

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína
Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Pavel Trachta

**ZMĚNY ENDOKRINNÍ FUNKCE A ZÁNĚTLIVÉHO PROFILU
TUKOVÉ TKÁNĚ A PERIFERNÍCH MONOCYTŮ U PACIENTŮ
S OBEZITOU: VLIV FYZICKÉ AKTIVITY A BARIATRICKÉ
CHIRURGIE**

**The changes in endocrine function and inflammatory profile of adipose
tissue and peripheral monocytes of patients with obesity: the influence of
physical activity and bariatric surgery**

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha 2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: III. interní klinika endokrinologie a metabolismu 1.LF UK a Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, U Nemocnice 1, Praha 2, 128 00

Školitel: prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Obsah:

Poděkování.....	7
Seznam použitých zkratk.....	8
Abstrakt (CZ).....	12
Abstrakt (EN).....	13
1. Úvod.....	14
2. Tuková tkáň a subklinický zánět.....	14
2.1) funkce tukové tkáně.....	14
2.2) metabolismus tukové tkáně.....	15
2.3) endokrinní funkce tukové tkáně.....	17
2.3.1) Adiponektin.....	17
2.3.2) Visfatin.....	18
2.3.3) Prolaktin.....	19
2.3.4) FABP-4.....	20
2.3.5) Angiopoietin-1.....	24
2.3.6) Apelin.....	25
2.3.7) C1QTNF1.....	26
2.3.8) DPP-IV.....	27
2.3.9) Leptin.....	28
2.3.10) Rezistin.....	29
2.3.11) TNF- α	30

2.4) subkutánní a viscerální tuková tkáň (u zdravých a obézních jedinců).....	31
2.5) subklinický zánět u obezity a jeho význam při vzniku kardiovaskulárních komplikací.....	36
3. Buňky imunitního systému a tuková tkáň.....	38
3.1) subpopulace buněk imunitního systému v tukové tkáni.....	38
3.2) změny endokrinní funkce a buněčného zastoupení v tukové tkáni u obézních pacientů.....	39
3.2.1) makrofágy tukové tkáně a jejich úloha při progresi subklinického zánětu.....	41
3.2.2) chemotaxe buněk imunitního systému do tukové tkáně.....	44
3.2.2.1) chemokinový systém a jejich význam při rozvoji inzulínové rezistence.....	46
4. Imunitní systém a signalizační kaskáda TLRs (toll like receptorů).....	47
4.1) toll-like receptor 1.....	50
4.2) toll-like receptor 2.....	50
4.3) toll-like receptor 3.....	51
4.4) toll-like receptor 4.....	51
4.5) toll-like receptor 5.....	52
4.6) toll-like receptor 6.....	52
4.7) toll-like receptor 7.....	52
4.8) toll-like receptor 8.....	52
4.9) toll-like receptor 9.....	53
4.10) toll-like receptor 10.....	53

4.11) toll-like receptory v kontextu metabolických onemocnění.....	53
5. Renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS).....	55
5.1) renin angiotenzinový systém tkánově specifický.....	57
6. Nové možné faktory regulující metabolismus a proliferační aktivitu tukové tkáně - Aquaporiny.....	61
6.1) aquaporin 1 (AQP1).....	65
6.2) aquaporin 3 (AQP3).....	65
6.3) aquaporin 7 (AQP7).....	66
6.4) aquaporin 9 (AQP9).....	67
7. Léčba obezity a možnosti ovlivnění subklinického zánětu.....	67
7.1) fyzická aktivita – definice fyzické aktivity.....	67
7.2) aerobní a anaerobní fyzická aktivita.....	68
7.3) pozitivní metabolické vlivy fyzické aktivity.....	69
7.4) chirurgická léčba obezity.....	72
7.4.1) laparoskopická tubulizace žaludku.....	73
8. Hypotézy a cíle práce.....	73
9. Metodika studie - Tři měsíce pravidelné aerobní fyzické aktivity u obézních pacientů zlepšují subklinický zánět neovlivňují systémový krevní tlak a endokrinní funkci podkožní tukové tkáně.....	74
9.1) vyšetření antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů.....	74
9.2) měření krevního tlaku a složení těla.....	75
9.3) biopsie tukové tkáně.....	75
9.4) stanovení mRNA exprese.....	75

9.5) fyzická aktivita.....	76
9.6) statistická analýza.....	76
10. Metodika studie - Laparoskopická tubulizace žaludku snižuje mRNA expresi prozánětlivě působících genů v podkožní tukové tkáni ale nikoliv v periferních monocyttech u obézních pacientů.....	77
10.1) vyšetření antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů.....	77
10.2) biopsie tukové tkáně.....	77
10.3) izolace krevních monocytů.....	78
10.4) stanovení mRNA exprese.....	78
10.5) statistická analýza dat.....	79
11. Vlastní výsledky.....	79
11.1 Tři měsíce pravidelné aerobní fyzické aktivity u obézních pacientů zlepšují subklinický zánět neovlivňují systémový krevní tlak a endokrinní funkci podkožní tukové tkáně.....	80
11.2 Laparoskopická sleeve gastrektomie snižuje mRNA expresi prozánětlivě působících genů v podkožní tukové tkáni ale nemění prozánětlivý profil periferních monocytů u pacientů s obezitou.....	80
12. Diskuze.....	82
13. Závěr a shrnutí výsledků práce.....	91
14. Literatura.....	93
15. Přílohy.....	126
15.1 Prohlášení autora.....	127
15.2 Identifikační záznam.....	127
15.3 Plné texty vlastních publikací tvořících podklady dizertační práce.....	128

Poděkování:

Tato práce vznikla v průběhu mého doktorandského studia v rámci doktorského studijního programu v biomedicíně na 3. interní klinice endokrinologie a metabolismu 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Poděkování patří v první řadě mému školiteli prof. MUDr. Martinovi Haluzíkovi, DrSc. nejen za vynikající odborné vedení v průběhu celého studia, ale i za jeho lidský přístup. Dále bych rád poděkoval všem klinickým a laboratorním spolupracovníkům, kteří se spolupodíleli na přípravě publikací.

Chtěl bych rovněž poděkovat panu přednostovi prof. MUDr. Štěpánovi Svačínovi, DrSc., který mě na kliniku přijal a vytvořil mi optimální podmínky k mé práci. Dále bych rád poděkoval mým kolegům na 3. interní klinice, kteří mě učili a předávali mi své cenné klinické a vědecké zkušenosti.

Zvláštní poděkování patří mé přítelkyni Pavlíně a mé dcerce Adélce za trpělivost a podporu, bez které bych to nikdy nezvládl.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE	Angiotenzin konvertující enzym
ACE2	Angiotenzin konvertující enzym typu 2
ADA	Adenosindeamináza
AGT	Angiotenzinogen
AMPK	5' AMP aktivovaná proteinkináza
ANOVA	Analýza rozptylu
ANGPT1	Angiopoetin 1
ANGPT2	Angiopoetin 2
ANG1	Angiotenzin 1
ANG2	Angiotenzin 2
AdipoR1	Adiponektinový receptor-1
AdipoR2	Adiponektinový receptor-2
AMPK	5' AMP-aktivovaná proteinkináza (AMPK)
AQPs	Aquaporiny
AT2R	Angiotenzinový receptor typ 2
AT1R	Angiotenzinový receptor typ 1
ATIPs	AT2R-interacting proteins
ATP	Adenosintrifosfát
BMI	Body mass index

CCL	CC chemokin (CC-motif ligand)
CCR	CC chemokinový receptor
CD	Cluster of differentiation
C1QTNF1	Complement-C1q TNF related protein 1
CRP	C-reaktivní protein
CX ₃ CL	CX ₃ C chemokin (CX ₃ C-motif ligand)
CX ₃ CR	CX ₃ C chemokinový receptor
CXCL	CXC chemokin (CXC-motif ligand)
CXCR	CXC chemokinový receptor
DPP4	Dipeptidylpetidáza 4
DCs	Dendritické buňky
DXA	Dvouenergiová rentgenová absorpciometrie
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
E-FABP	Epidermal fatty acid binding protein
FABP-4	Fatty acid binding protein 4
GLP1	Glucagon-like peptide-1
GLUT	Glukózový transportér
GM-CSF	Granulocytární a makrofágový stimulující faktor
GR	Glukokortikoidní receptor
HDL	High density lipoprotein
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1 α
HOMA	Homeostasis model assessment
HSL	Hormon senzitivní lipáza

iNOS	Inducibilní NO-syntáza
IL	Interleukin
IRF	Interferon response factor
LPL	Lipoproteinová lipáza
LPS	Lipopolysacharid
M-CSF	Makrofágový stimulující faktor
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
MCP-1	Monocytární chemoatrakční protein-1
MR	Mineralokortikoidní receptor
NAMPT	Nikotinamidfosforibosyltransferáza
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NF κ B	Nukleární faktor kappa B
oGTT	Orální glukózový toleranční test
PAI-1	Inhibitor aktivátoru plazminogenu-1
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBEF	Pre-B-cell colony enhancing factor
PPAR-alfa	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPAR-gama	Peroxisome proliferator-activated receptor gama
PRL	Prolaktin
PRR	Proreninový/reninový receptor
RBP4	Retinol vázající protein 4
RT PCR	Real-time polymerase chain reaction

SAT	Subcutaneous adiposse tissue
sSAT	Superficial subcutaneous adiposse tissue
dSAT	Deep subcutaneous adiposse tissue
STAT	Transducery signálu a aktivátory transkripce
SOSC-3	Supressor of cytokine signalling-3
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
TIR	Toll-L-1 receptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α
TNF-2	Tumor necrosis factor-2
SVF	Stromal vascular fraction
UCP1	Uncoupling protein-1
VAT	Visceral adiposse tissue
VLDL	Very-low density lipoprotein
VMK	Volné mastné kyseliny
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFA	Vaskulární endoteliální růstový faktor A
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor type 2
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

ABSTRAKT (CZ)

Výzkum na poli obezity, diabetes mellitus a jejich komplikací se v posledních letech stále více orientuje na patofyziologické mechanismy jejich vzniku a možnosti jejich ovlivnění. Cílem předkládané práce bylo prozkoumat vliv dvou odlišných intervencí - tubulizace žaludku a fyzické aktivity - na antropometrické, biochemické, hormonální parametry a mRNA expresi vybraných prozánětlivých faktorů v podkožní tukové tkáni společně s mRNA expresí v periferních monocytech u pacientek, které podstoupily tubulizaci žaludku.

Do studie s fyzickou aktivitou bylo zařazeno celkem 15 obézních žen s arteriální hypertenzí, které podstoupily 3měsíční cvičební program, který zahrnoval 30 min aerobního cvičení třikrát týdně. Do druhé studie s tubulizací žaludku bylo zařazeno celkem 13 obézních žen, které byly sledovány po dobu 2 let po výkonu.

Získané výsledky naznačují, že v obou studiích měly obézní ženy před intervencí zvýšenou mRNA expresi prozánětlivých cytokinů, adipokinů, chemokinů a chemokinových receptorů ve srovnání s kontrolními skupinami. Obě intervence vedly ke zlepšení antropometrických parametrů a systémového subklinického zánětu. Studie s fyzickou aktivitou neměla žádný vliv na krevní tlak, lipidový profil a relativní genovou expresi komponent renin-angiotenzin-aldosteronového systému a jiných prozánětlivých faktorů v podkožní tukové tkáni. Po 3 měsících cvičebního režimu došlo k signifikantnímu zvýšení genové exprese aquaporinu-3. Ve studii, kde obézní ženy podstoupily tubulizaci žaludku došlo po dvou letech sledování ke zlepšení metabolického profilu pacientek a k poklesu zvýšeně exprimovaných prozánětlivě působících chemokinových receptorů, chemokinů a jiných prozánětlivě působících faktorů v podkožní tukové tkáni. Tubulizace žaludku naopak signifikantně nezměnila zvýšený expresní profil chemotaktických a prozánětlivých cytokinů a jejich korespondujících receptorů v periferních monocytech, což se může podílet na částečném přetrvávání prozánětlivého stavu a pozdějších metabolických komplikací u obézních pacientů.

Klíčová slova: obezita - subklinický zánět - fyzická aktivita - tubulizace žaludku - chemokiny - periferní monocyty

ABSTRACT (EN)

Research in the field of obesity, diabetes mellitus and their complications in recent years is increasingly focused on pathophysiological mechanisms of their onset and potential prevention and treatment. The aim of the present work was to evaluate the effects of two different interventions - sleeve gastrectomy and physical activity - on anthropometric, biochemical, hormonal parameters and mRNA expression of proinflammatory factors in subcutaneous adipose tissue along with mRNA expression in peripheral blood monocytes in patients who underwent sleeve gastrectomy.

A total of 15 obese women with hypertension were included into the physical activity study. These patients underwent a 3-month training program, which included 30 minutes of aerobic exercise three times a week. 13 obese women were included into sleeve gastrectomy study and were followed-up for 2 years after surgery.

Our results indicate that in both studies obese groups had at baseline significantly increased mRNA expression of proinflammatory cytokines, adipokines, chemokines and chemokine receptors relative to control groups. Both interventions decreased body weight and low-grade inflammation. Physical activity had no significant effect on blood pressure, lipid profile and mRNA expression of the components of the renin-angiotensin-aldosterone system and other proinflammatory factors in subcutaneous adipose tissue. Three months of exercise program significantly increased mRNA expression of aquaporin-3. In the laparoscopic sleeve gastrectomy study, a bariatric procedure improved metabolic profile of patients and reduced mRNA expression of up-regulated proinflammatory chemokine receptors, chemokines and other proinflammatory factors in subcutaneous adipose tissue. In contrast, laparoscopic sleeve gastrectomy did not affect up-regulated proinflammatory expression in peripheral blood monocytes even 2 years after operation. Ongoing inflammatory response in circulating monocytes thus may contribute to partial persistence of metabolic complications in obese patients after surgery.

Key words: obesity - subclinical inflammation - physical activity - Sleeve gastrectomy - chemokines - peripheral monocytes

1. Úvod:

Nadváha a obezita jsou Světovou zdravotnickou organizací (WHO) definovány jako abnormální nebo excesivní akumulace tukové tkáně, která může vést ke změně či poškození zdraví (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>). Podstatou obezity je nadměrné množství tukové tkáně v podkožní, ale i viscerální lokalizaci; kromě toho se triacylglyceroly a jiné lipidové metabolity ukládají i do různých parenchymových a jiných orgánů (játra, pankreas, kosterní sval, myokard). Obezita je považována za pandemii 21. století s rychle rostoucí prevalencí a s ní souvisejícím nárůstem metabolických komplikací, což v současnosti představuje celosvětově jeden z největších zdravotních i sociálně-ekonomických problémů [1]. Podle údajů Světové zdravotnické organizace bylo v roce 2011 obezitou postiženo celosvětově cca 500 miliónů lidí, přičemž se předpokládá, že se toto číslo do roku 2030 ještě zdvojnásobí (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>).

2. Tuková tkáň a subklinický zánět

Komplikace obezity vznikají obecně z několika příčin. Samotná vyšší tělesná hmotnost vyvolává tzv. komplikace mechanické, k nimž patří nemoci z přetížení kloubů a páteře, syndrom spánkové apnoe a částečně i hypertrofie srdce. Ostatní komplikace řadíme mezi komplikace metabolické, zahrnující například dyslipidémii, arteriální hypertenzi či diabetes mellitus 2. typu. Chronické přetížení adipocytů lipidy vede k ektopickému ukládání tuku v jaterní a svalové tkáni, což má za následek vznik inzulinové rezistence [2]. Přetížení pankreatu lipidy je významným faktorem vyvolávajícím apoptózu beta-buněk a posléze vznik diabetes mellitus 2. typu [3]. Tuková tkáň obézních jedinců je více infiltrována imunokompetentními buňkami, které tam vstupují v důsledku zvýšeného odumírání hypertrofických adipocytů, což má za následek rozvoj tzv. subklinického zánětu, při kterém jsou lokálně a posléze i do systémové cirkulace uvolňovány faktory vedoucí k chronické systémové zánětlivé reakci [4].

2.1 Funkce tukové tkáně

Z histologického hlediska se tuková tkáň skládá z adipocytů (vlastní zralé buňky tukové tkáně) a interadipocytárního, vaskularizovaného stromatu, které je tvořeno

extracelulární matrix s disperzně se vyskytujícími fibroblasty, preadipocyty (nezralé prekurzory adipocytů), endoteliálními buňkami a buňkami imunitního systému [5]. Dlouhodobě byly tukové tkáně připsány tři základní funkce: funkce tepelného izolátoru, funkce mechanické ochrany proti nárazům a především funkce energetické zásobárny. Podkožní tuková tkáň je významně horším tepelným vodičem než většina vnitřních orgánů a funguje jako velmi účinný tepelný izolátor. Řada vnitřních orgánů je navíc obklopena vrstvou tukové tkáně, což má kromě tepelné izolace i ochranný význam před mechanickým poškozením. Funkce zásobního energetického zdroje je umožněna díky uložení energie v adipocytech ve formě triacylglycerolů v cytoplazmatických lipidových kapénkách [6]. Posledních 20 let intenzivního výzkumu však ukázalo, že kromě uvedených klasických funkcí je tuková tkáň též aktivní endokrinní orgán, který je zapojen do řady metabolických, hormonálních a imunitních procesů, jejichž výsledné produkty a reakce působí nejen lokálně v samotné tukové tkáni, ale mohou ovlivňovat i vzdálené orgány a systémy a tím i homeostázu celého organismu [7].

2.2 Metabolismus tukové tkáně

Určujícím faktorem pro metabolismus tukové tkáně je typ převládajících adipocytů (bílé nebo hnědé) [8]. Modifikujícími faktory jsou lokalizace tukové tkáně (viscerální vs. subkutánní), celkový metabolický stav organismu (stav sytosti versus stav hladovění) a typ přijímané potravy. Bílá tuková tkáň je tvořena hlavně adipocyty s jednou tukovou kapénkou a malým množstvím mitochondrií, pro hnědou tukovou tkáň jsou naopak typické adipocyty s malými tukovými kapénkami a velkým množstvím mitochondrií [9].

Hnědá tuková tkáň se významně podílí na energetickém výdeji a termogenezi [10]. Hnědá tuková tkáň je inervována sympatickým nervovým systémem [11], jehož nervová zakončení jsou umístěna na hnědých adipocytech, kde se uvolňuje noradrenalin, který prostřednictvím β 1- a β 3-adrenergních receptorů stimuluje hormon senzitivní lipázu (HSL) [12]. Ta následně štěpí triacylglyceroly na glycerol a volné mastné kyseliny (VMK). Mastné kyseliny jsou pak oxidovány v mitochondriích, kde prostřednictvím odpřahujících (uncoupling) proteinů (zejména UCP-1) dochází k uvolnění energie ve formě tepla namísto jejího ukládání ve formě ATP [13].

V bílé tukové tkáni je uloženo velké množství energie ve formě triacylglycerolů [14].

Při hladovění dochází v důsledku nízkých hladin inzulínu ke zvýšení tvorby a sekrece glukagonu a zároveň ke zvýšené stimulaci β -adrenergních receptorů, což vede synergistickým mechanismem k aktivaci HSL a akceleraci lipolýzy. Výsledné produkty (VMK a glycerol) jsou uvolňovány do krevního oběhu a využívají se jako energetický (VMK) a strukturní (glycerol) substrát pro glukoneogenezi v játrech i jako přímý zdroj energie pro svaly (VMK). Po příjmu potravy je v důsledku vzestupu sérových koncentrací inzulínu inhibována aktivita HSL v tukové tkáni a aktivována lipoproteinová lipáza (LPL), která hydrolyzuje triacylglyceroly v krevním řečišti (přenášené jako součást VLDL – lipoproteiny s velmi nízkou denzitou). Volné mastné kyseliny potom vstupují do adipocytů a jsou inkorporovány do endogenních triacylglycerolů. Dalším možným substrátem pro syntézu triacylglycerolů v adipocytech jsou mastné kyseliny *de novo* syntetizované přímo v adipocytech [15].

V poslední době se popisuje i další typ tukové tkáně tzv. béžový tuk (beige fat), označovaný i jako „brite“ tuková tkáň (hnědá tuková tkáň v bílé tukové tkáni). Jde o seskupení adipocytů v bílé tukové tkáni, které exprimují odpřahující (uncoupling) proteiny (zejména UCP-1) v reakci na různé stimulační podněty [16]. Tyto adipocyty, podobně jako adipocyty v hnědé tukové tkáni, jsou multivakuolární, obsahují vysoký počet mitochondrií a exprimují velké množství genů, které jsou specifické pro hnědou tukovou tkáň (např. UCP-1, CIDEA, Pgc1a). Kromě termogeneze se hnědá a béžová tuková tkáň v řadě charakteristik liší a měly by být vnímány odděleně, jako dva odlišné buněčné typy. Za prvé, u myších modelů bylo prokázáno, že „béžové“ adipocyty nepocházejí ze stejných embryonálních prekursorových buněk jako adipocyty hnědé tukové tkáně [17]. Za druhé, funkce adipocytů hnědé a béžové tukové tkáně jsou v experimentu na myších jinak regulovány [18]. Za třetí, adipocyty těchto dvou typů tukové tkáně obsahují jinou genetickou výbavu [19]. A konečně čtvrtý a nejzásadnější rozdíl mezi hnědou a béžovou tukovou tkání spočívá v tom, že adipocyty v hnědé tukové tkáni ve zvýšené míře exprimují UCP-1 a jiné geny zapojené do termogeneze za bazálních podmínek, zatímco u adipocytů v béžové tukové tkáni jsou tyto geny exprimovány pouze v závislosti na stimulaci faktory, které aktivují β -adrenergní receptory nebo PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) receptory [20, 21]. Otázka, zda jsou funkce hnědé a béžové tukové tkáně odlišné, není doposud uspokojivě zodpovězena.

2.3 Endokrinní funkce tukové tkáně

Objev endokrinní funkce tukové tkáně na počátku devadesátých let minulého století znamenal zásadní zlom v dosavadním pohledu na tuto tkáň. Dosud předpokládaná relativně pasivní úloha tukové tkáně v metabolických dějích se náhle změnila na úlohu aktivní a s pokračujícími intenzivními výzkumy se ukazuje, že v tukové tkáni je produkováno daleko více látek s hormonálními účinky, než se původně předpokládalo [22]. Tyto faktory souborně nazývané adipokiny se účastní regulace bezpočtu fyziologických dějů, do kterých lze počítat metabolismus nutrientů, signalizaci o stavu sytosti a energetických zásob organismu, imunitní a zánětlivé reakce, angiogenezi a řadu dalších procesů [23, 24]. Vzhledem k tomu, že faktorů, které jsou produkovány tukovou tkání, je velké množství, v této práci se detailněji zmíníme o leptinu, adiponektinu a rezistinu, třech hormonech tukové tkáně nejpodrobněji zkoumaných v souvislosti s regulací metabolických dějů u lidí.

2.3.1 Adiponektin

Adiponektin je proteinový hormon produkováný výlučně adipocyty vyznačující se inzulín-senzitizujícími účinky na periferní tkáně. Je produkován bílou tukovou tkání v mikromolárních množstvích a působí cestou receptoru AdipoR1, AdipoR2 a T-cadherinu, kdy při vazbě na tyto receptory zvyšuje funkci AMP-aktivované proteinkinázy a PPAR- α v játrech a příčně pruhovaném svalstvu. Sérové koncentrace adiponektinu negativně korelují s parametry inzulínové rezistence a výskytem obezity a diabetes mellitus 2. typu. Adiponektin přímým působením zvyšuje oxidaci volných mastných kyselin, facilituje vstup glukózy do adipocytů a působí protizánětlivě a anti-ateroskleroticky [23, 25-28].

Adiponektin působí přes adiponektinový receptor-1 (AdipoR1) a adiponektinový receptor-2 (AdipoR2). Tyto receptory mají sedm transmembránových částí, ale jsou funkčně odlišné od G-proteinů spřažených s receptory a to především odlišnou polaritou řetězců. Ve tkáních jsou tyto receptory v různé míře jinak zastoupené, ale obecně vzato jsou exprimované zároveň [29]. Předpokládá se, že adiponektin působí přes tyto receptory aktivací 5' AMP-aktivované proteinkinázy (AMPK) a peroxisome proliferator-activated receptoru-alfa (PPAR-alfa) [30]. U myší je AdipoR2 nejvíce exprimován v játrech, zatímco AdipoR1 je přítomen prakticky ve všech tkáních [30]. Myši s vyřazeným genem pro adiponektinový receptor-1 a -2 měly poruchu

glukózové tolerance a více vyjádřenou inzulínovou rezistenci v játrech [29]. V rozporu s tím je práce Bjursella et al., který prokázal, že myši s vyřazeným genem pro AdipoR2 byly štíhlé, rezistentní k přírůstku hmotnosti navozené dietou s vysokým obsahem tuků a měly zlepšenou glukózovou toleranci se snížením celkového cholesterolu a HDL-cholesterolu [31]. U lidí je AdipoR2 ve zvýšené míře exprimován v příčně pruhovaném svalstvu a pozitivně koreluje s inzulínovou senzitivitou [32] a sérovými koncentracemi triglyceridů na lačno u zdravých jedinců bez poruchy glukózové tolerance [33]. V práci Moriniga et al. byly naopak relativní genové exprese AdipoR2 ale nikoliv AdipoR1 snižené v intraabdominální tukové tkáni obézních pacientů a negativně korelovaly se sérovými koncentracemi triglyceridů a apolipoproteinem B [34].

Gen pro AdipoR2 je lokalizován na chromozomálním lokusu 12p13.33 a obsahuje devět exonů. Byla prokázána asociace mezi variantami genu pro AdipoR2 a vznikem inzulínové rezistence a diabetes mellitus 2. typu [35], sérovými koncentracemi triacylglycerolů [36] a obsahem tuku v játrech [37]. Na druhou stranu jsou studie, které neprokázaly pozitivní asociaci mezi variantami genu pro AdipoR2 a diabetes mellitus 2. typu [38, 39]

2.3.2 Visfatin

Visfatin byl poprvé popsán, jako 52 kDa pre-B-cell colony enhancing factor (PBEF) s predominantní expresí v periferních lymfocytech [40]. Později byl přejmenován a identifikován, jako nový adipokin "visfatin", protože je jeho produkce vyšší ve viscerální tukové tkáni v porovnání s podkožní tukovou tkání [41]. Jiné práce zase prokázaly, že mRNA exprese visfatinu v podkožní a viscerální tukové tkáni jsou shodné [42]. Visfatin je také přítomen i v jiných tukových depozitech, jako je perivaskulární a epikardiální tuková tkáň [43]. Visfatin není produkován pouze adipocyty, ale i buňkami imunitního systému a to převážně aktivovanými makrofágy, jejichž infiltrace v tukové tkáni je významně zvýšena u obézních pacientů [44]. Visfatin disponuje vnitřní enzymatickou aktivitou stejně, jako nikotinamidfosforibosyl transferáza (NAMPT), jak bylo v roce 2002 prokázáno skupinou Rongvaux et al. [45]. U savců intracelulární NAMPT katalyzuje limitující krok v syntéze nikotinamidadeninukleotidu (NAD⁺), jako esenciálního koenzymu v mnohočetných buněčných redoxních reakcích [46]. U savců existují dvě izoformy visfatinu.

Intracelulární visfatin hraje centrální úlohu v regulaci NAD-dependentních enzymů a je zapojen do regulace buněčného metabolismu v závislosti na dostupnosti nutrientů, maturaci buněk a buněčného přežívání [47, 48]. Extracelulární forma visfatinu je produkována různými typy buněk [49]. Kromě adipocytů je visfatin/Nampt exprimován na buňkách imunitního systému, chondrocytech a v řadě dalších tkání [44, 50]. Recentně byla zjištěna exprese visfatinu v lidských myoblastech [51] a hepatocytech, odkud je visfatin aktivně secernován [52].

V kontextu metabolických chorob převážná část studií prokázala zvýšené sérové koncentrace visfatinu/NAMPT u obézních pacientů, pacientů s diabetes mellitus 2. typu a metabolickým syndromem. Visfatin/NAMPT tak představuje nezávislý rizikový faktor aterosklerotických onemocnění [53, 54]. Předpokládá se, že visfatin/NAMPT může být markerem endoteliální dysfunkce a pravděpodobně hraje důležitou roli v iniciaci a propagaci aterosklerózy [55]. Uslu et al. prokázal, že u diabetiků 2. typu zvýšené sérové koncentrace visfatinu pozitivně korelovaly s jiným markerem endoteliální dysfunkce homocysteinem [56]. V jiné práci byla prokázána zvýšená exprese visfatinu/NAMPT v cirkulujících monocytech u obézních pacientů s diabetem 2. typu ve srovnání s pacienty bez diabetu, což může naznačovat větší asociaci zvýšených koncentrací visfatinu/NAMPT s diabetem, než s obezitou [57]. Na druhou stranu, Oki et al. prokázali, že sérové koncentrace visfatinu/NAMPT pozitivně korelují s prozánětlivými faktory nezávisle na stavu inzulínové rezistence [58]. Je zřejmé, že hladiny visfatinu/NAMPT jsou pozitivně asociovány s prozánětlivým stavem a pozitivně korelují s cirkulujícími prozánětlivými faktory, jako je IL-6, CRP a MCP-1 [59, 60].

2.3.3 Prolaktin

Prolaktin je polypeptidový hormon, který je syntetizován a sekretován specializovanými buňkami adenohipofýzy, tzv. laktotropy. V současnosti je známo více než tři sta biologických účinků prolaktinu [61]. Produkce a sekrece prolaktinu není omezena pouze na adenohipofýzu, ale je v organismu produkována i jinými orgány a tkáněmi. Extrapituitární syntéza byla popsána v mozku, placentě, decidue, děloze, epiteliálních buňkách a buňkách imunitního systému [62]. Prolaktinové receptory jsou přítomny v řadě buněk periferního imunitního systému a to na T a B-lymfocytech, NK-buňkách a střevních epiteliálních buňkách [63, 64]. Prolaktin působí

jako imunomodulační hormon, který může působit na aktivaci lymfocytů a jiných buněk imunitního systému se sekundárním zvýšením produkce cytokinů [65]. Celá řada onemocnění, a to včetně onemocnění autoimunitních, vzniká na základě nepoměru mezi zánětlivými a protizánětlivými procesy a předpokládá se, že prolaktin může být jeden z faktorů, který se může podílet na patogenezi těchto onemocnění [66]. Imunomodulační aktivita prolaktinu může souviset s jeho účinkem na zvýšení aktivity nukleárních transkripčních faktorů, jako je IRF-1 a NFκB, které hrají důležitou roli v imunitních procesech.

Hyperprolaktinémie je poměrně častým nálezem u pacientů s chronickým onemocněním ledvin a to u obou pohlaví. Její prevalence u pacientů s chronickým onemocněním ledvin je od 30% do 65% a zřejmě souvisí se sníženou clearance ledvin, ale také se zvýšenou produkcí prolaktinu při změněné dopaminergní aktivitě [67]. Některé práce poukazují na to, že prolaktin má řadu biologických účinků a může se podílet na aterosklerotických procesech: zvýšené sérové koncentrace prolaktinu byly prokázány u pacientů s esenciální hypertenzí [68], v průběhu akutní fáze koronárních syndromů a ischemických cévních mozkových příhod [69]. V *in vitro* studiích prolaktin modifikoval prozánětlivou odpověď, zvyšoval adhezi mononukleárních buněk imunitního systému k endotelu cévní stěny a stimuloval proliferaci buněk hladkého svalstva cévní stěny [70, 71]. Některé práce ukazují, že hyperprolaktinémie je spojena se sníženou inzulínovou senzitivitou a subklinickým zánětem [72]. Poměrně zásadní informací je, že prolaktin koreloval s rizikovým skóre, které predikovalo 10 letou kardiovaskulární mortalitu [73].

2.3.4 FABP-4

FABP-4 (fatty acid binding protein 4) je protein patřící do rodiny cytoplazmatických proteinů podílejících se na transportu, intracelulárním skladování a metabolismu lipidů. Primárně je FABP-4 exprimován na makrofázích a adipocytech. Gen pro FABP-4 je lokalizován na 8q21 chromozomu, molekulová hmotnost FABP-4 je 14.7 kDa. Skupina FABP proteinů váže hydrofobní ligandy jako nenasycené a nasycené mastné kyseliny, eikosanoidy a jiné lipidy s vysokou afinitou. Vlastní FABP-4 se vyskytuje ve 2 formách solubilní a intracelulární. Studie na buněčných kulturách prokázaly úlohu FABP-4 při transportu a skladování lipidů a na regulaci fosfolipidového metabolismu. Mezi další předpokládané funkce FABP-4 patří

transport lipidových ligandů do signálních regulačních drah a enzymatických buněčných procesů. FABP-4 hraje důležitou roli při přenosu lipidů do specifických buněčných kompartmentů (lipidových inkluzí a endoplazmatického retikula), kde se účastní na regulaci signálních kaskád a syntéze komponent pro buněčnou membránu. Dalšími organelami, kam jsou lipidy přenášeny pomocí FABP-4, jsou peroxisomy a mitochondrie, dále cytoplazmatické enzymy a konečně buněčné jádro, kde FABP-4 moduluje genovou transkripci prostřednictvím jaderných hormonálních receptorů PPAR, nebo prostřednictvím jiných faktorů, které mají afinitu k lipidům.

V pokusu na myších byly genetickou manipulací vyřazeny geny pro FABP-4 a FABP-5, které jsou významným způsobem exprimovány na adipocytech a makrofázích. Delece genu pro FABP-4 v adipocytech snížila sekreci prozánětlivých cytokinů v makrofázích, naopak vedla ke zvýšení stimulace inzulínové signální kaskády a vychytávání glukózy v adipocytech [74]. Genetická manipulace s vyřazením genu v makrofázích měla za následek snížení exprese FABP-4 v makrofázích a změny v intracelulární akumulaci cholesterolu. Byla pozorována i snížená prozánětlivá odpověď v tukové tkáni, a to snížením aktivity I κ B a NF- κ B se supresí cyklooxygenázy-2 a indukibilní NO-syntázy (iNOS). Byla zvýšena i aktivita PPAR- γ receptorů [75]. Spojení mezi zánětem tukové tkáně a rozvojem inzulínové rezistence, vznikem diabetes mellitus 2. typu a aterosklerózou bylo popsáno v posledním desetiletí. Studie na genetických modelech myší prokázaly, že FABP-4 může být důležitým faktorem, který se v pokusu na myších podílel na vzniku metabolického syndromu. V experimentálních studiích s použitím inhibitorů FABP-4 byl pozorován jejich příznivý vliv na rozvoj aterosklerózy a diabetes mellitus 2. typu. V první experimentální studii byl u zvířat s vyřazením izoformy FABP-4 (aP2) a FABP-5 (mal1) v adipocytech a makrofázích zjištěn silný ochranný vliv na rozvoj obezity vyvolané vysokotukovou dietou [74]. U těchto zvířat byl také potlačen rozvoj inzulínové rezistence, diabetes mellitus 2. typu, steatózy jater a aterosklerózy. Při příjmu potravy s vysokým obsahem tuků u myší s vyřazeným genem pro FABP-4 byla prokázána zvýšená aktivita AMP-aktivované protein kinázy a snížená aktivita jaterní stearyl-CoA-desaturázy-1. Myši s geneticky vyřazeným genem pro FABP-4 jsou částečně rezistentní proti obezitě vyvolané inzulínovou rezistencí a vznikem diabetes mellitus 2. typu [74]. Mají nižší koncentraci cirkulujících triacylglycerolů a jsou chráněny před vznikem aterosklerózy. V jiné práci byla ověřována hypotéza, že

kombinace genetického vyřazení genu pro FABP-4 a FABP-5 bude mít synergický účinek na metabolické parametry a snížení rychlosti progresu aterosklerózy u myšího modelu aterosklerózy s vyřazeným genem pro apoE (-/-) [76]. ApoE (-/-) myši s vyřazeným genem pro FABP-4 a FABP-5 měly sníženou koncentraci sérového cholesterolu a triacylglycerolů a zvýšenou inzulínovou senzitivitu ve srovnání s apoE (-/-) zvířaty. Doba přežití se u apoE (-/-) myši s vyřazeným genem pro FABP-4 a FABP-5 zvýšilo o 67% ve srovnání s kontrolní skupinou apoE (-/-) [76]. V jiném experimentu zkoumal Boord et al. vliv vyřazení genu pro FABP-4 na hypercholesterolemii a aterosklerózu u apoE (-/-) myši. Vyřazení obou genů vedlo ke zmenšení aterosklerotických lézí v oblasti proximální aorty, pravé karotické artérie a arteria facialis. V jiné studii byla popsána silná exprese FABP-4 v endoteliálních buňkách kapilár a malých žil v myších a lidských tkáních, včetně srdeční a ledvinné tkáně. FABP-4 byl detekován v buněčném jádře a cytoplasmě a byl popsán jeho účinek na signální kaskádu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF/VEGFR2) a pozitivní vliv na proliferaci v endoteliálních buňkách [77]. Další studie zkoumala vliv faktorů produkovaných lidskými adipocyty na kontraktilitu myokardu. FABP-4 inhiboval influx Ca^{2+} iontů do buňky během systoly v pokusu na krysích kardiomyocytech [78]. Při pokusech, kdy myším byl perorálně podáván inhibitor FABP-4, bylo zjištěno zpomalení procesu aterosklerózy a jiných složek metabolického syndromu [74].

V klinické studii Tuncmana et al. byl sledován vliv genetických variant lokusu genu pro FABP-4, které měly za následek sníženou expresi FABP-4 v tukové tkáni. Nositelé T87C polymorfizmu měli nižší sérovou koncentraci triacylglycerolů a signifikantně snížené riziko koronárních onemocnění a vzniku diabetes mellitus 2. typu. Haluzík et al. sledoval sérové koncentrace FABP-4 u 11 obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu a 10 zdravých štíhlých žen v kontrolní skupině před a po 3 měsíční léčbě PPAR-alfa agonistou fenofibrátem. Cílem studie bylo najít vztah koncentrací FABP-4 k jiným biochemickým parametrům a k parametrům inzulínové senzitivity pomocí hyperinzulinemického-izoglykemického clampu. Hyperinzulinémie signifikantně snížila koncentrace FABP-4 u obou zkoumaných skupin. Sérové koncentrace FABP-4 pozitivně korelovaly s BMI, triacylglyceroly, glykemií, glykovaným hemoglobinem, aterogenním indexem a koncentracemi inzulínu [79]. Inverzní vztah byl nalezen mezi koncentracemi FABP-4, BMI, parametry inzulínové

senzitivity, HDL-cholesterolem a kompenzací diabetu. V jiné klinické studii byly zkoumány koncentrace FABP-4 u pacientů s kombinovanou familiární dyslipidemií [80]. Zkoumán byl vztah mezi koncentracemi FABP-4, dyslipidemií a metabolickými odchylkami. Koncentrace FABP-4 byly vyšší u pacientů s familiární kombinovanou dyslipidemií než u zdravých jedinců. Sérové koncentrace FABP-4 pozitivně korelovaly s BMI, obvodem pasu, koncentracemi inzulínu v séru a HOMA indexem. Korelace s koncentracemi lipidů v séru nebyla nalezena. Při měření koncentrace FABP-4 v epikardiální tukové tkáni a ascendentní aortě u pacientů s metabolickým syndromem byla zjištěna signifikantně vyšší exprese mRNA a koncentrace FABP-4 než ve skupině pacientů bez metabolického syndromu [81]. Byla také nalezena 66krát vyšší exprese v epikardiální tukové tkáni než ve tkáni ascendentní aorty. Míra exprese FABP-4 v epikardiální tukové tkáni pozitivně korelovala s obvodem pasu. U pacientů s diabetes mellitus 2. typu byla oproti kontrolní skupině zdravých jedinců zjištěna zvýšená koncentrace PPAR- γ , FABP-4 a E-FABP (epidermální fatty acid binding protein) v podkožní tukové tkáni [82]. Simón et al. měřili sérové koncentrace FABP-4 před a rok po bariatrické operaci u 77 obézních žen. Při redukci hmotnosti u obézních žen došlo po roce ke snížení plazmatických koncentrací FABP-4, solubilního receptoru pro TNF-2, IL-18, CRP a ke zvýšení koncentrací adiponektinu [83]. Ve studii Khalyfa et al. byla sledována koncentrace FABP-4 ve skupině 309 dětí ve věku 5-7 let. Děti byly rozděleny podle BMI na skupinu obézních a neobézních. Během studie byla měřena koncentrace inzulínu, hsCRP a FABP-4. Ve skupině obézních dětí byly zjištěny zvýšené sérové koncentrace FABP-4, LDL-cholesterolu a hsCRP. Koncentrace FABP-4 u obézních dětí pozitivně korelovaly s hodnotou BMI, HOMA indexem, hsCRP, ale ne s koncentrací lipidů [84]. Haluzíková et al. ve své studii měřila sérové koncentrace FABP-4, leptinu, solubilního leptinového receptoru, adiponektinu, rezistinu, CRP, inzulínu, glukózy, cholesterolu a triglyceridů u 19 pacientek s restriktivním typem mentální anorexie a u 16 zdravých žen s normální hmotností. BMI, sérové koncentrace leptinu byly signifikantně nižší, zatímco koncentrace sérového adiponektinu a solubilního leptinového receptoru byly signifikantně vyšší u pacientek s mentální anorexií oproti kontrolní skupině. Sérové koncentrace FABP-4 u pacientek s mentální anorexií se nelišily od kontrolní skupiny a nebyla zjištěna korelace s žádným jiným studovaným parametrem [85]. Některé práce zjišťovaly, zda by bylo možné použít FABP-4 jako jeden z diagnostických markerů metabolického syndromu. Nižší sérové koncentrace FABP-4 mohou podle

jedné publikace být prognostickým markerem u pacientů držících redukční dietu a predikovat její úspěšnost [86]

2.3.5 Angiopoietin 1

ANGPT1 (Angiopoietin 1) tento glykoprotein patří do rodiny angiopoietinů. Zástupci této skupiny hrají důležitou roli ve vývoji cév a angiogenezi. Všechny angiopoietiny se vážou s podobnou afinitou na endoteliální buněčně specifický receptor s tyrozin-kinázovou aktivitou. Tento glykoprotein hraje důležitou roli ve zprostředkování interakcí mezi endotelem a okolní matrix, mezenchymálními tkáněmi a inhibuje endoteliální permeabilitu. Podílí se také na maturaci cév a jejich stabilitě.

Obezita je spojena s nižší tkáňovou perfúzí v příčně pruhovaných svalech a může vést ke snížené spotřebě kyslíku tkáněmi [87], snížené glukózové toleranci a inzulínové rezistenci [88]. Neadekvátní perfúze tkání může souviset se sníženou denzitou cév a sníženou vazodilatační odpovědí [88, 89]. V příčně pruhovaném svalstvu denzita cév pozitivně koreluje s glukózovou tolerancí a inzulínovou senzitivitou [90, 91] a je snížena u pacientů s diabetem 2. typu [92]. Ve studiích, které zahrnovaly muže s diabetem 2. typu a porušenou glukózovou tolerancí, cvičení zvýšilo angiogenezi ve svalech [93, 94]. Dysfunkce tukové tkáně je spojována s obezitou a inzulínovou rezistencí, sníženou hustotou cév a hypoxií společně s fibrózou tukové tkáně, infiltrací makrofágy a subklinickým zánětem [95]. Snížená denzita cév byla pozorována v podkožní tukové tkáni obézních pacientů oproti štíhlým kontrolám [96, 97]

Cvičení a jiné stimuly regulují proangiogenní cesty přes tvorbu faktoru-1 α indukovaného hypoxií (HIF-1 α), který zvyšuje transkripci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru A (VEGFA) [98]. Kromě toho jsou secernovány glykoproteiny angiopoietin-2 (Angpt2) a angiopoietin-1 (Angpt1), které patří mezi zásadní regulátory angiogeneze. Vyšší poměr Angpt2:Angpt1 angiogenezi stimuluje. V kosterním svalstvu cvičení zvyšuje genovou expresi Angpt1 a Angpt2 [99] a zvyšuje poměr Angpt2:Angpt1 [100].

Angpt-1 je konstitutivně produkován pericyty a jeho předpokládanou funkcí je snížení prozánětlivého stavu v endoteliálních buňkách [101]. Nízké koncentrace Angpt-1 a snížený počet pericytů jsou poměrně charakteristické pro diabetes 2. typu [102, 103].

V kulturách buněk viscerální tukové tkáně došlo po přidání Angpt-1 ke snížení zánětlivého profilu, částečnému obnovení lipolýzy a zlepšení inzulínové senzitivity [104]. V *in vitro* modelech Angpt-1 snižoval apoptózu endoteliálních buněk a prozánětlivý stav mechanismem snížené exprese adhezivních molekul na povrchu endoteliálních buněk [105, 106]. V pokusu na Angpt-1 deficientních myších došlo ke zhoršenému hojení ran v odpovědi na poranění, rozvoji fibrózy pojiva a různých cévních abnormalit [107], naopak podávání Angpt-1 diabetickým myším zlepšilo denzitu cév v tukové tkáni a snížilo velikost adipocytů [108].

2.3.6 Apelin

Apelin byl identifikován, jako peptid a endogenní ligand orphan receptorů spřažených s G-proteinem APJ (apelinový receptor). Sekrece apelinu v tukové tkáni je zvýšena působením prozánětlivých faktorů, jako je TNF- α . U myší krmených vysokokalorickou dietou se zvyšuje produkce prozánětlivých faktorů současně se zvýšením infiltrace tukové tkáně makrofágy a množstvím tukové tkáně. V současné době není dostatek informací o tom, jaká je funkce apelinu v imunitních procesech. Některé práce naznačují, že apelin může hrát důležitou roli v tumorózní neovaskularizaci a proliferaci endoteliálních buněk [109]. V pokusu na myších vedla léčba antagonisty apelinového receptoru ke snížení jaterní fibrózy, což naznačuje dosud ne zcela jasné působení apelinu v jaterní tkáni [110]. V jiné práci inhibice apelinu pomocí farmakologicky připraveného blokátoru (F13A) zvýšila rychlost regenerace jaterní tkáně po hepatektomii, což naznačuje jeho potenciální použití v léčbě jaterních onemocnění [111]. U obézních myší s inzulínovou rezistencí podání rekombinantně připraveného apelinu vedlo ke zvýšené utilizaci glukózy v kosterním svalstvu a obnovení glukózové tolerance [112].

U lidí řada prací prokázala zvýšené sérové koncentrace apelinu u pacientů s obezitou nebo diabetem [113]. Apelin-17 a [pyr-1]-apelin-13 se ukázaly, jako predominantní formy v plazmě u lidí [114]. Sérové koncentrace apelinu by mohly být použity jako nový biomarker, který predikuje vznik diabetu u lidí [115]. Sérové koncentrace apelinu byly vyšší u žen než u mužů, ale vyšší koncentrace byly asociovány s vyšším rizikem vzniku diabetu pouze u mužů [115]. Recentnější data ukazují, že sérové koncentrace apelinu byly signifikantně vyšší u pacientů s diabetem 1. typu oproti zdravým kontrolám a to dokonce ještě více než u diabetiků 2. typu

[116]. Habchi et al. prokázal, že sérové koncentrace apelinu negativně korelovaly s glykovaným hemoglobinem u pacientů s diabetem 2. typu, což naznačuje, že vyšší cirkulující sérové koncentrace apelinu jsou spojené s lepší glykemickou kontrolou [116]. Boucher et al. prokázal, že inzulín je jedním z nejdůležitějších regulátorů sekrece a exprese apelinu [117]. S přihlédnutím na práce u diabetiků 1. typu, kde byly zjištěny zvýšené koncentrace apelinu lze říci, že obezita není pravděpodobně jednou z hlavních determinant zvýšených hladin apelinu, což naznačují i jiné práce, kde nebyla zjištěna pozitivní korelace mezi koncentrací apelinu a BMI [113]. V řadě prací zaměřených na redukci hmotnosti různými intervencemi (nízkokalorická dieta, fyzická aktivita, bariatrická chirurgie) byly sérové koncentrace apelinu po těchto intervencích sníženy [113, 118]. Byla také prokázána signifikantní na BMI nezávislá korelace mezi sníženými sérovými koncentracemi apelinu a zlepšenou inzulinovou senzitivitou [119]. Na základě výsledků těchto studií lze hypotetizovat, že zvýšené sérové koncentrace apelinu u diabetiků 1. a 2. typu jsou kompenzačním mechanismem, který přímo snižuje inzulinovou rezistenci.

2.3.7 C1QTNF1

C1QTNF1 (Complement-C1q TNF-related protein 1) patří do rodiny CTRP proteinů, které vykazují protizánětlivé a antidiabetické účinky v pokusu na myších [120]. Dosud bylo identifikováno 15 faktorů CTRP rodiny [121]. Jako zástupce rodiny CTRP proteinů je C1QTNF1 primárně exprimován v tukové tkáni [122] a je nejvíce produkován stromálními buňkami tukové tkáně, jako jsou makrofágy, preadipocyty a endoteliální buňky [123]. C1QTNF1 aktivuje serin/threoninové proteinkinázy Akt a mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) [123]. V pokusu na myších vedlo podávání rekombinantního C1QTNF1 k signifikantnímu poklesu glykémie [123]. V *in vitro* pokusu na izolovaném kosterním svalu přidání rekombinantního C1QTNF1 aktivovalo AMP-aktivovanou proteinkinázu (AMPK) a tím sekundárně zvýšilo oxidaci mastných kyselin [124]. Transgenní myši s overexpresí genu pro C1QTNF1 měly ve zvýšené míře vyjádřenou inzulinovou senzitivitu, oxidaci mastných kyselin a energetický výdej [124].

Studie u lidí prokázaly, že sérové koncentrace byly signifikantně zvýšené u pacientů s hypertenzí [125] a metabolickým syndromem [126].

2.3.8 DPP4

Dipeptidyl-peptidáza (DPP-4), také známá, jako CD26 je ubikviterně exprimovaný glykoprotein o hmotnosti 110 kDa, který byl poprvé popsán Hapsu-Havem a Glennerem [127]. DPP-4 je transmembránový protein typu II, jenž je uvolňován do cirkulace z povrchu membrány procesem zvaným „shedding“ [128]. Důležitost tohoto enzymu ve vědeckých a lékařských kruzích zvýšil vývoj léků, které se ve velké míře používají v léčbě diabetu 2. typu, DPP-4 inhibitorů. Tato skupina léků označovaných, jako gliptiny zvyšuje sérové koncentrace inkretinů a tímto mechanismem stimuluje postprandiální sekreci inzulínu. Solubilní DPP-4 lze charakterizovat jako adipokin [129], který koreluje s parametry metabolického syndromu [130]. DPP-4 je multifunkční enzym, který má vazebnou kapacitu pro velké množství peptidů, mezi které patří např. adenosindeamináza (ADA) a extracelulární proteiny obsažené v matrix mezibuněčné hmoty [128, 131, 132]. Lze konstatovat, že DPP-4 je zapojena do buněčných signálních procesů, aktivace buněk imunitního systému a dysregulace jeho exprese je příčinou vzniku řady onemocnění.

Dipeptidyl-peptidáza 4 je exprimována na velkém počtu různých typů buněk, jako jsou epiteliální buňky, fibroblasty a různé podskupiny leukocytů. Mechanismy, které regulují transkripci genu pro DPP-4 a jeho enzymatickou aktivitu nejsou doposud zcela objasněny. U lidí je gen pro DPP-4 lokalizován na 2. chromozomu, má 70 kb a obsahuje 26 exonů [128]. Jeho exprese je regulována řadou faktorů. Interleukin 12 (IL-12) je klíčovým faktorem v diferenciaci naivních T-lymfocytů do Th1 subtypu a také zvyšuje expresi genu pro DPP-4. Proto je DPP-4 důležitým faktorem v aktivaci buněk imunitního systému [133, 134]. Je jen málo studií, které zkoumají vztah různých variant genu DPP-4 ke vzniku různých metabolických onemocnění. V roce 2009, Bouchard et al. analyzoval jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) u genu DPP-4 a hledal asociace s krevním tlakem, sérovými koncentracemi lipidů u obézních pacientů s otázkou, zda mohou polymorfismy genu DPP-4 vysvětlit individuální riziko vzniku metabolických komplikací u obézních pacientů. Tři z analyzovaných jednonukleotidových polymorfismů ukázaly pozitivní signifikantní asociaci se sérovými koncentracemi celkového cholesterolu a triglyceridy. Naopak u žádného ze studovaných polymorfismů a kardiovaskulárních rizikových faktorů se neprokázala asociace s relativní genovou expresí genu DPP-4 ve viscerální tukové tkáni [135].

U myši s vyřazeným genem pro DPP-4, které byly krmeny vysokotukovou dietou,

došlo ke zlepšení inzulínové rezistence a poklesu glykémie v orálním glukózovém tolerančním testu (oGTT). Tato zvířata měla vyšší sérové koncentrace GLP-1 a inzulínu oproti kontrolní skupině bez vyřazeného genu [136]. Podobné zlepšení glukózové tolerance a zvýšené sérové koncentrace GLP-1 a leptinu bylo pozorováno u obézních myší Dark Agouti s chybějící DDP-4 genem [137]. Jiná práce prokázala, že myši s vyřazeným genem pro DPP-4 měly vyšší rychlost maturace adipocytů a vyšší expresi genů, které se podílejí na vychytávání triacylglycerolů z cirkulace, a vyšší expresi PPAR- γ receptorů, koncentrace adiponektinu a leptinu. To bylo spojeno s nižším zánětlivým profilem v tukové tkáni v podobě snížení exprese TNF- α , IL-6, PAI-1 a CCL-7 [138].

2.3.9 Leptin

Leptin je proteinový hormon, který je syntetizován primárně v bílé tukové tkáni, odkud je secernován do cirkulace. Vzhledem k tomu, že jeho tvorba je přímo úměrná množství tukové tkáně, představuje leptin cirkulující hormonální signál, který informuje hypothalamické centrum sytosti o stavu tukových zásob v organismu, čímž se v zásadní míře podílí na regulaci energetického příjmu a výdeje [139]. Sérové koncentrace leptinu [140] a jeho mRNA exprese v tukové tkáni jsou zvýšené u obézních pacientů [141]. Leptin hraje důležitou roli v glukózové homeostáze, kdy v játrech a příčně pruhovaném svalstvu zlepšuje inzulínovou senzitivitu a reguluje funkci pankreatických β -buněk [142]. Předpokládá se, že leptin má i prozánětlivé účinky, jelikož jeho struktura je podobná jiným cytokinům (obzvláště IL-6) a jeho receptor patří do třídy 1 cytokinových receptorů [143]. Leptin nejen přispívá k produkci jiných prozánětlivě působících cytokinů, jako jsou IL-2 a IFN- γ , ale také inhibuje produkci protizánětlivě působícího cytokinu IL-4 [144]. Současně jsou cirkulující sérové koncentrace leptinu a jeho mRNA exprese v tukové tkáni zvyšovány prozánětlivě působícími cytokiny (TNF- α , IL-1 a endotoxin (lipopolysacharid - LPS)) [145]. Lze tedy říci, že leptin přímo spolupůsobí na vznik subklinického zánětu v tukové tkáni a naopak faktory, které jsou při subklinickém zánětu ve zvýšené míře produkovány, dále zvyšují jeho tvorbu. Tímto mechanismem působí leptin na perzistenci chronického subklinického zánětu u obézních pacientů [143]. Etiologická a patogenetická úloha leptinu při vzniku obezity a jejich komplikací zůstává i přes výše uvedené údaje spíše sporná, přestože část vědců prosazuje koncept rezistence

na účinky leptinu jako jednu z možných příčin obezity [146].

2.3.10 Rezistin

Rezistin je dalším adipokinem, který je produkován adipocyty. V myších modelech působí prozánětlivě a zároveň snižuje citlivost na inzulín. Sérové koncentrace rezistinu jsou zvýšené u obézních myší a pozitivně korelují s parametry inzulínové rezistence [147, 148]. Nedostatek, či úplné chybění rezistinu chrání myši před hyperglykemií indukovanou dietou zvýšením aktivity AMP-kinázy a snížením exprese enzymů glukoneogeneze v játrech [149]. V experimentu na myších navíc rezistin inhiboval procesy zahrnuté do intracelulárního přenosu signálu z inzulínového receptoru v myších 3T3-L1 adipocytech a indukoval zvýšenou expresi supresorového genu SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling 3), známého inhibitoru inzulínové signální kaskády [150]. Několik studií na lidských dobrovolnících dokumentovalo těsnou vazbu mezi zvýšenými sérovými koncentracemi rezistinu a obezitou, inzulínovou rezistencí nebo diabetes mellitus 2. typu [151-153]. Na druhou stranu jiné práce ukazují, že cirkulující sérové koncentrace rezistinu a jeho genová exprese v adipocytech nejsou u lidí asociovány s inzulínovou rezistencí [154, 155]. Na rozdíl od myší je lidský rezistin exprimován primárně v buňkách mononukleárního systému a to převážně v makrofázích a působí tak spíše jako cytokin než čistý adipokin. [155]. Je přitom zajímavé, že v experimentu na myších, kterým byl podáván humánní rezistin získaný z makrofágů, došlo ke zhoršení subklinického zánětu v tukové tkáni a inzulínové rezistence [156].

Kromě adipokinů produkuje tuková tkáň velké množství cytokinů. Tyto látky většinou glykoproteinové povahy mají celou řadu biologických funkcí. Účastní se převážně imunitních dějů a jejich účinek je obvykle pleiotropní (působí současně na více procesů) a redundantní (existuje více cytokinů se stejným nebo podobným účinkem). V tukové tkáni obézních pacientů dochází k rozvoji subklinického zánětu charakterizovaného zvýšenou sekrecí prozánětlivě působících cytokinů a chemokinů [157, 158]. Celá řada z těchto prozánětlivých faktorů, mezi které můžeme počítat monocytární chemotaktický protein-1 (MCP-1), tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) a interleukin-8 (IL-8), se může podílet na vzniku inzulínové rezistence [159-161]. Sérové koncentrace IL-6 jsou zvýšené u

mužů s nadváhou, kdy tyto hodnoty pozitivně korelují s viscerální obezitou, zatímco sérové koncentrace TNF- α pozitivně korelují s celotělovou obezitou [162]. Ukazuje se, že sérové koncentrace IL-6 pozitivně korelují se stupněm obezity, která je hodnocena pomocí BMI, velikostí adipocytů a procentem tuku v organismu [163]. Tato zjištění naznačují možnou roli tukové tkáně v regulaci sekrece IL-6 u obézních pacientů s centrálním (viscerálním) typem obezity [164]. IL-6 vykazuje nejen prozánětlivé, ale i protizánětlivé účinky zvýšením produkce imunoglobulinů B-lymfocyty a aktivací cytotoxické aktivity T-lymfocytů. Mezi jeho další funkce patří stimulace produkce trombocytů, ovlivnění endoteliální funkce a indukce syntézy reaktantů akutní fáze v játrech prostřednictvím zvýšení aktivity nukleárního faktoru kappa B (NF κ B) [165].

2.3.11 TNF- α

TNF- α je další prozánětlivý cytokin, který se může podílet na vzniku obezity a inzulínové rezistence [159]. Jeho genová exprese je zvýšená u obézních pacientů a pozitivně koreluje s parametry inzulínové rezistence [159]. V experimentu na myších mělo podávání TNF- α za následek vznik inzulínové rezistence v tukové tkáni [166], zatímco delece genu pro TNF- α a jeho receptory vedla u obézních myší ke zlepšení inzulínové senzitivity [167]. S přihlédnutím k výše uvedenému je nutno zmínit, že korelace mezi sérovými koncentracemi TNF- α a inzulínovou rezistencí je relativně slabá [159, 168] a ani chronická neutralizace TNF- α protilátkami nezlepšila u obézních pacientů s metabolickým syndromem inzulínovou rezistenci i přes příznivé ovlivnění subklinického systémového zánětu [169]. Bernstein et al. [170] ve své práci dokumentovali, že podávání antagonistů TNF- α nevedlo u lidí ke zlepšení inzulínové senzitivity. Absence efektu na inzulínovou senzitivitu může být dána kompenzatorním působením jiných prozánětlivých cytokinů produkovaných tukovou tkání. TNF- α je součástí sítě prozánětlivých faktorů a jeho role je nejspíše v aktivaci cytokinové signální kaskády, která zahrnuje synergické a inhibiční reakce, jež regulují syntézu a expresi jiných cytokinů, hormonů a jejich receptorů [171].

2.4 Subkutánní a viscerální tuková tkáň (u zdravých a obézních jedinců)

V dnešní době je všeobecně akceptováno, že tuková tkáň není homogenní tkání se

stejnými metabolickými účinky, ale skládá se z odlišných frakcí s různou metabolickou aktivitou [172, 173]. Zvýšení množství tukové tkáně v abdominální oblasti je rizikovým faktorem pro vznik metabolických onemocnění, zatímco zvýšení tukové tkáně v gluteo-femorální oblasti je považováno za relativně protektivní [174]. Z klinického hlediska lze říci, že body mass index (BMI, kg/m²) necharakterizuje jednoznačně (optimálně, komplexně, dokonale) obezitu a nekoreluje s obsahem tuku v různých tělesných kompartmentech a to především ve viscerální tukové tkáni [175]. Naproti tomu obvod pasu, obvod boků, poměr obvodu pasu k obvodu boku a poměr výšky k obvodu pasu byly nepřímými ukazateli množství podkožní a viscerální tukové tkáně. Korelace obvodu pasu a obvodu boků s množstvím tukové tkáně byly ověřeny i pomocí zobrazovacích metod, jako je DXA, výpočetní tomografie a magnetická rezonance [175-177]. Rozsáhlé studie u dětí a dospělých prokázaly, že jedinci se stejným BMI mohou mít různě vyjádřené riziko vzniku metabolických onemocnění [178, 179]. Jedním z vysvětlení může být, tak jak popsal Vague v roce 1956, různé anatomické uspořádání tukové tkáně v odlišných tělesných kompartmentech organismu. Mezi základní depa bílé tukové tkáně patří viscerální tuková tkáň (VAT), která je centrálně lokalizovaná v dutině břišní a oddělená peritoneem, podkožní tuková tkáň (SAT), která je lokalizovaná přímo pod kůží a konečně ektopická tuková tkáň, která je uložena v kompartmentech organismu, které přímo nesouvisí se skladováním tuků [180]. Podkožní tuková tkáň (SAT) tvoří více než 80% celkového tělesného tuku a zahrnuje gluteální, femorální a abdominální tukovou tkáň, kterou ještě můžeme rozdělit Scarpeovou fascií na superficiální tukovou tkáň (sSAT) uloženou pod epidermis a hlubokou podkožní tukovou tkáň, která naléhá na peritoneum a je viditelná na vyšetření provedeném výpočetní tomografií [181]. Mezi 10-20% z celkového tělesného tuku připadá na intraabdominální, viscerální tuk (VAT), který je přítomen v blízkosti vnitřních orgánů, které různou měrou obklopuje. Další tukové zásoby jsou přítomny v retroperitoneu, kde je přítomno odhadem 31-42% z celkového intraabdominálního tuku [182]. V širším smyslu lze mezi podtypy tukové tkáně zařadit také ektopicky uložený tuk například v játrech, pankreatu či svalu. Lokální regulační úlohu může mít epikardiální tuková tkáň lokalizovaná kolem srdce a perinefrotická a perivaskulární tuková tkáň, která obklopuje krevní cévy. K nárůstu frakce ektopické tukové tkáně vede nemožnost dalšího skladování tuků v podkožní tukové tkáni (SAT), což má za následek nadměrné skladování tuků v orgánech, kde se normálně nevyskytuje [180]. Kromě výše uvedeného se tuková

depa liší i velikostí adipocytů. Obecně jsou adipocyty menší ve viscerální tukové tkáni a podkožní tukové tkáni štíhlých a zdravých jedinců s nadváhou oproti obézním nezávisle na pohlaví [183]. Ačkoliv je podkožní tuková tkáň považována za bezpečnější a méně metabolicky škodlivou, bylo prokázáno, že velké adipocyty podkožní tukové tkáně byly asociovány se vznikem inzulínové rezistence a vysokým rizikem vzniku diabetes mellitus 2. typu. Toto naznačují i recentní práce u pacientek s Roux-en-Y-gastrickým bypassesem, které ukázaly, že redukce masy podkožní tukové tkáně a velikosti adipocytů byly spojeny se zlepšením inzulínové senzitivity [184]. V hlubších vrstvách podkožní tukové tkáně ve srovnání s vrstvami povrchovějšími jsou adipocyty malé s trendem ke zvyšování průměru směrem od povrchu do břišní dutiny [185]. Garaulet et al. pozoroval, že adipocyty podkožní tukové tkáně byly větší než adipocyty periviscerální, zatímco nebyly pozorovány rozdíly mezi adipocyty podkožní tukové tkáně a omentálními adipocyty [183]. S přihlédnutím na stromální vaskulární frakci (SVF) je počet buněk SVF vyšší ve viscerální tukové tkáni, než v podkožní tukové tkáni [185]. Viscerální tuková tkáň obsahuje vyšší počet B-lymfocytů, T-lymfocytů, NK-buněk, zřejmě i v souvislosti s vyšší přítomností lymfatických uzlin. Bylo prokázáno, že lymfocyty ve viscerální tukové tkáni reprezentují spíše vrozenou imunitu, zatímco lymfocyty přítomné v podkožní tukové tkáni se spíše podílí na imunitě získané [186]. Při srovnání povrchových vrstev a hlubších vrstev podkožní tukové tkáně se ukázalo, že hlubší vrstvy podkožní tukové tkáně měly vyšší zastoupení CD3+ lymfocytů, což někteří autoři připisují snížené adipogenní aktivitě a menší velikosti adipocytů [185]. Změna v počtu a typu lymfocytů může předcházet infiltraci makrofágy a následnému prozánětlivému stavu [187]. Počet makrofágů je signifikantně vyšší ve viscerální tukové tkáni ve srovnání s podkožní tukovou tkání, ale nikoliv ve srovnání hlubších vrstev a povrchovějších vrstev podkožní tukové tkáně u zdravých jedinců s nadváhou [188]. U obézních jedinců dochází k větší infiltraci tukové tkáně makrofágy, a to více v hlubších vrstvách podkožní tukové tkáně ve srovnání s povrchovými vrstvami podkožní tukové tkáně [189]. Infiltrace makrofágy pozitivně korelovala s velikostí adipocytů, jak v podkožní tukové tkáni, tak i tukové tkáni viscerální a to nezávisle na obezitě, ale při větší přítomnosti hypertrofických adipocytů, jak bylo prokázáno na myších s vyřazeným genem pro hormon-senzitivní lipázu [190].

Akumulace tukové tkáně je závislá na proliferaci preadipocytů a jejich diferenciaci

v nové adipocyty a hypertrofii již existujících adipocytů. Starší práce definovaly fenotyp obézních stran celularity tukové tkáně, jako „hyperplastický“ a „hypertrofický“ [191], který je ovlivňován vlivy dietními, genetickými, faktory inzulínové senzitivity, fyzickou aktivitou a vlivy environmentálními [192]. Hyperplázie, zvýšení počtu buněk a hypertrofie, zvýšení velikosti buněk jsou dva základní mechanismy růstu tukové tkáně. Hypertrofie předchází hyperplazii, pokud je schopnost buněk ukládat lipidy již vyčerpaná [193]. V pokusu na buněčných kulturách preadipocyty podkožní tukové tkáně proliferovaly podstatně rychleji než preadipocyty získané z omentálního tuku a tato rychlost proliferace nebyla závislá na BMI a pohlaví [194]. I přes výše uvedené zůstává nejasné, jaký děj (hypertrofie versus hyperplazie) je dominujícím faktorem v růstu tukové hmoty. Recentní práce na pacientech, kteří podstoupili omentektomii a bariatrický výkon prokázaly, že hmotnost omenta je primárně determinována počtem adipocytů a v menší míře velikostí adipocytů, což předpokládá, že zvýšení masы viscerální tukové tkáně u obézních jedinců závisí převážně na proliferaci adipocytů [195].

Termín adiposopathie („nemocný tuk“) je definován jako dysfunkce tukové tkáně způsobená pozitivní kalorickou balancí a inaktivním způsobem života u geneticky predisponovaných jedinců. Anatomicky a morfologicky je adiposopathie charakterizovaná hypertrofií adipocytů a akumulací tuku ve viscerální oblasti [196]. Patofyziologicky se adiposopathie manifestuje dysfunkcí adipocytů a endokrinologickými a imunologickými poruchami v tukové tkáni, které se mohou podílet na vzniku metabolických a kardiovaskulárních onemocnění [196]. Podkožní (SAT) a viscerální (VAT) tuková tkáň jsou často popisovány jako dva odlišné orgány s rozdílnou genetickou linií buněk, jejichž zvýšená akumulace má na organismus odlišný dopad [197]. Periferní SAT je často popisována jako „protektivní“ [198], VAT oproti tomu jako „patologická“ [199]. Lze ale říci, že toto hrubé dělení je značně zjednodušené, protože protektivní i patologické účinky má jak SAT, tak i VAT. Množství SAT i VAT je globálně zvýšeno při pozitivní kalorické balanci [198]. Naproti tomu je velikost adipocytů regulována nezávisle na změnách rozložení tukových zásob v organismu [200]. Od konce dvacátých let minulého století je známo, že centrální obezita a zvýšená akumulace viscerálního tuku pozitivně korelují s metabolickými onemocněními a zvýšeným kardiovaskulárním rizikem [201]. V rámci mezinárodních definic metabolického syndromu je centrální obezita uváděna jako

jedno ze základních diagnostických kritérií (společně s jinými kritérii jako hyperglykémie, hypertenze a dyslipidémie) [201]. SAT a VAT se liší buněčným zastoupením, fyziologickými, endokrinologickými a imunologickými funkcemi, inervací, krevním průtokem a metabolickou aktivitou [197], což do značné míry vysvětluje, proč zvýšená akumulace VAT souvisí s negativními metabolickými následky. Na druhou stranu bylo prokázáno, že hluboké vrstvy SAT v abdominální oblasti jsou silným prediktorem globální inzulínové rezistence, jaterní inzulínové rezistence, vyššího Framinghamského skóre (Framingham Risk Score) a vykazují vyšší expresi prozánětlivě působících lipogenetických a lipolytických genů [202]. VAT je popisována jako více patogenní a metabolicky aktivnější než SAT v důsledku vyššího stupně bazální lipolýzy v adipocytech viscerálního tuku, vyšší senzitivity k působení katecholaminů a naopak menší senzitivity k působení inzulínu [203], což vede k většímu uvolňování lipotoxických volných mastných kyselin. Venózní část řečiště viscerální tukové tkáně je drénována prostřednictvím portálního oběhu do jater, kam jsou transportovány volné mastné kyseliny, které svým lipotoxickým účinkem způsobují inzulínovou rezistenci a dyslipidémii [203]. Ačkoliv některé studie předpokládají, že VAT je méně senzitivní na antilipolytický účinek inzulínu [197], jiné práce zmiňují, že aktivita inzulínové signální kaskády může být ve VAT větší než v SAT [204]. Stran krevního zásobení se udává, že z VAT se krev vrací převážně přes portální systém jater, zatímco ze SAT se drénuje přes portální i systémový venózní oběh. Vzhledem k tomu, že SAT obsahuje cca 80% z celkové hmoty tukové tkáně organismu ve srovnání s 20% VAT, je zřejmé, že převážná většina cirkulujících volných mastných kyselin, které jsou transportovány do extrahepatálních orgánů (např. svalstvo), pochází ze SAT [205, 206]. Z těchto poznatků lze soudit, že vzhledem k tomu, že extrahepatální lipotoxicita se velkou měrou podílí na celkové inzulínové rezistenci v organismu, je SAT do jisté míry více „patogenní“ než VAT. Některé práce poukazují na to, že i přes chirurgické odstranění omentálního (viscerálního) tuku nedošlo ke zlepšení inzulínové senzitivity a kardiovaskulárních rizikových faktorů u obezních pacientů [207]. Proto i přes zjištění, že VAT je metabolicky aktivnější tkáň, musíme tuto problematiku hodnotit v širším kontextu. Ukazuje se, že nejúčinnější metody bariatrické chirurgie na zlepšení negativního metabolického profilu a metabolických abnormalit jsou takové, které mají za následek celkové snížení tělesného tuku [208]. Nárůst množství jak viscerální tak podkožní tukové tkáně vede k patologickým procesům, které mají za následek perikardiální a

perivaskulární akumulaci tuku a tukovou infiltraci jater, kosterního svalstva, pankreatu, srdce a ledvin [209, 210].

Zatímco celkové množství tukové tkáně v organismu je důležité pro vznik inzulínové rezistence a s obezitou asociovaných onemocnění, je evidentní, že specifická tuková depa úzce souvisí s rizikovými faktory různých metabolických onemocnění [211]. Podkožní a viscerální depa vykazují značnou interindividuální variabilitu v závislosti na věku, stavu výživy a rase. Akumulace viscerální tukové tkáně souvisí s androidní obezitou a je nezávislým rizikovým faktorem pro vznik metabolických a kardiovaskulárních onemocnění, zejména inzulínové rezistence, diabetes mellitus 2. typu, vysokých sérových koncentrací triacylglycerolů, nízkých koncentrací HDL-cholesterolu, arteriální hypertenze, metabolických a onkologických onemocnění [212]. V pokusu na myších mělo odstranění viscerální tukové tkáně za následek zlepšení inzulínové senzitivity a oddálení vzniku diabetes mellitus 2. typu [213]. Premenopauzální ženy, které mají větší množství podkožní tukové tkáně a vyšší inzulínovou senzitivitu, jsou více chráněny před vznikem metabolických a kardiovaskulárních onemocnění [214, 215]. Asociace mezi množstvím viscerální tukové tkáně a metabolickými onemocněními byla prokázána v řadě epidemiologických studií, kde se používala řada indexů, které přímo korelují s množstvím viscerální tukové tkáně, jako je poměr obvodu pasu k poměru boků, nebo poměr boku k výšce. Studie Health ABC, která byla prováděna na více než 3000 dospělých a ve které byla měřena viscerální tuková tkáň pomocí počítačové tomografie, prokázala, že viscerální tuková tkáň je asociována s rizikem metabolického syndromu u lidí s normální tělesnou hmotností a u obézních jedinců [216]. Tato studie také prokázala odlišné role podkožní tukové tkáně v závislosti na různých lokalizacích: podkožní tuková tkáň v oblasti břicha byla přímo spojena s rozvojem metabolického syndromu, zatímco podkožní tuková tkáň v gluteo-femorální oblasti byla inverzním vztahem spojena s výskytem metabolického syndromu u obézních žen a mužů [217]. Mechanismy zodpovědné za možnou roli viscerální tukové tkáně ve vzniku metabolických onemocnění zahrnují pravděpodobně změnu rychlosti lipolýzy, společně se zvýšenou citlivostí ke katecholaminům, směřování volných mastných kyselin do jater cestou v. portae, akumulace prozánětlivých buněk a alterace v produkci prozánětlivě a protizánětlivě působících cytokinů, nižší angiogenní kapacitu a hypoxii [180, 212].

V poslední době je často diskutována role ektopicky uložené tukové tkáně ve vztahu k rozvoji metabolických onemocnění. Předpokládá se, že ektopická tuková tkáň v játrech a svalech se zásadní měrou podílí na vzniku inzulínové rezistence a diabetes mellitus 2. typu u dospělých, adolescentů a dětí. V poslední době přibývají důkazy, že důležitou roli ve vzniku inzulínové rezistence může hrát i perikardiální, periaortální, intramyokardiální a perirenální tuková tkáň [180].

2.5 Subklinický zánět u obezity a jeho význam při vzniku kardiovaskulárních komplikací

Současné poznatky ukazují, že celá řada prozánětlivě působících faktorů uplatňujících se při vzniku obezitou podmíněného subklinického zánětu je asociovaná s rozvojem aterosklerózy, kardiovaskulárních onemocnění, diabetes mellitus 2. typu a se zvýšeným kardiometabolickým rizikem [218]. Dosud není zcela objasněn přesný vztah mezi subklinickým zánětem a akcelerací procesu aterosklerózy [219] nebo rozvojem arteriální hypertenze [220]. V současnosti je některými autory přijímána hypotéza, že chronická stimulace imunitního systému vede k posunu směrem k prozánětlivému metabolickému profilu [221]. Tyto alterace v imunitním systému se nejspíše v největší míře týkají deregulace v adaptivní imunitě a to převážně v její T-buněčné složce [221]. Subklinický zánět je v kontextu kardiovaskulárních onemocnění charakterizovaný zvýšenými sérovými koncentracemi prozánětlivě působících cytokinů a jiných proteinů a faktorů akutní fáze, které svým negativním vlivem na metabolismus mohou způsobovat či zhoršovat již existující kardiovaskulární onemocnění.

Ještě před třiceti lety byla ateroskleróza vnímána jako proliferativní proces [222], nejnovější poznatky ale ukazují, že subklinický zánět je jedním z klíčových mechanismů vzniku aterosklerózy [223]. Pickup et al. ve své studii ve skupině pacientů s diabetem 2. typu prokázal, že zvýšené sérové koncentrace IL-6, CRP a sérového kortizolu pozitivně korelovaly s výskytem metabolického syndromu [224]. Obdobně ve studii IRAS (The Insulin Resistance Atherosclerosis Study), která byla provedena u pacientů bez diabetu, byl prokázán přímý vztah mezi zvýšeným počtem leukocytů, CRP a fibrinogenu a složkami metabolického syndromu [225]. Metaanalýza prospektivních studií, která zkoumala vztah mezi prozánětlivými faktory a ischemickou chorobou srdeční, prokázala pozitivní korelaci mezi sérovými

koncentracemi CRP, fibrinogenu, albuminu a celkovým počtem leukocytů a rychlostí vzniku ischemické choroby srdeční [226].

Různé studie ukazují, že subklinický zánět může být v příčinné souvislosti se vznikem a progresí kardiovaskulárních onemocnění [223, 227]. Prozánětlivé mediátory mohou akcelarovat procesy vedoucí k ruptuře aterosklerotického plátu, což může vyústit v trombózu s následnou ischemií [228]. Mezi klíčové faktory, které jsou v současnosti považovány za nezávislé prediktory ischemické choroby srdeční, patří IL-6 [229], fibrinogen [230] a C-reaktivní protein [231], které mohou být užity jako biomarkery vzniku tohoto onemocnění [232]. V aterosklerotických plátech byla prokázána vyšší exprese IL-6, což může souviset s rychlejší progresí procesu aterosklerózy. Kromě toho byla produkce IL-6 zjištěna i v endotelu cév a buňkách hladkého svalstva [233]. IL-6 stimuluje monocyty a podílí se na zvýšeném ukládání fibrinogenu ve stěně cév, kde dochází ke snížené aktivitě lipoproteinové lipázy, což zvyšuje influx lipidů do makrofágů. V jiné studii autoři prokázali, že zvýšení sérových koncentrací IL-6 nad 5 ng/ml je spojeno s vyšší mortalitou pacientů, než při sérových koncentracích pod 5 ng/ml. Toto zjištění naznačuje, že IL-6 je silný nezávislý prediktor ischemické choroby srdeční [234].

TNF- α hraje důležitou roli při vzniku endoteliální dysfunkce a jeho zvýšené koncentrace byly zjištěny u pacientů se srdečním selháním [235]. Zvyšuje adhezi imunokompetentních buněk k endoteliím cévní stěny, zhoršuje oxidační stres a urychluje proces apoptózy, což může ve svém důsledku vést k trombóze a ischemické chorobě srdeční [236].

3. Buňky imunitního systému a tuková tkáň

3.1 Subpopulace buněk imunitního systému v tukové tkáni

Z morfologické a funkční příbuznosti imunitního systému a metabolických reakcí lze vypozařovat z evolučního hlediska jisté shody již u vícebuněčných organismů. U hmyzu určité orgány obsahující tuk exprimují na svém povrchu receptory pro bakteriální a mykotické antigeny (Toll receptory), které jsou zodpovědné za přirozenou imunitu [237]. Toll receptory aktivují signální kaskádu NF κ B, která vede k sekreci antimikrobiálních peptidů a aktivaci obranných mechanismů [238]. Tyto orgány mají zároveň skladovací funkci pro tuky [239]. U obratlovců jsou tyto funkce

rozděleny mezi játra, tukovou tkáň a kostní dřeň. Ačkoliv se doposud předpokládalo, že játra a kostní dřeň jsou hlavními orgány, které se podílejí na těchto imunitních reakcích, recentní data ukazují, že tuková tkáň se podílí na imunitních reakcích více, než se dosud předpokládalo [240].

Z histologického hlediska se tuková tkáň skládá ze 2 odlišných buněčných populací – adipocytů (vyzrálých tukových buněk) a interadipocytární stromální-vaskulární frakce, která je tvořena extracelulární matrix s disperzně uloženými fibroblasty, preadipocyty (nezralé prekurzory adipocytů), endoteliálními buňkami a buňkami imunitního systému [5]. Buňky, které jsou stálou součástí tukové tkáně, obsahují prakticky všechny typy buněk imunitního systému a hrají důležitou roli v odstraňování apoptotických buněk, buněčného detritu a podílejí se na udržování tkáňové homeostázy [241]. Nadměrné ukládání tuku vede ke změně v počtu a funkci imunitních buněk a zvyšuje se i aktivita některých z těchto buněk (jmenovitě makrofágů, žírných buněk, neutrofilů a T- a B-lymfocytů). Zároveň se snižuje počet eozinofilů a některých podtypů T-lymfocytů (T helper (Th2), Treg a iNKT buněk) [242]. Zánět tukové tkáně není spojen pouze s akumulací tukové tkáně, ale je pozorován i u rychlé redukce hmotnosti tukové tkáně, např. u krátce trvající kalorické restriktce [243]. U pacientů, u kterých jsou velmi malé či téměř vyčerpané tukové zásoby (například pacienti s mentální anorexií), byla také prokázána zvýšená produkce prozánětlivých adipokinů [244]. Na progresi subklinického zánětu v tukové tkáni se mohou podílet i jiné faktory než zvýšení tělesné hmotnosti. Setkáváme se s ním například u jiných onemocnění s chronickým průběhem - chronické renální insuficience či jiných chronicky probíhajících onemocnění [245, 246].

Buňky imunitního systému jsou obecně kategorizovány do dvou linií v závislosti na místě jejich dozrávání. Myeloidní řada zahrnuje makrofágy, dendritické buňky (DCs), žírné buňky a granulocyty (neutrofil, eozinofil a bazofil), zatímco lymfoidní linie obsahuje T- a B-lymfocyty, NK-buňky a NKT-buňky (natural killer T-lymfocyty) [247]. Buňky myeloidní linie jsou považovány za hlavní součást vrozené imunity a konkrétně makrofágy jsou nejhojnějším typem buněk v tukové tkáni. Infiltrace tukové tkáně různými subtypy makrofágů je základním mechanismem rozvoje subklinického zánětu v této tkáni. Řada myeloidních buněk hraje důležitou roli ve vývoji získané imunity – dendritické buňky prezentují antigen pro efektorové buňky imunitního systému a řada cytokinů, které jsou produkovány makrofágy, žírnými buňkami a

neutrofilů je nezbytná pro aktivaci T- a B-lymfocytů [248]. Druhou největší frakcí v tukové tkáni obézních jedinců jsou lymfocyty, jejichž počet a aktivita se mění ještě před změnami počtu makrofágů a předpokládá se, že i vrozená imunita se podílí na progresi subklinického zánětu u metabolických onemocnění.

3.2 Změny endokrinní funkce a buněčného zastoupení v tukové tkáni u obézních pacientů

V současnosti je všeobecně přijímán koncept, že jedním z nejdůležitějších mechanismů vedoucích od obezity ke vzniku diabetes mellitus 2. typu a následným kardiovaskulárním komplikacím je rozvoj lokálního a systémového subklinického zánětu charakterizovaného zvýšenou infiltrací tukové tkáně buňkami imunitního systému a nadměrnou produkcí prozánětlivě působících faktorů s jejich následným uvolňováním do cirkulace [249]. Zánětem rozumíme sérii humorálních a buněčných reakcí, které jsou namířeny k obraně organismu proti různým inzultům (infekce, poškození tkání) a které mají za úkol návrat funkční integrity tkání a orgánů do původního stavu [242]. V akutní fázi zánětu a při počátečním poškození tkání se typicky zvyšuje uvolňování imunomodulačních molekul, mezi které patří cytokiny a chemokiny. Tyto faktory jsou produkovány makrofágy a žírnými buňkami v tkáních a vyvolávají chemotaxi neutrofilů v první fázi a makrofágů a lymfocytů ve fázi druhé z cirkulace do místa zánětu [242]. Infiltrující buňky imunitního systému v místě zánětu následně odstraňují infekční agens a zánětem poškozené buňky. Obecně lze říci, že zánět je charakterizován zvýšenými lokálními a systémovými koncentracemi cytokinů společně se zvýšeným počtem infiltrujících buněk imunitního systému, kdy v první fázi akutního zánětu svými funkcemi dominují neutrofilů, zatímco mononukleární buňky (převážně makrofágy) se více uplatňují v chronických fázích zánětu [248]. Prokázalo se, že obezita je spojena s mírným stupněm zánětu, který je chronický a sterilní – tj. není vyvolán žádným infekčním agens. Je charakterizován pouze mírným zvýšením cirkulujících prozánětlivých faktorů bez přítomnosti klinických známek zánětu (proto pojem „subklinický zánět“) [250]. Ukazuje se, že obezitou indukovaný subklinický zánět zasahuje do metabolických procesů na různých úrovních a může hrát jednu z klíčových rolí v rozvoji inzulinové rezistence [251]. Nová data ukazují, že tuková tkáň představuje významnou součást imunitního systému [240]. V tukové tkáni je trvale přítomno široké spektrum buněk imunitního systému, které se podílejí na odstraňování buněčného detritu, apoptotických buněk a udržování homeostázy i u

zdravých jedinců [241]. Excesivní akumulace tuku vede ke změnám v počtu a zastoupení imunokompetentních buněk, kdy se v tukové tkáni zvyšuje zastoupení makrofágů, žírných buněk, neutrofilů a T- a B-lymfocytů, zatímco některé buněčné typy jsou redukovány (eozinofily, některé podtypy T lymfocytů – T helper 2 (Th2), Treg a iNKT buňky) [242]. Kintscher a kol. prokázali, že akumulace T-lymfocytů v tukové tkáni předcházela infiltraci makrofágy, a že tato infiltrace T-lymfocyty může být primárním stimulem k chemoatrakci makrofágů do tukové tkáně [252]. Důležitý je i poměr Th1/Th2 lymfocytů, který spolurozhoduje o tom, jestli se imunitní reakce bude ubírat směrem k zánětlivým či protizánětlivým dějům [253]. Th1 lymfocyty jsou prozánětlivé a přispívají k diferenciaci nepolarizovaných M0 makrofágů směrem ke klasickému prozánětlivému M1 fenotypu. Na druhou stranu Th2-lymfocyty indukují protizánětlivou odpověď a vznik protizánětlivého M2 fenotypu makrofágů. Obezita indukovaná vysokým energetickým příjmem je spojena s posunem lokálního makrofágového spektra v tukové tkáni od protektivního M2 k prozánětlivému M1 fenotypu [254]. Dále bylo prokázáno, že většina makrofágů v tukové tkáni je odvozena od cirkulujících mononukleárních buněk, tj. ze zdrojů primárně lokalizovaných mimo tukovou tkáň [255, 256]. Periferní monocyty jsou do tukové tkáně atrahovány různými chemoatraktanty produkovanými hypertrofickými adipocyty, rezidenčními stromálními makrofágy a T-lymfocyty [257]. Hlavními působky, které se podílejí na migraci monocytů z cirkulace do tukové tkáně, jsou chemokiny působící prostřednictvím specifických receptorů [258, 259]. Některé práce prokázaly v tukové tkáni obézních jedinců zvýšenou genovou expresi celé řady z CC-rodiny chemokinů včetně CCL-2, CCL-3, CCL-5, CCL-7, CCL-8 a CCL-11, CCL-17, CCL-22 [243, 260-263]. Jelikož ve většině studií zvýšená exprese těchto chemokinů pozitivně korelovala s infiltrací tukové tkáně makrofágy, předpokládá se, že uvedené chemoatraktanty hrají stěžejní roli v chemotaxi mononukleárních buněk do tukové tkáně [258, 264]. Chemokiny působí přes chemokinové receptory (CCRs pro CC-chemokiny) [259]. Zvýšená genová exprese chemokinových receptorů CCR-1, CCR-2, CCR-3 a CCR-5 byla zjištěna v podkožní a viscerální tukové tkáni obézních, což představuje další potvrzení významu příslušných chemokinů pro vznik subklinického zánětu v tukové tkáni [263].

3.2.1 Makrofágy tukové tkáně a jejich úloha při progresi subklinického zánětu

Makrofágy jsou fagocyty trvale přítomné v tukové tkáni, které se kromě imunitních

reakcí v rámci vrozeného imunitního systému podílejí i na řadě úklidových a odklízecích reakcí v tukové tkáni [265]. Makrofágy tukové tkáně představují nejrozsáhlejší subpopulaci buněk imunitního systému, která obsahuje cca 5% ze všech buněk u potkanů s normální hmotností (10-15% ve viscerální tukové tkáni) a tento počet stoupá až k 50% zastoupení u obézních zvířat [187]. Počet makrofágů tukové tkáně u lidí je menší, ale pořád čítá cca 4% ve viscerální tukové tkáni u štíhlých jedinců se vzestupem na 12% u jedinců s obezitou [266]. První důkaz o významným zvýšení infiltrace tukové tkáně makrofágy a zvýšení produkce prozánětlivých cytokinů u obézních zvířat přinesla práce Xu a Weisberga v roce 2003 [187, 267]. Následně provedené práce u lidí potvrdily tyto nálezy a to nejvíce ve viscerální tukové tkáni, kde se ukázalo, že počet makrofágů tukové tkáně se zvyšuje v přítomnosti abdominální obezity a případná redukce hmotnosti u obézních jedinců má za následek i snížení počtu makrofágů [255, 266, 268]. Navíc bylo prokázáno, že infiltrace tukové tkáně makrofágy pozitivně koreluje nejen s BMI, ale také s velikostí adipocytů a expresí prozánětlivě působících faktorů ve stromo-vaskulární frakci, které jsou asociovány se vznikem inzulinové rezistence, jako je TNF- α , indukibilní NO-syntáza (iNOS) a IKK β [44, 269]. Navíc se předpokládá, že existuje přímý vztah infiltrace tukové tkáně makrofágy a jinými metabolickými a non-metabolickými onemocněními, jako je endoteliální dysfunkce a nealkoholická steatohepatitida [270, 271].

Nejvíce makrofágů, které infiltrují tukovou tkáň obézních, pochází převážně ze systémové cirkulace, nicméně se předpokládá, že malá část makrofágů vzniká z lokálních preadipocytů. Aktivované preadipocyty vykazují podobné antigenní charakteristiky, jako makrofágy s expresí antigenů F4/80, Mac1, CD80, CD86 a CD45. V *in vivo* a *in vitro* pokusech tyto aktivované preadipocyty, pokud se aplikovaly do peritoneální dutiny zvířat, měly schopnost fagocytózy [267, 272]. Přesné mechanismy, které se podílejí na iniciaci a přestupu makrofágů z cirkulace do tukové tkáně nejsou doposud zcela objasněny, ale předpokládá se, že spouštěcím mechanismem může být hypertrofie adipocytů s následnou nekrotizací, hypoxie tkáně, přeplnění adipocytů lipidy, zvýšený průnik endotoxinu do cirkulace a stres endoplazmatického retikula, které mohou aktivovat různé typy buněk imunitního systému [273]. Důležitou roli v atrakci buněk imunitního systému do tukové tkáně hraje komplexní síť cytokinů s chemotaktickým účinkem (chemokiny), které jsou

produkovány tukovou tkání a reagují s korespondujícími receptory na povrchu atrahujících buněk imunitního systému. Ačkoliv byla prokázána řada chemokinů, které se podílejí na stimulaci vstupu makrofágů do tukové tkáně, nejslibnější chemotaktická cesta zahrnuje monocytární-chemoatrahující protein 1/chemokine C-C motif receptor 2 (MCP1/CCR2), chemokine CX3C motif ligand 1/chemokine CX3C motif receptor 1 (CX3CL1/CX3CR1) a leukotriene B4/leukotrienový B4 receptor (LTB4/BLT1) [274]. MCP1 se ve zvýšené míře vyskytuje převážně v hypertrofických adipocytech. Po vazbě ligandu na CCR2 receptor na povrchu makrofágů je stimulována jejich migrace [275, 276]. Zvýšená exprese MCP1 vede k infiltraci tukové tkáně makrofágy, inzulínové rezistenci a jaterní steatóze, aniž by došlo ke zvýšení tělesné hmotnosti, zatímco delece genu pro MCP1, nebo makrofágového receptoru CCR2 snižuje počet makrofágů v tukové tkáni a zlepšuje inzulínovou senzitivitu [258]. Mezi další chemokiny, jejichž exprese v tukové tkáni je zvýšena a které pozitivně korelují se sérovými koncentracemi inzulínu, patří CCL3 (MIP1 α - macrophage inflammatory protein 1 α), CCL5, CCL (MCP3), CCL8 (MCP2), CCL11 (eotaxin) a CCL13 (MCP4) [260, 277].

Obezita mění nejen počet makrofágů v tukové tkáni, ale také jejich funkci a distribuci. V závislosti na antigenní výbavě makrofágů a produkci jejich cytokinů lze makrofágy rozdělit do dvou subpopulací – klasicky aktivované M1 a alternativně aktivované M2. V pokusech *in vitro* jsou M1 makrofágy stimulované prozánětlivými cytokiny, mezi které patří granulocytární a makrofágy stimulující faktor (GM-CSF), IFN γ a bakteriální lipopolysacharidy, což má za následek výraznou protizánětlivou a antibakteriální odpověď. K přesmyku směrem k M2 makrofágům dochází pod vlivem protizánětlivě působících cytokinů IL4, IL13 a IL10 a makrofágy stimulujícího faktoru (M-CSF), což v konečném důsledku vede k nasměrování makrofágů k protizánětlivému fenotypu [278, 279]. V tukové tkáni záleží typ polarizace makrofágů na stupni obezity. U štíhlých jedinců jsou makrofágy tukové tkáně disperzně a difúzně lokalizovány mezi adipocyty a to převážně s fenotypem M2. Tyto M2 makrofágy na svém povrchu primárně exprimují M2 antigeny, mezi které patří CD206 (manózoový receptor), CD209 a CD301 (Mg11/2) a produkují protizánětlivé cytokiny, jako IL10, antagonistu pro IL1-receptor (IL1Ra) a enzym arginázu 1, která blokuje aktivitu prozánětlivě působící iNOS [280]. M2 makrofágy mají i řadu dalších funkcí, jako je odklizení buněčného detritu, regulují proliferaci a diferenciaci

prekurzorů adipocytů, stejně tak, jako se podílejí na angiogenezi, termogenezi a remodelaci extracelulární matrix [269, 280]. Mezi nejdůležitější faktory pro regulaci aktivity M2 makrofágů patří IL4, který je nejvíce produkován eozinofily v tukové tkáni, a IL13, který je sekretován z Th₂ lymfocyty a NK buňkami [281]. Obezita vede ke snížení exprese těchto faktorů. Zároveň se zvyšuje exprese prozánětlivých antigenů, jako je F4/80, CD11b (integrin alpha M) a CD11c (integrin alpha X) se současnou produkcí prozánětlivých cytokinů TNF α , IL6 a NO-syntházy 2, což má za následek posun od protizánětlivých makrofágů M2 k prozánětlivým makrofágům M1 [282]. Tento posun není pravděpodobně způsoben transformací rezidentních M2 makrofágů v tukové tkáni, ale spíše zvýšenou infiltrací makrofágy z cirkulace a jejich diferenciací do M1 fenotypu [269]. Kromě změny fenotypu makrofágů dochází při obezitě i ke změně morfologie a lokalizace makrofágů. Zatímco jsou M2 makrofágy roztroušeny ve stromo-vaskulární frakci tukové tkáně, M1 makrofágy jsou nakupeny ve specifických shlucích, jejichž struktura připomíná korunu s okolními velkými lipidovými inkluzemi, které jsou zbytky nekrotických adipocytů [283]. Tato polarizace makrofágů významně zvyšuje systémový subklinický zánět a snižuje působení inzulínu. Počet CD11c+ makrofágů v periferní cirkulaci pozitivně koreloval s inzulínovou rezistencí a jejich odstranění zlepšilo inzulínovou rezistenci a snížilo lokální a systémovou produkci prozánětlivých faktorů [284, 285]. Jedním z potenciálních mechanismů tohoto negativního působení na účinky inzulínu je inhibice inzulínové signální kaskády faktorem TNF α , což má za následek downregulaci GLUT4 transportéru v adipocytech a zvýšenou produkci kolagenu s fibrózní remodelací extracelulární matrix s následnou infiltrací tukové tkáně makrofágy [282]. Je řada dalších faktorů, které se mohou podílet na posunu od M2 makrofágů k M1 makrofágům, mezi tyto faktory patří toll-like receptory (TLRs). Skupina toll-like receptorů aktivuje a moduluje vrozený imunitní systém v závislosti na stimulaci cizorodými patogeny. Jejich ligandy váží celou řadu infekčních antigenů, mezi které patří i bakteriální lipopolysacharid (LPS), který se váže na TLR4. U obézních myší byly prokázány vyšší sérové koncentrace cirkulujícího lipopolysacharidu, pravděpodobně díky zvýšené translokaci bakterií ze střeva. Naopak u myší s vyřazeným genem pro toll-like receptor byla prokázána snížená infiltrace tukové tkáně makrofágy a snížený počet prozánětlivých M1 makrofágů [286, 287]. Některé ligandy TLR4, které jsou schopné aktivovat protizánětlivou antibakteriální odpověď, obsahují ve své molekule nasycené mastné kyseliny, heat

shock proteiny a jiné látky, které jsou zvýšené u obezity a diabetes mellitus 2. typu [288]. Nadměrné přetížení lipidy je způsobeno nadměrným energetickým příjmem s následnou nedostatečnou kapacitou adipocytů tyto přebytečné tuky skladovat, což vede k indukci M1 makrofágů, stresu endoplazmatického retikula a aktivaci inflamozomů [289]. Naopak nenasycené mastné kyseliny řídí posun směrem k M2 makrofágům tím, že se váží na PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ). Podobný mechanismus účinku s pozitivními metabolickými a antidiabetickými vlivy je pozorován u skupiny léčiv tzv. PPAR γ agonistů – glitazonů [290, 291]. Metabolicky pozitivně působící adipokin adiponektin má také přímý vliv na polarizaci M2 makrofágů a jeho snížení v důsledku nárůstu tukové hmoty při obezitě může být jedním z faktorů, které jsou zodpovědné za buněčný posun od M2 protizánětlivých makrofágů směrem k M1 prozánětlivým makrofágům v tukové tkáni [292]. Na druhou stranu je potřeba říci, že neexistuje ostrá hranice mezi fenotypem M1 a M2 a to obzvláště u lidí (na rozdíl od řady experimentálních výsledků). U lidí byla prokázána simultánní exprese fenotypu M1 makrofágů (F4/80 a CD11c), stejně tak, jako M2 makrofágů (CD206 a CD301) [293].

3.2.2 Chemotaxe buněk imunitního systému do tukové tkáně

Chemokiny nazývané též chemotaktické cytokiny jsou malé heparin-vázající proteiny, které se přímo podílejí na pohybu cirkulujících leukocytů do místa infekce, či poranění. Dosud je u člověka známo více než 50 chemokinů, které se podle své struktury a funkce rozdělují do čtyř rodin [294, 295]. Systematická nomenklatura byla v posledních několika letech opakovaně upravována. Největší skupina chemokinů zahrnuje CC chemokiny nazvané podle těsného naléhání první dvou ze čtyř cysteinových zbytků. CC chemokiny do místa chronického zánětu přitahují mononukleární buňky. Nejlépe popsáným CC chemokinem je monocyto-chemoatrakční protein-1 (MCP-1), nazývaný také v systematické nomenklatuře „chemokinový ligand CCL2“. Jde o silný chemoatraktant pro monocyty, dendritické buňky, paměťové T buňky a bazofily. Mezi další chemokiny patří makrofágový zánětlivý protein-1 α (MIP)-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) a RANTES (CCL5). Je pravděpodobné, že dimery, nebo tetramery jsou aktivní formou řady CC chemokinů [296]. Druhá rodina chemokinů obsahuje CXC chemokiny, které obsahují jeden aminokyselinový zbytek vložený mezi první dva cysteinové zbytky. Některé CXC chemokiny, mezi které lze řadit např. interleukin-8 (CXCL8), patří mezi chemokiny,

kteřé do místa akutního zánětu přitahují polymorfonukleární monocyty. CXCL8 také aktivuje monocyty a může se podílet na přímé stimulaci vstupu těchto buněk do cévních lézí [297, 298]. Třetí skupinou chemokinů je CX₃C rodina, ve které je jediný člen fraktalkine (CX₃CL1). Ten je připojen k mucinovým můstkům transmembránových a cytoplazmatických oblastí, čímž se vytvoří receptory pro buněčnou adhezi [299, 300]. Tumor necrosis faktor (TNF)-α- konvertující enzym se může odštěpit od CX₃CL1 z povrchu membrány do oběhu a může působit, jako solubilní chemoatraktant [301, 302]. Chemokiny působí na efektorové buňky aktivací povrchových receptorů, které obsahují sedm transmembránových domén a jsou spřaženy s G-proteiny. Odpověď leukocytů na působení chemokinů závisí na komplementu chemokinových receptorů na povrchu leukocytů.

Monocytové chemoatrakční proteiny atrahují monocyty do místa traumatu, bakteriální či mykotické infekce a ischémie. Tyto proteiny obsahují skupinu navzájem podobných peptidů – CCL2, CCL7, CCL8 a CCL13, které jsou kódovány geny na chromozomu 17 [303]. CCR2 je jediný známý receptor pro CCL2 a CCL13 [304, 305], zatímco CCL8 se váže na receptory CCR2 a CCR5, chemokin CCL7 se váže na chemokinové receptory CCR1, CCR2 a CCR3. Studie na myších s vyřazeným genem pro CCL2 prokázaly, že CCL2 se významně podílí na regulaci infiltrace monocytů v průběhu zánětu [303]. Monocytové chemoatrakční proteiny navíc působí chemoatrakčně na eozinofily a bazofily a mohou indukovat degranulaci těchto buněk. Z toho lze usuzovat, že tyto buňky se významnou měrou podílejí i na alergických reakcích. Myši s delecí genu pro CCL2 měly defekt v produkci antigen prezentujících pomocných lymfocytů typu 2, které produkují protilátky [306], navíc myši s vyřazeným genem pro CCL2 (CCR2) měly závažný defekt v produkci interferonu-γ, cytokinu, který má důležitou roli v propagaci zánětlivého procesu [305]. U obézních myší cílené vyřazení genu pro CCL2 [307] a jeho receptoru CCR2 [308] vedlo ke snížení počtu makrofágů v tukové tkáni. Naopak zvýšená exprese CCL2 zvýšila infiltraci a počet makrofágů v tukové tkáni [264].

Chemokiny, mezi které patří CCL2, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CXCL5, CXCL8 a CXCL10, jsou zvýšeně produkovány v různých oblastech tukové tkáně. Sérové koncentrace těchto chemokinů jsou výrazně zvýšené u obézních ve srovnání se štíhlými jedinci. Exprese chemokinových receptorů CCR1, CCR2, CCR3 a CCR5 je zvýšena na prozánětlivých buňkách v omentální a podkožní tukové tkáni obézních

pacientů [309, 310]. Dalším chemokinovým receptorem, u něhož se předpokládá důležitá role v prozánětlivých pochodech u obézních jedinců, je chemokinový receptor CCR5. U obézních je významně zvýšena exprese CCR5 a jeho ligandů v bílé tukové tkáni u obézních myší, které byly krmeny vysokokalorickou stravou [263], což mělo za následek významnou infiltraci hypertrofické tukové tkáně makrofágy. Vyřazení genu pro CCR5 v myeloidních leukocytech je spojeno s výraznou redukcí infiltrace tukové tkáně monocyty s prozánětlivým účinkem a má protektivní vliv na vznik subklinického zánětu tukové tkáně u obézních myší [311]. Tato data předpokládají, že makrofágy tukové tkáně s expresí CCR5 se mohou podílet na obezitou-indukovaném prozánětlivém stavu tukové tkáně. Na druhou stranu studie Kennedyho et al. ukázala, že CCR5 může mít malou roli v regulaci M1 makrofágů tukové tkáně, ale zvyšuje influx CD4+ T-lymfocytů do hypertrofické tukové tkáně [312].

3.2.2.1 Chemokinový systém a jeho význam při rozvoji inzulínové rezistence

Inzulínová rezistence má stěžejní roli v patogenezi diabetes mellitus 2. typu a v posledních letech jsou objasňovány faktory, které jsou zodpovědné za vznik obezitou indukované inzulínové rezistence. Řada prací ukazuje, že chemokinový systém přímo spojuje obezitu se vznikem inzulínové rezistence, a to regulací funkční odpovědi makrofágů, stejně tak jako přímou kontrolou infiltrace tukové tkáně makrofágy prozánětlivého fenotypu M1 [313]. Genetickou manipulací provedená inaktivace signální osy CCL2-CCR2 [258, 308], nebo farmakologicky provedená inhibice této osy [314, 315] vedla ke zlepšení inzulínové senzitivity u obézních myší, zatímco zvýšená exprese CCL2 na myším modelu zhoršila inzulínovou rezistenci [264]. Jiné práce však prokázaly, že chybění CCL2 nezlepší žádné metabolické parametry [316]. Dalším chemokinovým receptorem, jehož vyřazení u myší vedlo ke zlepšení inzulínové rezistence, je CCR5. CCR5 $-/-$ myši, které byly krmeny vysokokalorickou dietou, prokázaly vyšší odolnost proti vzniku obezitou-indukované inzulínové rezistence a diabetu 2. typu [311]. V kontrastu s výsledky této studie je práce Kennedyho et al., který popsal, že CCR5 $-/-$ myši měly signifikantní systémovou glukózovou intoleranci [312]. CXC motif chemokinový ligand 5 (CXCL15) a jeho odpovídající chemokinový receptor CXCR2 se mohou také podílet na vzniku inzulínové rezistence. Sérové koncentrace CXCL5 jsou výrazně zvýšené u obézních jedinců ve srovnání se štíhlými [317]. Léčba obézních, inzulín rezistentních myší

pomocí neutralizujících protilátek anti-CXCL5, nebo antagonisty receptoru CXCR2 snížilo glykémii na lačno a zlepšilo inzulínovou senzitivitu. *Cxcr2* ^{-/-} myši byly chráněny proti vzniku inzulínové rezistence a diabetu [317, 318].

Zvýšená exprese CXC motifu chemokinového ligandu 14 (CXCL14) byla prokázána v bílé tukové tkáni obézních myší, které byly krmeny vysokokalorickou dietou. Genetickou manipulací navozená inaktivace CXCL14 zlepšila inzulínovou senzitivitu, ale pouze u samic, ale nikoliv u samců. Kromě toho byly CXCL14 deficientní myši chráněny od dietou-indukované hyperglykémie, hyperinzulínémie a hypoadiponektémie. Genetickou manipulací navozená zvýšená exprese CXCL14 v příčně pruhovaném svalstvu zhoršila u CXCL14 ^{-/-} myší inzulínovou rezistenci, což předpokládá, že CXCL14 je důležitým faktorem ve vychytávání glukózy do příčně pruhovaného svalstva [319]. Ačkoliv se předpokládá, že chemokinový systém se může zásadní měrou podílet na vzniku inzulínové rezistence navozením prozánětlivého stavu v tukové tkáni, CX3C chemokinový ligand 1 (CX3CL1) a jeho odpovídající chemokinový receptor CX3CR1 zvyšují inzulínovou sekreci v β -buňce pankreatu. Ostrůvky izolované z CX3CR1 deficientních myší produkovaly méně inzulínu v závislosti na různých stimulech. V *in vivo* pokusu, podání solubilního CX3CL1 zvýšilo sérové koncentrace inzulínu a zlepšilo glukózovou toleranci [320].

4. Imunitní systém a signalizační kaskáda TLRs (toll like receptorů)

Vrozený imunitní systém odpovídá na patogeny aktivací prozánětlivých kaskád, které mají za účel eradikovat infekční agens. Takzvané PRRs (pattern recognition receptors) patří mezi základní součásti vrozeného imunitního systému. V současné době je známa celá řada intracelulárních a extracelulárních PRRs. Mezi další důležité skupiny receptorů patří Toll-like receptory, Nod-like receptory a RIG-like receptory. Každý z PRRs (pattern recognition receptors) rozpoznává konzervované fragmenty patogenů, také označované, jako PAMPs (pathogen associated molecular patterns), které se vyskytují na povrchu gram-pozitivních a gram-negativních bakterií, DNA, RNA virů, hub a protozoí. V případě aktivace těmito molekulami dochází k produkci prozánětlivých cytokinů, chemokinů, interferonů, které mají za účel eliminovat patogen z organismu, dále k aktivaci fagocytózy a ovlivnění získaného (adaptivního) imunitního systému. V posledních letech přibývá důkazů, že funkce TLRs (toll-like receptors) není omezena pouze na vrozený a získaný imunitní

system, ale může se podílet i na funkci jiných orgánových kompartmentů, jako je např. trávicí trakt, kde tyto receptory interagují s komenzální mikroflórou a tím se mohou podílet na regulaci střevní homeostázy [321]. Nadměrná aktivace TLRs na druhou stranu vede k některým typům chronických a autoimunitních onemocnění, které postihují gastrointestinální trakt, centrální nervový systém, ledviny, kůži, plíce a klouby. Bylo již prokázáno, že TLRs nejsou aktivovány pouze exogenními, ale i endogenními ligandy, jako jsou obecně vzato faktory produkované při stresu, poškození buněk, či apoptóze [322, 323].

Teoretický koncept, že imunitní systém obsahuje specializované receptory, které jsou schopné rozpoznávat různé patogeny, byl postulován Janewayem et al. ještě před rozpoznáním a popsáním TLRs [324]. První popis toll proteinu u *Drosophily* a jeho funkci a vztahu k nastolení dorzoventrální polarity u embrya byl proveden v roce 1985 [325]. Na základě strukturální a funkční podobnosti mezi IL-1/NF- κ B prozánětlivou signalizační kaskádou u savců a dorzoventrální signalizační cestou u embryí *Drosophil* bylo zjištěno, že tyto cesty produkují řadu peptidů s antimykotickým a antibakteriálním působením. Prokázalo se, že Toll ligand Spz (Spätzle), který reguluje expresi antimykotických genů u dospělých much a který byl genetickou manipulací vyřazen, zásadní měrou snížil přežití při napadení mykotickým organismem [326]. V této studii bylo poprvé naznačeno propojení imunitního systému s imunitní odpovědí. Při hledání homologních proteinů u lidí identifikovaly zároveň dvě vědecké skupiny lidské TLRs, které mohou hrát klíčovou roli v aktivaci vrozeného a získaného imunitního systému [327, 328]. Dosud bylo popsáno u člověka deset různých TLRs a u ve velké většiny z nich jsou známy i jejich ligandy. Všechny tyto receptory mají podobnou základní strukturu typu 1 transmembránového glykoproteinového receptoru. Zatímco některé TLRs jsou lokalizované na buněčné membráně (TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10), jiné jsou přítomny v endosomech a proto jsou uloženy intracelulárně (TLRs 3, 7, 8, 9). N-terminální konec těchto receptorů obsahuje na leucin bohaté opakující se motivy (LRR – leucin-rich repeat) a tyto konce se váží na různé ligandy. Cytoplazmatické části jsou vysoce konzervované a tzv. Toll-IL-1R (TIR) vykazuje velkou funkční a strukturální podobnost mezi Toll proteiny *Drosophily* a IL-1R1 proteinem u savců [329]. TIR doména funguje jako regulační a váže adaptorové molekuly. Při navázání ligandu dochází k homodimerizaci, nebo heterodimerizaci TLRs a poté k přenosu signálu a signálních

molekul dovnitř buňky [330]. V současnosti jsou známy dvě regulační adaptorové cesty. V jedné cestě je hlavní regulační adaptorový protein MyD88, který se přímo váže na cytosolovou doménu TLR5, TLR 7, TLR8 a TLR9. K TLR2 a TLR4 protein MyD88 se váže na TLR-TIR doménu přes TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein) [331]. V závislosti na ligandech a signálních molekulách může aktivace signalizační cesty MyD88 přímo vést k indukci genové exprese přes transkripční faktory NF- κ B, AP (activating protein)-1, nebo IRF (interferon-response factor) 1, 5 a 7 [332-334].

Aktivace toll-like receptorů není působena pouze patogeny, ale i četnými endogenními mechanismy. Solubilní forma TLR2 byla prokázána u člověka a solubilní forma TLR4 byla nalezena u myši [335, 336]. Tyto solubilní formy receptorů mohou zablokovat TLRs odpověď, a to tím, že se naváží na koreceptory a ligandy. V uplynulých letech byla popsána již celá řada intracelulárních inhibitorů signálních cest toll-like receptorů, které inhibují odpovědi TLR a to systémem negativní zpětné vazby. Toll like receptory jsou exprimovány na celé řadě buněk imunitního systému, ale i na buňkách neimunitního charakteru. Dendritické buňky (DCs), neutrofilů a makrofágy exprimují na svém povrchu celou řadu toll-like receptorů. To, jakou bude mít buňka výbavu TLRs, do jisté míry i souvisí s místem, kde je buňka uložena. Funkčně aktivní TLRs byly prokázány i na buňkách centrálního nervového systému a ledvin, na kardiomyocytech a synoviálních fibroblastech. Aktivace TLRs byla zjištěna i u neinfekčních procesů, jako je traumatické, či ischemické poranění, nebo autoimunitní onemocnění [337-339].

4.1 TLR1

TLR1 je zakotven v cytoplazmatické membráně a tvoří heterodimer společně s TLR2 [340, 341]. Tento komplex TLR1/TLR2 rozpoznává triacetylované lipopeptidy, které jsou spojeny s peptidoglykanovou vrstvou bakterií, jako jsou *Mycobacterium tuberculosis*, nebo *Borrelia burgdorferi* [340, 342]. Bylo prokázáno, že bakterie *Neisseria meningitidis* potřebuje ke svému rozpoznání imunitním systémem navázání komplexu TLR1/TLR2 na vnější vrstvu buněčné membrány bakterie [343]. Kromě heterodimerizace s TLR1 s TLR2 bylo prokázáno, že TLR1 heterodimerizuje i s receptorem TLR10 [344]. Ligand tohoto komplexu je dosud neznámý. TLR1 je všudypřítomně exprimován v leukocytech, ale byl také nalezen v buňkách

neimunitního charakteru, jako jsou astrocyty, fibroblasty, keratinocyty [345], endoteliální buňky [346] a epiteliální buňky [347].

4.2 TLR2

Profil buněk, na kterých je TLR2 exprimován, je prakticky shodný s profilem TLR1 s tím rozdílem, že exprese TLR2 je výrazně zvýšená u monocytů, ale nízká u lymfocytů [347]. Regulace exprese TLR2 se liší v závislosti na tom, na jakém buněčném typu jsou exprimovány. V průběhu hojení rány, byla zvýšená exprese TLR2 v keratinocytech na rozdíl od exprese TLR1, TLR4, TLR6 [348]. Naproti tomu v monocytech 1,25-dihydroxy-vitamin D3 snižuje expresi TLR2, což snižuje aktivaci imunitní signální kaskády [349]. TLR2 heterodimerizuje s TLR1, TLR6, nebo s TLR10 [344]. Ligand pro komplex TLR2/TLR10 dosud nebyl identifikován. Zatímco komplex TLR1/2 rozpoznává triacetylované lipopeptidy, komplex TLR6/2 rozpoznává diacetylované lipopeptidy [350]. Bylo zjištěno, že ligandy pro TLR2 receptory jsou složky mikrobiální stěny, jako kyselina lipoteichoová, peptidoglykany, lipomanany a řada dalších molekul s různým spektrem složení [350, 351]. TLR2 rozpoznávají i proteiny z parazitů *Trypanosoma cruzi*, nebo *Schistosoma mansoni* [352, 353] a předpokládá se, že TLR2 receptory hrají důležitou roli v protivirové odpovědi a to obzvláště u herpetických virů [354, 355]. Kromě exogenních ligandů, váží TLR2 i celou řadu endogenních ligandů, jako je neurotoxin odvozený od eozinofilů [356], HMGB1 (high mobility group box) [357] a různé formy tzv. heat shock proteinů [358]. Univerzálnost TLR2 ve schopnosti vázat různé formy ligandů lze vysvětlit schopností tvořit heterodimery s jinými TLRs, čímž se zvýší jejich vazebná schopnost, např. CD14 zvyšuje odpovídavost TLR2 k jejich ligandům [359].

4.3 TLR3

TLR3 je exprimován na dendritických buňkách, makrofázích, žírných buňkách a NK-buňkách (natural killer cells). Jeho exprese byla zjištěna i na buňkách neimunitního typu, jako jsou fibroblasty, keratinocyty, astrocyty, oligodendrocyty, epiteliální a endoteliální buňky [345, 360, 361]. Původně se předpokládalo, že TLR3 je lokalizován pouze v endozomech, ale jeho exprese byla popsána i na povrchu jiných buněk, např. fibroblastů [362]. TLR3 váže dvoušroubovicovou RNA virů, ale i endogenní ligandy, které vznikají rozpadem nekrotických buněk [342, 360]. Podobně jako u receptoru TLR2 a TLR4 je odpověď TLR3 zvýšena v přítomnosti koreceptoru

CD14 [363]. U některých virových infekcí má signalizace TLR3 receptoru spíše negativní, škodlivý charakter. Myši s vyřazeným genem pro TLR3 měly vyšší procento přežití při nákaze virem Inluenzy A a virem Punta Toro [364, 365]. Virus západonilské horečky používá TLR3 indukovanou prozánětlivou odpověď ke vstupu viru do hostitelské buňky [366]. Zvýšená signalizace TLR3 byla prokázána u řady autoimunitních chorob ledvin a jater, diabetu a revmatoidní artritidy [360, 367, 368]. TLR3 může hrát významnou roli v udržování rovnováhy mezi tolerancí a imunitní odpovědí.

4.4 TLR4

TLR4 je prvním toll-like receptorem, který byl identifikován a popsán u lidí. Jeho aktivita je zvýšená v závislosti na přítomnosti lipopolysacharidu (LPS) Gram-negativních bakterií. Hlavní součástí lipopolysacharidové molekuly důležitou při identifikaci TLR4 je lipidová A komponenta. Rozpoznání lipidové A komponenty TLR4 vede k produkci velkého množství imunomodulačních cytokinů a chemokinů, které stimulují mitogenem aktivované proteinkinázy (MAP-kinázy), AP-1, NF- κ B a IRF5 signální cesty. Pro signalizaci TLR4 je důležitá přítomnost koreceptorů CD14 a MD-2, se kterými receptor tvoří komplex [369]. Podobně, jako u TLR1, TLR2 a TLR3, byla exprese TLR4 prokázána na monocytech, ale také na polymorfonukleárních buňkách a dendritických buňkách. Jeho nízká exprese byla naopak prokázána na B-lymfocytech, fibroblastech, astrocytech, keratinocytech, myocytech, endoteliálních a epiteliálních buňkách [347, 370, 371]. TLR4 váže řadu endogenních ligandů, např. Hsp70 (heat shock protein 70), což bylo již řadou autorů popsáno [358, 372]. Mezi další popsané endogenní ligandy, které mohou aktivovat TLR4 patří fibrinogen, fibronektin, heparansulfát a hyaluronan [373, 374].

4.5 TLR5

Jediným známým ligandem pro TLR5 je flagelin, hlavní protein bičíku (flagell) gram-negativních bakterií [375]. TLR5 je široce exprimován na celé řadě buněk. Může signalizovat jako homodimér, ale také tvořit heterodiméry s TLR4, což v konečném důsledku může vést k aktivaci alternativní signální kaskády. Po navázání flagellinu na TLR5 dochází k aktivaci NF- κ B, který se váže na heterodimery a následně dochází k produkci interferonů typu 1 a oxidu dusnatého [376].

4.6 TLR6

TLR6 tvoří heterodiméry s TLR2 a váží s vysokou specifitou diacetylované lipopetidy. TLR6 je exprimován v podobných buněčných typech, jako u TLR1 nebo TLR2. Oba typy toll-like receptorů TLR6 a TLR1 jsou ve zvýšené míře exprimovány v B-lymfocytech, zatímco TLR2 jsou exprimovány B-lymfocyty jen v malé míře [347].

4.7 TLR7

Exprese TLR7 na rozdíl od jiných toll-like receptorů je omezena pouze na dendritické buňky a B-lymfocyty. TLR7 váže ligandy společně s receptorem TLR8 a oba tyto receptory rozpoznávají jednovláknovou virovou RNA [377]. Dosud není zcela objasněno, jaké jsou přesné sekvence v molekule RNA, které aktivují TLR7. Předpokládá se, že úseky RNA bohaté na uracil (U) a guanosin/uracil (GU) jsou stimulatory aktivace signalizace TLR7 a TLR8 [377]. Navzdory podobě TLR7 a TLR8, studie s jejich agonisty prokázaly odlišnosti v jejich signalizačních drahách a expresním profilu. Zatímco agonisté TLR7 vedou k aktivaci signalizační cesty produkce interferonů v plazmatických dendritických buňkách, aktivace TLR8 vede k produkci prozánětlivých cytokinů v myeloidních dendritických buňkách [378].

4.8 TLR8

Doposud se předpokládalo, že oba dva typy toll-like receptorů TLR7 a TLR8 rozpoznávají stejnou sekvenci RNA, nyní ale přibývají důkazy, že každý z těchto receptorů rozpoznává specifickou RNA sekvenci [379]. Bylo prokázáno, že synteticky připravené jednovláknové oligoribonukleotidy, které obsahují velké množství guanosinu a uracilu vedou k produkci interferonu a tumor necrosis faktoru (TNF), což naznačuje aktivaci TLR7 a TLR8. V kontrastu s tím je zjištěno, že oligoribonukleotidy obsahující adenosin a uracil indukují produkci TNF, ale nikoliv interferonu v monocytech a myeloidních dendritických buňkách. Tato sekvenční specifita TLR7 a TLR8 může hrát důležitou roli v modulaci vrozené imunity v závislosti na pronikajícím viru do hostitelského organismu.

4.9 TLR9

TLR9 patří společně s TLR3, 7 a TLR8 do rodiny receptorů, které rozpoznávají nukleové kyseliny a jsou lokalizované v endosomech. Ligandem pro TLR9 je DNA,

kteřá obsahuje nemetylované CpG motivy [380]. Tento typ DNA je častý v bakteriích a virech, na rozdíl od savců, kde jsou sekvenční CpG vzácné a pokud jsou přítomny, tak v metylované formě. Bylo popsáno, že DNA obsahující tyto sekvenční aktivují TLR9, které se mohou významnou měrou podílet na patogenezi autoimunních onemocnění [381, 382]. Expresie těchto receptorů v imunitních buňkách byla nalezena v B-lymfocytech, plasmacytoidních dendritických buňkách, ale i intestinálních epitelálních buňkách a keratinocytech. Aktivace těchto buněk přes TLR9 vede k jejich maturaci a navozuje expresi kostimulačních molekul, interferonu a jiných prozánětlivých cytokinů a chemokinů [383, 384].

4.10 TLR10

Posledním objeveným toll-like receptorem u lidí je TLR10. U hlodavců tento receptor nemá ekvivalent. Jeho struktura je podobná TLR1 a TLR6 a tvoří homodiméry, nebo heterodiméry s TLR1 a TLR2. Jako u TLR7 a TLR9 byla jeho expresie doposud popsána v B-lymfocytech a plasmacytoidních dendritických buňkách [344].

4.11 Toll-like receptory v kontextu metabolických onemocnění

V poslední době se ukazuje, že etiopatogeneze diabetu 1. typu může být asociována s patologickými reakcemi imunitního systému. Byl zjištěn polymorfismus genů kódujících TLR2 a TLR3 a jeho asociace se vznikem diabetes mellitus 1. typu [385, 386]. Tyto studie byly prováděny u korejské a jihoafrické populace a není jasné, jak dalece jsou tyto asociace přítomné i u ostatních populací. Monocyty pacientů s diabetem 1. typu vykazují zvýšenou expresi TLR2 a TLR4. *In vitro* aktivace TLR3 dvoušroubovicovou RNA vedla k apoptóze pankreatických β -buněk, což je charakteristický znak pro diabetes mellitus 1. typu [387]. Jak již bylo řečeno, TLR4 je exprimován na řadě buněk imunitního systému včetně makrofágů a dendritických buněk. TLR4 váže lipopolysacharidy stěny gram-negativních bakterií [388]. Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem, jejichž zástupcem u bakterií je kyselina laurová, jsou schopné aktivace signalizace TLR4 v makrofázích [389, 390]. Jednoduché mastné kyseliny (SFAs – single fatty acids), jejichž cirkulující sérové koncentrace jsou při obezitě zvýšeny, představují potenciálně důležité působky, které mohou hrát důležitou roli při vzniku dietou navozené leptinové a inzulínové rezistence. Některé studie prokázaly, že jednoduché mastné kyseliny, ale nikoliv nenasycené aktivují TLR4 signalizaci v adipocytech a makrofázích. Schopnost

mastných kyselin aktivovat prozánětlivé signální cesty v tukové tkáni a makrofázích je v přímé závislosti na přítomnosti TLR4 [391]. Schopnost volných mastných kyselin aktivovat toll-like receptory se liší podle délky jejich řetězce a pozitivně koreluje s navozením inzulínové rezistence v příčně pruhovaném svalstvu [392]. V příčně pruhovaném svalstvu palmitát (C16:0) a stearát (C18:0) aktivují prozánětlivé signální cesty s následnou indukcí inzulínové rezistence, zatímco laurát (C12:0) působí opačným směrem [392]. V pokusu na myších došlo po podávání palmitátu v myokardu ke zvýšené expresi genů spojených s aktivací endoplazmatického retikula a jeho zvýšeným stresem [393]. Jak již bylo výše uvedeno, TLR2 je exprimován na povrchu řady buněk a podílí se na rozpoznávání bakteriálních, mykotických, parazitárních a virových komponent [394]. Inhibice TLR2 zlepšuje inzulínovou senzitivitu ve svalu a bílé tukové tkáni u myší, které byly krmeny dietou s vysokým obsahem tuku [395]. Doposud není zcela jasná úloha TLR signálních drah v různých typech tkání a ve vývoji inzulínové rezistence. Recentní práce ukazují, že signalizace TLR4 v hematopoetických buňkách jsou důležité při vzniku inzulínové rezistence v játrech a bílé tukové tkáni u myší krmených dietou s vysokým obsahem tuku [287]. Obézní pacienti s diabetem 2. typu mají signifikantně zvýšenou genovou expresi TLR4 ve svalech, která pozitivně koreluje s mírou inzulínové rezistence. Abnormální exprese a signalizace TLR4 je pravděpodobně způsobena zvýšenými sérovými koncentracemi volných mastných kyselin, které mohou být jedním z faktorů podílejících se u lidí na vzniku inzulínové rezistence [396]. Předpokládá se, že nasycené mastné kyseliny jsou jedním z důležitých ligandů pro TLR4 [389] s následnou aktivací JNK a IKK signálních cest. Ty pak inhibují působení inzulínu v příčně pruhovaném svalstvu, játrech a tukové tkáni [397].

5. Renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS)

Renin-angiotenzin-aldosteronový systém je enzymatická kaskáda navzájem navazujících reakcí. Limitujícím krokem renin-angiotenzin-aldosteronového systému je syntéza angiotenzinu I (ANG I) a to odštěpením dekaeptidu na NH₂-terminální části z angiotenzinogenu (AGT) enzymem reninem. Transformace angiotenzinogenu na angiotenzin I je druhově specifická [398, 399]. Renin je syntetizován jako neaktivní proenzym (prorenin), který se stává enzymaticky aktivní po odštěpení NH₂-terminálního propeptidu konvertázou, nebo konformační změnou po jeho navázání

na proreninový/reninový receptor (PRR). Mimo tuto enzymatickou aktivitu může proreninový/reninový receptor spouštět intracelulární signální cesty, jako je aktivace MAP kinázy p42/p44 a fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K)/p85 [400].

Angiotenzin II (ANG II) je produkován hlavně z angiotenzinu I (ANG I) a to angiotenzin konvertujícím enzymem (ACE) a řadou chymáz. Angiotenzin 1-7 může být syntetizován z angiotenzinu I prostřednictvím neutrální endopeptidázy 24.11, nazývané neprilysin, dále prolyl-endopeptidázou, nebo polykarboxypeptidázou. Angiotenzin 1-7 může být syntetizován z angiotenzinu 1-9 angiotenzin konvertujícím enzymem, nebo z angiotenzinu II přes angiotenzin konvertující enzym typu 2 (ACE2). Angiotenzin konvertující enzym je dikarboxypeptidáza, která odštěpuje dvě aminokyseliny na karboxylovém konci molekuly angiotenzinu I a angiotenzinu II. Angiotenzin konvertující enzym a angiotenzin konvertující enzym 2 jsou proteiny glykofosfatidylinositolové povahy, které jsou přítomny na endoteliálních buňkách většiny krevních cév. Tyto enzymy mohou být uvolněny do cirkulace prostřednictvím působení proteinů z rodiny dizintegrinů a metaloproteináz. Angiotenzin I není sám o sobě aktivním hormonem, ale od něho odvozené molekuly jsou biologicky aktivní. Angiotenzin 1-7 působí přes Mas-receptor [401] a váže se na angiotenzinový receptor typu 2 (AT2R) [402]. Angiotenzin II působí na dva typy receptorů. Angiotenzinový receptor typu 1 zprostředkovává hlavní působení angiotenzinu II a stimuluje sekreci aldosteronu ze zona glomerulosa nadledvin. Mechanismus působení AT2R je méně jasný, v některých patologických stavech se relativní genová exprese AT2R zvyšuje v odpovědi na remodelaci tkání a zánět [403]. V případě, že AT1R vytvoří heterodimer s AT2R, může dojít k přerušení signalizační kaskády AT1R [404]. Funkce AT2R mohou být odlišné v závislosti na typu tkáně a buňky a jsou nezávislé na angiotenzinu II (ANG II) [405]. AT2R jsou regulovány specifickými cytosolovými proteiny zvanými AT2R-interacting proteins (ATIPs) anebo oligomerizací jejich receptorů [406]. AT2R jsou obvykle exprimovány ve tkáních v menším množství než AT1R receptory s výjimkou některých tkání, jako jsou buňky endokrinního a exokrinního pankreatu, mozkové buňky a varlata [407]. AT1R, AT2R a Mas receptory jsou receptory spřažené s G-proteinem. AT1R jsou spřaženy s Gq proteinem, který je zodpovědný za mobilizaci intracelulárních zásob kalcia, AT1R mohou být také spojeny i s jinými G proteiny a AT2R se ne vždy váží ke G-proteinům. Aldosteron se váže na oba typy mineralokortikoidních receptorů (MR) a

glukokortikoidních receptorů (GR). MR a GR jsou cytosolové proteiny, které v přítomnosti kortizolu a aldosteronu migrují do jádra a váží se na tzv. DNA-responzivní elementy. Glukokortikoidy jsou transformovány 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázou typu 2 (11 β -HSD2) a tím se stávají inaktivní na mineralokortikoidních receptorech [408] a naopak jsou reaktivovány 11 β -hydroxysteroiddehydrogenázou typu 1 (11 β -HSD1). Tento enzym je přítomen v bílé tukové tkáni, kde u lidí přeměňuje kortizon v kortizol [409].

Funkční RAAS je nezbytný pro normální průběh adipogeneze a lipogeneze. Kompletní inhibice RAAS přes renin [410], nebo vyřazení genu pro angiotenzinogen vedlo u myši k fenotypu s nízkým obsahem tělesného tuku [411]. Je zajímavé, že aliskiren, který inhibuje produkci všech angiotenzinů, snížil u myši tělesnou hmotnost a celkové množství tukové tkáně [412, 413]. Adipogeneze a lipogeneze jsou regulovány komplexními mechanismy zahrnujícími mimo jiné i vnitřní modulaci RAAS receptorů, které jsou řízeny převážně autokrinními mechanismy [414]. Toto bylo prokázáno na buněčných kulturách 3T3-L1 fibroblastů, u kterých se molekulární součásti RAAS podílejí na diferenciačních procesech fibroblastů na adipocyty [415, 416]. AT2R zvyšují adipogenezi a lipogenezi zvyšováním exprese PPAR- γ , klíčový transkripční faktor pro adipogenezi a syntézu volných mastných kyselin [417, 418]. Trofická role AT2R v adipocytech byla prokázána u myši s vyřazeným genem pro AT2R, u kterých byla zjištěna malá velikost adipocytů i přes to, že tyto myši byly krmeny dietou s vysokým obsahem tuků [419] a měly zvýšené sérové koncentrace angiotenzinů [420]. Angiotenzin II zvyšuje v adipocytech lokální syntézu prostacyklinů, které jsou potentním adipogenním faktorem [421]. Jsou tři předpokládané hypotézy, jak RAAS moduluje energetickou bilanci a změny tělesné viscerální tukové tkáně. Za první, zvýšená exprese genu pro renin zvyšuje příjem potravy, což bylo prokázáno u transgenních myši s overexpresí genu pro renin [422]. Za druhé, podávání ACEi a blokátorů angiotenzinových receptorů u hlodavců snížilo množství bílé tukové tkáně [423, 424]. Snížení množství tuku u těchto hlodavců bylo doprovázené i sníženým příjmem potravy [423]. Za třetí, podávání angiotenzinu II indukovalo u potkanů snížení množství tukové tkáně a pokles hmotnosti a zvýšilo energetický výdej [425, 426]. Myši s konstitutivně zvýšenou aktivací RAAS, které měly vysoké koncentrace angiotenzinu II v krvi, měly nižší obsah tukové tkáně a byly rezistentní proti obezitě vyvolané nadměrným energetickým příjmem [427].

5.1 Renin-angiotenzinový systém tkáňově specifický

Angiotenzinogen, renin, angiotenzin-konvertující enzym (ACE), AT1-receptory, AT2-receptory byly identifikovány u potkaních a lidských adipocytů [428]. Nejvíce studií se dosud soustředilo na regulaci uvolňování angiotenzinogenu z adipocytů, které jsou hlavním zdrojem lokální, anebo systémové produkce angiotenzinových peptidů. Lu et al. ve své práci prokázal, že relativní genová exprese angiotenzinogenu v tukové tkáni byla o 68% vyšší než v játrech, což předpokládá primární roli angiotenzinogenu produkovaného tukovou tkání v celkové produkci angiotenzinu II [420]. Při použití myšího modelu s vyřazeným genem pro angiotenzinový receptor II bylo prokázáno, že exprese angiotenzinogenu je přítomna v játrech, ale nikoliv v tukové tkáni [420]. Při použití myších modelů s deficientním AT2 receptorem se ukázalo, že tento receptor maskuje efekt angiotenzinu II v regulaci produkce angiotenzinogenu tukovou tkání. Exprese angiotenzinogenu tukovou tkání se zvýšila u myší s vyřazeným genem pro AT2-receptor a tento efekt byl blokován antagonisty AT1-receptorů [420]. V jiné studii na myších byl použit jiný přístup k zjištění podílu lokálního RAS systému v tukové tkáni na celkovém systémovém RAS. U myší s hypertenzí s navozenou zvýšenou genovou expresí pro angiotenzinogen v tukové tkáni byla následně prokázána i zvýšená exprese angiotenzinogenu v ledvinách [429], což předpokládá fyziologické působení lokálního RAS i na jiné systémy, které se podílejí na řízení krevního tlaku.

Důležitým aspektem produkce angiotenzinogenu tukovou tkání, nebo od něj odvozených angiotenzinových peptidů, je jejich možný vliv na rozvoji arteriální hypertenze u obézních pacientů. Studie na pacientech s obezitou prokázaly, že snížení krevního průtoku podkožní tukovou tkání bylo následováno zvýšeným uvolňováním angiotenzinu II zprostředkované isoproterenolem [430, 431]. Autoři této studie předpokládají zvýšenou aktivitu sympatického nervového systému u obézních jedinců s následným zvýšením lokální produkce angiotenzinu II v tukové tkáni. Tyto nálezy ukazují na možnou zvýšenou aktivaci RAS v podkožní tukové tkáni a její možnou souvislost se zvýšenými sérovými koncentracemi angiotenzinových peptidů v cirkulaci.

Poměrně nedávné studie prokázaly lokalizaci reninových receptorů v lidské tukové tkáni [432]. Exprese reninového receptoru byla zvýšená ve viscerální tukové tkáni ve

srovnání s podkožní tukovou tkání u obézních a štíhlých jedinců [432].

Adipocyty exprimují AT1 a AT2 receptory [428]. Lokálně uvolňované angiotenzinové peptidy, nebo i angiotenziny produkované v krevní cirkulaci vykazují autokrinní/parakrinní efekt v regulaci adipocytárních funkcí. S obezitou je spojena vyšší masa tukové tkáně, kdy adipocyty jsou hypertrofické a více se diferencují. Již několik prací prokázalo angiotenzinový efekt na diferenciaci adipocytů s rozdílnými výsledky [433-435]. Recentní práce ukazují efekt angiotenzinů na diferenciaci kmenových buněk kostní dřeně na adipocyty [436]. Výsledky ukázaly, že tato diferenciaci byla spojena se zvýšenou buněčnou expresí reninu a AT2-receptorů. Autoři této studie předpokládají, že lokální RAS může negativně ovlivňovat funkce tukové tkáně. Na druhou stranu řada prací prokázala opačný efekt, kdy angiotenzin II zvyšoval diferenciaci adipocytů z lidských preadipocytů, které byly izolované z viscerální a perirenální tukové tkáně [437]. Je dokumentováno, že angiotenzin II zvyšuje prozánětlivý stav prostřednictvím prozánětlivě působících chemokinů a zvýšeného oxidačního stresu [438, 439]. V preadipocytech izolovaných z tukové tkáně potkanů angiotenzin II zvyšoval genovou expresi monocytárního chemoatrakčního proteinu-1 (MCP-1) v tukové tkáni [440]. Tato data předpokládají, že systémově nebo lokálně produkovaný angiotenzin II může ovlivnit oxidativní stres a prozánětlivý stav v tukové tkáni. Podávání angiotenzinu II myším snížilo cirkulující sérové koncentrace high-denzity lipoproteinu (HDL), což bylo asociováno s translokací scavengerového receptoru typu B1 (SR-B1) do plazmatické membrány v tukové tkáni [441]. Podobné výsledky byly pozorovány u transgenních myší se zvýšenou expresí angiotenzinogenu v tukové tkáni, což ukazuje na možnost, že angiotenzin II produkovaný tukovou tkání by mohl být jedním z faktorů vzniku dyslipidemií u obézních pacientů a to cestou regulace SR-B1 a clearance HDL lipidových částic. Řada prací se soustředila na efekt blokady RAS v experimentálních modelech obezity. Podávání antagonistů AT1 receptoru KK-Ay myším s diabetem 2. typu vedlo ke snížení glykémie a zlepšení inzulínové senzitivity [442]. Tento efekt blokady AT1-receptoru byl spojen se zvýšeným vychytáváním glukózy v tukové tkáni, snížením velikosti adipocytů a zvýšením exprese PPAR- γ receptorů. Podobný efekt byl zjištěn v jiné studii, ve které byly myším, které byly krmeny normální dietou, podávány antagonisté AT1-receptoru [443].

Viscerální tuková tkáň tvoří cca 20% z celkového množství tukové tkáně. Ačkoliv

podkožní tuková tkáň je největší zásobárnou tuku v těle, má viscerální tuková tkáň vyšší metabolickou aktivitu s přímou drenáží živin do jater přes portální žílu [444]. Lidská viscerální tuková tkáň vykazuje signifikantně zvýšenou genovou expresi angiotenzinogenu v porovnání s podkožní tukovou tkání [445]. U pacientů s metabolickým syndromem blokáce AT1-receptorů pomocí telmisartanu snížila množství viscerální tukové tkáně po 24 týdnech léčby ve srovnání s amlodipinem [446]. Tato redukce viscerální tukové hmoty byla následována zlepšením inzulínové senzitivity. Tento náález naznačuje, že lokální produkce angiotenzinu II viscerálními adipocyty může působit parakrinně a facilitovat další růst a proliferaci tukové tkáně. Koncept, že viscerální RAS se podílí na regulaci krevního tlaku je evidentní ze studií, které zkoumaly efekt redukce hmotnosti na lokální RAS v tukové tkáni. Engeli et al. zkoumal vliv redukce hmotnosti na expresi komponent RAS v tukové tkáni a sérové koncentrace renin-angiotenzinového systému. V této studii obézní postmenopauzální ženy podstoupily 13týdenní redukční program, který vedl k 5% poklesu hmotnosti. Redukce hmotnosti byla spojena se signifikantním snížením sérových koncentrací angiotenzinogenu, reninu a aldosteronu a snížením systolického krevního tlaku o 7 mm Hg. Snížení obvodu pasu signifikantně pozitivně korelovalo s expresí angiotenzinogenu v podkožní tukové tkáni a plazmatickými sérovými koncentracemi angiotenzinogenu [447]. Goossens et al. ve své práci zkoušeli efekt cirkulujícího a lokálně produkovaného angiotenzinu II a ověřovali, zda angiotenzin II interaguje s oxidem dusnatým a tímto reguluje průtok krve tukovou tkání. K objasnění efektu angiotenzinu II na podkožní tukovou tkáň, byl pacientům podáván za kontinuální monitorace krevního tlaku ACEi enalaprilát přímo do podkožní tukové tkáně. V krevním průtoku tukovou tkání nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl mezi skupinou, které byl podáván enalaprilát a kontrolní skupinou. Skupině pacientů, kterým byl podáván AT1-antagonista losartan, došlo ke zvýšení průtoku krve tukovou tkání ve srovnání s kontrolní skupinou, které byl podáván fyziologický roztok, což naznačuje, že cirkulující angiotenzin II je v podkožní tukové tkáni negativním regulátorem krevního průtoku [431]. Kromě viscerální a podkožní tukové tkáně, jsou i jiné lokalizace, které obsahují intraorgánovou a periorgánovou tukovou tkáň s vysokou metabolickou aktivitou [448, 449]. Periaortální tuková tkáň, která se skládá z hnědých a bílých adipocytů obaluje aortu, byla identifikována, jako regulátor tonu hladkých svalových buněk a cévní funkce. Byla prokázána i genová exprese angiotenzinogenu v periaortální tukové tkáni [450]. V jiné práci byl sledován efekt

periaortálního tuku na kontraktilní odpověď aortálních prstenců [451]. Výsledky této studie prokázaly, že kontraktilní odpověď na elektrickou stimulaci byla snižena při podávání antagonistů receptoru pro angiotenzin II, což předpokládá důležitou roli lokálně produkovaného angiotenzinu II jako regulátoru odpovědi hladkého svalstva cév. Recentní práce ukazují, že RAS v periaortální tukové tkáni může působit prostřednictvím angiotenzinu II i v rámci cévní stěny. U transgenních, lipoatrofických myší, kterým chybí periaortální tuková tkáň, byl pozorován zvýšený krevní tlak, což se připisuje zvýšené genové expresi AT1 – receptoru přímo v aortě. Zde byl krevní tlak normalizován po podávání antagonistů AT1-receptorů [441]. Některé práce prokázaly u obézních pacientů zvýšeně aktivovaný RAS v tukové tkáni, který může být jedním z mechanismů podílejících se na vzniku hypertenze sdružené s obezitou. Řada studií prokázala pozitivní efekt na hodnoty krevního tlaku při zablokování RAS v experimentu na zvířatech i u obézních pacientů s hypertenzí a také sledovala účinnost různých typů antihypertenziv [452]. Podání antagonisty AT1-receptoru olmesartanu obézním KK-Ay myším snížilo expresi řady prozánětlivých cytokinů (tumor necrosis factor- α , PAI-1, sérový amyloid A, MCP-1) v tukové tkáni a snížilo tvorbu reaktivních forem kyslíku [453]. Tyto efekty olmesartanu byly asociovány s poklesem krevního tlaku.

V subanalýze studie Treat to Target Postauthorization Study, která zkoumala účinek irbesartanu u pacientů s hypertenzí a metabolickým syndromem, pacienti, kteří užívali irbesartan, vykazovali snížení v systolickém a diastolickém krevním tlaku a redukcí kardiovaskulárních rizikových faktorů (snížení sérových triglyceridů, glykémie na lačno, obvodu pasu a zvýšení sérových koncentrací HDL-cholesterolu) [454]. Tyto pozitivní účinky irbesartanu byly více vyjádřeny u pacientů s metabolickým syndromem ve srovnání se skupinou hypertenzních pacientů bez metabolického syndromu. V další prospektivní, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované studii The Hypertension-Obesity-Sibutramine bylo celkem 171 obézních hypertenzních pacientů. U těchto pacientů se porovnávala účinnost tří různých hypotenziv [455]. Po dvou týdnech studie byl pacientům do terapie přidán sibutramin, jako antiobezitikum. Výsledky prokázaly, že antihypertenzní kombinační terapie s ACEi a blokátory kalciového kanálu byla s přihlédnutím na možné pozitivní metabolické účinky výhodnější než kombinace β -blokátor/diuretická léčba. V další post-hoc analýze observační studie, která zahrnovala přibližně 72000 hypertenzních pacientů z celého

Německa, ti z pacientů, kteří byli obézní a byli léčeni antagonisty AT1-receptorů, měli rizikový profil stran případného diabetogenního vlivu a jiných metabolických negativních účinků hypotenziv podstatně nižší, než ti pacienti, kteří byli léčeni diuretiky [456].

6. Nové možné faktory regulující metabolismus a proliferační aktivitu tukové tkáně – Aquaporiny

Vodní homeostáza a energetická rovnováha jsou základními mechanismy pro přežití a adaptaci buněk organismu. Voda přechází přes buněčnou membránu dvěma paralelními cestami s odlišnými mechanismy: přestupem molekul vody přes hydrofóbní fosfolipidovou dvojvrstvu a difúzí vody přes specifické proteinové kanály, známé jako aquaporiny [457]. Aquaporiny (AQPs) patří mezi vysoce konzervovanou skupinu membránových proteinů, zvaných hlavní vnitřní proteiny, které tvoří rozsáhlou skupinu více než 1700 integrálních membránových proteinů vyskytujících se prakticky ve všech živých organizmech [458]. Aquaporiny mohou být rozděleny do tří podrodin: (i) ortodoxní, nebo klasické aquaporiny, které jsou selektivní pouze pro vodu, (ii) aquaglyceroporiny, které jsou propustné pro glycerol a jiné malé molekuly rozpustné ve vodě a (iii) S-aquaporiny, také nazývané neortodoxní superaquaporiny, nebo také subcelulární aquaporiny, které jsou přítomny pouze u živočichů, ale nikoliv u rostlin, hub a bakterií [459]. Počet izoform aquaporinů se liší u různých organismů. *Escherichia Coli* má pouze jeden klasický aquaporin (AqpZ) a jeden protein se sekvencí podobnou aquaporinu (facilitátor glycerolu G1pF) [460, 461]. Kvasinka *Saccharmyces cerevisiae* má dva ortodoxní aquaporiny (ScAqy1 a ScAqy2) a dva aquaglyceroporiny (YFL054Cp a ScFps1) [462]. U savců bylo dosud identifikováno 13 izoform (AQP0-AQP12) s odlišnou expresí v orgánech a tkáních, které jsou zapojeny do absorpce nebo exkrece tekutin, ale i v jiných orgánech, jako je mozek, kůže, tuková tkáň a játra [463]. Nejpozoruhodnějším rysem aquaporinových kanálů je jejich vysoká selektivita a účinnost pro prostup vody a glycerolu, iontů a protonů [464]. Kromě vody a glycerolu bylo dokumentováno, že aquaporinovými kanály prochází i další molekuly, jako urea, amoniak, peroxid vodíku, oxid uhličitý, oxid dusnatý a další ionty [465]. Mechanismus prostupu některých z těchto molekul přes aquaporinové kanály není dosud zcela objasněn.

Regulace aquaporinových kanálů je zásadním krokem v osmoregulaci a vodní

homeostáze u mikroorganismů a v orgánech savců, které se podílejí na transportu tekutin [466]. Aquaporiny eukaryotních organismů jsou často regulovány posttranslačně tzv. gateováním, které kontroluje míru toku molekul, nebo mechanismem zvaným "trafficking", kdy jsou aquaporinové kanály přesouvány z intracelulárního kompartmentu buňky do cytoplazmatické membrány [467]. Funkce aquaporinů je regulována i jinými faktory, jako je fosforylace, pH, tlak, gradient iontů na cytoplazmatické membráně, teplota a řada dalších [468-470]. Vzhledem ke své jedinečné schopnosti transportovat glycerol hrají aquaporiny důležitou roli v osmoregulaci a to prostřednictvím kontroly intracelulárních zásob glycerolu [471]. U savců hrají aquaporiny důležitou roli v energetickém metabolismu a to kontrolou množství glycerolu v epidermální, tukové a řadě jiných tkání. Aquaglyceroporiny jsou zapojeny do hydratace kůže, buněčné proliferace, karcinogeneze a metabolismu tuků [472-474]. Permeabilita cytoplazmatické membrány pro glycerol v různých tkáních a orgánech hraje důležitou roli v regulaci metabolismu a energetické homeostázy s předpokladem, že tuková tkáň má v této regulaci zásadní roli [475, 476]. Exprese tukových aquaglyceroporinů je zprostředkována hormony a spouštěna katecholaminy ve stavu nalačno a inzulínem v postprandiálním stavu [477].

Tuková tkáň představuje zásadní zdroj plazmatického glycerolu [478]. AQP7 byl dosud považován za unikátní kanál pro glycerol v tukové tkáni. Nicméně později bylo prokázáno, že AQP3 a AQP9 jsou dalšími aquaporiny zodpovědnými za transport glycerolu v lidských adipocytech [479, 480]. Pravděpodobným důvodem, proč je v adipocytech několik typů transportních kanálů pro glycerol, je přítomnost složité signální sítě regulující lipidový a glukózový metabolismus. Aquaglyceroporiny vykazují odlišnou subcelulární lokalizaci u myších 3T3-L1 adipocytů. Zatímco AQP3 je přítomen v cytoplazmatické membráně a cytoplazmě, AQP7 je přítomen převážně v cytoplazmě lipidových inkluzí a AQP9 je exprimován v plazmatické membráně [480]. Hlavní funkcí aquaglyceroporinů je kontrola vstřebávání a uvolňování glycerolu, dvou hlavních kroků pro syntézu triacylglycerolů (lipogeneze) a jejich hydrolýzu (lipolýza) [481]. Aquaglyceroporiny jsou regulovány lipogenními (hlavně inzulín) a lipolytickými hormony (leptin a katecholaminy) [480]. Za fyziologických podmínek inzulín reguluje expresi aquaglyceroporinů a jeho působení může ovlivnit vychytávání, či uvolňování glycerolu z adipocytů [482]. Inzulín dle některých prací snižuje expresi genu pro AQP7 v myších adipocytech negativní zpětnou vazbou přes

IRE (insulin response elements) a jeho genový promotor [483]. V jiné práci bylo prokázáno, že inzulin zvyšuje proteinovou expresi AQP3, AQP7 a AQP9 v lidských adipocytech a to cestou aktivace signální cesty fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K)/Akt/mTOR. Tento výsledek naznačuje odlišný efekt inzulinu na regulaci aquaglyceroporinů u lidí ve srovnání s hlodavci [480]. Uvedený rozdíl může být vysvětlen následujícími fakty. Za první glycerol je hlavním substrátem pro jaterní glukoneogenezu u myši v průběhu hladovění a při postabsorpčním stavu, zatímco pyruvát je hlavním substrátem pro glukoneogenezu u lidí [478]. Za druhé, vzácné případy chybění AQP3 a AQP7 u lidí, nevyvolaly u myši stejné fenotypické klinické projevy [484, 485] a za třetí exprese aquaglyceroporinů je zvýšená u stavů s vyjádřenou inzulinovou rezistencí [486, 487], což dokládají i zvýšené plazmatické koncentrace glycerolu a vystupňovaná jaterní glukoneogeneza u obézních pacientů s inzulinovou rezistencí [480, 484]. Za stavů negativní energetické bilance, jako je hladovění nebo cvičení, jsou triacylglyceroly hydrolyzovány tukovou lipoproteinovou lipázou a hormon-senzitivní lipázou (HSL) na glycerol a volné mastné kyseliny. Katecholaminy (noradrenalin a adrenalin) regulují lipolýzu přes lipolytické β -adrenergní receptory (β_1 , β_2 a β_3) a antilipolyticky působící α_2 -adrenergní receptory [488]. β -adrenergní receptory jsou spřažené s Gs-proteiny a aktivují adenylátcyklázu, která vede ke zvýšení cAMP s následnou aktivací proteinkinázy A. Ta pak vede k fosforylaci hormon-senzitivní lipázy (HSL) a translokaci z cytosolu do lipidových inkluzí s následným zvýšením lipolýzy. AQP3 a AQP7 zvyšují přestup glycerolu z myších 3T3-L1 adipocytů v závislosti na stimulaci β -adrenergními agonisty s lipolytickým účinkem a to přesunem aquaporinů z cytosolu (AQP3), nebo z lipidových inkluzí (AQP7) a jejich začleněním do cytoplazmatické membrány [480, 489, 490]. Krátkodobé podávání isoprotenerolu vyvolává translokaci AQP3 a AQP7 bez ovlivnění jejich exprese. Naopak dlouhodobá stimulace navozená podáváním isoproterenolu snížila expresi AQP7 v myších 3T3-L1 adipocytech [480, 491]. U jiného lipolyticky působícího hormonu leptinu bylo prokázáno, že snižuje expresi AQP7 a to cestou signální kaskády PI3K/Akt/mTOR [480], což předpokládá negativní zpětnou vazbu v regulaci lipolýzy a snížení uvolňování glycerolu z adipocytů. Novější práce prokázala, že karboxymethylchitin, mukopolysacharid s antiobezitickými účinky, stimuluje lipolýzu zvýšením aktivity hormon-senzitivní lipázy (HSL) a exprese AQP7 v 3T3-L1 adipocytech [492]. Předpokládá se, že AQP7 je jedním z hlavních kanálů pro uvolňování glycerolu z adipocytů. Myši s chyběním

genu pro AQP7 vykazovaly vyšší obsah intracelulárního glycerolu oproti kontrolní skupině [493]. U lidí bylo zatím prokázáno jen několik mutací pro AQP7. Myši s mutací G264V a knockoutem genu pro AQP7 se vyznačovaly normální tělesnou hmotností a sérovými koncentracemi triacylglycerolů, ale chybělo zvýšení glycerolémie po tělesné zátěži navzdory zvýšeným sérovým koncentracím noradrenalinu [484].

Obezita je u lidí spojena se změněným expresním profilem aquaporinů v tukové tkáni [479, 494-496]. Byly dokumentovány změny v expresi aquaporinů v různých tukových depech. Některé práce popisují například různou míru exprese AQP7 u pacientů s obezitou. Zvýšená exprese AQP7 v omentální tukové tkáni předpokládá zvýšení celkové lipolytické kapacity, zatímco snížení exprese AQP7 v podkožní tukové tkáni vede k intracelulární akumulaci glycerolu a progresivní hypertrofii adipocytů [479, 480, 494]. Obezita u lidí s diabetem vykazuje změnu v expresním profilu aquaporinu AQP3, AQP7 a AQP9 v tukové tkáni oproti zdravým kontrolám. Tyto nálezy předpokládají, že regulace aquaglyceroporinů v tukové tkáni více souvisí s inzulínovou rezistencí než s obezitou [480]. V pokusu na myších mělo podávání thiazolidindionů (pioglitazonu a rosiglitazonu) za následek zvýšení exprese AQP7, aniž by bylo ovlivněno uvolňování glycerolu z adipocytů [497, 498]. Tento zdánlivý paradox je způsoben paralelním zvýšením aktivity a exprese glycerolkinázy, která je indukována thiazolidindiony v adipocytech. To vede k přednostnímu použití glycerolu pro syntézu triacylglycerolů namísto jeho uvolňování do krevního oběhu [499]. Proto je toto nežádoucí zvýšení exprese AQP7 v tukové tkáni více vyjádřeno u jedinců s inzulínovou rezistencí, což vede ke zvýšení sérové koncentrace glycerolu s následným zvýšením jaterní glukoneogeneze. Tento proces může být přerušeno zvýšeným obrátem glycerolu v adipocytech při podávání thiazolidindionů.

6.1 Aquaporin 1

Aquaporin 1 je prvním identifikovaným aquaporinem. Byl poprvé izolován z erytrocytů. Jeho role v erythrocytech není zcela objasněna, myši s deficitem AQP1 totiž neprokazovaly žádné hematologické abnormality. Lidé s deficitem AQP1 byli klinicky asymptomatictí, ale nebyli schopni se adaptovat při nedostatku tekutin zvýšením osmolality moči. S výjimkou výše uvedeného nebyl pozorován žádný jiný fenotypický projev u lidí s deficitem AQP1, ačkoliv u myší s deficitem AQP1 došlo ke

ztrátě sensorického vnímání (AQP1 je mimo jiné exprimován i ve spinálních neuronech) [500]. V jiné práci na myších s knockoutem genu pro AQP1 byla dokumentována porucha vstřebávání tuků, protože bylo prokázáno, že AQP1 je exprimován ve střevním lymfatickém systému [501]. AQP1 je také exprimován na apikální membráně žlučových cest, které jsou stimulovány sekretinem [502]. Myši s deficitem AQP1 nevykazovaly žádné abnormality v transportu žluči. Jedna práce prokázala expresi AQP1 v pankreatických sekrečních granulech (zymogenní granula) [503], zatímco jiná práce tyto poznatky nepotvrdila [501].

Poměrně recentně byla popsána prostupnost oxidu dusnatého přes AQP1 v endoteliích cév [504]. Další práce naznačuje, že AQP1 by mohl být propustný i pro molekuly kyslíku [505]. Jiné práce ukazují, že endoteliální AQP1 je důležitý pro angiogenezu a to usnadněním migrace buněk, tento mechanismus však není doposud zcela objasněn. Předpokládá se, že aquaporiny usnadňují rychlý průnik vody přes cytoplazmatickou membránu v přední části migrujících buněk. Tento rychlý influx vody je řízen změnami osmolality, která je tvořena transmembránovým přestupem iontů a aktinovou depolymerizací, což může přispívat k pohybu a migraci buněk. Zvýšená exprese AQP1 v mikrovaskulárních endoteliích tumorů podporovala proliferaci dalších cév v těchto rostoucích tumorech [506].

6.2 Aquaporin 3

Tento aquaporin je exprimován na bazolaterální membráně hlavních buněk ve sběrných kanálcích ledvin a usnadňuje vstřebávání vody a tím se podílí na zvyšování koncentrace moči. Podobně, jako AQP1 je AQP3 také exprimován v erytrocytech [485]. AQP3 hraje důležitou roli v koncentraci moči a hydrataci kůže, usnadňuje transport vody a glycerolu přes cytoplazmatickou membránu v oblasti bazální buněčné membrány keratinocytů v kůži [507]. Kromě hydratace kůže hraje AQP3 také důležitou roli v regeneraci kůže a při progresi nádorových onemocnění [508]. Glycerol je jedním ze substrátů buněčného metabolismu, které stimulují buněčnou proliferaci přes aktivaci MAP-kinázy [506]. Zvýšená expozice glycerolu, nebo zvýšená exprese AQP3 v kůži může stimulovat růst buněk bazálních vrstev nádoru kůže. Tento růst kožních tumorů byl zpomalen u AQP3 deficientních myší. Předpokládá se, že glycerol může být promotorem pro vznik a růst keratinokarcinomů [508].

AQP3 v gastrointestinálním traktu je důležitým faktorem pro regeneraci poškozeného epitelu tlustého střeva po kolitidách. U AQP3 deficientních myší s indukovanou kolitidou byla pozorována zhoršená regenerace epitelu tlustého střeva po perorálním podávání glycerolu [509]. Z jiných aquaporinů jsou mimo jiné v epitelích gastrointestinálního traktu exprimovány AQP7 a AQP8 a to převážně v apikální membráně epitelů, zatímco AQP3 je exprimován převážně v bazolaterální části membrány [510]. Vzhledem k časté a intenzivní výměně výstelky gastrointestinálního traktu mohou hrát aquaporiny důležitou roli v buněčné proliferaci.

6.3 Aquaporin 7

AQP7 byl poprvé izolován z varlat a tukové tkáně. Jeho přesný mechanismus účinku ve varlatech není dosud zcela objasněn, nicméně u AQP7 deficientních myší nedošlo k žádné prokazatelné změně funkce spermií, ačkoliv je AQP7 ve spermiích poměrně silně exprimován [511]. AQP7 deficientní myši byly hypoglykemické po dlouhotrvajícím hladovění, protože byla narušena dodávka glycerolu do jater a to porušením na katecholaminy regulované sekrece glycerolu z adipocytů. Dále bylo zjištěno, že tyto AQP7 deficientní myši měly větší velikost adipocytů a větší množství intraabdominálního tuku [493, 512]. Snížený eflux glycerolu z adipocytů tukové tkáně u AQP7 deficientních myší vedl ke zvýšené akumulaci tuku, zvýšené aktivitě glycerolkinázy a vyšší tvorbě volných mastných kyselin [493]. Proto se předpokládá, že AQP7 působí jako jakási výstupní dráha pro glycerol a při jeho úplném chybění dochází k akumulaci tukové tkáně. AQP7 nebyl detekován přímo v adipocytech, ale byl zjištěn v endoteliích kapilár tukové tkáně [513]. V jiné práci autoři prokázali, že AQP7 deficientní myši nebyly obézní, vyskytovaly se u nich menší pankreatické ostrůvky a měly zvýšenou sekreci inzulínu [514]. Lidé s nefunkčním AQP7 také netrpí obezitou [484].

AQP7 je také exprimován v proximálním tubulu ledvin. AQP7 deficientní myši ztrácí glycerol do moči, což ale nevede k žádné poruše metabolismu glukózy a glycerolu [515]. Zdravé myši kompletně reabsorbují glycerol v proximálním tubulu ledvin a vylučovaný močový glycerol může způsobit poškození buněk proximálního tubulu ledvin, jak bylo prokázáno v pokusu na potkanech. Tyto výsledky naznačují, že močový glycerol může být dobrým markerem pro poškození ledvin, stejně tak jako NAG (N-acetyl- β -D-glukosaminidáza) a beta2-mikroglobulin [515].

6.4 Aquaporin 9

Aquaporin 9 byl poprvé izolován z leukocytů na základě hypotézy, že všechny krevní buňky obsahují aquaporiny. Erytrocyty na svém povrchu exprimují AQP1 a AQP3. AQP9 byl také poprvé izolován z jater, kde byl identifikován jako transportér urey. Přesná role AQP9 v transportu urey je však objasněna pouze částečně. AQP9 dále funguje jako vychytávací mechanismus glycerolu v játrech, nicméně u myší s vyřazeným genem pro AQP9 nedošlo ke zvýšení sérových koncentrací glycerolu [516]. AQP9 je také používán v rámci protinádorové terapie oxidem arsenitým, který je využíván při léčbě akutní promyelocytární leukémie. Odpověď na léčbu přímo koreluje s mírou exprese AQP9 [517]. Bylo popsáno, že AQP9 je přítomen i v mitochondriích mozkových glií [518]. Zvýšení exprese AQP9 bylo také pozorováno v bílé tukové tkáni myší při podávání thiazolidindionů [519].

Diferenciace osteoklastů je spojena se zvýšením buněčného objemu a to uspořádáním do vícejaderných osteoklastů z jejich mononukleárních prekurzorů. Vyšší relativní genová exprese AQP9 byla zjištěna při diferenciaci osteoklastů a to specificky u procesu jejich fúze. Při použití nesespecifického AQP9 inhibitoru, phloretinu se dramaticky snížila velikost a počet osteoklastů [520].

7. Léčba obezity a možnosti ovlivnění subklinického zánětu

7.1 Fyzická aktivita – definice fyzické aktivity

Obezitu můžeme léčebně ovlivnit v zásadě pěti způsoby – fyzickou aktivitou, dietou, psychoterapií, podáváním antiobezitik a chirurgicky. Fyzická aktivita je dle WHO definována jako každý tělesný pohyb zprostředkovaný příčně pruhovaným svalstvem, který vyžaduje energetický výdej. Nedostatek fyzické aktivity byl identifikován jako čtvrtý hlavní rizikový faktor celosvětové úmrtnosti [521]. Fyzická aktivita patří k základním nefarmakologickým léčebným postupům jak léčby obezity, tak i ostatních složek metabolického syndromu, tj. diabetes mellitus 2. typu, arteriální hypertenze a dyslipidémie. Za prudký vzestup incidence obezity, diabetes mellitus 2. typu a prakticky všech složek metabolického syndromu ve vyspělých státech Evropy a Severní Ameriky v posledních třiceti letech je kromě snadné dostupnosti vysoce energetických potravin a nápojů významně spoluodpovědná změna životního stylu s výrazným omezením fyzické aktivity [522]. Pravidelné fyzické aktivitě se v dospělé

populaci věnuje pouze asi deset až patnáct procent lidí. Ukazuje se, že tělesná inaktivita představuje závažnější zdravotní riziko než obezita [523]. Metabolický prospěch z fyzické aktivity je zřejmý i nezávisle na hmotnostním poklesu. Celá řada epidemiologických studií prokázala, že fyzická aktivita je jedním z neúčinnějších opatření proti vzniku obezity, diabetes mellitus 2. typu a chronických kardiovaskulárních komplikací [524, 525]. Pravidelná fyzická aktivita může oddálit rozvoj diabetu u vysoce rizikových pacientů s porušenou glukózovou tolerancí [526]. Ve studii Knowlera a kol. měla fyzická aktivita větší vliv na prevenci vzniku diabetu než léčba metforminem [526].

7.2 Aerobní a anaerobní fyzická aktivita

Aerobní fyzická aktivita zlepšuje zdatnost kardiovaskulárního aparátu. Vzniklá svalová hmota při této fyzické aktivitě je metabolicky aktivní, má vysoký podíl svalových buněk, zvyšuje se v ní podíl svalových vláken Ila a dochází k poklesu inzulínové rezistence v důsledku metabolických změn [527]. Jako příklad aerobní aktivity může sloužit kondiční běh (jogging), jízda na kole, plavání na dlouhé tratě, ale i rychlá chůze.

Energie pro svalovou činnost se získává mimo jiné pomocí glykolýzy. Tato metabolická dráha je nejen hlavní metabolickou dráhou v metabolismu glukózy, která vede k tvorbě acetyl-CoA a jeho oxidaci v citrátovém cyklu, ale představuje také hlavní dráhy pro metabolismus fruktózy a galaktózy pocházejících z potravy [528]. Klíčový význam glykolýzy spočívá ve schopnosti poskytovat ATP pouze krátkodobě v nepatrném množství i v nepřítomnosti kyslíku (tzv. anaerobní glykolýza), proto umožňuje kosternímu svalu vysokou výkonnost i za podmínek, kdy se stává aerobní oxidace nedostatečnou. Oxidativní fosforylace je další alternativou při tvorbě energie pro svalovou činnost, při které dochází k 85% regeneraci ATP a mohou v ní být využity nejen sacharidy, ale i tuky a mastné kyseliny.

Anaerobní fyzická aktivita: tento typ aktivity využívá jako hlavního zdroje energie svalový a jaterní zásobní cukr – glykogen, který se zpracovává anaerobně za vzniku laktátu. Je využíván u silových sportů s krátkým trváním. Při tomto typu fyzické zátěže je zvyšován podíl svalové hmoty a zvyšuje se i svalová síla. Anaerobní zátěž zvyšuje inzulínovou senzitivitu, ale podstatně méně ovlivňuje metabolismus glukózy a méně často vyvolává hypoglykémii. Energetická potřeba organismu stoupá v důsledku zvýšení podílu svalové hmoty [527].

V praxi se obvykle za účelem snížení hmotnosti a zlepšení výkonnosti doporučuje 20-60 minut trvající aerobní zátěž mírné intenzity (60 % maximální tepové frekvence). Je však známo, že krátkodobá desetiminutová zátěž vysoké intenzity (90% VO₂ max) při opakování 2-3krát denně, vede k podobným výsledkům. Tento typ tréninku je rizikový u pacientů s podezřením na aterosklerotické komplikace. Doporučuje se opakovat fyzickou aktivitu 3-5krát týdně, přičemž je vhodné dodržovat podobný čas a intenzitu. Obecně doporučovaný aerobní trénink je možné kombinovat 1-2krát týdně s anaerobním tréninkem (posilováním), který vede k budování svalové hmoty. Při doporučení fyzické aktivity pacientům je zásadní postupovat individuálně a optimálně před zahájením pravidelného cvičení ověřit jejich aktuální fyzickou zdatnost pomocí spiroergometrie.

7.3 Pozitivní metabolické vlivy fyzické aktivity

Pravidelná fyzická aktivita má významné pozitivní metabolické efekty. Předpokládá se, že snižuje systémový subklinický zánět. Několik studií prokázalo, že při dlouhodobém cvičení a sníženém příjmu vysokoenergetické potravy došlo k poklesu zánětlivých parametrů [529]. Fyzická aktivita zvyšuje uvolňování adrenalinu, kortizolu, růstového hormonu, prolaktinu a jiných faktorů, které mají imunomodulační účinek [530]. IL-6 je jedním z prvních cytokinů, které se uvolňují do cirkulace v průběhu cvičení. Sérové koncentrace IL-6 se zvyšují exponenciálně (někdy až 100krát) v závislosti na době cvičení a zůstávají zvýšené i po ukončení fyzické aktivity. Bylo prokázáno, že zvýšené sérové koncentrace IL-6 indukují zvýšení sérových koncentrací protizánětlivých cytokinů IL-1 a IL-10 [531]. IL-10 působí prostřednictvím inhibice syntézy prozánětlivých cytokinů imunokompetentními buňkami monocyto-makrofágového systému. IL-10 snižuje produkci IL-1 α , IL-1 β a TNF- α a prozánětlivých chemokinů IL-8 a MIP- α . Tyto cytokiny a chemokiny hrají důležitou roli v aktivaci granulocytů, monocytů/makrofágů, NK-buněk, T a B-buněk a jejich migraci do místa zánětu [532]. Snížení jejich tvorby tak může představovat jeden ze základních mechanismů, kterými fyzická aktivita tlumí subklinický zánět, čímž následně zlepšuje celkový stav organismu [532].

Ahmadi ve své práci sledoval vliv fyzické aktivity u 17 žen s obezitou III. stupně dle WHO. Po 7 měsících cvičebního programu došlo k signifikantnímu poklesu obvodu pasu, viscerálního tuku, sérových koncentrací inzulínu, glykémie nalačno, hsCRP, HbA1c, PAI-1, TNFRII [533]. V jiné práci byla u mužů, kteří podstoupili 2 měsíční

cvičební program, prokázána pozitivní korelace mezi snížením sérových koncentrací CRP a zmenšením obvodu pasu [534]. Několik studií prokázalo, že CRP a jiné prozánětlivé cytokiny, včetně IL-6 a TNF- α jsou zvýšené u pacientů s diabetes mellitus 2. typu [535]. CRP byl identifikován jako nezávislý rizikový faktor vzniku kardiovaskulárních onemocnění. U pacientů s chronickým srdečním selháním došlo po pravidelném cvičení ke zvýšení HDL-cholesterolu, signifikantnímu snížení triacylglycerolů a Lp(a). Sérové koncentrace inzulínu, glykémie nalačno, TNF- α , CRP a kyseliny močové byly takéž sniženy [536].

V poslední době se v souvislosti s fyzickou aktivitou ukazuje významná role kosterního svalstva a jeho působků v protizánětlivém působení. Termín myokiny byl stanoven pro cytokiny a jiné peptidy, které jsou produkovány, exprimovány a uvolňovány do krevního oběhu buňkami kosterního svalstva. Mezi myokiny patří IL-6, IL-8, IL-15, brain-derived neurotrophic factor, leukemia inhibitory factor, FGF-21, follistatin like-1 [537]. Tyto působky uvolňované do oběhu z pracujícího svalu působí na vzdálené orgány a svým protizánětlivým účinkem snižují subklinický zánět u onemocnění jako je ateroskleróza, diabetes mellitus 2. typu a metabolický syndrom. IL-6 je první cytokin, který je uvolňován do krevního oběhu ze svalu během cvičení a jeho sérové koncentrace se zvyšují v závislosti na délce cvičení. mRNA exprese IL-6 se zvyšuje v kontrahujícím se kosterním svalstvu [538, 539], současně se zvýšenou expresí je zvýšena i transkripční aktivita genu pro IL-6 [539]. IL-6 působí za různých okolností jako zánětlivý nebo i jako protizánětlivý faktor. Pokud je produkován T-buňkami a makrofágy, stimuluje imunitní systém a zvyšuje zánětlivou odpověď, zatímco IL-6 produkováný kosterním svalstvem má protizánětlivý účinek inhibičním působením na TNF- α a IL-1 β a zvýšením sekrece protizánětlivých cytokinů IL-1 a IL-10. Cvičením zprostředkované zvýšení sérové koncentrace IL-6 pozitivně koreluje s masou svalové tkáně, způsobem, délkou a intenzitou cvičení [531]. Cvičení má ochranný účinek proti TNF- α -indukované inzulínové rezistenci [225]. Petersen ve své práci prokázal, že IL-6 zvyšuje obrát lipidů, stimuluje lipolýzu a β -oxidaci mastných kyselin prostřednictvím aktivace AMP-aktivované proteinkinázy [540].

Zatímco jednorázové cvičení s velkou intenzitou je spojeno s krátce trvajícím zánětlivou reakcí [541], pravidelné cvičení má déletrvajícím protizánětlivý efekt [542, 543]. I když některé mechanismy pozitivního účinku fyzické aktivity na zlepšení metabolického a kardiovaskulárního zdraví byly již objasněny [544], role tukové tkáně v tomto procesu zůstává stále nejasná. Jen málo prací se zabývalo vlivem fyzické

aktivity na endokrinní funkci tukové tkáně, přičemž jejich výsledky nebyly jednoznačné [545, 546]. Fyzická nečinnost vede k akumulaci viscerálního tuku a tím ke zvýšení oxidačního stresu a aktivaci kaskád prozánětlivých faktorů, které potencují rozvoj aterosklerózy. Pravidelná fyzická aktivita snižuje expresi endoteliálního receptoru pro angiotensin II typu 1 (AT1R), vede ke snížení aktivity NADPH oxidázy a produkce superoxidového anionu. Touto cestou dochází ke snížení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) [547].

Vztahu fyzické aktivity a metabolických komplikací se věnovala již řada starších studií. V Malmo Preventive Project bylo od roku 1974 do roku 1992 sledováno více než 33 346 osob, které byly vyšetřeny na přítomnost rizikových faktorů aterosklerózy [548]. Byl zde prokázán význam rizika porušené glukózové tolerance pro predikci vzniku diabetes mellitus 2. typu. Poprvé se také prokázalo, že fyzická aktivita je z hlediska prevence metabolických komplikací významnějším opatřením než diety. Další významnou studií je čínská studie Da Qing z roku 1986 [549]. V této studii bylo celkem 110 000 osob obou pohlaví s porušenou glukózovou tolerancí edukováno ve 33 zdravotnických centrech. Po 6 letech byl výskyt diabetes mellitus 2. typu nižší o třetinu u osob dodržujících dietu a ve skupině cvičících jedinců byla incidence vzniku diabetes mellitus 2. typu snížena téměř o polovinu. Tato studie jasně prokázala větší význam fyzické aktivity než dietních opatření v prevenci diabetes mellitus 2. typu. Další studie vystavují v rámci edukace pacienty současně změně dietní i změně fyzické aktivity a neumožňují oddělení obou efektů. Finská studie DPS (Diabetes Prevention Study) byla provedena u menšího počtu (500 jedinců) osob s porušenou glukózovou tolerancí [550]. Kontrolní skupina byla jednorázově poučena o změně životního stylu, intervenovaná skupina byla pravidelně kontrolována dietní sestrou a současně pod odborným dohledem cvičila. Cílem edukace bylo snížit hmotnost, snížit celkový příjem tuků, satureovaných mastných kyselin, zvýšit příjem vlákniny a zvýšit fyzickou aktivitu na mírnou zátěž 30 minut denně. Výskyt diabetes mellitus 2. typu se snížil o 58%. Na snížení rizika diabetes mellitus 2. typu vlivem fyzické aktivity se podílí zvýšení inzulínové senzitivity a tedy pokles inzulínové rezistence [551]. Při pravidelné fyzické aktivitě se udržuje zvýšená citlivost tkání na inzulín, kdežto nedostatek pohybu vede ke snížení inzulínové senzitivity a kompenzatornímu nárůstu sekrece inzulínu [552].

7.4 Chirurgická léčba obezity

Bariatrická chirurgie je jediná dlouhodobě efektivní léčba obezity s prokázaným účinkem na snížení morbidity a mortality [553-556]. Kromě výrazného poklesu hmotnosti bariatrická chirurgie dramaticky zlepšuje stav onemocnění spojených s obezitou, mezi které patří diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémie, arteriální hypertenze, syndrom spánkové apnoe a řada dalších [553-555].

Dnešní bariatrická chirurgie používá metody restriktivní, při kterých dochází ke zmenšení objemu žaludku, a malabsorbční, charakterizované omezením resorbční plochy střeva, případně jejich kombinace. Mezi čistě restriktivní operace lze zařadit adjustabilní gastrickou bandáž (AGB) a nověji také vertikální gastrickou plikaci (VGP). Někteří autoři k čistě restriktivním metodám řadí ještě tubulizaci žaludku (sleeve gastrectomie – SG). U tubulizace žaludku však byl kromě restrikce a zrychleného vyprazdňování tubulizovaného žaludku do duodena prokázán i efekt hormonální s poklesem sérových koncentrací ghrelinu produkovaného původně v resekované části žaludku [557]. Za čistě malabsorbční operaci je dnes považována biliopankreatická diverze typu Scopinaro (BPD/S) nebo typu duodenálního switchu (BPD/DS). Tubulizace žaludku je v současnosti bariatrická metoda, která je používána v podobné frekvenci, jako doposud nejčastěji používaný typ bypassové operace Roux-en-Y gastrický bypass (RYGBP). Většina autorů jej považuje za kombinovanou restriktivně-malabsorbční metodu [558].

7.4.1 Laparoskopická tubulizace žaludku

Tubulizace žaludku – sleeve gastrectomy (SG) – je restriktivní operace vyřazující díky odnětí žaludečního fundu zdroj produkce orexigenního hormonu ghrelinu [557]. Hlavním efektem je podobně jako u gastrické bandáže zmenšení objemu žaludku a tím snížení množství přijímané stravy. Principem tubulizace žaludku je chirurgické odstranění téměř celého velkého zakřivení žaludku včetně buněk produkujících ghrelin. Zbýlý žaludek má podobu trubice o objemu 80-120 ml (v závislosti na typu použité kalibrační sondy a velikosti ponechaného antra). Množství stravy, které je možné sníst najednou, je mnohonásobně menší, než bylo před operací. Tubulizace žaludku vede ke snížení plazmatických hladin ghrelinu o 40-70%, což vysvětluje vyšší účinnost této metody ve srovnání s gastrickou bandáží [557, 559]. Předchozí práce ukázaly, že laparoskopická tubulizace žaludku má pozitivní efekt na

antropometrické parametry [560], zlepšení inzulínové rezistence, kontrolu diabetu, zlepšení lipidogramu a krevního tlaku [561]. Jedním z potenciálních procesů vedoucích k pozitivním metabolickým efektům tubulizace žaludku a dalších bariatrických výkonů může být i zlepšení subklinického zánětu v různých tkáních [556], nicméně je třeba zmínit, že přesné patofyziologické mechanismy odpovědné za tyto příznivé účinky nejsou dosud objasněny [561, 562].

8. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Při koncipování naší práce jsme vycházeli z předpokladu, že intervence v podobě fyzické aktivity a tubulizace žaludku mohou ovlivnit subklinický zánět a zlepšit metabolický profil obézních pacientů. U obézních pacientů, kteří podstoupili tubulizaci žaludku, jsme předpokládali, že mezi podkožní tukovou tkání a periferními monocyty bude jistá forma interakce zprostředkovaná chemotaktickými a dalšími prozánětlivými faktory, která bude přispívat k lokální i systémové zánětlivé reakci. Taktéž jsme předpokládali, že u obézních pacientek s arteriální hypertenzí, které podstoupily cvičební režim, mohou být pozitivní účinky na pokles hodnot krevního tlaku a metabolický profil způsobeny ovlivněním mRNA exprese tkáňově specifického renin-angiotenzin-aldosteronového systému v podkožní tukové tkáni a prozánětlivých faktorů a jejich receptorů v podkožní tukové tkáni.

Specifické cíle naší práce byly následující:

- Zkoumat možnou interakci mezi podkožní tukovou tkání a periferními monocyty, která může hrát důležitou roli v etiopatogenezi subklinického zánětu u obézních pacientů
- Studovat vliv vybraných intervencí – fyzické aktivity a tubulizace žaludku - na prozánětlivý a chemotaktický profil v podkožní tukové tkáni pacientů s obezitou
- Zhodnotit, zda a do jaké míry se může aerobní fyzická aktivita podílet na poklesu hodnot krevního tlaku a posoudit, do jaké míry je ovlivněna mRNA exprese renin-angiotenzin-aldosteronového systému v podkožní tukové tkáni pod vlivem cvičebního režimu
- Zhodnotit, zda změny cirkulujících sérových koncentrací prozánětlivých

faktorů, nebo mRNA exprese vybraných chemokinů a cytokinů v podkožní tukové tkáni a cirkulujících monocyttech, mohou vysvětlovat pozitivní vliv tubulizace žaludku na metabolické parametry u obézních pacientů

9. METODIKA STUDIE „Tři měsíce pravidelné aerobní fyzické aktivity u obézních pacientů zlepšují subklinický zánět neovlivňují systémový krevní tlak a endokrinní funkci podkožní tukové tkáně“

Všechna klinická a laboratorní vyšetření byla prováděna na III. interní klinice VFN a ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN.

9.1 Vyšetření antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů

U všech vyšetřovaných subjektů byla změřena tělesná výška a hmotnost a vypočítán body mass index (BMI – hmotnost v kg/výška v m²). Odběry krevních vzorků byly provedeny za standardních podmínek po celonočním lačnění mezi 7. a 8. hodinou ránní. Do 30 minut byly vzorky zpracovány pomocí centrifugace (10 min při 1000 x G) a séra byla dále uskladněna při teplotě -80°C k dalšímu vyšetření. Základní biochemické parametry byly stanoveny standardními laboratorními metodami. Sérové koncentrace FABP-4, rezistinu, leptinu a adiponektinu byly měřeny komerčními ELISA kity (BioVendor, Modrice, Czech Republic). Sérové hladiny C-reaktivního proteinu byly stanoveny vysoce citlivou analýzou (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Sérové koncentrace inzulínu byly měřeny komerčním RIA kitem (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France).

9.2 Měření krevního tlaku a složení těla

Všem subjektům bylo změřeno tělesné složení a procento tělesného tuku bioimpedancí (Multi-frequency Bodystat QuadScan 4000, Douglas, UK). Obézním pacientům byl změřen jednorázově krevní tlak v pozici v sedě sfygmomanometrem (LCD 301, Spirit Medical Co., Taiwan) a 24 hodinovým měřením krevního tlaku, které bylo provedeno pomocí oscilometrického zařízení (SpaceLabs 90207, SpaceLabs Medical, Redmond, WA, USA), které měřilo krevní tlak po 20 min v průběhu dne (od 6. hodiny ránní do 22. hodiny večerní) a každých 30 min v průběhu noci (od 22. hodiny večerní do 6. hodiny ránní). Kontrolní skupině byl změřen tlak jednorázově.

9.3 Biopsie tukové tkáně

Biopsie podkožní tukové tkáně byla u pacientů prováděna v ranních hodinách současně s krevními odběry po 10-12 hodinovém lačnění. Vzorky tukové tkáně byly odebírány z oblasti břišní stěny cca 10-15 cm laterálně od pupku. Po zarouškování a dezinfekci místa odběru bylo provedeno lokální znecitlivění 20 ml 1% trimecainu (Mesocain 1% inj.sol.). Následně byl skalpelem proveden krátký řez (3-4 mm), kterým byla paralelně s břišní stěnou zavedena plastová kanyla s kovovým zavaděčem (Braunüle MT, 12 G, délka 80 mm, vnitřní/vnější průměr 2.2/2.7 mm, Braun Melsungen, Německo). Po opatrném rozrušení podkožní tukové tkáně byl odstraněn kovový zavaděč, na kanylu byla připojena 20 ml stříkačka a pomocí podtlaku bylo odebráno požadované množství tukové tkáně (200-1000 mg). Vzorky tkáně byly rozděleny do plastových zkumavek (Eppendorf, AG, Německo, obsah 1.5 ml) s 1 ml RNA stabilizujícího činidla (RNAlater, Quigen, Německo), okamžitě zamraženy na -80°C a uloženy k dalšímu zpracování.

9.4 Stanovení mRNA exprese

Vzorky tukové tkáně byly homogenizovány za použití kuliček MagNA Lyser Green Beads na automatickém homogenizátoru MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Poté byla z homogenizátoru na přístroji MagNA Pure instrument pomocí kitu MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Německo) izolována celková RNA. Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometrickým měřením absorbance při 260 nm (NanoPhotometer, Implen, Munchen, Germany). Pro reverzní transkripci bylo použito 0.25 µg RNA. Syntéza byla provedena soupravou High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Stanovení genové exprese FABP-4, CD68, adiponektinu a jeho receptorů, rezistinu, angiotenzinogenu, angiotenzin-konvertujícího enzymu a angitenzinového receptoru typu 1 bylo provedeno pomocí panelu TaqMan® gene Expression Assays na přístroji 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Měření dalších 44 genů bylo provedeno pomocí panelu TaqMan® Custom Array na přístroji ViiA7 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA). V reakční směsi se nacházelo cca 12 µg cDNA, TaqMan® Universal PCR Master Mix II, NO AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a voda zbavená nukleáz (Fermentas Life Science, Litva) se specifickými TaqManGene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) použitými pro reakci. Data byla vyjádřena jako prahové hodnoty (Ct), tzn. jako změna fluorescence v reálném

čase. Pro každý vzorek byly stanovovány také endogenní kontroly β -2-mikroglobulin a HPCLA1 pro kompenzaci odchylek ve vstupním objemu do reakční směsi a účinnosti reakce. Relativní genová exprese sledovaných genů byla vypočítána podle vzorce $2^{-\Delta\Delta}$ (CT cytokinu – CT endogenní kontroly).

9.5 Fyzická aktivita

Obézní pacientky s hypertenzí podstoupily tří měsíční aerobní cvičební program, který se skládal z 30 minutového cvičení 3 x týdně pod dohledem kondičního trenéra v Rekondičním centru VFN.

9.6 Statistická analýza

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Jednotlivé parametry byly vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standard error of the mean – střední chyba průměru). Za statisticky významné byly považovány rozdíly a korelace, kde p bylo menší než 0,05. K porovnání rozdílů v genových expresích, antropometrických, biochemických a hormonálních parametrech ve skupině obézních subjektů a kontrolní skupinou byla použita jednocestná analýza rozptylu (One-way ANOVA) následovaná Dunnettovou metodou mnohonásobného porovnávání s kontrolní skupinou, nebo Kruskal-Wallisova jednocestná ANOVA následovaná Dunnovým testem. Pro hodnocení rozdílů ve skupině obézních žen před a po cvičení byl použit párový t -test nebo neparametrický Wilcoxonův test. Vztahy mezi jednotlivými faktory byly hodnoceny pomocí Spearmanova nebo Pearsonova korelačního testu.

10. METODIKA STUDIE „Laparoskopická tubulizace žaludku snižuje mRNA expresi prozánětlivě působících genů v podkožní tukové tkáni, ale nikoliv v periferních monocytech u obézních pacientů“

Všechna klinická a laboratorní vyšetření byla prováděna na III. interní klinice VFN a ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN. Pacienti podstoupili laparoskopickou tubulizaci žaludku na Chirurgické klinice 2. LF UK a ÚVN.

10.1 Vyšetření antropometrických, biochemických a hormonálních parametrů

U všech vyšetřovaných subjektů byla týden před operací a 6, 12, 24 měsíc po

operaci změřena tělesná výška a hmotnost a vypočítán body mass index (BMI – hmotnost v kg/výška v m²). Odběry krevních vzorků byly provedeny za standardních podmínek po celonočním lačnění mezi 7. a 8. hodinou ranní. Do 30 minut byly vzorky zpracovány pomocí centrifugace (10 min při 1000 x G) a séra byla dále uskladněna při teplotě -80°C k dalšímu vyšetření. Základní biochemické parametry byly stanoveny standardními laboratorními metodami. Krevní vzorky použité k izolaci periferních monocytů byly odebírány do média obsahujícího Na-EDTA a zpracovány do 2 hodin po odběru. Sérová koncentrace adiponektinu byla měřena komerčním RIA kitem (Linco Research, St. Charles MO, USA) a sérové hladiny C-reaktivního proteinu byly stanoveny vysoce citlivou analýzou (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Sérové koncentrace leptinu a rezistinu byly měřeny komerčními ELISA kity (BioVendor, Modrice, Czech Republic). Sérová koncentrace inzulínu byly měřeny komerčním RIA kitem (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France).

10.2 Biopsie tukové tkáně

Biopsie podkožní tukové tkáně byla u pacientů prováděna v ranních hodinách současně s krevními odběry po 10-12 hodinovém lačnění. Vzorky tukové tkáně byly odebírány z oblasti břišní stěny cca 10-15 cm laterálně od pupku. Po zarouškování a dezinfekci místa odběru bylo provedeno lokální znecitlivění 20 ml 1% trimecainu (Mesocain 1% inj.sol.). Následně byl skalpelem proveden krátký řez (3-4 mm), kterým byla paralelně s břišní stěnou zavedena plastová kanyla s kovovým zavaděčem (Braunüle MT, 12 G, délka 80 mm, vnitřní/vnější průměr 2.2/2.7 mm, Braun Melsungen, Německo). Po opatrném rozrušení podkožní tukové tkáně byl odstraněn kovový zavaděč, na kanylu byla připojena 20 ml stříkačka a pomocí podtlaku bylo odebráno požadované množství tukové tkáně (200-1000 mg). Vzorky tkáně byly rozděleny do plastových zkumavek (Eppendorf, AG, Německo, obsah 1.5 ml) s 1 ml RNA stabilizujícího činidla (RNAlater, Quigen, Německo), okamžitě zamraženy na -80°C a uloženy k dalšímu zpracování.

10.3 Izolace krevních monocytů

Krevní vzorky použité k izolaci periferních monocytů byly odebírány do média obsahujícího Na-EDTA a zpracovány do 2 hodin po odběru. Leukocyty se ze vzorků získávaly pomocí Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences AB, Švédsko). Do 50 ml zkumavky Falcon bylo napipetováno 3.5 ml Ficoll-Paque™ Plus a následně bylo

pomalu přidáno 5 ml krevního vzorku. Po centrifugaci byly agregáty leukocytů přeneseny do další zkušební zkumavky obsahující 10 ml PBS (0.001 M PBS, pH 7.4) a opětovně centrifugovány. Supernatant byl odsán a buněčná peleta byla rozpuštěna v roztoku DE-GAS (0.01 M PBS pH 7.4; 0.5 M EDTA pH 8.0 a 1% BSA). Monocyty byly dále izolovány magnetickou izolační metodou za použití magnetických mikrokuliček značených monocyto­vým antigenem CD14 (MiniMacs Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Poté byla z CD14+ monocytů izolovaná celková RNA na přístroji MagNA Pure instrument pomocí izolačního kitu MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Německo).

10.4 Stanovení mRNA exprese

Vzorky tukové tkáně byly homogenizovány za použití kuliček MagNA Lyser Green Beads na automatickém homogenizátoru MagNA Lyser (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Poté byla z homogenizátoru na přístroji MagNA Pure instrument pomocí kitu MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Německo) izolována celková RNA. Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometrickým měřením absorbance při 260 nm (NanoPhotometer, Implen, Munchen, Germany). Pro reverzní transkripci bylo použito 0.25 µg RNA. Syntéza byla provedena soupravou High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Měření 48 genů bylo provedeno pomocí panelu TaqMan® Custom Array na přístroji ViiA7 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA). V reakční směsi se nacházelo cca 12 µg cDNA, TaqMan® Universal PCR Master Mix II, NO AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a voda zbavená nukleáz (Fermentas Life Science, Litva) se specifickými TaqManGene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) použitými pro reakci. Data byla vyjádřena jako prahové hodnoty (Ct), tzn. jako změna fluorescence v reálném čase. Pro každý vzorek byly stanovovány také endogenní kontroly β-2-mikroglobulin a HPCLA1 pro kompenzaci odchylek ve vstupním objemu do reakční směsi a účinnosti reakce. Relativní genová exprese sledovaných genů byla vypočítána podle vzorce $2^{-\Delta\Delta}$ (CT cytokinu – CT endogenní kontroly).

10.5 Statistická analýza dat

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (SPSS Inc., USA). Jednotlivé parametry byly vyjádřeny jako průměr ± SEM (standard error of the

mean – střední chyba průměru). Za statisticky významné byly považovány rozdíly a korelace, kde p bylo menší než 0.05. K porovnání rozdílů v genových expresích, antropometrických, biochemických a hormonálních parametrech ve skupině obézních subjektů před a po laparoskopickou tubulizací žaludku a kontrolní skupinou byla použita jednocestná analýza rozptylu (One-way ANOVA) následována Holm-Sidakovým testem. Rozdíly mezi obézními ženami před a po laparoskopické tubulizaci žaludku byla použita ANOVA následována Dunnovým testem. K vyloučení tzv. falešně pozitivních hodnot byla použita Benjamini-Hochbergova metoda pro mnohočetné testování genové exprese v periferních monocytech a podkožní tukové tkáni.

11. Vlastní výsledky

11.1 Tři měsíce pravidelné aerobní fyzické aktivity u obézních pacientů zlepšují subklinický zánět, avšak neovlivňují systémový krevní tlak a endokrinní funkci podkožní tukové tkáně

Cíl práce: Cílem naší práce bylo posoudit vliv pravidelné tříměsíční fyzické aktivity na parametry subklinického zánětu a prozánětlivý profil podkožní tukové tkáně. Dále jsme hodnotili efekt tříměsíční fyzické aktivity na antropometrické, biochemické a hormonální parametry, krevní tlak a mRNA expresi vybraných adipokinů, chemokinů, cytokinů a jiných faktorů v podkožní tukové tkáni.

Metodika: U 15 obézních žen bez DM2 (OB) s arteriální hypertenzí a 15 zdravých kontrolních subjektů (C) s normální hmotností jsme vyšetřili základní antropometrické, biochemické a hormonální parametry za pomoci standardních laboratorních metod. Krevní tlak ve skupině obézních byl hodnocen jednorázově sphygmomanometrem a 24-hodinovým monitorováním krevního tlaku před a po 3 měsících cvičení. Kontrolní skupina byla vyšetřena pouze za bazálních podmínek a skupina obézních žen s arteriální hypertenzí bazálně a po třech měsících pravidelného fyzického cvičení. Sérové koncentrace FABP-4, rezistinu, leptinu a adiponektinu byly měřeny komerčními ELISA kity. Sérové koncentrace inzulínu byly měřeny komerčními RIA kity. K analýze mRNA exprese vybraných faktorů byla použita metoda RT PCR. Zvolená intervence zahrnovala 30 min aerobního cvičení třikrát týdně po dobu tří měsíců.

Výsledky: Za bazálních podmínek měla obézní skupina oproti kontrolní skupině signifikantně vyšší tělesnou hmotnost, BMI, procento tuku v těle, obvod pasu a boků, zvýšenou glykémii na lačno, sérové triacylglyceroly, CRP, IA, inzulín, leptin, FABP-4 a HOMA index současně se zvýšenou expresí chemokinů (CCL-2, -3, -4, -17), CD68, apelinem, angiopoetinem 1, IGF1R, CD40-ligand, IL10 a STAT3 v podkožní tukové tkáni. Expresí genů renin-angiotenzin-aldosteronového systému v podkožní tukové tkáni se mezi skupinami výrazně nelišila. Po 3 měsících pravidelné fyzické aktivity došlo k signifikantnímu zlepšení všech antropometrických parametrů, lačné glykémie, CRP a HOMA indexu. Sérové koncentrace adiponektinu, leptinu, FABP-4 a inzulinu se nezměnily. Po intervenci nedošlo kromě zvýšení mRNA exprese AQP-3 k žádné jiné signifikantní změně v expresi vybraných genů v podkožní tukové tkáni.

Závěr: Hlavním zjištěním této práce je, že 3 měsíce pravidelné fyzické aktivity signifikantně snížily tělesnou hmotnost, systémový subklinický zánět a inzulinovou rezistenci bez přímého vlivu na endokrinní funkce tukové tkáně, renin-angiotenzinový systém v tukové tkáni, nebo na cirkulující hladiny lipidů. Tyto nálezy naznačují, že endokrinní funkce podkožní tukové tkáně pravděpodobně nejsou zodpovědné za zlepšení subklinického zánětu a inzulinové rezistence.

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

11.2 Laparoskopická tubulizace žaludku snižuje mRNA expresi prozánětlivě působících genů v podkožní tukové tkáni ale nikoliv v periferních monocitech u obézních pacientů

Cíle práce: Cílem naší práce bylo posoudit vliv laparoskopické tubulizace žaludku na prozánětlivý profil v podkožní tukové tkáni a periferních monocitech po dvou letech sledování. Dále jsme hodnotili expresi vybraných prozánětlivě působících genů v podkožní tukové tkáni a periferních monocitech.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 13 obézních žen bez DM2 (OB) a 18 zdravých kontrolních subjektů (C) s normální hmotností. Antropometrické, biochemické a hormonální parametry a odběr podkožní tukové tkáně byly prováděny bazálně a v 6, 12 a 24 měsíci po LSG. K analýze mRNA exprese 45 genů v podkožní tukové tkáni (SCAT) a periferních monocitech (PM) byla použita metoda RT-PCR.

Výsledky: Za bazálních podmínek byly signifikantně zvýšené sérové koncentrace prozánětlivých faktorů hsCRP (0.42 ± 0.58 vs. 1.45 ± 0.85 mg/l; $p < 0.05$) ve srovnání s kontrolní skupinou. mRNA exprese makrofágového antigenu CD68, cytokinů (IL-10, IL-18), chemokinů (CCL-3, -17, -22) a chemokinového receptoru CCR1 byly zvýšené, zatímco mRNA exprese adiponektinového receptoru 2 (ADIPOR2), JUN protoonkogenu, NF κ B2 a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru A (VEGFA) byla snížena v SCAT obézních žen ve srovnání se zdravými kontrolami. V periferních monocyttech (PM) byla zjištěna zvýšená exprese CD68, chemokinových receptorů (CCR-1, CCR-2, CCR-3) a jiných prozánětlivých receptorů (TLR-2, TLR-4, TNFRSF1A), makrofágový migrační inhibiční faktor (MIF), ICAM-1, PPAR δ a ADIPOR2 ve skupině obézních ve srovnání s kontrolní skupinou. Po 24 měsících od LSG došlo ke snížení tělesné hmotnosti (BMI 42.3 ± 4.1 vs. 33.0 ± 6.0 kg/m²; $p < 0.05$) a zlepšení lipidového profilu (LDL cholesterol 2.76 ± 1.06 vs. 2.37 ± 1.10 mmol/l; $p < 0.05$; TAG 1.71 ± 0.83 vs. 0.95 ± 0.56 mmol/l; $p < 0.05$) bez signifikantního vlivu na glykémii (4.99 ± 0.80 vs. 5.18 ± 0.83 mmol/l; $p < 0.05$) nebo parametry inzulinové rezistence (HOMA-IR 8.51 ± 4.83 vs. 7.24 ± 4.98 ; $p < 0.05$). V podkožní tukové tkáni, LSG snížila mRNA expresi téměř všech up-regulovaných chemokinů, chemokinových receptorů a prozánětlivých faktorů (CCL-3, CCL-17, CCL-22, CCR-1, CCR-4, CD68, IL-1B, IL-18) s maximem změn ve 12. a 24. měsících po operaci. V kontrastu s tím byl prokázán jen minimální efekt na prozánětlivý profil v periferních monocyttech v průběhu celé studijní periody s perzistentním zvýšením mRNA exprese téměř všech faktorů, jako je MIF, TLR-2, TLR-4 a jiných prozánětlivě působících receptorů.

Závěr: V této studii jsme prokázali, že obézní pacienti měli zvýšenou mRNA expresi chemotaktických a prozánětlivě působících faktorů v podkožní tukové tkáni a v periferních monocyttech. LSG zlepšila tento profil v podkožní tukové tkáni, ale nikoliv v periferních monocyttech. Předpokládáme, že aktivace TLR-stresové prozánětlivé signalizační cesty a zvýšená exprese MIF v periferních monocyttech se může podílet na omezeném efektu LSG na zlepšení inzulinové rezistence. Tento přetrvávající stav zvýšené exprese prozánětlivých a chemotakticky působících faktorů v periferních monocyttech 2 roky po LSG se může podílet na perzistenci a/nebo budoucí remanifestaci metabolických komplikací u obézních pacientů po metabolické chirurgii.

Výsledky této práce byly publikovány v časopise *Molecular Cellular Endocrinology*, plný text článku v otištěné verzi je uveden v příloze.

12. Diskuze

Jak bylo prokázáno v četných experimentálních i klinických studiích, terapie obezity fyzickou aktivitou a bariatrickou chirurgií má u obézních jedinců výrazné pozitivní metabolické účinky. Patofyziologické mechanismy zodpovědné za uvedené účinky však dosud nejsou zcela přesně objasněny. Tubulizace žaludku je restriktivní bariatrickou operací, které vede k významnému snížení tělesné hmotnosti i zlepšení řady dalších parametrů. Na jejich účincích se jistě mohou podílet i přímé hormonální vlivy – především snížení sérových koncentrací orexigenně-působícího ghrelinu. V naší práci měla tubulizace žaludku pozitivní vliv na celou řadu metabolických parametrů. Mimo jiné významně zlepšila prozánětlivý profil podkožní tukové tkáně u obézních pacientek bez diabetu, avšak neměla žádný vliv na zvýšenou expresi prozánětlivě působících faktorů v periferních monocytech v průběhu 2letého sledování. Naše data ve shodě s jinými pracemi naznačují, že jedním z mechanismů, které se mohou podílet na metabolickém zlepšení pacientek po tubulizaci žaludku, může být zmírnění chronického zánětlivého stavu a to zejména v podkožní tukové tkáni [556]. Jiné práce prokázaly, že tubulizace žaludku může mít pozitivní vliv na antropometrické parametry [560], stejně tak jako na parametry inzulínové rezistence, kontrolu glykémie u pacientů s diabetem 2. typu, sérové koncentrace lipidů [561] a hodnoty krevního tlaku [563]. V naší studii tubulizace žaludku významně snížila tělesnou hmotnost, zlepšila lipidový profil pacientek a snížila subklinický zánět, který byl měřen pomocí hsCRP. V průběhu 2letého sledování pacientek nebyl pozorován vliv na parametry glukózového metabolismu (glykémie na lačno, HbA1c, HOMA index). Tento efekt může být vysvětlen tím, že obézní pacientky ve sledované skupině neměly poruchu glukózového metabolismu. Pozitivní efekt tubulizace žaludku přetrvával po celou dobu studie, ačkoliv byl pozorován patrný, ale nesignifikantní trend ke zvyšování BMI a glykémie na konci 2letého sledování pacientek. V souladu s jinými pracemi [243, 262, 263, 564], které byly publikovány na toto téma, jsme na počátku studie před intervencí prokázali zvýšenou expresi chemotakticky působících cytokinů v podkožní tukové tkáni. Zvýšeny byly exprese CC chemokinů 3, 17 a 22 s korespondujícím zvýšením odpovídajících chemokinových receptorů (CCR-1, -2, -3) a jiných prozánětlivě působících receptorů

(TLR-2, TNFRS1A) v periferních monocytech. Vyšší exprese markeru makrofágů CD68 ukazuje na zvýšenou akumulaci imunokompetentních buněk v podkožní tukové tkáni obézních jedinců, což může dále přispívat k progresi lokálního subklinického zánětu. Zvýšená exprese prozánětlivě působícího cytokinu IL-18, stejně tak jako zvýšená exprese protizánětlivě působícího cytokinu IL-10 naznačují, že tuková tkáň obézních jedinců je infiltrována nikoliv pouze M1-makrofágy, které produkují prozánětlivé cytokiny, ale také protizánětlivě působícími makrofágy M2, kdy IL-10 je jeden z typických cytokinů těchto buněk [565, 566]. Výsledky naší práce potvrzují přítomnost silného prozánětlivého a chemotaktického stavu makrofágů a jiných buněk imunitního systému v podkožní tukové tkáni obézních pacientek. Tento fakt naznačuje, že obezita i bez poruchy glukózového metabolismu je schopna zvýšit chemoatrakční potenciál podkožní tukové tkáně pro vstup dalších prozánětlivých imunokompetentních buněk. Poměrně překvapivým zjištěním naší studie je skutečnost, že tubulizace žaludku kromě výrazného zlepšení prozánětlivého profilu v podkožní tukové tkáni neměla žádný vliv na zvýšenou expresi prozánětlivě působících genů a jiných prozánětlivě působících působků v periferních monocytech. Po tubulizaci žaludku došlo ke snížení exprese prozánětlivě působících chemokinů a markeru makrofágů CD68, což ukazuje na sníženou chemoatrakční schopnost a sníženou infiltraci podkožní tukové tkáně imunokompetentními buňkami. Tento efekt na zvýšenou expresi prozánětlivě působících chemokinů a jiných prozánětlivých receptorů nebyl zjištěn v periferních monocytech v průběhu celého období sledování po operaci. Naše data jsou v rozporu s výsledky jiné naší práce u obézních pacientů s diabetem 2. typu, u kterých 3týdenní nízkokalorická dieta s energetickým příjmem 2500 kJ/den vedla k signifikantnímu a konzistentnímu snížení zvýšené mRNA exprese všech chemokinových a cytokinových receptorů v periferních monocytech a k podobné i když méně vyjádřené změně v expresním profilu zvýšeně exprimovaných chemokinů v podkožní tukové tkáni [243]. Jeden zřejmý rozdíl mezi naší a uvedenou studií, který by částečně mohl vysvětlit rozdílné výsledky, je přítomnost diabetu ve skupině žen v citované práci s nízkokalorickou dietou. Nicméně tato zjištění naznačují, že chemotaktický profil v periferních monocytech může být více ovlivněn krátkodobými změnami v energetickém příjmu (které jsou charakteristické pro nízkokalorickou dietu), zatímco prozánětlivý a chemoatrakční profil v podkožní tukové tkáni může být více ovlivněn dlouhodobým poklesem tělesné hmotnosti jaký je přítomen po tubulizaci žaludku. Podkožní tuková tkáň může být

primárním místem, kde dochází k metabolicky pozitivním změnám u dlouhodobější redukce tělesné hmotnosti po tubulizaci žaludku, zatímco periferní monocyty mohou hrát důležitou roli v dlouhodobém přetrvávání nebo recidivě vzniku subklinického zánětu po tubulizaci žaludku [567].

S výjimkou změny v chemoatrakčním profilu mohou být do dlouhodobého přetrvávání prozánětlivého stavu zahrnuty i jiné specifické mechanismy v periferních monocyttech. Toll-like receptory jsou jedním z klíčových komponent vrozeného imunitního systému a jsou exprimovány převážně na monocyttech. Toll-like receptory se podílejí na patogenezi inzulínové rezistence na zvířecích modelech [391, 568] a zprostředkovávají vznik prozánětlivého stavu v cévách a inzulínovou rezistenci u dietou-indukované obezity [569]. Aktivace Toll-like receptorů v adipocyttech byla asociována se vznikem inzulínové rezistence u obézních a s následným rozvojem diabetu 2. typu [570]. Vysoké koncentrace glukózy a volných mastných kyselin v krvi mohou zvyšovat aktivaci a expresi TLR2 a TLR4, což vede k vyšší aktivaci prozánětlivé cesty přes nukleární faktor (NF)- κ B [571]. V naší práci jsme pozorovali signifikantní zvýšení mRNA exprese TLR2, TLR4 a NF κ B2 v periferních monocyttech obézních pacientek ve srovnání se zdravými ženami před laparoskopickou tubulizací žaludku a toto zvýšení přetrvávalo po celou dobu sledování. Toto zvýšení naznačuje přetrvávající aktivaci TLR prozánětlivé osy v periferních monocyttech.

Jiným faktorem, který se může podílet na přetrvávajícím prozánětlivém stavu po tubulizaci žaludku, může být makrofágový migrační inhibiční faktor (MIF), který je široce exprimovaným prozánětlivým cytokinem, který se podílí na vzniku velkého množství zánětlivých onemocnění [572-574]. Jeho deficit je spojen se sníženou infiltrací makrofágů do bílé tukové tkáně a pokles systémového chronického zánětu a subklinického lokálního chronického zánětu v různých orgánech [575]. Zvýšená exprese tohoto prozánětlivého cytokinu v periferních monocyttech byla pozorována v naší studii po celou dobu sledování pacientek po tubulizaci žaludku.

U obézních žen, které podstoupily tubulizaci žaludku, jsme prokázali, že podkožní tuková tkáň a periferní monocyty vykazují silný chemoatrakční a prozánětlivý profil s korespondujícím zvýšením exprese chemotaktických faktorů a jejich odpovídajících receptorů. Tubulizace žaludku zlepšila metabolickou kontrolu pacientek a snížila subklinický chronický zánět. Tento efekt byl spojen se zlepšením prozánětlivého

expresního profilu chemokinů, chemokinových receptorů a prozánětlivě působících cytokinů v podkožní tukové tkáni, ale nikoliv v periferních monocytech.

Ve druhé práci jsme sledovali u pacientek s obezitou vliv pravidelné fyzické aktivity. Zde bylo nejdůležitějším zjištěním, že tři měsíce pravidelné fyzické aktivity signifikantně snížily tělesnou hmotnost a obsah tuku v organizmu, systémový subklinický zánět a inzulínovou rezistenci bez významného vlivu na endokrinní funkce podkožní tukové tkáně, krevní tlak a sérové koncentrace lipidů. Tato zjištění jsou ve shodě i s jinými pracemi, které zkoumaly vliv fyzické aktivity na expresi různých adipokinů v podkožní tukové tkáni. Práce Polaka et al. se zabývala vlivem 12týdenní fyzické aktivity u osmi obézních postmenopauzálních žen na expresi vybraných adipokinů v podkožní tukové tkáni. Tyto ženy zredukovaly v průběhu cvičebního režimu svojí hmotnost o cca 5 kg, ale nebyla zjištěna žádná signifikantní změna v relativní genové expresi adiponektinu, leptinu, IL-6, nebo TNF- α v podkožní tukové tkáni [576]. Další práce sledovala vliv 12týdenní fyzické aktivity u dvanácti obézních mužů středního věku, tato intervence nevedla v této studii k signifikantnímu poklesu hmotnosti a nedošlo ani k signifikantní změně relativní genové exprese adiponektinu, leptinu, IL-1 β , IL-6 a TNF- α [577]. Christiansen et al. ve své 12týdenní intervenční studii s fyzickou aktivitou neprokázal ve skupině obézních pacientů žádnou signifikantní změnu v relativní genové expresi IL-6, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α a leptinu v podkožní tukové tkáni a nebyla zjištěna ani žádná signifikantní změna v markerech infiltrace tukové tkáně makrofágy CD-68 a CD-14 [578]. Výsledky citovaných prací a naší práce naznačují, že endokrinní funkce podkožní tukové tkáně není pravděpodobně primárně zodpovědná za zlepšení systémového subklinického zánětu a inzulínové rezistence. Obezita je typicky charakterizovaná nikoliv jen nadměrnou akumulací tukové tkáně, ale i hypertrofií adipocytů a zvýšenou produkcí prozánětlivých faktorů a faktorů přímo zhoršujících inzulínovou rezistenci [579]. Skupina obézních pacientek v naší studii měla před intervencí zvýšenou expresi chemotaktických cytokinů (CC chemokiny 2, 3, 4 a 17) a makrofágového markeru CD68 ve srovnání s kontrolní skupinou. To naznačuje zvýšený prozánětlivý stav tukové tkáně u pacientek s obezitou a vyšší infiltraci tukové tkáně makrofágy, což je v souladu s výsledky naší práce s tubulizací žaludku a pracemi jiných autorů [261, 263]. Dále byla u obézních žen prokázána zvýšená genová exprese protizánětlivě působícího IL-10, jednoho z fenotypických markerů protizánětlivých M2-makrofágů

[565], naznačujících komplexní vliv obezity na zastoupení imunokompetentních buněk v tukové tkáni. Tyto výsledky naznačují přítomnost silného prozánětlivého a chemoatrakčního stavu podkožní tukové tkáně pro makrofágy a jiné imunokompetentní buňky u obézních pacientek.

Dalším zajímavým zjištěním naší práce je, že tři měsíce pravidelné aerobní fyzické aktivity neměly vliv na zvýšeně exprimované chemokiny v podkožní tukové tkáni. To ukazuje na přetrvávající prozánětlivý a chemotaktický stav v podkožní tukové tkáni i po tomto typu intervence fyzickou aktivitou. Nedostatečný efekt 3měsíční pravidelné fyzické aktivity na prozánětlivý stav podkožní tukové tkáně v kombinaci se zlepšením systémového subklinického zánětu může mít několik vysvětlení. Za prvé, bylo doloženo, že podkožní tuková tkáň, která představuje kvantitativně nejvýznamnější tukové depo, není metabolicky nejaktivnějším podtypem tukové tkáně s ohledem na systémové metabolické účinky [580]. Experimentální a klinické práce prokázaly, že hlavním místem produkce faktorů s prozánětlivým účinkem u obézních pacientů s diabetem 2. typu či bez něj je viscerální tuková tkáň [44, 581]. Ačkoliv studie u lidí, na rozdíl od experimentálních prací, přesvědčivě neukázaly, že viscerální tuková tkáň má větší prozánětlivý potenciál než podkožní tuková tkáň, bylo prokázáno, že redukce hmotnosti způsobená dietou, nebo cvičením je způsobená více úbytkem viscerální než podkožní tukové tkáně [582, 583]. V naší práci byl signifikantní pokles viscerální tukové tkáně dokumentován snížením obvodu pasu, což předpokládá, že změny endokrinní funkce tukové tkáně by mohly být více vyjádřeny ve viscerální, než v podkožní tukové tkáni. Na druhou stranu nebyly zaznamenány žádné významnější změny v cirkulujících sérových koncentracích námi vybraných adipokinů po třech měsících pravidelného cvičebního režimu. Dle našich výsledků je pravděpodobné, že změny endokrinní funkce tukové tkáně mají zřejmě jen malý vliv na zlepšení subklinického zánětu a inzulínové rezistence.

Jedinou signifikantní změnou v relativní genové expresi v podkožní tukové tkáni po třech měsících fyzické aktivity bylo zvýšení exprese genu pro aquaporin-3, což naznačuje jeho možné spojení s pravidelnou fyzickou zátěží. Jak již bylo řečeno aquaporiny jsou rodinou malých, hydrofobních, integrálních membránových proteinů, které jsou exprimovány v řadě tkání a jsou zodpovědné za transport vody a glycerolu, migraci buněk, neuronální signalizaci a řadu dalších procesů [473]. Aquaporin 3 je silně exprimován v bazální vrstvě keratinocytů, kde se podílí na transportu vody a

hydrataci podkožní tukové tkáně [584]. Některá data ukazují, že může být zapojen do řízení buněčné proliferace a to prostřednictvím regulace transportu glycerolu. Jsou práce, které naznačují, že aquaporiny by mohly být zapojeny do změn proliferační aktivity tukové tkáně po fyzické aktivitě [585].

Zvýšená exprese hlavních komponent renin-angiotenzin-aldosteronového systému, jako je angiotenzin-konvertující enzym, angiotenzinogen a angiotenzinový receptor typ 1 v tukové tkáni může ukazovat vztah mezi obezitou a vznikem arteriální hypertenze [586]. V naší studii s fyzickou aktivitou měly všechny obézní pacientky arteriální hypertenzi. V porovnání se zdravou, kontrolní skupinou nebyl nalezen signifikantní rozdíl v relativní genové expresi genu pro angiotenzin-konvertující enzym, angiotenzinogen a angiotenzinový receptor typ 1 v podkožní tukové tkáni ve srovnání s kontrolní skupinou jedinců s normálními hodnotami krevního tlaku. 3měsíční fyzická aktivita neměla vliv na žádný z těchto parametrů. Tyto nálezy jsou ve shodě s prací Giacchettiho et al., který prokázal zvýšenou relativní genovou expresi pro angiotenzinogen a angiotenzinový receptor typ 1 ve viscerální ale nikoliv podkožní tukové tkáni obézních pacientů [587]. V jiné naší práci, která byla prováděna u kardiologických pacientů, jsme neprokázali žádný rozdíl v relativní genové expresi složek renin-angiotenzin-aldosteronového systému v epikardiální a podkožní tukové tkáni, což předpokládá, že jejich regulace může být odlišná v různých podtypech tukové tkáně [588]. Tyto data neukazují souvislost mezi zvýšenou produkcí komponent renin-angiotenzin-aldosteronového systému v podkožní tukové tkáni, obezitou a vznikem arteriální hypertenze.

Velká část dlouhodobějších studií zaměřených na efekt pravidelného cvičení na cirkulující hladiny lipidů prokázala zvýšené sérové koncentrace HDL-cholesterolu a snížené sérové koncentrace triglyceridů [589]. V naší studii byla pozorována pouze nesignifikantní tendence ke zlepšení těchto parametrů. Tento nedostatečný efekt cvičení může být vysvětlován malou frekvencí cvičení, která byla prováděna třikrát týdně a krátkou dobou cvičebního programu, který trval celkem tři měsíce, zatímco v ostatních studiích byl cvičební program nastaven na šest a někdy i více měsíců [590]. Podobně jsme nepozorovali ani signifikantní změnu v hodnotách krevního tlaku po třech měsících cvičebního programu. Nepřítomnost změn v krevním tlaku může být vysvětlena tím, že v průběhu studie byla dle potřeby upravována (obvykle snižována) antihypertenzivní medikace, což mohlo potenciálně detekovatelné změny

krevního tlaku zamaskovat. Tato zjištění mohou také naznačovat, že k významnému snížení krevního tlaku či zlepšení cirkulujících lipidů může být nutné delší trvání fyzické aktivity, případně její vyšší frekvence nebo intenzita.

Naše práce tedy prokázala, že tři měsíce pravidelného cvičebního programu snížily systémový subklinický zánět a zlepšily inzulínovou rezistenci, měly malý vliv na endokrinní funkci podkožní tukové tkáně a žádný efekt na krevní tlak a cirkulující hladiny lipidů. Tato zjištění naznačují, že změny prozánětlivého stavu podkožní tukové tkáně se pravděpodobně nepodílejí na pozitivních metabolických a protizánětlivých efektech pravidelného cvičebního režimu. Zajímavým zjištěním naší práce je zvýšení relativní genové exprese aquaporinu-3 v podkožní tukové tkáni po cvičebním režimu. Fyzická aktivita snižuje objem tělesného tuku zvýšením energetického výdeje [591]. V průběhu fyzické aktivity dochází k mobilizaci tukových zásob a to převážně triacylglycerolů. Tuková tkáň je důležitým metabolickým substrátem v průběhu prodlouženého cvičení [592]. Předpokládá se, že podkožní tuková tkáň přispívá největší měrou podílem mastných kyselin, které jsou v konečném důsledku oxidovány při mírné intenzitě cvičení, kdežto viscerální tuková tkáň se na tomto procesu podílí jen malé míře [593]. Je třeba také zmínit triacylglyceroly obsažené ve svalech, které se uvolňují při cvičení střední intenzity [594, 595]. Uvolnění mastných kyselin z tukové tkáně v průběhu cvičení je umožněno lipolýzou tukové tkáně, stupněm reesterifikace mastných kyselin a krevním průtokem tukovou tkání [596, 597]. Cvičením navozená zvýšená lipolýza tukové tkáně je přičítána zvýšeným sérovým koncentracím katecholaminů a malému snížení sérových koncentrací inzulínu [596, 598]. Řada studií potvrdila, že za lipolýzu indukovanou cvičením jsou zodpovědné cirkulující sérové koncentrace adrenalinu [599, 600], nicméně i po zablokování účinků adrenalinu v tukové tkáni dochází k uvolňování mastných kyselin do systémové cirkulace [600]. Toto předpokládá přítomnost jiných cirkulujících faktorů, které aktivují lipolýzu v průběhu fyzické aktivity. Fyzická zátěž nízké intenzity je silným stimulem pro mobilizaci tuků z tukové tkáně ve stavu na lačno a příjem stravy tuto mobilizaci volných mastných kyselin z tukové tkáně snižuje [601]. Fyzická aktivita má déletrvající efekt (10-20 hodin) na oxidaci tuků obsažených ve stravě [602, 603]. Glukóza je nezbytná pro syntézu triacylglycerolu v adipocytech a to tvorbou glycerol-3-fosfátu, který může být prekurzorem pro syntézu mastných kyselin přes *de novo* lipogenezu [604]. Uvolnění

glycerolu lipolýzou v tukové tkáni se může podílet na tvorbě glukózy procesem glukoneogeneze v játrech [604]. Některé práce ukazují, že efekt cvičení může být odlišný v různých oblastech podkožní tukové tkáně a to v závislosti na krevním průtoku danou oblastí a na typu fyzické aktivity [605]. Není doposud zcela objasněno, jak se zvyšuje průtok krve tukovou tkání paralelně se zvyšováním intenzity fyzické zátěže a mobilizací mastných kyselin. Některé hypotézy ukazují, že fyzická aktivita s velkou intenzitou vede k vazokonstrikci cév tukové tkáně navozenou katecholaminy a poklesu průtoku krve tukovou tkání. Některé práce dokumentují, že fyzická aktivita s velkou intenzitou má za následek snížení uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně [594, 606, 607]. S přihlédnutím na různorodost velikostí tukových zásob v organismu, lze dle výsledků některých prací předpokládat, že lipolýza navozená cvičením je vyšší v horních (abdominálních) částech podkožní tukové tkáně ve srovnání s dolními (hýžděová, nebo femorální krajina) částmi podkožní tukové tkáně a to i v případě, kdy je cvičební režim primárně cílen na svalstvo dolní části těla [596, 605]. Jedna práce poukázala na to, že pokud je cvičení soustředěno na paže, lipolýza je i tak větší v abdominální tukové tkáni, než v podkožní tukové tkáni v oblasti klíční kosti [608]. Na základě těchto výsledků se předpokládá, že změna citlivosti na katecholaminy může vysvětlovat tyto místní rozdíly v lipolýze v různých oblastech podkožní tukové tkáně v průběhu fyzické aktivity [488, 609, 610]. Pokud jde o uvolňování mastných kyselin po cvičebním režimu, tento proces zůstává zvýšen společně se zvýšeným krevním průtokem tukovou tkání několik hodin po fyzické aktivitě s mírnou intenzitou [611, 612]. Nicméně je třeba upřesnit, že bezprostředně po ukončení cvičení je toto uvolňování mastných kyselin dočasně sníženo a teprve poté, dochází ke zvýšení, které trvá v průměru 3 hodiny [611, 612]. Toto zvýšení uvolňování mastných kyselin a krevního průtoku tukovou tkání po cvičebním režimu nebylo pozorováno u pacientů s diabetem 2. typu [613]. Jedna nedávno publikována práce poukázala na pozitivní korelaci mezi intenzitou fyzické zátěže (absolutní energetický výdej) a uvolňováním mastných kyselin po ukončení fyzické aktivity [614], což naznačuje roli intenzity fyzické zátěže, jako důležitého faktoru při mobilizaci mastných kyselin z tukové tkáně [614].

Cirkulující glycerol pochází z lipolýzy tukové tkáně, přijímané stravy a z glycerolu, který je reabsorbován v proximálních tubulech [478, 482]. Je důležitým metabolickým substrátem pro syntézu triacylglycerolů a v glukózové homeostáze, kdy se v procesu

paterní glukoneogeneze podílí na tvorbě glukózy při stavu lačnění [615]. Tuková tkáň představuje důležitý zdroj plazmatického glycerolu [478]. Doposud se předpokládalo, že hlavním kanálem pro glycerol je aquaporin-7 (AQP-7), ale nová data ukazují, že se na transportu glycerolu v adipocytech významnou měrou podílí i aquaporin-3 (AQP-3) a aquaporin-9 (AQP-9) [479, 480]. Možným důvodem přítomnosti několika glycerolových kanálů v adipocytech je skutečnost, že řízení lipidového a glukózového metabolismu je komplexní a složitý signalizační proces. Aquaporin-3 je přítomen v cytoplazmatické membráně a cytoplazmě [480], oproti ostatním aquaporinům, které jsou přítomny v plazmě, nebo v cytoplazmatické membráně. Mezi hlavní funkce aquaglyceroporinů v adipocytech patří kontrola vstřebávání a uvolňování glycerolu, dvou klíčových kroků v syntéze triacylglycerolů (lipogenezi) a hydrolýze triacylglycerolů (lipolýze) [481]. Za podmínek negativní energetické bilance jako je hladovění či fyzická aktivita jsou triacylglyceroly hydrolyzovány na glycerol a volné mastné kyseliny adipocytární triglyceridovou lipázou a hormon-senzitivní lipoproteinovou lipázou a jsou uvolňovány do krevního oběhu. Katecholaminy (noradrenalin a adrenalin) řídí lipolýzu přes lipolytické β -adrenergní receptory ($\beta_{1, 2, 3}$) a antilipolytickými α_2 -adrenergními receptory [488]. Aquaporin-3 zvyšuje efflux glycerolu z 3T3-L1 myších adipocytů v závislosti na β -adrenergní stimulaci a jiných lipolytických stimulech a to přesunem cytoplazmatické frakce aquaporinu-3 do cytoplazmatické membrány [489, 490]. Bylo popsáno, že snížení exprese aquaporinů (AQP-3 a AQP-7), které se podílejí na effluxu glycerolu z adipocytu v podkožní tukové tkáni vedlo k akumulaci glycerolu intracelulárně a vedlo ke zvětšení objemu adipocytu [479, 494, 495]. Bylo prokázáno, že obézní diabetici 2. typu mají větší změnu v expresním profilu aquaporinu-3, -7, -9 ve srovnání s nediabetiky, což předpokládá, že řízení aquaglyceroporinů v lidské tukové tkáni více souvisí s inzulínovou rezistencí, než s obezitou [480]. Myši s vyřazeným genem pro aquaporin-3 se klinicky manifestovaly nefrogenním diabetes insipidus [616]. Jedinci mající homozygotní mutaci pro aquaporin-3 jsou buď obézní, nebo mají diabetes 2. typu [484, 485]. Jiné práce prokázaly, že relativní genová exprese aquaporinu-3 je významně zvýšená u nádorových onemocnění různých buněčných typů, jako jsou nádory kůže, jícnu, jazyka, kolorektální tumory a nádory žaludku [506, 617-620].

V kontextu s naší studií lze usuzovat, že zvýšení relativní genové exprese aquaporinu-3 po třech měsících fyzické aktivity u obézních žen bylo v návaznosti na

zvýšení lipolytické aktivity podkožní tukové tkáně v důsledku cvičebního režimu.

13. Závěr a shrnutí výsledků práce

Intenzivní výzkum věnující se obezitě, diabetes mellitus 2. typu a jiným metabolickým odchylkám, které se podílejí na rozvoji a urychlení procesu aterosklerózy a vzniku kardiovaskulárních onemocnění přináší v poslední době velké množství informací o různých faktorech a mechanismech podílejících se na etiopatogenezi těchto chorob. Do této skupiny patří i celá řada faktorů s endokrinními účinky, které jsou produkovány podkožní a viscerální tukovou tkání a svým regulačním působením ovlivňují pochody ve většině metabolicky aktivních tkání a orgánů. Pozitivní vliv těchto faktorů na celkový metabolický profil z nich činí velice lákavý cíl nejrůznějších terapeutických intervencí. Přestože fyzická aktivita a bariatrická chirurgie patří k základním nefarmakologickým postupům v léčbě obezity, nejsou dosud známé přesné a jednoznačné údaje o přesných mechanismech, které vedou k pozitivním účinkům těchto dvou intervenčních metod. Subklinický zánět je považován za jeden z hlavních mechanismů integrujících obezitu, diabetes mellitus 2. typu a další komponenty metabolického syndromu. Hlavní úloha při vzniku lokálního zánětu v tukové tkáni a následně i systémové zánětlivé reakci je v současnosti připisována infiltraci tukové tkáně imunokompetentními buňkami, obzvláště makrofágy, pocházejícími z periferní cirkulace. Přesné mechanismy interakce tukové tkáně a periferních monocytů (prekursorů tkáňových makrofágů) však nejsou dosud plně objasněny. Proto bylo jedním z cílů těchto dvou intervenčních studií přinést další poznatky o vlivu fyzické aktivity na expresi komponent renin-angiotenzin-aldosteronového systému a jiných prozánětlivých faktorů v podkožní tukové tkáni ve skupině obézních pacientek s arteriální hypertenzí a zhodnotit vliv fyzické aktivity na kompenzaci krevního tlaku a subklinický zánět. Ve druhé studii s obézními pacientkami jsme se ve snaze blíže charakterizovat vzájemnou souhru mezi tukovou tkání a periferními monocyty zaměřili na posouzení exprese chemotaktických a dalších prozánětlivých faktorů a jím odpovídajících receptorů v podkožní tukové tkáni a periferních monocytech obézních pacientek, které podstoupily laparoskopickou tubulizaci žaludku.

V naší studii s fyzickou aktivitou jsme ukázali, že sérové koncentrace námi vybraných prozánětlivých faktorů a prozánětlivě působících chemokinů v podkožní tukové tkáni jsou signifikantně zvýšené u obézních pacientů s arteriální hypertenzí v porovnání se štíhlými subjekty. Dále jsme prokázali, že 3měsíční fyzická aktivita vedla ke zlepšení antropometrických parametrů, zlepšení kompenzace krevního tlaku a k poklesu parametrů subklinického zánětu. Dalším zjištěním naší práce bylo, že fyzická aktivita nevedla k žádné signifikantně významné změně v expresi komponent systému renin-angiotenzin-aldosteron a jiných prozánětlivě a protizánětlivě působících genů v podkožní tukové tkáni. V naší další intervenční studii u obézních pacientek, které podstoupily laparoskopickou tubulizaci žaludku jsme prokázali, že podkožní tuková tkáň u obézních pacientek zvýšeně exprimuje celou paletu chemotaktických a prozánětlivých cytokinů, které působí primárně na mononukleární buňky. U těchto obézních pacientek jsme zároveň v cirkulujících periferních monocytech prokázali nadměrnou expresi korespondujících chemokinových a cytokinových receptorů. Laparoskopická tubulizace žaludku v průběhu 2letého sledování zlepšila antropometrické parametry, metabolický a zánětlivý stav, což bylo alespoň z části zprostředkováno úpravou expresního profilu chemokinových a cytokinových receptorů v podkožní tukové tkáni. Naopak zvýšený expresní profil chemokinů, chemokinových a jiných prozánětlivě působících receptorů na cirkulujících periferních monocytech nebyl po laparoskopické tubulizaci žaludku výrazněji ovlivněn. Dále jsme prokázali přetrvávající aktivaci prozánětlivé osy toll-like receptorů - NF- κ B. Tento přetrvávající prozánětlivý stav v periferních monocytech se mohl podílet na mírném, ale nesignifikantním zhoršení metabolického stavu obézních pacientek, které jsme pozorovali ve druhém roce sledování, a může se podílet na opakované manifestaci metabolických komplikací. Získané poznatky identifikují periferní monocyty jako důležitý a dosud málo zdůrazňovaný faktor účastnící se patogeneze obezity a jiných metabolických onemocnění.

I přes veškeré úsilí věnované v poslední době léčbě a prevenci současné pandemie obezity a diabetes mellitus 2. typu, zaujímají metabolická, kardiovaskulární a další onemocnění asociována s nadměrnou akumulací tělesného tuku pořád nejčastější příčiny morbidit a mortality v naší společnosti. Hlubší porozumění patofyziologickým mechanismům, které vedou k rozvoji uvedených poruch, lze pokládat za základní podmínku k identifikaci nejúčinnějších terapeutických strategií schopných kauzálně

zasáhnout do patogeneze obezity a přidružených onemocnění. Věříme, že v uvedeném kontextu představují naše poznatky alespoň částečně vysvětlení těchto patofyziologických mechanismů.

13. LITERATURA

1. York, D.A., et al., *Prevention Conference VII: Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: Group I: worldwide demographics of obesity*. *Circulation*, 2004. **110**(18): p. e463-70.
2. Sironi, A.M., et al., *Ectopic fat storage, insulin resistance, and hypertension*. *Curr Pharm Des*, 2011. **17**(28): p. 3074-80.
3. Unger, R.H. and Y.T. Zhou, *Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover*. *Diabetes*, 2001. **50 Suppl 1**: p. S118-21.
4. Sell, H. and J. Eckel, *Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. **13**(4): p. 366-70.
5. Curat, C.A., et al., *From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes*. *Diabetes*, 2004. **53**(5): p. 1285-92.
6. Martin, S. and R.G. Parton, *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(5): p. 373-8.
7. Trayhurn, P. and J.H. Beattie, *Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ*. *Proc Nutr Soc*, 2001. **60**(3): p. 329-39.
8. Cinti, S., *Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation*. *Ann Med*, 2011. **43**(2): p. 104-15.
9. Enerback, S., *The origins of brown adipose tissue*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(19): p. 2021-3.
10. Cereijo, R., M. Giralt, and F. Villarroya, *Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans*. *Ann Med*, 2014: p. 1-9.
11. Zingaretti, M.C., et al., *The presence of UCP1 demonstrates that metabolically*

- active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue.* FASEB J, 2009. **23**(9): p. 3113-20.
12. Shrestha, Y.B., et al., *Central melanocortin stimulation increases phosphorylated perilipin A and hormone-sensitive lipase in adipose tissues.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **299**(1): p. R140-9.
 13. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans).* Int J Obes (Lond), 2010. **34 Suppl 1**: p. S7-16.
 14. Jacobsen, B.K., et al., *Acyl pattern of adipose tissue triglycerides, plasma free fatty acids, and diet of a group of men participating in a primary coronary prevention program (the Oslo Study).* Am J Clin Nutr, 1983. **38**(6): p. 906-13.
 15. Bartness, T.J., C.H. Vaughan, and C.K. Song, *Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue.* Int J Obes (Lond), 2010. **34 Suppl 1**: p. S36-42.
 16. Vitali, A., et al., *The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes.* J Lipid Res, 2012. **53**(4): p. 619-29.
 17. Seale, P., et al., *PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch.* Nature, 2008. **454**(7207): p. 961-7.
 18. Xue, B., et al., *Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat.* J Lipid Res, 2007. **48**(1): p. 41-51.
 19. Wu, J., et al., *Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human.* Cell, 2012. **150**(2): p. 366-76.
 20. Petrovic, N., et al., *Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes.* J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7153-64.
 21. Wu, J., P. Cohen, and B.M. Spiegelman, *Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?* Genes Dev, 2013. **27**(3): p. 234-50.
 22. Wronska, A. and Z. Kmiec, *Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots.* Acta Physiol (Oxf), 2012. **205**(2): p. 194-208.
 23. Harwood, H.J., Jr., *The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis.* Neuropharmacology, 2012. **63**(1): p. 57-75.
 24. Wozniak, S.E., et al., *Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article.* Dig Dis Sci, 2009. **54**(9): p. 1847-56.
 25. Falcao-Pires, I. and A.F. Leite-Moreira, *Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment.* Heart Fail Rev, 2012. **17**(3): p. 325-44.
 26. Tishinsky, J.M., *Modulation of adipokines by n-3 polyunsaturated fatty acids and ensuing changes in skeletal muscle metabolic response and inflammation.* Appl Physiol Nutr Metab, 2013. **38**(3): p. 361.
 27. Wolfson, N., et al., *Relation of adiponectin to glucose tolerance status, adiposity, and cardiovascular risk factor load.* Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 250621.
 28. Pereira, R.I., et al., *Adiponectin dysregulation and insulin resistance in type 1 diabetes.* J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(4): p. E642-7.
 29. Yamauchi, T., et al., *Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes*

- abrogation of adiponectin binding and metabolic actions.* Nat Med, 2007. **13**(3): p. 332-9.
30. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.* Nature, 2003. **423**(6941): p. 762-9.
 31. Bjursell, M., et al., *Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism.* Diabetes, 2007. **56**(3): p. 583-93.
 32. Civitarese, A.E., et al., *Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes.* Diabetologia, 2004. **47**(5): p. 816-20.
 33. Staiger, H., et al., *Expression of adiponectin receptor mRNA in human skeletal muscle cells is related to in vivo parameters of glucose and lipid metabolism.* Diabetes, 2004. **53**(9): p. 2195-201.
 34. Morinigo, R., et al., *Intra-abdominal fat adiponectin receptors expression and cardiovascular metabolic risk factors in obesity and diabetes.* Obes Surg, 2006. **16**(6): p. 745-51.
 35. Potapov, V.A., et al., *Adiponectin and adiponectin receptor gene variants in relation to type 2 diabetes and insulin resistance-related phenotypes.* Rev Diabet Stud, 2008. **5**(1): p. 28-37.
 36. Broedl, U.C., et al., *Genetic variants of adiponectin receptor 2 are associated with increased adiponectin levels and decreased triglyceride/VLDL levels in patients with metabolic syndrome.* Cardiovasc Diabetol, 2006. **5**: p. 11.
 37. Kotronen, A., et al., *Genetic variation in the ADIPOR2 gene is associated with liver fat content and its surrogate markers in three independent cohorts.* Eur J Endocrinol, 2009. **160**(4): p. 593-602.
 38. Qi, L., et al., *Variations in adiponectin receptor genes and susceptibility to type 2 diabetes in women: a tagging-single nucleotide polymorphism haplotype analysis.* Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1586-91.
 39. Collins, S.C., et al., *Adiponectin receptor genes: mutation screening in syndromes of insulin resistance and association studies for type 2 diabetes and metabolic traits in UK populations.* Diabetologia, 2007. **50**(3): p. 555-62.
 40. Samal, B., et al., *Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1431-7.
 41. Fukuhara, A., et al., *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin.* Science, 2005. **307**(5708): p. 426-30.
 42. Berndt, J., et al., *Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans.* Diabetes, 2005. **54**(10): p. 2911-6.
 43. Cheng, K.H., et al., *Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease.* Int J Obes (Lond), 2008. **32**(2): p. 268-74.
 44. Curat, C.A., et al., *Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin.* Diabetologia, 2006. **49**(4): p. 744-7.
 45. Rongvaux, A., et al., *Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis.* Eur J Immunol, 2002. **32**(11): p. 3225-34.
 46. Formentini, L., F. Moroni, and A. Chiarugi, *Detection and pharmacological modulation of nicotinamide mononucleotide (NMN) in vitro and in vivo.* Biochem Pharmacol, 2009. **77**(10): p. 1612-20.

47. Revollo, J.R., A.A. Grimm, and S. Imai, *The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 50754-63.
48. van der Veer, E., et al., *Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD⁺-dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation*. Circ Res, 2005. **97**(1): p. 25-34.
49. Revollo, J.R., et al., *Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 363-75.
50. Gosset, M., et al., *Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(5): p. 1399-409.
51. Costford, S.R., et al., *Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(1): p. E117-26.
52. Garten, A., et al., *Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **391**(1): p. 376-81.
53. Chen, M.P., et al., *Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(1): p. 295-9.
54. Filippatos, T.D., et al., *Increased plasma visfatin levels in subjects with the metabolic syndrome*. Eur J Clin Invest, 2008. **38**(1): p. 71-2.
55. Vanhoutte, P.M., *Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis*. Circ J, 2009. **73**(4): p. 595-601.
56. Uslu, S., et al., *Relationship between adipocytokines and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus*. Exp Ther Med, 2012. **4**(1): p. 113-120.
57. Laudes, M., et al., *Visfatin/PBEF/Nampt and resistin expressions in circulating blood monocytes are differentially related to obesity and type 2 diabetes in humans*. Horm Metab Res, 2010. **42**(4): p. 268-73.
58. Oki, K., et al., *Circulating visfatin level is correlated with inflammation, but not with insulin resistance*. Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **67**(5): p. 796-800.
59. Liu, S.W., et al., *Association of plasma visfatin levels with inflammation, atherosclerosis and acute coronary syndromes (ACS) in humans*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(2): p. 202-7.
60. Kato, A., et al., *Relationship between serum pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin and atherosclerotic parameters in chronic hemodialysis patients*. Am J Nephrol, 2009. **29**(1): p. 31-5.
61. Bole-Feysot, C., et al., *Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice*. Endocr Rev, 1998. **19**(3): p. 225-68.
62. Freeman, M.E., et al., *Prolactin: structure, function, and regulation of secretion*. Physiol Rev, 2000. **80**(4): p. 1523-631.
63. Nagano, M., et al., *Expression of prolactin and growth hormone receptor genes and their isoforms in the gastrointestinal tract*. Am J Physiol, 1995. **268**(3 Pt 1): p. G431-42.
64. Matera, L., *Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells*. Life Sci, 1996. **59**(8): p. 599-614.
65. Matera, L., et al., *Up-modulation of interferon-gamma mediates the enhancement of spontaneous cytotoxicity in prolactin-activated natural killer*

- cells. *Immunology*, 1999. **98**(3): p. 386-92.
66. Walker, S.E. and J.D. Jacobson, *Roles of prolactin and gonadotropin-releasing hormone in rheumatic diseases*. *Rheum Dis Clin North Am*, 2000. **26**(4): p. 713-36.
 67. Carrero, J.J., et al., *Prolactin levels, endothelial dysfunction, and the risk of cardiovascular events and mortality in patients with CKD*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012. **7**(2): p. 207-15.
 68. Stumpe, K.O., et al., *Hyperprolactinaemia and antihypertensive effect of bromocriptine in essential hypertension. Identification of abnormal central dopamine control*. *Lancet*, 1977. **2**(8031): p. 211-4.
 69. Wallaschofski, H., et al., *Enhanced platelet activation by prolactin in patients with ischemic stroke*. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(1): p. 38-44.
 70. Sauro, M.D., et al., *Prolactin stimulation of protein kinase C activity in rat aortic smooth muscle*. *Life Sci*, 1989. **44**(23): p. 1787-92.
 71. Sun, R., et al., *Expression of prolactin receptor and response to prolactin stimulation of human NK cell lines*. *Cell Res*, 2004. **14**(1): p. 67-73.
 72. Yavuz, D., et al., *Endothelial function, insulin sensitivity and inflammatory markers in hyperprolactinemic pre-menopausal women*. *Eur J Endocrinol*, 2003. **149**(3): p. 187-93.
 73. Georgiopoulou, G.A., et al., *Prolactin and preclinical atherosclerosis in menopausal women with cardiovascular risk factors*. *Hypertension*, 2009. **54**(1): p. 98-105.
 74. Furuhashi, M., et al., *Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(7): p. 2640-50.
 75. Makowski, L., et al., *The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I κ B kinase activities*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(13): p. 12888-95.
 76. Boord, J.B., et al., *Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2004. **110**(11): p. 1492-8.
 77. Elmasri, H., et al., *Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells*. *FASEB J*, 2009. **23**(11): p. 3865-73.
 78. Lamounier-Zepter, V., et al., *Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease*. *Circ Res*, 2009. **105**(4): p. 326-34.
 79. Haluzik, M.M., et al., *Serum adipocyte fatty acid binding protein levels in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of fenofibrate treatment*. *Physiol Res*, 2009. **58**(1): p. 93-9.
 80. Cabre, A., et al., *Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(8): p. 1746-51.
 81. Vural, B., et al., *Presence of fatty-acid-binding protein 4 expression in human epicardial adipose tissue in metabolic syndrome*. *Cardiovasc Pathol*, 2008. **17**(6): p. 392-8.
 82. Ben Yahia, R., et al., *[Healthy persons versus patients with diabetes mellitus type 2--chosen parameters in serum and subcutaneous abdominal adipose tissue]*. *Vnitr Lek*, 2007. **53**(1): p. 9, 11-7.
 83. Simon, I., et al., *Adipocyte fatty acid-binding protein as a determinant of insulin*

- sensitivity in morbid-obese women.* Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(6): p. 1124-8.
84. Khalyfa, A., et al., *Fatty-acid binding protein 4 gene variants and childhood obesity: potential implications for insulin sensitivity and CRP levels.* Lipids Health Dis, 2010. **9**: p. 18.
 85. Haluzikova, D., et al., *Serum concentrations of adipocyte fatty acid binding protein in patients with anorexia nervosa.* Physiol Res, 2009. **58**(4): p. 577-81.
 86. Stejskal, D., M. Karpisek, and J. Bronsky, *Serum adipocyte-fatty acid binding protein discriminates patients with permanent and temporary body weight loss.* J Clin Lab Anal, 2008. **22**(5): p. 380-2.
 87. Gavin, T.P., et al., *Lower capillary density but no difference in VEGF expression in obese vs. lean young skeletal muscle in humans.* J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(1): p. 315-21.
 88. Frisbee, J.C., *Obesity, insulin resistance, and microvessel density.* Microcirculation, 2007. **14**(4-5): p. 289-98.
 89. Clerk, L.H., et al., *Obesity blunts insulin-mediated microvascular recruitment in human forearm muscle.* Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1436-42.
 90. Larsson, H., et al., *Muscle fiber characteristics in postmenopausal women with normal or impaired glucose tolerance.* Diabetes Care, 1999. **22**(8): p. 1330-8.
 91. Solomon, T.P., et al., *Progressive hyperglycemia across the glucose tolerance continuum in older obese adults is related to skeletal muscle capillarization and nitric oxide bioavailability.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(5): p. 1377-84.
 92. Mathieu-Costello, O., et al., *Regulation of skeletal muscle morphology in type 2 diabetic subjects by troglitazone and metformin: relationship to glucose disposal.* Metabolism, 2003. **52**(5): p. 540-6.
 93. Allenberg, K., K. Johansen, and B. Saltin, *Skeletal muscle adaptations to physical training in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus.* Acta Med Scand, 1988. **223**(4): p. 365-73.
 94. Kim, H.J., J.S. Lee, and C.K. Kim, *Effect of exercise training on muscle glucose transporter 4 protein and intramuscular lipid content in elderly men with impaired glucose tolerance.* Eur J Appl Physiol, 2004. **93**(3): p. 353-8.
 95. Sun, K., et al., *Fibrosis and adipose tissue dysfunction.* Cell Metab, 2013. **18**(4): p. 470-7.
 96. Pasarica, M., et al., *Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response.* Diabetes, 2009. **58**(3): p. 718-25.
 97. Spencer, M., et al., *Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(12): p. E1990-8.
 98. Levy, A.P., et al., *Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia.* J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13333-40.
 99. Timmons, J.A., et al., *Modulation of extracellular matrix genes reflects the magnitude of physiological adaptation to aerobic exercise training in humans.* BMC Biol, 2005. **3**: p. 19.
 100. Gustafsson, T., et al., *The influence of physical training on the angiotensin and VEGF-A systems in human skeletal muscle.* J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(3): p. 1012-20.
 101. Imhof, B.A. and M. Aurrand-Lions, *Angiogenesis and inflammation face off.* Nat Med, 2006. **12**(2): p. 171-2.

102. Imesch, P.D., C.D. Bindley, and I.H. Wallow, *Clinicopathologic correlation of intraretinal microvascular abnormalities*. *Retina*, 1997. **17**(4): p. 321-9.
103. Singh, H., N.P. Brindle, and V.A. Zammit, *High glucose and elevated fatty acids suppress signaling by the endothelium protective ligand angiopoietin-1*. *Microvasc Res*, 2010. **79**(2): p. 121-7.
104. Pellegrinelli, V., et al., *Endothelial cells from visceral adipose tissue disrupt adipocyte functions in a three-dimensional setting: partial rescue by angiopoietin-1*. *Diabetes*, 2014. **63**(2): p. 535-49.
105. Kim, I., et al., *Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression*. *Circ Res*, 2001. **89**(6): p. 477-9.
106. Papapetropoulos, A., et al., *Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(13): p. 9102-5.
107. Jeansson, M., et al., *Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(6): p. 2278-89.
108. Jung, Y.J., et al., *The effects of designed angiopoietin-1 variant on lipid droplet diameter, vascular endothelial cell density and metabolic parameters in diabetic db/db mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **420**(3): p. 498-504.
109. Masri, B., et al., *[Apelin signalisation and vascular physiopathology]*. *J Soc Biol*, 2009. **203**(2): p. 171-9.
110. Principe, A., et al., *The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease*. *Hepatology*, 2008. **48**(4): p. 1193-201.
111. Yoshiya, S., et al., *Blockade of the apelin-APJ system promotes mouse liver regeneration by activating Kupffer cells after partial hepatectomy*. *J Gastroenterol*, 2015. **50**(5): p. 573-82.
112. Dray, C., et al., *Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice*. *Cell Metab*, 2008. **8**(5): p. 437-45.
113. Castan-Laurell, I., et al., *Apelin, diabetes, and obesity*. *Endocrine*, 2011. **40**(1): p. 1-9.
114. De Mota, N., et al., *Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(28): p. 10464-9.
115. Ma, W.Y., et al., *Plasma apelin: A novel biomarker for predicting diabetes*. *Clin Chim Acta*, 2014. **435**: p. 18-23.
116. Habchi, M., et al., *Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2014. **81**(5): p. 696-701.
117. Boucher, J., et al., *Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity*. *Endocrinology*, 2005. **146**(4): p. 1764-71.
118. Heinonen, M.V., et al., *Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009. **19**(9): p. 626-33.
119. Krist, J., et al., *Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity*. *Obes Facts*, 2013. **6**(1): p. 57-69.
120. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(45): p. 26746-9.
121. Kishore, U., et al., *C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(10): p. 551-61.

122. Kim, K.Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increases CTRP1 expression in adipose tissue*. FEBS Lett, 2006. **580**(16): p. 3953-60.
123. Wong, G.W., et al., *Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions*. Biochem J, 2008. **416**(2): p. 161-77.
124. Peterson, J.M., et al., *CTRP1 protein enhances fatty acid oxidation via AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and acetyl-CoA carboxylase (ACC) inhibition*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1576-87.
125. Jeon, J.H., et al., *A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production*. FASEB J, 2008. **22**(5): p. 1502-11.
126. Chalupova, L., A. Zakovska, and K. Adamcova, *Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of serum CTRP1: a pilot study: measurement of serum CTRP1 in healthy donors and patients with metabolic syndrome*. Clin Biochem, 2013. **46**(1-2): p. 73-8.
127. Hopsu-Havu, V.K. and G.G. Glenner, *A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide*. Histochemie, 1966. **7**(3): p. 197-201.
128. Lambeir, A.M., et al., *Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2003. **40**(3): p. 209-94.
129. Lamers, D., et al., *Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome*. Diabetes, 2011. **60**(7): p. 1917-25.
130. Sell, H., et al., *Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro*. Diabetes Care, 2013. **36**(12): p. 4083-90.
131. Mulvihill, E.E. and D.J. Drucker, *Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors*. Endocr Rev, 2014. **35**(6): p. 992-1019.
132. Cordero, O.J., F.J. Salgado, and M. Nogueira, *On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(11): p. 1723-47.
133. Mattern, T., et al., *Antibody-induced modulation of CD26 surface expression*. Immunology, 1995. **84**(4): p. 595-600.
134. Cordero, O.J., et al., *Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes*. Immunobiology, 1997. **197**(5): p. 522-33.
135. Rohrborn, D., N. Wronkowitz, and J. Eckel, *DPP4 in Diabetes*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 386.
136. Yasuda, N., et al., *Improvement of high fat-diet-induced insulin resistance in dipeptidyl peptidase IV-deficient Fischer rats*. Life Sci, 2002. **71**(2): p. 227-38.
137. Frerker, N., et al., *Phenotyping of congenic dipeptidyl peptidase 4 (DP4) deficient Dark Agouti (DA) rats suggests involvement of DP4 in neuro-, endocrine, and immune functions*. Clin Chem Lab Med, 2009. **47**(3): p. 275-87.
138. Ben-Shlomo, S., et al., *Role of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipose tissue inflammation of dipeptidylpeptidase 4-deficient rats*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(11): p. 2331-41.
139. Margetic, S., et al., *Leptin: a review of its peripheral actions and interactions*.

- Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26**(11): p. 1407-33.
140. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 292-5.
 141. Koudih, S., et al., *Relationship between subcutaneous adipose tissue expression of leptin and obesity in Tunisian patients*. Tunis Med, 2010. **88**(8): p. 569-72.
 142. Marroqui, L., et al., *Role of leptin in the pancreatic beta-cell: effects and signaling pathways*. J Mol Endocrinol, 2012. **49**(1): p. R9-17.
 143. Paz-Filho, G., et al., *Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2012. **56**(9): p. 597-607.
 144. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.
 145. Grunfeld, C., et al., *Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters*. J Clin Invest, 1996. **97**(9): p. 2152-7.
 146. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 763-70.
 147. Satoh, H., et al., *Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats*. J Clin Invest, 2004. **114**(2): p. 224-31.
 148. Qi, Y., et al., *Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency*. Diabetes, 2006. **55**(11): p. 3083-90.
 149. Banerjee, R.R., et al., *Regulation of fasted blood glucose by resistin*. Science, 2004. **303**(5661): p. 1195-8.
 150. Stepan, C.M., et al., *Activation of SOCS-3 by resistin*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(4): p. 1569-75.
 151. Vidal-Puig, A. and S. O'Rahilly, *Resistin: a new link between obesity and insulin resistance?* Clin Endocrinol (Oxf), 2001. **55**(4): p. 437-8.
 152. McTernan, C.L., et al., *Resistin, central obesity, and type 2 diabetes*. Lancet, 2002. **359**(9300): p. 46-7.
 153. McTernan, P.G., et al., *Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(5): p. 2407.
 154. Kielstein, J.T., et al., *Increased resistin blood levels are not associated with insulin resistance in patients with renal disease*. Am J Kidney Dis, 2003. **42**(1): p. 62-6.
 155. Patel, L., et al., *Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(2): p. 472-6.
 156. Qatanani, M., et al., *Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(3): p. 531-9.
 157. Jernas, M., et al., *Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1540-2.
 158. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1023-33.
 159. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
 160. Amrani, A., et al., *Interleukin-1 effect on glycemia in the non-obese diabetic mouse at the pre-diabetic stage*. J Endocrinol, 1996. **148**(1): p. 139-48.

161. Sartipy, P. and D.J. Loskutoff, *Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7265-70.
162. Cartier, A., et al., *Visceral obesity and plasma glucose-insulin homeostasis: contributions of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in men*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(5): p. 1931-8.
163. Bastard, J.P., et al., *Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects*. Circulation, 1999. **99**(16): p. 2221-2.
164. Fontana, L., et al., *Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 1010-3.
165. Fain, J.N., et al., *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2273-82.
166. Ruan, H. and H.F. Lodish, *Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(5): p. 447-55.
167. Uysal, K.T., et al., *Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 610-4.
168. Miyazaki, Y., et al., *Tumor necrosis factor alpha and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27**(1): p. 88-94.
169. Wascher, T.C., et al., *Chronic TNF-alpha neutralization does not improve insulin resistance or endothelial function in "healthy" men with metabolic syndrome*. Mol Med, 2011. **17**(3-4): p. 189-93.
170. Bernstein, L.E., et al., *Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome*. Arch Intern Med, 2006. **166**(8): p. 902-8.
171. Illei, G.G. and P.E. Lipsky, *Novel, non-antigen-specific therapeutic approaches to autoimmune/inflammatory diseases*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(6): p. 712-8.
172. Kelley, D.E., et al., *Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(5): p. E941-8.
173. Walker, G.E., et al., *Deep subcutaneous adipose tissue: a distinct abdominal adipose depot*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(8): p. 1933-43.
174. Manolopoulos, K.N., F. Karpe, and K.N. Frayn, *Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(6): p. 949-59.
175. Beechy, L., et al., *Assessment tools in obesity - psychological measures, diet, activity, and body composition*. Physiol Behav, 2012. **107**(1): p. 154-71.
176. Shah, N.R. and E.R. Braverman, *Measuring adiposity in patients: the utility of body mass index (BMI), percent body fat, and leptin*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e33308.
177. Kullberg, J., et al., *Practical approach for estimation of subcutaneous and visceral adipose tissue*. Clin Physiol Funct Imaging, 2007. **27**(3): p. 148-53.
178. Katz, S.L., et al., *Creation of a reference dataset of neck sizes in children: standardizing a potential new tool for prediction of obesity-associated diseases?* BMC Pediatr, 2014. **14**: p. 159.
179. Kitahara, C.M., et al., *Association between class III obesity (BMI of 40-59 kg/m²) and mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies*. PLoS Med, 2014. **11**(7): p. e1001673.

180. Britton, K.A. and C.S. Fox, *Ectopic fat depots and cardiovascular disease*. *Circulation*, 2011. **124**(24): p. e837-41.
181. Smith, S.R., et al., *Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity*. *Metabolism*, 2001. **50**(4): p. 425-35.
182. Abate, N., et al., *Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(1): p. 88-98.
183. Garaulet, M., et al., *Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans*. *Int J Obes (Lond)*, 2006. **30**(6): p. 899-905.
184. Andersson, D.P., et al., *Changes in subcutaneous fat cell volume and insulin sensitivity after weight loss*. *Diabetes Care*, 2014. **37**(7): p. 1831-6.
185. Boulet, N., et al., *Cellular heterogeneity in superficial and deep subcutaneous adipose tissues in overweight patients*. *J Physiol Biochem*, 2013. **69**(3): p. 575-83.
186. Caspar-Bauguil, S., et al., *Adipose tissue lymphocytes: types and roles*. *J Physiol Biochem*, 2009. **65**(4): p. 423-36.
187. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
188. Strissel, K.J., et al., *Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications*. *Diabetes*, 2007. **56**(12): p. 2910-8.
189. Tordjman, J., et al., *Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue: relation with liver histopathology in morbid obesity*. *J Hepatol*, 2012. **56**(5): p. 1152-8.
190. Wang, S.P., et al., *The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice*. *Obes Res*, 2001. **9**(2): p. 119-28.
191. Salans, L.B., S.W. Cushman, and R.E. Weismann, *Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(4): p. 929-41.
192. Marti, A., M.A. Martinez-Gonzalez, and J.A. Martinez, *Interaction between genes and lifestyle factors on obesity*. *Proc Nutr Soc*, 2008. **67**(1): p. 1-8.
193. Jo, J., et al., *Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth*. *PLoS Comput Biol*, 2009. **5**(3): p. e1000324.
194. Van Harmelen, V., K. Rohrig, and H. Hauner, *Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects*. *Metabolism*, 2004. **53**(5): p. 632-7.
195. Arner, E., et al., *Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology*. *Diabetes*, 2010. **59**(1): p. 105-9.
196. Bays, H.E., *Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease?* *J Am Coll Cardiol*, 2011. **57**(25): p. 2461-73.
197. Lee, M.J., Y. Wu, and S.K. Fried, *Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications*. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(1): p. 1-11.
198. Bays, H.E., et al., *Anthropometric measurements and diabetes mellitus: clues to the "pathogenic" and "protective" potential of adipose tissue*. *Metab Syndr Relat Disord*, 2010. **8**(4): p. 307-15.
199. Fox, C.S., et al., *Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 2007. **116**(1): p. 39-48.

200. Tchoukalova, Y.D., et al., *Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(1): p. 56-63.
201. Bays, H., *Adiposopathy, "sick fat," Ockham's razor, and resolution of the obesity paradox*. Curr Atheroscler Rep, 2014. **16**(5): p. 409.
202. Marinou, K., et al., *Structural and functional properties of deep abdominal subcutaneous adipose tissue explain its association with insulin resistance and cardiovascular risk in men*. Diabetes Care, 2014. **37**(3): p. 821-9.
203. McCarty, M.F., *Modulation of adipocyte lipoprotein lipase expression as a strategy for preventing or treating visceral obesity*. Med Hypotheses, 2001. **57**(2): p. 192-200.
204. Laviola, L., et al., *Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo*. Diabetes, 2006. **55**(4): p. 952-61.
205. Bays, H.E., et al., *Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2008. **6**(3): p. 343-68.
206. Klein, S., *The case of visceral fat: argument for the defense*. J Clin Invest, 2004. **113**(11): p. 1530-2.
207. Fabbrini, E., et al., *Surgical removal of omental fat does not improve insulin sensitivity and cardiovascular risk factors in obese adults*. Gastroenterology, 2010. **139**(2): p. 448-55.
208. Bays, H.E., et al., *Adiposopathy and bariatric surgery: is 'sick fat' a surgical disease?* Int J Clin Pract, 2009. **63**(9): p. 1285-300.
209. Coppack, S.W., *Adipose tissue changes in obesity*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 5): p. 1049-52.
210. Guri, A.J. and J. Bassaganya-Riera, *Systemic effects of white adipose tissue dysregulation and obesity-related inflammation*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(4): p. 689-700.
211. Wajchenberg, B.L., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome*. Endocr Rev, 2000. **21**(6): p. 697-738.
212. Hocking, S., et al., *Adiposity and insulin resistance in humans: the role of the different tissue and cellular lipid depots*. Endocr Rev, 2013. **34**(4): p. 463-500.
213. Gabriely, I., et al., *Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process?* Diabetes, 2002. **51**(10): p. 2951-8.
214. Hoeg, L., et al., *Higher intramuscular triacylglycerol in women does not impair insulin sensitivity and proximal insulin signaling*. J Appl Physiol (1985), 2009. **107**(3): p. 824-31.
215. Chang, S.H., et al., *A systematic review of body fat distribution and mortality in older people*. Maturitas, 2012. **72**(3): p. 175-91.
216. Goodpaster, B.H., et al., *Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women*. Arch Intern Med, 2005. **165**(7): p. 777-83.
217. Snijder, M.B., et al., *Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC Study*. Diabetologia, 2005. **48**(2): p. 301-8.
218. De la Fuente, M. and J. Miquel, *An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(26): p. 3003-26.
219. Fulop, T., A. Khalil, and A. Larbi, *The role of elastin peptides in modulating the immune response in aging and age-related diseases*. Pathol Biol (Paris),

2012. **60**(1): p. 28-33.
220. Viridis, A., U. Dell'Agnello, and S. Taddei, *Impact of inflammation on vascular disease in hypertension*. *Maturitas*, 2014. **78**(3): p. 179-83.
221. Douziech, N., et al., *Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging*. *Exp Gerontol*, 2002. **37**(2-3): p. 369-87.
222. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis--an update*. *N Engl J Med*, 1986. **314**(8): p. 488-500.
223. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(23): p. 2129-38.
224. Pickup, J.C., et al., *NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X*. *Diabetologia*, 1997. **40**(11): p. 1286-92.
225. Festa, A., et al., *Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS)*. *Circulation*, 2000. **102**(1): p. 42-7.
226. Danesh, J., et al., *Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies*. *JAMA*, 1998. **279**(18): p. 1477-82.
227. Taube, A., et al., *Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **302**(11): p. H2148-65.
228. van der Wal, A.C., et al., *Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology*. *Circulation*, 1994. **89**(1): p. 36-44.
229. Ridker, P.M., et al., *Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men*. *Circulation*, 2000. **101**(15): p. 1767-72.
230. Kannel, W.B., et al., *Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study*. *JAMA*, 1987. **258**(9): p. 1183-6.
231. Koenig, W. and C. Wanner, *C-reactive protein and coronary artery disease--what is the link?* *Nephrol Dial Transplant*, 1999. **14**(12): p. 2798-800.
232. Vasan, R.S., *Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations*. *Circulation*, 2006. **113**(19): p. 2335-62.
233. Szekanecz, Z., et al., *Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce interleukin (IL)-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4: the possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation*. *Agents Actions*, 1994. **42**(3-4): p. 159-62.
234. Lindmark, E., et al., *Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy*. *JAMA*, 2001. **286**(17): p. 2107-13.
235. Ueland, T., et al., *TNF revisited: osteoprotegerin and TNF-related molecules in heart failure*. *Curr Heart Fail Rep*, 2012. **9**(2): p. 92-100.
236. Zhang, H. and C. Zhang, *Vasoprotection by dietary supplements and exercise: role of TNFalpha signaling*. *Exp Diabetes Res*, 2012. **2012**: p. 972679.
237. Leclerc, V. and J.M. Reichhart, *The immune response of *Drosophila melanogaster**. *Immunol Rev*, 2004. **198**: p. 59-71.
238. Rolff, J. and M.T. Siva-Jothy, *Invertebrate ecological immunology*. *Science*, 2003. **301**(5632): p. 472-5.
239. Sondergaard, L., *Homology between the mammalian liver and the *Drosophila**

- fat body*. Trends Genet, 1993. **9**(6): p. 193.
240. Mortensen, R.F., *C-reactive protein, inflammation, and innate immunity*. Immunol Res, 2001. **24**(2): p. 163-76.
 241. Schipper, H.S., et al., *Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(8): p. 407-15.
 242. Cildir, G., S.C. Akincilar, and V. Tergaonkar, *Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage*. Trends Mol Med, 2013. **19**(8): p. 487-500.
 243. Mraz, M., et al., *The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(4): p. E606-13.
 244. Dolezalova, R., et al., *Changes of endocrine function of adipose tissue in anorexia nervosa: comparison of circulating levels versus subcutaneous mRNA expression*. Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **67**(5): p. 674-8.
 245. Roubicek, T., et al., *Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease*. Nutrition, 2009. **25**(7-8): p. 762-8.
 246. Kremen, J., et al., *Increased subcutaneous and epicardial adipose tissue production of proinflammatory cytokines in cardiac surgery patients: possible role in postoperative insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4620-7.
 247. Kondo, M., et al., *Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 759-806.
 248. Lee, B.C. and J. Lee, *Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 446-62.
 249. Neels, J.G. and J.M. Olefsky, *Inflamed fat: what starts the fire?* J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 33-5.
 250. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
 251. Heilbronn, L.K. and L.V. Campbell, *Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(12): p. 1225-30.
 252. Kintscher, U., et al., *T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1304-10.
 253. Winer, S., et al., *Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 921-9.
 254. Lumeng, C.N., et al., *Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes*. Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3239-46.
 255. Canello, R., et al., *Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2277-86.
 256. Bruun, J.M., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(4): p. 2282-9.

257. Suganami, T., J. Nishida, and Y. Ogawa, *A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2062-8.
258. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1494-505.
259. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 610-21.
260. Vasudevan, A.R., et al., *Eotaxin and obesity*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(1): p. 256-61.
261. Dahlman, I., et al., *A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(10): p. 5834-40.
262. Wu, H., et al., *T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity*. *Circulation*, 2007. **115**(8): p. 1029-38.
263. Huber, J., et al., *CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(8): p. 3215-21.
264. Kamei, N., et al., *Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(36): p. 26602-14.
265. Galli, S.J., N. Borregaard, and T.A. Wynn, *Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(11): p. 1035-44.
266. Harman-Boehm, I., et al., *Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(6): p. 2240-7.
267. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
268. Vitseva, O.I., et al., *Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue*. *Obesity (Silver Spring)*, 2008. **16**(5): p. 932-7.
269. Nguyen, M.T., et al., *A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(48): p. 35279-92.
270. Cancello, R., et al., *Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity*. *Diabetes*, 2006. **55**(6): p. 1554-61.
271. Apovian, C.M., et al., *Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(9): p. 1654-9.
272. Charriere, G., et al., *Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 9850-5.
273. Maury, E. and S.M. Brichard, *Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome*. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. **314**(1): p. 1-16.
274. Osborn, O. and J.M. Olefsky, *The cellular and signaling networks linking the*

- immune system and metabolism in disease*. Nat Med, 2012. **18**(3): p. 363-74.
275. Gerhardt, C.C., et al., *Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **175**(1-2): p. 81-92.
276. Christiansen, T., B. Richelsen, and J.M. Bruun, *Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects*. Int J Obes (Lond), 2005. **29**(1): p. 146-50.
277. Hashimoto, I., et al., *Elevated serum monocyte chemoattractant protein-4 and chronic inflammation in overweight subjects*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14**(5): p. 799-811.
278. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
279. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
280. Chawla, A., K.D. Nguyen, and Y.P. Goh, *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 738-49.
281. Wu, D., et al., *Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis*. Science, 2011. **332**(6026): p. 243-7.
282. Lumeng, C.N., S.M. Deyoung, and A.R. Saltiel, *Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(1): p. E166-74.
283. Prieur, X., et al., *Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice*. Diabetes, 2011. **60**(3): p. 797-809.
284. Patsouris, D., et al., *Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals*. Cell Metab, 2008. **8**(4): p. 301-9.
285. Fujisaka, S., et al., *Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice*. Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2574-82.
286. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
287. Saberi, M., et al., *Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice*. Cell Metab, 2009. **10**(5): p. 419-29.
288. Dasu, M.R., et al., *Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects*. Diabetes Care, 2010. **33**(4): p. 861-8.
289. Erbay, E., et al., *Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis*. Nat Med, 2009. **15**(12): p. 1383-91.
290. Odegaard, J.I., et al., *Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1116-20.
291. Stienstra, R., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue*. J Biol Chem, 2008. **283**(33): p. 22620-7.
292. Ohashi, K., et al., *Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6153-60.
293. Bourlier, V., et al., *Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose*

- tissue macrophages*. *Circulation*, 2008. **117**(6): p. 806-15.
294. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(7): p. 436-45.
 295. Rot, A. and U.H. von Andrian, *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 891-928.
 296. Proudfoot, A.E., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1885-90.
 297. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. *Nature*, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
 298. Huo, Y., et al., *The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(9): p. 1307-14.
 299. Haskell, C.A., M.D. Cleary, and I.F. Charo, *Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10053-8.
 300. Fong, A.M., et al., *Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow*. *J Exp Med*, 1998. **188**(8): p. 1413-9.
 301. Tsou, C.L., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(48): p. 44622-6.
 302. Garton, K.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(41): p. 37993-8001.
 303. Daly, C. and B.J. Rollins, *Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies*. *Microcirculation*, 2003. **10**(3-4): p. 247-57.
 304. Charo, I.F., *CCR2: from cloning to the creation of knockout mice*. *Chem Immunol*, 1999. **72**: p. 30-41.
 305. Charo, I.F. and W. Peters, *Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization*. *Microcirculation*, 2003. **10**(3-4): p. 259-64.
 306. Gu, L., et al., *Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1*. *Nature*, 2000. **404**(6776): p. 407-11.
 307. Oh, D.Y., et al., *Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice*. *Diabetes*, 2012. **61**(2): p. 346-54.
 308. Weisberg, S.P., et al., *CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(1): p. 115-24.
 309. Anderson, E.K., D.A. Gutierrez, and A.H. Hasty, *Adipose tissue recruitment of leukocytes*. *Curr Opin Lipidol*, 2010. **21**(3): p. 172-7.
 310. Surmi, B.K. and A.H. Hasty, *The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue*. *Vascul Pharmacol*, 2010. **52**(1-2): p. 27-36.
 311. Kitade, H., et al., *CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status*. *Diabetes*, 2012. **61**(7): p. 1680-90.

312. Kennedy, A., et al., *Loss of CCR5 results in glucose intolerance in diet-induced obese mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **305**(7): p. E897-906.
313. Eheim, A., D. Medrikova, and S. Herzig, *Immune cells and metabolic dysfunction*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(1): p. 13-25.
314. Tamura, Y., et al., *C-C chemokine receptor 2 inhibitor improves diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(3): p. 219-28.
315. Tamura, Y., et al., *Inhibition of CCR2 ameliorates insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(12): p. 2195-201.
316. Kirk, E.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]*. Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1254-61.
317. Chavey, C., et al., *CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance*. Cell Metab, 2009. **9**(4): p. 339-49.
318. Neels, J.G., et al., *Keratinocyte-derived chemokine in obesity: expression, regulation, and role in adipose macrophage infiltration and glucose homeostasis*. J Biol Chem, 2009. **284**(31): p. 20692-8.
319. Nara, N., et al., *Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30794-803.
320. Lee, Y.S., et al., *The fractalkine/CX3CR1 system regulates beta cell function and insulin secretion*. Cell, 2013. **153**(2): p. 413-25.
321. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, 2004. **118**(2): p. 229-41.
322. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger, *Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1249-55.
323. Shi, Y., W. Zheng, and K.L. Rock, *Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14590-5.
324. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
325. Anderson, K.V., L. Bokla, and C. Nusslein-Volhard, *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product*. Cell, 1985. **42**(3): p. 791-8.
326. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
327. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
328. Rock, F.L., et al., *A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 588-93.
329. Gay, N.J. and F.J. Keith, *Drosophila Toll and IL-1 receptor*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 355-6.
330. Watters, T.M., E.F. Kenny, and L.A. O'Neill, *Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(6): p. 411-9.
331. Horng, T., et al., *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity*

- for Toll-like receptors. *Nature*, 2002. **420**(6913): p. 329-33.
332. Honda, K., et al., *Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(43): p. 15416-21.
333. Negishi, H., et al., *Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(41): p. 15136-41.
334. Takaoka, A., et al., *Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors*. *Nature*, 2005. **434**(7030): p. 243-9.
335. Iwami, K.I., et al., *Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling*. *J Immunol*, 2000. **165**(12): p. 6682-6.
336. LeBouder, E., et al., *Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk*. *J Immunol*, 2003. **171**(12): p. 6680-9.
337. Boyd, J.H., et al., *Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response*. *Cardiovasc Res*, 2006. **72**(3): p. 384-93.
338. Kielian, T., *Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis*. *J Neurosci Res*, 2006. **83**(5): p. 711-30.
339. Konat, G.W., T. Kielian, and I. Marriott, *The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge*. *J Neurochem*, 2006. **99**(1): p. 1-12.
340. Takeuchi, O., et al., *Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins*. *J Immunol*, 2002. **169**(1): p. 10-4.
341. Wyllie, D.H., et al., *Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses*. *J Immunol*, 2000. **165**(12): p. 7125-32.
342. Alexopoulou, L., et al., *Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice*. *Nat Med*, 2002. **8**(8): p. 878-84.
343. Massari, P., et al., *Meningococcal porin PorB binds to TLR2 and requires TLR1 for signaling*. *J Immunol*, 2006. **176**(4): p. 2373-80.
344. Hasan, U., et al., *Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88*. *J Immunol*, 2005. **174**(5): p. 2942-50.
345. Lebre, M.C., et al., *Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(2): p. 331-41.
346. Fitzner, N., et al., *Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands*. *Clin Vaccine Immunol*, 2008. **15**(1): p. 138-46.
347. Hornung, V., et al., *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. *J Immunol*, 2002. **168**(9): p. 4531-7.
348. Schaubert, J., et al., *Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(3): p. 803-11.
349. Sadeghi, K., et al., *Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(2): p. 361-70.
350. Ozinsky, A., et al., *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the*

- innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13766-71.
351. Schwandner, R., et al., *Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2.* J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17406-9.
352. Ouaisi, A., et al., *The Trypanosoma cruzi Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection.* J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6366-74.
353. Campos, M.A., et al., *Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite.* J Immunol, 2001. **167**(1): p. 416-23.
354. Compton, T., et al., *Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2.* J Virol, 2003. **77**(8): p. 4588-96.
355. Kurt-Jones, E.A., et al., *Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1315-20.
356. Yang, D., et al., *Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses.* J Exp Med, 2008. **205**(1): p. 79-90.
357. Park, J.S., et al., *High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors.* Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(3): p. C917-24.
358. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4.* J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 15028-34.
359. Vasselon, T., et al., *TLR2 recognizes a bacterial lipopeptide through direct binding.* J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7401-5.
360. Brentano, F., et al., *RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2656-65.
361. Tissari, J., et al., *IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression.* J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4289-94.
362. Matsumoto, M., et al., *Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(5): p. 1364-9.
363. Lee, H.K., et al., *Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14.* Immunity, 2006. **24**(2): p. 153-63.
364. Le Goffic, R., et al., *Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia.* PLoS Pathog, 2006. **2**(6): p. e53.
365. Gowen, B.B., et al., *TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection.* J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6301-7.
366. Wang, T., et al., *Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis.* Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1366-73.
367. Lang, K.S., et al., *Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling.* J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2456-63.
368. Patole, P.S., et al., *Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(5): p. 1326-38.
369. Shimazu, R., et al., *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.* J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1777-82.

370. Song, P.I., et al., *Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(2): p. 424-32.
371. Frantz, S., et al., *Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium*. J Clin Invest, 1999. **104**(3): p. 271-80.
372. Dybdahl, B., et al., *Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 685-90.
373. Smiley, S.T., J.A. King, and W.W. Hancock, *Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2887-94.
374. Okamura, Y., et al., *The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 10229-33.
375. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1099-103.
376. Mizel, S.B., et al., *Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 6217-23.
377. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
378. Gorden, K.B., et al., *Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1259-68.
379. Forsbach, A., et al., *Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3729-38.
380. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
381. Leadbetter, E.A., et al., *Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors*. Nature, 2002. **416**(6881): p. 603-7.
382. Viglianti, G.A., et al., *Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA*. Immunity, 2003. **19**(6): p. 837-47.
383. Hartmann, G., G.J. Weiner, and A.M. Krieg, *CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9305-10.
384. Kadowaki, N., S. Antonenko, and Y.J. Liu, *Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2291-5.
385. Park, Y., et al., *Association of the polymorphism for Toll-like receptor 2 with type 1 diabetes susceptibility*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1037**: p. 170-4.
386. Pirie, F.J., et al., *Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in South African Blacks with type 1 diabetes*. Tissue Antigens, 2005. **66**(2): p. 125-30.
387. Dogusan, Z., et al., *Double-stranded RNA induces pancreatic beta-cell apoptosis by activation of the toll-like receptor 3 and interferon regulatory factor 3 pathways*. Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1236-45.
388. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
389. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16683-9.
390. Hwang, D., *Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids*

- mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways.* FASEB J, 2001. **15**(14): p. 2556-64.
391. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.* J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
392. Hommelberg, P.P., et al., *Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(1): p. E114-20.
393. Lockridge, J.B., et al., *Bioinformatic profiling of the transcriptional response of adult rat cardiomyocytes to distinct fatty acids.* J Lipid Res, 2008. **49**(7): p. 1395-408.
394. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation.* Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
395. Caricilli, A.M., et al., *Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet.* J Endocrinol, 2008. **199**(3): p. 399-406.
396. Reyna, S.M., et al., *Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects.* Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2595-602.
397. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes.* J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
398. Blendea, M.C., et al., *Abrogation of oxidative stress improves insulin sensitivity in the Ren-2 rat model of tissue angiotensin II overexpression.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(2): p. E353-9.
399. Bohlender, J., et al., *High human renin hypertension in transgenic rats.* Hypertension, 1997. **29**(1 Pt 2): p. 428-34.
400. Nguyen, G. and D.N. Muller, *The biology of the (pro)renin receptor.* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(1): p. 18-23.
401. Santos, R.A., et al., *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8258-63.
402. Walters, P.E., T.A. Gaspari, and R.E. Widdop, *Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats.* Hypertension, 2005. **45**(5): p. 960-6.
403. Lemarie, C.A. and E.L. Schiffrin, *The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease.* J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2010. **11**(1): p. 19-31.
404. AbdAlla, S., et al., *The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist.* J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39721-6.
405. Miura, S., S.S. Karnik, and K. Saku, *Constitutively active homo-oligomeric angiotensin II type 2 receptor induces cell signaling independent of receptor conformation and ligand stimulation.* J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 18237-44.
406. Rodrigues-Ferreira, S. and C. Nahmias, *An ATIPical family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins.* Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(11): p. 684-90.
407. Shao, C., I.H. Zucker, and L. Gao, *Angiotensin type 2 receptor in pancreatic islets of adult rats: a novel insulinotropic mediator.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **305**(10): p. E1281-91.
408. Pascual-Le Tallec, L. and M. Lombes, *The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action.* Mol Endocrinol, 2005. **19**(9): p. 2211-21.
409. Masuzaki, H., et al., *A transgenic model of visceral obesity and the metabolic*

- syndrome*. Science, 2001. **294**(5549): p. 2166-70.
410. Takahashi, N., et al., *Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin*. Cell Metab, 2007. **6**(6): p. 506-12.
 411. Massiera, F., et al., *Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity*. Endocrinology, 2001. **142**(12): p. 5220-5.
 412. Iwai, M., et al., *Direct renin inhibition improved insulin resistance and adipose tissue dysfunction in type 2 diabetic KK-A(y) mice*. J Hypertens, 2010. **28**(7): p. 1471-81.
 413. Stucchi, P., et al., *Aliskiren reduces body-weight gain, adiposity and plasma leptin during diet-induced obesity*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(3): p. 771-8.
 414. Darimont, C., et al., *Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II*. Endocrinology, 1994. **135**(5): p. 2030-6.
 415. Fu, M., et al., *A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(10): p. 2437-50.
 416. Hung, W.W., et al., *Blockade of the renin-angiotensin system ameliorates apelin production in 3T3-L1 adipocytes*. Cardiovasc Drugs Ther, 2011. **25**(1): p. 3-12.
 417. Jones, G.T., et al., *Angiotensin II type 1 receptor 1166C polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm in three independent cohorts*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 764-70.
 418. Shum, M., et al., *Angiotensin II type 2 receptor promotes adipocyte differentiation and restores adipocyte size in high-fat/high-fructose diet-induced insulin resistance in rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **304**(2): p. E197-210.
 419. Yvan-Charvet, L., et al., *Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 991-9.
 420. Lu, H., et al., *Angiotensin II increases adipose angiotensinogen expression*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(5): p. E1280-7.
 421. Saint-Marc, P., et al., *Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation*. Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 487-92.
 422. Gratze, P., et al., *Energy metabolism in human renin-gene transgenic rats: does renin contribute to obesity?* Hypertension, 2009. **53**(3): p. 516-23.
 423. Frantz, E.D., et al., *Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e67192.
 424. Fujisaka, S., et al., *Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice*. Endocrinology, 2011. **152**(5): p. 1789-99.
 425. Cassis, L.A., et al., *Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 1): p. E867-76.
 426. de Kloet, A.D., et al., *Central angiotensin II has catabolic action at white and brown adipose tissue*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(6): p. E1081-91.
 427. Favre, G.A., et al., *Constitutive activation of the renin-angiotensin system reduces visceral fat and improves glucose tolerance in mice*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2014. **15**(4): p. 396-409.

428. Cassis, L.A., *Fat cell metabolism: insulin, fatty acids, and renin*. *Curr Hypertens Rep*, 2000. **2**(2): p. 132-8.
429. Kim, S., et al., *The adipose renin-angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal renin-angiotensin system*. *J Biomed Biotechnol*, 2006. **2006**(5): p. 27012.
430. Goossens, G.H., et al., *Endocrine role of the renin-angiotensin system in human adipose tissue and muscle: effect of beta-adrenergic stimulation*. *Hypertension*, 2007. **49**(3): p. 542-7.
431. Goossens, G.H., et al., *Angiotensin II: a major regulator of subcutaneous adipose tissue blood flow in humans*. *J Physiol*, 2006. **571**(Pt 2): p. 451-60.
432. Achard, V., et al., *Renin receptor expression in human adipose tissue*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(1): p. R274-82.
433. Ailhaud, G., *Cross talk between adipocytes and their precursors: relationships with adipose tissue development and blood pressure*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **892**: p. 127-33.
434. Brucher, R., et al., *Larger anti-adipogenic effect of angiotensin II on omental preadipose cells of obese humans*. *Obesity (Silver Spring)*, 2007. **15**(7): p. 1643-6.
435. Skurk, T., V. van Harmelen, and H. Hauner, *Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(7): p. 1199-203.
436. Matsushita, K., et al., *Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes*. *Hypertension*, 2006. **48**(6): p. 1095-102.
437. Sarzani, R., et al., *Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth*. *Int J Obes (Lond)*, 2008. **32**(2): p. 259-67.
438. Daugherty, A., M.W. Manning, and L.A. Cassis, *Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(11): p. 1605-12.
439. Harrison, D., et al., *Role of oxidative stress in atherosclerosis*. *Am J Cardiol*, 2003. **91**(3A): p. 7A-11A.
440. Tsuchiya, K., et al., *Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 expression via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in rat preadipocytes*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. **291**(4): p. E771-8.
441. Yvan-Charvet, L., et al., *In vivo evidence for a role of adipose tissue SR-BI in the nutritional and hormonal regulation of adiposity and cholesterol homeostasis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(6): p. 1340-5.
442. Iwai, M., et al., *TAK-536, a new AT1 receptor blocker, improves glucose intolerance and adipocyte differentiation*. *Am J Hypertens*, 2007. **20**(5): p. 579-86.
443. Zorad, S., et al., *Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma*. *Eur J Pharmacol*, 2006. **552**(1-3): p. 112-22.
444. Bays, H., et al., *Adiposopathy: treating pathogenic adipose tissue to reduce cardiovascular disease risk*. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2007. **9**(4): p. 259-71.
445. Giacchetti, G., et al., *Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects*. *Am J*

- Hypertens, 2002. **15**(5): p. 381-8.
446. Shimabukuro, M., H. Tanaka, and T. Shimabukuro, *Effects of telmisartan on fat distribution in individuals with the metabolic syndrome*. J Hypertens, 2007. **25**(4): p. 841-8.
 447. Engeli, S., et al., *Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system*. Hypertension, 2005. **45**(3): p. 356-62.
 448. Garg, A., et al., *Peculiar distribution of adipose tissue in patients with congenital generalized lipodystrophy*. J Clin Endocrinol Metab, 1992. **75**(2): p. 358-61.
 449. Abate, N. and A. Garg, *Heterogeneity in adipose tissue metabolism: causes, implications and management of regional adiposity*. Prog Lipid Res, 1995. **34**(1): p. 53-70.
 450. Cassis, L.A., K.R. Lynch, and M.J. Peach, *Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta*. Circ Res, 1988. **62**(6): p. 1259-62.
 451. Soltis, E.E. and L.A. Cassis, *Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness*. Clin Exp Hypertens A, 1991. **13**(2): p. 277-96.
 452. Segura, J. and L.M. Ruilope, *Obesity, essential hypertension and renin-angiotensin system*. Public Health Nutr, 2007. **10**(10A): p. 1151-5.
 453. Kurata, A., et al., *Blockade of Angiotensin II type-1 receptor reduces oxidative stress in adipose tissue and ameliorates adipocytokine dysregulation*. Kidney Int, 2006. **70**(10): p. 1717-24.
 454. Kintscher, U., et al., *Irbesartan for the treatment of hypertension in patients with the metabolic syndrome: a sub analysis of the Treat to Target post authorization survey. Prospective observational, two armed study in 14,200 patients*. Cardiovasc Diabetol, 2007. **6**: p. 12.
 455. Scholze, J., et al., *Optimal treatment of obesity-related hypertension: the Hypertension-Obesity-Sibutramine (HOS) study*. Circulation, 2007. **115**(15): p. 1991-8.
 456. Schindler, C., et al., *Cardiovascular risk in obese hypertensive patients taking various antihypertensive drugs*. Clin Drug Investig, 2007. **27**(10): p. 707-17.
 457. Verkman, A.S., *Water permeability measurement in living cells and complex tissues*. J Membr Biol, 2000. **173**(2): p. 73-87.
 458. Abascal, F., I. Irisarri, and R. Zardoya, *Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(5): p. 1468-81.
 459. Ishibashi, K., Y. Tanaka, and Y. Morishita, *The role of mammalian superaquaporins inside the cell*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(5): p. 1507-12.
 460. Maurel, C., et al., *Functional characterization of the Escherichia coli glycerol facilitator, GlpF, in Xenopus oocytes*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 11869-72.
 461. Calamita, G., et al., *Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from Escherichia coli*. J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29063-6.
 462. Soveral, G., et al., *Yeast water channels: an overview of orthodox aquaporins*. Biol Cell, 2010. **103**(1): p. 35-54.
 463. Ishibashi, K., S. Hara, and S. Kondo, *Aquaporin water channels in mammals*. Clin Exp Nephrol, 2009. **13**(2): p. 107-17.
 464. Murata, K., et al., *Structural determinants of water permeation through aquaporin-1*. Nature, 2000. **407**(6804): p. 599-605.
 465. Wu, B. and E. Beitz, *Aquaporins with selectivity for unconventional permeants*.

- Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(18): p. 2413-21.
466. Kortenoeven, M.L. and R.A. Fenton, *Renal aquaporins and water balance disorders*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(5): p. 1533-49.
467. Tornroth-Horsefield, S., et al., *Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation*. FEBS Lett, 2010. **584**(12): p. 2580-8.
468. Soveral, G., R.I. Macey, and T.F. Moura, *Membrane stress causes inhibition of water channels in brush border membrane vesicles from kidney proximal tubule*. Biol Cell, 1997. **89**(5-6): p. 275-82.
469. Soveral, G., et al., *Membrane tension regulates water transport in yeast*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(11): p. 2573-9.
470. Chaumont, F., M. Moshelion, and M.J. Daniels, *Regulation of plant aquaporin activity*. Biol Cell, 2005. **97**(10): p. 749-64.
471. Ahmadpour, D., et al., *Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(5): p. 1482-91.
472. Hara-Chikuma, M. and A.S. Verkman, *Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(12): p. 1386-92.
473. Rodriguez, A., et al., *Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control*. Cell Cycle, 2011. **10**(10): p. 1548-56.
474. Ribatti, D., et al., *Aquaporins in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(5): p. 1550-3.
475. Madeira, A., T.F. Moura, and G. Soveral, *Aquaglyceroporins: implications in adipose biology and obesity*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(4): p. 759-71.
476. Rodriguez, A., et al., *Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015. **309**(8): p. E691-714.
477. Fruhbeck, G., et al., *Regulation of adipocyte lipolysis*. Nutr Res Rev, 2014. **27**(1): p. 63-93.
478. Reshef, L., et al., *Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30413-6.
479. Miranda, M., et al., *Paired subcutaneous and visceral adipose tissue aquaporin-7 expression in human obesity and type 2 diabetes: differences and similarities between depots*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(7): p. 3470-9.
480. Rodriguez, A., et al., *Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(4): p. E586-97.
481. Maeda, N., T. Funahashi, and I. Shimomura, *Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008. **4**(11): p. 627-34.
482. Fruhbeck, G., et al., *Aquaporin-7 and glycerol permeability as novel obesity drug-target pathways*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(7): p. 345-7.
483. Kishida, K., et al., *Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36251-60.
484. Kondo, H., et al., *Human aquaporin adipose (AQPap) gene. Genomic structure, promoter analysis and functional mutation*. Eur J Biochem, 2002. **269**(7): p. 1814-26.
485. Roudier, N., et al., *AQP3 deficiency in humans and the molecular basis of a novel blood group system, GIL*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 45854-9.

486. Kuriyama, H., et al., *Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9*. *Diabetes*, 2002. **51**(10): p. 2915-21.
487. Nejsum, L.N., et al., *Compensatory increase in AQP2, p-AQP2, and AQP3 expression in rats with diabetes mellitus*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **280**(4): p. F715-26.
488. Arner, P., *Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues*. *Ann Med*, 1995. **27**(4): p. 435-8.
489. Kishida, K., et al., *Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(27): p. 20896-902.
490. Yasui, H., et al., *Membrane trafficking of aquaporin 3 induced by epinephrine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **373**(4): p. 613-7.
491. Fasshauer, M., et al., *Suppression of aquaporin adipose gene expression by isoproterenol, TNFalpha, and dexamethasone*. *Horm Metab Res*, 2003. **35**(4): p. 222-7.
492. Kong, C.S., et al., *Anti-obesity effect of carboxymethyl chitin by AMPK and aquaporin-7 pathways in 3T3-L1 adipocytes*. *J Nutr Biochem*, 2011. **22**(3): p. 276-81.
493. Hibuse, T., et al., *Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(31): p. 10993-8.
494. Marrades, M.P., et al., *Differential expression of aquaporin 7 in adipose tissue of lean and obese high fat consumers*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **339**(3): p. 785-9.
495. Prudente, S., et al., *A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities*. *Diabetes*, 2007. **56**(5): p. 1468-74.
496. Catalan, V., et al., *Influence of morbid obesity and insulin resistance on gene expression levels of AQP7 in visceral adipose tissue and AQP9 in liver*. *Obes Surg*, 2008. **18**(6): p. 695-701.
497. Kishida, K., et al., *Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(51): p. 48572-9.
498. Lee, D.H., et al., *The effects of thiazolidinedione treatment on the regulations of aquaglyceroporins and glycerol kinase in OLETF rats*. *Metabolism*, 2005. **54**(10): p. 1282-9.
499. Guan, H.P., et al., *A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents*. *Nat Med*, 2002. **8**(10): p. 1122-8.
500. Oshio, K., et al., *Impaired pain sensation in mice lacking Aquaporin-1 water channels*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **341**(4): p. 1022-8.
501. Ma, T., et al., *Defective dietary fat processing in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **280**(1): p. C126-34.
502. Tietz, P.S., et al., *Agonist-induced coordinated trafficking of functionally related transport proteins for water and ions in cholangiocytes*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(22): p. 20413-9.
503. Cho, S.J., et al., *Aquaporin 1 regulates GTP-induced rapid gating of water in secretory vesicles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(7): p. 4720-4.
504. Herrera, M. and J.L. Garvin, *Novel role of AQP-1 in NO-dependent vasorelaxation*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **292**(5): p. F1443-51.

505. Echevarria, M., et al., *Development of cytosolic hypoxia and hypoxia-inducible factor stabilization are facilitated by aquaporin-1 expression*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30207-15.
506. Verkman, A.S., M. Hara-Chikuma, and M.C. Papadopoulos, *Aquaporins--new players in cancer biology*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(5): p. 523-9.
507. Hara-Chikuma, M. and A.S. Verkman, *Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin*. Biol Cell, 2005. **97**(7): p. 479-86.
508. Hara-Chikuma, M. and A.S. Verkman, *Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(1): p. 326-32.
509. Thiagarajah, J.R., D. Zhao, and A.S. Verkman, *Impaired enterocyte proliferation in aquaporin-3 deficiency in mouse models of colitis*. Gut, 2007. **56**(11): p. 1529-35.
510. Laforenza, U., et al., *Expression and immunolocalization of aquaporin-7 in rat gastrointestinal tract*. Biol Cell, 2005. **97**(8): p. 605-13.
511. Sohara, E., et al., *Morphologic and functional analysis of sperm and testes in Aquaporin 7 knockout mice*. Fertil Steril, 2007. **87**(3): p. 671-6.
512. Hara-Chikuma, M., et al., *Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15493-6.
513. Skowronski, M.T., et al., *AQP7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle: implications in glycerol metabolism*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(3): p. F956-65.
514. Matsumura, K., et al., *Aquaporin 7 is a beta-cell protein and regulator of intraislet glycerol content and glycerol kinase activity, beta-cell mass, and insulin production and secretion*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(17): p. 6026-37.
515. Sohara, E., et al., *Physiological roles of AQP7 in the kidney: Lessons from AQP7 knockout mice*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(8): p. 1106-10.
516. Rojek, A.M., et al., *Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3609-14.
517. Leung, J., et al., *Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells*. Blood, 2007. **109**(2): p. 740-6.
518. Amiry-Moghaddam, M., et al., *Brain mitochondria contain aquaporin water channels: evidence for the expression of a short AQP9 isoform in the inner mitochondrial membrane*. FASEB J, 2005. **19**(11): p. 1459-67.
519. Seda, O., et al., *Pharmacogenomics of metabolic effects of rosiglitazone*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(2): p. 141-55.
520. Aharon, R. and Z. Bar-Shavit, *Involvement of aquaporin 9 in osteoclast differentiation*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 19305-9.
521. Snell, P.G. and J.H. Mitchell, *Physical inactivity: an easily modified risk factor?* Circulation, 1999. **100**(1): p. 2-4.
522. Blair, S.N. and A.S. Jackson, *Physical fitness and activity as separate heart disease risk factors: a meta-analysis*. Med Sci Sports Exerc, 2001. **33**(5): p. 762-4.
523. Li, T.Y., et al., *Obesity as compared with physical activity in predicting risk of coronary heart disease in women*. Circulation, 2006. **113**(4): p. 499-506.
524. Hu, F.B., et al., *Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2694-703.
525. Look, A.R.G., et al., *Reduction in weight and cardiovascular disease risk factors in individuals with type 2 diabetes: one-year results of the look AHEAD*

- trial*. Diabetes Care, 2007. **30**(6): p. 1374-83.
526. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. N Engl J Med, 2002. **346**(6): p. 393-403.
527. Jensen, J., et al., *The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise*. Front Physiol, 2011. **2**: p. 112.
528. Boiteux, A. and B. Hess, *Design of glycolysis*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1981. **293**(1063): p. 5-22.
529. Petersen, A.M. and B.K. Pedersen, *The anti-inflammatory effect of exercise*. J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(4): p. 1154-62.
530. Handschin, C. and B.M. Spiegelman, *The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 463-9.
531. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6*. Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1379-406.
532. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 165-90.
533. Ahmadi, N., et al., *Effects of intense exercise and moderate caloric restriction on cardiovascular risk factors and inflammation*. Am J Med, 2011. **124**(10): p. 978-82.
534. Michigan, A., T.V. Johnson, and V.A. Master, *Review of the relationship between C-reactive protein and exercise*. Mol Diagn Ther, 2011. **15**(5): p. 265-75.
535. Ray, A., et al., *The role of inflammation on atherosclerosis, intermediate and clinical cardiovascular endpoints in type 2 diabetes mellitus*. Eur J Intern Med, 2009. **20**(3): p. 253-60.
536. Tsarouhas, K., et al., *Study of insulin resistance, TNF-alpha, total antioxidant capacity and lipid profile in patients with chronic heart failure under exercise*. In Vivo, 2011. **25**(6): p. 1031-7.
537. Brandt, C. and B.K. Pedersen, *The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 520258.
538. Nieman, D.C., et al., *Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run*. J Appl Physiol (1985), 2003. **94**(5): p. 1917-25.
539. Keller, C., et al., *Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content*. FASEB J, 2001. **15**(14): p. 2748-50.
540. Petersen, E.W., et al., *Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E155-62.
541. Pedersen, B.K., et al., *Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6*. Exerc Immunol Rev, 2001. **7**: p. 18-31.
542. Kasapis, C. and P.D. Thompson, *The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(10): p. 1563-9.
543. Timmerman, K.L., et al., *Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise?* J Leukoc Biol, 2008. **84**(5): p. 1271-8.
544. Dunkley, A.J., et al., *Effectiveness of interventions for reducing diabetes and cardiovascular disease risk in people with metabolic syndrome: systematic review and mixed treatment comparison meta-analysis*. Diabetes Obes Metab, 2012. **14**(7): p. 616-25.

545. Stefanyk, L.E. and D.J. Dyck, *The interaction between adipokines, diet and exercise on muscle insulin sensitivity*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. **13**(3): p. 255-9.
546. Lakhdar, N., et al., *Effects of intense cycling training on plasma leptin and adiponectin and its relation to insulin resistance*. *Neuro Endocrinol Lett*, 2013. **34**(3): p. 229-35.
547. Szostak, J. and P. Laurant, *The forgotten face of regular physical exercise: a 'natural' anti-atherogenic activity*. *Clin Sci (Lond)*, 2011. **121**(3): p. 91-106.
548. Nilsson, P. and G. Berglund, *Prevention of cardiovascular disease and diabetes: lessons from the Malmo Preventive Project*. *J Intern Med*, 2000. **248**(6): p. 455-62.
549. Pan, X.R., et al., *Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study*. *Diabetes Care*, 1997. **20**(4): p. 537-44.
550. Tuomilehto, J., et al., *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(18): p. 1343-50.
551. Imperatore, G., et al., *Physical activity, cardiovascular fitness, and insulin sensitivity among U.S. adolescents: the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(7): p. 1567-72.
552. Holloszy, J.O., *Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity*. *J Appl Physiol (1985)*, 2005. **99**(1): p. 338-43.
553. Sjostrom, L., *Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study*. *Int J Obes (Lond)*, 2008. **32 Suppl 7**: p. S93-7.
554. Bennett, J.M., S. Mehta, and M. Rhodes, *Surgery for morbid obesity*. *Postgrad Med J*, 2007. **83**(975): p. 8-15.
555. O'Brien, P.E., *Bariatric surgery: mechanisms, indications and outcomes*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010. **25**(8): p. 1358-65.
556. Ikramuddin, S. and H. Buchwald, *How bariatric and metabolic operations control metabolic syndrome*. *Br J Surg*, 2011. **98**(10): p. 1339-41.
557. Basso, N., et al., *First-phase insulin secretion, insulin sensitivity, ghrelin, GLP-1, and PYY changes 72 h after sleeve gastrectomy in obese diabetic patients: the gastric hypothesis*. *Surg Endosc*, 2011. **25**(11): p. 3540-50.
558. Vetter, M.L., et al., *Comparison of Bariatric Surgical Procedures for Diabetes Remission: Efficacy and Mechanisms*. *Diabetes Spectr*, 2012. **25**(4): p. 200-210.
559. Baltasar, A., et al., *Laparoscopic sleeve gastrectomy: a multi-purpose bariatric operation*. *Obes Surg*, 2005. **15**(8): p. 1124-8.
560. Noria, S.F. and T. Grantcharov, *Biological effects of bariatric surgery on obesity-related comorbidities*. *Can J Surg*, 2013. **56**(1): p. 47-57.
561. Sirbu, A., et al., *Six months results of laparoscopic sleeve gastrectomy in treatment of obesity and its metabolic complications*. *Chirurgia (Bucur)*, 2012. **107**(4): p. 469-75.
562. Ruiz-Tovar, J., et al., *Change in levels of C-reactive protein (CRP) and serum cortisol in morbidly obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy*. *Obes Surg*, 2013. **23**(6): p. 764-9.
563. Dogan, M., et al., *Effective weight control and normalization of metabolic parameters after laparoscopic sleeve gastrectomy: a single center experience*. *Hepatogastroenterology*, 2013. **60**(122): p. 368-71.

564. Dahlman, I., et al., *Changes in adipose tissue gene expression with energy-restricted diets in obese women*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(6): p. 1275-85.
565. Turner, J.J., et al., *Investigation of nuclear factor-kappaB inhibitors and interleukin-10 as regulators of inflammatory signalling in human adipocytes*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(3): p. 487-93.
566. Yehuda-Shnaidman, E. and B. Schwartz, *Mechanisms linking obesity, inflammation and altered metabolism to colon carcinogenesis*. Obes Rev, 2012. **13**(12): p. 1083-95.
567. Hirabara, S.M., et al., *Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 379024.
568. Poggi, M., et al., *C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet*. Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1267-76.
569. Kim, S.C., et al., *Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but no gain in function*. BMC Physiol, 2007. **7**: p. 5.
570. Song, M.J., et al., *Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346**(3): p. 739-45.
571. Dasu, M.R. and I. Jialal, *Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(1): p. E145-54.
572. Zerneck, A., J. Bernhagen, and C. Weber, *Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease*. Circulation, 2008. **117**(12): p. 1594-602.
573. Lue, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease*. Microbes Infect, 2002. **4**(4): p. 449-60.
574. Baugh, J.A. and R. Bucala, *Macrophage migration inhibitory factor*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Suppl): p. S27-35.
575. Verschuren, L., et al., *MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease*. Circ Res, 2009. **105**(1): p. 99-107.
576. Polak, J., et al., *Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in obese women*. Metabolism, 2006. **55**(10): p. 1375-81.
577. Klimcakova, E., et al., *Dynamic strength training improves insulin sensitivity without altering plasma levels and gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue in obese men*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(12): p. 5107-12.
578. Christiansen, T., et al., *Exercise training versus diet-induced weight-loss on metabolic risk factors and inflammatory markers in obese subjects: a 12-week randomized intervention study*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(4): p. E824-31.
579. Bluher, M., *Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2013. **27**(2): p. 163-77.
580. Bluher, M., *Are there still healthy obese patients?* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2012. **19**(5): p. 341-6.
581. Despres, J.P., *Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat*. Crit Pathw Cardiol, 2007. **6**(2): p. 51-9.

582. Imbeault, P., et al., *Relationship of visceral adipose tissue to metabolic risk factors for coronary heart disease: is there a contribution of subcutaneous fat cell hypertrophy?* Metabolism, 1999. **48**(3): p. 355-62.
583. Dolinkova, M., et al., *The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients.* Mol Cell Endocrinol, 2008. **291**(1-2): p. 63-70.
584. Agre, P., *The aquaporin water channels.* Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(1): p. 5-13.
585. Guo, L., et al., *An aquaporin 3-notch1 axis in keratinocyte differentiation and inflammation.* PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80179.
586. Engeli, S., et al., *The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome?* Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 807-25.
587. Giacchetti, G., et al., *Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24 Suppl 2**: p. S142-3.
588. Roubicek, T., et al., *Increased angiotensinogen production in epicardial adipose tissue during cardiac surgery: possible role in a postoperative insulin resistance.* Physiol Res, 2008. **57**(6): p. 911-7.
589. Schellenberg, E.S., et al., *Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis.* Ann Intern Med, 2013. **159**(8): p. 543-51.
590. Schwingshackl, L., et al., *Impact of different training modalities on anthropometric and metabolic characteristics in overweight/obese subjects: a systematic review and network meta-analysis.* PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82853.
591. Hawley, J.A. and S.J. Lessard, *Exercise training-induced improvements in insulin action.* Acta Physiol (Oxf), 2008. **192**(1): p. 127-35.
592. Ahlborg, G., et al., *Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids.* J Clin Invest, 1974. **53**(4): p. 1080-90.
593. Horowitz, J.F., *Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise.* Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(8): p. 386-92.
594. Romijn, J.A., et al., *Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration.* Am J Physiol, 1993. **265**(3 Pt 1): p. E380-91.
595. van Loon, L.J., et al., *The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans.* J Physiol, 2001. **536**(Pt 1): p. 295-304.
596. Arner, P., et al., *Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise.* J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 893-8.
597. Moro, C., et al., *Sex differences in lipolysis-regulating mechanisms in overweight subjects: effect of exercise intensity.* Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(9): p. 2245-55.
598. Wasserman, D.H., et al., *Exercise-induced fall in insulin and increase in fat metabolism during prolonged muscular work.* Diabetes, 1989. **38**(4): p. 484-90.
599. de Glisezinski, I., et al., *Adrenaline but not noradrenaline is a determinant of exercise-induced lipid mobilization in human subcutaneous adipose tissue.* J Physiol, 2009. **587**(Pt 13): p. 3393-404.
600. Moro, C., et al., *Exercise-induced lipid mobilization in subcutaneous adipose tissue is mainly related to natriuretic peptides in overweight men.* Am J Physiol

- Endocrinol Metab, 2008. **295**(2): p. E505-13.
601. Enevoldsen, L.H., et al., *The combined effects of exercise and food intake on adipose tissue and splanchnic metabolism*. J Physiol, 2004. **561**(Pt 3): p. 871-82.
 602. Gill, J.M., et al., *Effects of prior moderate exercise on exogenous and endogenous lipid metabolism and plasma factor VII activity*. Clin Sci (Lond), 2001. **100**(5): p. 517-27.
 603. Votruba, S.B., et al., *Prior exercise increases subsequent utilization of dietary fat*. Med Sci Sports Exerc, 2002. **34**(11): p. 1757-65.
 604. Newsholme, E.A., et al., *The role of substrate cycles in metabolic regulation*. Biochem Soc Trans, 1983. **11**(1): p. 52-6.
 605. Horowitz, J.F., et al., *Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(2): p. E348-55.
 606. Hodgetts, V., et al., *Factors controlling fat mobilization from human subcutaneous adipose tissue during exercise*. J Appl Physiol (1985), 1991. **71**(2): p. 445-51.
 607. Romijn, J.A., et al., *Relationship between fatty acid delivery and fatty acid oxidation during strenuous exercise*. J Appl Physiol (1985), 1995. **79**(6): p. 1939-45.
 608. Stallknecht, B., et al., *Role of the sympathoadrenergic system in adipose tissue metabolism during exercise in humans*. J Physiol, 2001. **536**(Pt 1): p. 283-94.
 609. Mauriege, P., et al., *Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences*. Eur J Clin Invest, 1987. **17**(2): p. 156-65.
 610. Wahrenberg, H., J. Bolinder, and P. Arner, *Adrenergic regulation of lipolysis in human fat cells during exercise*. Eur J Clin Invest, 1991. **21**(5): p. 534-41.
 611. Mulla, N.A., L. Simonsen, and J. Bulow, *Post-exercise adipose tissue and skeletal muscle lipid metabolism in humans: the effects of exercise intensity*. J Physiol, 2000. **524 Pt 3**: p. 919-28.
 612. Enevoldsen, L.H., et al., *Post-exercise abdominal, subcutaneous adipose tissue lipolysis in fasting subjects is inhibited by infusion of the somatostatin analogue octreotide*. Clin Physiol Funct Imaging, 2007. **27**(5): p. 320-6.
 613. Simonsen, L., et al., *The effect of exercise on regional adipose tissue and splanchnic lipid metabolism in overweight type 2 diabetic subjects*. Diabetologia, 2004. **47**(4): p. 652-9.
 614. Magkos, F., et al., *Free fatty acid kinetics in the late phase of postexercise recovery: importance of resting fatty acid metabolism and exercise-induced energy deficit*. Metabolism, 2009. **58**(9): p. 1248-55.
 615. Rodriguez, A., et al., *Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice*. FEBS Lett, 2006. **580**(20): p. 4771-6.
 616. Ma, T., et al., *Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4386-91.
 617. Liu, Y.L., et al., *Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues*. Hum Pathol, 2007. **38**(1): p. 171-8.
 618. Huang, Y., et al., *Critical role of aquaporin-3 in the human epidermal growth factor-induced migration and proliferation in the human gastric adenocarcinoma cells*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(12): p. 1000-7.
 619. Melis, M., et al., *Gene expression profiling of colorectal mucinous*

- adenocarcinomas*. *Dis Colon Rectum*, 2010. **53**(6): p. 936-43.
620. Kusayama, M., et al., *Critical role of aquaporin 3 on growth of human esophageal and oral squamous cell carcinoma*. *Cancer Sci*, 2011. **102**(6): p. 1128-36.

15. Přílohy

15.1 Prohlášení autora

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

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

V Praze, 25.5.2017

MUDr. Pavel Trachta

15.2 Identifikační záznam

TRACHTA, Pavel. *Změny endokrinní funkce a zánětlivého profilu tukové tkáně a periferních monocytů u pacientů s obezitou: vliv fyzické aktivity a bariatrické chirurgie. [Changes in endocrine function and inflammatory profile of adipose tissue and peripheral monocytes of patients with obesity: the influence of physical activity and bariatric surgery]*. Praha, 2017. 146 stran. 4 příloh. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, III. interní klinika. Školitel: Haluzík, Martin.

15.3 Plné texty vlastních publikací tvořících podklady dizertační práce

- Trachta, P., et al., *Laparoscopic sleeve gastrectomy ameliorates mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue but not in peripheral monocytes of obese patients*. Mol Cell Endocrinol, 2014. 383(1-2): p. 96-102.
- Trachta, P., et al., *Three months of regular aerobic exercise in patients with obesity improve systemic subclinical inflammation without major influence on blood pressure and endocrine production of subcutaneous fat*. Physiol Res, 2014. 63 Suppl 2: p. S299-308.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Laparoscopic sleeve gastrectomy ameliorates mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue but not in peripheral monocytes of obese patients



P. Trachta^a, I. Dostálová^a, D. Haluzíková^{a,b}, M. Kasalický^c, P. Kaválková^a, J. Drápalová^a, M. Urbanová^a, Z. Lacinová^a, M. Mráz^a, M. Haluzík^{a,*}

^a Third Department of Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

^b Department of Sports Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

^c Department of Surgery, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Military University Hospital, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2013

Received in revised form 20 November 2013

Accepted 20 November 2013

Available online 27 November 2013

Keywords:

Obesity

Laparoscopic sleeve gastrectomy

Adipose tissue

Peripheral monocytes

ABSTRACT

Low-grade inflammation links obesity, insulin resistance, and cardiovascular diseases. We investigated the effects of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) on expression profile of genes involved in inflammatory pathways in subcutaneous adipose tissue (SCAT) and peripheral monocytes (PM). At baseline, obese group had significantly increased mRNA expression of proinflammatory chemokines (CCL-3, -17, -22), chemokine receptor CCR1 and cytokines (IL-10, IL-18) in SCAT and chemokine and other proinflammatory receptors (CCR-1, -2, -3, TLR-2, -4) in PM relative to control group. LSG decreased body weight, improved metabolic profile and reduced mRNA expression of up-regulated chemokine receptors, chemokines and cytokines in SCAT. In contrast, expression profiles in PM were largely unaffected by LSG. We conclude that LSG improved proinflammatory profile in subcutaneous fat but not in peripheral monocytes. The sustained proinflammatory and chemotactic profile in PM even 2 years after LSG may contribute to partial persistence of metabolic complications in obese patients after metabolic surgery.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bariatric surgery is the only long-term effective treatment of severe obesity with proven reduction of both morbidity and mortality (Sjöström, 2008; Bennett et al., 2007; Ó'Brien, 2010; Ikramuddin and Buchwald, 2011). Beside sustained weight loss, bariatric surgery also dramatically improves obesity-related comorbidities including type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, arterial hypertension, sleep apnea and many others (Sjöström, 2008; Bennett et al., 2007; Ó'Brien, 2010; Ikramuddin and Buchwald, 2011).

Laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) has recently emerged as an alternative restrictive bariatric procedure to the popular laparoscopic adjustable gastric banding (Bennett et al., 2007) with good weight-loss efficacy. Nevertheless, exact pathophysiological mechanisms behind its beneficial metabolic effects are only poorly understood (Sirbu et al., 2012; Dogan et al., 2012; Ruiz-Tovar et al., 2013).

Abbreviations: LSG, laparoscopic sleeve gastrectomy; PM, peripheral monocytes; SCAT, subcutaneous adipose tissue.

* Corresponding author. Address: 3rd Department of Medicine, 1st Faculty of Medicine, U Nemocnice 1, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 224962908; fax: +420 224919780.

E-mail address: mhalu@lf1.cuni.cz (M. Haluzík).

One of the possible mechanisms of long-term beneficial metabolic effects of LSG could be the improvement of low-grade inflammation in different tissues (Ikramuddin and Buchwald, 2011). Subclinical inflammation is one of the key mechanisms linking obesity, insulin resistance, and other components of the metabolic syndrome (Wellen and Hotamisligil, 2003). The pivotal role in its development is now attributed to the adipose tissue and its endocrine dysfunction (Wellen and Hotamisligil, 2003). Obesity is typically characterized by elevated circulating levels of acute phase proteins, proinflammatory cytokines, and chemokines (Wellen and Hotamisligil, 2003). A number of studies including our data have shown that both adipocytes and immunocompetent cells residing in adipose tissue contribute to this inflammatory process (Ruiz-Tovar et al., 2013; Xu et al., 2003; Canello et al., 2005). Excessive accumulation of fat is associated with elevated number of adipose tissue macrophages and increased expression of proinflammatory factors (Xu et al., 2003). Studies have shown that most of the adipose tissue macrophages are derived from circulating mononuclear cells outside the adipose tissue (Canello et al., 2005). Peripheral blood monocytes are recruited into adipose tissue by various chemoattractants produced by hypertrophic adipocytes as well as resident stromal macrophages and T-lymphocytes. Their products subsequently act on adipocytes in a paracrine manner promoting the production of proinflammatory

factors. This cross-talk between adipose tissue monocytes and adipocytes generates a vicious circle of increased adipose tissue inflammation that contributes to low-grade systemic inflammation (Curat et al., 2004).

At present, very little is known about the interaction between circulating monocytes and adipose tissue and its modification by bariatric surgery. Here we tested the hypothesis that metabolic improvements after LSG could be mediated by attenuated inflammatory profile and decreased expression of proinflammatory and chemotactic factors in both peripheral monocytes (PM) and subcutaneous adipose tissue (SCAT). To this end, we examined the expression of a selected panel of inflammation-related factors in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes and evaluated the long-term effects of laparoscopic sleeve gastrectomy on these parameters.

2. Methods

2.1. Study subjects

Thirteen obese non-diabetic females (OB group) and eighteen healthy normal-weight age-matched women (C group) were included in the study. Four out of thirteen obese non-diabetic women were on antihypertensive treatment, one patient was treated with a statin. None of the studied subjects (OB group and C group) suffered from diabetes mellitus, thyroid disorder and/or acute infectious disease. None of the studied subjects had malignant tumor or any kind of allergy. Healthy control women had been free of any medication and had no history of obesity or malnutrition, hypertension, and gastrointestinal disease. Blood tests confirmed normal blood count, liver and renal functions and biochemical and hormonal parameters. OB subjects underwent laparoscopic sleeve gastrectomy at the Surgical Clinic, Military University Hospital in Prague and were examined at the Third Department of Medicine, General University Hospital, Prague. Written informed consent was signed by all participants before being enrolled into the study. The study was approved by the Human Ethics Committee, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic.

2.2. Anthropometric examination, blood and adipose tissue sampling

All obese patients were examined at basal state 1 week before LSG and 6 and 12 months after the surgery, while normal-weight age-matched women were examined only once at basal state. Eight out of thirteen obese women completed the 2-year follow-up and were examined also at month 24 after the surgery. All subjects were measured and weighed, and their body mass index (BMI) was calculated. Blood samples for cytokines, C-reactive protein (CRP), insulin and biochemical parameters were withdrawn between 0700 h and 0800 h after 12 h of overnight fasting. Blood samples were separated by centrifugation for 10 min at 1000g within 30 min from blood collection. Serum was subsequently stored in aliquots at -80°C until further analysis. Blood samples for CD14+ monocyte isolation were collected in Na-EDTA anticoagulant from all subjects and processed within 1–2 h.

Samples of the subcutaneous adipose tissue (abdominal area) were collected using subcutaneous needle biopsy. Approximately 100 mg of adipose tissue was collected to 1 ml of RNA stabilization Reagent (RNAlater, Qiagen, Germany) and stored at -80°C until further analysis.

2.3. Hormonal and biochemical assays

Serum adiponectin was measured by commercial RIA kit (Linco Research, St. Charles MO, USA) and C-reactive protein (CRP) was

measured by high sensitive assay (high sensitive CRP – Bender Medsystems, Vienna, Austria). Sensitivity was 0.78 ng/ml for adiponectin and 3.0 pg/ml for hsCRP. Serum leptin and resistin concentrations were measured by commercial ELISA kits (BioVendor, Modrice, Czech Republic) with a sensitivity of 0.2 ng/ml for resistin and 0.2 ng/ml for leptin. Serum insulin concentrations were measured by commercial RIA kit (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France). Sensitivity was 4.6 $\mu\text{IU/ml}$. Intra- and interassay variability for all kits was <5% and 9% respectively.

Biochemical parameters (HbA_{1c}, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, TAG, atherogenic index, glucose) were determined by standard laboratory methods in the Department of Biochemistry of General University Hospital, Prague. All biochemical assays were performed in one batch.

2.4. PM separation and total RNA isolation from monocytes and adipose tissue

Peripheral blood leukocytes were obtained from blood sample using Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) as described in detail previously (Mraz et al., 2011). Briefly, for each blood sample, Ficoll-Paque Plus was placed in a tube and then the blood sample was added. After centrifugation, leukocyte agglomerates were placed in a tube containing PBS (0.01 m PBS), pH 7.4. After centrifugation the supernatant was discarded, and the cell pellet was dissolved in PBS. The centrifugation step was repeated and the pellet was dissolved in DEGA buffer (0.01 m PBS with 0.5 m EDTA, pH 8 and 1% BSA). Monocytes were isolated from the cell pellet with magnetic activated cell sorting technique (MiniMacs Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) using microbeads coated with CD14 antibody (MACS CD14 MicroBeads; Miltenyi Biotec). The purity of isolated monocytes was >98% and it did not vary between time points in the same person. Total RNA was extracted from CD14+ monocyte samples on MagNA Pure instrument using MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Samples of subcutaneous adipose tissue were homogenized on MagNA Lyser Instrument with MagNA Lyser Green beads (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Total RNA from homogenized tissue was extracted on MagNA Pure instrument using MagNA Pure Compact RNA Isolation kit (tissue) (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

2.5. Determination of mRNA expression

mRNA expression of genes of interest was determined on ViiA7 Instrument using TaqMan Custom Array (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described in detail previously (Dolinkova et al., 2008). To compensate for variations in RNA amount and efficiency of reverse transcription, beta-2-microglobulin was used as endogenous references and results were normalized to these values. The formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$ was used to calculate relative gene expression. mRNA expression assays were carried out in multiple runs using multiplex analysis enabling to assess 48 genes at the same time.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed on SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Anthropometric, biochemical, and hormonal results are expressed as means \pm SD. Differences in gene expression, anthropometric, biochemical and hormonal parameters between OB subjects before and after LSG, and control group were evaluated using one-way ANOVA followed by Holm–Sidak test. Differences between obese women before and after LSG were evaluated using ANOVA on ranks followed by Dunn's test as appropriate. Statistical significance was assigned to $P < 0.05$. The

Benjamini–Hochberg procedure for false discovery rate was used for multiple testing of mRNA gene expression profiles in both PM and SCAT (Klipper-Aurbach et al., 1995).

3. Results

3.1. Anthropometric, biochemical, and hormonal characteristics of study subjects

Anthropometric, biochemical, and hormonal characteristics of both study groups are summarized in Table 1. The study groups were age-matched. At baseline, obese women had markedly increased BMI, serum triglycerides, insulin, resistin, leptin, CRP and HOMA index compared with control group. Serum adiponectin and HDL-cholesterol were significantly reduced in obese group relative to healthy controls.

LSG significantly reduced body weight and serum LDL-cholesterol, triglycerides, leptin and CRP levels, whereas serum adiponectin and HDL-cholesterol concentrations significantly increased

after LSG. No significant effects of LSG on total cholesterol, HbA1c, insulin, glucose, resistin and HOMA index during the two-year follow-up were found.

3.2. mRNA expression of inflammation-related genes in SCAT and PM

The summary of mRNA expression of selected inflammation-related genes in SCAT and PM of OB patients relative to control group is shown in Table 2 (chemokines and chemokine receptors in SCAT), Table 3 (hormones, adipokines, and corresponding receptors in SCAT), Table 4 (cytokines and other inflammation-related factors and corresponding receptors in SCAT), Table 5 (mRNA expression of chemokines and chemokine receptors in PM), Table 6 (mRNA expression of hormones, adipokines, and corresponding receptors in PM) and Table 7 (mRNA expression of cytokines and other inflammation-related factors and corresponding receptors in PM). At baseline, of the 45 genes studied in both tissues, significant differences in mRNA expression were detected in 11 genes in SCAT and in 10 genes in PM compared with control group, respectively.

Table 1
Clinical, hormonal, and metabolic characteristics of study subjects at baseline and after laparoscopic sleeve gastrectomy.

	Controls	Obese (LSG)			
		Basal state	6 months	12 months	24 months
Number	18	13	13	13	8
Age (year)	44.0 ± 14.2	40.8 ± 8.4	N/A	N/A	N/A
Body mass index (kg/m ²)	22.4 ± 1.9	42.3 ± 4.1 [†]	33.4 ± 4.2 ^{†*}	31.5 ± 4.5 ^{†*}	33.0 ± 6.0 ^{†*}
Cholesterol (mmol/l)	5.09 ± 0.60	4.84 ± 1.51	4.71 ± 1.47	4.79 ± 1.45	4.81 ± 1.45
HDL cholesterol (mmol/l)	1.71 ± 0.31	1.34 ± 0.46 [†]	1.45 ± 0.45	1.71 ± 0.44 [†]	1.84 ± 0.45 [†]
LDL cholesterol (mmol/l)	2.89 ± 0.50	2.76 ± 1.06	2.61 ± 1.12	2.60 ± 0.83 [†]	2.37 ± 1.10 [†]
Triglycerides (mmol/liter)	1.07 ± 0.44	1.71 ± 0.83 [†]	1.45 ± 0.62	1.35 ± 0.61	0.95 ± 0.56 [†]
Blood glucose (mmol/l)	4.69 ± 0.34	4.99 ± 0.80	5.11 ± 0.78	4.86 ± 0.80	5.18 ± 0.83
HbA1c (% IFCC)	3.54 ± 0.47	3.98 ± 0.62	3.88 ± 0.53	3.71 ± 0.67	4.09 ± 0.89
Insulin (mIU/l)	17.5 ± 4.9	36.8 ± 16.2 [†]	25.9 ± 7.9	26.0 ± 14.8	31.1 ± 20.8
HOMA-IR	3.66 ± 1.12	8.51 ± 4.83 [†]	6.01 ± 2.55 [†]	5.98 ± 4.97	7.24 ± 4.98
Resistin (ng/ml)	4.99 ± 1.31	7.69 ± 2.87 [†]	7.21 ± 1.58 [†]	7.41 ± 2.92 [†]	6.81 ± 1.40
Adiponectin (µg/ml)	29.2 ± 11.8	15.9 ± 7.2 [†]	19.7 ± 8.8 [†]	24.1 ± 9.0 [†]	27.3 ± 9.3 [†]
Leptin (ng/ml)	16.0 ± 10.8	54.5 ± 11.8 [†]	22.2 ± 10.8 [†]	20.4 ± 12.0 [†]	25.6 ± 17.1 [†]
C-reactive protein (mg/l)	0.42 ± 0.58	1.45 ± 0.85 [†]	1.14 ± 0.87 [†]	0.94 ± 0.69 [†]	0.69 ± 0.32 [†]

Values are means ± S.D. Statistical significance is from One way ANOVA or ANOVA on Ranks as appropriate. HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment, insulin resistance; IFCC, International Federation of Clinical Chemistry.

[†] p < 0.05 vs. control group.
^{†*} p < 0.05 vs. obese group (basal state).

Table 2
Chemokines and chemokine receptors: mRNA expression changes in subcutaneous adipose tissue of obese patients (n = 11) relative to control group (n = 18) and the effect of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG).

Gene symbol	Gene name	Obese			
		Basal state (n = 18)	6 months (n = 11)	12 months (n = 11)	24 months (n = 8)
CCL-2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	1.57 ± 1.13	1.72 ± 0.74	1.50 ± 1.19	1.78 ± 1.45
CCL-3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	1.65 ± 1.33 [†]	1.72 ± 1.26 [†]	0.73 ± 0.53	0.50 ± 0.54 [†]
CCL-5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	0.61 ± 0.46	0.44 ± 0.20	0.31 ± 0.12 [†]	0.33 ± 0.12 [†]
CCL-7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	3.19 ± 3.72	4.83 ± 3.92	1.45 ± 1.75	1.79 ± 1.67
CCL-8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	1.08 ± 0.52	1.26 ± 1.44	1.03 ± 0.59	1.26 ± 0.96
CCL-17	Chemokine (C-C motif) ligand 17	4.22 ± 2.96 [†]	5.50 ± 3.67 [†]	2.42 ± 1.32	3.74 ± 2.65 [†]
CCL-22	Chemokine (C-C motif) ligand 22	4.36 ± 2.90 [†]	5.24 ± 3.35 [†]	2.62 ± 2.83	2.90 ± 3.34
CCR-1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	2.35 ± 1.55 [†]	2.55 ± 1.42 [†]	1.29 ± 0.70	1.12 ± 0.56 [†]
CCR-2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	0.94 ± 0.36	1.16 ± 0.64	0.79 ± 0.35	0.65 ± 0.60
CCR-3	Chemokine (C-C motif) receptor 3	0.98 ± 1.36	0.32 ± 0.24	0.19 ± 0.12 [†]	0.28 ± 0.28
CCR-4	Chemokine (C-C motif) receptor 4	1.16 ± 0.58	0.77 ± 0.25	0.67 ± 0.42 [†]	0.50 ± 0.23 [†]
CCR-5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	2.05 ± 1.13	3.38 ± 2.41 [†]	2.18 ± 1.95	1.49 ± 1.10
CD68	CD 68 molecule	2.18 ± 1.36	2.41 ± 0.97 [†]	1.54 ± 0.69	1.35 ± 0.68 [†]
CXCL-10	Chemokine (C-C motif) ligand 10	0.95 ± 1.33	1.45 ± 1.92	0.68 ± 0.45	0.61 ± 0.30

Values are means ± S.D. Relative mRNA expression is expressed as multiple of mean relative mRNA expression of control group for every gene. Relative mRNA expression of control group is taken as 1.0. Statistical significance is from One way ANOVA or ANOVA on ranks as appropriate.

[†] p < 0.05 vs. control group.
^{†*} p < 0.05 vs. obese group (basal state).

Table 3
Hormones, adipokines, and corresponding receptors: mRNA expression changes in subcutaneous adipose tissue of obese patients (n = 11) relative to control group (n = 18) and the effect of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG).

Gene symbol	Gene name	Obese (LSG)			
		Basal state (n = 18)	6 months (n = 11)	12 months (n = 11)	24 months (n = 8)
ADIPOR1	Adiponectin receptor 1	1.04 ± 0.33	0.73 ± 0.11 ^{*,*}	0.72 ± 0.11 ^{*,*}	0.82 ± 0.18 [*]
ADIPOR2	Adiponectin receptor 2	0.64 ± 0.32 [*]	0.65 ± 0.17 [*]	0.76 ± 0.22	0.94 ± 0.32
NAMPT (Visfatin)	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	0.84 ± 0.67	0.82 ± 0.38	0.67 ± 0.10	0.73 ± 0.24
PRL	Prolactin	1.19 ± 0.96	0.87 ± 0.69	1.09 ± 0.77	1.08 ± 1.10
PRLR	Prolactin receptor	1.33 ± 0.26	1.41 ± 0.28	0.75 ± 0.11	0.74 ± 0.13 [*]
RETN	Resistin	0.44 ± 0.23	0.29 ± 0.31 [*]	0.10 ± 0.09 ^{*,*}	0.19 ± 0.14 ^{*,*}

Values are means ± S.D. Relative mRNA expression is expressed as multiple of mean relative mRNA expression of control group for every gene. Relative mRNA expression of control group is taken as 1.0. Statistical significance is from One way ANOVA or ANOVA on Ranks as appropriate.

^{*} p < 0.05 vs. control group.

^{*} p < 0.05 vs. obese group (basal state).

Table 4
Cytokines and other inflammation-related factors and corresponding receptors: mRNA expression changes in subcutaneous adipose tissue of obese patients (n = 11) relative to control group (n = 18) and the effect of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG).

Gene symbol	Gene name	Obese			
		Basal state (n = 18)	6 months (n = 11)	12 months (n = 11)	24 months (n = 8)
IL-10	Interleukin 10	2.22 ± 1.73 [*]	1.40 ± 0.75	1.07 ± 0.70	0.81 ± 0.49 [*]
IL-18	Interleukin 18	1.99 ± 0.89 [*]	1.82 ± 0.94 [*]	1.28 ± 0.69 [*]	1.14 ± 0.58 [*]
IL-1 α	Interleukin 1 α	ND			
IL-1 β	Interleukin 1 β	0.86 ± 1.15	0.31 ± 0.39	0.17 ± 0.10 [*]	0.16 ± 0.12 ^{*,*}
IL1R	Interleukin 1 receptor	1.08 ± 0.42	1.03 ± 0.29	1.01 ± 0.28	0.97 ± 0.21
IL-6	Interleukin 6	1.00 ± 0.61	0.71 ± 0.34	0.82 ± 0.14	0.90 ± 0.45
IL-6R	Interleukin 6 receptor	0.94 ± 0.57	0.69 ± 0.20	0.60 ± 0.22 [*]	0.60 ± 0.22 [*]
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer	0.92 ± 0.36	0.91 ± 0.10	1.00 ± 0.36	1.16 ± 0.41
IL-8	Interleukin 8	0.65 ± 0.45	0.63 ± 0.42	0.40 ± 0.24	0.20 ± 0.12 ^{*,*}
JUN	Jun proto-oncogene	0.42 ± 0.08 [*]	0.12 ± 0.04 ^{*,*}	0.11 ± 0.04 [*]	0.16 ± 0.05
MAFB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	1.55 ± 0.94	1.51 ± 0.54	1.14 ± 0.46	1.10.35 \pm
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	1.13 ± 0.33	1.24 ± 0.28	1.10 ± 0.21	1.18 ± 0.28
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	1.13 ± 0.33	1.15 ± 0.29	0.97 ± 0.34	0.98 ± 0.39
NFkB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	0.78 ± 0.56	0.69 ± 0.11	0.72 ± 0.16	0.77 ± 0.17
NFkB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	0.54 ± 0.07 [*]	0.68 ± 0.10 [*]	0.64 ± 0.16 [*]	0.71 ± 0.18 [*]
PPARA	Peroxisome proliferator activated receptor α	0.66 ± 0.27	0.53 ± 0.14 [*]	0.51 ± 0.15 [*]	0.64 ± 0.30
PPARD	Peroxisome proliferator activated receptor δ	1.09 ± 0.87	0.94 ± 0.16	0.94 ± 0.28	1.06 ± 0.26
TLR2	Toll-like receptor 2	1.00 ± 0.68	0.71 ± 0.36	0.44 ± 0.20 ^{*,*}	0.42 ± 0.19 ^{*,*}
TLR4	Toll-like receptor 4	0.94 ± 0.17	0.92 ± 0.21	0.87 ± 0.29	0.83 ± 0.16
TNF- α	Tumor necrosis factor α	1.18 ± 0.63	0.94 ± 0.37	0.85 ± 0.52	0.77 ± 0.41
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	0.81 ± 0.31	1.28 ± 0.68	1.03 ± 0.73	1.24 ± 0.77
TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	1.17 ± 0.49	0.83 ± 0.47	0.60 ± 0.18 ^{*,*}	0.83 ± 0.55
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	0.47 ± 0.40 [*]	0.45 ± 0.10 [*]	0.52 ± 0.10 [*]	0.55 ± 0.22
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	0.89 ± 0.27	0.98 ± 0.10	0.92 ± 0.21	1.20 ± 3.14
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2.28 ± 1.56	1.38 ± 0.84 [*]	0.54 ± 0.33 [*]	0.94 ± 0.60 [*]

Values are means ± S.D. Relative mRNA expression is expressed as multiple of mean relative mRNA expression of control group for every gene. Relative mRNA expression of control group is taken as 1.0. Statistical significance is from One way ANOVA or ANOVA on Ranks as appropriate.

^{*} p < 0.05 vs. control group.

^{*} p < 0.05 vs. obese group (basal state).

mRNA expression was undetectable in five genes in PM (CCL-22, -7, -17, IL-1 α , IL-6) and in one gene (IL-1 α) in SCAT.

In SCAT of obese patients, increased expression of chemokines CCL-3, -17 and -22 and chemokine receptor CCR-1 together with elevated expression of macrophage marker CD68 (Table 2) and interleukins IL-10 and IL-18 (Table 4) was found compared with C group. On the other hand, mRNA expression of adiponectin receptor 2 (ADIPOR2), Jun proto-oncogene (JUN), NFkB2 and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) was decreased in obese compared with C subjects (Tables 3 and 4). We found no significant changes in mRNA expression of other studied genes in SCAT of OB patients as compared to C group (Tables 2–4).

At baseline, PM of obese patients showed elevated mRNA expression of most chemokine and cytokine receptors including CCR-1, -2, -3, toll-like receptor 2 and 4 and TNFRSF1A (TNF receptor superfamily member 1A) as well as other inflammation-related factors and receptors as CD68, ICAM-1, PPARD and ADIPOR2 (Tables 5–7).

3.3. The influence of laparoscopic sleeve gastrectomy on SCAT and PM mRNA expression profile in obese subjects

LSG significantly reduced mRNA expression of several chemokines and chemokine receptors in SCAT including CCL-3, CCL-5, CCR-1 and CCR-4 together with macrophage marker CD68 (Table 2). This effect was firstly detected 12 months after LSG and was most pronounced 24 months after the surgery, whereas no significant change in the expressions of these chemokines/receptors has been observed at month 6 after LSG. In contrast, in PM mRNA expression of the investigated chemokines and chemokine receptors was not affected by LSG at any time throughout the 2-year follow-up except of a temporary increase in the expression of CCR-1 at month 12 after LSG (Table 5).

From the adipokine panel, mRNA expression of adiponectin receptor 1 and resistin in SCAT decreased already at month 6 after LSG and remained decreased until the end of the study, while the expression of prolactin receptor showed significant reduction only

Table 5
Chemokines and chemokine receptors: mRNA expression changes in peripheral CD14+ monocytes of obese patients (n = 13) relative to control group (n = 18) and the effect of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG).

Gene symbol	Gene name	Obese			
		Basal state (n = 18)	6 months (n = 13)	12 months (n = 13)	24 months (n = 8)
<i>Chemokines and chemokine receptors</i>					
CCL-2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	1.63 ± 1.80	2.07 ± 1.99	2.64 ± 1.45 [†]	1.48 ± 1.51
CCL-3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	1.62 ± 1.89	2.73 ± 2.17 [†]	3.07 ± 2.64 [†]	2.39 ± 2.80
CCL-5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	2.42 ± 1.81	3.44 ± 2.26 [†]	3.36 ± 3.39 [†]	1.93 ± 1.03
CCL-7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	ND			
CCL-8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	2.10 ± 1.49	2.38 ± 1.87	3.21 ± 2.40 [†]	1.91 ± 1.29
CCL-17	Chemokine (C-C motif) ligand 17	ND			
CCL-22	Chemokine (C-C motif) ligand 22	ND			
CCR-1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	2.53 ± 1.43 [†]	3.56 ± 1.67 [†]	3.94 ± 2.10 ^{†*}	2.44 ± 1.03 [†]
CCR-2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	3.16 ± 1.97 [†]	3.57 ± 1.02 [†]	4.33 ± 1.78 [†]	3.11 ± 1.71 [†]
CCR-3	Chemokine (C-C motif) receptor 3	2.59 ± 1.52 [†]	1.39 ± 0.99	1.33 ± 0.89	1.04 ± 1.00
CCR-4	Chemokine (C-C motif) receptor 4	1.36 ± 1.20	1.52 ± 1.10	1.01 ± 0.54	0.86 ± 0.63
CCR-5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	1.90 ± 1.27	2.87 ± 2.43 [†]	3.19 ± 1.95 [†]	1.50 ± 0.89
CD68	CD 68 molecule	2.05 ± 0.83 [†]	2.55 ± 0.86 [†]	2.73 ± 0.98 [†]	1.96 ± 0.82 [†]
CXCL-10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	0.82 ± 0.61	0.92 ± 0.60	1.54 ± 1.78	1.24 ± 1.76

Values are means ± S.D. Relative mRNA expression is expressed as multiple of mean relative mRNA expression of control group for every gene. Relative mRNA expression of control group is taken as 1.0. Statistical significance is from One way ANOVA or ANOVA on Ranks as appropriate.

ND – non-detectable

[†] p < 0.05 vs. control group.

^{*} p < 0.05 vs. obese group (basal state).

Table 6
Hormones, adipokines, and corresponding receptors: mRNA expression changes in peripheral CD14+ monocytes of obese patients (n = 13) relative to control group (n = 18) and the effect of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG).

Gene symbol	Gene name	Obese			
		Basal state (n = 18)	6 months (n = 13)	12 months (n = 13)	24 months (n = 8)
<i>Hormones, adipokines and receptors</i>					
ADIPO1	Adiponectin receptor 1	2.22 ± 1.74	2.71 ± 1.58 [†]	2.45 ± 0.99 [†]	2.27 ± 1.32 [†]
ADIPO2	Adiponectin receptor 2	1.84 ± 0.59 [†]	2.48 ± 0.89 [†]	2.03 ± 1.02 [†]	1.89 ± 0.89 [†]
NAMPT (visfatin)	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	2.07 ± 1.67	3.92 ± 2.91 ^{†*}	2.83 ± 2.55 [†]	1.51 ± 0.95
PRL	Prolactin	1.78 ± 2.72	2.07 ± 2.02	2.42 ± 2.40	1.46 ± 1.25
PRLR	Prolactin receptor	1.72 ± 1.85	2.22 ± 1.67	1.90 ± 1.65	1.78 ± 1.02
RETN	Resistin	1.10 ± 0.44	1.12 ± 0.70	0.98 ± 0.50	0.71 ± 0.43

Values are means ± S.D. Relative mRNA expression is expressed as multiple of mean relative mRNA expression of control group for every gene. Relative mRNA expression of control group is taken as 1.0. Statistical significance is from One way ANOVA or ANOVA on Ranks as appropriate.

ND – non-detectable.

[†] p < 0.05 vs. control group.

^{*} p < 0.05 vs. obese group (basal state).

at month 24. Similarly to chemokines, only a transiently increased mRNA expression of NAMPT (visfatin) was found at month 6 in PM, while no other change in mRNA expression of the remaining adipokines could be observed during the study period (Table 6).

Other proinflammatory factors whose mRNA expression in SCAT decreased mainly at months 12 or 24 after LSG included IL-1β, IL-8, IL-10 and IL-18, NFκB2, TNFRSF1B, toll-like receptor 2 and Jun proto-oncogene. In contrast, vascular endothelial growth factor A was the only parameter whose mRNA expression was significantly elevated after LSG in SCAT of obese subjects (Table 4). Again, LSG had almost no effect on mRNA expression of these factors in PM with the exception of increased expression of FOS gene, and NAMPT (visfatin) at month 6, CCR-1 at month 12 and STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) at months 6 and 24 (Table 7).

4. Discussion

Laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) is a recently introduced restrictive-type bariatric surgical procedure with effects on body weight, glucose control and metabolic parameters comparable to established restrictive bariatric operations (e.g. gastric banding). Here we demonstrate that except of positively influencing the

allover metabolic state LSG also markedly improved proinflammatory profile of subcutaneous adipose tissue in obese non-diabetic females, although it had no effect on complementarily up-regulated panel of inflammation-related genes in peripheral monocytes (PM) during a 2-year follow-up

Our data indicate that one of the mechanisms of metabolic improvements after LSG may lie in the attenuation of chronic-grade inflammation, in particular in adipose tissue (Ikramuddin and Buchwald, 2011).

Previous studies have shown that LSG exerts positive effects on anthropometric parameters (Noria and Grantcharov, 2013), as well as insulin resistance and T2DM control, lipid levels (Sirbu et al., 2012) and blood pressure (Dogon et al., 2012). In our study, LSG significantly decreased body weight, improved lipid profile and reduced systemic low-grade inflammation as measured by hsCRP. Conversely, no influence of LSG on parameters of glucose metabolism (fasting glucose, HbA_{1c}, HOMA index) could be observed throughout the study period. This fact might most probably be attributed to the absence of an overt glucose metabolism disorder in the study group. Positive metabolic effects of LSG persisted throughout the whole study period, though a slight non-significant trend towards increased BMI and blood glucose occurred at the end of the follow-up at Month 24.

Table 7Cytokines and other inflammation-related factors and corresponding receptors: mRNA expression changes in peripheral CD14⁺ monocytes of obese patients (n = 13) relative to control group (n = 18) and the effect of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG).

Gene symbol	Gene name	Basal state (n = 18)	6 months (n = 13)	12 months (n = 13)	24 months (n = 8)
IL10	Interleukin 10	2.15 ± 0.99	1.82 ± 1.22 [†]	1.42 ± 0.79 [†]	1.10 ± 0.87 [†]
IL18	Interleukin 18	1.36 ± 1.05	1.82 ± 1.01	1.63 ± 0.95	1.24 ± 0.65
IL1 α	Interleukin 1 alpha	ND			
IL1 β	Interleukin 1 beta	1.67 ± 1.96	1.81 ± 1.61	1.99 ± 2.23	1.15 ± 0.96
IL1R	Interleukin 1 receptor	0.83 ± 0.64	1.06 ± 0.97	1.28 ± 0.73	1.08 ± 0.70
IL6	Interleukin 6	ND			
IL6R	Interleukin 6 receptor	1.99 ± 0.93	2.78 ± 1.53 [†]	2.59 ± 0.81 [†]	2.78 ± 1.44 [†]
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer	1.65 ± 0.65	2.17 ± 0.95 [†]	1.91 ± 0.60 [†]	2.51 ± 1.14 [†]
IL8	Interleukin 8	1.92 ± 2.15	2.59 ± 2.04	2.57 ± 2.83	2.47 ± 2.49
JUN	Jun proto-oncogene	0.79 ± 0.49	2.03 ± 1.25	1.64 ± 1.44	1.76 ± 1.68
MAFB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	1.49 ± 1.51	1.57 ± 0.72	1.59 ± 1.37	0.98 ± 0.36
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	1.29 ± 0.59	2.25 ± 1.30 [†]	2.01 ± 0.72 [†]	1.47 ± 0.41
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	1.67 ± 0.89 [†]	2.01 ± 1.08 [†]	1.93 ± 0.76 [†]	1.32 ± 0.80
NF κ B1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	1.53 ± 0.68	1.81 ± 0.82	1.71 ± 0.48	1.67 ± 0.61
NF κ B2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	1.25 ± 0.56	2.04 ± 1.29 [†]	2.02 ± 0.86 [†]	1.99 ± 1.69
PPARA	Peroxisome proliferator activated receptor α	1.76 ± 1.52	1.36 ± 0.91	1.82 ± 1.31	1.87 ± 1.19
PPARD	Peroxisome proliferator activated receptor δ	1.86 ± 0.84 [†]	1.98 ± 0.90 [†]	2.21 ± 0.47 [†]	2.71 ± 2.04 [†]
TLR2	Toll-like receptor 2	1.63 ± 0.77 [†]	1.93 ± 1.66	2.08 ± 1.99 [†]	1.28 ± 0.57
TLR4	Toll-like receptor 4	1.61 ± 0.55 [†]	1.81 ± 0.77 [†]	1.94 ± 0.48 [†]	2.05 ± 0.74 [†]
TNF α	Tumor necrosis factor α	1.56 ± 1.50	2.14 ± 1.40	2.03 ± 1.91	1.60 ± 0.84
TNFRS1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	2.55 ± 1.32 [†]	2.89 ± 1.66 [†]	3.32 ± 2.27 [†]	2.59 ± 2.06 [†]
TNFRS1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	1.43 ± 0.86	1.37 ± 1.18	1.42 ± 0.90	1.50 ± 0.79
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	1.57 ± 0.52	1.67 ± 0.74 [†]	2.02 ± 1.37 [†]	1.80 ± 0.86 [†]
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	0.56 ± 0.24	1.00 ± 0.48 [†]	0.90 ± 0.34	1.29 ± 0.46 [†]
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	0.83 ± 0.56	2.67 ± 1.10 ^{†*}	1.44 ± 1.02	1.27 ± 0.67

Values are means \pm S.D. Relative mRNA expression is expressed as multiple of mean relative mRNA expression of control group for every gene. Relative mRNA expression of control group is taken as 1.0. Statistical significance is from One way ANOVA or ANOVA on Ranks as appropriate.

ND – non-detectable.

[†] $p < 0.05$ vs. control group.

^{*} $p < 0.05$ vs. obese group (basal state).

In agreement with other previously published studies (Dahlman and Linder, 2005; Wu et al., 2007; Huber et al., 2008; Mraz et al., 2011) at baseline we found markedly increased expression of chemotactic cytokines including CC chemokines 3, 17 and 22 in SCAT complemented by a similar up-regulation of corresponding chemokine receptors (CCR-1, -2, -3) and other inflammation-related receptors (TLR2 and 4, TNFRS1A) in PM of our obese non-diabetic patients. Elevated expression of macrophage marker CD68 indicates increased accumulation of immunocompetent cells in obese SCAT, further contributing to local low-grade inflammation. However, increased expression of both the proinflammatory cytokine IL-18 as well as the anti-inflammatory IL-10 suggests that obese adipose tissue is infiltrated not only by M1 macrophages producing proinflammatory cytokines, but also by anti-inflammatory and reparatory M2 macrophages as IL-10 is one of the typical M2 phenotype markers (Turner et al., 2010; Yehuda-Shnaidman and Schwartz, 2012). Taken together, our data indicate the existence of a strong proinflammatory and chemoattractant state of subcutaneous adipose tissue for macrophages and other immunocompetent cells in obese non-diabetic patients, suggesting that obesity *per se* (i.e. without the presence of an overt disorder of glucose metabolism) is able to increase the chemoattracting potential of SCAT.

The most intriguing finding of our study is the observation that LSG markedly improved the proinflammatory profile of subcutaneous adipose tissue while it did not substantially change the expression of up-regulated chemokine receptors as well as other inflammation-related factors in peripheral monocytes. Decreased expression of chemokines and macrophage marker CD68 indicate reduced chemoattracting ability and subsequent reduction in immunocompetent cell infiltration of SCAT. Conversely, no such data could be seen in PM, where increased expression of most of the initially up-regulated chemokine and other proinflammatory receptors was present throughout the whole follow-up. These data

are in contrast with our previous results in obese subjects with type 2 diabetes where short-term caloric restriction (3 weeks of very-low-calorie diet – energy intake 2500 kJ/day) induced a significant and consistent decrease in mRNA expression of all up-regulated chemokine and cytokine receptors in PM and a similar, albeit less pronounced change in the expression profile of up-regulated chemokines in SCAT (Mraz et al., 2011). One obvious difference between the studies which could at least partially account for this discrepancy is the presence of diabetes mellitus in the VLCD study. Nevertheless, the results also suggest that the chemotactic profile of PM might be more affected by rapid short-term changes in energy intake (characteristic for VLCD), whereas the proinflammatory and chemoattracting profile of SCAT could be more influenced by long-term weight reduction as seen after LSG. SCAT may thus be the primary mediator of long-term favorable metabolic changes after LSG, while PM may play a role in the persistence and/or recurrence of low-grade inflammation after LSG (Hirabara et al., 2012).

Except of modification in chemoattraction, other specific mechanisms seem also involved in the persistent proinflammatory state of PM. Toll-like receptors (TLRs), one of the key molecular components of the innate immune response, are expressed predominantly on cells of the innate system, particularly on monocytes. TLRs participate in pathogenesis of insulin resistance in animal models (Shi et al., 2006; Poggi et al., 2007) and mediate vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity (Kim et al., 2007). Activation of TLRs in adipocytes was associated with the onset of insulin resistance in obesity and type-2 diabetes (Song et al., 2006). High glucose as well as free fatty acids can induce TLR2 and TLR4 expression and activation, leading thus to increased inflammation via nuclear factor (NF)- κ B (Dasu and Jilka, 2011). In our study we demonstrated a significant increase in mRNA expression of TLR2, TLR4 and NF κ B2, in peripheral monocytes of obese

subjects relative to control group at baseline that persisted throughout the whole study period. These findings indicate an ongoing activation of the TLR stresspathway in PM.

Another factor possibly contributing to persistent proinflammatory state after LSG might be the macrophage inhibitory factor – MIF. MIF is a widely expressed pro-inflammatory cytokine that contributes to the development of a wide spectrum of inflammatory disorders (Zernecke et al., 2008; Lue et al., 2002; Baugh and Bucala, 2002). Its deficiency has been previously shown to reduce macrophage infiltration into white adipose tissue and to lower both tissue-specific and systemic chronic inflammation (Verschuren et al., 2010). Conversely, its sustainably up-regulated expression as seen in our study subjects might be by one of the mechanism responsible for maintaining PM in a predominantly proinflammatory state after LSG.

In conclusion, we have demonstrated that both subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients exert a strong chemoattracting and proinflammatory profile with complementary orchestrated expression of chemotactic factors and their corresponding receptors. LSG significantly improved metabolic control and reduced systemic low-grade inflammation of obese patients. These effects were in concert with improved expression profile of chemokines, chemokine receptors and proinflammatory acting cytokines in SCAT, but not in PM. Whether the persistent proinflammatory and chemotactic profile in PM after LSG plays a driving role in the persistence/re-manifestation of metabolic complications of obese patients after surgery or is just a marker of allover insulin resistance remains to be determined in further studies.

Disclosure summary

The authors have nothing to declare.

Acknowledgments

This work was supported by RVO-VFN64165, SVV264503, IGA-NT13299, IGA-NT13046-4/2012 and project reg.no. CZ.2.16/3.1.00/24012 from OP Prague Competitiveness.

References

- Baugh, J.A., Bucala, R., 2002. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit. Care Med.* 30, S27–S35.
- Bennett, J.M.H., Mehta, S., Rhodes, M., 2007. Surgery for morbid obesity. *Postgraduate Med. J.* 83 (975), 8–15.
- Canello, R., Henegar, C., Viguier, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.L., Bouloumié, A., Barbatelli, G., Cinti, S., Svensson, P.A., Barsh, G.S., Zuckerman, J.D., Basdevant, A., Langin, D., Clément, K., 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54 (8), 2277–2286.
- Curat, C.A., 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 (5), 1285–1292.
- Dahlman, I., Linder, K., Arvidsson Nordström, E., Andersson, I., Lidén, J., Verdich, C., Sørensen, T.I., Arner, P., 2005. Changes in adipose tissue gene expression with energy-restricted diets in obese women. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (6), 1275–1285. Erratum in: *Am. J. Clin. Nutr.* 2005 Sep 82(3), 709.
- Dasu, M.R., Jialal, I., 2011. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. *Am. J. Physiol.* 300 (1), E145–E154.
- Dogan, M., Tugmen, C., Kebapci, E., Karaman, K., Ozturk, S., Olmez, M., Karaca, C., Bademkiran, E., Gorgun, M., Aydin, C., 2012. Effective weight control and

- normalization of metabolic parameters after laparoscopic sleeve gastrectomy: a single center experience. *Hepatogastroenterology* 60 (122).
- Dolinková, M., Dostálová, I., Lacinová, Z., Michálek, D., Haluzíková, D., Mráz, M., Kasalický, M., Haluzík, M., 2008. The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol. Cell. Endocrinol.* 291 (1–2), 63–70.
- Hirabara, S.M., Gorjão, R., Vinolo, M.A., Rodrigues, A.C., Nachbar, R.T., Curi, R., 2012. Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions. *J. Biomed. Biotechnol.* 379024.
- Huber, J., Kiefer, F.W., Zeyda, M., Ludvik, B., Silberhumer, G.R., Prager, G., Zlabinger, G.J., Stulnig, T.M., 2008. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (8), 3215–3221.
- Ikramuddin, S., Buchwald, H., 2011. How bariatric and metabolic operations control metabolic syndrome. *Br. J. Surg.* 98 (10), 1339–1341.
- Kim, S.C., Ghanem, A., Stapel, H., et al., 2007. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but nogain in function. *BMC Physiol.* 7, article 5.
- Klipper-Aurbach, Y., Wasserman, M., Braunsiegel-Weintrob, N., Borstein, D., Peleg, S., Assa, S., Karp, M., Benjamini, Y., Hochberg, Y., Laron, Z., 1995. Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Med. Hypotheses* 45 (5), 486–490.
- Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., Bernhagen, J., 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.* 4, 449–460.
- Mráz, M., Lacinová, Z., Drapalová, J., Haluzíková, D., Horinek, A., Matoulek, M., Trachta, P., Kavalková, P., Svacina, S., Haluzík, M., 2011. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (4), E606–E613.
- Noria, S.F., Grantcharov, T., 2013. Biological effects of bariatric surgery on obesity-related comorbidities. *Can. J. Surg.* 56 (1), 47–57.
- O'Brien, P.E., 2010. Bariatric surgery: mechanisms, indications and outcomes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25 (8), 1358–1365.
- Poggi, M., Bastelica, D., Gual, P., et al., 2007. C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50 (6), 1267–1276.
- Ruiz-Tovar, J., Oller, I., Galindo, I., Llaveró, C., Arroyo, A., Calero, A., Diez, M., Zubiaga, L., Calpena, R., 2013. Change in levels of C-reactive protein (CRP) and serum cortisol in morbidly obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Obes. Surg.* 23 (6), 764–769.
- Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., Flier, J.S., 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116 (11), 3015–3025.
- Sirbu, A., Copăescu, C., Martin, S., Barbu, C., Olaru, R., Fica, S., 2012. Six months results of laparoscopic sleeve gastrectomy in treatment of obesity and its metabolic complications. *Chirurgia (Bucur.)* 107 (4), 469–475.
- Sjöström, L., 2008. Dec Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study. *Int. J. Obes. (Lond.) Rev.* 32 (7), S93–S97.
- Song, M.J., Kim, K.H., Yoon, J.M., Kim, J.B., 2006. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (3), 739–745.
- Turner, J.J., Foxwell, K.M., Kanji, R., Brenner, C., Wood, S., Foxwell, B.M., Feldmann, M., 2010. Investigation of nuclear factor- κ B inhibitors and interleukin-10 as regulators of inflammatory signalling in human adipocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 162 (3), 487–493.
- Verschuren, W.J., Kooistra, T., Teake, B., Bernhagen, J., Voshol, P., Peter, J., Margriet Ouwens, D., van Erk, M., van Erp, M., Vries-van, Jitske, der Weij, Lin, Hajo Leng, J., van Bockel, K., van Dijk, Willems, Fingerle-Rowson, Günter, Bucala, Rick, Kleemann, Robert, 2010. MIF-deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance and associated atherosclerotic disease. *Circ. Res.* 105 (1), 99–107.
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112 (12), 1785–1788.
- Wu, H., Chosh, S., Perrard, X.D., Feng, L., Garcia, G.E., Perrard, J.L., Sweeney, J.F., Peterson, L.E., Chan, L., Smith, C.W., Ballantyne, C.M., 2007. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 115 (8), 1029–1038.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112 (12), 1821–1830.
- Yehuda-Shnaidman, E., Schwartz, B., 2012. Mechanisms linking obesity, inflammation and altered metabolism to colon carcinogenesis. *Obes. Rev.* 13 (12), 1083–1095.
- Zernecke, A., Bernhagen, J., Weber, C., 2008. Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation* 117, 1594–1602.

subjects relative to control group at baseline that persisted throughout the whole study period. These findings indicate an ongoing activation of the TLR stresspathway in PM.

Another factor possibly contributing to persistent proinflammatory state after LSG might be the macrophage inhibitory factor – MIF. MIF is a widely expressed pro-inflammatory cytokine that contributes to the development of a wide spectrum of inflammatory disorders (Zernecke et al., 2008; Lue et al., 2002; Baugh and Bucala, 2002). Its deficiency has been previously shown to reduce macrophage infiltration into white adipose tissue and to lower both tissue-specific and systemic chronic inflammation (Verschuren et al., 2010). Conversely, its sustainably up-regulated expression as seen in our study subjects might by one of the mechanism responsible for maintaining PM in a predominantly proinflammatory state after LSG.

In conclusion, we have demonstrated that both subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients exert a strong chemoattracting and proinflammatory profile with complementary orchestrated expression of chemotactic factors and their corresponding receptors. LSG significantly improved metabolic control and reduced systemic low-grade inflammation of obese patients. These effects were in concert with improved expression profile of chemokines, chemokine receptors and proinflammatory acting cytokines in SCAT, but not in PM. Whether the persistent proinflammatory and chemotactic profile in PM after LSG plays a driving role in the persistence/re-manifestation of metabolic complications of obese patients after surgery or is just a marker of all over insulin resistance remains to be determined in further studies.

Disclosure summary

The authors have nothing to declare.

Acknowledgments

This work was supported by RVO-VFN64165, SVV264503, IGA-NT13299, IGA-NT13046-4/2012 and project reg.no. CZ.2.16/3.1.00/24012 from OP Prague Competitiveness.

References

- Baugh, J.A., Bucala, R., 2002. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit. Care Med.* 30, S27–S35.
- Bennett, J.M.H., Mehta, S., Rhodes, M., 2007. Surgery for morbid obesity. *Postgraduate Med. J.* 83 (975), 8–15.
- Cancello, R., Henegar, C., Viguier, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.L., Bouloumié, A., Barbatelli, G., Cinti, S., Svensson, P.A., Barsh, G.S., Zucker, J.D., Basdevant, A., Langin, D., Clément, K., 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54 (8), 2277–2286.
- Curat, C.A., 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 (5), 1285–1292.
- Dahlman, I., Linder, K., Arvidsson Nordström, E., Andersson, I., Lidén, J., Verdich, C., Sørensen, T.I., Amer, P., 2005. Changes in adipose tissue gene expression with energy-restricted diets in obese women. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (6), 1275–1285. Erratum in: *Am. J. Clin. Nutr.* 2005 Sep 82(3), 709.
- Dasu, M.R., Jialal, I., 2011. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. *Am. J. Physiol.* 300 (1), E145–E154.
- Dogan, M., Tugmen, C., Kebapci, E., Karaman, K., Ozturk, S., Olmez, M., Karaca, C., Bademkiran, E., Gorgun, M., Aydin, C., 2012. Effective weight control and

- normalization of metabolic parameters after laparoscopic sleeve gastrectomy: a single center experience. *Hepatogastroenterology* 60 (122).
- Dolinková, M., Dostálová, I., Lacinová, Z., Michálek, D., Haluzíková, D., Mráz, M., Kasalický, M., Haluzík, M., 2008. The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol. Cell. Endocrinol.* 291 (1–2), 63–70.
- Hirabara, S.M., Gorjão, R., Vinolo, M.A., Rodrigues, A.C., Nachbar, R.T., Curi, R., 2012. Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions. *J. Biomed. Biotechnol.* 379024.
- Huber, J., Kiefer, F.W., Zeyda, M., Ludvik, B., Silberhumer, G.R., Prager, G., Zlabinger, G.J., Stulnig, T.M., 2008. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (8), 3215–3221.
- Ikramuddin, S., Buchwald, H., 2011. How bariatric and metabolic operations control metabolic syndrome. *Br. J. Surg.* 98 (10), 1339–1341.
- Kim, S.C., Ghanem, A., Stapel, H., et al., 2007. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but nogain in function. *BMC Physiol.* 7, article 5.
- Klipper-Aurbach, Y., Wasserman, M., Braunsiegel-Weintrob, N., Borstein, D., Peleg, S., Assa, S., Karp, M., Benjamini, Y., Hochberg, Y., Laron, Z., 1995. Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Med. Hypotheses* 45 (5), 486–490.
- Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., Bernhagen, J., 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.* 4, 449–460.
- Mráz, M., Lacinová, Z., Drapalová, J., Haluzíková, D., Horinek, A., Matoulek, M., Trachta, P., Kavalková, P., Svacina, S., Haluzík, M., 2011. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (4), E606–E613.
- Noria, S.F., Grantcharov, T., 2013. Biological effects of bariatric surgery on obesity-related comorbidities. *Can. J. Surg.* 56 (1), 47–57.
- O'Brien, P.E., 2010. Bariatric surgery: mechanisms, indications and outcomes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25 (8), 1358–1365.
- Poggi, M., Bastelica, D., Gual, P., et al., 2007. C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50 (6), 1267–1276.
- Ruiz-Tovar, J., Oller, I., Galindo, I., Llaveró, C., Arroyo, A., Calero, A., Diez, M., Zubiaga, L., Calpena, R., 2013. Change in levels of C-reactive protein (CRP) and serum cortisol in morbidly obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Obes. Surg.* 23 (6), 764–769.
- Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., Flier, J.S., 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116 (11), 3015–3025.
- Sirbu, A., Copăescu, C., Martin, S., Barbu, C., Olaru, R., Fica, S., 2012. Six months results of laparoscopic sleeve gastrectomy in treatment of obesity and its metabolic complications. *Chirurgia (Bucur.)* 107 (4), 469–475.
- Sjöström, L., 2008. Dec Bariatric surgery and reduction in morbidity and mortality: experiences from the SOS study. *Int. J. Obes. (Lond.) Rev.* 32 (7), S93–S97.
- Song, M.J., Kim, K.H., Yoon, J.M., Kim, J.B., 2006. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (3), 739–745.
- Turner, J.J., Foxwell, K.M., Kanji, R., Brenner, C., Wood, S., Foxwell, B.M., Feldmann, M., 2010. Investigation of nuclear factor- κ B inhibitors and interleukin-10 as regulators of inflammatory signalling in human adipocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 162 (3), 487–493.
- Verschuren, W.J., Kooistra, T., Teake, B., Bernhagen, J., Voshol, P., Margriet Ouwens, D., van Erk, M., van Vries, J., Jitske, der Weij, L., Hajo Leng, J., van Bockel, K., van Dijk, Willems, Fingerle-Rowson, Günter, Bucala, Rick, Kleemann, Robert, 2010. MIF-deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance and associated atherosclerotic disease. *Circ. Res.* 105 (1), 99–107.
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112 (12), 1785–1788.
- Wu, H., Ghosh, S., Perrard, X.D., Feng, L., Garcia, G.E., Perrard, J.L., Sweeney, J.F., Peterson, L.E., Chan, L., Smith, C.W., Ballantyne, C.M., 2007. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 115 (8), 1029–1038.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112 (12), 1821–1830.
- Yehuda-Shnaidman, E., Schwartz, B., 2012. Mechanisms linking obesity, inflammation and altered metabolism to colon carcinogenesis. *Obes. Rev.* 13 (12), 1083–1095.
- Zernecke, A., Bernhagen, J., Weber, C., 2008. Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation* 117, 1594–1602.

Three Months of Regular Aerobic Exercise in Patients With Obesity Improve Systemic Subclinical Inflammation Without Major Influence on Blood Pressure and Endocrine Production of Subcutaneous Fat

P. TRACHTA¹, J. DRÁPALOVÁ¹, P. KAVÁLKOVÁ¹, V. TOUŠKOVÁ¹, A. CINKAŽLOVÁ¹, Z. LACINOVÁ¹, M. MATOULEK¹, T. ZELINKA¹, J. WIDIMSKÝ Jr.¹, M. MRÁZ¹, M. HALUZÍK¹

¹Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

Received March 20, 2014

Accepted March 26, 2014

Summary

The aim of our study was to explore the effects of regular aerobic exercise on anthropometric, biochemical and hormonal parameters and mRNA expression of selected factors involved in metabolic regulations in subcutaneous adipose tissue of patients with obesity. Fifteen obese women with arterial hypertension underwent a three-month exercise program consisting of 30 min of aerobic exercise 3 times a week. Fifteen healthy lean women with no intervention served as a control group. Obese group underwent anthropometric measurements, blood sampling, subcutaneous adipose tissue (SCAT) biopsy and 24-h blood pressure monitoring at baseline and after three months of exercise, while control group was examined only once. At baseline, obese group had increased SCAT expression of proinflammatory cytokines and adipokines relative to control group. Three months of regular exercise improved anthropometric parameters, decreased CRP, blood glucose and HOMA-IR, while having no significant effect on lipid profile and blood pressure. Gene expressions in SCAT were not affected by physical activity with the exception of increased aquaporin-3 mRNA expression. We conclude that three months of regular exercise decrease systemic subclinical inflammation with only minor influence on the blood pressure and the endocrine function of subcutaneous fat.

Key words

Obesity • Physical activity • Adipose tissue • Proinflammatory factors

Corresponding author

M. Haluzik, Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, U Nemocnice 1, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Fax: + 420 224919780. E-mail: mhalu@lf1.cuni.cz

Introduction

The pathophysiology of various features of metabolic syndrome is complex and comprises multiple potential mechanisms including subclinical inflammation and disturbed endocrine function of adipose tissue (Ravussin and Smith 2002, Haffner 2003, Reaven *et al.* 2004). Adipose tissue, in particular the visceral fat, plays a pivotal role in this process by producing excessive amounts of proinflammatory and insulin resistance-inducing factors that contribute to the development of insulin resistance, arterial hypertension, subclinical inflammation and other pathologies clustered within metabolic syndrome (Mráz *et al.* 2011b, Trachta *et al.* 2014).

Adipose tissue of patients with obesity is characterized by increased infiltration by immunocompetent cells that, together with hypertrophic adipocytes, contribute to the proinflammatory milieu of obese fat (Xu *et al.* 2003, Neels and Olefsky 2006). Secreted factors include proinflammatory/prothrombotic cytokines that promote atherogenesis and contribute to the development of insulin resistance,

PHYSIOLOGICAL RESEARCH • ISSN 0862-8408 (print) • ISSN 1802-9973 (online)

© 2014 Institute of Physiology v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Fax +420 241 062 164, e-mail: physres@biomed.cas.cz, www.biomed.cas.cz/physiolres

arterial hypertension and atherosclerosis (Havel 2002, Mazurek *et al.* 2003). The endocrine production of adipose tissue and its anti/proinflammatory balance is regulated on multiple levels including its intensive interaction with circulating immunocompetent cells (Mraz *et al.* 2011a). Numerous epidemiological studies have shown that regular exercise is one of the most potent measures to protect against obesity, type 2 diabetes mellitus and long-term cardiovascular complications (Hu *et al.* 2004, Pi-Sunyer *et al.* 2007). While a single bout of acute exercise is accompanied by a short term proinflammatory response (Pedersen *et al.* 2001, Gleeson 2007), regular exercise evokes a long-term anti-inflammatory effect (Kasapis and Thompson 2005, Timmerman *et al.* 2008). While some of the mechanisms behind the beneficial effects of regular exercise have been deciphered (Dunkley *et al.* 2012), the role of modulation of endocrine function of adipose tissue in this process remains only partially clarified, with some studies showing improved endocrine profile of fat with regular exercise while others failing to do so (Stefanyk and Dyck 2010, Lakhdar *et al.* 2013).

We hypothesized that regular physical activity could improve systemic subclinical inflammation and other obesity-related pathologies through the modulation of inflammatory profile of adipose tissue. To this end, we explored the effect of three months of regular exercise on anthropometric, biochemical and hormonal parameters, blood pressure and mRNA expression of adipokines, chemokines, cytokines and other relevant factors in subcutaneous adipose tissue.

Methods

Study subjects

Fifteen non-diabetic obese female patients with arterial hypertension (age 48.5 ± 2.2 years, body mass index (BMI) 37.6 ± 0.9 kg/m²) were included in the study. The patients underwent a supervised three-month exercise program consisting of 30 min of aerobic exercise 3 times a week. The control group consisted of 15 healthy lean women (age 48.1 ± 1.8 years, BMI 23.7 ± 0.6 kg/m²).

Control subjects had no history of obesity and/or diabetes mellitus, arterial hypertension, or lipid metabolism disturbances and received no medication. Blood tests confirmed normal blood count, biochemical and hormonal parameters. In the obese group, 13 women were treated with antihypertensive medication, 2 had dyslipidemia treated with hypolipidemic agents, none of

the patients had type 2 diabetes.

Written informed consent was signed by all participants before being enrolled into the study. The study was approved by the Human Ethics Review Board, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic.

Anthropometric examination, biochemical and hormonal determination, blood pressure measurements and tissue sampling

The obese group was examined at baseline and after three months of regular exercise, while the control group was examined only once. All subjects were measured and weighed, and their body mass index (BMI) was calculated. Percentage of total body fat was assessed by bioimpedance analysis (Multi-frequency Bodystat QuadScan 4000, Douglas, UK). In the obese group casual blood pressure (BP) values were obtained in the sitting position using a sphygmomanometer (LCD 301, Spirit Medical Co., Taiwan) and 24-h ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) was performed using an oscillometric device (SpaceLabs 90207, SpaceLabs Medical, Redmond, WA, USA), which was set to measure the blood pressure every 20 min during the day (from 06:00 h to 22:00 h) and every 30 min during the night (from 22:00 h to 06:00 h). Casual blood pressure in the control group was measured only once at baseline. Blood samples for biochemical and hormonal measurements were withdrawn between 07:00 h and 08:00 h after 12 h of overnight fasting. Blood samples were separated by centrifugation for 10 min at $1000 \times g$ within 30 min from blood collection. Serum was subsequently stored in aliquots at -80 °C until further analysis.

Samples of the subcutaneous adipose tissue (abdominal area) were obtained by subcutaneous needle aspiration biopsy. Approximately 100 mg of adipose tissue was collected to 1 ml of RNA stabilization Reagent (RNAlater, Qiagen, Germany) and stored at -80 °C until further analysis.

Hormonal and biochemical assays

Serum concentrations of FABP-4, resistin, leptin and adiponectin were measured using a commercial ELISA kits (BioVendor, Modrice, Czech Republic) with a sensitivity of 0.1 ng/ml for FABP-4, 0.2 ng/ml for resistin, 0.12 ng/ml for leptin and 1.0 ng/ml for adiponectin. Serum C-reactive protein (CRP) levels were measured by high sensitive assay (Bender MedSystems,

Vienna, Austria) with a sensitivity of 3 pg/ml. Serum insulin concentrations were measured by commercial RIA kit (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France) with a sensitivity of 2.0 μ IU/ml. The intra- and inter-assay variabilities of all kits were less than 5 % and less than 10 %, respectively.

Biochemical parameters (HbA_{1c}, total LDL and HDL cholesterol, TAG, IA, glucose) were determined by standard laboratory methods in the Department of Biochemistry of General University Hospital, Prague.

Determination of mRNA expression

Samples of subcutaneous adipose tissue were homogenized on MagNA Lyser Instrument with MagNA Lyser Green beads (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Total RNA from homogenized tissue was extracted on MagNA Pure instrument using Magna Pure Compact RNA Isolation kit (tissue) (Roche Diagnostics GmbH, Germany). The RNA concentration was determined from absorbance at 260 nm on a NanoPhotometer (Implen, Munchen, Germany). Reverse transcription was performed using 0.25 μ g of total RNA to synthesize the first strand cDNA using the random primers as per the instructions of the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Gene expression of FABP-4, CD68, adiponectin and its receptors, resistin, angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin receptor type 1 (AGTR1) was performed on a 7500 Real-Time PCR System using TaqMan® gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Measurement of gene expression of other 44 genes was performed on ViiA7 Instrument using TaqMan Custom Array (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A mix of TaqMan® Universal PCR Master Mix II, NO AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), nuclease-free water (Fermentas Life Science, Lithuania) and specific TaqManGene expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used for reaction.

The increase in fluorescence was measured in real time and threshold cycle (Ct) values were obtained. To compensate for variations in RNA amount and efficiency of reverse transcription, beta-2-microglobulin and HPCAL1 were used as endogenous reference and results were normalized to the mean of these values. The formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to calculate relative gene expression.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results were expressed as means \pm SEM. Differences of gene expression, anthropometric, biochemical and hormonal parameters between obese and control group were evaluated using one-way ANOVA followed by Dunnett's Method as Multiple Comparison versus Control Group or Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks followed by Dunn's Method, as appropriate. Differences in parameters of obese group before and after three months of exercise were evaluated using paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test, as appropriate. The correlations between various parameters were estimated by Pearson product moment correlation test or Spearman rank order correlation test. Statistical significance was assigned to $P < 0.05$.

Results

Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of study subjects and its changes after three months of exercise

Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics of both study groups are summarized in Table 1. At baseline, obese group had significantly higher body weight, BMI, body fat percentage, waist and hip circumference, fasting blood glucose, serum triglycerides, CRP, IA, insulin, leptin, FABP-4 and HOMA index compared to control group. Serum adiponectin and HDL-cholesterol levels were significantly reduced in obese relative to control group.

Three months of regular exercise in obese group significantly reduced body weight, BMI, body fat percentage, waist and hip circumference, fasting blood glucose, CRP and HOMA index. Serum adiponectin, leptin, FABP-4 and insulin were not affected by exercise. Nor the casual or the 24-h blood pressure values were significantly affected by the three months of exercise (Table 2).

mRNA expression of adipokines and inflammation and insulin pathway-related genes in subcutaneous adipose tissue

The summary of mRNA expressions of adipokines and inflammation and insulin pathway-related genes in subcutaneous adipose tissue of control and obese group before and after three months of regular exercise is shown in Table 3.

Table 1. Anthropometric, biochemical and hormonal characteristics and blood pressure values of study subjects.

	Controls	OB (before PA)	OB (after PA)
Number (n)	15	15	15
Dyslipidemia	0	2	2
Diabetes mellitus	0	0	0
Arterial hypertension	0	15	15
Age (years)	48.1 ± 1.8	48.5 ± 2.2	48.5 ± 2.2
Body mass index (kg/m ²)	23.7 ± 0.6	37.6 ± 0.9 *	35.4 ± 0.8 * †
Body weight (kg)	67.5 ± 2.3	105.2 ± 3.2 *	99.2 ± 3.0 * †
Body fat (%)	29.0 ± 1.8	46.7 ± 1.5 *	42.6 ± 2.0 * †
Waist circumference (cm)	78.1 ± 2.2	108.4 ± 2.2*	104.3 ± 2.2* †
Hip circumference (cm)	96.0 ± 2.1	125.5 ± 2.2 *	119.3 ± 1.8 * †
Fasting blood glucose (mmol/l)	4.81 ± 0.09	5.72 ± 0.15*	5.32 ± 0.12* †
HbA _{1c} (% IFCC)	3.79 ± 0.08	4.13 ± 0.11	4.01 ± 0.09
Triglycerides (mmol/l)	0.96 ± 0.10	1.53 ± 0.17 *	1.44 ± 0.18 *
Cholesterol total (mmol/l)	5.17 ± 0.27	5.36 ± 0.31	5.45 ± 0.25
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.59 ± 0.07	1.34 ± 0.06 *	1.40 ± 0.06
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.15 ± 0.23	3.34 ± 0.28	3.41 ± 0.24
Atherogeneity index	2.31 ± 0.19	3.11 ± 0.25 *	2.99 ± 0.24
HOMA-IR index	3.35 ± 0.17	11.30 ± 1.28*	9.11 ± 0.99* †
Adiponectin (µg/ml)	12.1 ± 1.3	8.4 ± 1.3*	8.5 ± 1.2*
Insulin (mIU/l)	15.6 ± 0.7	44.1 ± 4.7*	38.0 ± 3.4*
FABP-4 (µg/ml)	25.3 ± 2.5	39.3 ± 3.9*	36.1 ± 3.6*
Leptin (ng/ml)	13.5 ± 2.0	47.8 ± 5.7*	40.4 ± 4.1*
hsCRP (ug/ml)	0.20 ± 0.06	0.81 ± 0.22*	0.56 ± 0.12* †

Values are mean ± SEM. Statistical significance is from One Way ANOVA vs. Control group and paired t-test or its non-parametric version vs. Obese after PA. *p<0.05 vs. control group; †p<0.05 vs. Obese before PA. PA – physical activity; HOMA-IR – homeostasis model assessment – insulin resistance; FABP – fatty acid-binding protein.

Table 2. Blood pressure values of the study subjects.

		Controls	OB (before PA)	OB (after PA)
Systolic blood pressure (mm Hg)	24 h	x	121.3 ± 3.5	119.2 ± 2.9
	Daytime	x	124.33 ± 4.1	122.2 ± 3.0
	Nighttime	x	113.1 ± 3.6	110.4 ± 3.2
	Casual		129.3 ± 3.2	132.3 ± 3.7
Diastolic blood pressure (mm Hg)	24 h	x	71.8 ± 3.0	72.1 ± 2.8
	Daytime	x	75.9 ± 3.4	74.7 ± 3.0
	Nighttime	x	66.4 ± 3.0	63.9 ± 2.5
	Casual		78.7 ± 1.1	86.9 ± 3.4
Heart rate (beats/min)	24 h	x	73.5 ± 1.9	72.4 ± 2.2
	Daytime	x	76.5 ± 2.4	74.1 ± 2.2
	Nighttime	x	65.7 ± 1.8	67.4 ± 2.5
	Casual		71.5 ± 2.0	76.8 ± 4.0

Values are mean ± SEM. Statistical significance is from One Way ANOVA vs. Control group and paired t-test or its non-parametric version vs. Obese after PA. *p<0.05 vs. control group.

Table 3. mRNA expression in SCAT of control group and obese patient with arterial hypertension before and after 3 months of physical activity.

Gene symbol	Gene name	Control (n = 15)	Obese (before PA) (n = 15)	Obese (after PA) (n = 15)
<i>Adipokines and hormones</i>				
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectin	1.026 ± 0.062	0.730 ± 0.082 *	0.734 ± 0.075 *
<i>ADIPOR1</i>	Adiponectin receptor 1	1.044 ± 0.086	0.864 ± 0.064	0.982 ± 0.118
<i>ADIPOR2</i>	Adiponectin receptor 2	1.041 ± 0.076	1.327 ± 0.129	1.212 ± 0.117
<i>ADM</i>	Adrenomedullin	1.066 ± 0.122	1.463 ± 0.099	1.645 ± 0.157 *
<i>ANGPT1</i>	Angiotensinogen 1	1.049 ± 0.086	2.051 ± 0.174 *	1.826 ± 0.199 *
<i>APLN</i>	Apelin	1.395 ± 0.262	3.312 ± 0.673 *	2.370 ± 0.272
<i>CIQTNF1</i>	Clq and tumor necrosis factor related protein 1	1.054 ± 0.093	1.217 ± 0.151	1.201 ± 0.112
<i>DPP4</i>	Dipeptidyl-peptidase 4	1.058 ± 0.092	1.045 ± 0.101	1.057 ± 0.113
<i>FABP-4</i>	Fatty acid binding protein 4	1.067 ± 0.114	1.154 ± 0.187	1.210 ± 0.220
<i>FAM132A</i>	Family with sequence similarity 132, member A	1.042 ± 0.080	1.227 ± 0.123	1.099 ± 0.129
<i>KDR</i>	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	1.039 ± 0.084	1.082 ± 0.080	0.996 ± 0.117
<i>LCN2</i>	Lipocalin 2	2.473 ± 0.851	0.955 ± 0.264	1.825 ± 1.178
<i>RARRES2</i>	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	1.056 ± 0.096	1.084 ± 0.082	0.904 ± 0.100
<i>RBP4</i>	Retinol binding protein 4, plasma	1.069 ± 0.107	1.189 ± 0.091	0.986 ± 0.135
<i>RETN</i>	Resistin	1.415 ± 0.320	1.685 ± 0.261	1.950 ± 0.733
<i>SAAI;SAA2</i>	Serum amyloid A1;serum amyloid A2	1.152 ± 0.162	1.477 ± 0.191	1.360 ± 0.148
<i>Aquaporines</i>				
<i>AQP1</i>	Aquaporin 1 (Colton blood group)	1.066 ± 0.103	1.321 ± 0.132	1.231 ± 0.131
<i>AQP3</i>	Aquaporin 3 (Gill blood group)	1.119 ± 0.137	1.472 ± 0.141	2.028 ± 0.202 *†
<i>AQP7</i>	Aquaporin 7	1.018 ± 0.051	0.945 ± 0.048	0.930 ± 0.090
<i>AQP9</i>	Aquaporin 9	1.912 ± 0.664	1.120 ± 0.169	2.246 ± 0.898
<i>Chemokines</i>				
<i>CCL2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	0.991 ± 0.106	2.567 ± 0.308 *	2.983 ± 0.347 *
<i>CCL3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3	1.881 ± 0.656	5.690 ± 0.978 *	4.633 ± 0.832 *
<i>CCL4</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 4	1.179 ± 0.172	2.257 ± 0.397 *	2.671 ± 0.499 *
<i>CCL5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	1.544 ± 0.419	1.208 ± 0.213	1.826 ± 0.467
<i>CCL17</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 1	1.835 ± 0.406	4.364 ± 0.806 *	4.389 ± 0.969 *
<i>CD68</i>	CD68 molecule	1.137 ± 0.153	2.419 ± 0.388 *	2.570 ± 0.454 *
<i>Cytokines</i>				
<i>IL1B</i>	Interleukin 1, beta	1.753 ± 0.539	0.880 ± 0.173	1.771 ± 0.667
<i>IL6</i>	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	1.154 ± 0.180	1.461 ± 0.253	1.783 ± 0.290
<i>IL10</i>	Interleukin 10	1.442 ± 0.415	4.243 ± 0.556 *	4.310 ± 0.494 *
<i>IL12A</i>	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	1.157 ± 0.178	1.414 ± 0.242	1.130 ± 0.224

<i>Insulin signaling pathway</i>				
<i>IGF1R</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor	1.051 ± 0.097	1.585 ± 0.142 *	1.388 ± 0.179
<i>IGF2R</i>	Insulin-like growth factor 2 receptor	1.043 ± 0.084	1.050 ± 0.073	1.222 ± 0.099
<i>INSR</i>	Insulin receptor	1.048 ± 0.095	0.974 ± 0.041	0.884 ± 0.071
<i>SHC1</i>	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	1.039 ± 0.078	1.514 ± 0.169	1.340 ± 0.142
<i>SHC3</i>	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3	1.299 ± 0.319	1.121 ± 0.206	1.174 ± 0.157
<i>SLC2A1</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	1.076 ± 0.113	0.981 ± 0.061	1.127 ± 0.121
<i>SLC2A3</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	1.105 ± 0.132	1.194 ± 0.080	1.324 ± 0.127
<i>Renin-angiotensin system</i>				
<i>ACE</i>	A-converting enzyme	1.039 ± 0.079	0.953 ± 0.051	0.931 ± 0.0342
<i>AGT</i>	Angiotensinogen	1.246 ± 0.217	0.837 ± 0.105	1.014 ± 0.126
<i>AGTR1</i>	Angiotensin receptor 1	1.075 ± 0.111	0.922 ± 0.063	0.976 ± 0.079
<i>Cell migration and other relevant genes</i>				
<i>CD40</i>	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	1.027 ± 0.066	1.293 ± 0.105	1.087 ± 0.090
<i>CD40LG</i>	CD40 ligand	1.589 ± 0.397	2.516 ± 0.312	3.400 ± 0.727 *
<i>NAMPT</i>	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	1.112 ± 0.167	0.895 ± 0.078	1.134 ± 0.129
<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	1.035 ± 0.072	1.579 ± 0.177 *	1.483 ± 0.134 *
<i>STAT5A</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A	1.033 ± 0.073	0.884 ± 0.071	0.832 ± 0.089
<i>VEGFC</i>	Vascular endothelial growth factor C	1.073 ± 0.112	1.355 ± 0.105	1.280 ± 0.151

Values are mean ± SEM. Statistical significance is from One Way ANOVA vs. Control group and paired t-test or its non-parametric version vs. Obese after PA. *p<0.05 vs. control group; *p<0.05 vs. Obese before PA. PA – physical activity.

At baseline, significant differences in mRNA expression were detected in 11 out of 53 studied genes in subcutaneous adipose tissue between obese and control group, respectively. mRNA expression in subcutaneous adipose tissue was undetectable in seven genes (SERPINA 12, IL-2, -3, -4, -12B, CCL-1, ITLN-1).

Increased expression of chemokines (CCL-2, -3, -4, -17), macrophage marker CD68, apelin, angiopoietin 1, IGF1R, CD-40-ligand, IL10 and STAT3 was found in subcutaneous fat of obese patients relative to control group, while mRNA expression of adiponectin in obese group was significantly decreased. mRNA expression of renin-angiotensin system-related genes did not differ between the groups.

The influence of physical activity on mRNA expression profile in obese patients with arterial hypertension

Three months of physical activity significantly

increased mRNA expression of aquaporin 3, while no other studied genes were significantly affected by the exercise program.

Discussion

The most important finding of this study is that three months of regular aerobic exercise significantly decreased body weight and body fat, systemic subclinical inflammation and insulin resistance without having a major effect on endocrine function of adipose tissue, blood pressure or circulating lipid levels. These findings indicate that endocrine production of subcutaneous adipose tissue was not a major player in the improvement of systemic subclinical inflammation and insulin resistance.

Obesity is typically characterized not only by excessive amount of adipose tissue with adipocyte

hypertrophy, but also by a marked alteration of its endocrine function and increased production of proinflammatory and insulin resistance-inducing factors (Blüher 2013). In our study, patients with obesity had markedly increased expression of chemotactic cytokines including CC chemokines 2, 3, 4 and 17 and macrophage marker CD68 compared to lean control subjects. This finding suggests increased proinflammatory milieu of adipose tissue in obese patients and higher infiltration of their adipose tissue with proinflammatory macrophages, which is in agreement with previously published data (Dahlman *et al.* 2005, Huber *et al.* 2008). Interestingly, obese patients had also increased mRNA expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 – one of the phenotypic markers of anti-inflammatory M2 macrophages (Turner *et al.* 2010), suggesting a complex influence of obesity on the adipose tissue immunocompetent cell content. Our data thus indicate the existence of a strong proinflammatory and chemoattractant state of subcutaneous adipose tissue for macrophages and other immunocompetent cells in obese non-diabetic patients with arterial hypertension.

Another interesting and possibly slightly surprising finding of our study is the observation that three months of regular exercise did not significantly change the expression of any up-regulated chemokines in SCAT. This data indicate a persistent proinflammatory and chemotactic profile in SCAT after the regular exercise intervention. The lack of effect of three months of regular physical activity on the inflammatory status of subcutaneous fat combined with improved systemic subclinical inflammation may have several explanations. Firstly, it has been demonstrated that subcutaneous adipose tissue, albeit comprising the largest fat depot, is not the most active player within different fat depots with respect to systemic metabolic effects (Blüher 2012). Both experimental and clinical studies have shown that the primary place of subclinical inflammation in patients with obesity both with or without type 2 diabetes mellitus is the visceral adipose tissue (Curat *et al.* 2006, Despres 2007). Although human studies did not, in contrast to experimental results, convincingly show that visceral fat is more proinflammatory than subcutaneous fat, they have clearly demonstrated that early body weight loss either by diet or exercise is mostly due to the decrease in visceral rather than subcutaneous fat (Imbeault *et al.* 1999, Dolinkova *et al.* 2008). In our study, significant loss of visceral fat was documented by a reduction of waist circumference suggesting that changes of endocrine

function of adipose tissue could have been more pronounced in visceral than in subcutaneous fat. On the other hand, as we did not detect any major changes in the circulating levels of the most important systemic adipokines after the three-month exercise intervention, it is conceivable that the overall significance of the changes in the endocrine function of adipose tissue could have had only minor impact on the improvement of systemic subclinical inflammation and insulin resistance.

Interestingly, the only significant change in mRNA expression in subcutaneous fat after three months of exercise in our study was an increase in aquaporin-3 gene suggesting its possible connection to regular exercise. Aquaporins are a family of small, hydrophobic, integral membrane proteins expressed in multiple tissues and involved in water and glycerol transport, cell migration, neural signaling and numerous other processes (Rodríguez *et al.* 2011). Aquaporin 3 is strongly expressed in the basal layer of keratinocytes contributing to water transport and hydration of subcutaneous tissues (Agre 2006). Recent data have suggested its involvement in the regulation of cell proliferation through the regulation of glycerol transport. It is tempting to speculate that increased mRNA expression of aquaporin 3 in the adipose tissue after physical activity could be connected to the changes of proliferative capacity of adipose tissue after regular exercise or to other exercise-related regulatory processes (Guo *et al.* 2013). Nevertheless, since this is the first report possibly linking aquaporin 3 to exercise-induced changes in adipose tissue, our finding certainly requires further investigation.

Previous studies have suggested that increased expression of crucial components of the renin-angiotensin-aldosterone system such as angiotensin-converting enzyme, angiotensinogen and angiotensin receptor 1 in adipose tissue may present another link between obesity and arterial hypertension (Engeli *et al.* 2003). In our study, all of the obese patients had arterial hypertension, yet we could not detect any significant differences in the mRNA expression of angiotensin-converting enzyme, angiotensinogen or angiotensin receptor 1 in their subcutaneous fat as compared to lean normotensive control subjects, nor any measurable effect of three months of regular exercise on these parameters. These findings are in line with the previous study by Giacchetti *et al.* who demonstrated increased angiotensinogen and angiotensin receptor 1 mRNA expression in visceral but not in subcutaneous fat of obese patients (Giacchetti *et al.* 2000). In our previous

study on cardiac surgery patients, we did not detect any difference in mRNA expression of renin-angiotensin-aldosterone components between epicardial and subcutaneous fat suggesting that their regulation might indeed be depot-specific (Roubicek *et al.* 2008). Collectively, these data do not support a connection between increased production of renin-angiotensin-aldosterone components in subcutaneous fat and the presence of obesity and arterial hypertension.

Most of the long-term studies focused on the effects of regular exercise on circulating lipid levels have shown increased HDL-cholesterol and decreased triglyceride concentrations with changes being dependent on the frequency and duration of exercise (Schellenberg *et al.* 2013). In our study, only non-significant tendency towards these improvement were detected. The lack of a detectable effect of exercise could have been due to the fact that its frequency was relatively low, i.e. three times a week, and that the overall duration of the exercise program was only three months, while it was usually six months or more in most of other studies (Schwingshackl *et al.* 2013). Along the same line, we did not see any significant changes in blood pressure after three months of exercise. The lack of changes in blood pressure is most likely explainable by the fact that antihypertensive medication of our patients has been appropriately adjusted (mostly lowered) based on the changes of blood pressure throughout the study period. These finding show

that, in contrast to changes in insulin sensitivity and systemic subclinical inflammation, longer duration of exercise or its higher frequency or intensity may be necessary to achieve significant improvements in blood pressure or circulating lipid levels.

In summary, our study has demonstrated that three months of regular exercise decreased systemic subclinical inflammation and improved insulin resistance with only minor influence on the endocrine function of subcutaneous fat and no significant effect on blood pressure and circulating lipid levels. These findings suggest that the changes of inflammatory status of subcutaneous fat probably did not contribute to positive metabolic and anti-inflammatory effects of regular exercise. An interesting and novel finding of increased aquaporin-3 mRNA expression in subcutaneous fat after the exercise program and its possible pathophysiological significance requires confirmation and clarification by further studies.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by RVO-VFN64165/2012, SVV260019/2014 (Specific University Research Program) and Internal Grant Agency of Ministry of Health of Czech Republic Grant No. 13299-4.

References

- AGRE P: The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc* **3**: 5-13, 2006.
- BLUHER M: Are there still healthy obese patients? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **19**: 341-346, 2012.
- BLUHER M: Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **27**: 163-177, 2013.
- CURAT CA, WEGNER V, SENGENES C, MIRANVILLE A, TONUS C, BUSSE R, BOULOUMIE A: Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* **49**: 744-747, 2006.
- DAHLMAN I, KAAMAN M, OLSSON T, TAN GD, BICKERTON AS, WAHLEN K, ANDERSSON J, NORDSTROM EA, BLOMQVIST L, SJOGREN A, FORSGREN M, ATTERSAND A, ARNER P: A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 5834-5840, 2005.
- DESPRES JP: Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat. *Crit Pathw Cardiol* **6**: 51-59, 2007.
- DOLINKOVA M, DOSTALOVA I, LACINOVA Z, MICHALSKY D, HALUZIKOVA D, MRAZ M, KASALICKY M, HALUZIK M: The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol Cell Endocrinol* **291**: 63-70, 2008.
- DUNKLEY AJ, CHARLES K, GRAY LJ, CAMOSSO-STEFINOVIC J, DAVIES MJ, KHUNTI K: Effectiveness of interventions for reducing diabetes and cardiovascular disease risk in people with metabolic syndrome: systematic review and mixed treatment comparison meta-analysis. *Diabetes Obes Metab* **14**: 616-625, 2012.

- ENGELI S, SCHLING P, GORZELNIAK K, BOSCHMANN M, JANKE J, AILHAUD G, TEBOUL M, MASSIERA F, SHARMA AM: The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol* **35**: 807-825, 2003.
- GIACCHETTI G, FALOIA E, SARDU C, CAMILLONI MA, MARINIELLO B, GATTI C, GARRAPA GG, GUERRIERI M, MANTERO F: Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24** (Suppl 2): S142-S143, 2000.
- GLEESON M: Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* (1985) **103**: 693-699, 2007.
- GUO L, CHEN H, LI Y, ZHOU Q, SUI Y: An aquaporin 3-notch1 axis in keratinocyte differentiation and inflammation. *PLoS One* **8**: e80179, 2013.
- HAFFNER SM: Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am J Cardiol* **92**: 18J-26J, 2003.
- HAVEL PJ: Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol* **13**: 51-59, 2002.
- HU FB, WILLET WC, LI T, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, MANSON JE: Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N Engl J Med* **351**: 2694-2703, 2004.
- HUBER J, KIEFER FW, ZEYDA M, LUDVIK B, SILBERHUMER GR, PRAGER G, ZLABINGER GJ, STULNIG TM: CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 3215-3221, 2008.
- IMBEAULT P, LEMIEUX S, PRUD'HOMME D, TREMBLAY A, NADEAU A, DESPRES JP, MAURIEGE P: Relationship of visceral adipose tissue to metabolic risk factors for coronary heart disease: is there a contribution of subcutaneous fat cell hypertrophy? *Metabolism* **48**: 355-362, 1999.
- KASAPIS C, THOMPSON PD: The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* **45**: 1563-1569, 2005.
- LAKHDAR N, BEN SAAD H, DENGUEZLI M, ZAOUALI M, ZBIDI A, TABKA Z, BOUASSIDA A: Effects of intense cycling training on plasma leptin and adiponectin and its relation to insulin resistance. *Neuro Endocrinol Lett* **34**: 229-235, 2013.
- MAZUREK T, ZHANG L, ZALEWSKI A, MANNION JD, DIEHL JT, ARAFAT H, SAROV-BLAT L, O'BRIEN S, KEIPER EA, JOHNSON AG, MARTIN J, GOLDSTEIN BJ, SHI Y: Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* **108**: 2460-2466, 2003.
- MRAZ M, LACINOVA Z, DRAPALOVA J, HALUZIKOVA D, HORINEK A, MATOULEK M, TRACHTA P, KAVALKOVA P, SVACINA S, HALUZIK M: The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **96**: E606-E613, 2011a.
- MRAZ M, LACINOVA Z, KAVALKOVA P, HALUZIKOVA D, TRACHTA P, DRAPALOVA J, HANUSOVA V, HALUZIK M: Serum concentrations of fibroblast growth factor 19 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of acute hyperinsulinemia, very-low calorie diet and PPAR-alpha agonist treatment. *Physiol Res* **60**: 627-636, 2011b.
- NEELS JG, OLEFSKY JM: Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* **116**: 33-35, 2006.
- PEDERSEN BK, STEENBERG A, FISCHER C, KELLER C, OSTROWSKI K, SCHJERLING P: Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6. *Exerc Immunol Rev* **7**: 18-31, 2001.
- PI-SUNYER X, BLACKBURN G, BRANCATI FL, BRAY GA, BRIGHT R, CLARK JM, CURTIS JM, ESPELAND MA, FOREYT JP, GRAVES K, HAFFNER SM, HARRISON B, HILL JO, HORTON ES, JAKICIC J, JEFFERY RW, JOHNSON KC, KAHN S, KELLEY DE, KITABCHI AE, KNOWLER WC, LEWIS CE, MASCHAK-CAREY BJ, MONTGOMERY B, NATHAN DM, PATRICIO J, PETERS A, REDMON JB, REEVES RS, RYAN DH, SAFFORD M, VAN DORSTEN B, WADDEN TA, WAGENKNECHT L, WESCHE-THOBABEN J, WING RR, YANOVSKI SZ: Reduction in weight and cardiovascular disease risk factors in individuals with type 2 diabetes: one-year results of the look AHEAD trial. *Diabetes Care* **30**: 1374-1383, 2007.
- RAVUSSIN E, SMITH SR: Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* **967**: 363-378, 2002.

- REAVEN G, ABBASI F, McLAUGHLIN T: Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Prog Horm Res* **59**: 207-223, 2004.
- RODRIGUEZ A, CATALAN V, GOMEZ-AMBROSI J, FRUHBECK G: Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control. *Cell Cycle* **10**: 1548-1556, 2011.
- ROUBICEK T, DOLINKOVA M, BLAHA J, HALUZIKOVA D, BOSANSKA L, MRAZ M, KREMEN J, HALUZIK M: Increased angiotensinogen production in epicardial adipose tissue during cardiac surgery: possible role in a postoperative insulin resistance. *Physiol Res* **57**: 911-917, 2008.
- SCHELLENBERG ES, DRYDEN DM, VANDERMEER B, HA C, KOROWNYK C: Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* **159**: 543-551, 2013.
- SCHWINGSHACKL L, DIAS S, STRASSER B, HOFFMANN G: Impact of different training modalities on anthropometric and metabolic characteristics in overweight/obese subjects: a systematic review and network meta-analysis. *PLoS One* **8**: e82853, 2013.
- STEFANYK LE, DYCK DJ: The interaction between adipokines, diet and exercise on muscle insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**: 255-259, 2010.
- TIMMERMAN KL, FLYNN MG, COEN PM, MARKOFSKI MM, PENCE BD: Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol* **84**: 1271-1278, 2008.
- TRACHTA P, DOSTALOVA I, HALUZIKOVA D, KASALICKY M, KAVALKOVA P, DRAPALOVA J, URBANOVA M, LACINOVA Z, MRAZ M, HALUZIK M: Laparoscopic sleeve gastrectomy ameliorates mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue but not in peripheral monocytes of obese patients. *Mol Cell Endocrinol* **383**: 96-102, 2014.
- TURNER JJ, FOXWELL KM, KANJI R, BRENNER C, WOOD S, FOXWELL BM, FELDMANN M: Investigation of nuclear factor-kappaB inhibitors and interleukin-10 as regulators of inflammatory signalling in human adipocytes. *Clin Exp Immunol* **162**: 487-493, 2010.
- XU H, BARNES GT, YANG Q, TAN G, YANG D, CHOU CJ, SOLE J, NICHOLS A, ROSS JS, TARTAGLIA LA, CHEN H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* **112**: 1821-1830, 2003.