

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Ústav histologie a embryologie



**Role makrofágů v tukové tkáni
patologicky obézních**

Dizertační práce

Mgr. Jaroslava Chyliková

Školitel: prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

Studijní obor: Anatomie, histologie a embryologie

Olomouc 2019

Palacky University in Olomouc
Faculty of Medicine and Dentistry
Department of Histology and Embryology



The role of macrophages in adipose tissue in pathologically obese patients

Dissertation Thesis

Mgr. Jaroslava Chyliková

Supervisor: prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

Field of study: Anatomy, histology and embryology

Olomouc 2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof. MUDr. Jiřího Ehrmanna, Ph.D. a za použití citované literatury. Jsem seznámena s tím, že tato dizertační práce je majetkem Univerzity Palackého v Olomouci (autorský zákon č. 121/2000 Sb., § 60 odst. 1) a bez jejího souhlasu nesmí být obsah práce použit v jiné publikaci. Souhlasím se zpřístupněním této práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci

.....

Mgr. Jaroslava Chyliková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala doc. MUDr. Vojtěchu Kamarádovi, DrSc. za ochotu, vstřícnost, odborné konzultace a mnohé cenné rady v průběhu studia. Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D. za odborné vedení dizertační práce. Poděkování si také zaslouží laborantky Ústavu histologie a embryologie LF UP za pečlivé zpracování histologických vzorků. Mé díky patří také mé rodině a především mým dětem za trpělivost a podporu během studia.

SOUHRN

Makrofágy jsou spojovány s chronickým zánětem, o kterém se předpokládá, že je základem změn probíhajících v bílé tukové tkáni obézních lidí. Důležitou roli ve vývoji zánětu hraje jak počet makrofágů, tak jejich funkční stav. Klasicky jsou makrofágy rozděleny do dvou podtypů: prozánětlivé (M1) a protizánětlivé (M2). M1 a M2 makrofágy vykonávají různé funkce produkcí pro- nebo protizánětlivých faktorů. S rozvojem metabolických změn a vznikem inzulínové rezistence je také spojována velikost adipocytů bílé tukové tkáně. Změna v jejich velikosti je považována za známku jejich dysfunkce. Jedním z následků zánětu v tukové tkáni, vyznačujících se infiltrací makrofágů a mnoha dalších imunitních buněk, je rozvoj fibrotických změn. Fibróza je charakteristickým znakem metabolicky dysfunkční tukové tkáně.

V práci je hodnocen poměr makrofágů M1 a M2 u obézních subjektů s diabetem a bez diabetu. Byla provedena analýza adipocytů v podkožní a viscerální tukové tkáni a vyhodnoceny změny jejich velikosti a srovnány s množstvím infiltrovaných makrofágů do tukové tkáně. Je zde rovněž srovnána stavba a rozsah intersticiální tkáně a bílé tukové tkáně u morbidně obézních žen s diabetem a bez diabetu se skupinou kontrol.

Do studie byli zařazeni pacienti, kteří podstoupili bariatrický zákrok pro morbidní obezitu. Skupina obsahovala 106 pacientů (mužů i žen) ve věku 21-66 let s BMI v rozmezí 30-58 s diabetem a bez diabetu. Tuková tkáň kontrol s fyziologickým BMI a bez diabetu byla získána během soudní pitvy. Vzorky tukové tkáně byly odebrány z podkožní tkáně v oblasti pupku a viscerální tuková tkáň z omenta. Tkáňové řezy byly nabarveny základním histologickým barvením hematoxylin-eosin. U vybraných řezů bylo použito barvení Weigert železitý hematoxylin-van Gieson a dvoustupňové nepřímé imunohistochemie s využitím protilátek CD68, CD204 a Bcl2.

CD68 pozitivní makrofágy a CD204 pozitivní makrofágy jsou přítomny jak v podkožní, tak i viscerální tukové tkáni. U morbidně obézních pacientů s diabetem je přítomnost CD68 pozitivních makrofágů výrazně vyšší ve viscerální tukové tkáni. Velikost adipocytů je u morbidně obézních významným markerem rozvoje inzulínové rezistence. Největší adipocyty byly nalezeny ve viscerální tkáni pacientů s diabetem 2. typu. Byla prokázána pozitivní korelace mezi velikostí adipocytů a stupněm infiltrace makrofágy, souvislost úrovně fibrotických změn s rozvojem inzulínové rezistence.

Na základě prezentovaných výsledků byla potvrzena významná role makrofágů tukové tkáně v rozvoji změn souvisejících s obezitou, zejména diabetu 2. typu.

Klíčová slova: obezita, makrofágy, imunohistochemie, diabetes 2. typu

SUMMARY

Macrophages are associated with chronic inflammation, which is expected to have major involvement in the changes of white adipose tissue in obese people. The important role is seen not only in number of macrophages but also in their functional status. The classification typically includes two subtypes of macrophages, proinflammatory (M1) and against inflammation (M2), each having various functions and producing different function related factors. The size of adipocyte also reflects the development of metabolic changes and insulin resistance and the cellular size changes are considered to be the signs of their dysfunction. One consequence of fatty tissue inflammation, when fatty tissue is infiltrated with macrophages and other immune system cells, can be fibrotic transformation. Fibrosis is a characteristic feature of metabolically dysfunctional adipose tissue.

This work analyzed the status of M1 macrophages compared to M2 macrophages in obese patients with and without diabetes. The adipocytes in subcutaneous and visceral fat were assessed and the evaluation included their size changes compared with the amount of infiltrating lymphocytes. In addition, the structure and extent of interstitial and white adipose tissue in morbidly obese women with and without diabetes, were compared to the control group.

The patients after a bariatric procedure for morbid obesity were included in this study. The group included 106 patients (men and women) in age range 21-66 years with BMI range 30-58, with and without diabetes. Fatty tissue samples in the control group with physiological BMI and without diabetes were received from forensic autopsies. The samples of fatty tissue were taken from abdominal subcutaneous tissue from the navel and from visceral omental fat and staining with standard hematoxylin-eosin was done. In selected slides Weigert ferric hematoxylin staining-Van Gieson and two-step indirect immunohistochemistry method with CD68, CD204 and Bcl2 applied.

CD68 and CD204 positive macrophages were found in subcutaneous tissue and also in visceral fat. In morbidly obese patients with diabetes, significantly more CD68 macrophages were found in visceral fat. The size of adipocytes in morbidly obese group is important marker of insulin resistance development. The biggest adipocytes were found in visceral fat in patients with diabetes type 2. It was shown that the positive correlation

exists between the size of adipocytes and the degree of infiltration by macrophages and also between the extent of fibrotic changes and development of insulin resistance

The presented results confirm the important role of fatty tissue macrophages in development of changes that are associated with obesity, especially with diabetes type 2.

Key words: obesity, macrophages, immunohistochemistry, diabetes type 2

OBSAH

1	ÚVOD	11
1.1	OBEZITA	12
1.1.1	Obezita, příčiny obezity	12
1.1.2	Prevalence obezity	12
1.1.3	Obezita jako rizikový faktor	14
1.2	TUKOVÁ TKÁŇ	15
1.2.1	Rozložení tukové tkáně	15
1.2.2	Charakteristika tukové tkáně	15
1.2.2.1	Bílá tuková tkáň	16
1.2.2.2	Hnědá tuková tkáň	18
1.2.2.3	Běžová tuková tkáň	19
1.3	FUNKCE TUKOVÉ TKÁNĚ	19
1.3.1	Adipogeneze a přeměna adipocytů v tukové tkáni	19
1.3.2	Lipogeneze a lipolýza	21
1.3.3	Endokrinní funkce	22
1.3.4	Tuková tkáň jako imunitní orgán	23
1.4	ROLE TUKOVÉ TKÁNĚ V PATOGENEZI OBEZITY A S NÍ SPOJENÝCH METABOLICKÝCH PORUCH	24
1.4.1	Hypertrofie a hyperplazie adipocytu při obezitě	24
1.4.2	Dysfunkce tukové tkáně v obezitě	25
1.4.2.1	Mechanický stres	26
1.4.2.2	Stres endoplazmatického retikula	26
1.4.2.3	Hypoxie tukové tkáně	27
1.4.2.4	Inzulínová rezistence a rozvoj diabetu 2. typu	27
1.5	ROLE DISTRIBUCE TUKU V PATOGENEZI OBEZITY	30
1.5.1	Subkutánní a viscerální tuková tkáň	30
1.5.2	Ektopická akumulace tuku	31
1.6	MAKROFÁGY TUKOVÉ TKÁNĚ	32
1.6.1	Infiltrace makrofágů do tukové tkáně	32
1.6.2	Původ makrofágů tukové tkáně	34
1.6.3	Polarizace makrofágů v tukové tkáni	35

1.6.4	Makrofágy tukové tkáně a obezita	37
1.6.5	Protektivní úloha makrofágů	37
2	CÍLE PRÁCE	38
3	MATERIÁL A METODY	39
3.1	Biologický materiál	39
3.2	Metody	42
3.3	Statistická analýza	44
3.4	Použité roztoky a chemikálie	44
4	VÝSLEDKY	45
4.1	Makrofágy v bílé tukové tkáni patologicky obézních	45
4.2	Polarizace M1/M2 makrofágů v bílé tukové tkáni patologicky obézních	47
4.3	Kvantitativní analýza počtu makrofágů	50
4.4	Velikosti adipocytů: srovnání podkožní a viscerální tukové tkáně	51
4.5	Vztah mezi velikostí adipocytů a výskytem makrofágů	55
4.6	Apoptóza adipocytů	56
4.7	Fibróza podkožní a viscerální bílé tukové tkáně	58
4.8	Srovnání metod odběru bílé tukové tkáně	61
5	DISKUZE	64
6	ZÁVĚR	70
7	SEZNAM ZKRATEK	71
8	POUŽITÁ LITERATURA	74
9	SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTACÍ	88

1 ÚVOD

Obezita je považována za jeden z nejvýznamnějších zdravotních problémů současnosti. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) v roce 2016 více než 1,9 miliónu dospělých (18-ti letých a starších) mělo nadváhu, z toho přes 650 miliónů bylo obézních. 41 miliónů dětí mladších 5ti let mělo nadváhu nebo obezitu a více než 340 miliónů dětí a dospívajících ve věku 5-19 let mělo nadváhu nebo obezitu. (WHO, 2016)

Obezita je metabolické onemocnění charakterizované nadměrným hromaděním tukové tkáně v důsledku nadměrného příjmu potravy a nevhodného životního stylu. Je spojena s řadou metabolických onemocnění, jako je diabetes mellitus typu 2, dyslipidémie, arteriální hypertenze a ateroskleróza.

Ještě před dvaceti lety byla tuková tkáň považována za zásobárnu energie, jako tepelný a mechanický izolátor. V současné době ji považujeme za vysoce aktivní orgán zapojený do metabolických, hormonálních a imunitních procesů. Tuková tkáň je složená z adipocytů, preadipocytů, fibroblastů, endoteliálních buněk, různých typů imunitních buněk a adipocyty vylučují celou řadu tzv. adipokinů, které se podílejí na regulaci energetického metabolismu, pocitu sytosti a mnoha dalších procesů (Boutens et Stienstra, 2016).

Tato dizertační práce je zaměřena na význam makrofágů v podkožní a viscerální tukové tkáni patologicky obézních. S obezitou je spojena akumulace prozánětlivých makrofágů v tukové tkáni. Stále však není jasné, do jaké míry tato akumulace přispívá k intoleranci glukózy a rezistenci na inzulín (Wernstedt et al., 2014). Pro pochopení molekulárních mechanismů, kterými se makrofágy tukové tkáně podílejí na rozvoji různých onemocnění, je zapotřebí jejich další studium, které by případně otevřelo dveře pro objev nových léčebných postupů.

1.1 OBEZITA

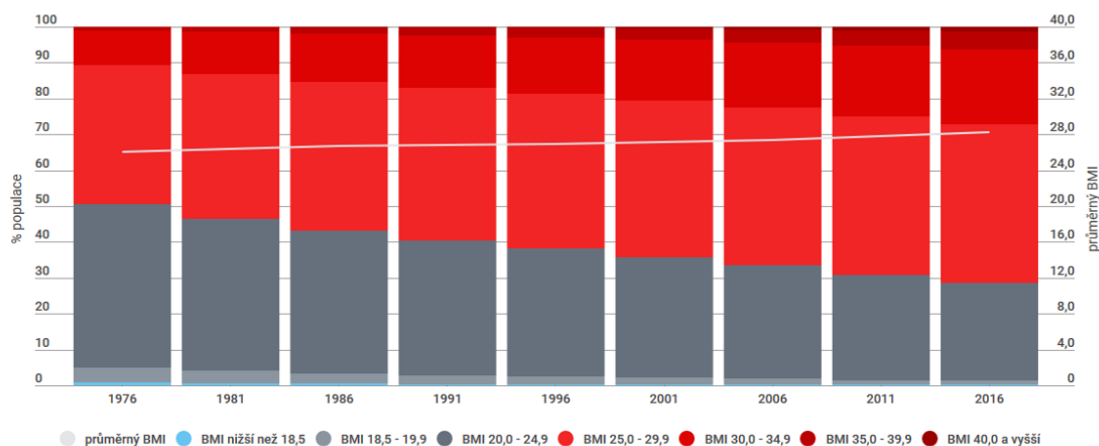
1.1.1 OBEZITA, PŘÍČINY OBEZITY

Obezita je definována jako zvýšené zastoupení tukové tkáně v organismu. Obvykle se hodnotí pomocí indexu tělesné hmotnosti (BMI – body mass index). Vypočítá se vydělením hmotnosti člověka v kilogramech druhou mocninou jeho výšky v metrech. Na základě hodnot BMI rozlišujeme následující kategorie: podváha s BMI pod 18,5, normální hmotnost s BMI mezi 18,5-25, nadváha s BMI 25-30, obezita I. stupně s BMI 30-35, obezita II. stupně s BMI 35-40 a morbidní obezita s BMI nad 40. Index BMI byl přijat jako běžná metoda kategorizace tělesné hmotnosti, protože je to praktická, neinvazivní a finančně nenákladná metoda. Existují však další, přesnější způsoby: posouzení obezity přímým měřením množství a distribuce tukové tkáně, stanovení obvodu pasu, poměru obvodu pasu k obvodu boků, nebo kostní denzitometrie (DXA) (Chan et al. 2003).

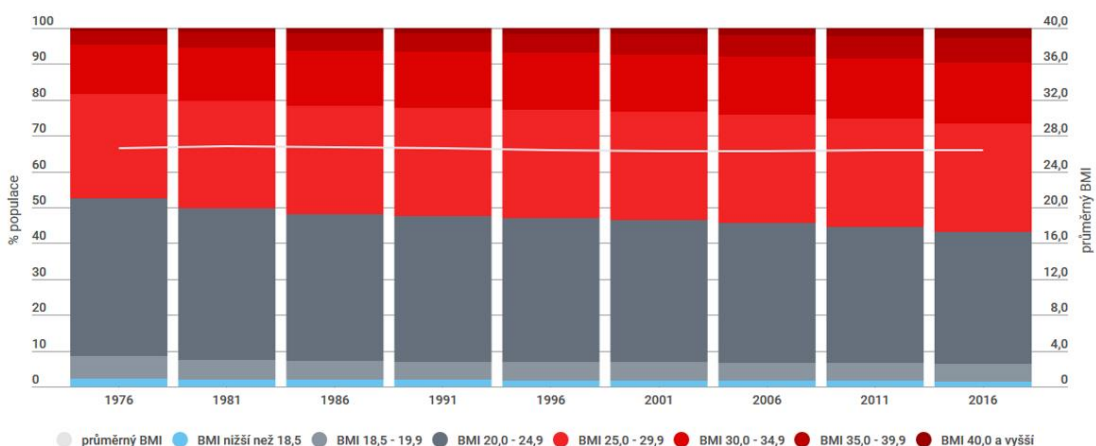
Rapidní nárůst výskytu obezity je způsoben změnou faktorů životního stylu; především stravovacími návyky a nedostatkem pohybu. Mezi další faktory patří genetické vlivy, nedostatek spánku, psychosociální stres, virové a bakteriální infekce, zvýšená porodní váha (Blundell et al., 2015).

1.1.2 PREVALENCE OBEZITY

Historicky můžeme říci, že obezita byla až do minulého století neduhem bohatých, byla známkou určitého společenského postavení, sociální nadřazenosti, znakem bohatství, úspěšnosti a blahobytu. V západních společnostech v 20. a 21. století se však obezita častěji objevuje u lidí s nižším socioekonomickým postavením. Za posledních 20 let se výskyt obezity výrazně zvýšil. Trend nárůstu obezity již byl však zaznamenán od 50. let minulého století (Caballero, 2007; Awad et Bradford, 2010). V České republice trpí nadváhou či dokonce obezitou 71% mužů a skoro 57% žen (Česko v datech, 2016). Dle WHO byla v České republice v roce 2016 prevalence obezity u dospělé populace 26% (WHO, 2016).



Obr. 1. Průměrný BMI a procento obyvatel podle BMI v české populaci – muži (převzato Česko v datech, 2016)



Obr. 2. Průměrný BMI a procento obyvatel podle BMI v české populaci – ženy (převzato Česko v datech, 2016)

S obezitou u dospělých došlo také ke zvýšení výskytu obezity u dětí a adolescentů. V České republice má nadváhu 27,5% dětí ve věku 5-19 let a obezitou trpí přibližně 10% dětí ve věku 5-19 let, celosvětově má nadváhu a obezitu 18% dětí ve věku 5-19 let (WHO, 2016). Ukazuje se, že vyšší než normální hodnoty BMI, především u mladších pod 30 let, mohou snížit očekávanou délku života až o 20 let.

Kromě toho děti s nadváhou a obezitou mají vyšší pravděpodobnost výskytu nadváhy a obezity v dospělosti, a jsou tedy vystaveny zvýšenému riziku onemocnění souvisejících s obezitou.

Dítě narozené matce s nadváhou či obezitou, má zvýšené riziko výskytu dětské obezity, zvýšené množství tuku při narození a vyšší porodní váhu; a je vystaveno vyššímu riziku obezity, metabolického syndromu a diabetu v dospělosti. Vzhledem k uvedeným skutečnostem je vhodné začít s intervencemi týkajícími se životního stylu u žen v plodném věku, jako jeden ze zásadních postupů boje proti nárůstu obezity (Fontaine et al., 2003; Rowlands et al., 2009).

1.1.3 OBEZITA JAKO RIZIKOVÝ FAKTOR

Nadváha a obezita je spojena s různými patologickými stavy. Metabolický syndrom, inzulínová rezistence, diabetes 2. typu, hypertenze, hyperlipidémie, ateroskleróza a kardiovaskulární nemoci jsou z nich nejzávažnější. Metabolický syndrom je soubor rizikových faktorů zahrnující centrální neboli abdominální obezitu, zvýšenou hladinu triglyceridů, snížení HDL cholesterolu, zvýšenou hladinu VLDL cholesterolu, zvýšený krevní tlak a zvýšenou hladinu glukózy na lačno. Pacienti s tímto syndromem mají zvýšené riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění anebo diabetu 2. typu. Obézní jedinci vykazují poruchu endoteliální funkce krevních cév, která spojuje obezitu s rozvojem aterosklerózy. Obezita vede k chronickému systémovému a lokálnímu zánětu nízkého stupně. Mrtvice, městnavé srdeční selhání, plicní embolie, astma, onemocnění žlučníku a dna jsou častější u obézních než u štíhlých jedinců. Navíc obezita zvyšuje riziko karcinomu prsu, vaječníků, endometria, kolorektálního karcinomu, jícnu, ledvin, pankreatu a prostaty (WHO, 2018). Nadměrné zvýšení hmotnosti může také vést k dalším zdravotním problémům, jako je obstrukční spánková apnoe, chronická bolest a osteoartróza. Psychosociální problémy, zvýšená pravděpodobnost deprese a poruchy příjmu potravy mohou snížit kvalitu života při obezitě. Mnoho z těchto faktorů je spojeno se sníženou délkou života nebo předčasným úmrtím. Alarmující je, že nejvyšší míra úmrtnosti související s obezitou je u osob mladších 30ti let (Pais et al., 2009; Moayyedi, 2008).

1.2 TUKOVÁ TKÁŇ

Tuková tkáň je jedním z typů vazivové tkáně, ve které jsou nejvíce zastoupeny tukové buňky (adipocyty).

Příjem lipidů adipocyty a jejich ukládání ve formě triglyceridů umožňuje expanzi tukové tkáně a je adaptivní odpovědí a chrání tak jiné tkáně před nadbytkem lipidů. Při obezitě dochází k nadměrnému ukládání tuku v bílé tukové tkáni. Kromě jejich úlohy při nakládání s živinami a v metabolismu, jsou adipocyty vysoce aktivní sekreční buňky produkující hormony, adipokiny a chemokiny, které hrají roli v imunitě, zánětu, vaskulárním růstu a remodelaci matrix (Greenberg et Obin, 2006; Sun et al., 2011).

1.2.1 ROZLOŽENÍ TUKOVÉ TKÁNĚ

Bílá tuková tkáň je rozdělena do fyziologických úložišť, zejména jako subkutánní a viscerální tuková tkáň (omentální, mezenterická, retroperitoneální a gonadální), nebo se vyskytuje v lokalizacích označovaných jako tuk ektopický (intrahepatický, intramuskulární, intrapancreatický a perikardiální). Podkožní tuková tkáň tvoří největší část tělesného tuku, celkově je asi 4-5krát objemnější než viscerální tuková tkáň. Podkožní tuková tkáň uchovává přibližně 80-90% celkového tělesného tuku, hlavně v oblasti břišní (kolem pasu), subskapulární (na horní části zad), gluteální a femorální. Menší část tělesného tuku (10 až 20% v závislosti na pohlaví a jednotlivci) se nachází v břišní dutině (Wajchenberg, 2000; Frühbeck, 2008).

1.2.2 CHARAKTERISTIKA TUKOVÉ TKÁNĚ

Rozlišujeme tři typy tukové tkáně, které se liší svou stavbou a funkcí: bílá tuková tkáň, jež ukládá přebytečnou energii ve formě triglyceridů a je významným endokrinním orgánem, hnědá tuková tkáň, která je specializována na přeměnu energie a její uvolnění ve formě tepla. A béžová tuková tkáň, která energii neukládá, ale spaluje (Ross, 2011; Sepa-Kishi et Ceddia, 2018).

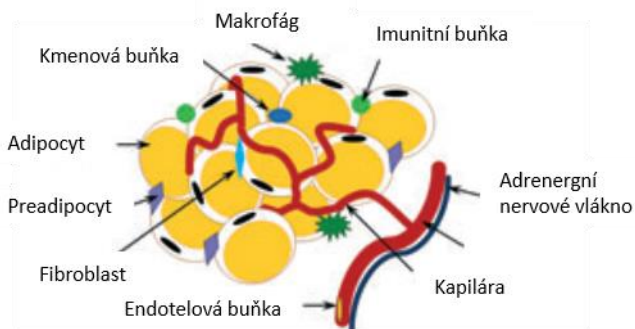
1.2.2.1 Bílá tuková tkáň

Bílá tuková tkáň představuje přibližně 10 až 20% celkové tělesné hmotnosti u štíhlých dospělých jedinců, avšak u obézních osob může dosáhnout více než 50 nebo dokonce až 70%. Přibližně 75% hmotnosti tukové tkáně sestává z lipidů (Baker, 1969).

V bílé tukové tkáni jsou přítomny hlavně bílé adipocyty, sférické buňky, zvané též univakuolární, s velkou variabilitou velikosti (25-200 μ m), obsahující jednu lipidovou kapénku obklopenou tenkým lemem cytoplazmy. Adipocyty jsou obklopeny bohatě vaskularizovanou řídkou pojivovou tkání. Vnější obal adipocytu se skládá ze sítě kolagenních vláken typu 1 a retikulárních vláken, které slouží k ochraně buňky před mechanickým poškozením. Každá buňka vytváří bazální laminu typického složení. Adipocyty a další buněčné populace přítomné v bílé tukové tkáni syntetizují kolageny typu 1, 3 a 4 a také kolagen typu 6A1, který může interagovat s kolagenem typu 4 a umožnit tak fixaci bazální laminy na tukovou buňku. Opora zajištěná bazálními laminami adipocytů a množstvím proteinů a proteoglykanů v extracelulární matrix (např. fibronectin, decorin, tenascin C, osteonectin, osteopontin) zmírňují vliv vnějších sil a zajišťují tak strukturální a funkční integritu tukové tkáně.

Další složkou bílé tukové tkáně je stromální vaskulární frakce zahrnující multipotentní kmenové buňky, preadipocyty, fibroblasty, pericyty a endotelové buňky krevních a lymfatických cév, makrofágy a další imunitní buňky (Divoux et Clément, 2011).

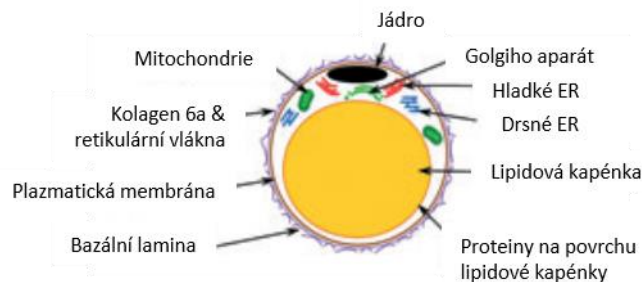
Hustá kapilární síť v tukové tkáni zajišťuje dostatečné zásobování živinami a kyslíkem a také představuje cestu pro distribuci hormonů, cytokinů a dalších biologicky aktivních látek. Bílá tuková tkáň je inervována sympatickým nervovým systémem nervovými vlákny, doprovázejícími arterie a arterioly. Noradrenalin iniciuje řadu metabolických kroků, které vedou k aktivaci lipázy, enzymu, jež štěpí triacylglyceroly, které tvoří více než 90% lipidů uložených v adipocytech. Sympatický nervový systém je v bílé tukové tkáni také klíčovým regulátorem produkce leptinu a dalších adipokinů. U obezity se snižuje citlivost tukové tkáně k sympatiku a toto může být základem dysregulace produkce leptinu a dalších sekretorických funkcí tukové tkáně (Wronska et Kmiec, 2012; Rayner, 2001).



Obr. 3. Typy buněk v bílé tukové tkáni (upraveno podle Wronska et Kmiec, 2012)

Adipocyty bílé tukové tkáně obsahují jednu velkou tukovou vakuolu (univakuolární). Tuková kapénka je uložena centrálně a zaujímá většinu objemu buňky. Je obklopena monomolekulovou fosfolipidovou vrstvou zesílenou sítí intermediálních filament (vimentin), bílkovinou perilipinem a proteiny indukující buněčnou smrt (CIDE proteiny). Nově syntetizované lipidy tvoří zpočátku malé kapičky na periferii cytoplazmy, jsou transportovány po mikrotubulech a nakonec se spojí v centrální tukovou kapénku. Adipocyty také mají aktinovou kortikální síť. Aktinová i mikrotubulární síť hrají důležitou úlohu v redistribuci glukózového transportéru typu 4 (GLUT4) závislém na inzulínu. Zatímco mikrotubuly zprostředkovávají subcelulární distribuci vesikul GLUT4, stimulace inzulínem vede k dynamické remodelaci aktinových kortikálních sítí. Vezikuly podstoupí translokaci, propojení, dokování a fúzi s plazmatickou membránou. (Verstraeten et al., 2011)

Jádro je oploštělé uloženo periferně při okraji buňky. V oblasti jádra je větší množství cytoplazmy obsahující Golgiho aparát, hladké a drsné endoplazmatické retikulum, volné ribozomy a velké protáhlé mitochondrie. Množství mitochondrií v tukové buňce se liší podle lokalizace tukové tkáně. Na povrchu adipocytu je glykokalyx. Plazmatická membrána obsahuje mnoho typů receptorů pro hormony, neurotransmitery (hlavně noradrenalin), cytokiny a další signální molekuly. Adipocyty exprimují také Toll-like receptory (Wronska et Kmiec, 2012).



Obr. 4. Struktura univakuolárního adipocytu (upraveno podle Wronska et Kmiec, 2012)

1.2.2.2 Hnědá tuková tkáň

Tukové buňky hnědé, multivakuolární tukové tkáně jsou menší (10-25 μ m) než buňky bílé tukové tkáně. Jádru je uloženo v buňce excentricky, v cytoplazmě jsou početné lipidové kapénky různé velikosti. Multivakuolární adipocyt obsahuje četné mitochondrie, které jsou velké, sférické, s laminárními kristami, malý Golgiho komplex a malé množství granulárního a hladkého endoplazmatického retikula. Mitochondrie obsahují velké množství pigmentu cytochromu, který dodává buňkám hnědavé zbarvení.

Hnědá tuková tkáň je rozdělena na lalůčky prostřednictvím řídké pojivové tkáně. Má bohaté krevní zásobení kapilárami, které zvyšují zbarvení tkáně. Mezi tukovými buňkami jsou četná nemyelinizovaná nervová vlákna (Ross, 2011).

Metabolická aktivita hnědé tukové tkáně je regulována noradrenalinem uvolněným ze sympatických nervových zakončení, který stimuluje lipólýzu a hydrolýzu triglyceridů a rovněž zvyšuje expresi a aktivitu molekul UCP-1 (odpřahující protein 1) v mitochondriích (Saely, 2012). Protein UCP1 umožňuje rozptylovat protonový elektrochemický gradient generovaný dýcháním ve formě tepla. Hnědá tuková tkáň tak hraje klíčovou roli v netřesové termogenezi. Hnědá tuková tkáň se vyskytuje hlavně u malých a hibernujících savců a lidských novorozenců. Studie posledních let však dokazují přítomnost hnědé tukové tkáně i u dospělých jedinců (Cannon et Nedergaard, 2004; Nedergaard et al., 2007).

1.2.2.3 Běžová tuková tkáň

V nedávné době byl popsán i třetí typ tukové tkáně, běžová (beige) nebo brite (hnědá tuková tkáň v bílé tukové tkáni). Bílá tuková tkáň vykazuje velkou plasticitu a může podléhat tzv. hnědnutí a tak získat vlastnosti hnědé tukové tkáně (velké množství lipidových kapének v cytoplazmě, vysoká mitochondriální aktivita). K tomuto jevu dochází po expozici chladem, chronickém vytrvalostním cvičení nebo β 3-adrenergní stimulací. Bílá tuková tkáň, která prošla procesem „zhnědnutí“ je charakterizována přítomností „běžových“ adipocytů. Běžová tuková tkáň spolu s hnědou významně přispívají k řízení výdeje energie v rámci celého organismu a ovlivňují systémovou metabolickou homeostázu. Ve srovnání s bílou tukovou tkání produkují více IL-6, IL-8 a MCP1. Z vývojového hlediska mají „běžové“ buňky blíže ke svalovým buňkám než buňkám hnědé tukové tkáně. Hnědá tuková tkáň představuje u lidí pouze malou část celkové tělesné hmotnosti, což limituje termogenní kapacitu této tkáně (Giralt et Villarova, 2013; Sepa-Kishi et Ceddia, 2018; Ikeda et al., 2018; Kristóf et al., 2019).

1.3 FUNKCE TUKOVÉ TKÁNĚ

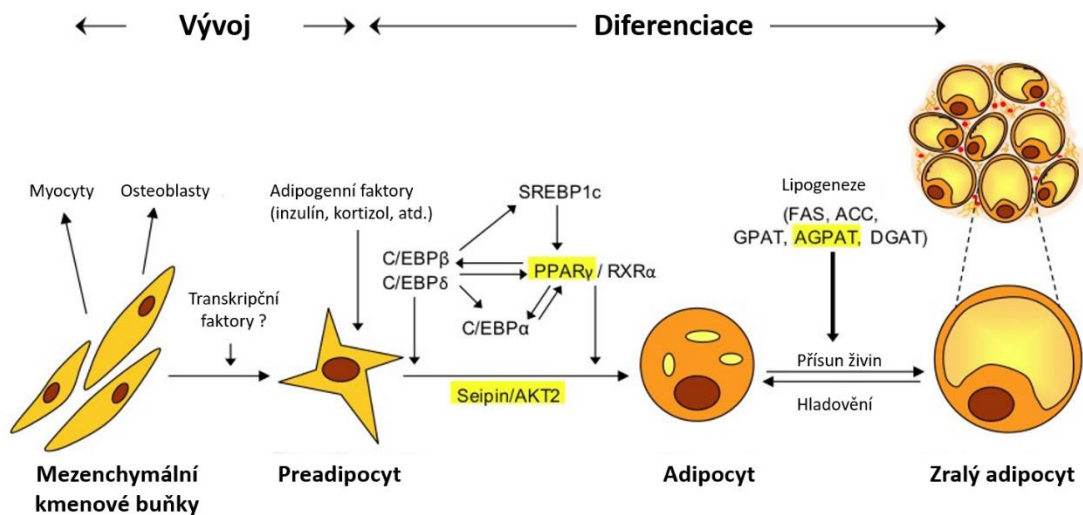
1.3.1 ADIPOGENEZE A PŘEMĚNA ADIPOCYTŮ V TUKOVÉ TKÁNI

Objem tukové tkáně se zvětšuje nárůstem velikosti adipocytů (hypertrofie) nebo přibýváním nových tukových buněk procesem adipogeneze (hyperplazie), případně obojím. Předpokládá se, že zvýšení počtu adipocytů (hyperplazie) nebo obměna starých buněk se děje během celého života diferenciací preadipocytů. Studie kinetiky adipocytů v bílé tukové tkáni využívající detekci kyseliny myristové ($C_{14:0}$), ukázaly, že přibližně 10% tukových buněk těla se každým rokem obnovuje ve všech věkových kategoriích a hodnotách indexu BMI a že novotvorba adipocytů je celoživotní a regulovaný proces (Gray et Vidal-Puig, 2007; Spalding et al., 2008).

Adipocyty pocházejí z mezenchymálních kmenových buněk. V prvním kroku diferenciaci se pluripotentní kmenová buňka stává unipotentní kmenovou buňkou preadipocytární linie, která ztrácí schopnost diferencovat se do jiných buněčných typů. V druhém kroku, zvaném terminální diferenciaci, podstupují preadipocyty výrazné změny v jejich genové expresi a morfologii a získávají fenotyp a vlastnosti zralých adipocytů. Zralé adipocyty již nejsou schopné diferenciaci a dělení.

Zrání kmenových buněk na preadipocyty je závislé na expresi extracelulárních faktorů jako jsou: transformující růstový faktor ($TGF\beta$), kostní morfogenetické proteiny (BMPs), inzulínový růstový faktor (IGF1), interleukin 17 (IL17), aktivin, růstový faktor fibroblastů 1 (FGF1) a růstový faktor fibroblastů 2 (FGF2) (Lowe et al., 2011).

V průběhu diferenciaci preadipocytů na adipocyty dochází ke změně citlivosti na inzulín, k expresi proteinů vázající mastné kyseliny, lipoproteinovou lipázu, adiposin a GLUT4 na buněčných površích a k příjmu glukózy vyvolanou účinkem inzulínu. Tento terminální diferenciací krok je primárně závislý na transkripčních faktorech $PPAR\gamma$, jeho aktivátoru $PGC-1\alpha$, jakož i na transkripčních faktorech $C/EBP\alpha$, $SREBP1$, $mTORC1$ a $FOXO1$. Proces diferenciaci může být ovlivněn účinkou inzulínu prostřednictvím transkripčního faktoru $FOXO1$. U preadipocytů jsou přítomny nízké koncentrace těchto transkripčních faktorů, ale během diferenciaci v adipocyty se jejich exprese zvyšuje. $PGC-1\alpha$ a $mTORC1$ zvyšují adipogenezí prostřednictvím svého účinku na $PPAR\gamma$, ale také nezávisle zvyšováním citlivosti na inzulín u diferenciujících se preadipocytů (Lefterova et Lazar, 2009).



Obr. 5. Diferenciaci adipocytu (upraveno podle Garg, 2011)

1.3.2 LIPOGENEZE A LIPOLÝZA

Hlavní funkcí tukové tkáně, v závislosti na energetickém stavu, je expanze a uchovávání nadbytečné energie ve formě triglyceridů (lipogeneze), nebo v případě potřeby, jejich uvolňování do oběhu a dalších tkání jako volné mastné kyseliny (MK) (lipolýza). 1000 g tuku obsahuje 800 g triglyceridů a asi 7000kcal. Průměrná délka života adipocytů v subkutánní bílé tukové tkáni je 9,5 let, během kterých jsou uložené lipidy nahrazeny v průměru šestkrát (Spalding et al., 2008).

Při lipogenezi dochází k vychytávání volných MK nebo glukózy do adipocytů a jejich následné syntéze na triglyceridy (TAG). Pro lipogenezi je důležitá aktivace lipoproteinové lipázy (LPL). LPL je syntetizována adipocyty a transferována do lumen kapiláry. Pomocí ní jsou uvolňovány volné MK z cirkulujících chylomikronových částic. Volné MK difundují přes endotel kapilár, a pomocí translokáz mastných kyselin jsou převedeny do adipocytů. Volné MK jsou potom využity pro syntézu triglyceridů. Volné MK a následně TAG mohou být v adipocytech syntetizovány také ze sacharidů v tzv. procesu „de novo“ lipogeneze (Kazantzis et Stahl, 2012).

Během hladovění uvolňuje tuková tkáň volné MK lipolýzou. TAG jsou hydrolyzovány na mastné kyseliny a glycerol a transportovány z tukové tkáně do krevního oběhu a dodávány do jater, svalů a dalších tkání. Při lipolýze musí dojít ke strukturální reorganizaci lipidových kapének, aby byl umožněn přístup hydrofilním lipázám k hydrofobnímu lipidu uvnitř kapének, z povrchu lipidové kapénky je odstraněn perilipin. Lipolýzy se v tukové tkáni účastní tři klíčové lipázy. Adipózní triglyceridová lipáza (ATGL) se účastní prvního kroku lipolýzy, hydrolyzuje TAG za vzniku diacylglycerolu (DAG) a MK. Hormon senzitivní lipáza je multifunkční enzym schopný hydrolyzovat přednostně DAG, ale také TAG a monoacylglycerol (MAG). Nakonec monoglyceridová lipáza (MGL) štěpí MAG na glycerol a neesterifikovanou MK. Volné MK mohou být transportovány z buňky nebo reesterifikovány zpět na nové triglyceridy. Avšak glycerol produkovaný v tukové tkáni nemůže být použit jako zdroj energie, protože tuková tkáň má limitovanou aktivitu glycerol kinázy. Glycerol z tukové tkáně je tedy transportován do jater pro glukoneogenezi (Zimmermann et al., 2004).

Jak lipogeneze, tak i lipolýza podléhají fyziologické kontrole, zahrnující hormonální a další způsoby regulace a jejich aktivace se vzájemně vylučuje. Například inzulin uvolněný po příjmu potravy inhibuje lipolýzu a prostřednictvím inzulinového

receptoru stimuluje transport glukózy do buňky a tvorbu MK. Jinými signály regulujícími tvorbu/degradaci TAG jsou glukagon, katecholaminy, glukokortikoidy, cytokiny, glukóza a hladiny MK (Kersten, 2001).

1.3.3 ENDOKRINNÍ FUNKCE

Od prvního objevu endokrinního potenciálu tukové tkáně Friedmanem a spol. v roce 1994 (Zhang et al., 1994), byl a stále je o tento aspekt obrovský vědecký zájem, který vedl k sestavení rozsáhlého seznamu molekul, produkovaných tukovou tkání, důležitých pro metabolickou a imunitní homeostázu.

Tyto adipokiny hrají významnou roli v příjmu a výdeji energie, regulaci tělesné tělesné hmotnosti, metabolismu glukózy a lipidů, citlivosti na inzulín a rozvoji zánětu. Působí také při tvorbě nových preadipocytů a regulují migraci buněk v tukové tkáni. Mnoho z těchto adipokinů působí jako hormony (endokrinní účinek) nebo autokrinním či parakrinním způsobem (Rasouli et Kern, 2008)..

Adipokiny jsou tkáňové hormony vylučované adipocyty nebo jinými buňkami přítomnými v tukové tkáni (kmenové buňky, preadipocyty, vaskulární buňky endotelu, buňky hladké svaloviny, pericyty, buňky cirkulující v krvi). Mezi hlavní adipokiny patří regulátor příjmu energie leptin, energetický regulátor a také protizánětlivý faktor adiponektin, proteiny akutní fáze jako PAI-1, vasokonstrikční angiotensinogen, transformující růstový faktor β (TGF- β), prostaglandiny, acylstimulující protein (ASP-1), adipophilin a faktory ovlivňující proliferaci tukové tkáně, heterogenitu a distribuci jako IGF-I, glukokortikoidy a pohlavní steroidy. Tuková tkáň také vylučuje regulátory metabolismu lipoproteinů; apolipoprotein E (apoE), lipoproteinová lipáza (LPL) a protein transferu cholesterylesteru (CETP). Mnoho cytokinů, chemokinů a faktorů souvisejících se zánětem je vylučováno adipocyty. Tyto zahrnují rezistin, osteopontin, tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), interleukiny IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 α , monocytární chemotaktický protein – 1 (MCP-1), interferon gamma-indukovaný protein (IP-10), makrofágový zánětlivý protein-1 β , faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF) a alkalická fosfatáza (ALP) (Kershaw et Flier, 2004).

Leptin a adiponektin jsou výhradně vylučovány adipocyty. Leptin byl objeven v roce 1994 jako faktor umožňující komunikaci mezi tukovou tkání a hypothalamem, a je tedy rozhodující pro regulaci chuti k jídlu a následně i velikost dep tělesného tuku.

Leptin je bílkovina o velikosti 167 aminokyselin. V hypothalamu leptin aktivuje receptory v anorexigenních neuronech a tím potlačuje chuť k jídlu a zvyšuje energetický výdej. Koncentrace leptinu v krevním oběhu je úzce a pozitivně spojena s množstvím tukové tkáně a jeho hladiny jsou tedy u obézních jedinců zvýšené. Dlouhodobé vystavení zvýšeným hladinám leptinu vede k rezistenci na leptin, tedy neschopnosti účinně potlačovat chuť k jídlu u obézních jedinců. Leptinové receptory jsou přítomny nejen v mozku, ale také v periferních orgánech a tkáních, jako jsou játra, kosterní svalovina, srdce a pankreas. Důležité je, že leptinové receptory jsou také exprimovány na T a B lymfocytech, monocytech a makrofágích a v těchto buňkách jsou účinky leptinu hlavně prozánětlivé. Leptin aktivuje sekreci zánětlivých cytokinů a zánětlivé cytokiny TNF- α a IL-6 v tukové tkáni stimulují produkci leptinu (Otero et al, 2005; Agrawal et al., 2011).

Jeden rok po objevení leptinu, v roce 1995, byl identifikován další významný adipokin adiponektin. Adiponektin je protein o velikosti 244 aminokyselin vylučovaný zralými adipocyty do krevního oběhu, kde je přítomen ve velkém množství než je typické pro ostatní cytokiny. Adiponektin působí jako látka protizánětlivá a inzulín senzitivující a hraje roli v regulaci metabolismu glukózy a lipidů ve svalích a játrech. Přestože je adiponektin produkován hlavně tukovými buňkami, u obézních jedinců jsou jeho hladiny výrazně sníženy. Toto je spojeno se zhoršením celkové citlivosti na inzulín a následně s vyššími hladinami glukózy. Navázáním adiponektinu na receptor aktivuje signální dráhy v buňce prostřednictvím PPAR γ , což vede k inhibici zánětu a oxidativního stresu (Waki et al., 2003; Rasmussen et al., 2006).

1.3.4 TUKOVÁ TKÁŇ JAKO IMUNITNÍ ORGÁN

Imunitní systém se skládá z mnoha buněčných i nebuněčných složek a je nezbytný pro udržení homeostázy. Za fyziologických podmínek má klíčovou roli v obraně proti exogenním patogenům a potenciálně nebezpečným endogenním elementům (např. nekrotickým buňkám, rakovinným buňkám). Tohoto je dosaženo spoluprací mnoha složek imunitního systému. Podobná spolupráce nastává také v tukové tkáni jako odpověď na metabolický stres.

Zánětlivá odpověď v tukové tkáni je charakterizována akumulací fagocytujících buněk (makrofágů, neutrofilů) a přítomností vyšších hladin prozánětlivých cytokinů, zahrnující TNF α , IL-6 atd. uvolněných ze zánětlivé tkáně, které přitahují efektorové

imunitní buňky. Protizánětlivá odpověď je zprostředkována zejména Th2 lymfocyty a B lymfocyty.

Tuková tkáň je infiltrována množstvím imunitních buněk zahrnujících vrozené i adaptivní komponenty. Fenotyp a jejich aktivita jsou ovlivňovány cytokiny, produkovanými adipocyty. Například leptin stimuluje aktivaci makrofágů a indukuje proliferaci Th1 lymfocytů. Rovněž vyvolává uvolňování prozánětlivých cytokinů (TNF α , IL-1 β , IL-6) z různých imunitních buněk. Na druhou stranu adiponektin vykazuje protizánětlivé vlastnosti, jako je schopnost potlačit cílové geny NF κ B (C-reaktivní protein (CRP), TNF α a IL-6) a indukovat sekreci protizánětlivých cytokinů makrofágy (Weisberg et al., 2003; Duffaut et al., 2009; Kintscher et al., 2008).

Výskyt makrofágů v tukové tkáni bude podrobněji popsán v dalších kapitolách. A jejich identifikace je jedním z cílů této práce.

1.4 ROLE TUKOVÉ TKÁNĚ V PATOGENEZI OBEZITY A S NÍ SPOJENÝCH METABOLICKÝCH PORUCH

1.4.1 HYPERTROFIE A HYPERPLAZIE ADIPOCYTU PŘI OBEZITĚ

V průběhu nadbytečného energetického příjmu může tuková tkáň expandovat cestou hypertrofie, hyperplazie, nebo kombinací obou. Nerovnováha v metabolismu lipidů způsobuje nadměrný tok volných mastných kyselin do tukové tkáně. Snížená spotřeba volných mastných kyselin a β -oxidace, a zvýšení lipolytických procesů vedou k přebytku volných mastných kyselin v krevním oběhu. Tuková tkáň aktivuje adipogenezi a zvýší počet adipocytů cestou hyperplazie nebo dojde ke zvětšení velikosti adipocytů cestou hypertrofie. Hyperplastická tuková tkáň je metabolicky zdravá, zatímco hypertrofická tuková tkáň je charakterizovaná dysfunkčními adipocyty, inzulínovou rezistencí, hypoxií a zánětem (Saponaro et al., 2015)

Zvýšená velikost adipocytů (hypertrofie) je spojena s inzulínovou rezistencí a steatózou jater a predikuje rozvoj diabetu 2. typu. Velké adipocyty jsou spojovány s buněčnou smrtí a jsou považovány za faktor stimuluji infiltraci zánětlivých makrofágů do tukové tkáně (Hoffstedt et al., 2010; Cinti et al., 2005).

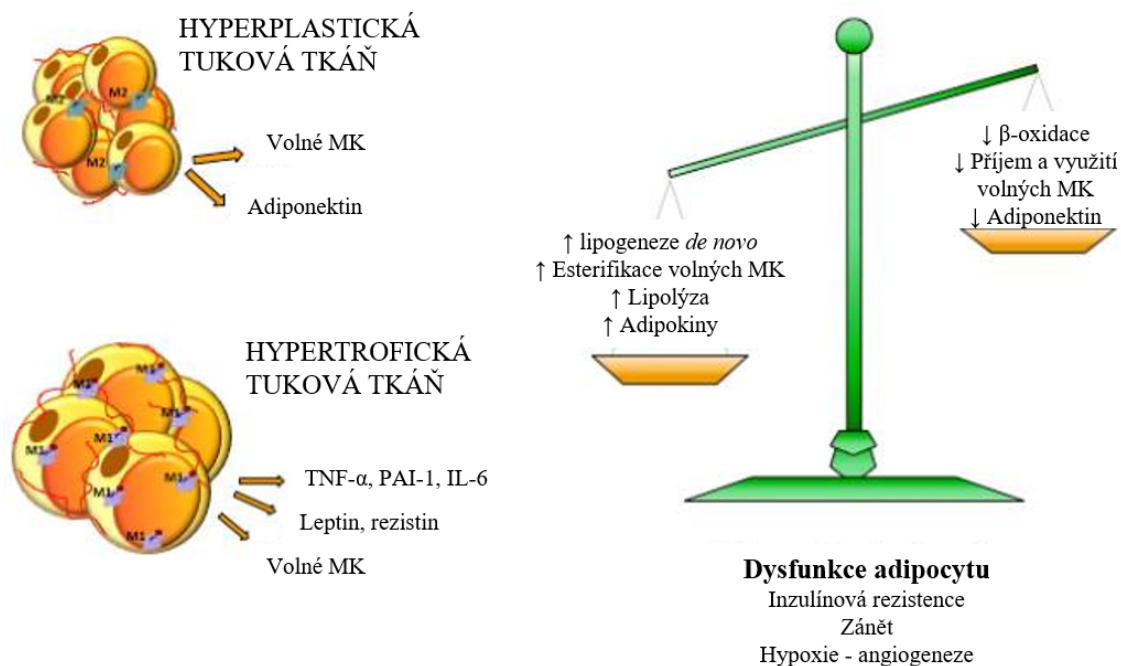
Hyperplazie je naopak považována za stav, který chrání před metabolickými komplikacemi obezity. Hyperplastické změny adipocytů zachovávají citlivost na inzulín. Hyperplazie je spojována s přednostní akumulací v subkutánní tukové tkáni a tělesným fenotypem ve tvaru „hrušky“, zatímco hypertrofie adipocytů je spojena s akumulací viscerálního tuku, obrazem těla ve tvaru „jablka“ s metabolickými komplikacemi. Nedávné studie naznačují, že spíše než anatomické uložení tukové tkáně, určují účinek na metabolismus různé vlastnosti a schopnost expanze viscerální a subkutánní tukové tkáně. Platí však, že, i když má podkožní tuk lepší adipogenní potenciál než tuk viscerální, při nárůstu hmotnosti jsou obě depa tukové tkáně schopny hypertrofie a hyperplazie. Zatímco jsou obecně přijaty rozdíly v akumulaci tělesného tuku v závislosti na pohlaví, nejasné zůstávají rozdíly v distribuci tukové tkáně podmíněné geneticky či získané během života (Ryden et al., 2014; Gesta et al., 2007; Tchoukalova et al., 2010).

Andersson a spol. prokázali, že obézní jedinci po bariatrické operaci, u nichž byla nalezena výrazná redukce velikosti adipocytů získali větší citlivost na inzulín (Andersson et al., 2014). Menší adipocyty citlivější na inzulín jsou popisovány ve viscerálním tuku i u obézních jedinců bez diabetu stejně jako u obézních charakterizovaných jako „metabolicky zdraví“. Inzulín a jeho zvýšené koncentrace v krevním oběhu stimulují hypertrofii adipocytů, nikoliv hyperplazii, jelikož preadipocyty vykazují pouze nízké hladiny receptoru na inzulín (Kloting et al., 2010; O'Connell et al., 2010).

1.4.2 DYSFUNKCE TUKOVÉ TKÁNĚ V OBEZITĚ

Dysfunkce tukové tkáně je významným faktorem, který přispívá k poruchám spojeným s obezitou. Faktory přispívající k dysfunkci tukové tkáně jsou: mechanický stres membrány adipocytů, mitochondriální dysfunkce, stres endoplazmatického retikula, zvýšená hypoxie buněk, inzulínová rezistence, zvýšená produkce reaktivního kyslíku mitochondriemi, rozvoj chronického zánětu a také zvýšená možnost apoptózy. Stresované mitochondrie tukové tkáně uvolňují více druhů reaktivního kyslíku, které mohou poškozovat mitochondrie a další součásti buňky, stejně jako snížení mitochondriální funkce může ovlivňovat mnohé základní funkce adipocytů. Jestliže mitochondrie nejsou schopny při obezitě zvládnout zvýšenou poptávku po oxidaci volných mastných kyselin, mohou neúplné produkty β -oxidace a zvýšený stres endoplazmatického retikula vést v mitochondriích a adipocytech ke zhoršení citlivosti na

inzulín a k dalším komplikacím (Goossens, 2008; Hajer et al., 2008; Saponaro et al., 2015).



Obr. 6. Hyperplazie a hypertrofie adipocytů. Dysfunkce tukové tkáně. (upraveno podle Saponaro et al., 2015)

1.4.2.1 Mechanický stres

Přestavba tukové tkáně je proces, který je akcelerován v souvislosti s expanzí tukové tkáně. Extracelulární matrix poskytuje mechanickou oporu adipocytů. Když adipocyty akumulují lipidy a zvětšují svou velikost, tlak z rozšiřující se lipidové kapénky souběžně s tuhou extracelulární matrix způsobuje napětí na buněčné membráně. To aktivuje zánětlivé dráhy a vyvolává expresi prozánětlivých cytokinů (Alligier, 2012; Khan et al., 2009).

1.4.2.2 Stres endoplazmatického retikula

Při expanzi tukové tkáně je na adipocyty vyvíjen obrovský tlak přizpůsobit příjem živin, a zpracovat a uložit tyto živiny ve formě triglyceridů. Prudký vzestup syntézy bílkovin a lipidů zvyšuje syntetické požadavky na endoplazmatické retikulum. Když produkce proteinů překračuje schopnost endoplazmatického retikula správně ukládat a

upravovat vznikající peptidy, dochází k buněčné odezvě, která zpomaluje tvorbu proteinů a zvyšuje expresi chaperonů skládajících proteiny. Tento stres endoplazmatického retikula vede k aktivaci zánětlivých a stresových signálních drah uvnitř adipocytu a následnému potlačení inzulínové aktivity (Hotamisligil, 2010).

1.4.2.3 Hypoxie tukové tkáně

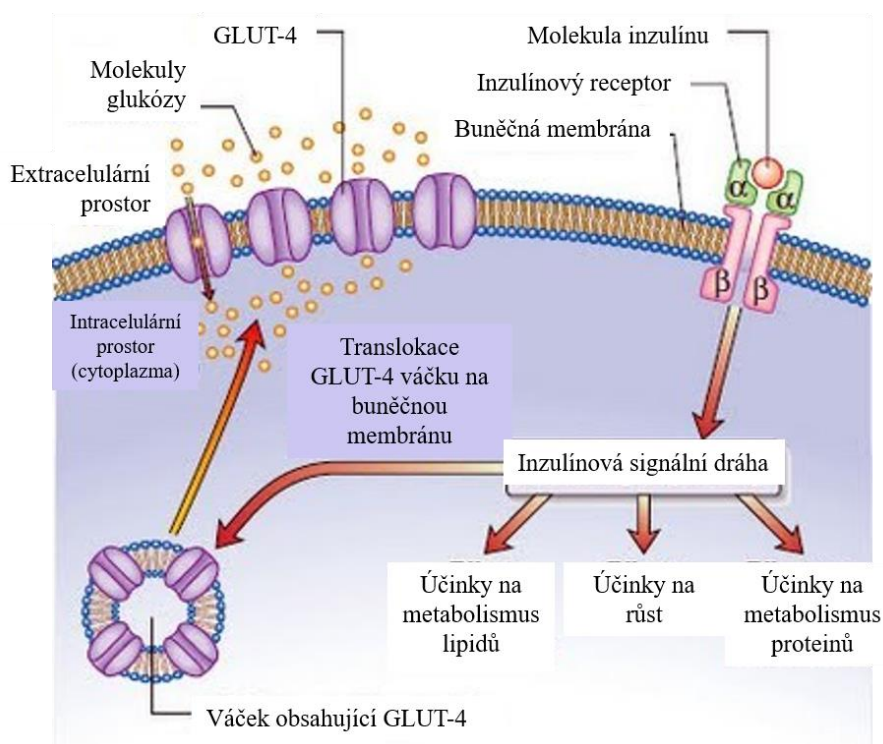
Dalším důsledkem růstu objemu tukové tkáně je zvýšená spotřeba kyslíku. Výživa tukové tkáně závisí na tvorbě nových krevních cév. Při obezitě je však přerušena spojitost expanze adipocytů a neovaskularizace, a výsledkem je hypo-perfúze tukové tkáně a její hypoxie. Hypo-perfúze tukové tkáně může být urychlujícím faktorem v sérii událostí vedoucích k dysfunkci adipocytů, zánětu tukové tkáně a celkové inzulínové rezistenci (Ye et al., 2007).

Řada studií z posledních let ukázala na významně zvýšený objem adipocytů u obezních pacientů. Příčinou byl nedostatek kyslíku (cytoplazmatická hypoxie) v centru hypertrofických adipocytů (Westerbacka et al., 2008; Hosogai et al., 2007). Hypoxie vede k podstatnému zvýšení HIF1 α (transkripční faktor indukovaný hypoxií) a snížení adiponektinu jak u lidí, tak i u hlodavců (Cancello et al., 2005; Ye et al., 2007). Ye se svými spolupracovníky prokázal (pomocí buněčné kultury myších adipocytů a qRT-PCR), že hypoxie zvyšuje adipocytární expresi HIF-1 α , VEGF, GLUT1, Hemox a PDK zánětlivých genů. Hypoxie také indukuje expresi leptinu v adipocytech. Hypoxie se podílí na iniciaci několika procesů, zahrnující smrt adipocytů, infiltraci leukocytů, aktivaci sekrece leptinu a potlačení exprese adiponektinu (Ye et al., 2007; Wang et al., 2008; Guo et al., 2017).

1.4.2.4 Inzulínová rezistence a rozvoj diabetu 2. typu

Inzulin je hormon produkováný výhradně pankreatickými β buňkami a jeho hlavní funkcí je regulace metabolismu sacharidů. Zvýšené hladiny glukózy vyvolávají sekreci inzulínu. Účinek inzulínu v buňkách je zprostředkován prostřednictvím receptoru s vnitřní aktivitou tyrosinkinázy. Po autofosforylaci inzulínového receptoru dojde k aktivaci tyrosinkinázy, jež spustí řadu reakcí uvnitř buňky vedoucích k tvorbě signálu, který aktivuje glukózový transportér (GLUT4). Tento GLUT4 je exprimován v tkáních

citlivých na inzulín, jako je tuková tkáň a kosterní svalovina. Dojde k translokaci GLUT4 z intracelulárního prostředí do buněčné membrány, což vede k přenosu glukózy do buňky a stimulaci syntézy glykogenu. Kromě transportu glukózy stimuluje inzulín glykolýzu a inhibuje rychlost glykogenolýzy a glukoneogeneze v játrech. Tyto účinky jsou důležité pro udržení normoglykemie. Inzulín také ovlivňuje metabolismus lipidů, např. snižuje rychlost lipolýzy v tukové tkáni a oxidaci mastných kyselin v játrech a svalech, stimuluje syntézu mastných kyselin a triglyceridů a absorpci triglyceridů do tukové tkáně a svalů (Pessin et Saltiel, 2000; Dimitriadis et al., 2011).



Obr. 7. Účinek inzulínu (upraveno podle Chhabra, 2012).

Inzulínová rezistence (IR) je stav, kdy je odpověď tkání na inzulínovou stimulaci snížena a je zapotřebí vyšších dávek inzulínu, aby bylo dosaženo stejné odpovědi jako při stavu inzulínové senzitivity. IR je tedy spojena se zvýšenou hladinou inzulínu v plazmě a delší postprandiální hyperglykemií. Bylo zjištěno, že inzulínová rezistence je způsobena několika defekty v inzulín signalizační kaskádě tkání, reagujících na inzulín; játrech, kosterní svalovině a tukové tkáni. Kvůli méně účinnému importu glukózy, využívají buňky jako palivo jiné molekuly bohaté na energii a glukóza zůstává v oběhu delší dobu. Vzhledem k vyšším hodnotám glukózy v krvi, produkují β buňky více inzulínu při

déletrvajícím stavu může toto vést k poškození β buněk a následně ke vzniku diabetu 2. typu. Přestože byla snížená citlivost na inzulín pozorována i u štíhlých jedinců, mají obézní pacienti mnohem vyšší riziko vzniku IR (Mlinar et al., 2007; Lee et Lee, 2014).

Jako jeden z hlavních faktorů inzulínové rezistence je považována přemíra volných mastných kyselin. Zvýšená inzulínová rezistence tukové tkáně a jiných tkání vede ke zvýšené lipolýze a uvolňování volných MK z adipocytů. Je to proto, že v inzulín rezistentní tukové tkáni, inzulín nedostatečně potlačuje lipolytickou hormon senzitivní lipázu (HSL) tukové tkáně, která uvolňuje volné MK do krevního oběhu. Zvýšené hladiny volných MK snižují příjem glukózy ve svalech, stimulují produkci glukózy v játrech a sekreci inzulínu z pankreatických β buněk. Toto vede k systémové inzulínové rezistenci. Z dlouhodobého hlediska však volné MK způsobují lipotoxicitu a vyčerpání β buněk v pankreatu (Savage et al., 2007; Grill et Qvigstad, 2000).

Kromě volných MK jsou i aminokyseliny s větveným řetězcem (BCAA) mediátory inzulínové rezistence při obezitě. U obezity je pozorován snížený katabolismus BCAA v tukové tkáni, následovaný zvýšením plazmatických hladin BCAA. Mechanismus, kterým mohou BCAA přispívat k inzulínové rezistenci, může být prostřednictvím aktivace lipogenního mTORC (savčí TOR protein). Bylo prokázáno, že zvýšené hladiny cirkulujícího BCAA leucinu aktivují kaskádu mTORC, která inhibuje signalizaci inzulínu v inzulín cílových tkáních. mTORC pozitivně reguluje množství a funkci β buněk. Trvalá aktivita mTORC způsobuje inzulínovou rezistenci v β buňkách Langerhansových ostrůvků, omezuje životnost a podporuje jejich apoptózu, což jsou faktory, které přispívají k rozvoji diabetu 2. typu. Akumulace BCAA v obezitě je buď přispěvatelem, nebo alespoň markerem vyvíjející se inzulínové rezistence (Lynch et Adams, 2014).

Zánět nízkého stupně tukové tkáně je považován za jeden z faktorů vedoucí k dysfunkci tukové tkáně a následně k inzulínové rezistenci. Množství makrofágů v tukové tkáni koreluje s rezistencí na inzulín. Také cytokiny uvolněné prozánětlivými buňkami v tukové tkáni, jako jsou $\text{TNF}\alpha$, IL-6 a IL-8, $\text{TGF}\beta$, přispívají k rozvoji systémové inzulínové rezistence. Například zvýšené hladiny zánětlivého cytokinu $\text{TNF}\alpha$ zvyšují hydrolýzu triglyceridů a inhibují expresi genů, důležitých v signální kaskádě inzulínu a diferenciaci adipocytů (Gregor et Hotamisligil, 2011). Tuková tkáň vylučuje také protizánětlivé faktory, jako je např. adiponektin, jehož hladina se však při obezitě

snižuje. Zdá se, že adiponektin působí proti účinkům zánětlivých cytokinů na buňky pankreatu (Rakatzi et al., 2004).

1.5 ROLE DISTRIBUCE TUKU V PATOGENEZI OBEZITY

1.5.1 SUBKUTÁNNÍ A VISCERÁLNÍ TUKOVÁ TKÁŇ

Podkožní tuk je hlavním depem pro odstraňování triglyceridů z krevního oběhu. Jeho schopnost růstu je považována za ochranu proti metabolickým komplikacím obezity. Pokud podkožní tuk chybí, jako u ipodystrofií, nadbytečný tuk se hromadí viscerálně, což vede k metabolickým problémům. Subkutánní tuková depa mají zvýšenou míru přeměny tuku a tvorby nových adipocytů ve srovnání s viscerálním tukem. Předpokládá se, že nové „mladší“ adipocyty jsou metabolicky zdravější (Tan et Vidal-Puig, 2008; Spalding et al., 2008).

Viscerální tuková tkáň je spojena s metabolickým syndromem a kardiometabolickými rizikovými faktory. Má vyšší metabolickou aktivitu měřenou lipogenezí a lipolýzou ve srovnání s jinými depy tuku. Zvýšená lipolýza, uvolňování volných MK a sekrece zánětlivých markerů viscerální tukovou tkání vedou k hromadění nadbytku tuku v játrech, svalech a pankreatu. To v těchto orgánech vyvolává lipotoxicitu a rezistenci na inzulín. Muži jsou více ohroženi metabolickými komplikacemi obezity, protože mají sklon k ukládání viscerálního tuku, zatímco ženy, navzdory k jejich vyššímu procentu tělesného tuku ve srovnání s muži, inklinují k akumulaci podkožního tuku. Se stoupajícím věkem se distribuce tělesného tuku částečně přesouvá ze subkutánních do viscerálních tukových dep (Demerath et al., 2008; Blaak, 2001).

Pouze malá část celkového tělesného tuku (7-18% v závislosti na pohlaví a jedinci) se nachází v břišní dutině. Viscerální tuk přispívá asi pouze 15% z celkového množství volných mastných kyselin v krevním oběhu, většina pochází ze subkutánních břišních nebo jiných podkožních dep. To vyvolává otázky o skutečném podílu viscerálního tuku na celkové citlivosti na inzulín v těle. Nedávné studie ukazují, že nízká viscerální adipozita u obézních lidí je spojena s fenotypem citlivým na inzulín, často nazývaný jako „metabolicky zdravá obezita“. Převládá názor, že zvýšené množství viscerálního tuku může u obézních pacientů rezistentních na inzulín představovat

nemožnost ukládat dostatek tuku v podkožní tukové tkáni, a to vede k ektopickému ukládání tuku a metabolickým problémům (Garg, 2004; Tan et Vidal-Puig, 2008).

Subkutánní a viscerální tuková tkáň produkují různá množství adipokinů, hormonů a zánětlivých markerů, zahrnujících leptin, angiotensinogen, TNF- α , PAI-1, karboxypeptidázu a thrombospondin. Expres angiotenzinogenu, faktorů komplementu, receptorů pro inzulin, 11 β hydroxysteroidní dehydrogenasy (11 β HSD) a proteinu stimulujícího acylaci (ASP) jsou vyšší ve viscerálním tuku, zatímco leptin je z velké části produkován subkutánní tukovou tkání a TNF- α oběma depy. U extrémní obezity IL-6 pochází převážně z viscerální tukové tkáně (Dusserre et al., 2000; Fontana et al., 2007). Vzhledem k uvedeným skutečnostem je pravděpodobné, že jak subkutánní, tak i viscerální tuková tkáň aktivně přispívají k vývoji nebo ochraně před metabolickými komplikacemi souvisejícími s obezitou.

1.5.2 EKTOPICKÁ AKUMULACE TUKU

Předpokládá se, že akumulace nadbytečného tuku vyvolává v adipocytech stresovou reakci, což způsobuje v tukové tkáni rozvoj zánětu a inzulinovou rezistenci. To vede k neschopnosti adipocytů přijímat větší množství glukózy, která má být uložena jako tuk. U obezity je snížena regulace příjmu mastných kyselin do tukové tkáně. Jakmile kapacita tukové tkáně dosáhne svých hranic, nadbytečný tuk se začne hromadit ve vnitřních orgánech, jako jsou játra, pankreas, svalovina a viscerální depa tukové tkáně, což způsobí jejich inzulinovou rezistenci. Akumulace přebytečného tuku v neadipózních tkáních vede k buněčné dysfunkci nebo buněčné smrti (McQuaid et al., 2011; Ravussin et Smith, 2002).

1.6 MAKROFÁGY TUKOVÉ TKÁNĚ

Makrofágy jsou distribuovány ve tkáních po celém těle. Hrají důležitou úlohu při nemocech a homeostáze. Mají významný účinek na růst tkání, stejně jako na remodelaci a organizaci tkání. Tyto jejich důležité funkce jsou, bohužel, často alterovány při mnoha chronických onemocněních, z nichž některé jsou spojeny se stárnutím. Jejich nekontrolovatelná aktivita může zhoršit mnohé patologické stavy. Úplné pochopení rolí makrofágů ve vývoji a udržování tkání, s využitím metod popisujících genovou expresi ve specifických subpopulacích makrofágů, může vnést světlo do hlubší biologie makrofágů a také umožnit přesnější cílenou anti-makrofágovou terapii.

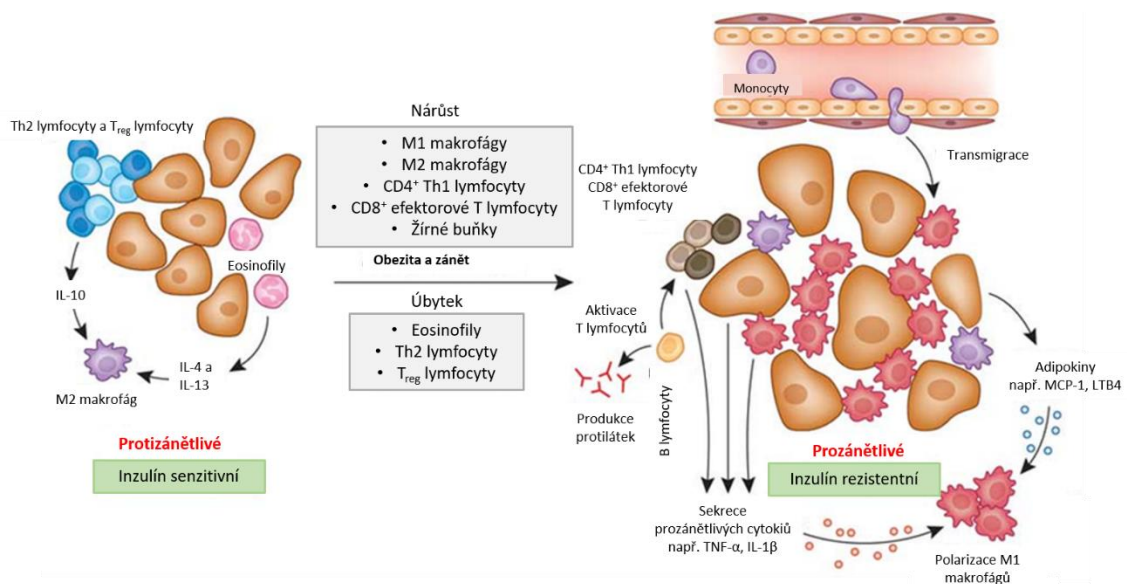
1.6.1 INFILTRACE MAKROFÁGŮ DO TUKOVÉ TKÁNĚ

Makrofágy se fyziologicky vyskytují jak ve viscerální, tak i subkutánní tukové tkáni. Vzhledem k tomu, že vývoj viscerálních adipocytů je odlišný od diferenciaci subkutánních adipocytů, lze předpokládat, že se tyto adipocyty liší svým potenciálem přitahovat makrofágy stimulací sekrece cytokinů. Je známo, že viscerální tuková tkáň exprimuje více cytokinů: IL-6, MCP-1, MIP- α a CSF1 a další geny související s makrofágy a zánětem. (Gesta et al., 2007). Harmann-Boehm se svými spolupracovníky zjistili, že u lidí je běžným jevem převažující infiltrace makrofágů v omentálním tuku, vyskytující se od štíhlých jedinců až po obézní jedince. Infiltrace makrofágy v omentálním tuku je obzvláště zvýšená u centrálního typu obezity, kde je spojena s komorbidními stavy, které obvykle doprovázejí těžkou obezitu (Harmann-Boehm et al., 2007; Curat et al., 2006).

Co je příčinou infiltrace makrofágů do tukové tkáně při obezitě? Sun a kol. uvádí čtyři různé mechanismy pro stimulaci makrofágové infiltrace: smrt adipocytů, hypoxii, zvýšenou sekreci chemokinů a dysregulaci v přeměně mastných kyselin (Sun et al., 2011).

Mastné kyseliny, uložené ve formě triglyceridů v tukové tkáni mohou také být důležitým regulátorem zánětu a infiltrace makrofágů do tukové tkáně. Mastné kyseliny mohou sloužit jako ligandy pro komplex TLR4 (toll-like receptor), čímž aktivují zánětlivou reakci spolu se zvýšením koncentrace extracelulárních lipidů, což nakonec vede k infiltraci makrofágů do tukové tkáně (Bruun et al., 2005).

Uplynulo již 16 let, kdy Weisberg a Xu se svými spolupracovníky poprvé popsali infiltraci makrofágů do tukové tkáně, označili je jako hlavní iniciátory zánětu souvisejícího s obezitou a inzulínovou rezistencí (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Nashromážděné důkazy dokládají důležitou úlohu změny polarizace makrofágů ve vývoji metabolických onemocnění.



Obr. 8. Imunitní buňky a zánět v tukové tkáni (upraveno podle Osborn, 2012)

Tuková tkáň je složená ze zralých adipocytů a menších buněk, pre-adipocytů, fibroblastů, endoteliálních buněk, makrofágů, histiocytů, které tvoří tzv. stromální vaskulární frakci. V tukové tkáni štíhlých jedinců se procento makrofágů ve stromální vaskulární frakci pohybuje okolo 5-10%, zatímco u obézních může dosahovat až 40% a u morbidně obézních až 50%. Jak u myši, tak i u lidí obsah makrofágů v tukové tkáni úzce souvisí s velikostí adipocytů a tělesnou hmotností. Analýza exprese genů v buňkách izolovaných z tukové tkáně obézních odhalila, že tuková tkáň obézních je hlavním zdrojem zánětlivých cytokinů (Hardy 2011). Navíc, hromadění makrofágů v tukové tkáni je spojeno s rozvojem inzulínové rezistence a progresí diabetu typu II. (Heilbronn 2008, Canello 2005). Avšak ne všechny osoby s vysokým BMI vykazují rezistenci na inzulín.

Na základě poměrně nedávného objevu důležité role makrofágů v tukové tkáni, bylo provedeno mnoho experimentů s cílem zvýšit nebo snížit počet makrofágů v tukové tkáni. Snahou bylo zjistit, zda po změně počtu makrofágů, dojde ke změně citlivosti na inzulín. Xu a spol. prokázal pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT PCR) a Northern blot analýzy šesti makrofágových prozánětlivých genů izolovaných ze stromální vaskulární frakce, že s poklesem počtu makrofágů v tukové tkáni u myšičího modelu po léčbě Rosiglitazonem (inzulín senzitivizující lék) dochází ke snížení hladin mRNA zánětlivých genů a zvýšení citlivosti na inzulín (Xu et al., 2003). Po chirurgickém bariatrickém zákroku u morbidně obézních pacientů došlo ke snížení hmotnosti a byla prokázána snížená exprese zánětlivých genů (MCP-1, PLAUR, CSF-3) a úbytek makrofágů v bílé tukové tkáni. Podobně došlo k poklesu makrofágů v tukové tkáni u obézních jedinců po změně jejich životního stylu (strava, cvičení) (Cancello et al., 2005). Kanda a spol. objevil, že při inhibici migrace monocytů do tukové tkáně narušením genu MCP-1 u myši, dochází k mírnému poklesu počtu makrofágů a zvýšené citlivosti na inzulín. Naopak zvýšená exprese monocytárního chemotaktického proteinu MCP-1 (MCP-1) vedla ke zvýšenému množství makrofágů v tukové tkáni a snížení citlivosti na inzulín, což bylo prokázáno u transgenních myši, kde je MCP-1 nadměrně exprimován v adipocytech. (Kanda et al., 2006). Na základě výše uvedeného můžeme soudit, že množství makrofágů v tukové tkáni úzce souvisí s inzulínovou rezistencí.

1.6.2 PŮVOD MAKROFÁGŮ TUKOVÉ TKÁNĚ

Při obezitě se objevuje zvýšené množství makrofágů v tukové tkáni buď na základě diferenciací z krevních monocytů (v kostní dřeni se vyvinou myeloidní prekurzory a do krevního oběhu vstupují jako monocyty), které přestoupily do tukové tkáně na základě změn ve vylučování chemokinů/cytokinů nebo proliferací rezidentních tkáňových makrofágů. Mnoho rezidentních tkáňových makrofágů je vytvořeno během časného embryonálního vývoje a je udržováno v dospělosti nezávisle na přílivu monocytů v krvi. Zánět v tukové tkáni nesporně způsobuje nárůst makrofágů pocházejících z krevních monocytů, které doplňují embryonálně zavedené populace makrofágů (Davies et al., 2013; Epelman et al., 2014).

Je známo, že adipocyty jsou schopné produkovat specifické adipokiny, které fungují jako chemoatraktanty pro cirkulující monocyty. Jeden takový chemokin je MCP-

1, o kterém víme, že je produkován ve velkém množství adipocyty a při obezitě je jeho hladina zvýšená. Nadměrná exprese MCP-1 v tukové tkáni podporuje akumulaci makrofágů. Je zajímavé, že přítomnost chemokinového receptoru CCR typu 2, který umožňuje reakci monocytů na MCP-1, je typickou charakteristikou nově přijatých makrofágů, čehož se využívá k jejich odlišení od rezidentních makrofágů.

Kromě zvýšené exprese MCP-1 tukovou tkání, je obezita charakterizována výrazným zvýšením počtu molekul CCR2 na cirkulujících monocytech. Navíc, monocyty obézních jedinců vykazují vyšší chemotaktickou aktivitu, která je spojena jak s inzulínovou rezistencí, tak s expresí CCR2 (Kamei et al., 2006).

1.6.3 POLARIZACE MAKROFÁGŮ V TUKOVÉ TKÁNI

Makrofágy vykazují významnou funkční heterogenitu. Faktory místního prostředí ovlivňují jejich vlastnosti a aktivační stav. Různé stimuly aktivují makrofágy k expresi odlišných chemokinů, povrchových markerů a metabolických enzymů, které v konečném důsledku generují rozmanité makrofágové funkce pozorované v zánětlivých a nezánětlivých podmínkách (Lumeng, 2007).

Existuje velké množství makrofágů tukové tkáně s různými imunitními profily. Pro lepší pochopení, jak makrofágy tukové tkáně ovlivňují obezitu a inzulínovou rezistenci, dělíme je na základní dva podtypy M1 a M2 (Castoldi, 2016).

U obezity dochází nejen ke zvýšení počtu makrofágů v tukové tkáni, ale také k jejich aktivaci směrem k zánětlivému fenotypu (M1). Lumeng a kol. ve své studii zjistili, že makrofágy tukové tkáně u štíhlých myší exprimují geny, které jsou charakteristické pro protizánětlivé makrofágy typu M2, neboli „alternativně aktivované“ makrofágy důležité v homeostáze tukové tkáně. Tyto geny zahrnují: protein Ym-1, Arginázu 1 a IL-10. Zatímco u obézních myší byla zjištěna zvýšená exprese TNF α a iNOS, které jsou charakteristické pro M1 (prozánětlivé) neboli „klasicky aktivované“ makrofágy. U obezity dochází k přechodu makrofágů tukové tkáně z M2-protizánětlivého na M1-prozánětlivý fenotyp. Tyto M1 makrofágy produkují zánětlivé cytokiny, které inhibují schopnost adipocytů reagovat na inzulín. Naopak ztráta hmotnosti je spojena s reverzní změnou, kdy makrofágy M1 přecházejí na M2 protizánětlivý fenotyp. (Lumeng, Bodzin 2007) Tyto objevy zdůrazňují, že obezita hraje důležitou roli v rozvoji inzulínové

rezistence nejen s ohledem na počet makrofágů, ale také fenotyp makrofágů v tukové tkáni.

U obezity tedy dochází k narušení rovnováhy v poměru M1/M2 makrofágů. Existují však důkazy, které odhalují složitější scénář v rozsahu funkčních stavů makrofágů, jež přesahuje klasické dělení M1/M2 a významné rozdíly v profilech makrofágů u zvířecích a lidských modelů (Castoldi et al., 2016).

V případech obezity u lidí však zůstává nezodpovězená otázka, zda přítomnost makrofágů M1 v tukové tkáni obézních jedinců je dána vývojem z prekursorových monocytů, nebo zda se vyskytuje jako důsledek repolarizace již přítomných makrofágů M2 ve tkáni. Experimentální studie u obézních myší prokázaly, že makrofágy M1 jsou průběžně doplňovány z prekursorů monocytů z krevního oběhu (Canello et al., 2005; Kanda et al., 2006; Lumeng et al., 2007; Lumeng et al., 2008; Gordon, 1995; Bruun et al., 2005). Kromě toho se hypertrofické adipocyty stávají zánětlivými anebo nekrotickými, což přitahuje M1 prozánětlivé makrofágy, které jsou uspořádány do „crown-like“ struktur (Lumeng et al., 2007; Bodzin et Saltiel, 2008). Makrofágy v crown-like strukturách obsahují mnoho vezikul barvicích se olejovou červení, což značí přítomnost intracytoplazmatických lipidů související s fagocytární aktivitou (Xu et al., 2003; Lumeng et al., 2007; Sun et al., 2011).

Tuková tkáň zdravých štíhlých obsahuje protizánětlivé M2 makrofágy, které udržují tkáňovou homeostázu a citlivost na inzulín vylučováním protizánětlivého cytokinu IL-10. Na základě kinetických studií prováděných u obézních myší se předpokládá, že před infiltrací tukové tkáně M1 makrofágy, jsou přítomny i další buňky zahrnující neutrofilů, CD8⁺ T lymfocyty a žírné buňky.

Cinti se svými kolegy předpokládal, že smrt adipocytů je hlavním stimulem, který reguluje infiltraci makrofágů v tukové tkáni. Smrt adipocytů je častější ve viscerální tukové tkáni, než v subkutánní tukové tkáni (Cinti et al., 2005; Strissel et al., 2007).

1.6.4 MAKROFÁGY TUKOVÉ TKÁNĚ A OBEZITA

Výsledkem je, že lidská obezita vede k dysregulaci prostřednictvím sekrece cytokinů, chemokinů a adipokinů tukovou tkání. I když mohou být uvolňovány adipocyty, studie ukázaly, že většina vylučovaných chemokinů v tukové tkáni pochází ze stromální vaskulární frakce (Xu et al., 2003; Curat et al., 2006; Sun et al., 2011). Produkce chemokinů makrofágy v tukové tkáni pravděpodobně přispívá k akumulaci makrofágů v tukové tkáni. Četné studie u lidí prokázaly zvýšenou genovou expresi různých cytokinů v tukové tkáni obézních jedinců (TNF- α , IL-1, IL-6), chemokinů, zahrnujících MCP-1, MIP-1 α (makrofágový zánětlivý protein-1 α), MIP-1 β (makrofágový zánětlivý protein-1 β), MCP-2, MCP-4. Zvýšený převod chemokinů z dysregulované tukové tkáně do krve vedl k chronickému zánětu nízkého stupně, inzulínové rezistenci a ateroskleróze (Sun et al., 2011; Murdolo et al., 2007; Murano et al., 2008).

1.6.5 PROTEKTIVNÍ ÚLOHA MAKROFÁGŮ

Navzdory mnohým důkazům, že makrofágy tukové tkáně vedou k chronickému zánětu a zhoršují inzulínovou rezistenci, mohou mít také protektivní úlohu. Kosteli a spol. publikoval, že odbourávání tuku uloženého v adipocytech, které je vyvoláno omezeným příjmem potravy nebo léky, je spojeno během časně ztráty hmotnosti se zvýšením lokálního uvolňování volných MK, což vyvolává nábor makrofágů. Makrofágy fagocytují přebytek lipidů a snižují místní koncentraci volných MK, mohou tak chránit lokální funkci adipocytů. V jiné studii prováděné u obézních myši akumulují makrofágy v tukové tkáni lipidy vedoucí k tvorbě „pěnových“ buněk v tukové tkáni (Suganami et al., 2005; Kosteli et al., 2010). Makrofágy M1 tvořící tzv. „crown-like“ struktury obsahují lipidové fagolysosomy chránící tělo od toxických účinků volných mastných kyselin uvolňovaných z adipocytů (Gordon, 1995; Cinti et al., 2005).

Přes intenzivní výzkum mnoha aspektů stavby a funkce bílé tukové tkáně u obézních, stále zůstává řada otevřených otázek. Výsledky ze studií na zvířatech jsou často neaplikovatelné při hledání nových léčebných postupů u lidí. Studie u lidí mohou navíc obsahovat rozporuplná data a jejich odlišná struktura může mít vliv na validitu.

2 CÍLE PRÁCE

1. Popsat distribuci makrofágů v podkožní a viscerální bílé tukové tkáni u pacientů před bariatrickou operací pro morbidní obezitu.
2. Charakterizovat fenotyp makrofágů bílé tukové tkáně u morbidně obézních pacientů pomocí imunohistochemie.
3. Studium exprese onkoproteinu Bcl2, jako blokátoru apoptózy, v cytoplazmě adipocytů v bílé tukové tkáni patologicky obézních.
4. Srovnání struktury a rozsahu intersticiální tkáně v bílé tukové tkáni u žen s fyziologickými hodnotami BMI a morbidně obézních žen s diabetem II. typu a bez diabetu.
5. Zjistit rozdíly ve struktuře subkutánní a viscerální bílé tukové tkáně u morbidně obézních žen.
6. Zjistit, zda je podkožní tuková tkáň morfologicky změněna užitím bioptické jehly ve srovnání s metodou klasické excize.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Pro tuto práci byl vytvořen soubor pacientů obezitologické ambulance Chirurgického oddělení Vítkovické nemocnice v Ostravě. Pacienti, kteří byli zařazeni do souboru, podstoupili bariatrický zákrok pro obezitu (BMI > 30), těžkou obezitu (BMI > 35) až morbidní obezitu (BMI > 40). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Výzkum byl schválen etickou komisí Lékařské fakulty Ostravské univerzity a etickou komisí Vítkovické nemocnice Ostrava.

Skupina pacientů zahrnovala 42 mužů ve věku 21-66 let s BMI v rozmezí 34-58 a 64 žen ve věku mezi 21-60 lety s BMI v rozmezí 30-54 s diabetem a bez diabetu. Při podstoupeném bariatrickém zákroku byly pacientům odebrány vzorky bílé tukové tkáně z podkožní tkáně břišní stěny z pupeční oblasti a viscerální tuková tkáň z omenta.

Vzorky bílé tukové tkáně byly odebrány metodou klasické excize za užití skalpelu. Pro srovnání morfologie bílé tukové tkáně užitím metody klasické excize a biopsií silnou jehlou, byly odebrány vzorky podkožní bílé tukové tkáně také bioptickou jehlou za užití jehly Medax (Bio-Feather 14Gx120MM).

Bílou tukovou tkáň kontrol s fyziologickým BMI a bez diabetu jsme získali v průběhu soudní pitvy na Ústavu soudního lékařství a medicínského práva Fakultní nemocnice Olomouc ze stejných oblastí, tedy z podkoží v blízkosti pupku a z omentální tukové tkáně.

Počet pacientů a základní charakteristika jsou uvedeny v tab. 1 a 3 (obézní) a v tab. 2 a 4 (kontroly).

číslo biopsie	věk	BMI	diabetes (A) / bez diabetu (N)	číslo biopsie	věk	BMI	diabetes (A) / bez diabetu (N)
12084/11	21	36,1	N	6686/12	31	41	N
12085/11	37	42,6	N	7718/12	33	49,1	N
12087/11	34	42,3	N	8215/12	48	47,5	N
12088/11	44	35,8	N	10152/12	39	41,5	N
12089/11	29	40,5	N	10363/12	36	49,8	A
12090/11	45	37,7	A	10639/12	42	40	N
12091/11	29	38,8	N	10779/12	47	39,5	N
12093/11	39	43,4	N	10839/12	33	38,8	N
12095/11	46	29,7	N	11516/12	33	40,5	N
12096/11	42	34,8	N	11567/12	42	37,9	N
12097/11	37	43,3	N	12438/12	40	53	N
12098/11	45	36,6	N	12687/12	47	45,4	A
12628/11	36	38,5	N	12891/12	36	41,4	N
12929/11	32	35	N	986/13	37	40,4	N
13124/11	33	39	N	993/13	46	39,9	A
14703/11	46	40,8	A	1419/13	36	33,8	N
15160/11	49	34,5	N	1998/13	47	51,1	A
15605/11	42	35,1	N	2116/13	38	49,8	N
16145/11	40	40	A	3189/13	51	43,4	A
821/12	45	36,8	A	3613/13	34	45,7	N
1546/12	41	42,1	A	3777/13	45	45,1	A
1677/12	35	36,8	N	3969/13	48	45,4	N
1826/12	44	49,4	A	4864/13	42	54,2	N
2515/12	32	50,9	N	5209/13	30	52	N
2516/12	44	43,6	N	6735/13	48	43,8	A
4392/12	29	45,3	N	6890/13	24	38,7	N
4680/12	37	39	N	7461/13	37	43,1	N
4773/12	21	43,8	N	7514/13	44	40,4	N
4774/12	45	35,2	N	8259/13	37	51,2	N
5307/12	47	39,4	N	8887/13	27	44,6	N
5308/12	44	49,8	N	9110/13	35	34,6	N
6176/12	38	37,8	N	9838/13	38	42,6	N

Tab. 1. Seznam bioptických vzorků – obézní pacienti – ženy

číslo pitvy	věk	BMI	číslo pitvy	věk	BMI
760/15	92	22,8	772/15	84	27
753/15	52	26,6	773/15	90	24,9
760/15	39	21,1	780/15	71	18,9
762/15	50	24,8	834/15	55	18,3
766/15	88	27,3	838/15	92	19

Tab. 2. Seznam nekroptických vzorků – kontroly bez diabetu – ženy

číslo biopsie	věk	BMI	diabetes (A) / bez diabetu (N)	číslo biopsie	věk	BMI	diabetes (A) / bez diabetu (N)
12086/11	55	40,7	N	6841/12	58	44,4	N
12094/11	62	45,4	A	7421/12	41	48,1	A
12627/11	34	41,5	N	7422/12	47	44	A
13195/11	32	41,8	N	7719/12	46	36,1	N
13413/11	61	40,7	N	7794/12	52	56	N
14701/11	52	41,8	N	8089/12	32	45,2	N
14702/11	54	36,9	N	8904/12	41	55,9	A
14866/11	42	52,8	A	10465/12	36	38,9	N
15424/11	45	44	A	10466/12	59	45,2	N
15867/11	24	54,3	N	10780/12	49	43,8	N
1120/12	60	36,7	N	10991/12	47	44,1	N
1121/12	37	42,9	N	12829/12	42	42,6	N
1209/12	56	37,7	N	12830/12	46	41,4	A
1825/12	66	46,6	A	991/13	21	58,1	N
1871/12	46	36,7	N	992/13	58	49,9	N
2561/12	51	52,1	N	994/13	55	48,3	N
3112/12	53	33,8	N	5501/13	47	49,2	A
4261/12	39	46,9	N	6733/13	38	49,8	N
4504/12	27	39,7	N	6734/13	53	39,4	N
4872/12	47	40,8	N	7028/13	41	45	A
4873/12	62	48,2	N	7278/13	58	46,8	N

Tab. 3. Seznam bioptických vzorků – obézní pacienti – muži

číslo pitvy	věk	BMI	číslo pitvy	věk	BMI
754/15	79	27,4	802/15	67	27,5
756/15	62	27,8	804/15	65	26,5
758/15	90	26,7	813/15	82	22,8
774/15	58	20,1	822/15	62	25,9
775/15	67	25,4	830/15	43	26,8
779/15	47	22,4	833/15	68	18,3
800/15	53	27	835/15	72	26,1

Tab. 4. Seznam nekroptických vzorků – kontroly bez diabetu – muži

3.2 METODY

Odebraný materiál byl ihned po odběru fixován v neutrálním formolu a v histologické laboratoři během 24 hodin zpracován do parafinových bloků. Z parafinových bločků byly na rotačním mikrotomu zhotoveny řezy silné 4-5 μ m a následně nabarveny základním histologickým barvením hematoxylin-eosin.

Na základě vyhodnocení jednotlivých preparátů, byly vybrány reprezentativní parafinové bloky jednotlivých pacientů a kontrol, u kterých bylo použito speciálního histologického barvení Weigert železitý hematoxylin-van Gieson pro znázornění pojivové tkáně a imunohistochemické barvení pro detekci makrofágů a jejich polarizaci CD68 a CD204, a exprese onkoproteinu Bcl2, jako blokátoru apoptózy.

Z těchto vybraných parafinových bloků byly připraveny řezy silné 5 μ m a přeneseny na podložní skla SuperFrost Plus®. Takto připravené řezy zůstaly do dalšího dne v termostatu při 56°C.

Následující den byly řezy odparafinovány ve dvou lázních xylenu vždy po dobu 5 minut, odvodněny v sestupné řadě etanolu (96%, 80%, 70%) vždy po dobu 5 minut a poté opláchnuty v destilované vodě a promývány pod tekoucí vodou.

Pro znázornění pojivové tkáně bylo použito speciální histologické barvení Weigert železitý hematoxylin-van Gieson pomocí kitu od firmy Diapath a bylo postupováno podle návodu od výrobce. Z destilované vody přeneseme tkáňové řezy na podložních sklech do Weigertova železitého hematoxylinu pro obarvení jader a barvíme při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Tkáňové řezy dobarvujeme pikrofuchsinem (směs kyseliny pikrové a kyselého fuchsínu) 10 minut. Následuje odvodnění v 96 % alkoholu, acetonu a v lázni aceton-xylen 1:1 a projasnění ve dvou lázních xylenu, vše po dobu 5 minut. Při tomto barvení se kolagenní vazivo obarví červeně, jádra jsou temně modrá.

Pro imunohistochemické barvení bylo použito dvoustupňové nepřímé imunohistochemie. Odmaskování epitopů bylo provedeno v citrátovém pufru (pH 6,0) v mikrovlnné troubě HISTOS PRO Milestone při teplotě 120°C a zvýšeném tlaku po dobu 15 minut. Aktivita endogenní peroxidázy byla blokována u zchladlých preparátů v 5 % vodném roztoku peroxidu vodíku po dobu 30 minut. Následoval oplach destilovanou vodou a poté dvakrát oplach v pufru 1xTRIS (pH 7,6) po 5 minutách a jedenkrát oplach v pufru 1xTRIS + Tween20 po dobu 5 minut. Abychom zabránili

nespecifickému přibarvování pozadí, inkubovali jsme tkáňové řezy v Protein block serum free (DAKO) po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

Následně byla aplikována primární protilátka CD68 (Mouse Monoclonal Anti-Human CD68, M0814, DakoCytomation), CD204 (Anti-MSR1 protilátka, rabbit, Sigma), Bcl2 (Anti-Human Oncoprotein Bcl2, BioGenex) v daném ředění. Inkubace s danými protilátkami probíhala ve vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Poté byly řezy opět opláchnuty třikrát v pufru 1xTRIS (pH 7,6) po 5 minutách a jedenkrát oplach v pufru 1xTRIS + Tween20 po dobu 5 minut.

Následovala aplikace detekčního systému EnVision™ Detection Systems, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (DAKO) ve vlhké komůrce po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Poté byly řezy opět opláchnuty dvakrát v pufru 1xTRIS (pH 7,6) po 5 minutách a 1x oplach v pufru 1xTRIS + Tween20 po dobu 5 minut.

Vizualizace proběhla pomocí chromogenu DAB při pokojové teplotě po dobu 5 minut za kontroly v mikroskopu a 10 minutový oplach tekoucí a destilovanou vodou.

V tkáňových řezech byla jádra buněk dobarvena hematoxylinem po dobu 1 až 2 min. Následuje oplach vodou, diferenciací čpavkovou vodou, promývání 10 minut pod tekoucí vodou a odvodnění v 96 % alkoholu, acetonu, v lázni aceton-xylenu 1:1 a projasnění ve dvou lázních xylenu, vše po dobu 5 minut.

Tkáňové řezy byly zamontovány do Pertexu a překryty krycím sklíčkem.

Zhotovené preparáty v základním histologickém barvení hematoxylin-eosin, ve speciálním histologickém barvení Weigert železitý hematoxylin-van Gieson a preparáty imunohistochemické byly hodnoceny v mikroskopu Olympus. Expres sledovaných proteinů CD68 a CD204 byla také hodnocena kvantitativně.

Velikost tukových buněk podkožní i viscerální tukové tkáně byla hodnocena v tkáňových řezech barvených základním histologickým barvením hematoxylin-eosin. Histologické řezy byly prohlíženy v mikroskopu při zvětšení 10× a poté byly pořízeny snímky kamerou firmy Olympus SC100. Pro zhodnocení velikosti tukových buněk byl pro analýzu použit systém Cellsens dimension/standard image analysis firmy Olympus.

Makrofágy byly nejprve identifikovány podrobným pozorováním v mikroskopu při zvětšení 40x v pěti oblastech a pak počítány při 20násobném zvětšení (celková

vyšetřovaná plocha 0,019 mm²). Počet makrofágů byl následně přepočten na 100 adipocytů.

3.3 STATISTICKÁ ANALÝZA

Pro zjištění rozdílů mezi studovanými skupinami, byly získané výsledky hodnoceny Mann-Whitneyovým testem na úrovni významnosti $P < 0,05$. Všechny výpočty byly provedeny pomocí softwaru GraphPad Prism 6.1.

3.4 POUŽITÉ ROZTOKY A CHEMIKÁLIE

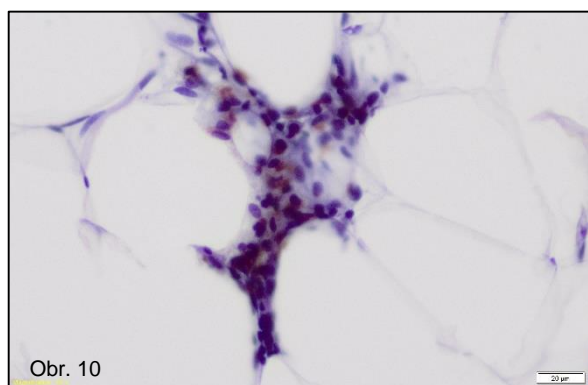
- Alkohol, aceton, xylen, destilovaná voda, peroxid vodíku, hematoxylin, eosin, pikrofuchsin, Pertex
- Citrátový pufr (pH 6,0): 9 ml roztoku A (210,1 g kyseliny citronové v 1 l ddH₂O) a 41 ml roztoku B (29,41 g citrátu sodného v 1 l ddH₂O) a doplnění ddH₂O do 500 ml
- TRIS pufr (pH 7,6): příprava zásobního roztoku 10x TRIS: 61 g TRIS (hydroxymethyl)aminomethan do 1 l ddH₂O. Hodnota pH upravena koncentrovanou HCl. 1x TRIS + Tween20 byl připraven přidáním 500 µl Tween20 do 1 l 1x TRIS
- Primární protilátky CD68 (Mouse Monoclonal Anti-Human CD68, M0814, DakoCytomation), CD204 (Anti-MSR1 protilátka, rabbit, Sigma), Bcl2 (Anti-Human Oncoprotein Bcl2, BioGenex)
- Detekční systém EnVision™ Detection Systems, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (DAKO)
- Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (DAKO)

4 VÝSLEDKY

4.1 MAKROFÁGY V BÍLÉ TUKOVÉ TKÁNI PATOLOGICKY OBÉZNÍCH

V bílé tukové tkáni obézních jedinců byla nalezena malá disperzní ložiska makrofágů se známkami zánětlivých procesů, a to jak v podkožní, tak i ve viscerální tukové tkáni.

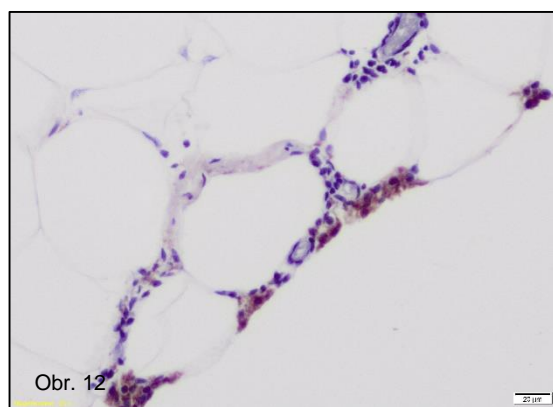
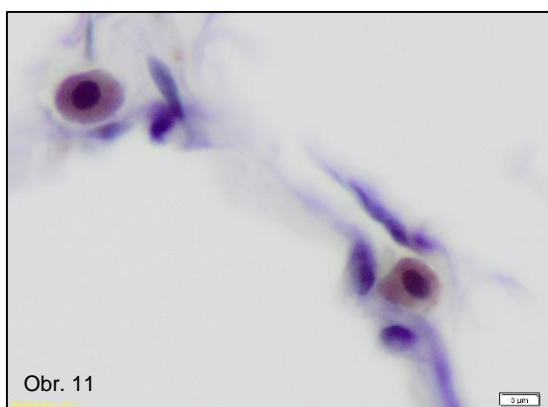
Imunohistochemickou reakcí za využití protilátky anti-CD68 byly prokázány CD68 pozitivní makrofágy, které byly většinou lokalizovány v prostorech styku několika adipocytů (obr. 9, 10).



Obr. 9. Podkožní bílá tuková tkáň (muž; BMI 51,8; s diabetem). HE.

Obr. 10. Viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 40; bez diabetu). CD68.

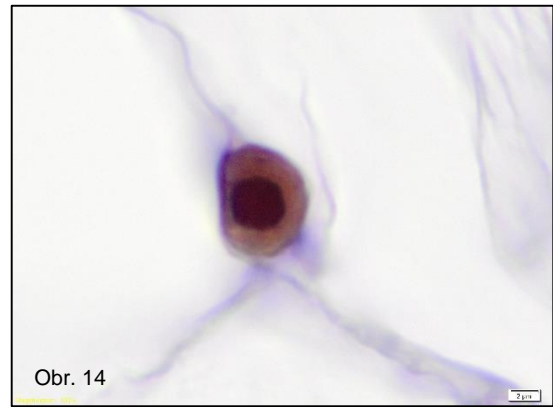
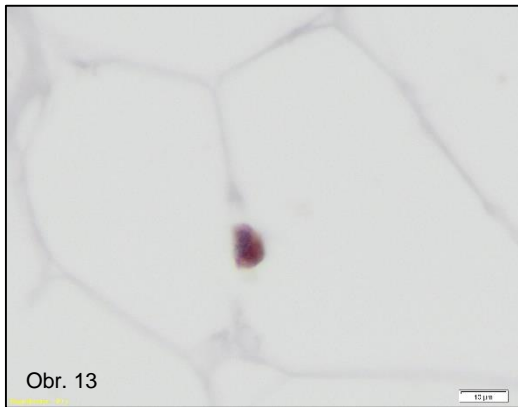
Makrofágy byly detekovány jako samostatné buňky nebo ve formě malých shluků (obr. 11, 12).



Obr. 11. Viscerální bílá tuková tkáň (muž; BMI 41,5; s diabetem). CD68.

Obr. 12. Viscerální bílá tuková tkáň (muž; BMI 39,4; bez diabetu). CD68.

Méně časté byly makrofágy v tenkých septech oddělujících přilehlé adipocyty (obr. 13, 14).



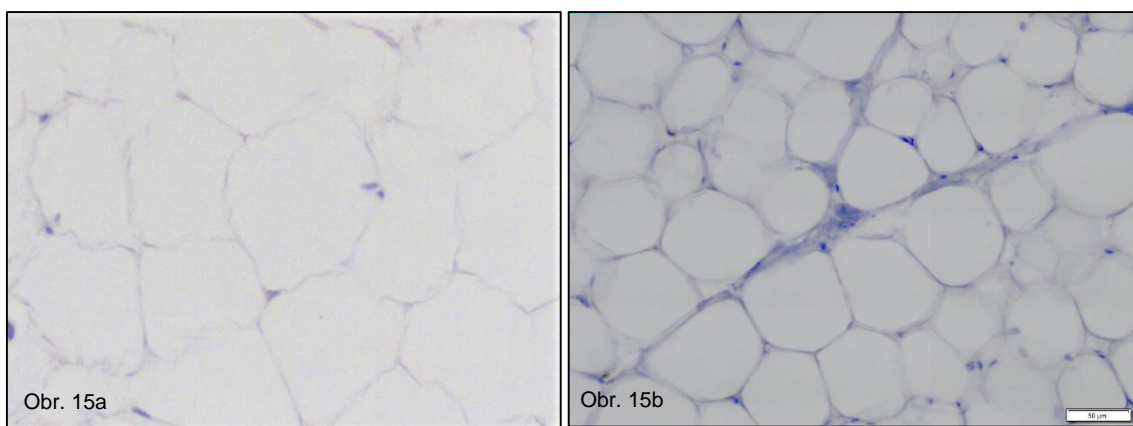
Obr. 13. Podkožní bílá tuková tkáň (muž; BMI 35; bez diabetu). CD68.

Obr. 14. Viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 35; bez diabetu). CD68.

4.2 POLARIZACE M1/M2 MAKROFÁGŮ V BÍLÉ TUKOVÉ TKÁNI PATOLOGICKY OBÉZNÍCH

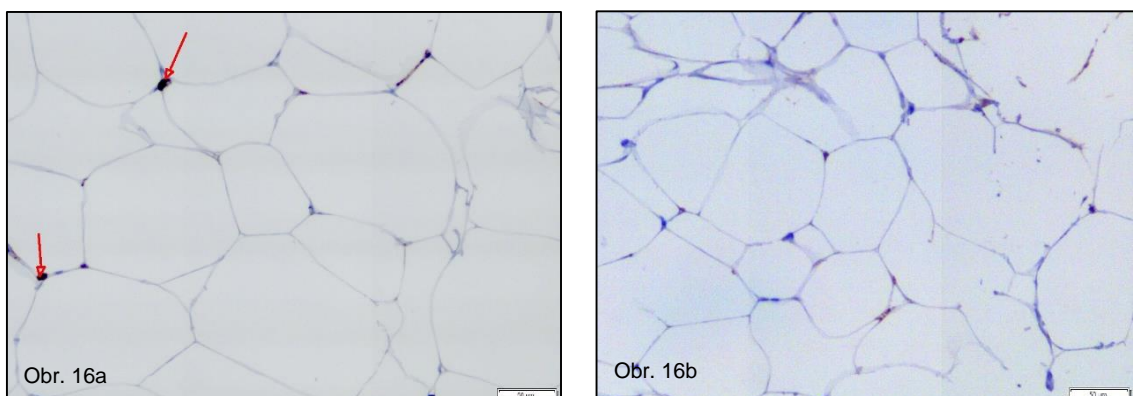
Na základě exprese CD68 jako znaku všech makrofágů a exprese CD204 jako znaku makrofágů M2 byl hodnocen aktivační stav (fenotyp) makrofágů v bílé tukové tkáni patologicky obézních s diabetem typu 2 a bez diabetu a ve skupině kontrol bez diabetu.

V kontrolní skupině neobézních pacientů bez diabetu byly makrofágy přítomny ojediněle v intersticiu (obr. 15 a, b).



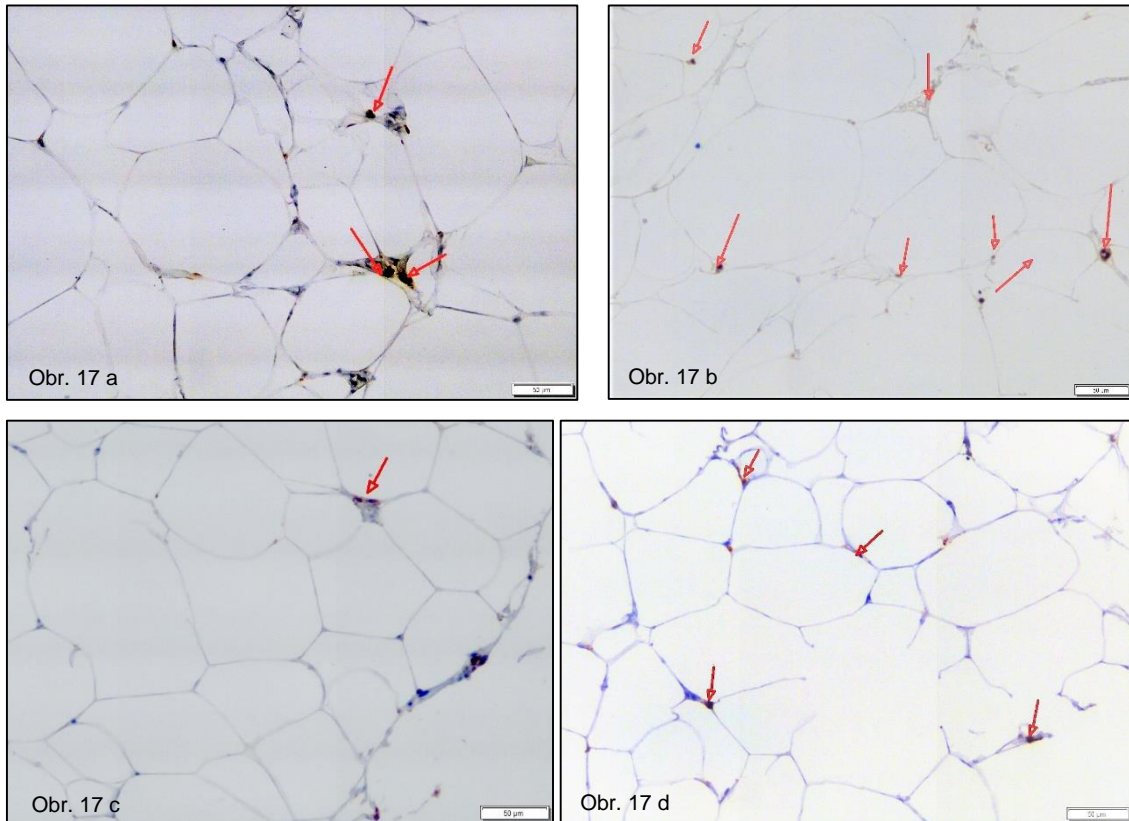
Obr. 15 Normální bílá tuková tkáň u kontrolní skupiny: (a) podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 21; bez diabetu), (b) viscerální bílá tuková tkáň (muž; BMI 22; bez diabetu). CD68.

U obézních pacientů bez diabetu bylo v bílé tukové tkáni jak podkožní, tak viscerální nalezeno malé množství CD204 pozitivních makrofágů (obr. 16 a, b).



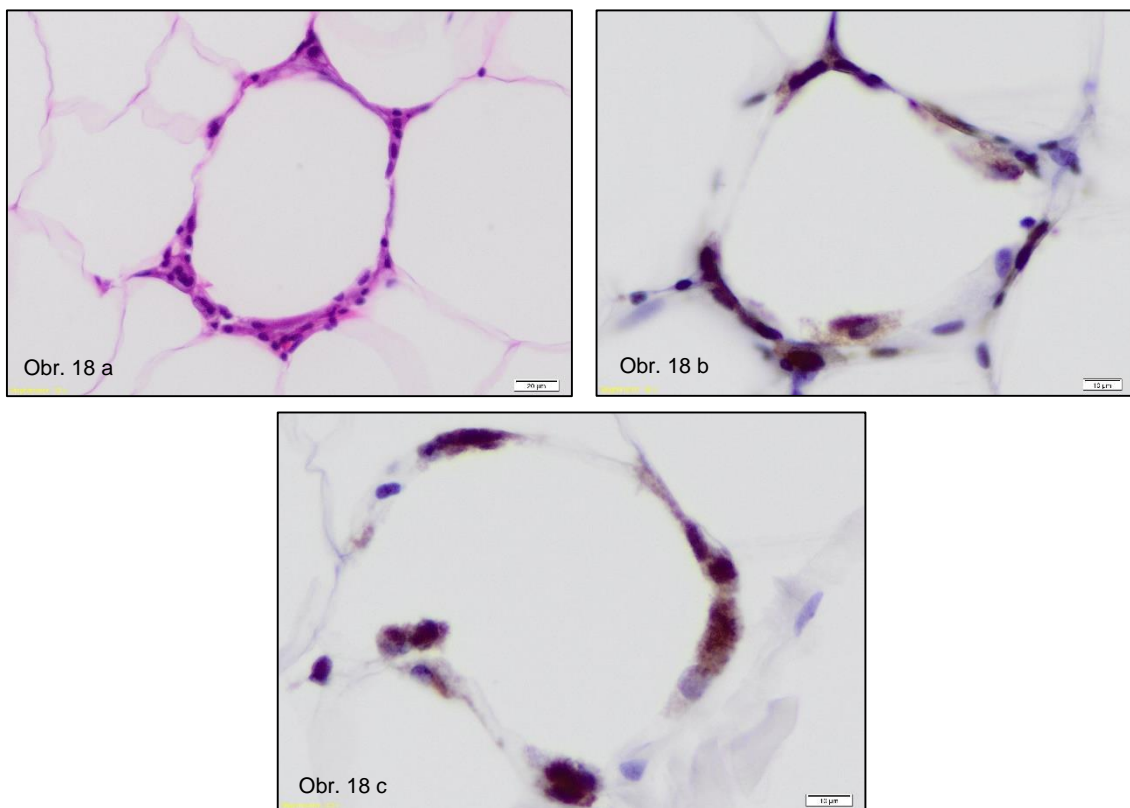
Obr. 16. Bílá tuková tkáň u pacientů bez diabetu: (a) podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 49,8; bez diabetu), šipky ukazují CD204 pozitivní makrofágy, (b) viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 49,8; bez diabetu). CD204.

U obézních pacientů s diabetem byla nalezena rozsáhlá infiltrace makrofágy. Bylo nalezeno velké množství CD68 pozitivních makrofágů, ale i početné CD204 pozitivní makrofágy, jak v podkožní, tak i ve viscerální bílé tukové tkáni (obr. 17 a, b, c, d).



Obr. 17 Bílá tuková tkáň u pacientů s diabetem: (a) podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 51, s diabetem); šipky ukazují CD68 pozitivní makrofágy. CD68; (b) viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 51; s diabetem); šipky ukazují CD68 pozitivní makrofágy. CD68; (c) podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 45,1; s diabetem); šipky ukazují CD204 pozitivní makrofágy. CD204; (d) viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 45,1; s diabetem); šipky ukazují CD204 pozitivní makrofágy. CD204.

Jednotlivé makrofágy byly nalezeny v intersticiu v tenkých septech mezi sousedícími adipocyty, zatímco větší skupinky makrofágů byly lokalizovány blízko drobných cév nebo v místech kontaktu mezi více tukovými buňkami. Makrofágy, které obklopovaly rozpadající se adipocyty, tvoří shluky, podobné syncytiím makrofágů, které nacházíme u chronického zánětu, označované jako „crown-like struktury“ (CLS) (obr. 18 a, b, c).



Obr. 18. (a) Viscerální bílá tuková tkáň (muž; BMI 36,7; bez diabetu). HE; (b) viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 43,8; s diabetem). CD68; (c) podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 39,4; bez diabetu). CD68.

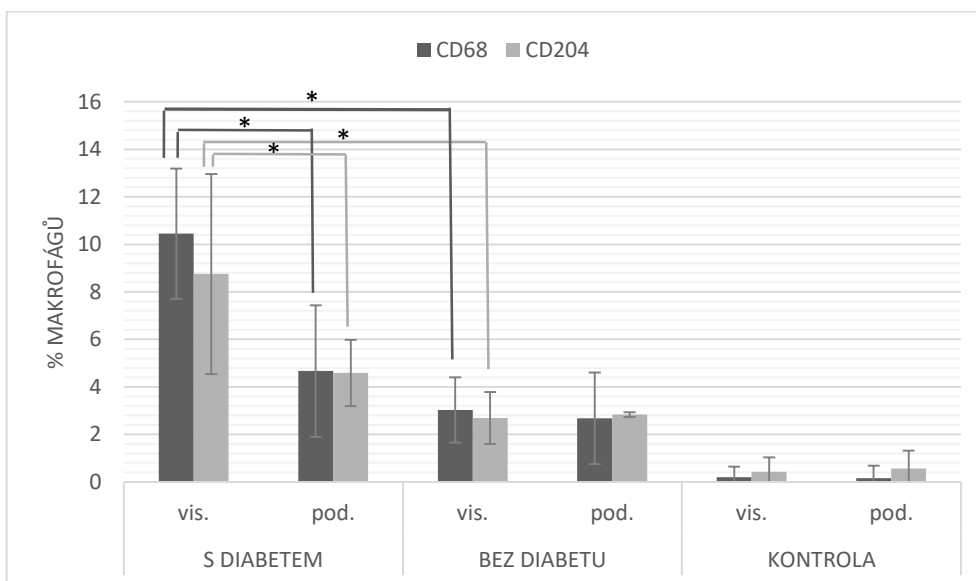
Tyto CLS struktury byly v tukové tkáni náhodně rozptýleny. Přičemž jejich výskyt byl častější ve viscerální bílé tukové tkáni patologicky obézních. Na formování CLS struktur se podílely jak CD68, tak i CD204 pozitivní makrofágy. CD204 pozitivní makrofágy byly nalezeny ve stejných lokacích jako CD68 pozitivní makrofágy.

4.3 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA POČTU MAKROFÁGŮ

Kvantitativní analýza počtu makrofágů ve všech parametrech u obézních pacientů s diabetem a u pacientů bez diabetu prokázala statisticky významný nárůst ve srovnání s kontrolní skupinou. Největší počet CD68+ makrofágů a CD204+ byl nalezen ve viscerální bílé tukové tkáni obézních pacientů s diabetem. Počet přítomných CD204+ makrofágů byl statisticky významně nižší ve srovnání s množstvím CD68+ makrofágů. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi výskytem CD68+ makrofágů a CD204+ makrofágů v podkožní bílé tukové tkáni (Tab. 5, Graf 1).

	S DIABETEM		BEZ DIABETU		KONTROLA	
	viscerální	podkožní	viscerální	podkožní	viscerální	podkožní
	průměr ± SD		průměr ± SD		průměr ± SD	
CD68	10,45±2,74	4,67±2,77	3,03±1,37	2,68±1,92	0,20±0,45	0,15±0,53
CD204	8,75±4,21	4,59±1,39	2,70±1,09	2,84±0,10	0,43±0,61	0,57±0,75

Tab. 5. Procento makrofágů.



Graf 1. Počet CD68+ a CD204+ makrofágů ve skupině kontrol, pacientů s diabetem a bez diabetu. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami. (vis. – viscerální tuk, pod. – podkožní tuk)

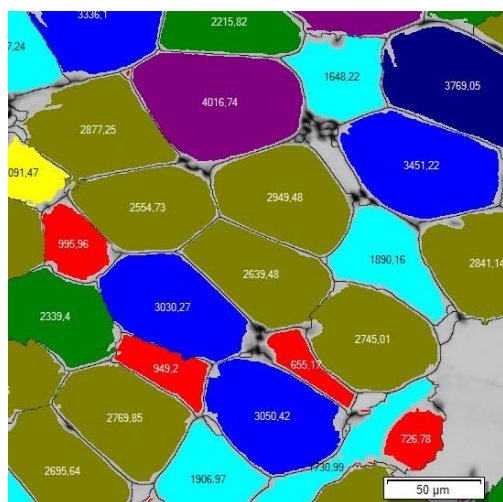
4.4 VELIKOSTI ADIPOCYTŮ: SROVNÁNÍ PODKOŽNÍ A VISCERÁLNÍ TUKOVÉ TKÁNĚ

Do srovnání struktury podkožní a viscerální bílé tukové tkáně u patologicky obézních pacientů s diabetem a bez diabetu bylo z našeho souboru pacientů vybráno pět morbidně obézních žen s diabetem ve věku 40-51 let, s BMI v rozmezí 40,0-51,1 a pět morbidně obézních žen bez diabetu ve věku 43-47 let, s BMI v rozmezí 40,4-54,2. Jako kontrolní skupina bylo vybráno 5 žen ve věku 39-55 let, s BMI ve fyziologickém rozmezí (Tab. 6).

	OBÉZNÍ PACIENTI				NEOBÉZNÍ PACIENTI	
	S DIABETEM		BEZ DIABETU		KONTROLA	
n	Věk	BMI	Věk	BMI	Věk	BMI
1	40	40	46	40,4	52	27
2	47	51,1	43	49,8	39	21
3	51	43,4	47	54,2	50	25
4	48	43,8	44	43,1	55	18
5	47	45,4	45	46,8	49	23
Průměr	46,6	44,74	45	46,86	49	22,8
Max.	51	51,1	47	54,2	55	27
Min.	40	40	43	40,4	39	18

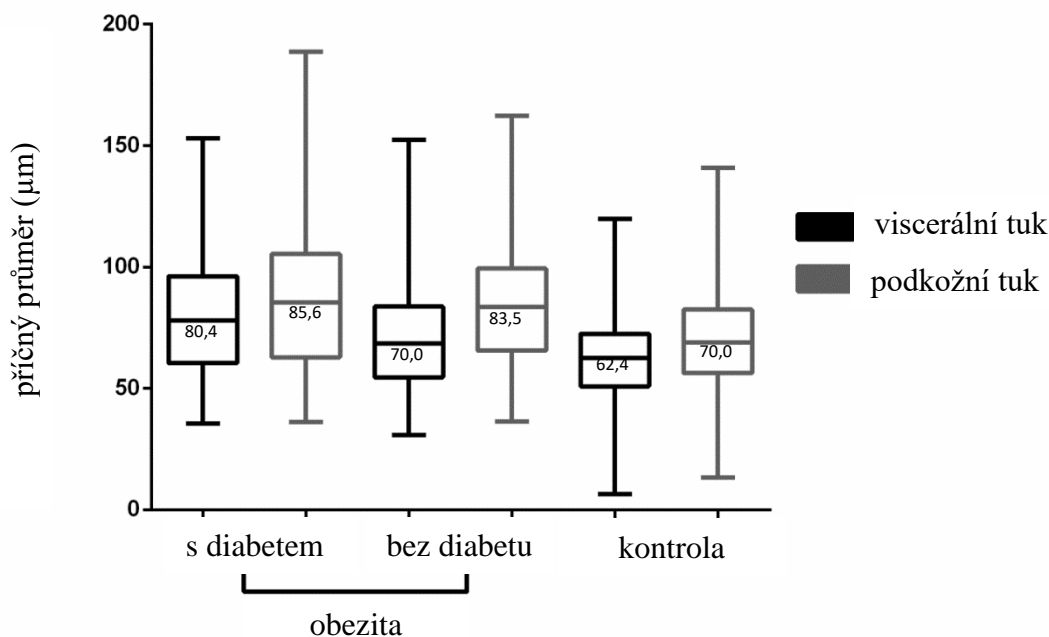
Tab. 6

S použitím systému obrazové analýzy Olympus cellSens system byla vyhodnocena průměrná velikost adipocytů u jednotlivých skupin pacientek (Obr. 19). Ze stanoveného objemu adipocytů jednotlivých buněk byla vypočtena hodnota velikosti jejich průměru.



Obr. 19. Obrazová analýza Olympus cellSens system.

Z hodnot, které byly naměřeny, je zřejmé, že adipocyty viscerální bílé tukové tkáně jsou menší než adipocyty podkožní bílé tukové tkáně. Dále bylo prokázáno, že jak viscerální, tak i podkožní bílá tuková tkáň obsahuje větší tukové buňky ve srovnání s adipocyty u kontrolní skupiny ve stejné lokalizaci. Při testování statistické významnosti byl prokázán statisticky vysoce významný rozdíl. Pouze při srovnání velikosti podkožních adipocytů u skupiny s diabetem a bez diabetu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl (Graf 2, Tab. 7).



Graf 2. Průměrné velikosti adipocytů s uvedením mediánů, 75. a 25. percentilu, největší a nejmenší naměřená hodnota pro jednotlivé skupiny.

VÝSLEDKY KRUSCAL-WALLIS A MANN-WHITNEY TESTU		
VISCERÁLNÍ TUK	kontrola vs. diabetes	**** P < 0,0001
	kontrola vs. bez diabetu	**** P < 0,0001
	diabetes vs. bez diabetu	**** P < 0,0001
	kontrola vs. obezní (M-W test)	**** P < 0,0001
PODKOŽNÍ TUK	kontrola vs. diabetes	**** P < 0,0001
	kontrola vs. bez diabetu	**** P < 0,0001
	diabetes vs. bez diabetu	nesignif. P > 0,9999
	kontrola vs. obezní (M-W test)	**** P < 0,0001

Tab. 7. Výsledky testování statistické významnosti.

Tabulka č. 8 a 9 shrnuje průměrné hodnoty nalezené u jednotlivých pacientek. Skupiny jsou poměrně homogenní s výjimkou nálezů u viscerální bílé tukové tkáně pacientek s diabetem. Zde byly nalezeny dvě pacientky s podstatně větší průměrnou hodnotou velikosti adipocytů. Při histologické analýze byla u těchto dvou pacientek nalezena podstatně větší infiltrace makrofágy a četné známky rozpadu adipocytů.

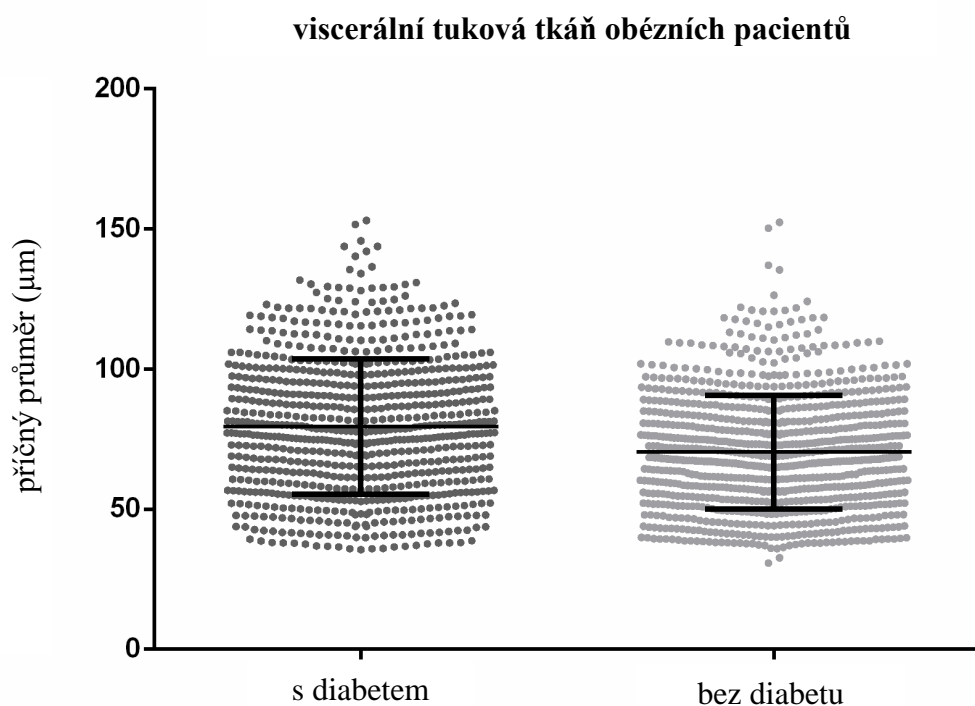
KONTROLY			
VISCERÁLNÍ TUK		PODKOŽNÍ TUK	
n	průměr ± SD	n	průměr ± SD
107	59,96 ± 13,77	118	71,24 ± 16,75
147	50,31 ± 16,25	112	58,04 ± 13,67
119	77,64 ± 17,90	118	81,86 ± 22,64
126	62,11 ± 13,71	129	74,67 ± 18,78
118	62,20 ± 17,00	118	64,30 ± 18,37

Tab. 8. Průměrné velikosti adipocytů u skupiny kontrol.

OBÉZNÍ PACIENTI							
S DIABETEM				BEZ DIABETU			
VISCERÁLNÍ TUK		PODKOŽNÍ TUK		VISCERÁLNÍ TUK		PODKOŽNÍ TUK	
n	průměr ± SD	n	průměr ± SD	n	průměr ± SD	n	průměr ± SD
185	72,15 ± 19,00	171	82,04 ± 27,40	188	75,88 ± 21,45	131	86,87 ± 20,32
144	69,67 ± 22,57	117	95,45 ± 32,11	158	75,34 ± 24,67	148	89,10 ± 30,79
110	97,49 ± 28,40	163	79,12 ± 25,51	197	67,73 ± 18,51	106	85,34 ± 24,05
175	76,58 ± 20,17	113	81,83 ± 28,33	149	70,00 ± 19,82	139	81,04 ± 21,22
146	88,49 ± 22,07	145	89,28 ± 25,49	215	64,50 ± 15,14	153	76,34 ± 20,91

Tab. 9. Průměrné velikosti adipocytů u pacientek morbidně obézních s diabetem a bez diabetu.

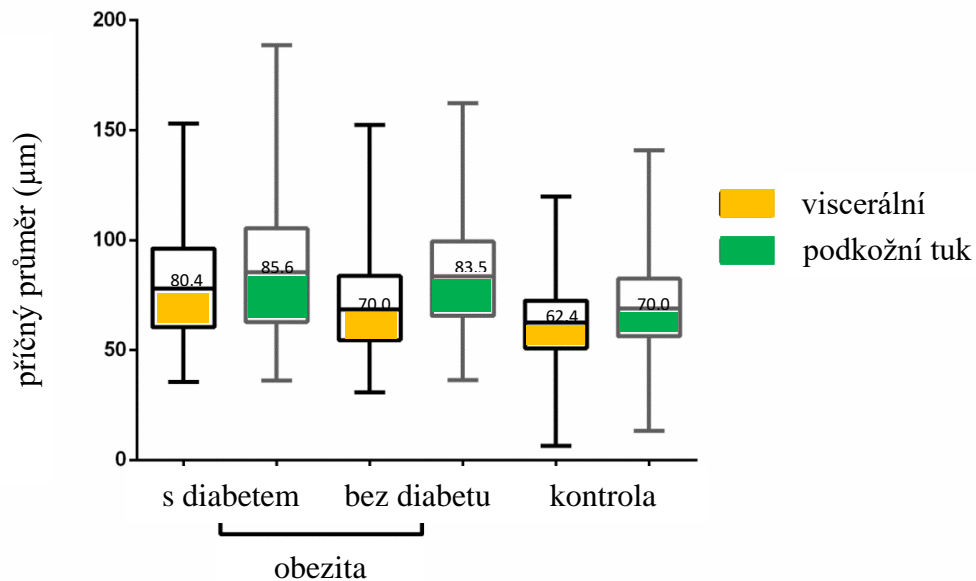
V grafu č. 3 je znázorněna distribuce velikosti adipocytů ve viscerální bílé tukové tkáni pacientů s diabetem a bez diabetu. Z grafu je zřejmé, že distribuce velikosti se liší u pacientů s diabetem a bez diabetu. U pacientů s diabetem byly nalezeny četnější velké buňky, které odpovídají hypertroficky změněným adipocytům procházejícím procesem apoptózy.



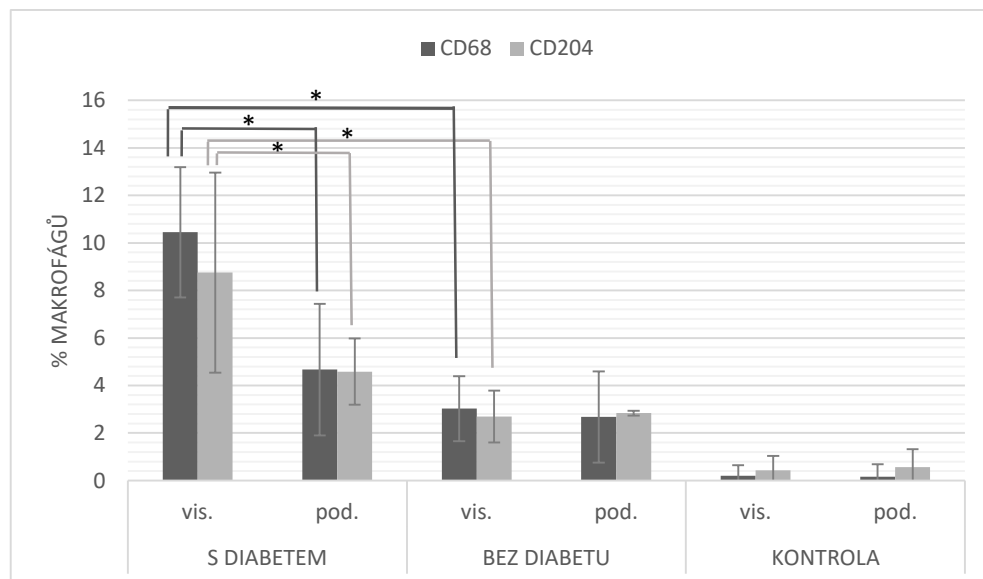
Graf 3. Distribuce velikostí adipocytů ve viscerální bílé tukové tkáni pacientů s diabetem a bez diabetu. Jeden bod zde odpovídá jedné naměřené hodnotě, vodorovná čára je průměr a svislá úsečka je směrodatná odchylka.

4.5 VZTAH MEZI VELIKOSTÍ ADIPOCYTŮ A VÝSKYTEM MAKROFÁGŮ

Na základě zjištěných hodnot množství makrofágů a velikostí tukových buněk byl srovnán vztah mezi velikostí adipocytů a stupněm infiltrace makrofágy u patologicky obézních pacientů. Bylo zjištěno, že velikost tukových buněk pozitivně koreluje s výskytem makrofágů v bílé tukové tkáni patologicky obézních (Graf 4, 5).



Graf 4. Průměrné velikosti adipocytů s uvedením mediánů, 75. a 25. percentilu, největší a nejmenší naměřená hodnota pro jednotlivé skupiny.



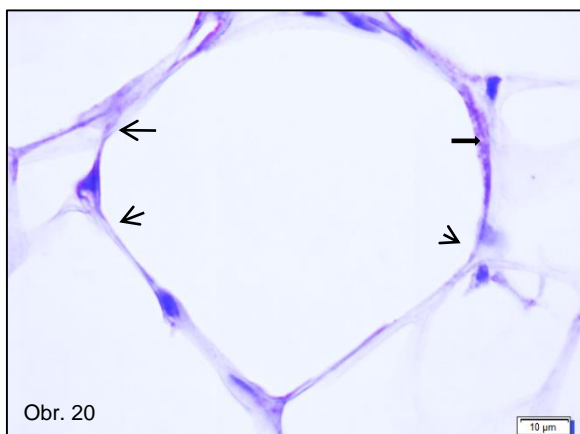
Graf 5. Počet CD68+ a CD204+ makrofágů ve skupině kontrol, pacientů s diabetem a bez diabetu. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami. (vis. – viscerální tuk, pod. – podkožní tuk)

4.6 APOPTÓZA ADIPOCYTŮ

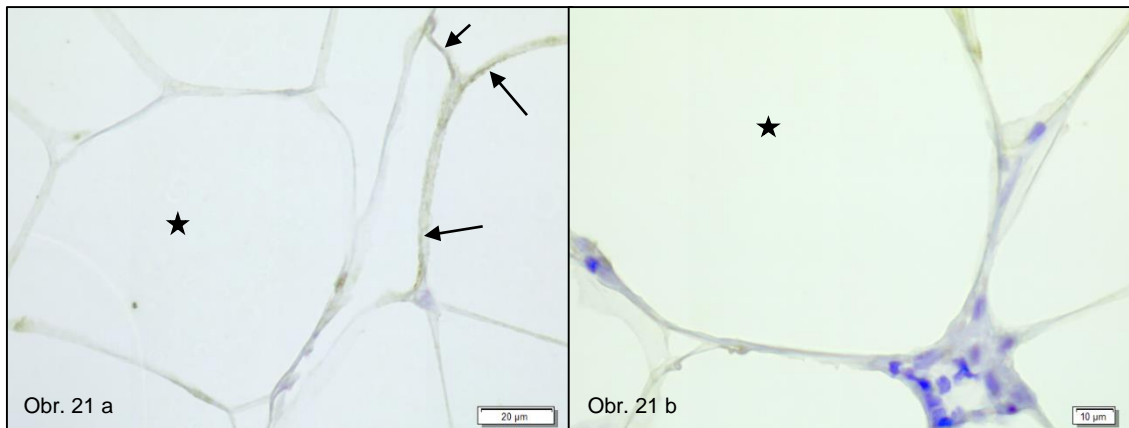
Ve vzorcích podkožní a viscerální bílé tukové tkáně patologicky obézních pacientů byla sledována exprese onkoproteinu Bcl2.

V cytoplazmě většiny tukových buněk byla nalezena exprese onkoproteinu Bcl2. Exprese Bcl2 nebyla lokalizována v cytoplazmě adipocytů se známkami degenerativních změn. Bcl2 negativní buňky byly nalezeny většinou jednotlivě, ojediněle byly přítomny jako malé klastry buněk. Častěji se popsané změny vyskytovaly v podkožní bílé tukové tkáni, než ve viscerální bílé tukové tkáni.

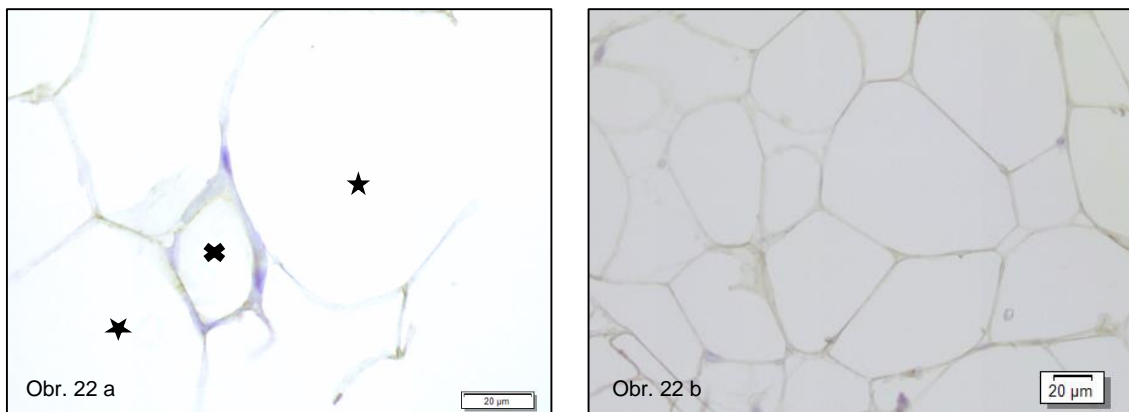
Byla prokázána negativní korelace mezi BMI a mírou exprese Bcl2 v adipocytech obézních osob.



Obr. 20. Podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 45,4; bez diabetu). Adipocyt průměrné velikosti bez morfologických změn s průkazem Bcl2 (šipky) v cytoplasmě. Větší akumulace je na tangenciálním řezu cytoplasmou (tlustá šipka). Bcl2.



Obr. 21 (a) Podkožní bílá tuková tkáň (muž; BMI 43,8, s diabetem). Adipocyt bez dystrofických změn s aktivitou Bcl2 v cytoplasmě (šipky). Hypertrofický adipocyt bez cytoplasmatické aktivity Bcl2 (hvězdička). Bcl2. (b) Podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 43; bez diabetu). Hypertrofický adipocyt (hvězdička) v blízkosti zánětlivě infiltrovaného perivaskulární intersticia. Bcl2.

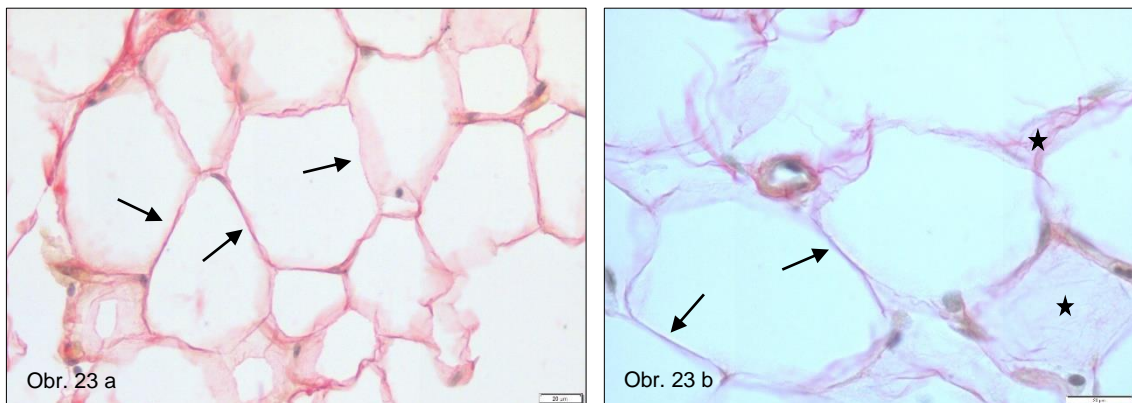


Obr. 22 (a) Viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 54,2; bez diabetu). Hypertrofické adipocyty (hvězdička) a výrazněji dystroficky změněný adipocyt (křížek) bez aktivity Bcl2. Bcl2. (b) Podkožní bílá tuková tkáň (žena, BMI 45,1; s diabetem). Oblast hypertrofických adipocytů. Bcl2.

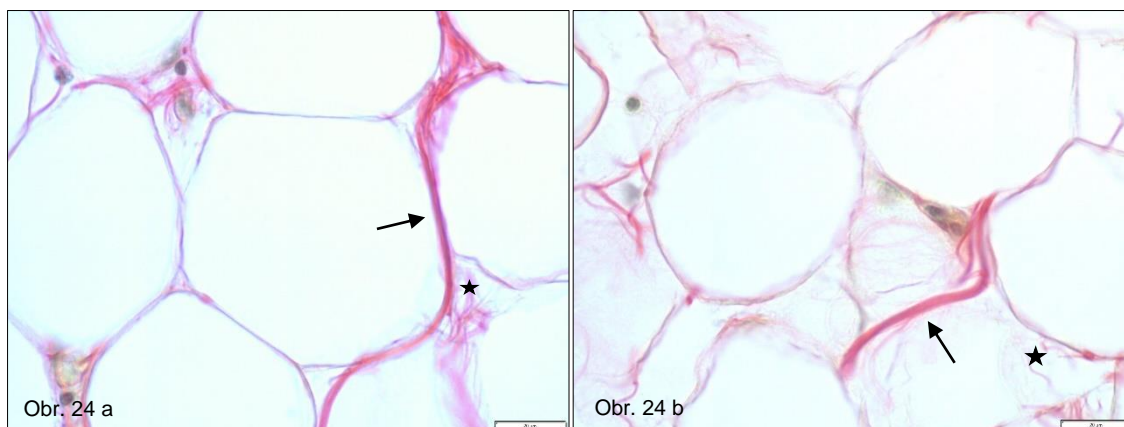
4.7 FIBRÓZA PODKOŽNÍ A VISCERÁLNÍ BÍLÉ TUKOVÉ TKÁNĚ

Za pomoci barvení Weigertův železitý hematoxylin – van Gieson byla srovnána stavba a rozsah intersticiální tkáně v bílé tukové tkáni žen s fyziologickými hodnotami BMI a morbidně obézních žen s diabetem II. typu a bez diabetu.

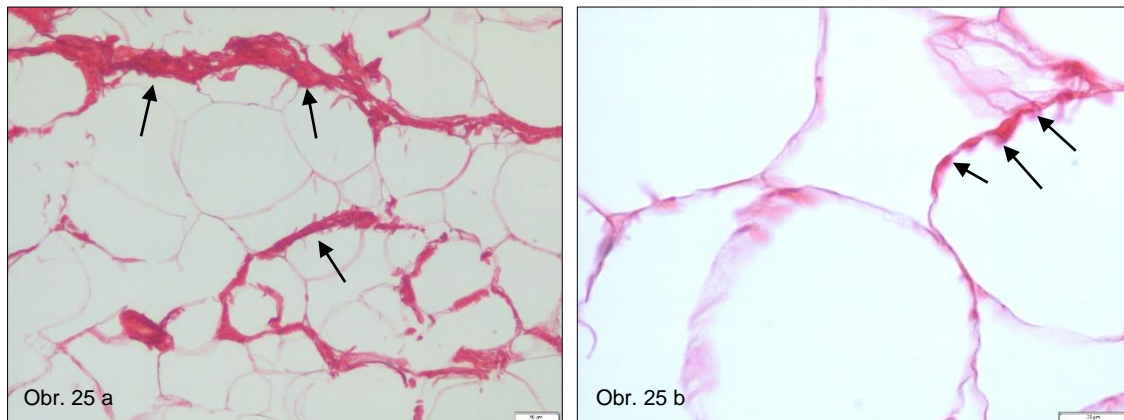
Nejmenší množství vazivového intersticia jsme našli jak v podkožní tak i ve viscerální bílé tukové tkáni neobézních žen bez diabetu. U morbidně obézních bylo zřetelné zmnožení intersticiálního vaziva. Nejvýraznější fibrotické změny byly přítomny v omentální tukové tkáni morbidně obézních žen s diabetem.



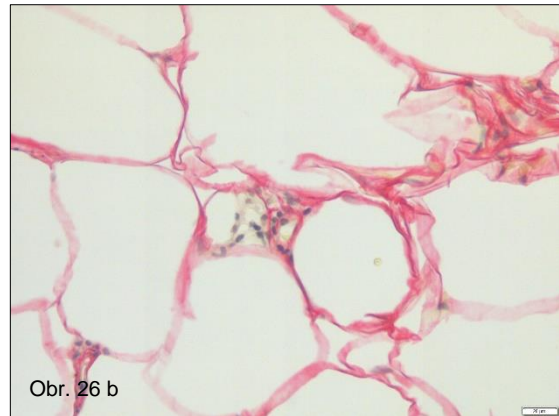
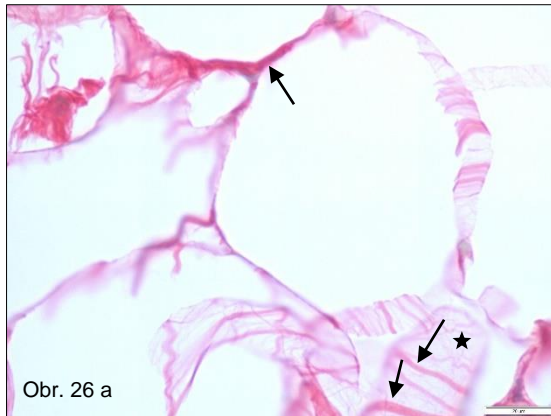
Obr. 23 (a) Podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 27; bez diabetu): Jednotlivá tenká kolagenová vlákna mezi adipocyty (šipky) nebo v perivaskulárních prostorech. Weigertův železitý hematoxylin-van Gieson. (b) Podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 27; bez diabetu). Jednotlivá tenká kolagenová vlákna mezi adipocyty (šipky). Velmi jemná síť kolagenu v intercelulárním prostoru mezi dvěma adipocyty (hvězdičky). Weigertův železitý hematoxylin-van Gieson.



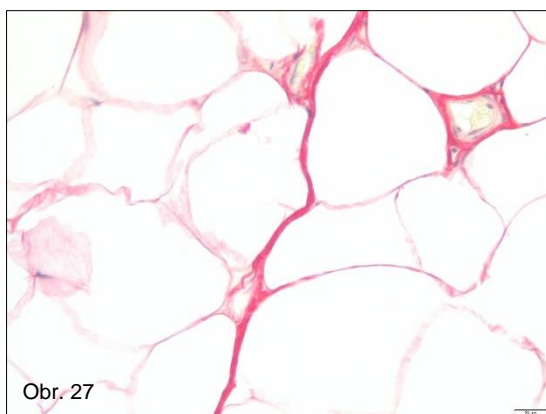
Obr. 24 (a) Viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 21; bez diabetu). Jedno izolované velké kolagenové vlákno (šipka). Jemnější kolagenová vlákna se nacházejí v perivaskulárních prostorech (hvězdička). V kontaktech mezi adipocyty nejsou kolagenová vlákna. Weigertův železitý hematoxylin-van Gieson. (b) Viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 21; bez diabetu). Jedno izolované velké kolagenové vlákno (šipka). Jemnější kolagenová vlákna se nacházejí v malém množství v intercelulárním prostoru mezi dvěma adipocyty (hvězdička). Weigertův železitý hematoxylin-van Gieson.



Obr. 25 (a) Viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 40; s diabetem). Značný nárůst intersticiální tkáně s četnými kolagenovými vlákny (šipky). Weigertův železitý hematoxylin-van Gieson. (b) Viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 40; s diabetem). Několik průřezů skrz větší kolagenová vlákna mezi sousedními adipocyty (šipky). Weigertův železitý hematoxylin-van Gieson.



Obr. 26 (a) Viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 40; s diabetem). V mezibuněčných prostorech mezi dvěma adipocyty jsou vidět jemnější kolagenová vlákna v husté síti (hvězdička) spolu s většími vlákny (šipky). Weigertův železitý hematoxylin-van Gieson. (b) Podkožní bílá tuková tkáň (žena; BMI 51; s diabetem). Malé zvýšení kolagenických vláken ve srovnání s viscerální bílou tukovou tkání. Weigertův železitý hematoxylin-van Gieson.

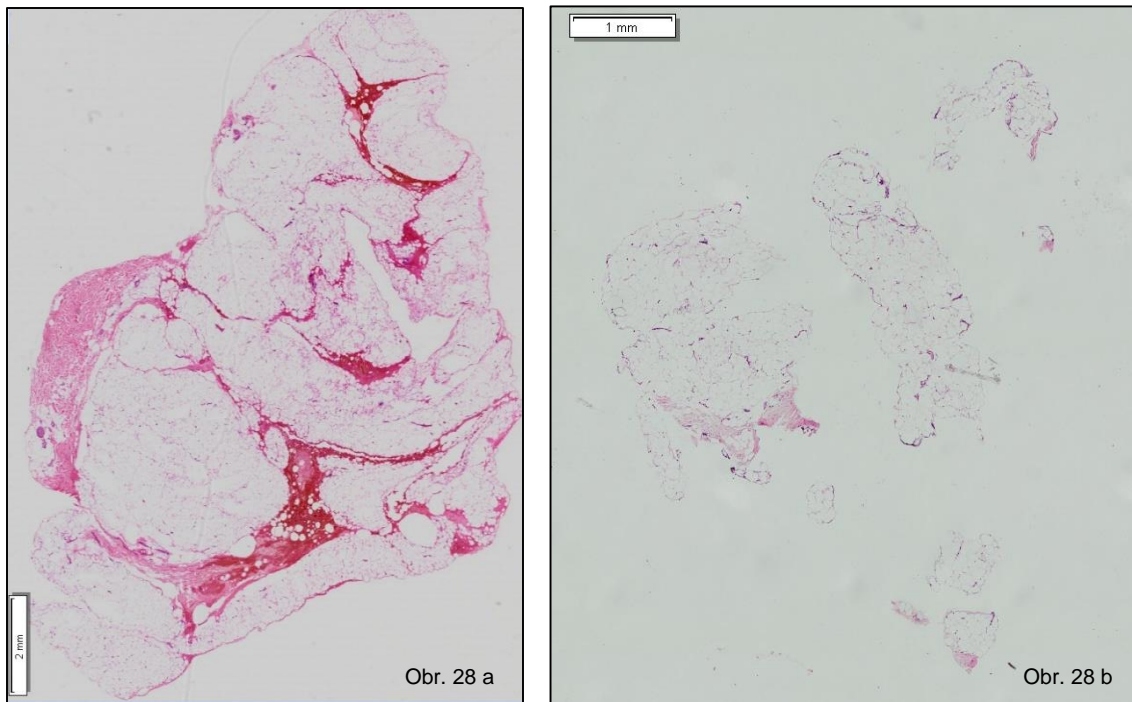


Obr. 27. Viscerální bílá tuková tkáň (žena; BMI 42; bez diabetu). Uspořádání a množství kolagenických vláken odpovídá struktuře neobézních a zdravých. Weigertův železitý hematoxylin-van Gieson.

4.8 SROVNÁNÍ METOD ODBĚRU BÍLÉ TUKOVÉ TKÁŇĚ

Pro zajištění platných a srovnatelných údajů o výzkumu, kdy z etických důvodů není možné získání vzorků bílé tukové tkáně klasickou metodou excize, byly srovnány morfometrické parametry a struktura podkožní bílé tukové tkáně odebrané klasickou metodou excize a silnou bioptickou jehlou Medax.

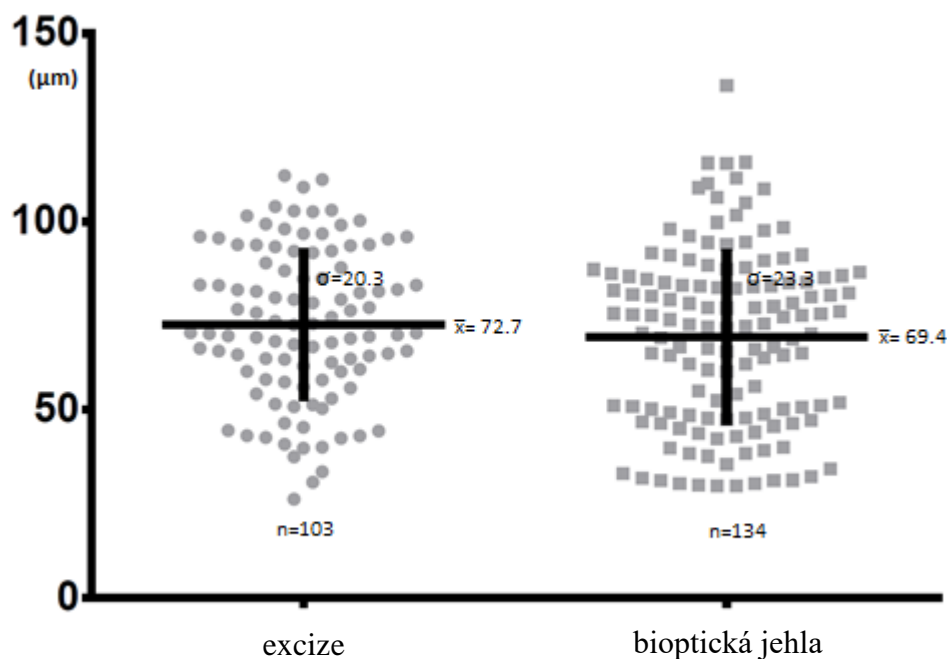
Patrný rozdíl mezi vzorky získanými dvěma výše uvedenými metodami koreloval s množstvím odebrané tkáně k hodnocení. Klasická bioptická excize zachytila plochu tkáně o velikosti přibližně 100 mm², zatímco vzorek bílé tukové tkáně odebraný bioptickou jehlou Medax byl asi 20x menší, přibližně tedy 5 mm². Kvalita vzorků tkání však byla srovnatelná.



Obr. 28 (a) Podkožní bílá tuková tkáň získaná chirurgickou excizí (žena; BMI 40,4; bez diabetu). HE; (b) Podkožní bílá tuková tkáň získaná bioptickou jehlou Medax (muž; BMI 48,3; bez diabetu). HE.

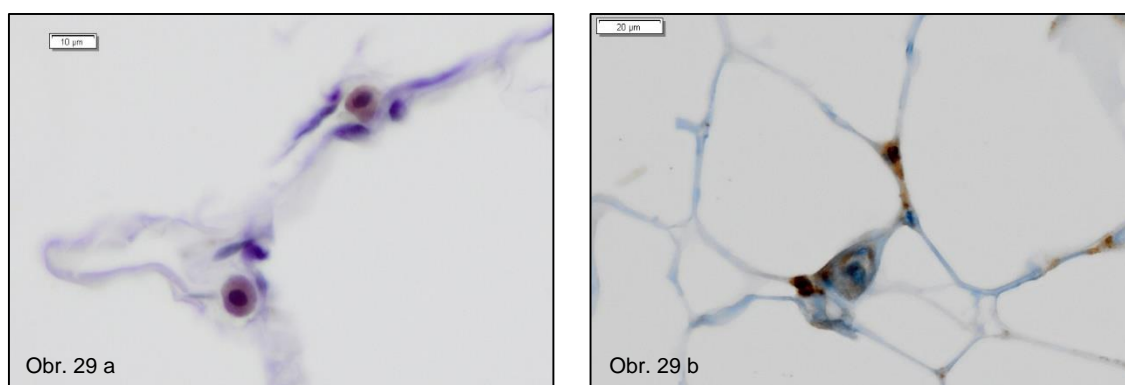
U bioptických vzorků získaných excizí byla možnost hodnocení celkové struktury bílé tukové tkáně, včetně morfologie větších cév, tloušťky a uspořádání vazivových sept. U vzorků získaných bioptickou jehlou byla schopnost analýzy těchto struktur omezena malou oblastí vzorku.

Byla srovnána velikost adipocytů ve vzorcích bílé tukové tkáně získané excizí a pomocí bioptické jehly Medax. Průměrná velikost adipocytů ve vzorku bílé tukové tkáně získané excizí byla $72,7 \pm 20,3 \mu\text{m}$ a ve vzorku bílé tukové tkáně získané bioptickou jehlou Medax byla $69,4 \pm 23,3 \mu\text{m}$ (Graf 6). Statistická významnost rozdílu velikosti adipocytů byla testována pomocí t-testu ($p = 0,2521$) v programu GraphPad Prism 6. Nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl.



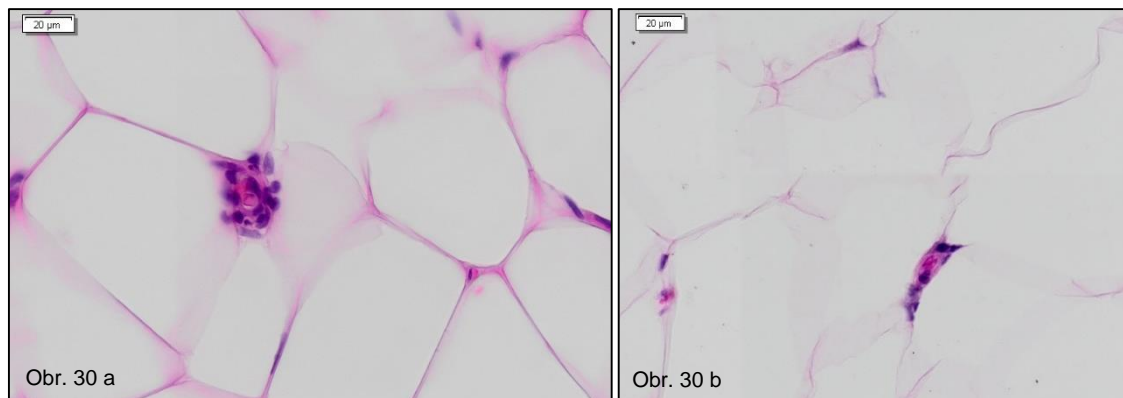
Graf 6.

V bílé tukové tkáni získané rozdílnými metodami odběru nebyly zjištěny rovněž žádné rozdíly v počtu nebo rozložení CD68 pozitivních makrofágů (Obr. 29 a, b).



Obr. 29 (a) Podkožní bílá tuková tkáň (muž; BMI 41,5; s diabetem). Excize. CD68; (b) Podkožní bílá tuková tkáň (muž; BMI 48,3; bez diabetu). Bioptická jehla Medax. CD68.

Ve vzorcích podkožní bílé tukové tkáně získaných oběma metodami byla zřejmá i perivaskulární infiltrace (Obr. 30 a, b).



Obr. 30 (a) Podkožní bílá tuková tkáň (muž; BMI 42,9; bez diabetu). Excize. HE; (b) Podkožní bílá tuková tkáň (muž; BMI 48,3; bez diabetu). Bioptická jehla Medax. HE.

5 DISKUSE

Zánět bílé tukové tkáně silně koreluje s nemocemi spojenými s obezitou. Nedávné studie ukazují, že počet makrofágů tukové tkáně je velmi silným prediktorem obezity spojenou s inzulínovou rezistencí (Klötting et al., 2010). Obezita, rozložení tukové tkáně a ztráta hmotnosti vedou k významným změnám v počtu makrofágů tukové tkáně exprimujících povrchové markery typu M1 nebo M2 (Aron-wisnewsky et al., 2009). U obezity je v tukové tkáni zastoupena ve velkém množství subpopulace M1 makrofágů (Nguyen et al.; Lumeng et al., 2007). Tyto M1 makrofágy jsou vysoce prozánětlivé a uvolňují řadu cytokinů/ chemokinů, které mohou vést prostřednictvím parakrinních a endokrinních mechanismů ke snížení citlivosti na inzulín (Tilg et Moschen, 2006; Lumeng et al., 2007).

Cílem práce bylo prozkoumat přítomnost makrofágů v podkožní a viscerální bílé tukové tkáni patologicky obézních, jejich fenotypizaci a zjistit podíl CD204+ makrofágů v celé populaci makrofágů v bílé tukové tkáni obézních pacientů ve vztahu k diabetu 2. typu. Toto vyšetření se opírá o využití povrchových markerů pro detekci makrofágů M1 a M2. Imunohistochemické barvení CD68 je všeobecně známé jako marker všech makrofágů, zatímco CD204 slouží jako marker pro diferenciaci M2 subtypu makrofágů (Catrysse et van Loo, 2018; Klimcakova et al., 2011). Nejnovější studie popisují složitější formy aktivace makrofágů než předchozí model M1/M2. Fenotyp makrofágů je určen spektrem podnětů v jejich mikroprostředí (Suzuki et al., 2017).

Makrofágy infiltrují jak viscerální, tak i podkožní bílou tukovou tkáň obézních pacientů (Harman-Boehm et al., 2007). Zjistili jsme signifikantně vyšší výskyt CD68+ a CD204 + makrofágů v omentální bílé tukové tkáni ve srovnání s podkožní bílou tukovou tkání. Vzhledem k tomu, že vývoj viscerálních adipocytů se liší od diferenciaci podkožních adipocytů, lze předpokládat, že se tyto adipocyty liší svým potenciálem přilákat makrofágy sekrecí cytokinů (Gesta et al., 2007).

Již dříve bylo popsáno, že viscerální tuková tkáň exprimuje vyšší hladinu cytokinů a podílí se na aktivaci dalších genů souvisejících s makrofágy a zánětem (Gesta et al., 2007). Harman-Boehm se svými spolupracovníky zjistili, že u lidí existuje vyšší úroveň infiltrace makrofágů v omentální tukové tkáni jak u neobézních, tak i u obézních jedinců.

Je to patrné zejména u centrálního typu obezity (Harman-Boehm et al., 2007; Curat et al., 2006).

Bylo popsáno, že u obezity dochází nejen ke zvýšení počtu makrofágů v tukové tkáni, ale existuje také zřejmý přechod od M2 protizánětlivých makrofágů k M1 prozánětlivému fenotypu. Tyto makrofágy M1 produkují zánětlivé cytokiny a chemokiny, jako je TNF α , IL-1, IL-6 a MCP-1. A to indukuje inzulinovou rezistenci v adipocytech (Xu et al., 2003; Shin et al., 2017; Thomas et Apovian, 2017; Stolarczyk, 2017).

Expres mnoha markerů M2 makrofágů koreluje s prozánětlivou sekrecí cytokinů v bílé tukové tkáni obézních jedinců (Zeyda et Stulnig, 2007).

Makrofágy obézních jedinců vykazují povrchové markery, které neodpovídají klasické (M1) ani alternativní (M2) aktivaci, ale spíše stavu metabolické aktivace indukované různými metabolickými stimuly (např. volnými mastnými kyselinami, vysokou hladinou inzulinu, vysokou hladinou glukózy) (Kratz et al., 2014).

Po bariatrické operaci, která byla prováděna u morbidně obézních pacientů pro redukci hmotnosti, došlo ke snížení počtu makrofágů a v bílé tukové tkáni byla pozorována snížená zánětlivá genová exprese (monocytový chemotaktický protein [MCP-1], urokinázový receptor aktivátoru plasminogenu [PLAUR], faktor stimulující kolonie [CSF-3]). Podobně bylo pozorováno snížení počtu makrofágů v bílé tukové tkáni u obézních jedinců po úpravě jejich životního stylu (dieta, cvičení) (Canello et al., 2005; Lumeng et al., 2007).

Zdravá tuková tkáň neobézních jedinců obsahuje protizánětlivé makrofágy M2, které udržují tkáňovou homeostázu a citlivost na inzulin vylučováním protizánětlivého cytokinu IL-10. V našem materiálu, získaného od neobézních osob, byl pouze velmi malý počet makrofágů M2. Na základě kinetických studií prováděných u obézních myší se předpokládá, že před infiltrací tukové tkáně makrofágy M1 jsou přítomny další buňky zahrnující neutrofile, CD8⁺ T buňky a žírné buňky (Lee et Lee, 2014) Obezita je spojena se ztrátou rovnováhy mezi populacemi makrofágů M1 a M2, kdy M1 prozánětlivé makrofágy významně převyšují počet protizánětlivých makrofágů M2 (Lumeng et al., 2008).

Na základě nejnovějších, zejména imunologických studií (Russo et Lumeng, 2018), lze konstatovat, že CD68⁺ i CD204⁺ makrofágy hodnocené v našich vzorcích jsou tzv. rezidentní makrofágy. Při obezitě tyto buňky proliferují a metabolické signály, jako

je vysoká hladina inzulínu, volné kyseliny, vysoká hladina glukózy, oxidované lipoproteiny o nízké hustotě, oxidované fosfolipidy, mohou navíc měnit fenotyp těchto makrofágů a mohou se metabolicky aktivovat (Catrysse et van Loo, 2018; Murray et al., 2014; Russo et Lumeng, 2018).

Velikost adipocytů je obecně považována za důležitý indikátor zdraví tukové tkáně (Weyer et al., 2000; Laforest et al., 2017). V naší studii jsme prokázali nejvýraznější změny ve velikosti viscerálních adipocytů ve skupině morbidně obézních žen s diabetem 2. typu. Velikost jejich adipocytů se statisticky významně lišila od velikosti obézních bez diabetu. U podkožní tukové tkáně jsme podobný rozdíl neprokázali. Stejný trend jsme prokázali při studiu infiltrace tukové tkáně makrofágy. Největší počet makrofágů jsme našli ve viscerální tukové tkáni žen s diabetem 2. typu.

Nalezené zvětšení adipocytů u obézních je dobře známo (Skurk et al., 2007; Michaud et al., 2016; Lessard et al., 2014; Bays et al., 2008), byl popsán také rozdíl ve velikosti podkožních a viscerálních adipocytů (O'Connell et al., 2010; Laforest et al., 2017; Michaud et al., 2016; Lessard et al., 2014; Hoffstedt et al., 2010; Garaulet et al., 2006; Pope et al., 2016). Zvětšení velikosti je způsobeno hromaděním triglyceridů v důsledku vysoké hladiny zdrojů energie. Po naplnění skladovací kapacity adipocytů dochází k vytváření ektopických tukových depot v játrech, svalech a jinde (Hoffstedt et al., 2010; Grigoraș et al., 2018; Monteiro et al., 2006). U zvětšených adipocytů dochází ke změnám v produkci chemokinů zejména k nárůstu vylučování pro-zánětlivých cytokinů (Skurk et al., 2007). Zvětšené adipocyty exprimují a vylučují zvýšené množství leptinu. Zvětšené adipocyty s větší pravděpodobností podléhají buněčné smrti (Monteiro et al., 2006).

Velikost viscerálních adipocytů je považována za marker inzulínové rezistence a metabolického syndromu. Velké adipocyty jsou rezistentní k antilipolytickému efektu inzulínu (Lönn et al., 2010; Weyer et al., 2000; Hoffstedt et al., 2010). Při zmenšení tělesné váhy (vyvolané např. chirurgickým zákrokem, dietou apod.) dochází ke zmenšení velikosti adipocytů, zlepšení citlivosti k inzulínu a úpravě produkce adipokinů (Murphy et al., 2017; Löfgren et al., 2005).

Bredela a spol. našli po podání růstového hormonu v dávce 2 mg/kg/den zmenšení velikosti podkožních adipocytů a zlepšení glukozové tolerance (Bredella et al., 2017).

Hoffstedt a spol. uvádí, že zvýšený počet malých adipocytů (hyperplazie) má protektivní účinek na rozvoj změn v metabolismu lipidů, glukózy a citlivosti buněk k inzulínu (Hoffstedt et al., 2010).

Nepřítomnost malých adipocytů u našich morbidně obézních pacientek je možno vysvětlit poruchou tvorby nových tukových buněk, což vede k většímu ukládání triglyceridů do již diferencovaných buněk, jejich hypertrofii a dalším výše popsaným metabolickým změnám (McLaughlin et al., 2010; Fang et al., 2015; Michaud et al., 2016; Pasarica et al., 2009). Lessard a spol. vysvětlují hypertrofii viscerálních adipocytů limitovanou schopností adipogeneze z preadipocytů v podkožní tukové tkáni, bráníci akumulaci tuku v podkoží, což působí přebytek lipidů viscerálního kompartmentu (Lessard et al., 2014).

Byla provedena analýza fibrózy ve viscerální a podkožní bílé tukové tkáni obézních pacientů s diabetem a bez diabetu a zdravých neobézních jedinců. Fibróza je typicky považována za fibroproliferativní poruchu s nekontrolovanou produkcí složek extracelulární matrix aktivovanými fibroblasty zánětlivým mikroprostředím (Henegar et al., 2008; Keophiphath et al., 2009). Na základě barvení Weigert železitý hematoxylin-van Gieson je analyzována přítomnost a organizace kolagenových vláken v bílé tukové tkáni. Fibrotické změny jsou prezentovány ve svazcích kolagenových vláken různé tloušťky, některá kolagenová vlákna izolují adipocyty od zbytku parenchymu, zejména u obézních jedinců.

V této studii byl prokázán zvýšený objem extracelulární matrix a také větší přítomnost fibrotických změn (svazků kolagenových vláken) v bílé tukové tkáni u obézních jedinců, přičemž nejvýraznější fibrotické změny byly prokázány u obézních pacientů s diabetem.

Stupeň fibrózy v bílé tukové tkáni je sám o sobě spojen s inzulínovou rezistencí a ve fibrózních oblastech se nachází větší množství makrofágů. Předchozí studie u myši naznačují, že nadměrná extracelulární matrix může omezit expanzi adipocytů, což vede k ektopickému ukládání lipidů a nekróze adipocytů (tvorba CLS struktur) (Khan et al.,

2009). Navíc analýza transkriptomického podpisu lidské bílé tukové tkáně obézních jedinců ukázala zvýšení mnoha genů extracelulární matrix (Henegar et al., 2008). Naše výsledky jsou tedy v souladu s výše popsanou teorií, protože adipocyty nejbližší fibrotickým oblastem byly menší, než ty vzdálenější od oblastí ukládání kolagenových vláken. Je však třeba poznamenat, že tyto souvislosti nebyly nalezeny v podkožní bílé tukové tkáni, což naznačuje rozdílné důsledky přítomnosti fibrózy v závislosti na lokalizaci bílé tukové tkáně. Kolagen může omezovat expanzi adipocytů omezením ukládání lipidů, avšak přímá příčinná souvislost se zánětem není jasná (Khan et al., 2009). Pasarica se svými spolupracovníky naznačují, že hypoxie a snížená hustota kapilár v důsledku nadměrné tvorby kolagenových vláken, mohou být základem pro chemotaxi makrofágů a zánět bílé tukové tkáně (Pasarica et al., 2009).

Apoptóza tukové tkáně je relativně obtížně studovaným jevem ve srovnání s jinými tkáněmi. I přesto bylo prokázáno, že dysregulace tohoto procesu přispívá k rozvoji obezity, rozdílu v regionální distribuci tuku nebo lipodystrofií (Sorisky, 2002; Sun et al., 2011).

Naše výsledky ukazují, že apoptóza adipocytů byla u obézních pacientů výrazně zvýšena ve viscerální bílé tukové tkáni. Tinahones a spol. prokázali u morbidně obézních zvýšenou genovou expresi kaspáz CSP 3 a CASP7 stimulujících apoptózu a to jak ve viscerální, tak i podkožní tkáni. Naproti tomu genová exprese Bcl2 výrazně poklesla u obou typů. Současné studie odhalují klíčovou patogenní úlohu apoptózy při náboru makrofágů do bílé tukové tkáně, zánětu a následného metabolického rozvratu, který vede k inzulinové rezistenci. Nedávno bylo popsáno, že během rozvoje obezity vede expanze bílé tukové tkáně k aktivaci apoptotických signálních drah, zahrnující smrtící receptory a mitochondriální dráhy. Tyto cytotoxické signální dráhy vedou k aktivaci efektorových kaspáz a apoptóze adipocytů. Nová terapeutická strategie pro léčbu metabolických komplikací spojených s obezitou může být antiapoptotická terapie s inhibicí buď Fas- (vnější cesta aktivace) nebo mitochondriálně (vnitřní cesta aktivace) zprostředkované cesty (Alkhoury et al., 2010).

Naproti tomu Cinti se svými spolupracovníky publikovali, že obezita je spojena s nekrotickým typem buněčné smrti. Mrtvé adipocyty vykazují několik znaků nekrózy, zahrnující rupturu membrány, dilatované endoplazmatické retikulum a buněčné zbytky v

extracelulárním prostoru, zatímco typické známky apoptózy, jako je kondenzace chromatinu a apoptotická tělíška, nejsou přítomny (Cinti et al., 2005; Tinahones et al., 2013).

Naše výsledky naznačují významnou úlohu tohoto antiapoptotického proteinu v regulaci homeostázy tukové tkáně.

Jedním z cílů naší práce je studium dlouhodobých změn morfologie bílé tukové tkáně po bariatrické operaci. V průběhu bariatrické operace jsme získali vzorky bílé tukové tkáně standardní excizí. Abychom mohli sledovat vývoj změn v bílé tukové tkáni v dlouhodobém horizontu po bariatrickém zákroku, je i z etického hlediska a s ohledem na pacienta, vhodné použít pro odběr bílé tukové tkáně bioptickou jehlu.

Biopsie jehlou je moderní diagnostickou metodou. Pro histologické vyšetření se odebírá malý vzorek tkáně délky 10-20 mm a šířky 1,4-2 mm. Tato metoda odběru je bezpečná, rychlá a spolehlivá a používá se k odběru tkání z orgánů, měkkých tkání nebo nádorů z různých částí lidského těla, nejčastěji při odběru tkáně z prsu nebo jater. Výhodou biopsie jehlou je minimální invazivita, minimální riziko komplikací a odpovídající histologický vzorek. Odběr je prováděn ambulantně bez nutnosti celkové anestezie (Pagni et al., 2014).

Výhodou odběru klasickou metodou excize je poskytnutí dostatečného vzorku tkáně pro stanovení diagnózy. Naopak nevýhodou je zvýšené riziko infekce, vysoká invazivita, větší zátěž pro pacienta, možné poškození přilehlých nervových a cévních struktur a zjizvení. Bioptická excize je také nákladnější (nutnost využití operačního sálu), zdržení případné diagnózy a léčby (z důvodu plánování operačních zákroků) a může nést rizika, která jsou spojená s medikací sedativy nebo celkovou anestezí (Shives, 1993).

Bílá tuková tkáň získaná excizí a bioptickou jehlou při hodnocení za použití obrazové analýzy nevykazovala žádné rozdíly v základních morfometrických vlastnostech tukových buněk.

Hlavní projevy chronického zánětu (perivaskulární infiltrace, CD68 pozitivní makrofágy, velikost a tvar adipocytů) převažují v tukové tkáni patologicky obézních osob a v takové míře, že změny ve studované oblasti nemají žádný vliv na závěrečné hodnocení.

6 ZÁVĚR

1. Potvrdili jsme výskyt makrofágů v podkožní i viscerální tukové tkáni obézních. Makrofágy se vyskytovaly izolovaně (často v septech mezi dvěma adipocyty), nebo byly součástí větších zánětlivých infiltrátů lokalizovaných většinou v blízkosti cév.
2. Nejvíce makrofágů typu M1 jsme našli ve viscerální tukové tkáni obézních s diabetem. V „CLS“ jsme prokázali výskyt M1 i M2 makrofágů. Většina makrofágů však nesla znaky jak M1, tak i M2 makrofágů. Domnívám se, že se jedná o tzv. „rezidentní“ makrofágy dle Russovy klasifikace (Russo, 2018).
3. Kvantitativní analýza počtu CD68 pozitivních a CD204 pozitivních makrofágů prokázala statisticky významné zvětšení proti kontrolní skupině. Nejpočetnější byly CD68 pozitivní makrofágy ve viscerální tukové tkáni pacientů s diabetem 2. typu. Rozdíly v počtu CD68 pozitivních a CD204 pozitivních makrofágů ve všech skupinách nebyly statisticky významné jak u podkožní, tak i viscerální tukové tkáně.
4. Největší adipocyty jsme našli v podkožní tukové tkáni u všech obézních. Viscerální adipocyty se proti kontrolám také zvětšují. Nejvýznamněji u pacientů s diabetem 2. typu.
5. Prokázali jsme pozitivní korelaci mezi velikostí adipocytů a stupněm infiltrace makrofágy.
6. Stupeň exprese onkoproteinu Bcl2 v cytoplazmě adipocytů negativně koreloval s BMI. Častěji jsme Bcl2 pozitivitu nacházeli v podkožní tukové tkáni.
7. Zmnožení zvláště vláknité složky intersticia jsme prokázali jak ve viscerální, tak i v podkožní tukové tkáni. Největší změny byly přítomny u pacientů s diabetem 2. typu.
8. Prokázali jsme, že je možno k morfologickému vyšetření tukové tkáně použít i materiál získaný odběrem silnou bioptickou jehlou.

Naše výsledky potvrdily významnou roli makrofágů tukové tkáně v rozvoji změn vyvolaných obezitou a to nejen na úrovni tukové tkáně, ale zejména u systémových změn, zejména diabetu 2. typu. Terapeutické ovlivnění fenotypu makrofágů se jeví jako perspektivní terapeutický směr.

7 SEZNAM ZKRATEK

ALP	alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase)
apoE	apolipoprotein E
ASP	protein stimulujiící acylaci (acylation-stimulating protein)
ATGL	tuková triacylglycerolová lipáza (adipose triglyceride lipase)
BCAA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (branched chain amino acids)
Bcl	lymfom B-buněk (B-cell lymphoma)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
BMP	kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)
C/EBP α	transkripční faktor (CCAAT enhancer binding protein alpha)
CCR	chemokinový receptor (chemokine receptor)
CD	diferenciační skupina (cluster of differentiation)
CETP	přenašeč cholesterylesterů (cholesterol ester transfer protein)
CIDE	DFFA (DNA fragmentační faktor-a) podobný faktor indukující buněčnou smrt (Cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-a)-like effector)
CLS	„crown-like“ struktura (crown-like structure)
CRP	C – reaktivní protein (C-reactive protein)
CSF	faktor stimulujiící kolonie (colony stimulating factor)
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAG	diacylglycerol
ddH ₂ O	deionizovaná voda
DXA	kostní denzitometrie (dual-energy x-ray absorptiometry)
FGF	růstový faktor fibroblastů (fibroblast growth factor)
FOXO1	forkhead transkripční faktor (forkhead box protein O1)

G-CSF	faktor stimulující granulocytární kolonie (granulocyte-colony stimulating factor)
GLUT	glukózový transportér (glucose transporter)
HCl	kyselina chlorovodíková
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou (high density lipoproteins)
HE	hematoxylin-eosin
Hemox	hem oxygenáza (heme oxygenase)
HIF	transkripční faktor indukovaný hypoxií (hypoxia-induced factor)
HSD	hydroxysteroidní dehydrogenáza (hydroxysteroid dehydrogenase)
HSL	hormon senzitivní lipáza (hormone-sensitive lipase)
IGF	inzulínu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)
IL	interleukin
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
IP-10	interferon gamma indukovaný protein 10 (interferon gamma-induced protein 10)
IR	inzulínová rezistence
LPL	lipoproteinová lipáza
M1	prozánětlivý makrofág
M2	protizánětlivý makrofág
MAG	monoacylglycerol
MCP	monocytární chemotaktický protein (monocyt chemoattractant protein)
MGL	monoglyceridová lipáza (monoglyceride lipase)
MIP	makrofágový zánětlivý protein (macrophage inflammatory protein)
MK	mastné kyseliny

mTORC	komplex cílové molekuly pro rapamycin u savců (mammalian target of rapamycin)
NF κ B	jaderný faktor κ B (nuclear factor κ B)
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu (plasminogen activator inhibitor)
PDK	fosfolipid-dependentní kináza (phospholipid dependent kinase)
PGC-1 α	PPAR γ koaktivátor-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator - 1 α)
PLAUR	receptor urokinázového aktivátoru plazminogenu (urokinase plasminogen activator receptor)
PPAR	receptor aktivovaný proliferátory peroxizómů (peroxisome proliferator-activated receptors)
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (reverse transcription polymerase chain reaction)
SREBP	sterol regulační element vázající protein (sterol regulatory element-binding protein)
TAG	triacylglycerol
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
Th	T pomocný lymfocyt (T helper cell)
TLR	receptor skupiny Toll (toll-like receptor)
TNF α	tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
UCP-1	odpřahující protein 1 (uncoupling protein 1)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VLDL	velmi nízkodenzitní lipoprotein (very low-density lipoprotein)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
Ym-1	chitináze podobný protein (chitinase like protein)

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Agrawal S, Gollapudi S, Su H, Gupta S. Leptin activates human B cells to secrete TNF- α , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 signaling pathway. *J Clin Immunol*. 2011;31(3):472-8.
2. Alkhoury N, Gornicka A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Kashyap S, Schauer PR, Feldstein AE. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J Biol Chem*. 2010;285(5):3428-38.
3. Alligier M, Meugnier E, Debard C, Lambert-Porcheron S, Chanseau E, Sothier M, Loizon E, Hssain AA, Brozek J, Scoazec JY, Morio B, Vidal H, Laville M. Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(2):E183-92.
4. Andersson DP, Eriksson Hogling D, Thorell A, Toft E, Qvisth V, Näslund E, Thörne A, Wirén M, Löfgren P, Hoffstedt J, Dahlman I, Mejhert N, Rydén M, Arner E, Arner P. Changes in subcutaneous fat cell volume and insulin sensitivity after weight loss. *Diabetes Care*. 2014;37(7):1831-6.
5. Aron-Wisnewsky J, Tordjman J, Poitou C, Darakhshan F, Hugol D, Basdevant A, Aissat A, Guerre-Millo M, Clément K. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(11):4619-23.
6. Awad AB, Bradford PG. *Adipose tissue and inflammation*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis; 2010. ISBN 978-1-4200-9130-4.
7. Baker GL. Human adipose tissue composition and age. *Am J Clin Nutr*. 1969;22(7):829-35.
8. Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6(3):343-68.
9. Blaak E. Gender differences in fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001;4(6):499-502.

10. Blundell JE, Gibbons C, Caudwell P, Finlayson G, Hopkins M. Appetite control and energy balance: impact of exercise. *Obes Rev.* 2015;16 Suppl 1:67-76.
11. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia.* 2016;59(5):879-94.
12. Bredella MA, Karastergiou K, Bos SA, Gerweck AV, Torriani M, Fried SK, Miller KK. GH administration decreases subcutaneous abdominal adipocyte size in men with abdominal obesity. *Growth Horm IGF Res* 2017;35:17-20.
13. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. 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):2282-9.
14. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev.* 2007;29:1-5.
15. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. 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):2277-86.
16. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.
17. Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NO, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front Immunol.* 2016;6:637.
18. Catrysse L, van Loo G. Adipose tissue macrophages and their polarization in health and obesity. *Cell Immunol* 2018; 330:114-19.
19. Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Burke V. Waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as predictors of adipose tissue compartments in men. *QJM.* 2003;96(6):441-7.
20. Chhabra N. Insulin Biosynthesis, Secretion, and Action. *Biochemistry for medics* [online], ©2019 [cit. 7. 9. 2012]. Dostupné z: <http://www.namrata.co/insulin-biosynthesis-secretion-and-action/>

21. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2347-55.
22. Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 2006;49(4):744-7.
23. Česko v datech. Povolujeme opasky [online], ©2016 [cit. 12. 2. 2018]. Dostupné z: <https://www.ceskovdatech.cz/clanek/85-povolujeme-opasky-cechu-s-nadvahou-vyrazne-pribyva/>
24. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14:986–995.
25. Demerath EW, Reed D, Rogers N, Sun SS, Lee M, Choh AC, Couch W, Czerwinski SA, Chumlea WC, Siervogel RM, Towne B. Visceral adiposity and its anatomical distribution as predictors of the metabolic syndrome and cardiometabolic risk factor levels. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(5):1263-71.
26. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;93 Suppl 1:S52-9.
27. Divoux A, Clément K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev.* 2011;12(5):e494-503.
28. Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384(4):482-5.
29. Dusserre E, Moulin P, Vidal H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1500(1):88-96.
30. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, Brija T, Gautier EL, Ivanov S, Satpathy AT, Schilling JD, Schwendener R, Sergin I, Razani B, Forsberg EC, Yokoyama WM, Unanue ER, Colonna M, Randolph GJ, Mann DL. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through

- distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*. 2014;40:91–104.
31. Fang L, Guo F, Zhou L, Stahl R, Grams J. The cell size and distribution of adipocytes from subcutaneous and visceral fat is associated with type 2 diabetes mellitus in humans. *Adipocyte* 2015;4(4):273-9.
 32. Fock KM, Khoo J. Diet and exercise in management of obesity and overweight. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 4:59-63.
 33. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA*. 2003;289(2):187-93.
 34. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007;56(4):1010-3.
 35. Frühbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol*. 2008;456:1-22.
 36. Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, Lujan J, Tebar FJ, Zamora S. 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):899-905.
 37. Garg A. Regional adiposity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(9):4206-10.
 38. Garg A. Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):3313-25.
 39. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
 40. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000.
 41. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav*. 2008;94(2):206-18.
 42. Gordon S. The macrophage. *Bioessays* 1995;17(11):977-86.

43. Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev.* 2007;65(6 Pt 2):S7-12.
44. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2006 Feb;83(2):461S-465S.
45. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415-45.
46. Grigoraş A, Amalinei C, Balan RA, Giuşcă SE, Avădănei ER, Lozneau L, Căruntu ID. Adipocytes spectrum - From homeostasia to obesity and its associated pathology. *Ann Anat* 2018;219:102-120.
47. Grill V, Qvigstad E. Fatty acids and insulin secretion. *Br J Nutr.* 2000;83 Suppl 1:S79-84.
48. Guo G, Jin S, Hu H, Zhou Y, Yan Y, Zong H, Wang Y, He H, Oh Y, Liu C, Gu N. Hypoxia in 3T3-L1 adipocytes suppresses adiponectin expression via the PERK and IRE1 unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;493(1):346-51.
49. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* 2008;29(24):2959-71.
50. Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Klötting N, Stumvoll M, Bashan N, Rudich A. 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):2240-7.
51. Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker JD, Clement K. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* 2008;9(1):R14.
52. Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, Andersson DP, Qvisth V, Löfgren P, Rydén M, Thörne A, Wirén M, Palmér M, Thorell A, Toft E, Arner P. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia.* 2010;53(12):2496-503.

53. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007;56(4): 901-11.
54. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900-17.
55. Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(3):191-200.
56. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kawatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2006;281(36):26602-14.
57. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006;116(6):1494-505.
58. Kazantzis M, Stahl A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):852-7.
59. Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clément K, Lacasa D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol*. 2009;23(1):11-24.
60. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56.
61. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001;2(4):282-6.
62. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol*. 2009;29(6):1575-91.
63. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Blüher M, Unger T, Wolf

- AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. 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):1304-10.
64. Klimcakova E, Roussel B, Kovacova Z, Kovacikova M, Siklova-Vitkova M, Combes M, Hejnova J, Decaunes P, Maoret JJ, Vedral T., Viguerie N, Bourlier V, Bouloumié A, Stich V, Langin D. Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat. *Diabetologia* 2011;54(4):876-87.
65. Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, Kern M, Stumvoll M, Blüher M. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(3):E506-15.
66. Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, Zechner R, Ferrante AW Jr. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* 2010;120(10):3466-79.
67. Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol.* 2014;5:470.
68. Kratz M, Coats BR, Hisert KB, Hagman D, Mutskov V, Peris E, Schoenfelt KQ, Kuzma JN, Larson I, Billing PS, Landerholm RW, Crouthamel M, Gozal D, Hwang S, Singh PK, Becker L. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab* 2014;20(4):614-25.
69. Kristóf E, Klusóczki Á, Veress R, Shaw A, Combi ZS, Varga K, Győry F, Balajthy Z, Bai P, Bacso Z, Fésüs L. Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning. *Exp Cell Res.* 2019;377(1-2):47-55.
70. Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(9):639-660.
71. Laforest S, Michaud A, Paris G, Pelletier M, Vidal H, Géloën A, Tchernof A. Comparative analysis of three human adipocyte size measurement methods and their relevance for cardiometabolic risk. *Obesity (Silver Spring)* 2017;25(1):122-131.

72. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(3):446-62.
73. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(3):107-14.
74. Lessard J, Laforest S, Pelletier M, Leboeuf M, Blackburn L, Tchernof A. Low abdominal subcutaneous preadipocyte adipogenesis is associated with visceral obesity, visceral adipocyte hypertrophy, and a dysmetabolic state. *Adipocyte* 2014;3(3):197-205.
75. Löfgren P1, Andersson I, Adolfsson B, Leijonhufvud BM, Hertel K, Hoffstedt J, Arner P. Long-term prospective and controlled studies demonstrate adipose tissue hypercellularity and relative leptin deficiency in the postobese state. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(11):6207-13.
76. Lönn M, Mehlig K, Bengtsson C, Lissner L. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. *FASEB J* 2010;24(1):326-31.
77. Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 16):2681-6.
78. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007;56(1):16-23.
79. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117(1):175-84.
80. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 2008;57(12):3239-46.
81. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(12):723-36.
82. McLaughlin T, Deng A, Yee G, Lamendola C, Reaven G, Tsao PS, Cushman SW, Sherman A. Inflammation in subcutaneous adipose tissue: relationship to adipose cell size. *Diabetologia* 2010;53(2):369-77.

83. McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, Ruge T, Gilbert M, Fielding BA, Frayn KN, Karpe F. Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes*. 2011;60(1):47-55.
84. Michaud A, Laforest S, Pelletier M, Nadeau M, Simard S, Daris M, Lebcœuf M, Vidal H, Géloën A, Tchernof A. Abdominal adipocyte populations in women with visceral obesity. *Eur J Endocrinol* 2016;174(2):227-39.
85. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta*. 2007;375(1-2):20-35.
86. Moayyedi P. The epidemiology of obesity and gastrointestinal and other diseases: an overview. *Dig Dis Sci*. 2008;53(9):2293-9.
87. Monteiro R, de Castro PM, Calhau C, Azevedo I. Adipocyte size and liability to cell death. *Obes Surg* 2006;16(6):804-6.
88. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, Cinti S. Dead adipocytes, detected as crown-like structures (CLS), are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 2008;49(7):1562-8.
89. Murdolo G, Hammarstedt A, Sandqvist M, Schmelz M, Herder C, Smith U, Jansson PA. Monocyte chemoattractant protein-1 in subcutaneous abdominal adipose tissue: characterization of interstitial concentration and regulation of gene expression by insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(7):2688-95.
90. Murphy J, Moullec G, Santosa S. Factors associated with adipocyte size reduction after weight loss interventions for overweight and obesity: a systematic review and meta-regression. *Metabolism* 2017;67:31-40.
91. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014;41(1):14-20.
92. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(2):E444-52.

93. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM. 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):35279-92.
94. O'Connell J, Lynch L, Cawood TJ, Kwasnik A, Nolan N, Geoghegan J, McCormick A, O'Farrelly C, O'Shea D. The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity. *PLoS One.* 2010;5(4):e9997.
95. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med.* 2012;18(3):363-74.
96. Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett.* 2005;579(2):295-301.
97. Pagni P, Spunticchia F, Barberi S, Caprio G, Paglicci C. Use of Core Needle Biopsy rather than Fine-Needle Aspiration Cytology in the Diagnostic Approach of Breast Cancer. *Case Rep Oncol.* 2014 Jul 11;7(2):452-8.
98. Pais R, Silaghi H, Silaghi AC, Rusu ML, Dumitrascu DL. Metabolic syndrome and risk of subsequent colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2009;15(41):5141-8.
99. Pasarica M, Xie H, Hymel D, Bray G, Greenway F, Ravussin E, Smith SR. Lower total adipocyte number but no evidence for small adipocyte depletion in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32(5):900-2.
100. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106(2):165-9.
101. Pope BD, Warren CR, Parker KK, Cowan CA. Microenvironmental Control of Adipocyte Fate and Function. *Trends Cell Biol* 2016;26(10):745-755.
102. Rakatzi I, Mueller H, Ritzeler O, Tennagels N, Eckel J. Adiponectin counteracts cytokine- and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetologia.* 2004;47(2):249-58.
103. Rasmussen MS, Lihn AS, Pedersen SB, Bruun JM, Rasmussen M, Richelsen B. Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14(1):28-35.

104. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S64-73.
105. 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 N Y Acad Sci.* 2002;967:363-78.
106. Rayner DV. The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. *Proc Nutr Soc.* 2001;60(3):357-64.
107. Ross MH, Pawlina W. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology.* 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, c2011. ISBN 978-0-7817-7200-6.
108. Rowlands I, Graves N, de Jersey S, McIntyre HD, Callaway L. Obesity in pregnancy: outcomes and economics. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(2):94-9.
109. Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology* 2018;155(4):407-17.
110. Rydén M, Andersson DP, Bergström IB, Arner P. Adipose tissue and metabolic alterations: regional differences in fat cell size and number matter, but differently: a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(10):E1870-6.
111. Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, Smith SR, Ryan DH, Anton SD, McManus K, Champagne CM, Bishop LM, Laranjo N, Leboff MS, Rood JC, de Jonge L, Greenway FL, Loria CM, Obarzanek E, Williamson DA. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med.* 2009;360(9):859-73.
112. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology.* 2012;58(1):15-23.
113. Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients.* 2015;7(11):9453-74.
114. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev.* 2007;87(2):507-20.

115. Sepa-Kishi DM, Ceddia RB. White and beige adipocytes: are they metabolically distinct? *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2018 Feb 21;33(2).
116. Shin KC, Hwang I, Choe SS, Park J, Ji Y, Kim JI, Lee GY, Choi SH, Ching J, Kovalik JP, Kim JB. Macrophage VLDLR mediates obesity-induced insulin resistance with adipose tissue inflammation. *Nat Commun* 2017;8(1):1087.
117. Shives TC. Biopsy of soft-tissue tumors. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;(289):32-5.
118. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(3):1023-33.
119. Sorisky A. Molecular links between obesity and cardiovascular disease. *Am J Ther*. 2002;9(6):516-21.
120. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-7.
121. Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol* 2017;37:35-40.
122. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007;56(12):2910-8.
123. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine link between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(10):2062-8.
124. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2094-101.
125. Suzuki T, Gao J, Ishigaki Y, Kondo K, Sawada S, Izumi T, Uno K, Kaneko K, Tsukita S, Takahashi K, Asao A, Ishii N, Imai J, Yamada T, Oyadomari S, Katagiri H. ER Stress Protein CHOP Mediates Insulin Resistance by Modulating Adipose Tissue Macrophage Polarity. *Cell Rep* 2017;18(8):2045-2057.

126. Tan CY, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 5):935-40.
127. Tchoukalova YD, Koutsari C, Votruba SB, Tchkonina T, Giorgadze N, Thomou T, Kirkland JL, Jensen MD. Sex- and depot-dependent differences in adipogenesis in normal-weight humans. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(10):1875-80.
128. Thomas D, Apovian C. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. *Metabolism* 2017;72:120-143.
129. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):772-83.
130. Tinahones FJ, Coín Aragüez L, Murri M, Oliva Olivera W, Mayas Torres MD, Barbarroja N, Gomez Huelgas R, Malagón MM, El Bekay R. Caspase induction and BCL2 inhibition in human adipose tissue: a potential relationship with insulin signaling alteration. *Diabetes Care.* 2013 Mar;36(3):513-21.
131. Verstraeten VL1, Renes J, Ramaekers FC, Kamps M, Kuijpers HJ, Verheyen F, Wabitsch M, Steijlen PM, van Steensel MA, Broers JL. Reorganization of the nuclear lamina and cytoskeleton in adipogenesis. *Histochem Cell Biol.* 2011 Mar;135(3):251-61.
132. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000;21(6):697-738.
133. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40352-63.
134. Wang B, Wood I, Trayhurn P. Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes. *J Endocrinol* 2008;198(1):127-34.
135. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-808.

136. Wernstedt Asterholm I, Tao C, Morley TS, Wang QA, Delgado-Lopez F, Wang ZV, Scherer PE. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab.* 2014;20(1):103-18.
137. Westerbacka J, Corner A, Kolak M, Makkonen J, Turpeinen U, Hamsten A, Fisher RM, Yki-Järvinen H. Insulin regulation of MCP-1 in human adipose tissue of obese and lean women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294(5):841-5.
138. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 2000;43(12):1498-506.
139. WHO. Overweight and obesity [online], ©2016 [cit. 2017]. Dostupné z: https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/
140. WHO. Obesity and overweight [online], ©2018 [cit. 16. 2. 2018]. Dostupné z: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
141. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012;205(2):194-208.
142. 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.* 2003;112(12):1821-30.
143. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293(4):E1118-28.
144. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett* 2007;112(2):61-7.
145. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425-32.
146. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 2004;306(5700):1383-6.

9 SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTACÍ

1. Práce související s dizertační prací

A) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Chylikova, J., Dvorackova, J., Cizkova, K., Lacey, H., Kamarad, V. Macrophages of the subcutaneous and omental fatty tissue in obese patients: Immunohistochemical phenotyping of M2 subtypes in relation to type 2 diabetes. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2019 Apr 9. doi: 10.5507/bp.2019.011. [Epub ahead of print]

B) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Kamarad, V., **Chylikova, J.**, Dvorackova, J., Cizkova, K., Lacey, H. Adipocyte size in morbidly obese women and its relation to type 2 diabetes. Acta Medica Martiniana. 2019 – přijato do tisku

C) Původní vědecké publikace v daném oboru uveřejněné ve sborníku

Chyliková, J., Kamarád, V., Dvořáčková, J., Holéczy, P. Morfologie podkožní tukové tkáně v závislosti na metodě odběru. Nové trendy a perspektivy v histologii IV. Martin: Univerzita Komenského v Bratislavě, Jesseniova lékařská fakulta v Martine, 2018. s. 9-12. ISBN 978-80-8187-047-7.

D) Přehledné/souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Chyliková, J., Dvořáčková, J., Tauber, Z., Kamarád, V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2018 Jun; 162(2):79-82. (IF 1,087)

E) Přehledné/souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné ve sborníku

Chyliková, J., Lichnovská, R., Bužga, M., Holéczy, P., Dvořáčková, J. Aktivní lokální zánět v tukové tkáni – spouštěč kardiovaskulárních onemocnění. Morfologie v Čechách a na Slovensku II., Ostrava 2013, ISBN 978-80-7464-364-4.

F) Publikovaná abstrakta

Chyliková, J., Kamarád, V., Bužga, M., Holéczy, P., Dvořáčková, J., Vaculová, J. Comparison of subcutaneous adipose tissue morphology using the methods of classical excision and fine needle biopsy. *Revista Argentina de Anatomía Clínica*, 2013; 5 (2): 158-159. ISSN 1852-8023.

Chyliková, J., Kamarád, V., Výborná, E., Dvořáčková, J., Holéczy, P. M1/M2 Macrophages polarization in white adipose tissue of morbid obese. *Biomedical Papers*, vol.159, suppl. 1, pp. S44. ISSN 1213-8118.

G) Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech

Chyliková, J., Carbolová, T., Kamarád, V., Bužga, M., Holéczy, P., Dvořáčková, J. White adipose tissue morphology in morbid obesity - the role of macrophages. *Morphology 2012 - 47th International Congress on Anatomy and 49th Lojda Symposium on Histochemistry*. Hradec Králové 9. - 12. 9. 2012.

Chyliková, J., Kamarád, V., Bužga, M., Holéczy, P., Dvořáčková, J., Vaculová, J. Comparison of subcutaneous adipose tissue morphology using the methods of classical excision and fine needle biopsy. *Morphology 2013*. Martin 4.-6. 6. 2013. ISBN 978-80-89544-47-9.

Chyliková, J., Kamarád, V., Dvořáčková, J., Bužga, M., Holéczy, P. Role of Adipocyte Apoptosis in the Remodeling of Adipose Tissue in Morbidly obese. *Morphology 2014 - 48th International Congress of The Czech Anatomical Society and 51st Lojda Symposium on Histochemistry*. Brno 7. - 9. 9. 2014.

Chyliková, J., Kamarád, V., Výborná, E., Dvořáčková, J., Holéczy, P. M1/M2 Macrophages polarization in white adipose tissue of morbid obese. *Morphology 2015 - 49th International Congress of the Czech Anatomical Society and 52nd Lojda Symposium on Histochemistry*. Olomouc 6. - 8. 9. 2015.

Chyliková, J., Dvořáčková, J., Kamarád, V. Fibrosis of Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue in Morbidly Obese Patients with Diabetes and without Diabetes. *Morphology 2016 – 44. Zjazd Slovenskej anatomickej spoločnosti s medzinárodnou účasťou*. Bratislava 8. - 10. 9. 2016. ISBN 978-80-223-4171-4.

Chyliková, J., Dvořáčková, J., Čížková, K., Kamarád, V. Structure of white adipose tissue: comparison of visceral and subcutaneous adipose tissue in morbidly obese women. Morphology 2017 - 50th International Congress of the Czech Anatomical Society and 54th Lojda Symposium in Histochemistry, Plzeň 10. - 12. 9. 2017. ISBN 978-80-263-1315-1.

Chyliková, J., Dvořáčková, J., Čížková, K., Kamarád, V. Adipocyte size and macrophage infiltration in morbidly obese women with and without diabetes. Morphology 2018 – 51th International Congress of the Czech Anatomical Society and 55th Lojda Symposium in Histochemistry, Jihlava 6. - 8. 9. 2018. ISBN 978-80-88064-35-0.

2. Ostatní publikace

A) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Furjelova, M., Kovalska, M., Jurkova, K., **Chylikova, J.**, Mestanova, V., Adamkov, M. Correlation of carbonic anhydrase IX expression with clinico-morphological parameters, hormonal receptor status and HER-2 expression in breast cancer. Neoplasma 62, 1, 2015, 88-97. (IF 1,961)

Adamkov, M., Výbohová, D., Tupá, V., **Chyliková, J.**, Horáček, J., Benčat, M. Expression and significance of survivin in colorectal high grade and low grade adenomas. Acta Histochemica vol.117, Issue 6, July 2015, pp.590-594. (IF 1,347)

Adamkov, M., Drahošová, S., **Chyliková, J.**, Výbohová, D. Survivin in breast lesions: immunohistochemical analysis of 196 cases. Polish Journal of Pathology. 2018;68(4):297-305. (IF 0,99)

B) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Jurková, K., Varga, I., Polák, Š., Furjelová, M., Kovalská, M., **Chyliková, J.**, Adamkov, M. Štúdium vývinu sleziny v embryonálnom období klasickými histologickými metódami. Revue medicíny v praxi 11, 2013, 2 s.32 a 36. ISSN 1336-202X.

C) Kapitoly v monografiích

Chyliková, J., Carbolová, T., Kamarád, V. Základy obecné histologie pro zdravotní laboranty. Ostravská univerzita v Ostravě; Ostrava 2013. ISBN 978-80-7464-342-2.