

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů a člověka



Bc. Helena Kratochvílová

**Úloha endokrinní funkce tukové tkáně v patogenezi chronického zánětu u obezity a
diabetes mellitus 2. typu**

**The role of endocrine function of adipose tissue in the pathogenesis of chronic
inflammation in obesity and type 2 diabetes mellitus**

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 04. 2016

Podpis

Poděkování

Děkuji svému školiteli, prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc., za jeho ochotu a možnost psát tuto práci pod jeho dohledem. Ráda bych také poděkovala Mgr. Anně Cinkajzlové za její pomocnou ruku, cenné rady, laskavost a trpělivost při zpracování této diplomové práce. V neposlední řadě patří mé velké díky celému týmu laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice za dohled, podporu a vždy podanou pomocnou ruku během práce.

Abstrakt

Tuková tkáň je aktivní endokrinní orgán zkoumaný v řadě procesů spojených s metabolickými poruchami. Tato práce se zabývá vlivem endoskopicky implantovaného zařízení snižujícího hmotnost - duodeno-jejunálního rukávu na subklinický zánět tukové tkáně u obézních pacientů s diabetes mellitus 2. typu. U pacientů indikovaných k implantaci duodeno-jejunálního rukávu byly stanoveny antropometrické, biochemické a hormonální znaky a mRNA exprese prozánětlivých (TNF- α , leptin, CCL-2, CX3CL1, CD40, CD80, CD86, CD206, CD163 a IL-6), i protizánětlivých genů (Adiponektin, IL-10) v subkutánní tukové tkáni před, jeden a deset měsíců po jeho zavedení. Implantace duodeno-jejunálního rukávu u pacientů vedla k významnému poklesu tělesné hmotnosti, obvodu pasu, zlepšení metabolické a glykemické kompenzace. C-reaktivní protein jako vysoce citlivý indikátor zánětlivých procesů v těle byl snížen po deseti měsících po implantaci. V případě mRNA exprese CD86 (marker aktivovaných B lymfocytů a makrofágů) došlo k přechodnému zvýšení v tukové tkáni jeden měsíc po operaci a následnému výraznému poklesu po deseti měsících. mRNA exprese ostatních testovaných genů se v tukové tkáni neměnila. 10 měsíců po implantaci duodeno-jejunálního rukávu došlo k významnému poklesu M1 (CD40+CD14+HLA-DR+ buněk) i M2 (CD206+CD14+HLA-DR+ buněk) makrofágů.

Závěrem lze říci, že implantace duodeno-jejunálního rukávu u pacientů s diabetes mellitus 2. typu je velmi účinnou metodou vedoucí ke snížení hmotnosti a zlepšení celé řady metabolických a hormonálních parametrů a ke snížení subklinického zánětu.

Klíčová slova: tuková tkáň, adipocyty, obezita, diabetes mellitus 2. typu, subklinický zánět, endokrinní dysfunkce, duodeno-jejunální rukáv

Abstract

Adipose tissue as an active endocrine organ is explored in a number of processes associated with metabolic disorders. This work is aimed on studying the effect of endoscopically implantable weight-reducing device - duodeno-jejunal bypass liner - on subclinical inflammation of adipose tissue in obese patients, which contributes to the development of type 2 diabetes mellitus. Specifically, for patients implanted with duodeno-jejunal bypass liner we determined anthropometric, biochemical and hormonal characteristics, and mRNA expression of subcutaneous adipose tissue proinflammatory (TNF- α , leptin, CCL-2, CX3CL1, CD40, CD80, CD86, CD206, CD163 and IL-6) and anti-inflammatory genes (Adiponektin, IL-10) before, one month and ten months after the intervention. The implantation of duodeno-jejunal bypass liner significantly decreased body weight, waist circumference, and improved metabolic and glycemic control. In addition, C-reactive protein a highly sensitive indicator of inflammatory processes in the body was reduced ten months after implantation. In the case of mRNA expression of CD86 (a marker of activated B lymphocytes and macrophages) there was temporarily increase in adipose tissue one month after the surgery and the subsequent significant decrease after ten months. mRNA expression of other tested genes in adipose tissue was not changed. 10 months after the duodeno-jejunal bypass, M1 (CD40+CD14+HLA-DR+ cells) and M2 (CD206+CD14+HLA-DR+ cells) macrophages also decreased significantly.

In conclusion, the duodeno-jejunal bypass in patients with type 2 diabetes mellitus is a very efficient method for improving in a wide range of anthropometric, biochemical and hormonal parameters. Additionally, it also attenuated subclinical inflammation.

Keywords: adipose tissue, adipocytes, obesity, type 2 diabetes mellitus, subclinical inflammation, endocrine dysfunction, duodeno-jejunal bypass liner

Seznam použitých zkratek

AC	Adenylátcykláza
AdipoR	Adiponektinový receptor
(c)AMP	(cyklický) Adenosinmonofosfát
APC	<i>Allofykocyanin</i>
ATGL	Adipocytární triglyceridová lipáza
ATP	Adenosintrifosfát
B2M	Beta-2-mikroglobulin
BMI	Index tělesné hmotnosti (<i>body mass index</i>)
CCL-2	Chemokinový ligand 2 s C-C motivem
CD	Diferenciační skupina (<i>cluster of differentiation</i>)
CNS	Centrální nervový systém
CRP	C-reaktivní protein
CX3CL1	Chemokinový ligand 1 s C-X3-C motivem
T2DM	Diabetes mellitus 2. typu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DJBL	Duodeno-jejunální rukáv (<i>Duodeno-jejunal bypass liner</i>)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanát</i>
HDL	Lipoprotein o vysoké denzitě (<i>high density lipoprotein</i>)
HSL	Hormon senzitivní lipáza (<i>hormone-sensitive lipase</i>)
IL	Interleukin
INF γ	Interferon gama
IR	Inzulínová rezistence
JAK	Janusova kináza
LDL	Lipoprotein s nízkou denzitou (<i>low density lipoprotein</i>)
MCP-1	Monocyty přitahující protein 1 (<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>)
MGL	Monoacylglycerolová lipáza
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina

MK	Mastné kyseliny
NK	<i>Natural killers</i>
ObR	Leptinový receptor (<i>obese receptor</i>)
PE	<i>Fykoerytrin</i>
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll</i>
PKA	Protein kináza A
RT - PCR	Reverzní transkripce (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SOCS3	Supresor cytokinové signalizace 2 (<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>)
STAT	Transduktor signálu a aktivátor transkripce (<i>Signal transducer and activator of transcription protein</i>)
SVF	Stromavaskulární frakce (<i>stroma vascular fraction</i>)
TAG	Triacylglycerol
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TT	Tuková tkáň
TYK 2	Tyrozínová kináza 2
UCP 1	Odpřahující protein 1 (<i>Uncoupling protein 1</i>)
VLDL	Lipoprotein s velmi nízkou denzitou (<i>very low density lipoprotein</i>)
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World health organisation</i>)
WHR	Poměr obvodu pasu a boků (<i>waist-to-hip ratio</i>)

Obsah

1	Úvod	10
2	Literární přehled	11
2.1	Tuková tkáň.....	11
2.1.1	Rozložení tukové tkáně.....	12
2.1.2	Lipidový metabolismus	12
2.2	Tuková tkáň jako endokrinní orgán	14
2.2.1	Leptin	15
2.2.2	Adiponektin	18
2.2.3	Cytokiny.....	19
2.2.3.1	TNF- α	20
2.2.3.2	Interleukin 6 (IL-6).....	21
2.2.3.3	CCL-2	22
2.2.3.4	CX3CL1	22
2.2.3.5	Interleukin 10 (IL-10).....	22
2.2.4	Markery imunokompetentních buněk – M1/M2 makrofágů	23
2.3	Obezita	26
2.3.1	Subklinický zánět.....	28
2.3.2	Metabolický syndrom	29
2.3.2.1	Inzulínová rezistence	30
2.3.2.2	Diabetes mellitus 2. typu	31
2.4	Léčba - Duodeno-jejunální rukáv (EndoBarrier)	32
3	Cíle diplomové práce.....	34
4	Metodika.....	35
4.1	Odběr vzorků.....	35
4.2	Stanovení hormonálních a biochemických parametrů	36
4.3	Homogenizace tukové tkáně a izolace mRNA.....	36
4.3.1	Princip.....	36
4.3.2	Materiál a chemikálie.....	37
4.3.2.1	Chemikálie.....	37
4.3.2.2	Materiál.....	37
4.3.3	Postup.....	38
4.4	Měření koncentrace celkové RNA a ověření její kvality	38
4.4.1	Princip.....	38
4.4.2	Materiál a chemikálie.....	38
4.4.2.1	Materiál.....	38

4.4.3	Postup.....	39
4.5	Reverzní transkripce (RT – PCR)	39
4.5.1	Princip.....	39
4.5.2	Materiál a chemikálie.....	39
4.5.2.1	Chemikálie.....	39
4.5.2.2	Materiál.....	39
4.5.3	Postup.....	40
4.6	Real-time PCR	40
4.6.1	Princip.....	40
4.6.2	Materiál a chemikálie.....	41
4.6.2.1	Chemikálie.....	41
4.6.2.2	Materiál.....	42
4.6.3	Postup.....	42
4.7	Průtoková cytometrie	43
4.7.1	Princip.....	43
4.7.2	Materiál a chemikálie.....	44
4.7.2.1	Chemikálie.....	44
4.7.2.2	Materiál.....	44
4.7.3	Izolace stromavaskulární frakce ze subkutánní tukové tkáně pro měření na průtokovém cytometru.....	45
4.7.3.1	Značení pro průtokový cytometr	45
4.7.3.2	Měření na průtokovém cytometru	45
4.7.3.3	Analýza dat z průtokového cytometru.....	46
4.8	Vyhodnocení výsledků – statistika.....	46
5	Výsledky.....	47
5.1	Antropometrický, biochemický a hormonální profil pacientů.....	47
5.2	Sérové hladiny CRP a cytokinů	49
5.3	Izolace RNA z tukové tkáně a její koncentrace změřená spektrofotometrem	50
5.4	Reverzní transkripce.....	50
5.5	Relativní mRNA exprese sledovaných genů v tukové tkáni u obézních pacientů s T2DM	51
5.6	Změny zastoupení makrofágů v subkutánní tukové tkáni.....	52
5.7	Korelace mezi mRNA expresí, procentem detekovaných makrofágů, sérovými hladinami cytokinů a antropometrickými či biochemickými parametry	54
6	Diskuze	56
7	Závěr.....	60
8	Literatura	61

1 Úvod

Tuková tkáň (TT) je jedním z nejrozsáhlejších orgánů a její dobrá funkce je nezbytná pro správné fungování organismu. Vytváří se již od narození, ale v časové ose je proměnlivá. V období pozdní adolescence, klimakteria či během těhotenství dochází k většímu hromadění tukových buněk a naopak v období růstu se její objem proporčně redukuje. Také složení TT se mění postupem času, kdy se u novorozenců vyskytující se hnědá tuková tkáň z převážné části mění na bílou tukovou tkáň. TT je považována za hlavní zásobárnu energie, má ochrannou funkci a produkuje řadu faktorů např. hormony, pro- i protizánětlivé cytokiny, faktory ovlivňující inzulínovou senzitivitu a další látky, které se podílejí na celkovém intermediálním metabolismu (Berry et al, 2013).

Jako endokrinní orgán TT ovlivňuje řadu procesů v těle a dysfunkce v sekreci chemických látek zvyšuje riziko vzniku metabolického syndromu zahrnujícího diabetes mellitus 2. typu (T2DM), inzulínovou rezistenci, hypertenzi, hypercholesterolemii a přidružené metabolické rozvraty. Změna v produkci faktorů tukové tkáně je zapříčiněna zejména zvýšenou akumulací tuku vedoucí k obezitě (Hajer et al, 2008). Obezita je celosvětově rozšířené onemocnění, které má v posledních letech výrazně vzrůstající tendenci. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, jež kromě metabolického syndromu přispívá i k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění, poruchám pohybového aparátu nebo psychickým problémům (Organization, 2000).

Obezita úzce souvisí s rozvojem chronického zánětu v organismu, jež je provázen zvýšeným množstvím cirkulujících prozánětlivých faktorů bez známky evidence klinických příznaků zánětu. Zánět vyvolaný nahromaděním tukové tkáně souvisí s poruchou fyziologické funkce tukové tkáně a homeostatickou nerovnováhou objevující se u T2DM a hraje hlavní roli v rozvoji inzulínové rezistence (Medzhitov, 2008; Oliver et al, 2010). Vztah zánětu a inzulínové rezistence byl prokázán již v roce 1989, a to průkazem asociace mezi zvýšenými hladinami prozánětlivého cytokinu *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) a hyperglykemií (Feingold et al, 1989). Naopak produkce protizánětlivých faktorů je u obézních pacientů redukována (Ouchi et al, 2011).

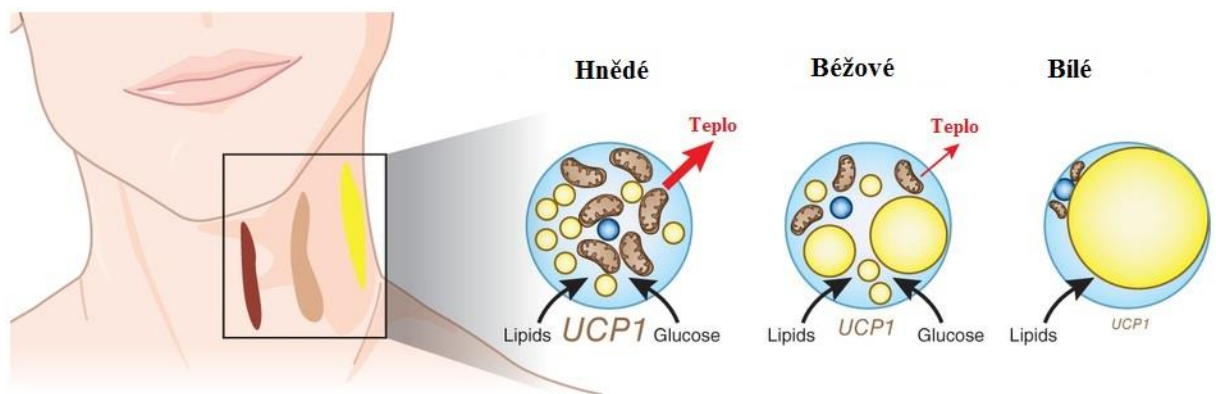
Diplomová práce bude zaměřena na vliv implantace duodeno-jejunálního rukávu (DJBL) na subklinický zánět u obézních pacientů s T2DM. Budeme stanovovat exprese vybraných genů, antropometrický, biochemický a hormonální profil, a procentuální zastoupení makrofágů v tukové tkáni.

2 Literární přehled

2.1 Tuková tkáň

Tuková tkáň se dostala do popředí zájmu vědců až v 90. letech minulého století. Do té doby byla považována za pasivní zásobárnu energie s termoregulačními vlastnostmi a funkcí mechanické ochrany orgánů. Teprve až na konci 20. století bylo objeveno, že se jedná o multifunkční orgán s endokrinními, imunitními a regeneračními vlastnostmi. TT má schopnost produkce endokrinně aktivních látek tzv. adipokinů (Zhang et al, 1994). Ty mají charakter hormonů, cytokinů, růstových faktorů či adhezních molekul. Sekrece adipokinů se odvíjí od celkové homeostázy organismu. Působí autokrinně, parakrinně i endokrinně a ovlivňuje lokální i celkový energetický metabolismus, centrální nervovou soustavu (CNS), jaterní či svalovou tkáň (Havel, 2002).

Obecně se rozlišují dva hlavní typy tukové tkáně – bílá a hnědá. U člověka zaujímá převážnou většinu bílá TT. Hnědá TT lokalizovaná v oblastech podél páteře, lopatek a velkých cév se vyskytuje především v dětství, v dospělosti se redukuje na minimum. Nejen proporčně, ale i složením a endokrinní sekrecí se oba typy značně liší. Bílá TT obsahuje unilokulární adipocyty vyplněné velkou tukovou kapénkou obsahující zásobní triacylglyceroly (TAG) a estery cholesterolu. Hnědá TT je charakterizovaná přítomností multilokulárních adipocytů s vícero tukovými kapénkami a vysokou denzitou mitochondrií a na ně vázaných cytochromů (Lean & Jennings, 1989). Hnědá TT se podílí na vytváření tepla u novorozenců procesem netřesové termogeneze. V dospělosti se z velké části přeměňuje na bílou TT, a proto není spojována s ovlivněním patofyziologie obezity (Rothwell & Stock, 1997). Avšak během posledních let bylo zjištěno, že i dospělý jedinec je schopen částečně aktivovat část TT a produkovat teplo. Takto aktivované adipocyty, tzv. béžové tukové buňky, nesou částečně charakteristiku jak hnědých tukových buněk (zvýšené množství mitochondrií a tukových kapének), tak bílých adipocytů (velikost tukových kapének) (*Obr. 1*). Jejich hlavní role v organismu a princip aktivace je stále otázkou budoucího výzkumu (Nedergaard & Cannon, 2013a). Dále bude diplomová práce zaměřena jen na bílou TT.



Obr. 1 Rozdíly mezi typy adipocytů. Produkce tepla z hnědých a béžových adipocytů se vytváří na základě exprese odpřahujícího proteinu 1 (UCP 1 - uncoupling protein 1), který je klíčový v procesu netřesové termogeneze. UCP 1 rozpřahuje oxidativní fosforylaci od oxidačního řetězce a tím se energie neuvolňuje ve formě adenosintrifosfátu (ATP), ale jako teplo (Nedergaard & Cannon, 2013b).

2.1.1 Rozložení tukové tkáně

Tuková tkáň je komplexní orgán tvořící 20 - 25 % celkové hmotnosti organismu zdravých jedinců, avšak toto množství se může u obézních navýšit až na dvojnásobek. Celý funkční komplex je tvořen z adipocytů (tukových buněk) a stromavaskulární frakce (SVF – *stroma vascular fraction*) složené z kolagenních vláken, krevních cév, fibroblastů, imunitních a nervových buněk (Trayhurn & Beattie, 2001). Adipocyty se seskupují do tukových dep, jejichž velikost je v rámci organismu nerovnoměrně rozložená. Tuková depa se nacházejí buď v podkožní, nebo ve viscerální (útrobní) oblasti. Nadměrné ukládání tuku ve viscerální oblasti má zásadní spojitost s vyšším rizikem vzniku metabolických (Wajchenberg, 2000) či kardiovaskulárních poruch (Larsson et al, 1984).

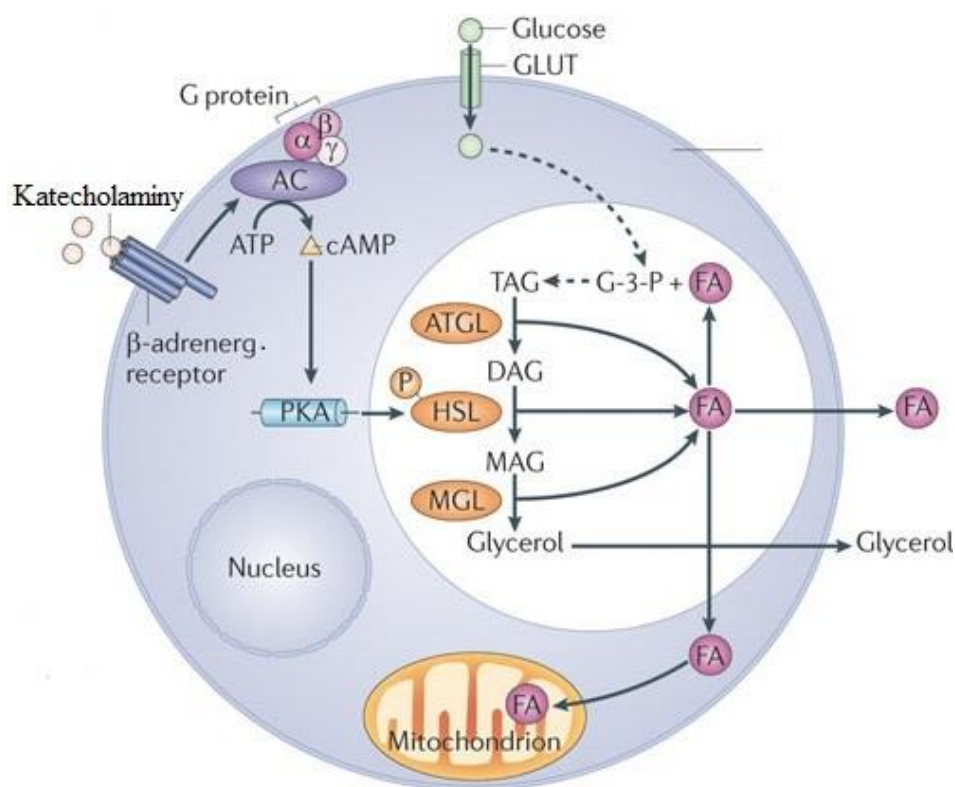
Zásadní metabolické dysbalance způsobuje i ektopické ukládání tuků tj. ukládání tuků mimo TT. K ektopickému ukládání může docházet při celkové absenci TT u tzv. kongenitální lipoatrofie, při níž se lipidy ukládají do jaterní, svalové tkáně, pankreatu, žlučníku a dochází k rozvoji metabolických onemocnění stejně jako u hypertrofované TT (Schrauwen & Hesselink, 2004).

2.1.2 Lipidový metabolismus

TT slouží jako zásobárna energie, ve které se skladují tuky v podobě TAG. Tuky z potravy se vstřebávají v tenkém střevě, kde se štěpí pomocí lipáz na glycerol a masné kyseliny (MK). MK pomocí specifických přenašečů putují do míst metabolismu – jater, kde dochází k oxidaci MK v matrix mitochondrií. Lipidy, které neprošly játry, se ukládají

přímo do tukové tkáně. V TT dochází k syntéze TAG z volných MK nebo *de novo* procesem lipogeneze. Lipogeneze snižuje příjem tuků v potravě. Dochází k ní při překročení syntézy glykogenu ve svazech a játrech, čímž přebytečná glukóza slouží jako prekurzor pro tvorbu TAG v TT. MK se do tukových buněk dostávají v závislosti na aktivitě lipoproteinové lipázy regulované hladinami inzulinu. Při příjmu potravy se vyplavuje inzulin, který aktivuje lipoproteinovou lipázu a MK jsou následně vychytávány z krve a ukládány v adipocytech (Pykalisto et al, 1975).

Při nedostatku energetického příjmu dochází k lipolýze, během níž se TAG v TT hydrolyzují na MK a glycerol. MK se buď reesterifikují zpět na TAG, nebo jsou uvolňovány do krevního řečiště a putují k cílovým tkáním. Glycerol se takto dostává převážně do jater, kde se podílí na procesu glukoneogeneze (novotvorba glukózy z neglukózových prekurzorů). MK jsou v krvi navázány na albumin a jsou dále využity zejména v kosterní svalovině a myokardu, čímž dochází k šetření zásobami glykogenu. Při lipolýze v adipocytech dochází ke třem hydrolytickým reakcím, ve kterých hrají roli enzymy adipocytární triacylglycerolová lipáza (ATGL) (Zimmermann et al, 2004), hormon senzitivní lipáza (HSL) (Holm et al, 2000) a monoacylglycerolová lipáza (MGL) (Sakurada & Noma, 1981). V první reakci katalyzované ATGL dochází k uvolnění MK a ke tvorbě diacylglycerolu, který vstupuje do reakce katalyzované HSL. Opět se odštěpuje MK a vzniklý monoacylglycerol vstupuje do třetí reakce katalyzované enzymem MGL, přičemž se uvolňuje MK a glycerol (*Obr. 2*). Proces lipolýzy je aktivován adrenalinem a noradrenalinem a inhibován inzulinem (Arner, 1997).



Obr. 2 Regulace lipolýzy v adipocyty bílé tukové tkáně. Katecholaminy se váží na β adrenergní receptor, který aktivuje adenylátcyklázu (AC), a tím produkuje cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). cAMP se váže na protein kinázu A (PKA), která fosforyluje HSL. Fosforylovaná HSL následně katalyzuje přeměnu diacylglycerolu při současném odštěpení mastné kyseliny (Altarejos & Montminy, 2011).

Syntéza i degradace TAG probíhá v cytoplasmě adipocytů a závisí na příjmu potravy, fyzické zátěži a teplotě. Mezi ději je u zdravých jedinců rovnováha, naopak u obézních dochází k deregulaci s převahou lipolýzy. Zvýšená lipolýza je jednou z příčin dyslipidémie a inzulínové rezistence u pacientů s obezitou a diabetem (Coppack et al, 1994).

2.2 Tuková tkáň jako endokrinní orgán

Od roku 1994, kdy byl objeven hormon leptin, se změnil pohled na tukovou tkáň, která začala být považována za aktivní endokrinní orgán (Zhang et al, 1994). TT produkuje řadu adipokinů. Ty jsou syntetizovány přímo adipocyty, ale také imunokompetentními buňkami a preadipocyty. Vedle produkce vlastních bioaktivních peptidů reaguje TT i na hormonální či nervové signály přijímané prostřednictvím řady receptorů. Známo je více než 600 faktorů sekretovaných TT, které působí lokálně i systémově, a jejichž funkce se

vzájemně doplňují. Patří mezi ně hormony jako je leptin (Zhang et al, 1994), adiponektin (Chandran et al, 2003), dále cytokiny TNF- α (Hotamisligil et al, 1993), IL-6 (Mohamed-Ali et al, 1997) či IL-10, růstové faktory, adhezivní molekuly nebo enzymy (Kershaw & Flier, 2004). Adipokiny se zjednodušeně rozdělují do 4 skupin dle svého působení (Kershaw & Flier, 2004).

- Hormony ovlivňující CNS, kde působí na centra sytosti. Příkladem je leptin.
- Látky ovlivňující celotělový zánět a imunitní systém (především prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny).
- Působky snižující citlivost na inzulín, což se projevuje rozvojem inzulínové rezistence a T2DM.
- Hormony působící na cévní endotel a celý kardiovaskulární systém např. adiponektin, jehož sekrece se snižuje s nárůstem hmotnosti a objemu TT.

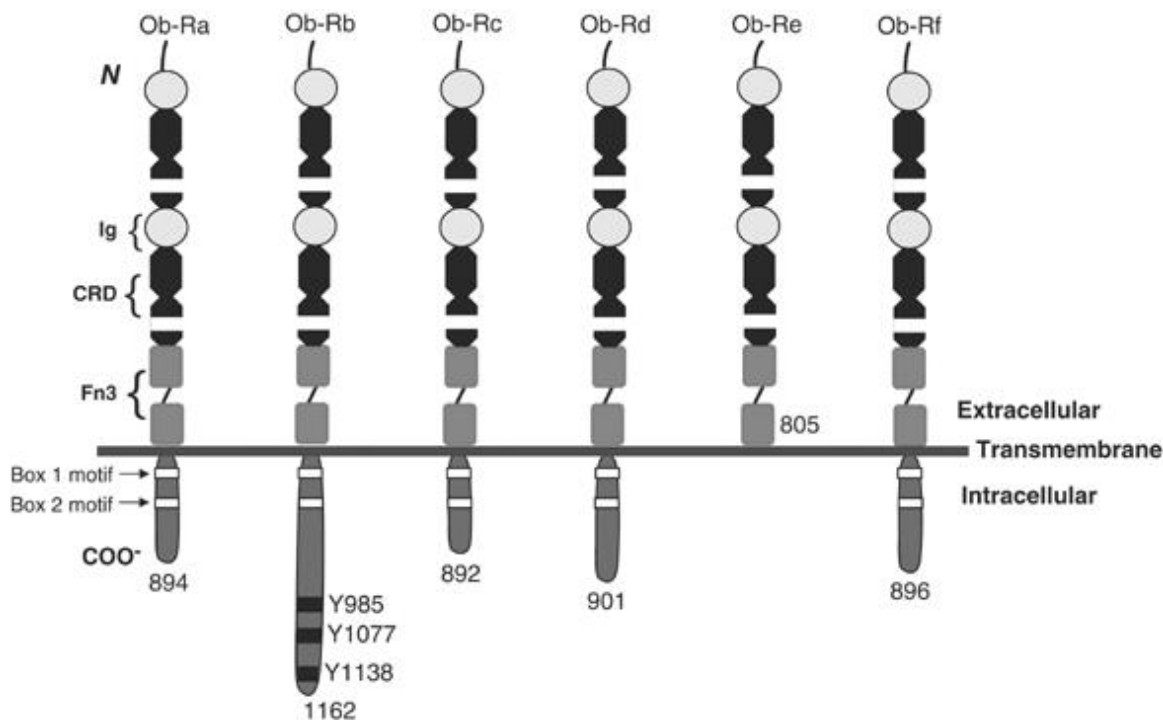
Sekrece adipokinů se mění v závislosti na stavu organismu. Jedinci s normální hmotností mají vyrovnanou produkci adipokinů, zatímco u obézních jedinců s nadbytkem TT vzniká dysfunkce v expresi a produkci těchto faktorů (Grundy et al, 2004).

2.2.1 Leptin

Leptin, hormon produkovaný tukovou tkání, byl objeven v roce 1994 skupinou vědců pod vedením profesora Friedmana (Zhang et al, 1994). Leptin je kódovaný *obese* (*ob*) genem nacházejícím se na sedmém chromozomu. Hlavní zdroj sekrece leptinu jsou adipocyty (Zhang et al, 1994). Z adipocytů je leptin uvolňován do krevního řečiště a putuje do CNS, kde působí v hypotalamu. Zde zpětnovazebně reguluje energetický příjem a výdej. V menším množství nalezneme produkci leptinu i v jiných tkáních jako jsou mléčné žlázy, vaječníky, placenta (Hoggard et al, 1997), plíce (Vernooy et al, 2009), hypofýza (Wiesner et al, 1999) nebo žaludek (Bado et al, 1998).

Leptin se váže na Ob-receptory a spouští signální kaskádu. Receptory pro leptin se nacházejí v mozku a v malém množství i v periferních tkáních, zejména v srdci, játrech, ováriích a tenkém střevě. Identifikováno bylo několik izoform leptinových receptorů (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe a ObRf), které se liší v délce a sekvenci vnitřních domén na základě alternativního sestřihu (*Obr. 3*) (Lee et al, 1996). Izoformy leptinového receptoru se dále dělí do tří kategorií: krátký, dlouhý a solubilní, přičemž zásadní roli má dlouhý ObRb receptor. ObRb se nachází napříč celou CNS s největším zastoupením v hypotalamu. Krátké izoformy ObRa a ObRc naopak umožňují přestup leptinu přes

hematoencefalickou bariéru (Fei, H., a spol., 1997) a solubilní receptory cirkulující v plazmě se váží na leptin sekretovaný z TT do krevního oběhu (Huang et al, 2001).



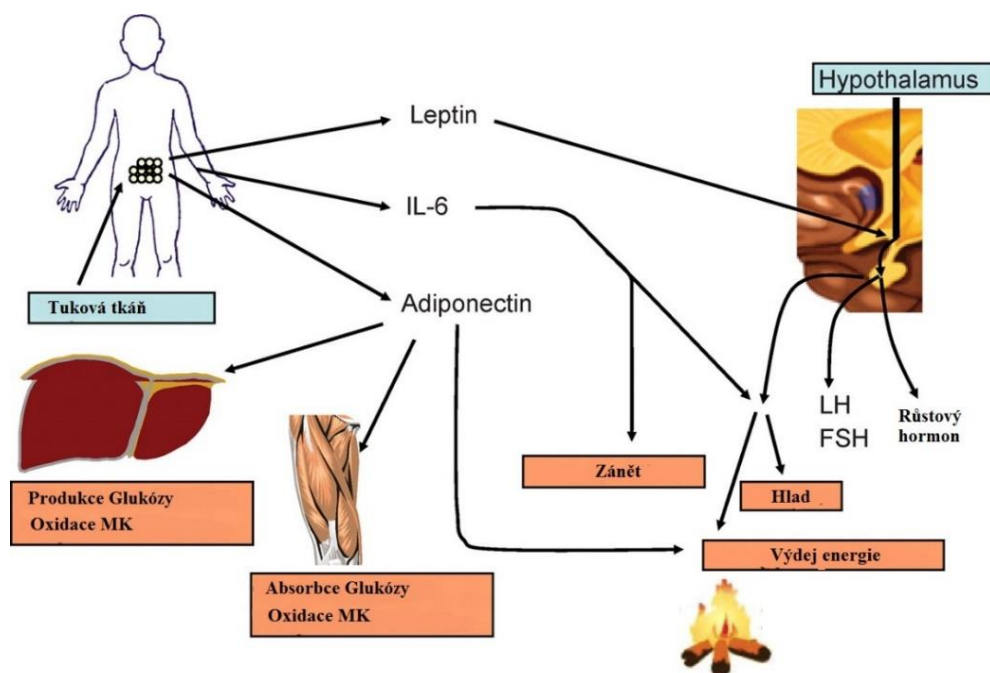
Obr. 3 Typy leptinových receptorů. Existuje nejméně 6 rozdílných izoforem leptinových receptorů, které mají stejnou extracelulární doménu a liší se intracelulární. Přestože 5 z 6ti Ob receptorů jsou transmembránové, pouze ObRb kóduje všechny proteinové motivy potřebné k aktivaci signální kaskády (Ceddia, 2005).

Friedman (Zhang et al, 1994) se svým týmem naklonovali *ob* gen u myši, který, jak se ukázalo, má totožnou strukturu jako lidský. Hladiny leptinu souvisí s příjmem a výdejem energie a odpovídají množství TT. Také se mění dle cirkadiálního rytmu, přičemž nejvyšších koncentrací leptin nabývá od půlnoci do brzkého rána a nejnižších v odpoledních hodinách (Ahima et al, 1996). Z cirkulace prochází leptin přes hematoencefalickou bariéru a v CNS se váže na specifické receptory. V CNS je považován za hlavní regulátor příjmu a výdeje energie hypotalamus, který obsahuje i nejvíce Ob receptorů. Leptin působí na hypotalamus ve ventrikulomediální oblasti, v laterálních hypotalamických jádrech a v místě obloukovitého jádra (*nucleus arcuatus*), kde stimuluje neurony k sekreci neuropeptidu proopiomelanokortinu (Fei et al, 1997), který je prekurzorem melanocyty stimulujícího hormonu alfa tzv. hormonu přesycení. Tento hormon se zvyšuje zároveň se vzestupem leptinu a působí anorexigenně (Balthasar et al, 2004) tj. snižuje chuť k jídlu a zvyšuje výdej energie. Dále leptin snižuje syntézu

stimulátorů příjmu potravy: neuropeptidu Y, *agouti related* polypeptidu a endokanabinoidů. Navýšení výdeje energie je doprovázeno vyšší tělesnou teplotou, spotřebou kyslíku a nepatrným snižováním tukových zásob. Leptin také působí v pankreatu na produkci inzulínu, a to přímo vzhledem k expresi leptinových receptorů na β buňkách pankreatu. Inzulínem je také zpětnovazebně zvyšována leptinová sekrece, stejně tak jako estrogény, mastnými kyselinami, glukokortikoidy nebo androgeny (Ahima et al, 1996).

Mutace *ob* genu jsou vzácné, avšak byly popsány jak u myší, tak u lidí. (Maffei et al, 1996). Hladina leptinu odráží množství tukové tkáně a u obézních může vzrůst až 4 krát v případě těžké obezity i více. U vzácné vrozené mutace dochází k nadměrné akumulaci tukové tkáně již u malých dětí. Nekontrolovatelná chuť k jídlu a nenasytost má za následek rozvoj až 3. stupně obezity, inzulínové rezistence následované zvýšeným vylučováním inzulínu a jiných metabolických komplikací. U obézních by vysoké množství uvolněného leptinu mělo také zvýšit energetický výdej. K tomu ale často nedochází díky indukci tzv. leptinové rezistence. Jedinci jsou rezistentní vůči účinku leptinu a hypotalamus zpětně nereguluje rovnováhu mezi příjmem a výdejem (Considine et al, 1996).

Vedle vlivu na výdej energie a udržování energetické rovnováhy v organismu působí leptin i v dalších procesech. Hraje roli v jaterní glukoneogenezi, glukózové homeostáze a aktivně se účastní hematopoézy, angiogenezi či imunitních nebo kardiovaskulárních funkcí. Podílí se i na funkci reprodukčního systému, řídí nástup puberty a ontogenezi (*Obr. 4*) (Margetic et al, 2002).



Obr. 4 Vliv sekrece leptinu, adiponektinu a IL-6 na organismus. Leptin působí v hypothalamu, kde inhibuje 5'adenozin monofosfátem aktivovanou proteinovou kinázu, čímž snižuje pocit hladu a aktivuje výdej energie. Na periférii zvyšuje oxidaci lipidů v játrech a lipolýzu v kosterních svalecth a adipocytech. Adiponektin inhibuje produkci glukózy v játrech a zároveň zvyšuje vychytávání glukózy kosterní svalovinou. V obou tkáních zvyšuje oxidaci MK. IL-6 působí centrálně na zvýšení energetického výdeje a utlumení pocitu hladu (Hajer et al, 2008).

2.2.2 Adiponektin

Adiponektin je protizánětlivý a antiaterogenní hormon vylučovaný adipocyty. V experimentu má pozitivní vliv na potlačení rozvoje aterosklerózy a protektivně působí na nemoci spojené s obezitou a nárůstem objemu tukové tkáně. Protein je složen ze dvou rozdílných domén, C – globulární a N – fibrilární. V roce 1995 byl objeven jako člen kolagenové superrodiny s homologii s kolagenem VIII, X, komplementem C1q a TNF- α . U lidí je znám jako GPB28 (*gelatin-binding protein of 28 kDa*) a obsahuje 244 aminokyselin (Scherer et al, 1995).

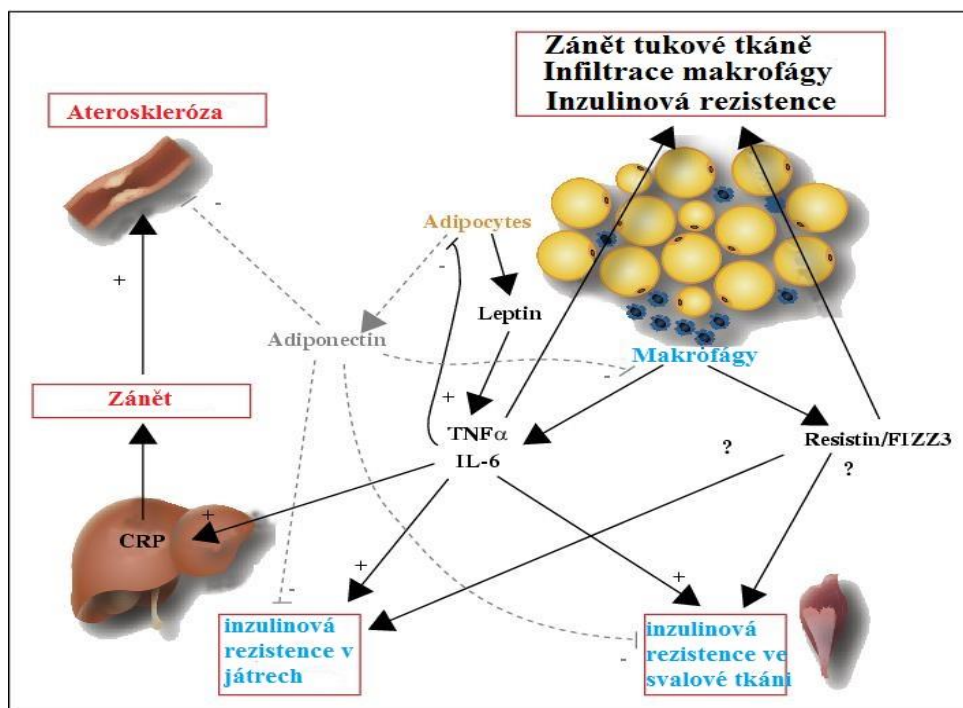
V cirkulaci se vyskytuje ve třech formách: nízkomolekulární trimery, hexamery a vysokomolekulární multimery složené z 12 – 18 podjednotek (Waki et al, 2003). Jako monomer je přítomen pouze v tukové tkáni. Rozdílné formy a jejich poměr v organismu vykazují rozdílné účinky na glukózovou homeostázu, T2DM a kardiovaskulární onemocnění (Scherer et al, 1995). Vysokomolekulární formy mají nejvyšší biologickou

aktivitu. Jejich zvýšená koncentrace zlepšuje inzulinovou senzitivitu, čímž může pomoci chránit proti vzniku inzulinové rezistence a metabolického syndromu. Pro svou schopnost snižovat hladinu glukózy v séru predikuje metabolické poruchy lépe, než celková koncentrace adiponektinu v plazmě (Hara et al, 2006). V roce 2003 byly objeveny dva základní receptory AdipoR1 a AdipoR2, které jsou ve větší či menší míře přítomny na orgánech v celém organismu. Nejvyšší výskyt AdipoR1 je v kosterní svalovině a AdipoR2 v játrech (Yamauchi et al, 2003).

Adiponektin jako inzulin - senzitivující hormon má pozitivní vliv na metabolická onemocnění, pozitivně koreluje s hladinami HDL (*high density lipoprotein*) a snižuje zánětlivé reakce. Při zvýšeném množství tukové tkáně jeho koncentrace klesá a zvyšují se hladiny zánětlivých markerů, snižuje se lipidový metabolismus (snižuje se oxidace MK a dochází k nárůstu plazmatické hladiny volných MK a TAG) a zvyšuje se riziko rozvoje obezity a jejích komplikací (Fruebis et al, 2001; Shimada et al, 2004).

2.2.3 Cytokiny

Cytokiny jsou v TT sekretovány vedle imunokompetentních buněk také preadipocyty a adipocyty. Cytokiny se dle své funkce dělí na prozánětlivé a protizánětlivé, přičemž jsou vylučovány dle aktuálního stavu organismu. U obézních jedinců dochází k nárůstu produkce prozánětlivých faktorů (Catalan et al, 2007). Mezi nejznámější a v této práci sledované patří TNF- α či IL-6. Naopak hladiny protizánětlivých působků při patofyziologiích obezity nebo T2DM budou zřejmě potlačeny (*Obr. 5*).



Obr. 5 Sekrece adipokinů u obézních a jejich vzájemné ovlivnění. Při nadbytku tukové tkáně dochází k zvýšení sekrece prozánětlivých cytokinů adipocyty. Prozánětlivé adipokiny inhibují inzulínovou senzitivitu, přispívají k infiltraci tukové tkáně makrofágy a rozvoji systémového zánětu prokazatelného nárůstem hladin C-reaktivního proteinu (CRP) (Bastard et al, 2006).

2.2.3.1 TNF- α

Tumor necrosis factor alpha je prozánětlivý cytokin, jehož hladiny rostou (mimo jiné) s nárůstem TT, stejně jako u všech zánětlivých stavů organismu. V TT je převážně produkován imunokompetentními buňkami, a to zejména makrofágy a lymfocyty. V menším množství je exprimován i v adipocytech. Důležitou roli má při rozvoji inzulínové rezistence. Vazbou na substrát inzulínového receptoru-1 zabráňuje fosforylaci inzulínového receptoru, a tím inhibuje signalizaci inzulínu. Jeho korelace s hyperinzulinémií byla prokázána experimentem, ve kterém byla obéznímu potkanovi *in vivo* podána protilátka proti TNF- α . Na základě neutralizace TNF- α následně došlo ke zlepšení inzulínové senzitivity ve svalové i tukové tkáni (Hotamisligil et al, 1993). TNF- α také významně reguluje lipidový metabolismus. Indukuje lipolýzu a zároveň zvyšuje syntézu TAG v játrech, čímž vzrůstá množství TAG v cirkulaci (Hube & Hauner, 1999). Svým působením ovlivňuje i další zánětlivé faktory jako IL-6, CRP, transkripční a růstové faktory nebo jejich receptory a naopak tlumí expresi protizánětlivého adiponektinu (Bastard et al, 2006).

2.2.3.2 Interleukin 6 (IL-6)

Interleukin 6 je produkován T lymfocyty, antigen-prezentujícími buňkami, ale také adipocyty, hepatocyty, hladkou svalovinou či osteoblasty. Jeho hlavní funkcí je schopnost vyvolat imunitní odpověď skrze produkci protilátek (Akira et al, 1990). Interaguje s TNF- α a přímo zvyšuje endogenní hladiny CRP v tukové tkáni u obézních jedinců (Baumann & Gauldie, 1994). Stimuluje zánětlivou a auto-imunitní reakci a přispívá k rozvoji T2DM (Kristiansen & Mandrup-Poulsen, 2005), inzulinové rezistence, aterosklerózy či rakoviny prostaty (Smith et al, 2001) nebo prsu (Xie et al, 2012).

IL-6 patří do rodiny cytokinů vázajících se na membránové receptory složené ze dvou podjednotek. Regulační podjednotka IL-6R α působí jako agonista a vyskytuje se v membránově vázané nebo solubilní formě. Jeho exprese je buněčně specifická, pouze u hepatocytů, leukocytů a některých endokrinních buněk (např. buňky hypofýzy a adrenokortikotropní buňky). Signalizační podjednotkou je gp130 na kterou se váže ligand a spolu s IL-6R α tvoří hexamerní komplex aktivující 2 signalizační dráhy. Fosforylovaná gp130 podjednotka asociuje s Janusovou kinázou (JAK) a aktivuje JAK/STAT (transduktor signálu a aktivátor transkripce) transkripční dráhu nebo JAK kináza působí na tyrozin fosfatázu SHP2 a spouští MAP kinázovou kaskádu. Aktivace jednotlivých transkripčních drah je individuálně zakódována v jednotlivých buňkách. Regulace mezi aktivací obou drah dále ovlivňuje metabolický stav buněk. Působení IL-6 vede k řadě fyziologických procesů, jako je aktivace proliferace, diferenciací, ale i apoptózy (Heinrich et al, 1998; Kamimura et al, 2003).

IL-6 má vliv jak v prozánětlivých (aktivace a diferenciací lymfocytů, podpora sekrece proteinů akutní fáze zánětu), tak i v protizánětlivých procesech, kde působí na regulaci prozánětlivých markerů (Xing et al, 1998). IL-6 má dvojí účinky i v regulaci T2DM, obezity nebo inzulinové rezistence (Kristiansen & Mandrup-Poulsen, 2005; Stenlof et al, 2003). Konkrétně ve Stenlofově studii (Stenlof et al, 2003) byla prokázána negativní korelace mezi hladinami IL-6 v CNS a množstvím tukové tkáně. Z toho vyplývá, že IL-6 v CNS ovlivňuje svým množstvím příjem a výdej energie a jeho nižší hladiny tak mohou přispívat k rozvoji obezity a inzulinové senzitivity (Stenlof et al, 2003). Na druhé straně je ale jeho podání spojené se vzestupem hladin IL-6 v krevním oběhu studováno i ve spojitosti s anorektickými pochody, protože vyvolává potlačení chuti k jídlu (Coppack, 2001).

2.2.3.3 CCL-2

CCL-2 (*chemokinonový (C-C motiv) ligand 2*) neboli MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) je protein akutní fáze zánětu patřící do rodiny CC chemokinů. Podílí se na infiltraci monocytů, T-lymfocytů (Carr et al, 1994) a dendritických buněk (Xu et al, 1996) do míst zánětu. Jeho hladiny stoupají u obézních jedinců a s redukcí tělesné hmotnosti dochází k jejich opětovnému poklesu. Kromě zánětu se jeho produkce adipocyty může podílet i na negativní vazbě mezi TT a svaly. Jeho vyšší hladiny snižují vychytávání glukózy monocyty regulované inzulinem, neboť CCL-2 snižuje inzulinovou signalizaci přes extracelulární signálem regulovanou kinázu 1/2 (Sell et al, 2006).

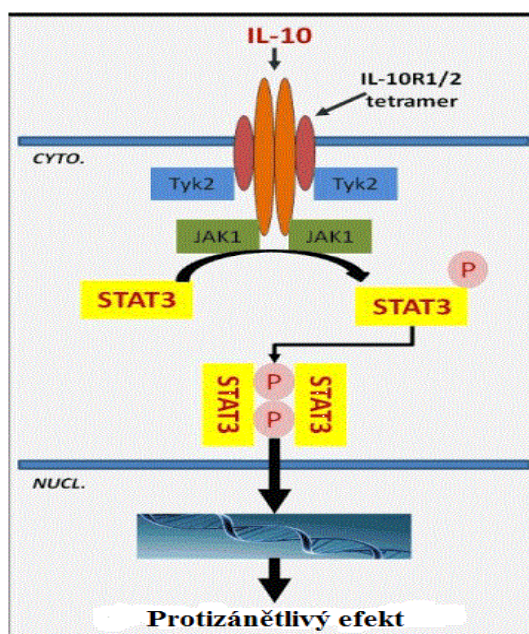
2.2.3.4 CX3CL1

CX3CL1 (*chemokinový (C-X3-C motiv) ligand 1*) u lidí znám pod názvem *Fractalkine* je jediný člen CX3C rodiny chemokinů (Jones et al, 2010). Vyskytuje se v rozpustné i transmembránové formě. Mezi funkce membránově vázaného CX3CL1 patří podpora adheze leukocytů na endotelu, kde může být indukován zánětlivými cytokiny, jako jsou TNF- α , INF γ nebo IL-1 (Garcia et al, 2000; Jones et al, 2010). Rozpustná forma působí jako chemoatraktant pro monocyty, T lymfocyty a *natural killers* (NK) buňky. Exprese CX3CL1 roste během zánětlivého stavu převážně na monocytech, ale také na makrofázích, fibroblastech, endoteliálních či dendritických buňkách (Jones et al, 2010).

2.2.3.5 Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin 10 je pleiotropní protizánětlivý cytokin, jehož hladiny vzrůstají u obézních jedinců (Jung et al, 2008). Je produkovaný nejen adipocyty, ale převážně makrofágy, dendritickými buňkami, B buňkami a skupinami CD4⁺ a CD8⁺ T buněk ve SVF či tkáňové matrix v oblastech tukových zásob. Jeho protizánětlivé vlastnosti se uplatňují zejména v cévním systému. Inhibuje interakce mezi leukocyty a endotelovými buňkami nebo potlačuje produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů sekretovaných makrofágy a lymfocyty (Esposito et al, 2003) skrze inhibici prozánětlivé signalizace (Wang et al, 1995). Dále inhibuje apoptózu makrofágů během infekce (Arai et al, 1995) a je zodpovědný za Th2 polarizaci pomocných T lymfocytů (Pinderski et al, 2002). Dle studie na zvířatech bylo zjištěno, že nedostatek IL-10 zvyšuje riziko rozvoje aterosklerózy (Mallat et al, 1999). U člověka je jeho produkce dána částečně geneticky (Westendorp et al, 1997). Genetická porucha v produkci IL-10 způsobuje zejména u obézních jedinců nedostatečnou zpětnovazebnou regulaci na zvýšenou produkci prozánětlivých faktorů.

IL-10 působí přes komplex heterodimerních receptorů IL-10R1 a IL-10R2, jejichž fosforylace aktivuje tyrozinové kinázy JAK1 a Tyk2, které spouštějí STAT3 signální dráhu (Obr. 6) (Donnelly et al, 1999). STAT3 putuje do jádra, kde se váže na promotor a spouští transkripci genů, mezi které patří samotný IL-10 nebo SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) (Murray, 2007). IL-10 funguje jako silný inhibitor exprese glykoproteinů hlavního histokompatibilního systému a zároveň zvyšuje expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86. Má vliv na útlum imunitní odpovědi. Po navázání IL-10 na antigen prezentující buňky dochází k produkci prozánětlivých cytokinů IL-2, INF γ spojených s Th1 buňkami a IL-4, IL-5 produkovaných Th2 buňkami (Mosser & Zhang, 2008).



Obr. 6 Mechanismus interakce interleukinu 10 s receptorem IL-10R1/2. Po navázání IL-10 na receptor se spouští signální dráha, jejíž klíčový faktor STAT3 aktivuje transkripci samotného IL-10 (pozitivní regulace) a geny účastnící se na potlačení zánětlivé reakce (např. SOCS3) (Fioranelli & Grazia, 2014).

2.2.4 Markery imunokompetentních buněk – M1/M2 makrofágů

Buněčná komponenta imunitního systému je tvořena buňkami dvou linií – myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie se diferencují monocyty (prekurzory makrofágů), megakaryocyty, granulocyty, dendritické buňky, erytrocyty a žírné buňky. Lymfoidní progenitor dává za vznik NK buňkám a lymfocytům.

Ve vztahu k TT se práce bude dále zaměřovat na makrofágy a jejich markery. Jedná se o buňky schopné fagocytózy. Podílejí se na vychytávání patogenů, odumřelých buněk a remodelaci tkání po zánětu. Makrofágy se diferencují z monocytů při vstupu do tkáně z krevního řečiště v průběhu tzv. diapedézy, ke které v tukové tkáni dochází vlivem nárůstu exprese adhezivních molekul na endotelových buňkách cévních stěn pod vlivem adipokinů. Základní rozdělení makrofágů je dle jejich produkce pro- a proti-zánětlivých faktorů na M1 a M2 (Mosser & Edwards, 2008).

M1 makrofágy označované také jako klasicky aktivované makrofágy jsou charakteristické produkcí prozánětlivých cytokinů (zejména TNF- α , IL-12 a IL-1 β), zvýšenou aktivitou inducibilní syntázy oxidu dusnatého a nízkou sekrecí protizánětlivého cytokinu IL-10. Jejich aktivace je vázána na 2 signály. První signál představuje INF γ , jehož zvýšená koncentrace je v místech zánětu. Druhým signálem je TNF- α přicházející jak z vnějšího prostředí, tak autokrinně působící na M1 makrofágy. Množství M1 makrofágů pozitivně koreluje s množstvím tukové tkáně. U obézních jedinců dochází ke zvýšení objemu (hypertrofii) a počtu tukových buněk, které produkují více exogenního TNF- α (Mosser & Edwards, 2008). Zároveň u adipocytů s překročenou skladovací kapacitou lipidů dochází k apoptóze i nekróze, k uvolnění dalších prozánětlivých faktorů a lipidových působků do extracelulárního prostoru, což zapříčiňuje zvýšenou infiltraci tukové tkáně dalšími M1 makrofágy (Cinti et al, 2005).

M2 makrofágy neboli alternativně aktivované makrofágy jsou typické svou produkcí protizánětlivých molekul. Lze je zjednodušeně rozdělit do tří skupin na makrofágy regulační, s tumorem asociované a makrofágy účastníci se hojících procesů. V patofyziologii obezity a T2DM je množství M2 makrofágů výrazně nižší oproti populaci M1 makrofágů. M1 makrofágy se akumulují v TT obézních jedinců a dochází k nárůstu jejich počtu až na 4 násobek (z 10 % na 40 % buněk vyskytujících se v TT) (Weisberg et al, 2003).

U obézních jedinců se ve zvýšené míře akumulují imunokompetentní buňky v TT (Duffaut et al, 2009). Měření mRNA exprese charakteristických znaků umožňuje určení jejich kvantitativních i kvalitativních změn. Obecně se jedná o antigeny na povrchu imunokompetentních buněk, které interagují s dalšími molekulami, čímž vyvolávají např. sekreci cytokinů nebo zesílení zánětlivé a imunitní odpovědi. Antigeny nesou souhrnný název CD (*cluster of differentiation*) a liší se dle funkce a svého výskytu (Khazen et al, 2005). V této diplomové práci budeme sledovat hodnoty vybraných antigenů vyskytujících

se v zánětlivých reakcích, jejichž exprese je spojena s makrofágy a jejich polarizací. Zařazujeme zde: CD86, CD80, CD40, CD14, CD163 a CD206.

CD14 je užíván jako marker charakteristický pro rozpoznání monocytů a makrofágů. Protein CD14 se vyskytuje volně anebo vázaný glykosylfosfatydilinositolovou kotvou na membráně. Jedná se o koreceptor k Toll-like receptoru 4 sloužící k rozpoznání bakteriálního lipopolysacharidu v komplexu s proteinem vázající lipopolysacharid (Triantafilou & Triantafilou, 2002).

CD40 patří mezi členy rodiny TNF. Jedná se o molekulu exprimovanou na povrchu M1 makrofágů, dendritických buněk či B lymfocytů, na který se váže CD40 ligand neboli CD154 vyskytující se na T lymfocytech. Navázáním se zvýší další exprese CD40 a TNF- α receptorů, čímž se posílí aktivace makrofágů vedoucí k degradaci pohlcených patogenů a jiných toxických molekul (Chatzigeorgiou et al, 2009).

CD80 (B7-1) se vyskytuje na aktivovaných B lymfocytech a makrofázích. Hlavní úlohu má jako kostimulátor aktivace T buněk (Peach et al, 1995). Stejnou funkci má i antigen CD86 (B7-2). Oba kostimulátory se váží na receptory CD28 a cytotoxický T-lymfocytární antigen-4 na T lymfocytech a stejnoměrně zajišťují produkci IL-2 a INF γ podporujícího Th1 fenotyp CD4⁺ lymfocytů. CD86 se indukuje významně vyšší produkci IL-4 oproti CD80 a to převážně u nezralých T lymfocytů (Freeman et al, 1995) (Linsley et al, 1994).

CD206 neboli manózoový receptor se vyskytuje zejména na M2 makrofázích a nezralých dendritických buňkách. V menším množství je produkován i ostatními buňkami jako jsou jaterní či lymfatické endotelové buňky, ale ne monocyty. Klíčovou roli má v udržení homeostázy pomocí endocytózy mikrobiálních glykoproteinů spojených se zánětem (Lee et al, 2002).

CD163 je marker pro M2 makrofágy. Jedná se o receptor vázající komplexy hemoglobinu a haptoglobinu. Výskyt molekuly CD163, jak ve vázané formě na zralých makrofázích, tak rozpustné formy se užívá pro predikci progrese zánětu, přičemž jeho zvýšené hladiny se vyskytují i při T2DM (Moller et al, 2011) a rostou u obézních jedinců (Bauer et al, 2011).

2.3 Obezita

Pro obezitu je charakteristické nahromadění TT za současného nárůstu tělesné hmotnosti. Jedná se o metabolické multifaktoriální onemocnění, u kterého převládá energetický příjem nad energetickým výdejem. Obezita společně s přidruženými onemocněními, jako jsou T2DM, hypertenze, ateroskleróza, vede k nárůstu předčasných úmrtí, kardiovaskulárních či cerebrovaskulárních příhod (Reilly et al, 2003).

Pacienti s obezitou mají také často narušenou i psychickou stránku osobnosti, a to zejména kvůli estetice. Jsou často vyčleňováni, nebo se sami straní kolektivu, jsou hendikepováni v některých fyzických aktivitách, a tímto jsou velmi stresováni. Z vnějších faktorů však právě stres hraje zásadní roli při vzniku obezity. Kromě stresu spolupůsobí i špatný životní styl, nevyvážená, nepravidelná a často nutričně zcela nevhodná strava, omezená fyzická aktivita, sedavé zaměstnání a další okolnosti, které přispívají ke genetickým a metabolickým faktorům až z 50 % (Reilly et al, 2003).

Stále se jako hlavní ukazatel pro stanovení obezity používá tzv. Index tělesné hmotnosti (*Body Mass Index* - BMI), přestože ne zcela přesně vypovídá o tělesných proporcích. Vzorec pro výpočet BMI vztahuje tělesnou hmotnost na výšku těla (váha v kg/výška v m²) a dle hodnoty rozlišujeme nadváhu, 1. stupeň (obezita), 2. stupeň (těžká obezita) a 3. stupeň (excesivní obezita) obezity (*Tab. 1*) (Flegal et al, 1998).

Tab. 1 Kritéria pro stanovení stupně obezity. Zdroj (Češka et al., 2004).

UKAZATEL		NADVÁHA	OBEZITA	TĚŽKÁ OBEZITA	EXCES. OBEZITA
BMI	muži	nad 25	nad 30	nad 35	nad 40
	ženy	nad 25	nad 30	nad 35	nad 40
obvod pasu cm	muži	nad 94	nad 102		
	ženy	nad 80	nad 88		
poměr pas/boky	muži		nad 0,95		
	ženy		nad 0,85		

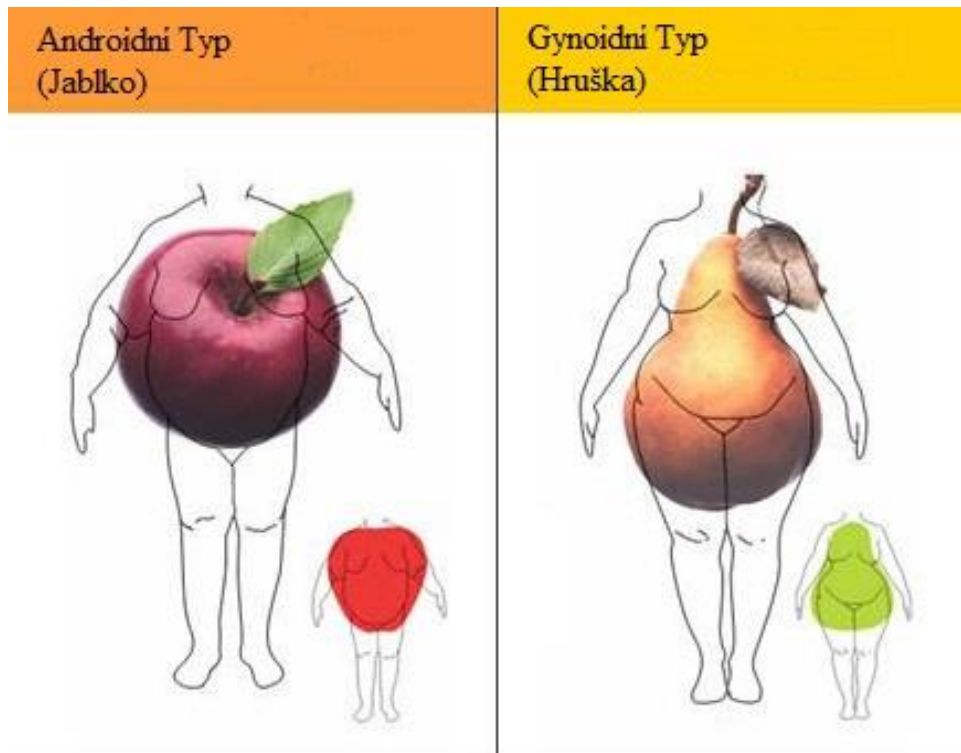
Index tělesné hmotnosti nerozlišuje tukovou a svalovou hmotu, a tak dle tabulek mohou někteří sportovci zapadat do kategorie nadváhy, popřípadě obezity. Dalším kritériem je obvod v pase nebo poměr obvodu pasu a boků (WHR). Množství tukové tkáně se dá také stanovit pomocí antropometrie, měření kožní řasy, bioelektrickou impedancí

(měření odporu těla a stanovení tuku, tukuprosté tkáně a vody v organismu), počítačovou tomografií nebo ultrazvukem (Organization, 2000).

Výskyt obezity rok od roku stoupá a dle studií prováděných WHO v roce 2011 je celosvětový počet obézních již vyšší než 500 milionů. Předpokládá se však, že tento podíl se do roku 2030 až zdvojnásobí. Obsah tukové tkáně v organismu je rozdílný u žen a mužů. Normální obsah tuku v organismu je u mužů do 20 % a u žen do 30 % tělesné hmotnosti (Organization, 2000).

Tuková depa neboli oblasti akumulace tukové tkáně se dělí na nitrobřišní (viscerální) a podkožní (subkutánní). Malá část nadbytečných tukových buněk se ukládá i do orgánů, jako jsou játra či slezina, kde mohou způsobit lokální komplikace. U obézních pacientů je důležitá vždy alespoň malá redukce váhy, neboť jako první vymizí tuk mimo tukovou tkáň (tzv. ektopicky uložený tuk) a sníží se tak riziko poškození orgánů. Podle akumulace tuku rozdělujeme obezitu na androidní a gynoidní (*Obr. 7*). K jejich klasifikaci se používá měření obvodu pasu, popřípadě WHR (*Tab. 1*).

- Androidní obezita se vyskytuje převážně u mužů a je charakteristická postavou ve tvaru „jablka“. Tuk se hromadí více ve viscerální části, která je metabolicky mnohem aktivnější než tuk v podkoží, a proto její přebytek způsobuje metabolické komplikace, rozvoj T2DM a riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění.
- Gynoidní obezita se vyznačuje postavou ve tvaru „hrušky“ s převahou v ženské populaci. Tuk se ukládá z větší části v podkoží v oblasti steh a boků. Podkožní tuk nemá tak výraznou endokrinní aktivitu jako tuk viscerální a jedná se o typ obezity, který je méně metabolicky nebezpečný.



Obr. 7 Androidní a gynoidní typ obezity. Androidní typ obezity je charakteristický postavou tvarem jablka a představuje větší riziko pro rozvoj metabolických komplikací ve srovnání s gynoidním typem obezity Zdroj (převzato z: <http://docplayer.cz/168446-Lidske-telo-se-sklada-z-vody-mineralu-proteinu-a-tuku-celek-ktery-tvori-vahu-u-zdravych-jedincu-je-podil-techto-latek-temer-konstantni-a-muzi.html>).

Prevence obezity je důležitá jak pro estetické, psychické a sociální aspekty ve společnosti, tak k předejití či snížení civilizačních chorob 21. století. Velké dopady má obezita i na ekonomiku, jelikož náklady na léčbu nemocí spojených s obezitou extrémně stoupají. Proto by lepší pochopení funkce TT u obézních jedinců mohlo přispět i k řešení jak předejít, efektivněji léčit nebo zmírnit následky této pandemie (Organization, 2000).

2.3.1 Subklinický zánět

Obezita je spojována s rozvojem systémového zánětu nízkého stupně v organismu neboli tzv. subklinického zánětu. Za hlavní příčinu je považována infiltrace TT makrofágy. Makrofágy v TT produkují řadu prozánětlivých cytokinů, zejména TNF- α , které přímo ovlivňují metabolickou rovnováhu například snížením senzitivity k inzulinu skrze inhibici signalizace inzulinového receptoru či potlačením funkce glukózového transportéru. Zánět dále podporují i samotné adipocyty obézního jedince, které exprimují řadu receptorů reagujících na přítomné cytokiny, spouští signální dráhy pomocí přímých buněčných kontaktů (signalizace skrze receptor CD40) a produkují další prozánětlivé faktory TNF- α ,

IL-6, IL-8, inhibitor aktivátoru plazminogenu 1, MCP-1/ CCL-2, CRP a hormony jako leptin či rezistin. Při nadbytku TT je naopak utlumena sekrece protizánětlivých hormonů jako je adiponektin (Fain et al, 2004).

U obezity dochází k hypertrofii adipocytů. Při překročení jejich skladovací kapacity dochází k jejich nekróze a produkci faktorů, které podporují vcestování další imunokompetentních buněk (převážně makrofágů), vzniká progresivní zánět a přibývá sekrece prozánětlivých faktorů (Oliver et al, 2010). Vztah mezi makrofágy a množstvím tukové tkáně byl prokázán korelacemi s hladinami BMI (Weisberg et al, 2003), stejně tak i větší množství makrofágů bylo nalezeno u obézních pacientů s rozvinutou inzulínovou rezistencí nebo endotelovou dysfunkcí (Apovian et al, 2008).

Výše uvedený vztah potvrdily i studie redukce TT. Při snížení tělesné hmotnosti a navýšení pohybu dochází ke zmírnění systémového zánětu. Došlo k poklesu prozánětlivých markerů zejména CRP, IL-6 a TNF- α (Heilbronn et al, 2001; Nicoletti et al, 2003). Z výsledků vyplývá, že jakékoliv snížení tělesné hmotnosti ať už navozené dietními opatřeními nebo chirurgickým zákrokem vede k vylepšení zánětlivého stavu v organizmu, zvýšení senzitivity k inzulinu a zlepšení kompenzace T2DM.

2.3.2 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom je soubor faktorů zvyšujících riziko kardiovaskulárních onemocnění. Je znám od roku 1988, kdy byl charakterizován profesorem Reavenem jako komplexní choroba současně se vyskytujícími dysregulací: inzulínorezistence, poruchy glukózové tolerance nebo T2DM, hyperinzulinémie, zvýšené lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL – *very low density lipoproteins*), nízké hladiny HDL cholesterolu a esenciální hypertenze (Reaven, 1988).

Diagnostická kritéria Metabolického syndromu se postupně upravovala a v roce 2005 světová i evropská diabetologická federace uvedla za hlavní znak centrální obezitu (obvod pasu u mužů > 94 cm; u žen > 80 cm) a k ní přidružení alespoň dvou z následujících poruch:

- Triacylglyceroly > 1,7 mmol/l nebo specifická léčba zaměřená na snížení TAG
- HDL cholesterol < 0,9 mmol/l u mužů nebo 1,1 mmol/l u žen nebo specifická léčba
- Krevní tlak \geq 130/85 mmHg nebo antihypertenzní léčba
- Glykémie nalačno \geq 5,6 mmol/l nebo diagnostikovaný T2DM

Celosvětová populace nevykazuje stejné tělesné parametry, a tak jsou hodnoty pro různé národnosti jako třeba Asiaty upraveny. Přesná diagnostika je díky mezilidské variabilitě, i na základě výše uvedených kritérií, těžce stanovitelná (Alberti et al, 2009). A proto diagnóza Metabolického syndromu, který nalezneme i pod názvy Reavenův syndrom, Syndrom X nebo civilizační syndrom, není jednoduchá a plně vypovídající.

Problém zvyšujícího se výskytu Metabolického syndromu je celosvětový, a to díky zhoršujícím se návykům životního stylu. Predispozičně je Metabolický syndrom ovlivněn geneticky z 30 % a zbytek se odvíjí od nedodržování zdravé stravy, nízké fyzické aktivity, narušené psychiky či většího množství sedavé práce. Metabolický syndrom má rizikové prozánětlivé, prokolagulační a proaterogenní vlastnosti. Všechny tyto deregulace dále rozvíjí vznik aterosklerózy i riziko trombogeneze, a tím nárůst kardiovaskulárních příhod.

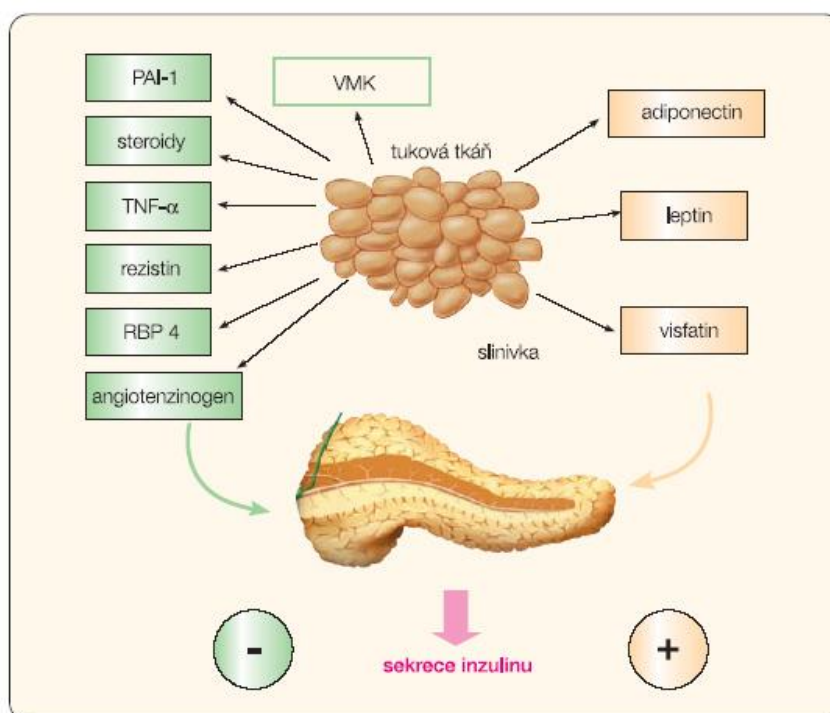
Přestože v nejnovějších kritériích není zahrnut parametr inzulinové rezistence (IR), je z mnoha hledisek považována právě IR za základní patofyziologickou příčinu (Alberti et al, 2009).

2.3.2.1 Inzulinová rezistence

IR nastává v okamžiku, kdy periferní tkáň přestává reagovat na inzulin a je tak narušen vstup glukózy do buněk a její metabolizace. Mezi tkáň citlivé na inzulin patří zejména svaly, játra a tuková tkáň. Zdravá TT štíhlého jedince uchovává energii pro organismus ve formě TAG a při sníženém příjmu potravy štěpí TAG na MK. Při inzulinové rezistenci však TT nereaguje na inzulin a dochází k nadměrné lipolýze, čímž stoupá množství volných MK v organismu. Přebytek volných MK se následně ektopicky ukládá v podobě TAG v jatrní (Banerji et al, 1995) a svalové tkáni (Pan et al, 1997) a zvyšuje rozvoj IR. U svalové tkáň dochází při IR k nízkému příjmu glukózy a játra omezí syntézu glykogenu a naopak produkují více glukózy (Shulman, 2000). Tímto se hladina glukózy v krvi zvyšuje, přičemž organismus reaguje další produkcí inzulinu z Langerhansových buněk pankreatu. Slinivka břišní se postupně vyčerpává, až dojde k redukci produkce inzulinu vedoucímu k rozvoji T2DM (Reaven, 1988).

Příčinou vzniku IR může být zánětlivý stav organismu nebo nadměrný psychický stres. Při obou patofyziologiích dochází ke zvýšené sekreci kortizolu do krve. Hladiny kortizolu snižují vychytávání glukózy z krve do svalové a jatrní tkáň. Odpovědí je pak inzulinová rezistence, při níž rostou hladiny inzulinu a glukózy v krvi (Yan et al, 2016). Z molekulárního pohledu dochází nejčastěji k poruše inzulinové signální kaskády ve

tkáních. Zejména nadbytečná produkce prozánětlivého cytokinu $\text{TNF-}\alpha$ omezuje správné předávání informace z receptoru k vnitřním strukturám buňky (Hotamisligil et al, 1993). Kromě $\text{TNF-}\alpha$ navíc existuje řada dalších molekul ovlivňujících správnou funkčnost inzulínového receptoru (Obr. 8). Hladiny $\text{TNF-}\alpha$ rostou při přemíře nahromaděného viscerálního tuku. Naopak potlačením exprese tohoto cytokinu reagujícího na zánět byla prokázána lepší inzulínová senzitivita (Hotamisligil et al, 1996). Důsledky nadměrné produkce $\text{TNF-}\alpha$ pak jsou rozvoj obezity, T2DM, hypertenze, hyperlipidemie a syndromu polycystických ovarií (Colilla et al, 2001).



Obr. 8 Látky produkované tukovou tkání a jejich vliv na sekreci inzulínu. Tuková tkáň je místem produkce řady faktorů negativně i pozitivně ovlivňujících sekreci inzulínu slinivkou břišní (Pelikánová T., 2006).

2.3.2.2 Diabetes mellitus 2. typu

T2DM je komplexní metabolické onemocnění často doprovázené obezitou. Jedná se o nedostatečnou schopnost organismu využít glukózu na základě relativního až absolutního nedostatku inzulínu. Onemocnění je úzce spojeno s IR a i přesto, že u T2DM jsou β buňky pankreatu z počátku plně funkční a produkují inzulín, tkáně nejsou schopny adekvátně reagovat a glukóza se hromadí volně v krevním řečišti, čímž nastává stav hyperglykemie. β buňky reagují na základě vysokých hladin glukózy zvýšenou produkcí inzulínu až do doby, kdy dojde k jejich vyčerpání a snížení schopnosti produkovat inzulín.

Ve srovnání s diabetes mellitus 1. typu (zánik beta-buněk s následným úplným deficitem inzulínové sekrece), který tvoří asi 5 % všech případů diabetu, je T2DM ve značné převaze a v posledních letech jeho prevalence rapidně stoupá. Prevencí T2DM je udržování tělesné hmotnosti v normě (tj. BMI < 25 kg/m²), aktivní způsob života a zdravý životní styl. Toto onemocnění je léčeno převážně redukcí tělesné hmotnosti a dietním opatřením v kombinaci s farmakologickou léčbou (Mellitus, 2005). V některých případech vede k vyléčení diabetu i chirurgický zákrok tzv. bariatrická operace určená ke snížení hmotnosti. Pacientům po takovémto zákroku se obvykle sníží hladina cukru v krvi efektivněji v porovnání s pacienty léčenými pouze antidiabetiky a jinými léky (Schauer et al, 2012).

Diagnostická kritéria pro T2DM jsou stanoveny dle WHO následovně:

- HbA_{1c} ≥ 48 mmol/l (≥ 6,5 % referenční metoda DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial* (Součást vědecké výzkumné báze Americké diabetologické společnosti))
- Glykémie nalačno ≥ 7,0 mmol/l (po 8 hodinové lačnění)
- Glykémie za 2 hodiny po orálním glukózovém tolerančním testu ≥ 11,1 mmol/l (dle WHO podat 75 g glukózy)
- Náhodná glykémie ≥ 11,1 mmol/l u pacientů s příznaky hyperglykémie (Resnick et al, 2000)

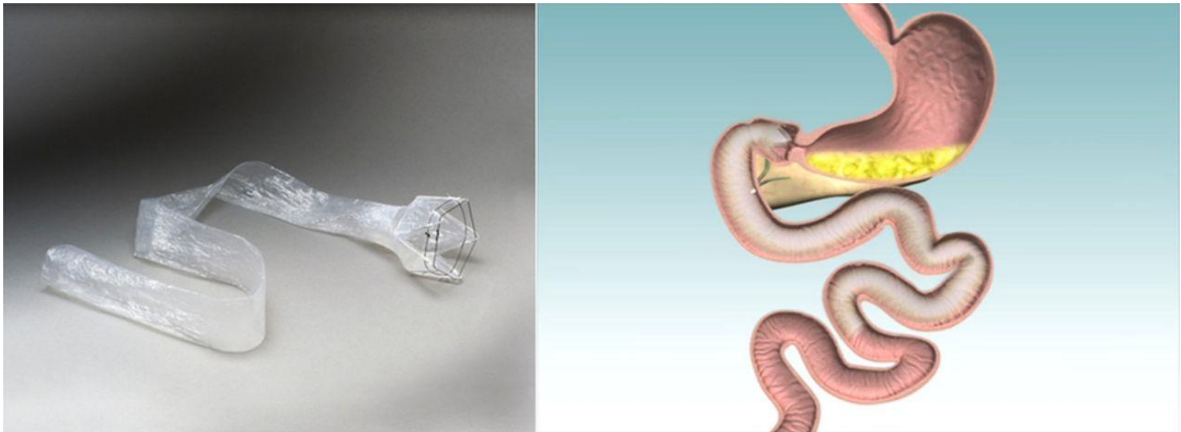
Neléčený T2DM přispívá k rozvoji přidružených onemocnění a negativně ovlivňuje kvalitu i délku života. Vede k projevům kardiovaskulárních onemocnění, mozkových příhod, retinopatií, selháním ledvin či poruchami oběhového systému končících amputacemi (Nathan, 1993)

2.4 Léčba - Duodeno-jejunální rukáv (EndoBarrier)

V léčbě obezity existují různé postupy. Ve většině případů dietní i farmakologické intervence vedou pouze ke krátkodobému zlepšení stavu pacientů. Nejúčinnější postup pro dosažení dlouhodobější redukce tělesné hmotnosti jsou chirurgické bariatrické výkony. Na pomezí konzervativní a chirurgické léčby stojí duodeno-jejunální rukáv (DJBL, Endobarier).

DJBL je bariatrická operace, která napomáhá léčbě obezity a přidružených metabolických komplikací zejména T2DM. Jedná se o endoskopicky proveditelný výkon.

Vlastní rukáv po svém zavedení zasahuje od duodena po proximální část jejunu, kde vytváří bariéru zabráňující přímému kontaktu chymu a stěny střeva. K mísení chymu s pankreatickými šťávami a žlučí tak dochází až za implantátem, což vyúsťuje v praktické vyřazení proximální části tenkého střeva z kontaktu s potravou (*Obr. 9*). Důsledkem je úbytek hmotnosti a zlepšení kompenzace T2DM, jenž je pravděpodobně důsledkem působení střevních hormonů především inkretinů (Patel et al, 2013).



Obr. 9 Duodeno-jejunální rukáv. Vlastní implantát je tvořen 60 cm dlouhým nepropustným fluoropolymerním „rukávem“. DJBL se ukotvuje endoskopicky do duodena, čímž brání přímému kontaktu chymu se střevní výstelkou (Rohde et al, 2013).

3 Cíle diplomové práce

Diplomová práce byla vypracována na pracovišti Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Jedním z hlavních výzkumných témat pracoviště je studium úlohy endokrinní funkce tukové tkáně v patogenezi chronického zánětu u obezity a T2DM.

Hlavním cílem této práce bylo ověřit pomocí vybraných faktorů vliv DJBL na subklinický zánět v tukové tkáni u obezních pacientů s T2DM a zhodnotit do jaké míry přispívá ovlivnění tohoto procesu ke zlepšení inzulinové rezistence a glykemické kompenzace. Získaná data by měla vést k bližšímu porozumění mechanismu vzniku subklinického zánětu v tukové tkáni a jeho přidružených komorbidit. V důsledku by tak měla přispět k lepšímu zacílení prevence a léčby komplikací obezity.

Dílčí úkoly:

Zhodnotit vliv DJBL na antropometrické, biochemické a hormonální parametry.

Stanovit mRNA exprese prozánětlivých a protizánětlivých genů v subkutánní tukové tkáni a zjistit její změny po zavedení rukávu do duodena po měsíci a po deseti měsících.

Ověřit změny populací prozánětlivých M1 a protizánětlivých M2 makrofágů v subkutánní tukové tkáni po DJBL pomocí průtokové cytometrie.

Posoudit, zda je DJBL účinnou metodou pozitivně ovlivňující subklinický zánět obezních pacientů s T2DM.

4 Metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 16 pacientů splňujících podmínky pro endoskopicky implantovaný DJBL (Tab. 2). Jednalo se o 9 mužů a 7 žen s diagnózou T2DM a BMI >30 kg/m². Před vstupem do studie pacienti podepsali informovaný souhlas a studie byla schválena etickou komisí 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Všechny implantace DJBL byly provedeny endoskopy Olympus GIF 190 (Olympus, Tokyo, Japonsko) na rentgenovém sále v nemocnici IKEM Praha. Zákrok je prováděn v celkové anestezii, endoskopicky je implantát zaveden do duodena, odkud je protáhnut a ukotven v proximální části jejunu. V rámci studie byli pacienti vyšetřováni před zákrokem (V1), 1 měsíc (V2) a 10 měsíců po zákroku (V3). Při každé návštěvě byly pacientovi stanoveny antropometrické parametry, odebrána krev pro biochemické a hormonální vyšetření a provedena biopsie podkožní tukové tkáně.

Tab. 2 Kritéria pro zařazení pacientů do studie Endobarrier.

	Zařazující	Vyřazující
1.	T2DM (nejméně rok)	Inkretinová léčba, pacient ve studii min. 3 měsíce bez léčby
2.	Stabilní léčba T2DM (min. 3 měsíce)	Kardiovaskulární příhoda v posledních 6 měsících (kardiovaskulární anamnéza znemožňující vysazení Anopyrinu)
3.	HbA1c > 5,3 % při léčbě	Zhoršená renální funkce: odhad glomerulární filtrace < 0,5 ml/min dle MDRD (<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>)
4.	Věk 18 – 65 let	Závažná hepatopatie
5.	BMI > 30 kg/m ²	Bariatrická operace v anamnéze

4.1 Odběr vzorků

Odběry byly prováděny na III. interní klinice ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze. Odběr vzorků krve probíhal ambulantně za standardních podmínek, tj. nalačno mezi 7. a 8. hodinou ranní. Vzorky krve byly po odběru do 30 min zpracovány centrifugací

(10 min při 1000 x g). Získané vzorky séra a plazmy byly uskladněny v alikvotech při teplotě -80 °C k dalšímu vyšetření.

Tuková tkáň byla odebírána v lokální anestezii z abdominální oblasti a následně byla použita pro izolaci SVF s následným značením na průtokovou cytometrii. Další část TT (asi 100 mg) byla uložena do 1 ml stabilizačního roztoku RNeasy Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Vzorky v stabilizačním mediu byly zamraženy při teplotě -80 °C a použity pro izolaci RNA, reverzní transkripci a stanovení relativní genové exprese pomocí *Real-time* PCR.

4.2 Stanovení hormonálních a biochemických parametrů

Biochemická vyšetření (stanovení glykémie, glykovaného hemoglobinu – HbA1c, HDL cholesterolu, celkového cholesterolu a triacylglycerolů) včetně výpočtu LDL cholesterolu byla provedena na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice. *Homeostasis model assessment* (HOMA) index byl počítán podle standardní rovnice: (sérový inzulin (mIU/l) x glykémie (mmol/l))/22,5.

Sérové hladiny CRP, leptinu, inzulinu a cytokinů byly měřeny komerčními ELISA, RIA a multiplexovými soupravami na pracovišti III. interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice. Koncentrace CRP byla měřena ELISA metodou (Bender Medsystems, Rakousko) s citlivostí 3 pg/ml. Hladiny inzulinu byly detekovány pomocí RIA metody (Cis Bio International, Francie) s citlivostí 2,0 μ IU/ml. Sérové hladiny leptinu byly stanoveny ELISA metodou (Biovendor, Česká Republika) se senzitivitou měření 0,2 ng/ml. Variability v rámci měření i mezi měřeními byly mezi 5,0 a 10,0 %. Hladiny cytokinů (INF γ , IL-10, IL-6, TNF- α) byly měřeny pomocí Milliplex[®] MAP KIT (Merck Millipore, Německo) s citlivostí 0,48-0,94, 0,56-0,93, 0,11-0,17 a 0,16-0,21 pg/ml. Variabilita mezi měřeními i během měření byla v rozmezí <10 a <15%.

4.3 Homogenizace tukové tkáně a izolace mRNA

4.3.1 Princip

TT je homogenizována na přístroji, který za použití homogenizačních kuliček a vhodném prostředí rozruší buňky za uvolnění proteinů a nukleových kyselin. Získaný homogenizát je následně použit pro izolaci RNA. Procesu izolace RNA je rovněž automatizovaný a odehrává se v následujících krocích:

- Vzorčky jsou v izolátoru lyzovány díky lyzačnímu pufru s Protein kinázou K a chaotropními soli.
- Nukleové kyseliny se váží na magnetické kuličky, přičemž dochází k degradaci DNA v přítomnosti DNázy.
- Nenavázané látky (proteiny, zbytky buněk) jsou odstraněny vícenásobným promytím a čistá RNA je uvolněna z magnetických kuliček

4.3.2 Materiál a chemikálie

4.3.2.1 Chemikálie

- Pro čištění nástrojů (pinzeta a nůžky):
 1. Alconox (1 %) (Sigma Aldrich, USA)
 2. 70 % Etanol (50 ml)
 3. 1 % β - merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
 4. ddH₂O (deionizovaná voda)
- MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Roche, Německo); složení: DNáza, lyzační roztok (Tissue Lysis Buffer), zkumavky s víčky, špičky, kazeta pro reakci obsahující suspenzi magnetických kuliček, proteináza K, lyzační pufr, promývací pufr I a II, vazebný pufr

4.3.2.2 Materiál

- Skleněné kádinky (4x 100 ml)
- Váhy (Adam Equipment Co. Ltd., Milton Keynes, U. K.)
- Kovové nůžky a pinzeta
- Vychlazený mrazící blok se stojanem
- Sterilní mikrozkušavky (2,0 ml)
- Sterilní špičky s filtrem (Gilson, USA)
- Pipeta Pipetman® Ultra (Gilson, USA)
- Keramické kuličky (MagNA Lyser Green Beads, Roche, Německo)
- Homogenizátor MagNA Lyser (Roche, Německo)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf AG, Německo)
- Automatický izolátor MagNA Pure Compact (Roche, Německo)
- Stojan na mikrozkušavky

4.3.3 Postup

Do zkumavky s homogenizačními kuličkami umístěnými v chladícím stojánku jsme napipetovali 600 μ l Tissue Lysis Buffer (z RNA Isolation Kit). Nástroje byly pročištěny ve čtyřech kádinkách s čistícími chemikáliemi před každým přendáváním vzorku. Ke kuličkám bylo vždy přidáno přesně odvážené množství TT (tj. 70-90 mg tkáně) a na přístroji MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo) se provedla homogenizace 5500 rpm / 10 s. Následovala centrifugace 13 400 rpm / 10 min a příprava MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics GmbH, Německo) pro izolaci RNA. Dle počtu vzorků byly načteny a vloženy do přístroje komerčně dodávané zásobníky s magnetickými kuličkami a roztoky. Do přístroje jsme dále vložili sterilní špičky a zkumavky: zkumavky s 350 μ l homogenizovaného vzorku, zkumavky s 20 μ l enzymu DNAsy a prázdné popsané zkumavky na vyizolovanou RNA. Na konci procesu bylo vytěženo 50 μ l eluované RNA, ze které odebereme vzorek pro měření koncentrace RNA.

4.4 Měření koncentrace celkové RNA a ověření její kvality

4.4.1 Princip

Koncentrace látek (v tomto případě RNA) je obecně stanovována na základě stanovení absorbance. Roztokem prochází světelné záření a dopadá na detektor, přičemž dochází k absorpci záření o určité vlnové délce. Poměr intenzity záření prošlého a dopadajícího se vyjadřuje jako transmitance, která slouží pro výpočet absorbance (absorbance je záporným logaritmem transmitance). Po získání hodnoty absorbance se na základě jejího vydělení tloušťkou absorpční vrstvy a molárního absorpčního koeficientu získá koncentrace stanovované látky. Kvalita RNA je pak dána poměrem vlnových délek A260 nm/280 nm, měla by se rovnat 2,0.

4.4.2 Materiál a chemikálie

4.4.2.1 Materiál

- NanoPhotometr (Implen, Německo)
- Sterilní špičky (Gilson, USA)
- Pipeta Pipetman® Ultra (Gilson, USA)
- Chladicí stojánek pro mikrozkušavky (Eppendorf AG, Německo)
- Buničina
- ddH₂O – pro stanovení blanku

4.4.3 Postup

NanoPhotometr byl nastaven na měření absorbance při 260 nm. Kalibraci přístroje pro blank jsme provedli pomocí 4 µl ddH₂O. Koncentrace RNA ve vzorku byla měřena jednotlivě vždy v objemu 4 µl. K posouzení čistoty vzorků byl použit poměr A₂₆₀ nm/280 nm. Po změření byly vzorky uloženy při -80 °C.

4.5 Reverzní transkripce (RT – PCR)

4.5.1 Princip

Reverzní transkripce je enzymatická reakce využívající enzym reverzní transkriptázu k přepisu RNA na cDNA („*complementary* DNA“). K přepisu jsou zásadní primery, které nasedají na 3' -poly (A) konec mRNA. Jako primery slouží oligonukleotidy, na které nasedá RNA dependentní DNA polymeráza syntetizující řetězec DNA komplementární s templátovou RNA z volných nukleotidů. Na konci reakce je vysokou teplotou degradována hybridní dvoušroubovice a zůstane volná jednovláknová cDNA.

4.5.2 Materiál a chemikálie

4.5.2.1 Chemikálie

- High Capacity cDNA RT kit (10xRT buffer, 25x dNTP Mix, 10x RT Random primers, MultiScribe Reverse Transcriptase, RNase inhibitor) (Applied Biosystems, CA, USA)
- ddH₂O

4.5.2.2 Materiál

- Laminární box (Thermo Fisher Scientific Inc, USA)
- Ledový stojánek na vzorky + stojánky na přípravu mikrozkuvek
- Sterilní mikrozkuvky (0,5 ml)
- Sterilní zkuvky (1,5 ml)
- Sterilní špičky s filtrem (Gilson, USA)
- Pipeta Pipetman® Ultra (Gilson, USA)
- Vortex (MSE Minishaker, Ika-Works, USA)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf AG, Německo)
- Termocycler (Bio-Rad, USA)

4.5.3 Postup

Práce probíhá vždy v dekontaminovaném laminárním boxu. Vzorky byly přenášeny a udržovány na ledovém bločku. Vstupní množství RNA do reakce je 250 ug pro jednoduchou reakci, resp. 750 ug pro trojitou reakci. RT - PCR jsme provedli v trojnásobném množství. Dle RNA koncentrace bylo spočítáno vstupní množství RNA v mikrolitrech a napipetováno do nadepsaných mikrozkušavek doplněných ddH₂O do celkového objemu 39,6 µl. Podle počtu analyzovaných vzorků jsme připravili zásobní roztok Master mixu s inhibítorem RNázy do 1,5 ml zkumavky (Tab. 3).

Tab. 3 Složení Master mixu s inhibítorem RNázy

Komponenty	Objem (µl)
10x RT buffer	2,0
25x dNTP Mix	0,8
10x RT Random primers	2,0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0
RNase inhibitor	1,0
Celkový objem Master mixu	6,8

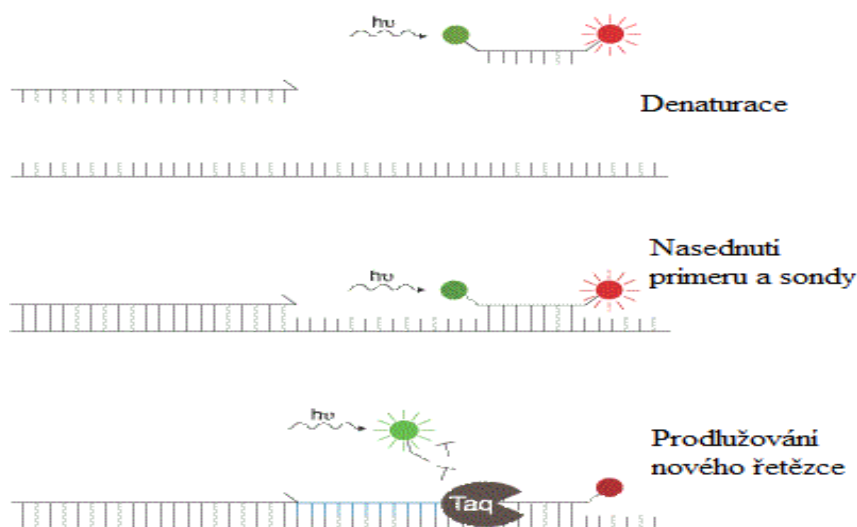
K naředěným vzorkům RNA jsme přidali 20,4 µl Master mixu. Krátce stočili v centrifuze MultiSpin (Eppendorf AG, Německo) v programu 1) stáčení 3500 rpm / 5 s; 2) třepání / 5 s; 3) stáčení 3500 rpm / 5 s. Vzorky byly přeneseny do cycleru (Labcyler, Sensoquest GmbH, Německo) a spuštěn přepis RNA na cDNA v podmínkách: 25 °C/ 10 min. – 37 °C / 120 min. – 85 °C/ 10 min. – 4 °C / ∞. Po reakci byly vzorky skladovány při -20 °C a dále byly použity ke stanovení relativní genové exprese metodou Real-time PCR.

4.6 Real-time PCR

4.6.1 Princip

Kvantitativní Real-time PCR neboli polymerázová řetězová reakce v reálném čase je molekulární metoda umožňující určení relativní míry genové exprese na základě kontinuální detekce fluorescenčního signálu. V reakci jsou použity oligonukleotidové TaqMan® sondy obsahující značení na 5' konci fluochromem (reporter) emitujícím záření o krátké vlnové délce a 3' konci tlumičem (quencher) emitujícím záření o delší vlnové délce. Quencher pro své záření využívá energii světla emitovaného reportérovým fluorochromem a tím jeho záření tlumí. Primery nasedají na komplementární úseky cDNA

a dochází k prodlužování řetězce od primeru až po místo, kde na DNA komplementárně nasedá sonda. Nastává degradace sondy exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy, uvolnění quencheru od reporterového fluorochromu, čímž se fluorochrom dostane z vlivu tlumiče (jehož záření ustane) a začne emitovat záření, které se detekuje (Obr. 10).



Obr. 10 Princip Real time - PCR. TaqMan® sonda pracuje na základě uvolnění quencheru od reporterového fluorochromu a detekce jeho fluorescenčního záření. Primery nasedají na templátovou DNA a polymeráza syntetizuje řetězec. Po dosažení sondy exonukleázová aktivita Tag polymerázy degraduje sondu, je uvolněn reporterový fluorochrom a fluorescence původně absorbovaná quencherem je detekována. Zdroj (převzato z: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimemcr.htm>).

Množství fluorescence je přímo úměrné relativní kvantifikaci vzorku, neboť závisí na specifickém navázání sondy a primerů. Pro správné měření je nutné zachovávat přesné objemy napipetované cDNA a zvolené sondy a primery. Výsledné hodnoty udávají relativní rozdíl v expresi zkoumaného genu a endogenní kontroly.

4.6.2 Materiál a chemikálie

4.6.2.1 Chemikálie

- TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix II, NO AmpErase® UNG (Applied Biosystems, CA, USA)
- TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, USA)
 - ID sond: Hs99999907_m1 (B2M - endogenní kontrola); Hs00605917_m1 (AdipoQ); Hs00234140_m1 (CCL-2);

Hs00169122_g1 (CD 14); Hs00374176_m1 (CD 40);
Hs01045163_m1 (CD 80); Hs01567026_m1 (CD 86);
Hs00174705_m1 (CD 163); Hs00171086_m1 (CX3CL1);
Hs00174131_m1 (IL-6); Hs00174086_m1 (IL-10); Hs00174877_m1
(Leptin); Hs00267207_m1 (MRC1/ CD 206); Hs00159575_m1
(NDUFA2/ CD 14); Hs00174128_m1 (TNF- α)

- Water PCR-Grade „Bioline“ (H₂O) (Fermentas Life Science, Litva)
- cDNA (neředěná nebo 6x ředěná po reverzní transkripci)

4.6.2.2 Materiál

- Optická reakční destička (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate) + optický adhezivní film (MicroAmp Optical Adhesive Film) (Applied biosystems, CA, USA)
- Sterilní mikrozkušavky (0,5 ml)
- Sterilní špičky s filtrem (Gilson, USA)
- Pipeta Pipetman® Ultra (Gilson, USA)
- Automatická opakující pipeta Eppendorf Xplorer® (Eppendorf AG, Německo)
- Třepačka MixMate® (Eppendorf AG, Německo)
- Vortex (MSE Minishaker, Ika-Works, USA)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf AG, Německo)
- Centrifuga Jouan BR4 s adaptérem (Jouan, VA, USA)
- Přístroj 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) + počítač

4.6.3 Postup

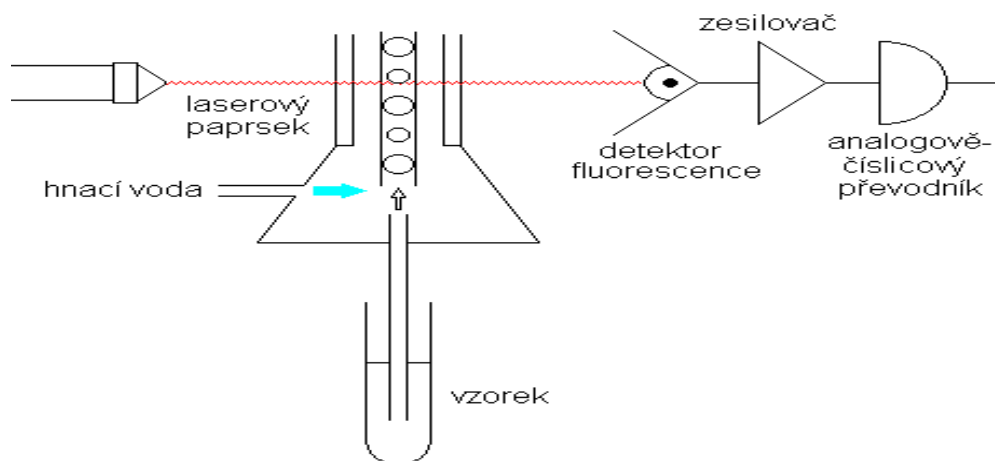
Reakce probíhala v 96 jamkové destičce. Každý gen pro jednotlivé vzorky byl měřen v doubletech. Vzorky cDNA jsme promíchali na třepačce (750 rpm / 1,5 min), stočili (*short spin* do 5 s), případně naředili (standardně 6x) a pipetovali v objemu 2,4 μ l / jamka. Podle počtu vzorků byla naředěna sonda (pro 1 reakci: 10 μ l PCR MasterMixu, 1 μ l příslušné sondy a 6,6 μ l PCR vody), kterou jsme pipetovali v objemu 17,6 μ l / jamka. Připravená destička byla uzavřena adhezivním filmem, centrifugována 1000 rpm / 1 min, protřepána 1500 rpm / 1,5 min a znovu centrifugována 1000 rpm / 1 min. Fluorescence byla detekovaná na analyzátoru 7500 Real Time PCR System přednastavený na teplotní profil:

teplota 95 °C po 10 min, při níž dochází k denaturaci dsDNA a aktivaci DNA polymerázy a 45 cyklů zahrnujících 95 °C po dobu 15 s a 60 °C po dobu 1 min, kdy dochází k opakované denaturaci dsDNA a nasednutí primerů i sondy k ssDNA a prodlužování nově syntetizovaného řetězce. Jako kontrolní gen byl použit gen pro beta-2-mikroglobulin (B2M). Zvýšení fluorescence bylo měřeno v reálném čase a byly zaznamenány prahové cykly (ΔC_T). Hodnoty ΔC_T detekovaného genu byly normalizovány oproti endogenní kontrole B2M a pomocí vzorce $2^{-\Delta\Delta C_T}$ a kalibrátoru (průměrná hodnota ΔC_T všech měření) se stanovila relativní genová exprese určitého genu v daném vzorku.

4.7 Průtoková cytometrie

4.7.1 Princip

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje analýzu buněk či částic na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností. V této práci jsme se zabývali analýzou buněčných populací, jež jsme určovali na základě specifického rozptylu světla (zjištění velikosti a granularity buněk tzn. měření parametrů FSC a SSC) a antigenních struktur za použití specifických fluorescenčně značených protilátek (analýza fluorescenčního signálu). Obecné schéma průtokového cytometru je znázorněno na *Obr. 11*.



Obr. 11 Obecné schéma průtokového cytometru. Principem měření je seskupení buněk do úzkého proudu, ve kterém prochází jednotlivé buňky za sebou. V určitém místě dochází k protnutí proudu laserovým paprskem. Jeho záření je rozptýleno a absorbováno fluorochromem, u něhož dochází k emisi záření. Záření je následně detekováno a převedeno na digitální signál. Zdroj (převzato z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~hroz/s/flowcyt1.htm>).

4.7.2 Materiál a chemikálie

4.7.2.1 Chemikálie

- BSA albumin fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich, USA)
- Kolagenáza VIII z *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich, USA); 125 CDU/mg
- PBS (0.01 M PBS, pH 7.4)
- Excellize 1 (Exbio Praha, a.s., Česká republika)
- Chlazená ddH₂O
- Fluorescenčně značené sondy
 - CD40 FITC (*fluorescein isothiocyanát*), HLA-DR PerCP (*peridinin chlorophyll*) a CD14 APC (*allofykocyanin*) (Exbio Praha, a.s., Česká republika)
 - CD206 PE (*fykoerytrin*) (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Nosná tekutina „*Bacteriostatic concentrate solution*“ (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Čistící roztok „*Cleaning concentrate solution*“ (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Dekontaminační roztok „*Decontamination concentrate solution*“ (Becton, Dickinson and Company, USA)

4.7.2.2 Materiál

- Laminární box (Jouan, VA, USA)
- Třepací vodní lázeň Julabo (Schoeller, Česká republika)
- Sítko
- Sterilní mikrozkuřavky (0,5 ml)
- Sterilní špičky (Gilson, USA)
- Pipeta Pipetman® Ultra (Gilson, USA)
- Centrifuga Jouan BR4 s adaptérem (Jouan, VA, USA)
- Skleněné kádinky (2x 150 ml; 1x 250 ml)
- Kádinka s ledovou tříští
- Sterilní falkonky (50 ml)
- Kovová pinzeta a nůžky
- Filtr (Falcon® 40 µm Cell Strainer, Becton, Dickinson and Company, USA)
- Průtokový cytometr BD Accuri™ C6 (Becton, Dickinson and Company, USA)

- počítač a software CFlow[®] 1.0.227.4 (Becton, Dickinson and Company, USA) a FlowJo X 10.0.7r2 (FlowJo, LCC. USA)

4.7.3 Izolace stromavaskulární frakce ze subkutánní tukové tkáně pro měření na průtokovém cytometru

Čerstvě odebraná tuková tkáň byla rozstříhána a viditelné cévy vyjmuty. Vzorek byl opakovaně promyt v roztoku PBS (0.01 M PBS, pH 7.4) a následně enzymaticky štěpen 0,01 % roztokem kolagenázy s přidavkem albuminu fetálního bovinního séra (4 % roztok) ve vodní lázni po dobu 30 min při 37 °C. Suspenzi jsme přelili přes vyvařené sítko a centrifugovali 1 200 rpm / 12 min / 6 °C. Odsáli jsme adipocyty i supernatant a získanou SVF přenesli do čisté centrifugační zkumavky a doplnili 2 ml PBS. Centrifugovali jsme 1 200 rpm / 12 min / 6 °C. Peletu jsme promývali ještě dvakrát. Při druhém promytí byla rozpuštěná SVF filtrována (Falcon[®] 40 µm Cell Strainer, Becton, Dickinson and Company, USA). Získaná peleta byla rozpuštěna v roztoku PBS.

4.7.3.1 Značení pro průtokový cytometr

Pro jednotlivé značení bylo použito 100 µl suspenze průměrně obsahující 10⁶ buněk, ke kterému bylo přidáno 4-20 µl fluorescenčně značené protilátky. Následovala inkubace 30 min při 2-8 °C ve tmě. Přidali jsme 200 µl Exccellyze 1 a inkubovali 10 min ve tmě při pokojové teplotě. Přidali jsme 1 ml chlazené deionizované H₂O, promíchali a inkubovali 10 min ve tmě při pokojové teplotě. Centrifugace 1 800 rpm / 6 min / 6 °C. Supernatant byl slit, zkumavka osušena a přidali jsme 1 ml PBS na promytí buněk. Opět centrifugace 1 800 rpm / 6 min / 6 °C, slití supernatantu a osušení zkumavky. Nakonec byla peleta resuspendována ve 150 µl PBS a 150 µl Exccellyse1. Takto připravené vzorky byly uchovány při 2-8 °C ve tmě a změřeny do 24 hodin na průtokovém cytometru.

4.7.3.2 Měření na průtokovém cytometru

Spustili jsme průtokový cytometr BD Accuri[™] C6 (Becton, Dickinson and Company, USA), počítač a software CFlow[®] 1.0.227.4 (Becton, Dickinson and Company, USA). Doplnili jsme potřebné roztoky (nosnou tekutinu a čistící a dekontaminační roztok) a propláchli průtokový cytometr ultračistou vodou. Vložili jsme vzorek pod jehlu průtokového cytometru, nastavili měření (tj. měření 50 tis. událostí při nejnižší rychlosti) a spustili. Tento postup byl užit u všech vzorků. Mezi jednotlivými vzorky jsme vždy otřeli jehlu a na konci měření nechali přístroj promýt ultra čistou vodou.

4.7.3.3 Analýza dat z průtokového cytometru

Pro analýzu byla naměřená data z programu CFlow[®] 1.0.227.4 (Becton, Dickinson and Company, USA) vyexportována ve formátu FCS a následně nahrána do programu FlowJo X 10.0.7r2 (FlowJo, LCC. USA). Data byla hodnocena následovně: nejprve byly vyloučeny doublety, dále byly datovány monocyty a makrofágy podle FSC a SSC parametrů a na histogramu určeny HLA-DR+ buňky. Z těchto buněk jsme pak určili CD40+CD14+HLA-DR+ nebo CD206+CD14+HLA-DR+ buněčné populace představující M1, resp. M2 makrofágy. Výsledky jsou uvedené jako procento datovaných monocytů/makrofágů.

4.8 Vyhodnocení výsledků – statistika

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu Sigma Stat 13.0 (SPSS Inc., IL, USA). Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± standardní chyba průměru (SEM). Normalita dat byla posuzována Shapiro-Wilkovým testem. Rozdíly mezi jednotlivými návštěvami byly hodnoceny pomocí metody One way RM ANOVA následované metodou Holm-Sidak nebo Dunnovou metodou. Rozdíly mezi muži a ženami byly hodnoceny pomocí nepárového t-testu či testem Mann-Whitney Rank Sum test dle normality dat. K hodnocení souvislostí mezi mírou genové exprese nebo výsledky průtokové cytometrie s antropometrickými a biochemickými parametry byl využit Pearsonův nebo Spearmanův korelační test. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Antropometrický, biochemický a hormonální profil pacientů

Výsledky antropometrických, biochemických a hormonálních měření obézních pacientů s T2DM, zařazených do studie Endobarrier jsou shrnuta v *Tab. 4*. U pacientů došlo ke snížení tělesné hmotnosti, BMI a zmenšení obvodu pasu jeden měsíc po operaci a tento trend přetrvával i při dalších návštěvách. Stejně tak došlo ke snížení, hladiny glukózy a HbA1c, celkového cholesterolu a LDL cholesterolu vůči bazálním hodnotám. V průběhu studie nebyla zaznamenána změna v koncentraci TAG a HDL cholesterolu, inzulinu a leptinu.

Tab. 4 Antropometrická a biochemická data u obézních pacientů s T2DM před, 1 měsíc a 10 měsíců po zavedení DJBL.

	V1	V2	V3
Počet	16	16	16
Věk (roky)	48,1 ± 2,10	48,1 ± 2,10	48,1 ± 2,10
Hmotnost (kg)	128 ± 5,30	122 ± 5,30¹	118 ± 5,60^{1, 2}
Obvod pasu (cm)	131 ± 2,70	127 ± 2,70¹	123 ± 2,90^{1, 2}
Obvod boků (cm)	132 ± 3,20	129 ± 3,40	126 ± 3,30¹
BMI (kg/m²)	42,2 ± 1,10	40,4 ± 1,20¹	38,5 ± 1,20^{1, 2}
Cholesterol (mmol/l)	4,55 ± 0,21	4,02 ± 0,20¹	4,00 ± 0,21¹
TAG (mmol/l)	2,44 ± 0,50	1,88 ± 0,20	1,73 ± 0,21
HDL (mmol/l)	1,11 ± 0,07	1,02 ± 0,06	1,09 ± 0,08
LDL (mmol/l)	2,83 ± 0,21	2,16 ± 0,18¹	2,24 ± 0,17¹
Glukóza (mmol/l)	12,3 ± 0,90	10,4 ± 0,97¹	8,19 ± 0,62^{1, 2}
HbA1c (mmol/mol)	76,2 ± 5,40	68,2 ± 4,80¹	57,6 ± 3,90^{1, 2}
Inzulin (uIU/ml)	22,0 ± 4,00	17,01 ± 2,90	17,7 ± 3,1
Leptin (ng/ml)	24,0 ± 4,30	18,2 ± 3,20	Dosud neměřeno
HOMA IR	11,5 ± 2,14	7,89 ± 1,46	6,45 ± 1,40¹

Data jsou vyjádřena jako průměr ± střední chyba průměru; V1: před intervencí, V2: 1 měsíc po intervenci, V3: 10 měsíců po intervenci; ¹ p<0,05 vs. V1; One way RM ANOVA; ² p<0,05 vs. V2; One way RM ANOVA;

V Tab. 5 jsou data rozdělena podle pohlaví, na muže a ženy. Rozdíl v parametrech mezi muži a ženami jsme zaznamenali v případě HDL cholesterolu, a to na V1 a V2. V obou odběrech byl HDL cholesterol významně vyšší u žen. Obvod pasu byl naopak u bazálních hodnot žen signifikantně nižší oproti mužům. V ostatních měřených parametrech se muži a ženy nelišily.

Tab. 5 Antropometrická, biochemická a hormonální data rozdělená dle pohlaví.

	Muži			Ženy		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3
Počet	9	9	9	7	7	7
Věk (roky)	49,3 ± 2,20	49,3 ± 2,20	49,3 ± 2,20	46,6 ± 4,10	46,6 ± 4,10	46,6 ± 4,10
Hmotnost (kg)	136 ± 5,60	129 ± 4,90¹	125 ± 5,30^{1, 2}	118 ± 8,80	113 ± 9,90¹	107 ± 9,90^{1, 2}
Obvod pasu (cm)	136 ± 2,10	131 ± 2,40¹	127 ± 2,90¹	125 ± 4,80*	123 ± 5,10	118 ± 5,40¹
Obvod boků (cm)	130 ± 3,90	126 ± 3,90	123 ± 2,50¹	134 ± 5,50	133 ± 6,00	131 ± 6,80
BMI (kg/m²)	43,1 ± 1,30	41,3 ± 1,30¹	39,7 ± 1,30^{1, 2}	41,1 ± 1,90	39,3 ± 2,20¹	37,0 ± 2,30^{1, 2}
Cholesterol (mmol/l)	4,49 ± 0,34	3,96 ± 0,29	3,68 ± 0,26¹	4,61 ± 0,25	4,10 ± 0,26	4,41 ± 0,29
TAG (mmol/l)	3,14 ± 0,82	2,15 ± 0,33	1,81 ± 0,28¹	1,52 ± 0,16	1,53 ± 0,12	1,61 ± 0,35
HDL (mmol/l)	0,94 ± 0,06	0,88 ± 0,04	0,93 ± 0,05	1,33 ± 0,10*	1,19 ± 0,09*	1,29 ± 0,16
LDL (mmol/l)	3,04 ± 0,31	2,10 ± 0,28¹	2,08 ± 0,22¹	2,59 ± 0,25	2,22 ± 0,23	2,41 ± 0,27
Glukóza (mmol/l)	11,6 ± 1,20	10,7 ± 1,50	7,90 ± 0,80	13,2 ± 1,50	10,0 ± 1,20¹	8,40 ± 1,01¹
HbA1c (mmol/mol)	70,6 ± 6,40	62,6 ± 6,00¹	55,5 ± 5,60^{1, 2}	83,4 ± 8,80	75,4 ± 7,30	60,0 ± 5,70^{1, 2}
Inzulin (uIU/ml)	22,4 ± 3,7	17,3 ± 1,6	22,7 ± 3,9	21,6 ± 8,3	16,6 ± 6,6	10,2 ± 3,40
Leptin (ng/ml)	20,3 ± 5,10	13,9 ± 2,80	Dosud neměřeno	28,3 ± 7,37	23,0 ± 5,92	Dosud neměřeno
HOMA IR	10,6 ± 1,08	8,50 ± 1,60	8,10 ± 2,10	12,6 ± 4,90	7,10 ± 2,80	3,90 ± 1,30

Data jsou vyjádřena jako průměr ± střední chyba průměru; V1: před intervencí, V2: 1 měsíc po intervenci, V3: 10 měsíců po intervenci; ¹ p<0,005 vs. V1; One way RM ANOVA; ² p<0,005 vs. V2; One way RM ANOVA; * p<0,005 vs. muži na V1 nebo V2; nepárový t-test

5.2 Sérové hladiny CRP a cytokinů

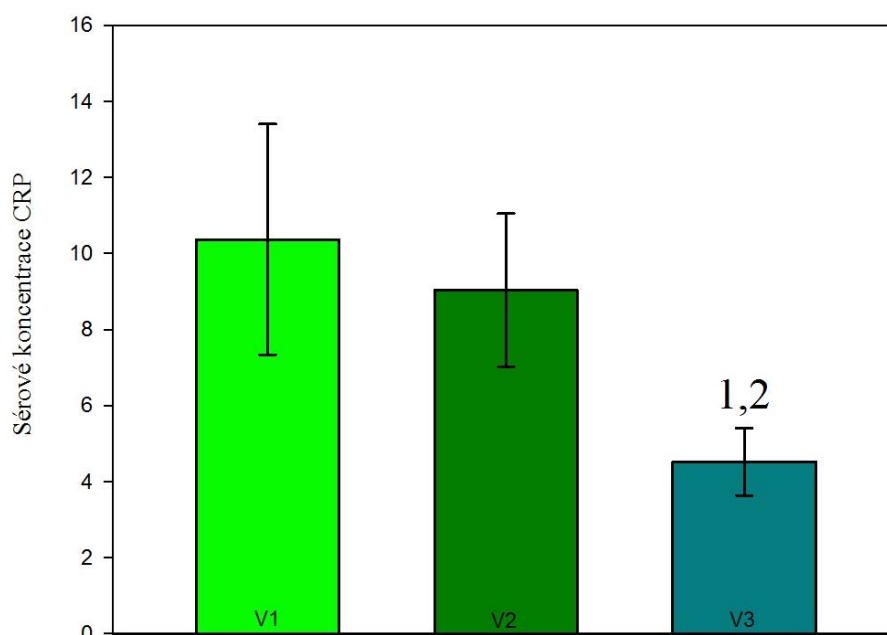
Koncentrace CRP a prozánětlivých, resp. protizánětlivých cytokinů v séru obézních pacientů s T2DM zařazených do studie Endobarrier jsou shrnuta v *Tab. 6*. Sérové hladiny CRP signifikantně klesly 10 měsíců po implantaci DJBL v porovnání s hodnotami zjištěnými před implantací (*Obr. 12*). Sérové koncentrace prozánětlivých cytokinů $\text{INF}\gamma$, IL-6, a $\text{TNF}\alpha$, resp. protizánětlivého cytokinu IL-10 se v rámci probíhající studie neměnily.

Tab. 6 Porovnání sérových hladin CRP a cytokinů $\text{INF}\gamma$, IL-10, IL-6 a $\text{TNF}\alpha$ u obézních pacientů s T2DM před, 1 měsíc a 10 měsíců po zavedení DBLJ.

	V1	V2	V3
Počet	16	16	16
CRP (mg/ml)	4,50 ± 1,20	3,33 ± 0,72	1,91 ± 0,44^{1, 2}
INFγ (pg/ml)	6,17 ± 1,33	8,64 ± 2,17	4,96 ± 1,27
IL-10 (pg/ml)	3,25 ± 0,59	3,75 ± 0,97	2,64 ± 0,44
IL-6 (pg/ml)	1,31 ± 0,24	1,39 ± 0,22	0,97 ± 0,18
TNFα (pg/ml)	2,49 ± 0,25	3,06 ± 0,57	2,38 ± 0,34

Data jsou vyjádřena jako průměr ± střední chyba průměru; V1: před intervencí, V2: 1 měsíc po intervenci, V3: 10 měsíců po intervenci; ¹ $p < 0,05$ vs. V1; One way RM ANOVA; ² $p < 0,05$ vs. V2; One way RM ANOVA

Sérové koncentrace CRP



Obr. 12 Graf znázorňující změny v sérových hladinách CRP u obézních pacientů s T2DM ve studii Endobarrier.

Data jsou vyjádřena jako průměr ± střední chyba průměru; V1: před intervencí, V2: 1 měsíc po intervenci, V3: 10 měsíců po intervenci; ¹ $p < 0,05$ vs. V1; ² $p < 0,05$ vs. V2

5.3 Izolace RNA z tukové tkáně a její koncentrace změřená spektrofotometrem

Pro izolaci RNA bylo použito $73,1 \pm 3,18$ mg tukové tkáně. Průměrná koncentrace vyizolované RNA byla $16,33 \pm 0,68$ $\mu\text{g/ml}$. Průměrná čistota RNA určená z poměru A260/A280 byla $2,032 \pm 0,0155$.

5.4 Reverzní transkripce

Vzhledem k požadavku na stanovení genové exprese byla RT-PCR provedena v trojnásobném množství. Vzorky RNA o nízké koncentraci se neředily, resp. objem vzorků byl upraven na 39,6 μl destilovanou vodou. Master mix s inhibitory RNázy byl připraven dle počtu vzorků a 20,4 μl bylo přidáno k připravené RNA. Celkový objem vzorku byl 60 μl . Pro ověření účinnosti metody RT-PCR byla u vybraných vzorků změřena koncentrace získané cDNA (n=9). Průměrná hodnota byla $1235,3 \pm 3,3$ $\mu\text{g/ml}$.

5.5 Relativní mRNA exprese sledovaných genů v tukové tkáni u obézních pacientů s T2DM

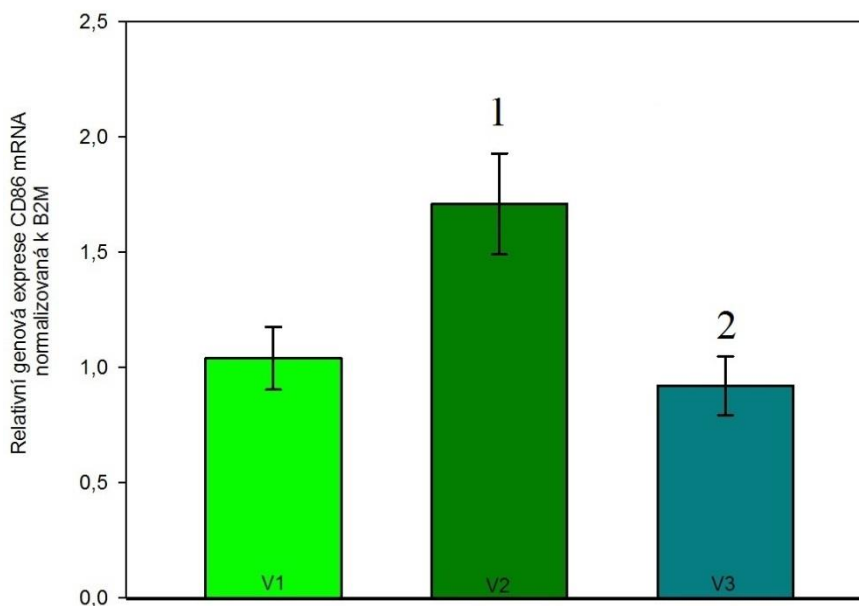
Souhrnné výsledky relativní mRNA exprese sledovaných genů v tukové tkáni u obézních jedinců s T2DM během studie jsou shrnuty v *Tab. 7*. Sledovali jsme mRNA expresi genů pro prozánětlivé i protizánětlivé působky, faktory zodpovědné za vcestování imunokompetentních buněk a jejich markerů. Významné rozdíly v genové expresi jsme zaznamenali u markeru pro M1 makrofágy CD86 (*Obr. 13*). Jeho mRNA exprese se zvýšila bezprostředně 1 měsíc po intervenci oproti hodnotám na počátku studie a 10 měsíců po implantaci se již nelišila v porovnání s V1. Dle získaných dat jsme nezaznamenali žádné další signifikantní změny v mRNA expresi prozánětlivých ani protizánětlivých genů.

Tab. 7 Porovnání relativní genové exprese mRNA sledovaných genů v celkovém subkutánní tukové tkáni u obézních pacientů s T2DM před, 1 měsíc a 10 měsíců po zavedení DJBL. Hodnoty jsou normalizovány k endogenní kontrole B2M.

	V1	V2	V3
Počet	16	16	16
Adiponektin	1,33 ± 0,22	1,13 ± 0,19	1,11 ± 0,17
Leptin	1,96 ± 0,54	1,25 ± 0,28	1,47 ± 0,31
CCL-2	1,77 ± 0,40	1,98 ± 0,63	1,11 ± 0,24
CX3CL1	1,30 ± 0,17	1,46 ± 0,30	1,21 ± 0,32
CD14	1,10 ± 0,16	1,35 ± 0,27	1,37 ± 0,25
CD40	1,14 ± 0,15	1,32 ± 0,25	1,13 ± 0,17
CD163	1,39 ± 0,25	1,38 ± 0,19	0,98 ± 0,16
CD206	1,47 ± 0,26	1,35 ± 0,27	1,07 ± 0,18
CD80	1,42 ± 0,22	1,43 ± 0,27	0,86 ± 0,16
CD86	1,04 ± 0,14	1,71 ± 0,22¹	0,92 ± 0,13²
TNF-α	1,16 ± 0,20	1,97 ± 0,46	1,08 ± 0,23
IL-10	1,04 ± 0,14	1,26 ± 0,21	1,21 ± 0,16
IL-6	1,33 ± 0,24	1,05 ± 0,23	1,26 ± 0,18

Data jsou vyjádřena jako průměr ± střední chyba průměru; V1: před intervencí, V2: 1 měsíc po intervenci, V3: 10 měsíců po intervenci; ¹ p<0,05 vs. V1; One way RM ANOVA; ² p<0,05 vs. V2; One way RM ANOVA

Genová exprese CD86



Obr. 13 Graf znázorňující změny v relativní mRNA expresi CD86 v subkutánní tukové tkáni u obézních pacientů s T2DM ve studii Endobarrier.

Data jsou vyjádřena jako průměr \pm střední chyba průměru; Data jsou normalizována s využitím mRNA exprese beta-2-mikroglobulinu; V1: před intervencí, V2: 1 měsíc po intervenci, V3: 10 měsíců po intervenci; ¹ $p < 0,05$ vs. V1; ² $p < 0,05$ vs. V2

5.6 Změny zastoupení makrofágů v subkutánní tukové tkáni

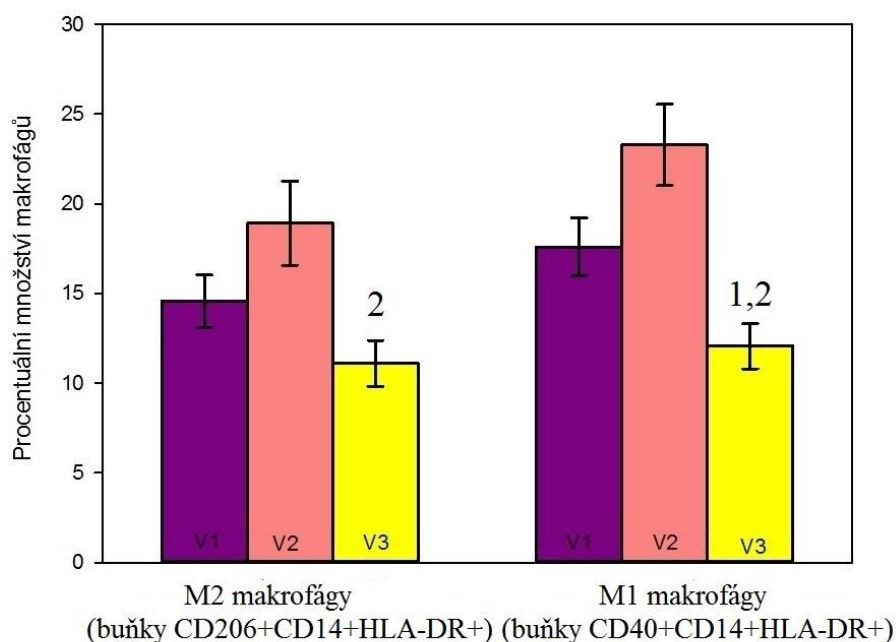
U vybraných pacientů jsme měřili změnu CD40 pozitivních a CD206 pozitivních makrofágů definovaných na základě přítomnosti obecných markerů HLA-DR a CD14 na povrchu buněk metodou průtokové cytometrie. Zaznamenali jsme signifikantní pokles procenta M1 (CD40+CD14+HLA-DR+ buněk) i M2 (CD206+CD14+HLA-DR+ buněk) makrofágů, a to 10 měsíců po implantaci duodeno-jejunálního rukávu (viz Obr. 13). Populace buněk CD206+CD14+HLA-DR+ se snížila ve srovnání s hodnotami 1 měsíc po intervenci. Množství buněk CD40+CD14+HLA-DR+ bylo sníženo nejen oproti procentu M1 makrofágů 1 měsíc po zavedení rukávu, ale i vůči bazálním hodnotám (viz Obr. 14). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8 Výsledky v procentuálním zastoupení populací buněk v porovnání u pacientů během studie.

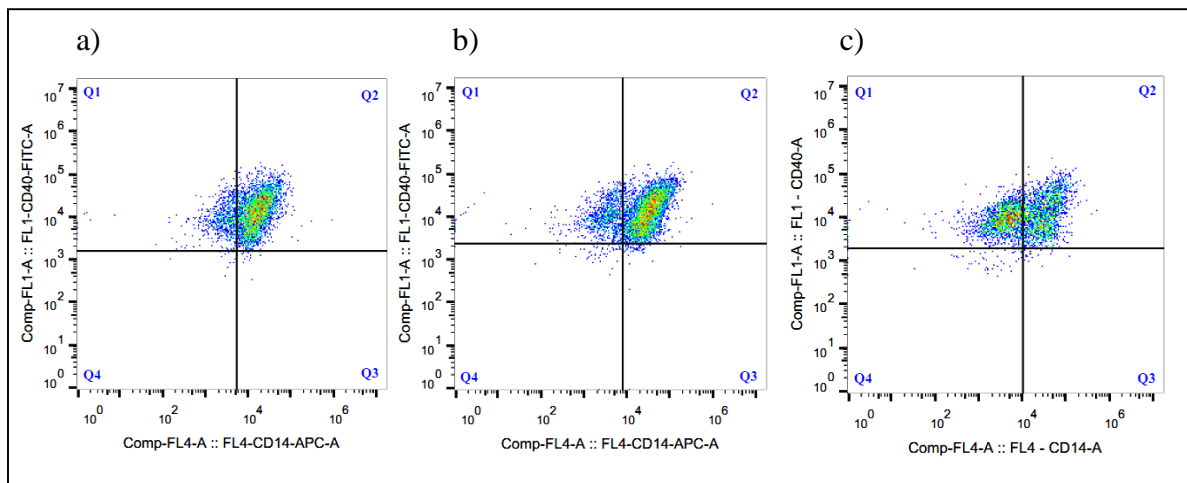
	V1	V2	V3
Počet	10	10	10
CD206+CD14+HLA-DR+ (%)	14,58 ± 1,46	18,91 ± 2,34	11,1 ± 1,29 ²
CD40+CD14+HLA-DR+ (%)	17,60 ± 1,61	23,29 ± 2,27	12,06 ± 1,26 ^{1,2}

Data jsou vyjádřena jako průměr ± střední chyba průměru; V1: před intervencí, V2: 1 měsíc po intervenci, V3: 10 měsíců po intervenci; ¹ p<0,05 vs. V1; One way RM ANOVA; ² p<0,05 vs. V2; One way RM ANOVA

Grafické znázornění procentuálního zastoupení M1 a M2 makrofágů během studie



Obr. 13 Procentuální rozdíly v zastoupení CD206 pozitivních a CD40 pozitivních makrofágů detekovaných dle markerů CD14 a HLA-DR před intervencí (V1), 1 měsíc (V2) a 10 měsíců po intervenci (V3). Data jsou znázorněna jako průměr ± střední chyba průměru. ¹ signifikance p < 0,05 vs. V1; ² signifikance p < 0,05 vs. V2



Obr. 14 Změny CD40+CD14+HLA-DR+ makrofágů v subkutánní tukové tkáni: efekt duodeno-jejunálního rukávu u obézních pacientů s T2DM.

Postup hodnocení: vyloučení doubletů, určení monocytů/makrofágů podle SSC a FSC vlastností, stanovení HLA-DR pozitivních buněk pomocí histogramu a učení buněk vykazujících pozitivitu na CD14 a CD40 (kvadrant Q2). Na obrázku je znázorněn a) bazální stav před intervencí (V1), b) stav 1 měsíc po intervenci (V2) a c) stav 10 měsíců po intervenci (V3).

5.7 Korelace mezi mRNA expresí, procentem detekovaných makrofágů, sérovými hladinami cytokinů a antropometrickými či biochemickými parametry

V rámci diplomové práce jsme analyzovali vzájemné souvislosti mezi hodnotami mRNA exprese sledovaných genů a antropometrickými, resp. biochemickými parametry. Pro analýzu byla využita data kombinovaná z jednotlivých návštěv. U pacientů zařazených do studie pozitivně korelovala hladina TAG s expresemi mRNA chemokinu CCL-2 ($R = 0,398$; $p < 0,01$), markerů pro makrofágy CD163 ($R = 0,302$; $p = 0,044$) a CD206 ($R = 0,427$; $p < 0,01$), leptinu ($R = 0,344$; $p = 0,021$) a IL-10 ($R = 0,466$; $p < 0,01$). Slabou pozitivní korelaci jsme zaznamenali i u koncentrace glukózy s mRNA expresí markeru pro M2 makrofágy CD206 ($R = 0,350$; $p = 0,019$) a CD163 ($R = 0,307$; $p = 0,040$), adiponektinem ($R = 0,307$; $p = 0,041$) a leptinem ($R = 0,361$; $p = 0,015$). Slabší korelaci vykazovaly hladiny HbA1c s mRNA expresí následujících adipokinů: CCL-2 ($R = 0,375$; $p = 0,014$), CD163 ($R = 0,298$; $p = 0,049$), CD206 ($R = 0,358$; $p = 0,017$), CD80 ($R = 0,397$; $p < 0,01$) a adiponektin ($R = 0,395$; $p < 0,01$).

Dále byly prokázány pozitivní asociace mezi sérovými koncentracemi CRP a BMI ($R = 0,325$; $p = 0,024$), koncentrací glukózy ($R = 0,354$; $p = 0,014$) a HbA1c ($R = 0,370$;

$p = 0,011$). Stejně tak i cytokin $\text{INF}\gamma$ pozitivně koreloval s TAG ($R = 0,347$; $p = 0,036$), ale negativně s LDL ($R = -0,431$; $p < 0,01$).

Sledovali jsme rovněž možné korelace mezi procentem buněk v tukové tkáni a biochemickými hodnotami. Středně silné pozitivní asociace vykazoval LDL i HDL cholesterol s procentem M1 ($R = 0,415$; $p = 0,044$; $R = 0,419$; $p = 0,037$) i M2 makrofágů ($R = 0,528$; $p < 0,01$; $R = 0,406$; $p = 0,044$). Pokles procenta M2 makrofágů odpovídal i poklesu HbA1c ($R = 0,487$; $p = 0,014$). Středně silnou negativní korelaci jsme zaznamenali u skupiny buněk CD206+CD14+HLA-DR+ s mRNA expresí IL-10 ($R = -0,512$; $p = 0,011$), stejně tak i u buněk CD40+CD14+HLA-DR+ ($R = -0,61$; $p = 0,002$), která byla zároveň negativně asociována s mRNA expresí CD86 ($R = -0,417$; $p = 0,043$).

6 Diskuze

Obezita je celosvětově šířící se pandemie, která je doprovázena celou řadou metabolických, funkčních i endokrinních komplikací. Při nadbytku tukové tkáně dochází ke změně sekrece adipokinů, což zvyšuje riziko inzulinové rezistence a metabolických poruch včetně T2DM. Obezita je doprovázena vznikem a rozvojem chronického zánětu a dysregulací produkce prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů (Acosta et al, 2014). Vedle zvýšené produkce prozánětlivých působků, které mají vliv na vzestupnou tvorbu imunitních buněk, se další imunokompetentní buňky dostávají do tkáně na základě hypertrofie adipocytů následovanou programovanou buněčnou smrtí (Mraz & Haluzik, 2014a).

Za jednu z mála účinných léčebných metod v léčbě obezity s dlouhodobějšími pozitivními výsledky se považují bariatrické procedury (Karlsson et al, 2007). Bariatrické operace kromě snížení tělesné hmotnosti, značně zlepšují i glukózovou homeostázu a používají se při léčbě T2DM (Sjöström et al, 2004). Mezi metody stojící na pomezí konzervativní a operační léčby patří duodeno-jejunální rukáv, který efektivně působí na redukci tělesné hmotnosti i zlepšení kompenzace diabetu. Jedná se o relativně málo invazivní přístup prováděný endoskopicky, u kterého byl zaznamenán prokazatelný efekt u léčby obezity, T2DM i dalších složek Metabolického syndromu (De Moura et al, 2012; Escalona et al, 2012; Rodriguez et al, 2009) První implantaci DJBL u člověka provedl v roce 2007 Gersin se svým týmem (Gersin et al, 2007) a následně tým Rodriguez-Grunerta L. v roce 2008 poprvé popsal úspěšnou implantaci i vyjmutí rukávu v rámci 12 týdnů u 12 pacientů (Rodriguez-Grunert et al, 2008).

V této studii jsme se zaměřili na změnu endokrinních a metabolických parametrů po zavedení DJBL u 16 pacientů s obezitou 3. stupně a T2DM. Konkrétně jsme posuzovali vliv duodeno - jejunálního rukávu na endokrinní funkci TT a změny v parametrech chronického zánětu u obezity a T2DM. Sledovali jsme antropometrické, biochemické, hormonální parametry, sérové hladiny cytokinů i relativní exprese mRNA či procentuální zastoupení M1 a M2 makrofágů v tukové tkáni před, 1 měsíc a 10 měsíců od zavedení implantátu do duodena.

Zavedení implantátu vedlo v naší studii k výrazné redukci tělesné hmotnosti i BMI. Tyto antropometrické znaky signifikantně klesají i dále s odstupem času od zavedení implantátu. Obdobné výsledky zaznamenala i studie de Jonga z roku 2013 (de Jonge et al,

2013) včetně zlepšení glukózového metabolismu (snížení hladin cirkulující glukózy a Hb1Ac). Stejně jako v de Jongově studii (de Jonge et al, 2013) nedošlo k významné změně hladin inzulínu. Zavedení DJBL snižuje hladiny glukózy u diabetiků, ale není zřejmé, zda dochází k zvýšení inzulínové senzitivity nebo nižší produkci jaterní glukózy. Již z předchozích studií vychází, že DJBL zlepšuje glykemickou kontrolu u obézních pacientů s T2DM (de Moura et al, 2011; Rodriguez et al, 2009).

Výrazný pokles hladin CRP po 10 měsících naznačuje potlačení chronického zánětu u obézních pacientů s T2DM, stejně jako v dříve publikované studii Munoz a Escalona z roku 2014 (Munoz & Escalona, 2014). CRP je zánětlivý marker, jehož zvýšené hodnoty svědčí o zvýšeném riziku kardiovaskulárních onemocnění (Pearson et al, 2003). Redukce objemu tukové tkáně a následný pokles zánětlivých faktorů by tak mohl zlepšit i kardiovaskulární riziko (de Moura et al, 2011). Ze získaných dat lze usuzovat, že na mechanismu metabolických zlepšení po zavedení rukávu, by mohl mít značnou roli i lokální útlum chronického zánětu zejména v tukové tkáni (Ikramuddin & Buchwald, 2011). Naše výsledky ukazují i okamžitý efekt na zlepšení lipidového metabolismu. Redukuje se celkový i LDL cholesterol, avšak žádný rozdíl jsme oproti studii Munoz a Escalona z roku 2014 (Munoz & Escalona, 2014) nezaznamenali v hladinách TAG či HDL cholesterolu.

Zároveň jsme detekovali i utlumení systémového zánětu hodnoceného jako snížení hladin CRP, a to i přesto, že nedošlo k výraznému ovlivnění mRNA exprese prozánětlivých ani protizánětlivých genů v subkutánní tukové tkáni. To by mohlo být vysvětleno faktem, že hlavním místem zánětu je viscerální tuková tkáň (Curat et al, 2006), která byla také viditelně redukována během studie, jak naznačuje významné snížení obvodu pasu a u mužů i obvod boků.

Významnou změnou v mRNA expresi v podkožní tukové tkáni byl významný pokles markeru pro B lymfocyty a M1 makrofágy CD86, jakožto kostimulační a aktivační receptor T lymfocytů (Linsley et al, 1994). Pokles exprese CD86 snižuje množství aktivovaných T lymfocytů a dochází k redukcii v počtu infiltrovaných imunokompetentních buněk. V rámci této diplomové práce jsme se zaměřili na makrofágy, které hrají ústřední roli v progresu subklinického zánětu v tukové tkáni. Významný pokles v subkutánní tukové tkáni jsme zaznamenali v procentuálním zastoupení protizánětlivých M2 (CD206+CD14+HLA-DR+ buněk) makrofágů a prozánětlivých M1 (CD40+CD14+HLA-DR+ buněk) makrofágů po 10 měsících od zavedení implantátu, i přesto že nebyla

ovlivněna přímo mRNA exprese samotných markerů užitých pro identifikaci a zjištění polarizace makrofágů tj. molekul CD206 a CD40. Akumulace makrofágů má silnou vazbu s nadměrným množstvím TT a zvýšenou sekrecí prozánětlivých faktorů, což souvisí s rozvojem systémového zánětu (Weisberg et al, 2003). Z dřívějších publikací je zřejmé, že většina makrofágů v TT pochází z cirkulace mimo TT a infiltruje se díky zvýšenému množství chemokinů a prozánětlivých buněk (Curat et al, 2004; Weisberg et al, 2003). Získané výsledky v poklesu populací makrofágů, tak potvrzují, že DJBL tlumí celkový chronický zánět v organizmu, stejně jako lokální chronický zánět v subkutánní tukové tkáni.

Pokles procenta M2 i M1 makrofágů negativně koreloval s mírným nárůstem IL-10 a dokonce M1 makrofágy vykazují i negativní korelaci s poklesem mRNA exprese CD86, z čehož lze usoudit, že nedochází ke striktní polarizaci fenotypu makrofágů (Bourlier et al, 2008). Makrofágy při nadbytku tukové tkáně s rostoucí progresí zánětu vykazují produkci jak prozánětlivých, tak protizánětlivých faktorů (Zeyda et al, 2007). Pokles lipidů LDL i HDL v naší studii odpovídá poklesu jak procenta prozánětlivých tak protizánětlivých makrofágů. Zdá se tedy, že fenotypy makrofágů nejsou pevně dané a můžou měnit polarizaci během změny diety, léků či dalších možností úpravy množství tukové tkáně jako je např. duodeno-jejunální rukáv (Mraz & Haluzik, 2014b).

Sérové hladiny cytokinů $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-10 a IL-6 nevykázaly během studie žádné signifikantní změny. Vložení rukávu do duodena nemělo vliv na cirkulující prozánětlivé faktory ($\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ a IL-6), které 1 měsíc po implantaci dokonce mírně rostly oproti bazálním hodnotám a k poklesu došlo opět po 10 měsících stejně jako u studie De Jonga z roku 2014 (de Jonge et al, 2014). Nedošlo ani ke změně koncentrací IL-10 s protizánětlivými účinky. To odpovídá i nesignifikantním změnám v mRNA expresi vybraných cytokinů. Protizánětlivý cytokin IL-10 má efekt na vaskulární systém, tlumí zánět díky redukující produkci prozánětlivých cytokinů. Jeho vzrůstající hladiny byly zjištěny u obézních jedinců a nízká koncentrace je spojována s Metabolickým syndromem bez vlivu tělesné hmotnosti (Esposito et al, 2003). Přestože mRNA exprese IL-10 lehce vzrostla na rozdíl od jeho sérových hodnot, ani v jednom případě jsme nezaznamenali žádný vliv implantace DJBL na tento cytokin. Na druhou stranu i to, že nedošlo k poklesu jeho cirkulujících hladin i mRNA exprese, může pozitivně ovlivňovat průběh zánětu zvláště v tukové tkáni, kde může přispívat k M2 polarizaci makrofágů (Mantovani et al,

2002) či Th2 i T regulačních lymfocytů (Feuerer et al, 2009) a hrát roli v obnovení homeostázy tukové tkáně.

Jak již bylo zmíněno ve výsledcích studie, našli jsme některé významné interakce mezi antropometrickými, resp. biochemickými parametry a sérovými koncentracemi určitých působků. Pozitivně korelovala hladina CRP v séru s BMI, koncentrací glukózy a HbA1c. Při snížení indexu tělesné hmotnosti, tak dochází ke snižování chronického zánětu a dále ze zjištěných korelací vyplývá, že systémový zánět je úzce provázán s glukózovým metabolismem. Naopak jsme našli pozitivní korelaci mezi HbA1c a počtem M2 makrofágů a negativní korelaci počtu všech makrofágů s expresí IL-10, což v obou případech opět potvrzuje, že polarizace makrofágů je proměnná a zásadní je zejména jejich celkový pokles v subkutánní tukové tkáni.

V porovnání s výsledky z jiné bariatrické studie (laparoskopické sleeve gastrektomie) publikované v roce 2014 Trachtou a spoluautory (Trachta et al, 2014), je patrné, že ke změně exprese mRNA prozánětlivých markerů může docházet až po delším časovém horizontu 12-24 měsíců po bariatrické intervenci. Přestože naše studie byla limitována počtem probandů a časovou osou mezi prvním a posledním měřením, je DJBL prokazatelně přínosný pro obézní pacienty s T2DM, jímž dle výsledků signifikantně mění tělesnou hmotnost, obvod pasu i boků, BMI, hladiny lipidů, koncentraci glukózy a HbA1c, čímž zlepšuje glukózovou homeostázu a inzulinovou senzitivitu. Naše výsledky jsou v soulase i s dalšími publikacemi (de Moura et al, 2011), které řadí proceduru DJBL jako možnou, méně invazivní techniku vedle bariatrických operací.

7 Závěr

V této práci jsme sledovaly změny endokrinní funkce a další charakteristiky tukové tkáně u obézních pacientů s T2DM. Výsledky vycházejí ze studie Endobarrier, během které byl pacientům zaveden DJBL do duodena. Hodnotili jsme změnu exprese mRNA v subkutánní tukové tkáni pomocí metody Real-Time PCR, v kontextu změn sérových hladin vybraných adipokinů před, 1 měsíc a 10 měsíců po implantaci. Pro širší vyhodnocení a vliv této studie jsme porovnávali i antropometrické a biochemické změny, sérové hladiny prozánětlivých $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, CRP a protizánětlivých IL-10 cytokinů a procentuální rozdíly v zastoupení subpopulací M1 a M2 makrofágů.

Mezi zkoumané mRNA exprese genů jsme zařadili protizánětlivé cytokiny (IL-10), prozánětlivé cytokiny ($\text{TNF-}\alpha$, IL-6), chemokiny (CCL-2, CX3CL1), markery pro makrofágy (CD14, CD40, CD80, CD86, CD163 a CD206), hormony produkované převážně adipocyty - prozánětlivý leptin a protizánětlivý adiponektin. Sledovali jsme i změny v zastoupení prozánětlivých (CD40+CD14+HLA-DR+ buněk) a protizánětlivých (CD206+CD14+HLA-DR+ buněk) makrofágů ve stromavaskulární frakci v subkutánní tukové tkáni.

Ze získaných výsledků je patrné, že duodeno-jejunální rukáv má významný pozitivní vliv na redukci tělesné hmotnosti, lipidový a glukózový metabolismus u obézních pacientů s T2DM. Zavedení rukávu tlumí systémový zánět, měřený jako snížení hladiny CRP a pokles procentuálního zastoupení makrofágů v subkutánní tukové tkáni. Z exprese sledovaných genů TT došlo ke změnám markeru pro makrofágy CD86. Výsledky této práce ukazují, že DJBL je vhodnou a účinnou metodou v léčbě obezity vyššího stupně a T2DM a do budoucna by další studium mechanismů působení DJBL mohlo přinést nové poznatky při léčbě těchto metabolických poruch.

8 Literatura

Acosta A, Abu Dayyeh BK, Port JD, Camilleri M (2014) Recent advances in clinical practice challenges and opportunities in the management of obesity. *Gut* **63**: 687-695

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **382**: 250-252

Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T (1990) Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **4**: 2860-2867

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr., International Diabetes Federation Task Force on E, Prevention, National Heart L, Blood I, American Heart A, World Heart F, International Atherosclerosis S, International Association for the Study of O (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**: 1640-1645

Altarejos JY, Montminy M (2011) CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 141-151

Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, McDonnell M, Hess D, Joseph L, Gokce N (2008) Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**: 1654-1659

Arai T, Hiromatsu K, Nishimura H, Kimura Y, Kobayashi N, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y (1995) Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during Salmonella infection. *Biochemical and biophysical research communications* **213**: 600-607

Arner P (1997) Regional adiposity in man. *The Journal of endocrinology* **155**: 191-192

Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* **394**: 790-793

Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V, Kenny CD, McGovern RA, Chua SC, Jr., Elmquist JK, Lowell BB (2004) Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* **42**: 983-991

- Banerji MA, Buckley MC, Chaiken RL, Gordon D, Lebovitz HE, Kral JG (1995) Liver fat, serum triglycerides and visceral adipose tissue in insulin-sensitive and insulin-resistant black men with NIDDM. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **19**: 846-850
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B (2006) Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European cytokine network* **17**: 4-12
- Bauer S, Weiss TS, Wiest R, Schacherer D, Hellerbrand C, Farkas S, Scherer MN, Ritter M, Schmitz G, Schaffler A, Buechler C (2011) Soluble CD163 is not increased in visceral fat and steatotic liver and is even suppressed by free fatty acids in vitro. *Experimental and molecular pathology* **91**: 733-739
- Baumann H, Gauldie J (1994) The acute phase response. *Immunology today* **15**: 74-80
- Berry DC, Stenesen D, Zeve D, Graff JM (2013) The developmental origins of adipose tissue. *Development* **140**: 3939-3949
- Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumie A (2008) Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* **117**: 806-815
- Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA (1994) Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 3652-3656
- Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Ramirez B, Rotellar F, Pastor C, Silva C, Rodriguez A, Gil MJ, Cienfuegos JA, Fruhbeck G (2007) Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. *Obesity surgery* **17**: 1464-1474
- Ceddia RB (2005) Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *International journal of obesity* **29**: 1175-1183
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research* **46**: 2347-2355
- Colilla S, Cox NJ, Ehrmann DA (2001) Heritability of insulin secretion and insulin action in women with polycystic ovary syndrome and their first degree relatives. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**: 2027-2031

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine* **334**: 292-295

Coppack SW (2001) Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *The Proceedings of the Nutrition Society* **60**: 349-356

Coppack SW, Jensen MD, Miles JM (1994) In vivo regulation of lipolysis in humans. *Journal of lipid research* **35**: 177-193

Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumié A (2004) From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* **53**: 1285-1292

Curat CA, Wegner V, Sengenés C, Miranville A, Tonus C, Busse R, Bouloumié A (2006) Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* **49**: 744-747

de Jonge C, Rensen SS, D'Agnolo HM, Bouvy ND, Buurman WA, Greve JWM (2014) Six months of treatment with the endoscopic duodenal-jejunal bypass liner does not lead to decreased systemic inflammation in obese patients with type 2 diabetes. *Obesity surgery* **24**: 337-341

de Jonge C, Rensen SS, Verdam FJ, Vincent RP, Bloom SR, Buurman WA, Le Roux CW, Schaper NC, Bouvy ND, Greve JWM (2013) Endoscopic duodenal-jejunal bypass liner rapidly improves type 2 diabetes. *Obesity surgery* **23**: 1354-1360

De Moura EG, Martins BC, Lopes GS, Orso IR, de Oliveira SL, Galvão Neto MP, Santo MA, Sakai P, Ramos AC, Garrido Júnior AB (2012) Metabolic improvements in obese type 2 diabetes subjects implanted for 1 year with an endoscopically deployed duodenal-jejunal bypass liner. *Diabetes technology & therapeutics* **14**: 183-189

de Moura EG, Orso IR, Martins BC, Lopes GS, de Oliveira SL, Galvao-Neto Mdos P, Mancini MC, Santo MA, Sakai P, Ramos AC, Garrido-Junior AB, Halpern A, Ceconello I (2011) Improvement of insulin resistance and reduction of cardiovascular risk among obese patients with type 2 diabetes with the duodenojejunal bypass liner. *Obesity surgery* **21**: 941-947

Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS (1999) The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **19**: 563-573

Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A (2009) Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochemical and biophysical research communications* **384**: 482-485

Escalona A, Pimentel F, Sharp A, Becerra P, Slako M, Turiel D, Munoz R, Bambs C, Guzmán S, Ibáñez L (2012) Weight loss and metabolic improvement in morbidly obese subjects implanted for 1 year with an endoscopic duodenal-jejunal bypass liner. *Annals of surgery* **255**: 1080-1085

Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D (2003) Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**: 1055-1058

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**: 2273-2282

Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM (1997) Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 7001-7005

Feingold KR, Soued M, Staprans I, Gavin LA, Donahue ME, Huang BJ, Moser AH, Gulli R, Grunfeld C (1989) Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia. *The Journal of clinical investigation* **83**: 1116-1121

Feurerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S (2009) Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine* **15**: 930-939

Fioranelli M, Grazia RM (2014) Twenty-five years of studies and trials for the therapeutic application of IL-10 immunomodulating properties. From high doses administration to low dose medicine new paradigm.

Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL (1998) Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **22**: 39-47

Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, Bernstein GM, Ke X-Y, Rennert PD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM (1995) B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* **2**: 523-532

Fruebis J, Tsao T-S, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MRS, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF (2001) Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 2005-2010

Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, Bacon KB, Zerwes H-G, Feng L (2000) NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. *Journal of leukocyte biology* **67**: 577-584

Gersin KS, Keller JE, Stefanidis D, Simms CS, Abraham DD, Deal SE, Kuwada TS, Heniford BT (2007) Duodenal—Jejunal Bypass Sleeve: A Totally Endoscopic Device for the Treatment of Morbid Obesity. *Surgical innovation* **14**: 275-278

Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, National Heart L, Blood I, American Heart A (2004) Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**: e13-18

Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* **29**: 2959-2971

Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, Kadowaki T (2006) Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes care* **29**: 1357-1362

Havel PJ (2002) Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Current opinion in lipidology* **13**: 51-59

Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM (2001) Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21**: 968-970

Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* **334 (Pt 2)**: 297-314

Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG (1997) Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11073-11078

Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA (2000) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annual review of nutrition* **20**: 365-393

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**: 665-668

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

Huang L, Wang Z, Li C (2001) Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *The Journal of biological chemistry* **276**: 6343-6349

Hube F, Hauner H (1999) The role of TNF- α in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **31**: 626-631

Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR (2003) Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes care* **26**: 2442-2450

Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E (2009) CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *BioFactors* **35**: 474-483

Ikramuddin S, Buchwald H (2011) How bariatric and metabolic operations control metabolic syndrome. *The British journal of surgery* **98**: 1339-1341

Jones BA, Beamer M, Ahmed S (2010) Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Molecular interventions* **10**: 263

Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, Kim SM, Lee SY, Ahn SM, Kim YK, Kim HJ, Kim DJ, Lee KW (2008) Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *The Journal of nutritional biochemistry* **19**: 371-375

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **149**: 1-38

Karlsson J, Taft C, Ryden A, Sjostrom L, Sullivan M (2007) Ten-year trends in health-related quality of life after surgical and conventional treatment for severe obesity: the SOS intervention study. *International journal of obesity* **31**: 1248-1261

Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**: 2548-2556

Khazen W, M'Bika J P, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A, Forest C (2005) Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS letters* **579**: 5631-5634

Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T (2005) Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* **54 Suppl 2**: S114-124

Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Wilhelmsen L, Bjorntorp P, Tibblin G (1984) Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *British medical journal* **288**: 1401-1404

Lean ME, Jennings G (1989) Brown adipose tissue activity in pyrexial cases of cot death. *Journal of clinical pathology* **42**: 1153-1156

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**: 632-635

Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, Risteli L, Lee YC, Feizi T, Langen H, Nussenzweig MC (2002) Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* **295**: 1898-1901

Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R (1994) Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* **1**: 793-801

Maffei M, Stoffel M, Barone M, Moon B, Dammerman M, Ravussin E, Bogardus C, Ludwig DS, Flier JS, Talley M, et al. (1996) Absence of mutations in the human OB gene in obese/diabetic subjects. *Diabetes* **45**: 679-682

Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggin E, Leseche G, Tedgui A (1999) Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **19**: 611-616

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* **23**: 549-555

- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA (2002) Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **26**: 1407-1433
- Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**: 428-435
- Mellitus D (2005) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* **28**: S37
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **82**: 4196-4200
- Moller HJ, Frikke-Schmidt R, Moestrup SK, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A (2011) Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clinical chemistry* **57**: 291-297
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* **8**: 958-969
- Mosser DM, Zhang X (2008) Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological reviews* **226**: 205-218
- Mraz M, Haluzik M (2014a) The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *The Journal of endocrinology* **222**: R113-127
- Mraz M, Haluzik M (2014b) The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *Journal of Endocrinology* **222**: R113-R127
- Munoz R, Escalona A (2014) Duodenal-jejunal bypass liner to treat type 2 diabetes mellitus in morbidly obese patients. *Current cardiology reports* **16**: 454
- Murray PJ (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of immunology* **178**: 2623-2629
- Nathan DM (1993) Long-term complications of diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* **328**: 1676-1685
- Nedergaard J, Cannon B (2013a) How brown is brown fat? It depends where you look. *Nature medicine* **19**: 540-541
- Nedergaard J, Cannon B (2013b) UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochimica et biophysica acta* **1831**: 943-949

Nicoletti G, Giugliano G, Pontillo A, Cioffi M, D'Andrea F, Giugliano D, Esposito K (2003) Effect of a multidisciplinary program of weight reduction on endothelial functions in obese women. *Journal of endocrinological investigation* **26**: RC5-8

Oliver E, McGillicuddy F, Phillips C, Toomey S, Roche HM (2010) The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. *The Proceedings of the Nutrition Society* **69**: 232-243

Organization WH (2000) *Obesity: preventing and managing the global epidemic*: World Health Organization.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews Immunology* **11**: 85-97

Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH (1997) Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* **46**: 983-988

Patel SR, Hakim D, Mason J, Hakim N (2013) The duodenal-jejunal bypass sleeve (EndoBarrier Gastrointestinal Liner) for weight loss and treatment of type 2 diabetes. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery* **9**: 482-484

Peach RJ, Bajorath J, Naemura J, Leytze G, Greene J, Aruffo A, Linsley PS (1995) Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *The Journal of biological chemistry* **270**: 21181-21187

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Jr., Taubert K, Tracy RP, Vinicor F, Centers for Disease C, Prevention, American Heart A (2003) Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* **107**: 499-511

Pinderski LJ, Fischbein MP, Subbanagounder G, Fishbein MC, Kubo N, Cheroutre H, Curtiss LK, Berliner JA, Boisvert WA (2002) Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Circulation research* **90**: 1064-1071

Pykalisto OJ, Smith PH, Brunzell JD (1975) Determinants of human adipose tissue lipoprotein lipase. Effect of diabetes and obesity on basal- and diet-induced activity. *The Journal of clinical investigation* **56**: 1108-1117

Reaven GM (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**: 1595-1607

Reilly JJ, Methven E, McDowell ZC, Hacking B, Alexander D, Stewart L, Kelnar CJ (2003) Health consequences of obesity. *Archives of disease in childhood* **88**: 748-752

Resnick HE, Harris MI, Brock DB, Harris TB (2000) American Diabetes Association diabetes diagnostic criteria, advancing age, and cardiovascular disease risk profiles: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes care* **23**: 176-180

Rodriguez-Grunert L, Galvao Neto MP, Alamo M, Ramos AC, Baez PB, Tarnoff M (2008) First human experience with endoscopically delivered and retrieved duodenal-jejunal bypass sleeve. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery* **4**: 55-59

Rodriguez L, Reyes E, Fagalde P, Oltra MS, Saba J, Aylwin CG, Prieto C, Ramos A, Galvao M, Gersin KS (2009) Pilot clinical study of an endoscopic, removable duodenal-jejunal bypass liner for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes technology & therapeutics* **11**: 725-732

Rohde U, Hedback N, Gluud LL, Vilsboll T, Knop FK (2013) Effect of the EndoBarrier Gastrointestinal Liner on obesity and type 2 diabetes: protocol for systematic review and meta-analysis of clinical studies. *BMJ open* **3**: e003417

Rothwell NJ, Stock MJ (1997) A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Obesity research* **5**: 650-656

Sakurada T, Noma A (1981) Subcellular localization and some properties of monoacylglycerol lipase in rat adipocytes. *Journal of biochemistry* **90**: 1413-1419

Sell H, Dietze-Schroeder D, Kaiser U, Eckel J (2006) Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle. *Endocrinology* **147**: 2458-2467

Shimada K, Miyazaki T, Daida H (2004) Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **344**: 1-12

Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **106**: 171-176

Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, Thomas S, Abood B, Nissen SE, Bhatt DL (2012) Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *The New England journal of medicine* **366**: 1567-1576

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **270**: 26746-26749

Schrauwen P, Hesselink MK (2004) Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* **53**: 1412-1417

Sjöström L, Lindroos A-K, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjöström CD (2004) Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *New England Journal of Medicine* **351**: 2683-2693

Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z, Keller ET (2001) Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine & growth factor reviews* **12**: 33-40

Stenlof K, Wernstedt I, Fjallman T, Wallenius V, Wallenius K, Jansson JO (2003) Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**: 4379-4383

Trachta P, Dostalova I, Haluzikova D, Kasalicky M, Kavalkova P, Drapalova J, Urbanova M, Lacinova Z, Mraz M, Haluzik M (2014) Laparoscopic sleeve gastrectomy ameliorates mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue but not in peripheral monocytes of obese patients. *Molecular and cellular endocrinology* **383**: 96-102

Trayhurn P, Beattie JH (2001) Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *The Proceedings of the Nutrition Society* **60**: 329-339

Triantafilou M, Triantafilou K (2002) Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in immunology* **23**: 301-304

Vernooy JH, Drummen NE, van Suylen RJ, Cloots RH, Moller GM, Bracke KR, Zuyderduyn S, Dentener MA, Brusselle GG, Hiemstra PS, Wouters EF (2009) Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers. *Thorax* **64**: 26-32

Wajchenberg BL (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine reviews* **21**: 697-738

Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T (2003) Impaired multimerization of human

adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *The Journal of biological chemistry* **278**: 40352-40363

Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM (1995) Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **270**: 9558-9563

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* **112**: 1796-1808

Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A (1997) Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* **349**: 1912-1913

Wiesner G, Vaz M, Collier G, Seals D, Kaye D, Jennings G, Lambert G, Wilkinson D, Esler M (1999) Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **84**: 2270-2274

Xie G, Yao Q, Liu Y, Du S, Liu A, Guo Z, Sun A, Ruan J, Chen L, Ye C, Yuan Y (2012) IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *International journal of oncology* **40**: 1171-1179

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK (1998) IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation* **101**: 311-320

Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, Wang JM (1996) Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *Journal of leukocyte biology* **60**: 365-371

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423**: 762-769

Yan YX, Xiao HB, Wang SS, Zhao J, He Y, Wang W, Dong J (2016) Investigation of the Relationship Between Chronic Stress and Insulin Resistance in a Chinese Population. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association*

Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Gyori G, Zlabinger GJ, Stulnig TM (2007) Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but

capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *International journal of obesity* **31**: 1420-1428

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**: 1383-1386

Elektronické zdroje

Češka, R., Štulc, T., Býma, S., Karen, I., Seifert, B. & Herber, O. (2004) Dyslipidémie. *Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP*. [online]. [cit. 2015-12-22]. Dostupné z: <http://www.svl.cz/files/files/Doporucene-postupy-2003-2007/Dyslipidemie.pdf>

Lidské tělo se skládá z vody, minerálů, proteinů a tuků, celek, který tvoří váhu. U zdravých jedinců je podíl těchto látek téměř konstantní a muži. *Docplayer* [online]. [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/168446-Lidske-telo-se-sklada-z-vody-mineralu-proteinu-a-tuku-celek-ktery-tvori-vahu-u-zdravych-jedincu-je-podil-techto-latek-temer-konstantni-a-muzi.html>

Pelikánová, Terezie. (2006) Metabolický syndrom a hyperglykémie. *Remedia* [online]. [cit. 2015-11-29]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Metabolicky-syndrom-a-hyperglykemie/6-L-eB.magarticle.aspx>

Princip průtokové cytometrie. *Laboratoř AIDS a infekční imunologie* [online]. [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/flowcyt1.htm>