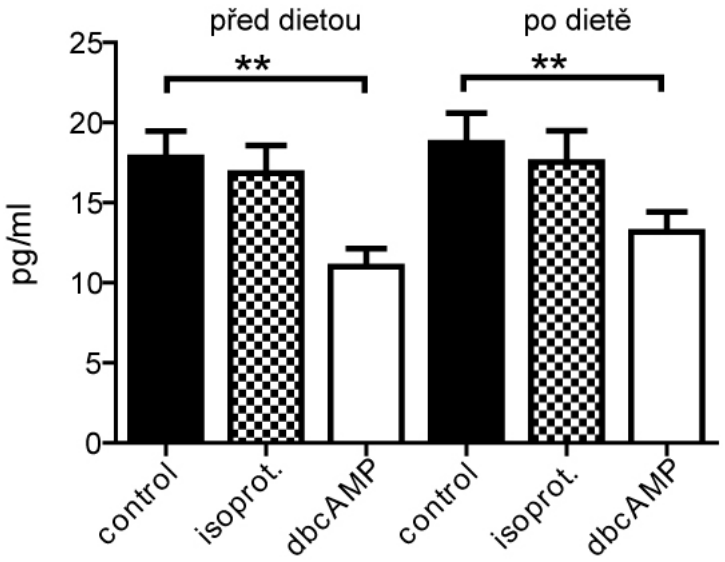


B.

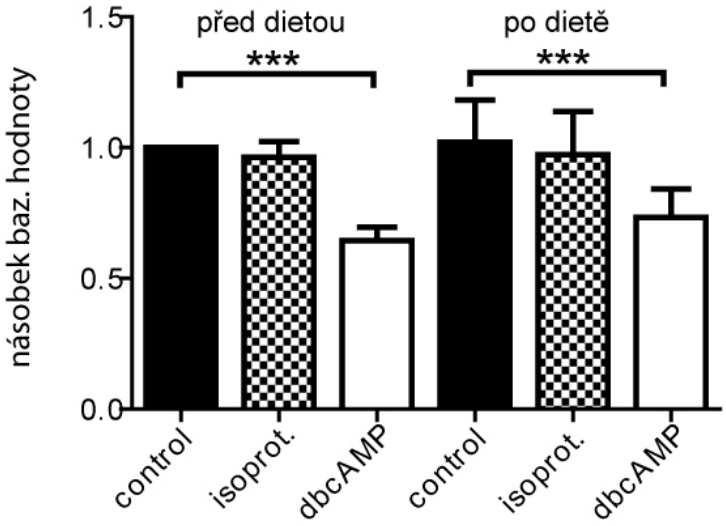


Graf 2: Efekt diety na sekreci IL6 u skupiny 23 žen v bazálních podmínkách (control) a stimulací lipolýzy (3 hod.) přidáním 1 µM isoproterenolu a 100 µM dibutyrylu cAMP. A. Vyhodnoceno použitím Mann Whitney testu (pg/ml) B. Normalizace dat na množství proteinu použitím Wilcox testu (násobek baz. hodnoty). * P< 0,05, ** P< 0,01 a *** P< 0,001.

A.



B.

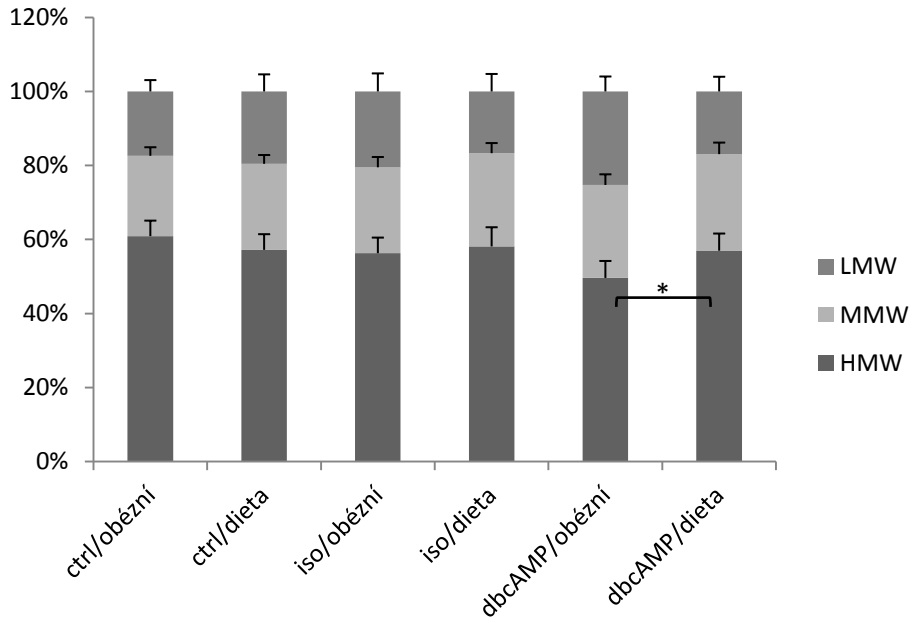


Graf 3: Efekt diety na sekreci MCP1 u skupiny 23 žen v bazálních podmínkách (control) a stimulací lipolýzy (3 hod.) přidáním 1 µM isoproterenolu a 100 µM dibutyrylu cAMP. A. Vyhodnoceno použitím Mann Whitney testu (pg/ml) B. Normalizace dat na množství proteinu použitím Wilcox testu (násobek baz. hodnoty). * P< 0,05, ** P< 0,01 a *** P< 0,001.

6.3. Změny izoforem adiponektinu (HMW, MMW, LMW) ve vztahu k dietní intervenci a v závislosti na stimulaci lipolýzy

Dále bylo zkoumáno rozložení izoforem adiponektinu v závislosti na redukci váhy a stimulaci lipolýzy. Zastoupení izoforem adiponektinu bylo stanoveno metodou Western Blot a vyhodnoceno pomocí Wilcoxonova testu. Rozložení jednotlivých izoforem sledovaných před a po dietě za bazální a stimulované lipolýzy je znázorněno na grafu 4.

Buňkami byla produkována nejvíce izoforma HMW (49,62-60,92%). O polovinu nižší sekrece byla zaznamenána u zbylých dvou izoforem. Nebyl zaznamenán rozdíl v zastoupení izoforem adiponektinu přítomném v kondiciovaném médiu adipocytů derivovaných před a po dietě. Zastoupení izoforem adiponektinu též nebylo modifikováno isoproterenolovou stimulací. Signifikantní rozdíl byl zaznamenán u HMW po přímém dodání cAMP, které vedlo ke snížení sekrece HMW pouze buňkami odvozenými z TT před dietní intervencí a tím i k dietou navozenému signifikantnímu rozdílu v podílu HMW izoformy na celkovém adiponektinovém profilu (před dietou 46,92%, po dietě 56,98%; p= 0,0179).



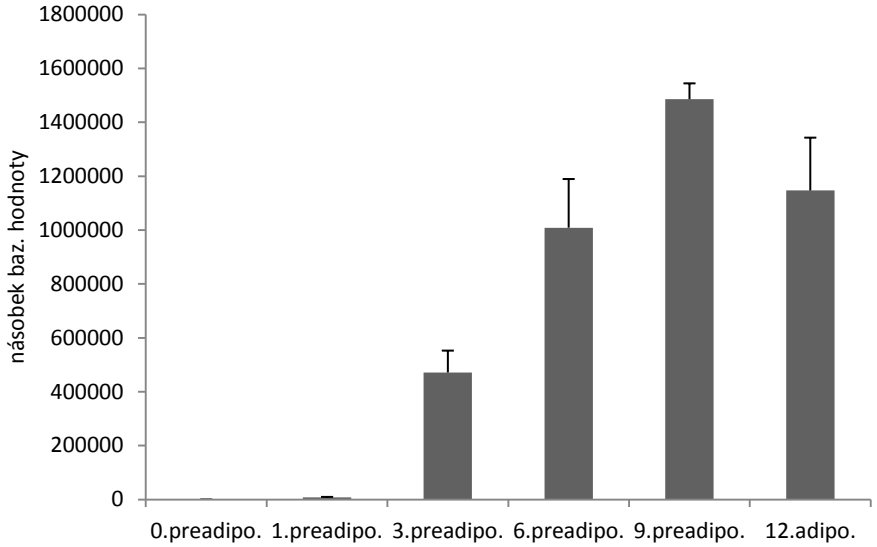
Graf 4: Rozložení jednotlivých izoforem adiponektinu (HMW, MMW, LMW) u skupiny 23 žen před dietou (obézní) a po dietě za bazálních podmínek (ctrl) a stimulací lipolýzy (3

hod.) přidáním 1 μM isoproterenolu a 100 μM dibutyrylu cAMP. Vyhodnocení Wilcox testem. * P< 0,05, ** P< 0,01 a *** P< 0,001.

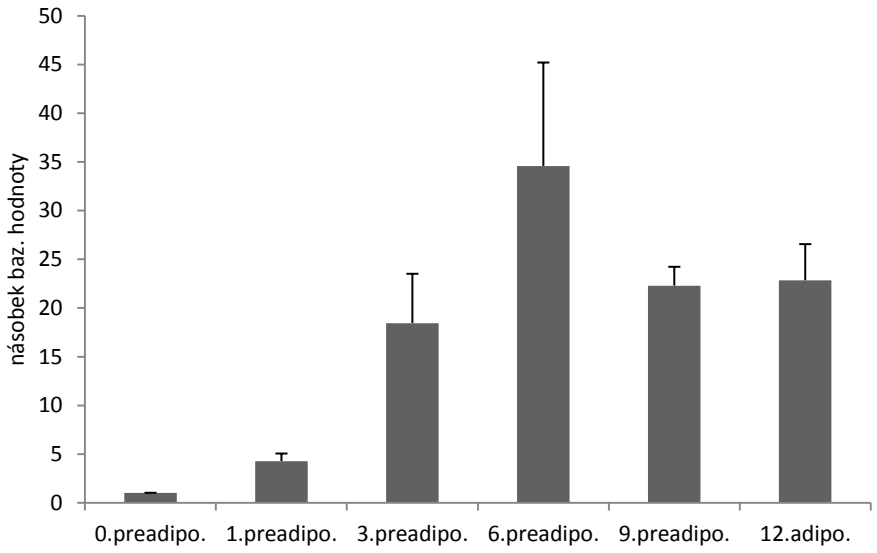
6.4. Výsledky genové exprese faktorů účastnících se stresu ER v průběhu diferenciace adipocytů

Míra exprese faktorů podílejících se na stresu ER během diferenciace adipocytů byla stanovena metodou kvantitativního RT-PCR. Za tímto účelem byla transkribována totální buněčná RNA z diferencovaných adipocytů odvozených ze dvou donorů (viz kap. 5.9.). Během 12 dnů trvající diferenciace byly buňky sklízeny a vytvořeny lyzáty a to 0., 1., 3., 6., 9. a 12. den, kdy již dosáhly plné diferenciace. Vzniklá cDNA byla analyzována použitím specifických primerů vybraných genů. K určení míry a průběhu diferenciace byly použity geny aP2 a PPARγ.

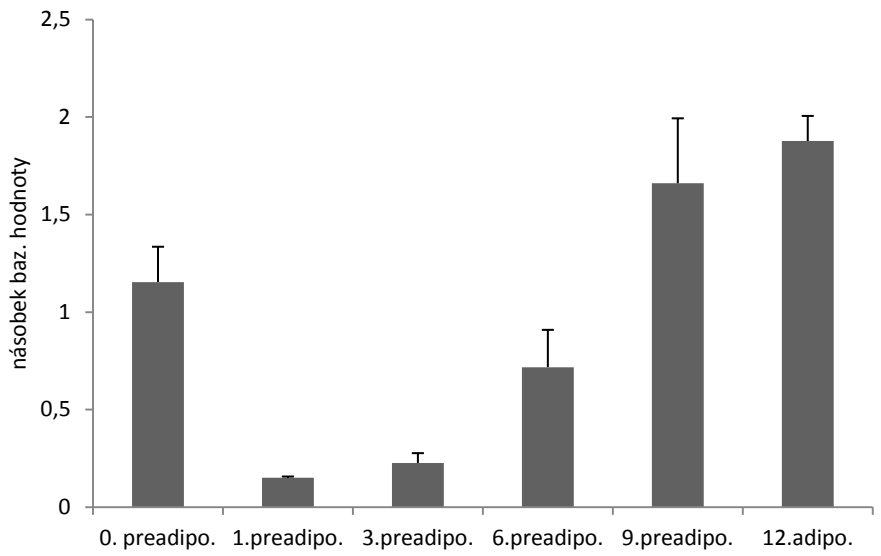
V průběhu adipogeneze pak byla analyzována mRNA exprese genů endoplazmatického retikula, konkrétně ATF3, ATF4 a HSPA5. Exprese genu ATF3 znázorněna na grafu 5 byla první den diferenciace nižší než jeho exprese v preadipocytech (došlo k sedminásobnému poklesu exprese). S postupující diferenciací se hladina mRNA ATF3 zvýšila na téměř dvojnásobek hodnot v bazálním stavu (tj. v preadipocytech). Exprese ATF4 (graf 6) a HSPA5 (graf 7) měly v rámci adipogeneze podobný profil, tj. po prvním dnu diferenciace došlo k mírnému poklesu, s přibývajícím časem diferenciace pak hladiny mRNA mírně narůstaly.



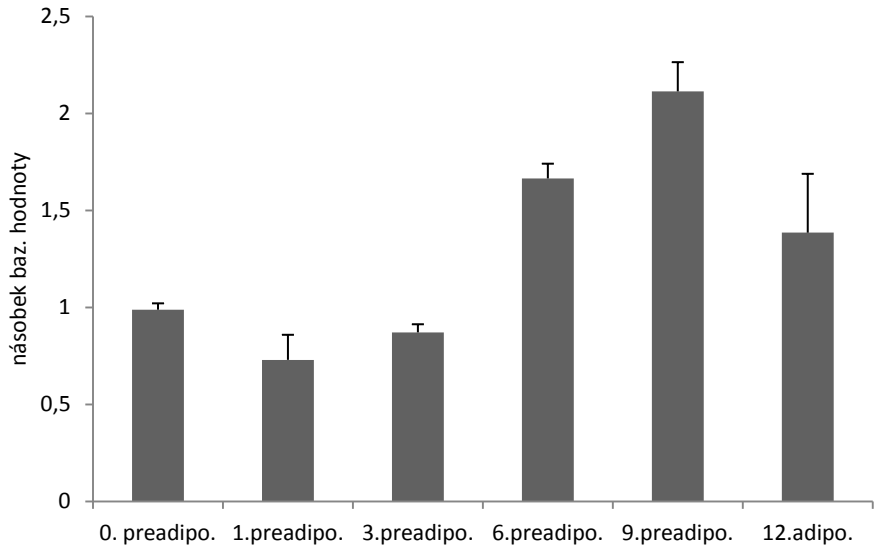
Graf 5: Průběh genové exprese aP2 během diferenciace adipocytů. Normalizace genem GUSB.



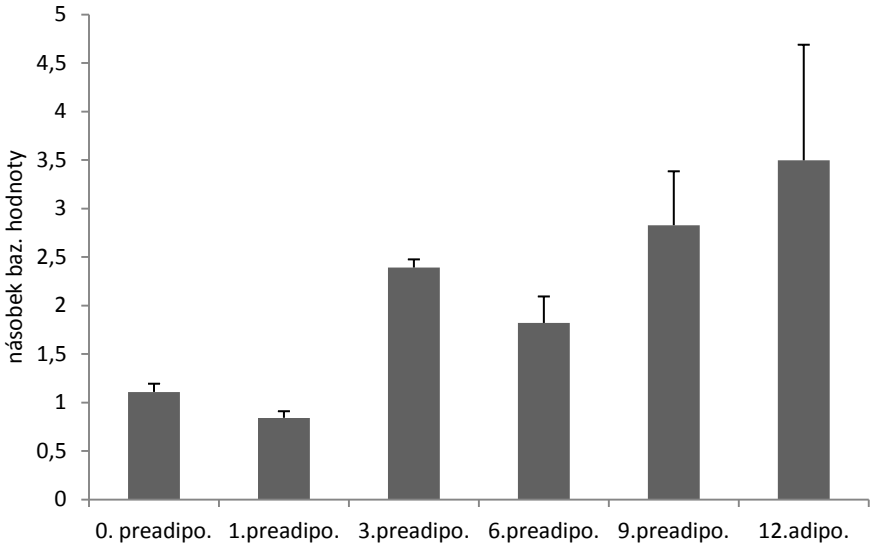
Graf 6: Průběh genové exprese PPARγ během diferenciace adipocytů. Normalizace genem GUSB.



Graf 7: Průběh genové exprese ATF3 během diferenciace adipocytů. Normalizace genem GUSB.



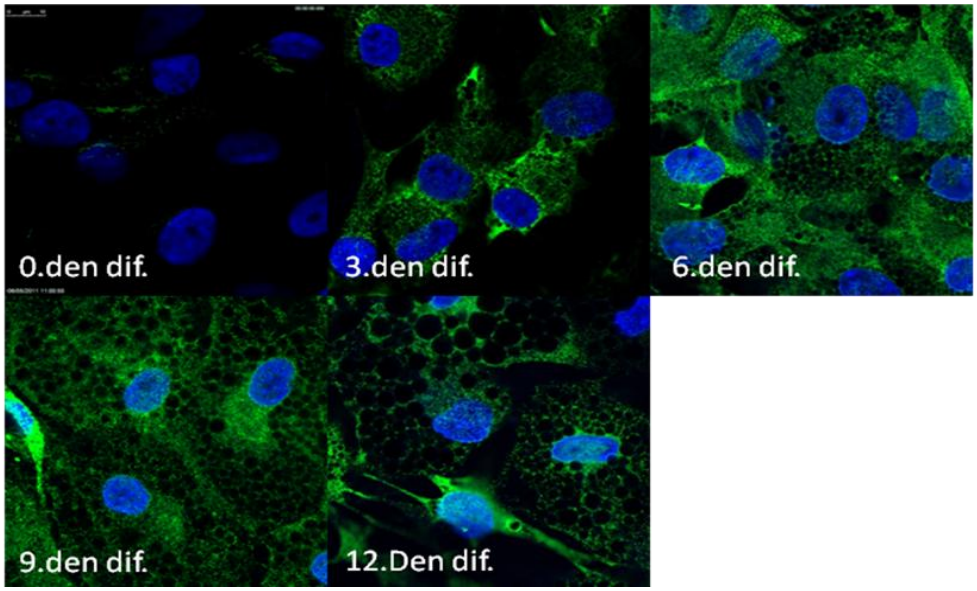
Graf 8: Průběh genové exprese ATF4 během diferenciace adipocytů. Normalizace genem GUSB.



Graf 9: Průběh genové exprese HSPA5 během diferenciace adipocytů. Normalizace genem GUSB.

6.5. Profil diferenciace adipocytů pomocí nepřímé imunofluorescence

Součástí projektu věnovaného analýze markerů ER v průběhu adipogeneze pomocí nepřímé imunofluorescence byla optimalizace této metody. Byl testován vliv fixace a permeabilizace na kvalitu značení ER. Fixace byla provedena použitím formaldehydu, methanolu nebo paraformaldehydu, permeabilizace pak probíhala použitím Tritonu nebo saponinu, popř. již v rámci formaldehydové fixace. Při samotné imunofluorescenci byly k detekci proteinů ER použity primární protilátky BiP, PDI, ERp57 a Erp44, PDI3 A a sekundární protilátka Alexa 488. Bylo použito široké rozmezí koncentrací primárních protilátek. Dále byl vyzkoušen fluorescenční marker endoplazmatického retikula ER-Tracker Blue-White DPX. Jedinou protilátkou, kterou se podařilo úspěšně obarvit ER, byla Anti-PDI3 A, a to po formaldehydové fixaci a permeabilizaci saponinem. Na obrázku 4 je znázorněn rozvoj endoplazmatického retikula během diferenciace lidských adipocytů.



Obrázek 4: Diferenciace adipocytů s následným barvením endoplazmatického retikula pomocí Anti-PDI3 A (ředění 1000x). Modře znázorněno jádro, zeleně endoplazmatické retikulum.

7. Diskuze

Obezita představuje jednu z hlavních hrozeb lidského zdraví, jelikož je asociována s velkým množstvím přidružených nemocí. Obezita je spojována s množstvím poruch morfologických a funkčních charakteristik TK, jakož i se změnami hladin adipocytokinů, které se podílejí na rozvoji inzulinové rezistence a dalších metabolických poruchách (Šiklová-Vítková et al., 2012, Kováčiková et al., 2011). Abnormální produkce prozánětlivých cytokinů je podkladem chronického zánětu, který vzniká aktivací inflamačních drah v hypertrofovaných adipocytech a následnou infiltrací buněk imunitního systému.

Téma práce navazuje na výzkumné studie prováděné v poslední době na Ústavu tělovýchovného lékařství, 3. lékařské fakulty spolu s Česko-francouzskou laboratoří pro klinický výzkum obezity. Hlavním cílem práce bylo studium metabolizmu tukové tkáně se zaměřením na sekreci vybraných adipocytokinů v tukové tkáni obézních pacientů podstupujících dietní intervenci. Byly analyzovány účinky jak dietetických intervencí tak účinek experimentálně navozené lipolýzy na sekreci adiponektinu, IL6 a MCP1. Druhá část práce byla věnována diferenciaci samotných adipocytů s ohledem na markery stresu ER.

7.1. Změny sekrece adiponektinu, IL6 a MCP1 v reakci na stimulaci lipolýzy a na dietní intervenci

VLCD dieta je určena k redukci hmotnosti na základě nutričně definované výživy bez degradace aktivní tělesné hmoty. Je prokázáno, že dietou dochází k zlepšení metabolického a morfologického profilu obézních (Rossmeislová et al., 2012).

Adiponektin je unikátním adipocytokinem produkovaným vyzrálými adipocyty s protizánětlivými, anti-sklerotizujícími a inzulin-senzitizujícími efekty, zvyšující vychytávání glukózy a oxidaci tuků ve svalech a redukující hepatickou glukoneogenezi (Fu et al., 2007).

Navzdory trendu ve zvýšení adiponektinu po váhovém úbytku, výsledky neprokázaly statisticky významný efekt diety na jeho sekreci. Toto mohlo být způsobeno

faktem, že sekrece byla stanovena za relativně krátkou dobu 3 hodin. Pokud by došlo ke stanovení po např. 24 hodinách, mohl být efekt již signifikantní. 3 hodinová intervence byla ale zvolena jako kontrola k experimentům s lipolýzou. Je pravděpodobné, že nefyziologicky dlouhodobá (24 hodin) stimulace lipolýzy by vedla k rozvoji stresové reakce, která by mohla působit na sekreci cytokinů druhotně a tím znemožnit jasnou interpretaci výsledků.

Dříve popsané zvýšení sekrece adiponektinu bylo pozorováno spíše ve studiích, které zahrnují morbidně obézní pacienty po chirurgickém zákroku, kde je redukce váhy značná (Fu et al., 2007).

Prokázali jsme, že stimulace lipolýzy pomocí izoproterenolu vede k inhibici sekrece adiponektinu (graf 1 B). Tento výsledek je v souladu s pozorováním na myších 3T3-L1 adipocytech, u kterých β adrenergní stimulace izoproterenolem inhibuje genovou expresi adiponektinu (Fasshauer et al., 2001). Toto může naznačovat, že zvýšená aktivita sympatického nervového systému (Goossens et al., 2008), která narušuje prostřednictvím účinku katecholaminů inzulinovou senzitivitu, indukuje IR snižováním adiponektinu při obezitě. Překvapivý byl fakt, že sekrece adiponektinu nebyla ovlivněna dbcAMP, které působí v lipolytické kaskádě postreceptorově. Tento výsledek naznačuje, že regulace sekrece adiponektinu je přímo závislá na aktivaci β adrenergního receptoru, která pravděpodobně může vést kromě aktivace adenyl cyklázy i k aktivaci dalších drah. Ve vztahu mezi lipolýzou a adiponektinem může docházet k ovlivňování i v opačném směru, tj. že adiponektin přímo reguluje intenzitu lipolýzy. Výzkum zaměřený na účinek adiponektinu na spontánní nebo katecholaminy indukovanou lipolýzu v lidských adipocytech u obézních a neobézních pacientů vedl ke zjištění, že adiponektin inhibuje jak bazální tak β adrenergně indukovanou lipolýzu (Wedellová et al., 2011). Inhibice AMP aktivované protein kinázy tento efekt ruší. Aktivace AMPK, hraje tedy zřejmě roli v účinku adiponektinu na tukovou tkáň. Spojitost mezi adiponektinem a aktivací AMPK byla potvrzena již dříve ve svalech, játrech a adipocytech hlodavců (Saito et. al., 2007; Mao et al., 2006; Deepa et al., 2009).

Souvislost mezi adiponektinem a AMPK spolu s dalšími studiemi stimulace AMPK samotným izoproterenolem (Fu et al., 2007) může nastolit v rámci dalšího výzkumu nové hledání odpovědí na otázku, zda stimulace lipolýzy izoproterenolem nevede k vytěsnění

účinku adiponektinu na stimulaci AMPK, které se ve výsledku projeví sníženou sekrecí tohoto adipocytokinu.

V rámci předkládané práce byl zkoumán také možný efekt diety, či samotná stimulace izoproterenolem a cAMP na rozložení jednotlivých izoforem adiponektinu.

Adiponektin je produkován ve třech základních izoformách (HMW, MMW a LMW). Mechanismy, které řídí produkci a uvolňování těchto izoforem nejsou zcela jasné. HMW se zdá, že je predominantně vylučovanou izoformou adiponektinu.

Analýza sekrece jednotlivých izoforem adiponektinu za bazálních podmínek neprokázala změny vyvolané dietou (graf 4). Dietní účinky na rozložení izoforem jsou v mnoha studiích rozporuplné, od žádného účinku na totální adiponektin a samotné izoformy, přes snížení u LMW a zvýšení u HMW a MMW, až po změny u všech izoforem (Kováčová et al., 2009; Bobbert et al., 2005; Polák et al., 2007; Polák et al., 2008). Studie se v poslední době zaměřují zejména na HMW z hlediska možného biologického efektu této izoformy na játra, svaly a endoteliální buňky a spojitostí s glukózou tolerancí a citlivostí na inzulin (Polák et al., 2008). Podle některých autorů může HMW sloužit k predikci IR a metabolického syndromu, spolu s rizikem aterosklerózy a koronárních tepených onemocnění (Hara et al., 2006). Proto bylo zajímavé zjištění, že vliv dbcAMP na sekreci HMW izoformy je odlišný v adipocytech odvozených z tkáně před a po váhovém úbytku, tj, před dietou dochází vlivem dbcAMP k poklesu sekrece HWM a po dietě je tento efekt potlačen.

IL6 je protein akutní fáze, který je vysoce exprimovaný makrofágy a adipocyty a jehož plazmatické hladiny jsou u obézních zvýšené. Jeho regulace a funkce v metabolismu není dobře chápána. U obézních subjektů je však pravděpodobné, že uvolňování IL6 se děje z expandované masy tukové tkáně a že tento uvolněný IL6 přispívá k některým aspektům asociovaných v patofyziologii organismu (Ali et al., 2001).

Z našich výsledků je patrné, že zvyšování sekrece IL6 se děje jak při stimulaci adipocytů izoproterenolem (graf 2B), tak přímým dodáním cAMP (graf 2). Současné studie potvrzují zvýšení IL6 po β adrenergní stimulaci, kdy izoproterenol stimuloval sekreci v lidských adipocytech a hladiny cirkulujícího IL6 (Ali et al., 2001; Goossens et al., 2008). Tento fakt může mít souvislost s dřívějšími studiemi IL6 jako možného faktoru podílejícího se na udržení energetické rovnováhy, kde je potvrzena spojitost mezi

zvýšenými hladinami IL6 a zvýšenou lipolýzou a oxidací tuků a to bez hypertriacylglycerolemie nebo zvýšení endogenní produkce glukózy (Ali et. al., 1997; Pedersen et. al., 2004).

IL6 je produkován také lokálně pracujícím svalem, což odráží zvýšení plazmatických hladin IL6 během cvičení. Zpočátku se vědci domnívali, že toto zvýšení je reakcí na poškození svalu během fyzické aktivity (Pedersen et al., 2001). Později bylo potvzeno, že markantní zvýšení IL6 doprovázené při cvičení je nezávislé na poškození svalu. Produkce IL6 ve vztahu k poškození nastává později a v menší míře. Intenzivní výzkum zaměřený na studium fyziologického významu produkce IL6 svalem vedl k závěru, že tento cytokin působí zejména na játra a tukovou tkáň, čímž přispívá k udržení homeostázy glukózy během cvičení a zprostředkovává cvičením indukovanou lipolýzu.

Tyto výsledky naznačují, že stimulace IL6 pomocí cAMP doložená výsledky této práce by mohla mít souvislost s výše uvedeným faktem IL6 senzoru udržování energetické rovnováhy. Zřejmě existuje i zpětná vazba mezi zvýšením IL6 a následnou stimulací lipolýzy, kdy stimulace lipolýzy může vézt k lokálnímu zvýšení hladin IL6 u adipocytů.

Třetí studovaný cytokin, MCP1, je prozánětlivý cytokin, hojně produkovaný makrofágy a endoteliálními buňkami (Klimčáková et. al, 2011). V menší míře je produkovaný preadipocyty a vyzrálými adipocyty (Christiansen et al., 2005). Jeho produkce je často stimulována zánětlivými stimuly jako je TNFα nebo IL1 (Fain and Madan, 2005). MCP1 hraje klíčovou roli v povolávání monocytů a paměťových T lymfocytů do tkání.

Naše výsledky prokázaly, že sekrece MCP1 je redukována přidáním dbcAMP, přičemž tento efekt byl stejný před i po dietě (graf 3). Tyto výsledky se ovšem rozcházejí s jinými studiemi. I když cAMP vede v jiných buněčných typech k inhibici exprese MCP1, (příkladem je inhibice MCP1 ve svalových buňkách dýchacích cest (Wuyts et al., 2003)), u 3T3-L1 adipocytů dodání cAMP expresi MCP1 zvyšovalo (Kralish et al., 2006). Toto zjištění bylo dáváno do souvislosti s glukózovou intolerancí indukovanou katecholaminy při obezitě. Efekt dbcAMP na MCP1 sekreci u lidských adipocytů zatím popsán nebyl a proto vysvětlení rozdílu mezi lidským a myším modelem bude vyžadovat další sérii experimentů

7.2. Genová exprese faktorů stresu ER v průběhu diferenciace

Rozvoj znalosti fyziologie tukové tkáně je podstatou účinné terapie obezity a poruch s ní souvisejících. Adipogeneze je složitý proces, který zahrnuje zapojení mnoha transkripčních faktorů a regulačních proteinů. Počátečním znakem vytváření adipocytu jsou tvarové změny, které souvisejí se změnami komponentů cytoskeletu a extracelulární matrix. Buňka nabývá sférický tvar. Během následné terminální fáze diferenciace získává buňka složky nezbytné pro syntézu a transport lipidů a sekreci adipocytních proteinů. V této fázi se zvyšuje také citlivost na inzulin (Gregore et al., 1998).

Ke sledování průběhu diferenciace lidských adipocytů jsme použili dva diferenciační markery, PPARγ a aP2 (graf 5 a 6). PPARγ je transkripční faktor nezbytný nejen pro zahájení, ale také samotné udržení procesu diferenciace (Gerhold et al., 2002; He et al., 2012). Jeho inhibice může znamenat dediferenciaci a snížení exprese ostatních diferenciačních markerů, spolu se ztrátou lipidní akumulace (Rosen and MacDougald, 2006). Jedním z genů aktivovaných PPARγ během diferenciace je gen aP2, který je klíčovým mediátorem intracelulárního transportu a metabolismu mastných kyselin (Sun and Nicholson, 2003).

Na vzorcích pocházejících z buněk v různých fázích adipogeneze jsme dokumentovali genovou expresi transkripčních faktorů ATF3 a ATF4, regulujících rozvoj ER. Po počátečním poklesu v časné fázi diferenciace se exprese ATF3 a 4 s postupující diferenciací zvyšovala (graf 7 a 8). Prvotní pokles jejich exprese může být podmíněn přechodem na bezsérové kultivační médium, ale následný nárůst exprese obou transkripčních faktorů naznačuje, že během diferenciace adipocytů může docházet ke stresu ER. Přeměna preadipocytu na adipocyt je spletitý proces, který vyžaduje řadu regulačních látek a nové stavební komponenty a je doprovázen zvýšenou akumulací lipidů. Jak již bylo popsáno v kapitole 4.6.1. hlavním místem syntézy bílkovin a formace lipidních kapének je endoplazmatické retikulum. V tomto smyslu nároky na ER mohou být vysoké.

Tato zjištění jsou podpořena také zvýšenou genovou expresí HSPA5 (graf 9). HSPA5 neboli BiP je hlavním molekulárním chaperonem ER, který napomáhá sbalování proteinů do konečné konformace.

Z výsledků analýzy genové exprese a imunofluorescenční detekce dalšího ER proteinu, PDI3 A, je zřejmé, že proces diferenciace adipocytů je spojen se zásadní

modelací ER. Zvýšená produkce proteinů vyžaduje vyšší množství molekulárního chaperonu BiP a i přes toto zesílení kontroly správné konformace proteinů, zřejmě dochází ke stresu ER, který je doprovázen aktivací nepřeberného množství regulačních genů, jako například ATF3 a 4.

8. Závěr

Hlavním cílem práce bylo zaměřit se na molekulární změny lidské tukové tkáně v průběhu dietní intervence se zaměřením na sekreci adipocytů a na změny exprese markerů ER v průběhu samotné diferenciace buněk. Nejdůležitější poznatky jsou shrnuty v následujících bodech:

1. Adipocyty získané z bioptických vzorků tukové tkáně byly použity ke studiu změn sekrece vybraných adipocytokinů (adiponektin, IL6 a MCP1) vyvolaných redukcí váhy u skupiny premenopauzálních žen. U adiponektinu byly sledovány také změny zastoupení jednotlivých izoforem (HMW, MMW, LMW).

2. Sekrece adipocytokinů byla stanovena za kontrolních podmínek a po experimentálně indukované lipolýze (stimulace buněk pomocí isoproterenolu a dbcAMP po dobu 3 hodin). Výsledky získané pomocí metody ELISA nepotvrdily v kontrolních podmínkách signifikantní změny sekrece adipocytokinů. Ani výsledky izoforem adiponektinu provedené pomocí metody Western Blot se po redukci váhy nezměnily.

3. Zaznamenány byly signifikantní změny po stimulaci lipolýzy. Sekrece MCP1 se po maximální indukci lipolýzy pomocí přímého dodání cAMP snížila. U IL6 byl zaznamenám nárůst sekrece jak po isoproterenolové stimulaci, tak po přímém dodání cAMP. U adiponektinu došlo ke snížení sekrece po β adrenergní stimulaci, které bylo patrné po normalizaci dat.

4. Nejvíce produkovanou izoformou byla HMW. Signifikantní rozdíl v zastoupení jednotlivých izoforem adiponektinu byl zaznamenán u HMW po přímém dodání cAMP, které vedlo ke snížení sekrece izoformy před dietní intervencí.

5. Exprese faktorů ER stresu ATF3, ATF4 a HSPA5 v průběhu diferenciace adipocytů byla sledována pomocí RT-PCR. Pro dokumentaci průběhu samotné diferenciace byly použity geny aP2 a PPARγ. Exprese genu ATF3 byla první den diferenciace podstatně nižší než při expresi v preadipocytech, s postupující diferenciací se hladina mRNA

ATF3 zvýšila. Exprese ATF4 a HSPA5 prokazovaly zpočátku mírné snížení, které se následně jako u ATF3 zvyšoval.

9. Seznam zkratek

A	ampér
Acrp30	adipocyte complement-related protein of 30 kDa
AdipoR	adiponektinový receptor (adiponectin receptor)
AMP1	adipose most amundant gene transkript 1
aP2	aktivator protein 2
Apml	adipose most abundant gene transcript 1
APPL1	adaptační protein
AMPK	AMP aktivovaná protein kináza
APS	persíran amonný
ATF	aktivační transkripční faktor
ATGL	tuková triglycerid lipáza (adipose triglyceridelipase)
ATP	adenosintrifosfát
BiP	bilding protein
BCA	kyselina bicinchoninová, metoda stanovení cel. proteinů
BMI	body mass index
BSA	Bovine Serum Albumin
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
Ca^{2+}	vápenatý kationt
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
cDNA	komplementarní deoxyribonukleová kyselina
CO_2	oxid uhličity
CRP	C-reaktivní protein (C-reaktive protein)
CT	treshold cycle
$CuSO_4.5H2O$	pentahydrát síranu měďnatého
dbcAMP	dybutyryl cyklické AMP
dH_2O	destilovaná voda
DIFM	diferenciační médium

DMEM-F12	Dulbecco´s Modified Eagle Medium with nutrient mixture F-12
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNáza	deoxyribonukleáza
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
eIF2α	eukaryotický iniciační faktor 2α (eukaryotic translation-initiation factor 2)
ELB	eluční pufr
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	endoplazmatické retikulum
ERp44 Rabbit Ab #2886	králičí polyklonální protilátka
ERp57 (G 117) Rabbit Ab #2881	králičí polyklonální protilátka
FABP4	fatty acid bilding protein 4
FFA	volná mastná kyselina (free faty acid)
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
FM	fat mass
GBP28	gelatin-bilding protein of 28 kDA
GRP78	glucose-regulated protein of 78 kDA 56
GUSB	glucuronidáza, beta
HCL	kyselina chlorovodíková
Hac 1	transkripční aktivátor
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
HMW	high molecular weight
HOMA-IR	homeostasis model assessment of the insulin resistance index
HRP	křenová peroxidáza
HSL	hormon senzitivní lipáza (hormone sensitive lipase)

HSPA5	heat shock protein A5
IBMX	3-isobutyl-1methyl xanthin
IGF1	inzulinu podobný růstový faktor 1 (inzulin like grown faktor 1)
IKKβ	IκB kináza β (IκB kinase β)
IL6	interleukin 6
IRE1	inositol requiring protein 1
IRS	substrát inzulinového receptoru
JNK	c-Jun N-terminální kináza (c-Jun N-terminal kinase)
LCD	nízkokalorická dieta (low calorie diet)
LMW	low molecular weight
M	molarita
M1	makrofágy typu 1
M2	makrofágy typu 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP1	monocytní chemoatraktantní protein 1 (monocyte chemoattractant protein 1)
Mg^{2+}	měďnatý kationt
MGL	monoacylglycerol lipáza (monoacylglycerol lipase)
MK	mastná kyselina
MMW	medium molecular weight
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
MSC - qualified FBS	mesenchymal stem cell-Fetal Bovine Serum
NaCl	kyselina chlorovodíková
NF-κB	jaderný faktor κB (nuclear factor κB)
P	pasáž
PCR	polymerase chain reaction
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PDI	proteinová disulfidová izomeráza
PERK	double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase

PFA	paraformaldehyd
pH	potenciál vodíku
PKA	proteinkináza A (protein kinase A)
PM4	proliferační médium 4
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor γ 58
RLT	lyzační pufr
RNA	ribonukleová kyselina
RPE	pufr pro odstranění kontaminace
Rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RW_1	pufr pro odstranění kontaminace
Ser	serin
S1P	site 1 protease
S2P	site 2 protease
SFM	serum free medium
SOCS	supresor signalizace cytokinu (suppressor of cytokine signalling)
SRP	signál rozeznávající partikule (signal recognition particle)
SVF	tromavaskulární frakce
T3	trijodtyronin
TAG	triacylglycerol
TEMED	NNN'N'tetramethylethylendiamin
TLR	toll-like receptor
TNFα	tumor nekrozní faktor α (tumor necrosis factor α)
Tris	tris(hydromethyl)aminomethan
TT	tuková tkáň
UPR	unfolded-protein response
V	volt
WB	Western Blot
WP	destička (well plate)
WM	weight maintenance
XBP1	X-box binding protein 1

10. Seznam použité literatury

Arvidsson E, Viguerie N, Andersson I, Verdich C, Langin D, Arner P. Effects of different hypocaloric diets on protein secretion from adipose tissue of obese women. *Diabetes* 2004; 53: 1966-71.

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-329.

Ali MV, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, et al. Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor-α, in Vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology and Matabolism* 1997; 82: 4196-4200.

Ali MV, Flower L, Sethi J, Hotamisligil G, Gray R, et al. β-Adrenergic Regulation of IL-6 Release from Adipose Tissue: In Vivo and in Vitro Studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Matabolism* 2001; 86: 5864-5869.

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Základy buněčné biologie. 2. vyd., Ústí nad Labem: *Espero Publishing* 1998. ISBN 80-902906-2-0.

Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes metab.* 2008; 34: 2-11.

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 2007; 204: 1057-69.

Aucott L, Poobalan A, Smith WC, Avenell A, Jung R and Broom J. Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term hypertension outcomes: a systematic review. *Hypertension* 2005; 45: 1035-41.

Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 1998; 182: 31-48.

Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 2000; 404: 644-51.

Bobbert T, Rochlitz H, Wegewitz U, Akpulat S, Mai K, Weickert MO, et al. Changes of Adiponectin Oligomer Composition by Moderate Weight Reduction. *Diabetes* 2005; 54: 2712-9.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation* 2002; 32**:** 14-23.

Boisvert WA. Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 161-5.

Bourlier V, Bouloumie A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* 2009; 35: 251-60.

Brostrom MA, Brostrom CO. Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium* 2003; 34: 345-363.

Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E527-33

Cancello R, Clement K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissu*e. BJOG* 2006; 113: 1141-7.

Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005; 46: 2347-55.

Coppack SW, Jensen MD, Miles JM. In vitro regulation of lipolysis in humans. *Journal of Lipid Research* 1994; 35: 177-193.

Curat CA, Miranville A, Sengenes C, Diehl M, Tonus C, Busse R, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004; 53: 1285-92.

Deepa SS, Dong LQ. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E22-E36.

Elliott RM, Johnson IT. Nutrigenomic approaches for obesity research. *Obes Rev* 2007; 8 Suppl 1: 77-81.

Fain JN, Madan AK. Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) release by explants of human visceral adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29: 1299-307.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by β-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters* 2001; 507: 142-6.

Fu L, Isobe K, Zeng Q, Suzukawa K, Takekoshi K, Kawakami Y. β adrenoreceptor agonists downregulate adiponectin, but upregulate adiponectin receptor 2 and tumor necrosis factor-α expression in adipocytes. *European Journal of Pharmacology* 2007; 569: 155-162.

Ganong WF. Přehled lékařské fyziologie. 12. vyd., Praha: *Galén* 2005. ISBN 80-7262-311-7.

Gerhold DL, Liu F, Jiang G, Zhihua L, Xu J, et al. Gene Expression Profile of Adipocyte Differentiation and ITs Regulation by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Agonists. *Endocrinology* 2002; 143: 2106-2118.

Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 2007; 131: 242-56.

Goldfine ID, Williams JA. Receptors for insulin and CCK in the acinar pancreas: relationship to hormone action. *Int Rev Cytol* 1983; 85: 1-38.

Goossens GH, Jocken JW, van Baak MA, Jansen EH, Saris WH, et al. Short-term β-adrenergic regulation of leptin, adiponectin and interleukin-6 secretion in vivo in lean and obese subjects. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 1029-38.

Gregoire FM, Smas CM and Sul HS. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev* 1998; 78: 783-809.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *The Journal of Lipid Research* 2007; 48: 1905-1904. .

Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BC, Eagon JC, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Is Reduced in Tissues of Obese Subjects After Weight Loss. *Diabetes* 2008; 58: 693-700.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 367-77**.**

Guri AJ, Bassaganya-Riera J. Systemic Effects of White Adipose Tissue Dysregulation and Obesity-Related Inflammation. *Obesity* 2011; 19: 689-700.

Hainer V, Toplak H, Mitrakou A. Treatment modalities of obesity: what fits whom? *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2: S269-77

Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, et al. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2006; 29: 1357-62.

Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 163-9.

Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2001; 2: 239-54.

He YH, He Y, Liao XL, Niu YC, Wang G, at al. The calcium-sensing receptor promotes adipocyte differentiation and adipogenesis through PPARγ pathway. *Mol Cell Biochem* 2012; 361: 321-328.

Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 923-49.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.

Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010; 140: 900-17.

Hotamisligil GS. Role of Endoplasmic Reticulum Stress and c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathways in Inflammation and Origin of Obesity and Diabetes. *Diabetes 2005*; 54: S73-S78.

Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposyty and reduced after weight loss in morbid obese subjekt.*International Journal of Obesity* 2005; 29: 146-150.

Jernas M, Palming J, Sjoholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG, et al. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *Faseb J* 2006; 20: 1540-2.

Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 547-66.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784-92.

Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444: 840-6.

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006; 116: 1494-505.

Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R, Karasik A. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 1995; 270: 23780-4.

Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007; 117: 2621-37.

Klimčáková E, Roussel B, Kováčová Z, Kováčiková M, Šiklová-Vítková M, et al. Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat. *Diabetologia* 2011; 54: 876–887.

Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversical, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 525-46.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635-43.

Korc M. Diabetes mellitus in the era of proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 2003; 2**:** 399-404.

Kováčiková M, Sengenes C, Kováčová Z, Šiklová-Vítková M, Klimčáková E, et al. Dietary intervention-induced weight loss decreases macrophage content in adipose tissue of obese women. *International Journal of Obesity 2010*; 35: 91-98.

Kováčová Z, Vítková M, Kováčiková M, Klimčáková E, Bajzová M, et al. Secretion of adiponectin multimeric complexes from adipose tissue explants is not modified by very low calorie diet. *European Journal of Endocrinology* 2009; 160: 585-592.

Kralish S, Klein J, Lossner U, Bluher M, Paschke R, et al. Isoproterenol stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept* 2006; 135: 12-6.

Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 2005; 54: S114–S124

Krogh-Madsen R, Møller K, Dela F, Kronborg G, Jauffred S, Pedersen BK. Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the response of IL-6, TNF-alpha, and FFAs to low-dose endotoxemia in humans. *AM J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286: E766-72.

Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* 2007; 148: 868-77.

Lafontan M. Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: S39-S51. (obrázek 1)

Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 2009; 48: 275-97.

Langmajer M. Základy lékařské fyziologie. 1.vyd., Praha: *Grada* 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.

Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 2006; 55: 249

Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin. action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity Reviews* 2005; 6: 13–21.

Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19: 146-52.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. Molecular cell biology**.** 4. vyd., New York: *W. H. Freeman* 2000. ISBN 0-7167-3136-3.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25: 677-86.

Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, et al. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 516-23.

Mauriége P, Imbeault P, Langin D, Lacaille M, Alméras N, et al. Regional and gender variations in adipose tissue lipolysis in response to weight loss. *J Lipid Res* 1999; 40: 1559-71.

Melgarejo E, Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 998-1001.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 958-69.

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 209-12.

Müllerová D, Kopecký J. White Adipose Tissue: Storage and Effector Site for Environmental Pollutants. *Psysiol. Res.* 2007; 56: 375-38.

Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 193-205.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harperova biochemie. 4. vyd., Praha: *H+H* 2002. ISBN 80-7319-013-3.

Mutch DM, Temanni MR, Henegar C, Combes F, Pelloux V, et al. Adipose gene expression prior to weight loss can differentiate and weakly predict dietary responders. *PLoS One* 2007; 2: e1344.

Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 689-719.

Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 2007; 282: 35279-92.

Oberhauser F, Schulte DM, Faust M, Güdelhöfer H, Hahn M, Müller N, et al. Weight loss due to a very low calorie diet differentially affects insulin sensitivity and interleukin-6 serum levels in nondiabetic obese human subjects. *Horm Metab Res* 2012; 44: 465-70.

Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, **et al**. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc* 2004; 63: 263-7.

Pedersen BK, Steensberg A a Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *Journal of Physiology* 2001; 536: 329-337.

Pokorný J. Přehled fyziologie člověka. 1.vyd., Praha: *Karolinum* 2002. ISBN 80-246-02229-6.

Polák J, Klimčáková E, Kováčiková M, Vítková M, Bajzová M, et al. Endokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogenezi inzulinové rezistence. *Interní Med* 2006; 10: 443-446

Polák J, Kováčová Z, Holst C, Verdich C, Astrup A, et al. Total adiponectin and adiponectin multimeric complexes in relation to weight loss-induced improvements in insulin sensitivity in obese women: the NUGENOB study. *Eur J Endocrinol* 2008; 158: 533-41.

Polák J, Kováčová Z, Jacek M, Klimčáková E, Kováčiková M, et al. An increase in plasma adiponectin multimeric complexes follows hypocaloric diet-induced weight loss in obese and overweight pre-menopausal women. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112: 557-65.

Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the Metabolic Complications of obesity. *J Clin Endocriol Metab* 2008; 93: S64-S73.

Redinger RN. Fat storage and the biology of energy expenditure. *Trans Res* 2009; 154: 52-60.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 519-29.

Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the insite out. *Nature reviews* 2006; 7: 885-896.

Rossmeislová L, Mališová L, Kráčmerová J, Štich V. Adaptation of human adipose tissue to hypocaloric diet. *Int J Obes (Lond)* 2012; doi: 10.1038/ijo.2012.80

Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Ritov VB, Menshikova EV, Kelley DE, Hidalgo J, Pedersen BK, KellyM. Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2006; 55: S48–S54.

Ryden M, Jocken J, van Harmelen V, Dicker A, et al. Comparative studies of the role of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E1847-55.

Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J* 2004; 68: 975-81.

Saito T, Jones CC, Huang S, Czech MP, Pilch PF. The interaction of Akt with APPL1 is required for insulin stimulated Glut4 translocation. *J Biol Chem 2007*; 282: 32280-32287.

Sun L, Nicholson AC, Hajjar DP, Gotto AM Jr and Han J. Adipogenic differentiating agents regulate expression of fatty acid binding protein and CD36 in the J744 macrophage cell line. *J Lipid Res* 2003; 44: 1877-86.

Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7265-70.

Sharma NK, Das SK, Mondal AK, Hackney OG, Chu WS, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Markers Are Associated with Obesity in Nondiabetic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4532–4541.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008; 453: 783-7.

Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 1990; 322: 1483-7.

Svačina Š, Bretšnajdrová A. Jak na obezitu a její komplikace. 1.vyd., Praha: *Grada Publishing a.s.* 2008. ISBN 978-80-247-2395-2

Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF-α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Indian J Med Res* 2012;135: 127-30.

Šiklová-Vítková M, Klimčáková E, Polák J, Kováčová Z, Tencerová M, et al. Adipose Tissue Secretion and Expression of Adipocyte-Produced and Stromavascular Fraction-Produced Adipokines Vary during Multiple Phases of Weight-Reducing Dietary Intervention in Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 0000-0000.

Škop V, Kontrová K, Zídková J, Zídek V. Adipocytokiny. Nedávno objevené hormony tukové tkáně. *Chem Listy* 2009; 103: 187-192.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 772-83.

Tonelli J, Li W, Kishore P, Pajvani UB, Kwon E, Weaver C, Scherer PE, Hawkins M. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 1621–1629.

Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005; 184: 285-93.

Unger JW, Moss AM, Livingston JN. Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. *Neuroscience* 1991; 42: 853-61.

Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE.
Circulating interleukin-6 in relation to adipozity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res.* 2001; 9: 414-7.

Wang Y, Beydoun MA. The Obesity Epidemic in the United States-Gender, Age, Socioeconomic, Racial/Ethnic, and Geographic Characteristics: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. *Epidemiol Rev* 2007; 29: 6-28.

Wedellová Z, Dietrich J, Šiklová-Vítková M, Kološtová K, Kováčiková M. Adiponectin Inhibits Spontaneous and Catecholamine-Induced Lipolysis in Human Adipocytes of Non-Obese Subjects Through AMPK-Dependent Mechanisms. *Physiol Res* 2011; 60: 139-148.

Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 7-11.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1111-9.

Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Demedts MG and Verleden GM. Modulation by cAMP of IL-1β-induced eotaxin and MCP-1 expression and release in human airway smooth muscle cells. *Eur Respir J* 2003; 22: 220-226.

www.genecards.org

Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000; 96: 1723-32.

Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008; 454: 455-62.

Zhou L, Zhang J, Fang Q, Lui M, Lui X, Jia W, et al. Autophagy-mediated insulin receptor down-regulation contributes to endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance. *Mol Pharmacol* 2009; 76: 596-603.

Zhu S, Wang Z, Heshka S, Heo M, Faith MS, Heymsfield SB. Waist circumference and obesity-associated risk factors among whites in the third National Health and Nutrition Examination Survey: clinical action thresholds. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 743-9.

Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE* 2005; 2005: pe4.