

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kateřina ZEMÁNKOVÁ**

Stres endoplazmatického retikula a jeho význam pro rozvoj zánětu tukové tkáně  
Stress of endoplasmic reticulum and its role for the development of adipose tissue  
inflammation

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Lenka Rossmeislová PhD.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

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

V Praze, 9.5.2011

Podpis

### **Poděkování**

Děkuji své školitelce Mgr. Lence Rossmeislové PhD. za její čas, ochotu, motivaci a cenné rady, kterými mi při vypracování této práce pomohla.

## Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Seznam zkratk .....	6
1. Úvod a cíle práce .....	8
2. Endoplazmatické retikulum .....	9
2.1. Struktura .....	9
2.2. Funkce .....	9
2.3. Příčiny stresu ER .....	10
2.4. UPR .....	10
3. Tuková tkáň .....	13
3.1. Význam a základní charakteristiky .....	13
3.1.1. Distribuce tuku .....	13
3.1.2. Obezita .....	14
3.1.3. Buněčné složení .....	15
3.2. Základní metabolické dráhy .....	16
3.2.1. Lipolýza .....	16
3.2.2. Inzulinová dráha .....	17
3.3. Tuková tkáň jako endokrinní orgán .....	17
3.4. Infiltrace makrofágů .....	19
4. ER o obézní tuková tkáň .....	20
4.1. Stres ER a rozvoj zánětu tukové tkáně .....	20
4.2. ER a inhibice inzulinové signalizace .....	22
4.2.1. c-Jun N-terminální kináza .....	22
4.2.2. Mastné kyseliny .....	23
4.3. Terapeutické možnosti .....	23
4.3.1. Redukce hmotnosti .....	23
4.3.2. Farmakologický přístup .....	24
5. Závěr .....	25
6. Literatura .....	26

## **Abstrakt**

Endoplazmatické retikulum (ER) je buněčnou organelou, kde dochází ke skládání proteinů, které jsou poté transportovány do různých míst v buňce nebo sekretovány. Je také zodpovědné za syntézu triglyceridů. Porucha metabolické rovnováhy vede ke stresu ER a k následnému spuštění signální dráhy, která se nazývá unfolded-protein response (UPR). Cílem této dráhy je zmírnit stres endoplazmatického retikula, obnovit přirozenou homeostázu a předejít buněčné smrti. Současně ale dochází k aktivaci stresových kináz a dalších faktorů, které mohou způsobit poruchy inzulinové signalizace a zvýšit expresi prozánětlivých cytokinů. Tyto jevy jsou charakteristické pro lidskou obezitu, která je spojena se sníženou citlivostí tkání k inzulinu a je považována za onemocnění s nízkou hladinou zánětu. Nedávné studie označily za původce zánětu stresované adipocyty a makrofágy infiltrované do tukové tkáně, které produkují převážně zánětlivé cytokiny. Skutečně bylo prokázáno, že stres endoplazmatického retikula je výrazně zvýšen v tukové tkáni obézních jedinců. Pokles váhy daný zmenšením tukové tkáně tento stres snižuje za současného snížení produkce prozánětlivých cytokinů i inzulinové rezistence.

Předkládaná práce má za cíl shromáždit a diskutovat tyto nové poznatky, které poukazují na to, že stres ER by mohl mít zásadní význam na vznik a vývoj onemocnění spojených s obezitou.

**Klíčová slova:** stres endoplazmatického retikula, zánět, tuková tkáň, obezita, cytokiny

## **Abstract**

Endoplasmic reticulum (ER) is a cellular organelle responsible for folding of proteins that are then transported to the various places in the cell or secreted. It is also crucial for the synthesis of triglycerides. Metabolic imbalance leads to ER stress and consequently triggers signaling pathway, which is called unfolded-protein response (UPR). The aim of this pathway is to alleviate ER stress, restore natural homeostasis and prevent death of cell. At the same time however, it activates stress kinases and other factors that may perturb insulin signaling and increase expression of proinflammatory cytokines. These signs are characteristic for human obesity, which is associated with reduced tissue's sensitivity to insulin and is considered as a disease with low level of inflammation. Recent studies have suggested that the source of proinflammatory cytokines in obesity are stressed adipocytes and macrophage infiltrated into adipose tissue. Indeed, it has been demonstrated that stress of endoplasmic reticulum is significantly increased in adipose tissue of obese individuals. Weight loss associated with reduction of adipose tissue mass decreases stress while lowers both, the production of proinflammatory cytokines and insulin resistance.

This work aims to collect and discuss these new findings, which suggest that ER stress might be crucial for the development of diseases associated with obesity.

**Key words:** stress of endoplasmic reticulum, inflammation, adipose tissue, obesity, cytokines

## Seznam zkratek

AP-1	– activator protein 1
ATF	– aktivační transkripční faktor (activating transcription factor)
ATGL	– tuková triglycerid lipáza (adipose triglyceride lipase)
BAT	– hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue)
BMI	– body mass index
CCL2	– CC - chemokin ligand 2 (CC-chemokine ligand 2)
CHOP	– C/EBP-homologous protein
C/EBP	– CCAAT/enhancer binding protein
DG	– diglycerid
eIF2 $\alpha$	– eukaryotický iniciační faktor 2 $\alpha$ (eukaryotic translation-initiation factor 2 $\alpha$ )
ER	– endoplazmatické retikulum
GA	– Golgiho aparát
GBP	– chirurgická redukce žaludku (gastric bypass surgery)
HSL	– hormon-senzitivní lipáza (hormone-sensitive lipase)
I $\kappa$ B	– inhibitor NF- $\kappa$ B
IKK $\beta$	– I $\kappa$ B kináza $\beta$ (I $\kappa$ B kinase $\beta$ )
IL	– interleukin
IR	– inzulinový receptor
IRE1 $\alpha$	– inositol-requiring 1 $\alpha$
IRS	– substrát inzulinového receptoru (insulin receptor substrate)
JNK	– c-Jun N-terminální kináza (c-Jun N-terminal kinase)
MGL	– monoacylglycerol lipáza (monoacylglycerol lipase)
MK	– mastná kyselina
NF- $\kappa$ B	– jaderný faktor $\kappa$ B (nuclear factor $\kappa$ B)
PAI-1	– plasminogen-activator inhibitor type 1
PBA	– 4-fenyl butyrylová kyselina (4-phenyl butyric acid)
PERK	– double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase
PI3K	– fosfatidylinositol 3 kináza
PPAR $\gamma$	– peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
ROS	– reaktivní kyslíkový radikál (reactive oxygen species)
SRP	– signál rozeznávající partikule (signal recognition particle)
SVF	– stromavaskulární frakce (stroma vascular fraction)

- TNF – tumor necrosis factor
- TG – triglycerid
- TUDCA – taurin-konjugovaný derivát ursodeoxycholové kyseliny  
(taurine-conjugated derivate of ursodeoxycholic acid)
- UCP-1 – rozpřahující protein (uncoupling protein-1)
- UPR – unfolded-protein response
- uORF – upstream otevřený čtecí rámeček (upstream open reading frame)
- WAT – bílá tuková tkáň (white adipose tissue)
- XBP1 – X-box-binding protein 1



## 1. Úvod a cíle práce

Endoplazmatické retikulum (ER) je jedna ze základních organel přítomná v každé eukaryotické buňce. Dlouho byla studována zejména s cílem pochopit mechanismy úprav sekretovaných proteinů, které v něm probíhají. Nyní je ER v centru zájmu i díky svým schopnostem regulovat řadu buněčných procesů zdánlivě nesouvisející s jeho základními funkcemi a to za podmínek různých typů stresu. Jak lze předpokládat ze znalostí základních funkcí ER, stresu endoplazmatického retikula jsou vystaveny zejména tkáně, jejichž činnost je spojena s vysokou úrovní sekrece nebo syntézou lipidů. Mezi takové patří např. imunitní buňky,  $\beta$  buňky pankreatu dedikované sekreci inzulínu, hepatocyty a tukové buňky specializované na syntézu triglyceridů. A skutečně u všech byla v nedávné době popsána spojitost mezi jejich zhoršenou primární funkcí a stresem endoplazmatického retikula. Tyto buňky a tkáně z nich složené přitom významně regulují metabolický stav celého organismu. Význam stresu ER pro  $\beta$  buňky pankreatu a hepatocyty je téma velmi intenzivně studované. Naproti tomu mechanismy, jakými stres ER ovlivňuje funkce tukové tkáně, jsou známé jen částečně. Obezita je závažné onemocnění postihující značnou část populace. Je spojena se zánětem a zhoršenou inzulínovou senzitivitou, které by mohly být primárně vyvolány stresem ER.

Rešeršní část práce je rozdělena tak, aby pokryla základní informace o endoplazmatickém retikulu a procesech spouštěných ve stresových podmínkách a dále o tukové tkáni, jejích vlastnostech a patofyziologických stavech spojených s její dysfunkcí. V následujících kapitolách je pak diskutován vliv stresu ER na rozvoj patologických stavů spjatých s tukovou tkání, což je hlavním smyslem této práce.

## 2. Endoplazmatické retikulum

### 2.1. Struktura

Endoplazmatické retikulum (ER) je organela tvořená sítí větvících se tubulů a plochých váčků, která je přítomna ve všech eukaryotických buňkách. Rozšiřuje se skrz cytoplazmu buňky a přiléhá k jadernému obalu [1]. Konvenčně se rozděluje na drsné ER, obsahující ribosomy, a hladké ER [2].

### 2.2. Funkce

ER je místem, kde dochází k biosyntéze, skládání, shromažďování a modifikacím řady sekretovaných a membránových proteinů [1]. Asi jedna třetina nově syntetizovaných proteinů je totiž syntetizována na ribosomech navázaných na membránu ER. mRNA těchto proteinů kóduje na N-konci signální sekvenci, která v asociaci se signál rozeznávající partikulí (SRP) směřuje peptidový řetězec k translokonu. Rostoucí řetězec vstupuje kotranslačně do lumen ER. Téměř okamžitě po vstupu do lumen dochází k proteolytickému odstranění signální sekvence [2]. V lumen ER jsou proteiny sbaleny do správné trojrozměrné struktury [1]. To je možné díky proteinovým chaperonům jako například BiP (též známý jako GRP78 nebo HSPA5), calnexin a calreticulin, které napomáhají správnému sbalení nových peptidů a zabraňují nahromadění nesbalených nebo částečně sbalených prekurzorů [3]. Některé proteiny pak mohou podstoupit oligomerizaci (zejména tvorbou disulfidických můstků, která je možná díky oxidačnímu prostředí ER) a další dodatečné proteolytické modifikace uvnitř organely. Velká část těchto proteinů je sekretována a ostatní jsou směřovány do různých buněčných kompartmentů. Přesun do Golgiho aparátu (GA), kde dochází k dalším modifikacím, se odehrává vesikulárním transportem [2]. Proteiny, které nejsou sbaleny do správné struktury, jsou odstraněny z ER degradací [4].

ER také funguje jako dynamická zásobárna vápníku, která odpovídá na růstové faktory, hormony a podněty ovlivňující hladinu buněčné energie, dostupnost živin nebo redoxní stav [1].  $\text{Ca}^{2+}$  uvolněný do cytosolu se chová jako intracelulární buněčný faktor díky své schopnosti aktivovat různé regulační enzymy. Kationty vápníku v ER podporují počáteční skládání proteinů [2]. Akumulace špatně sbalených proteinů v ER však může způsobit únik vápníku z ER. Uvolněný vápník z ER je pak soustředěn do matrix mitochondrií a způsobuje depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány, narušuje elektronový transport, což vede k vyšší produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). ROS jsou malé molekuly, které jsou vysoce reaktivní kvůli přítomnosti nespárovaného elektronu [1]. Schopnost ER regulovat

cytoplazmatické hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  iontů tedy umožňuje i správnou funkci jiných organel, např. zmiňovaných mitochondrií.

ER má i zásadní význam pro rozvoj tukové tkáně, jelikož je místem tvorby triglyceridových (TG) kapének (ty mohou být též nazývány tukové nebo lipidové kapénky). K syntéze TG dochází při hromadění mastných kyselin (MK) uvnitř buňky. Tři MK a jedna molekula glycerolu jsou spojeny a tvoří triglycerid. Hydrofobní molekuly TG jsou ze sterických důvodů uskladněny ve formě kapének, které jsou ohraničeny jednou vrstvou fosfolipidové membrány a asociovanými proteiny. TG pak slouží jako zásobárna energie, jejich syntéza může být považována i za lipid-neutralizační proces [3] (viz kapitola 3.2.1.).

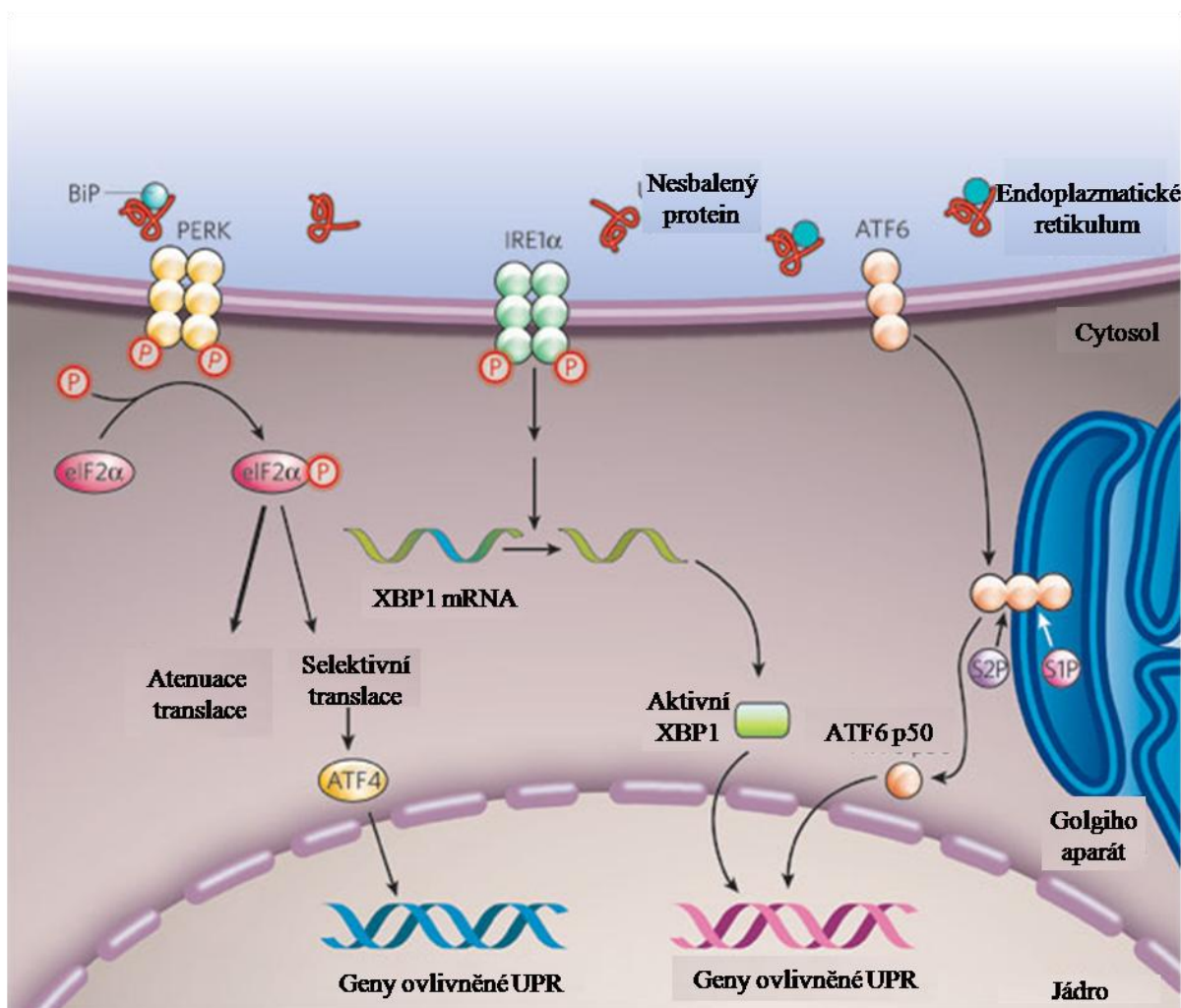
### 2.3. Příčiny stresu ER

Funkční stav ER může být narušen různými podmínkami včetně vyčerpání zásob  $\text{Ca}^{2+}$ , změnou z oxidačního na redukční prostředí v lumen ER, inhibicí glykosylace proteinů, nedostatkem glukózy nebo kyslíku, nedostatkem degradačních proteinů asociovaných s ER nebo expresí virových nebo např. mutantních proteinů. Každá podmínka představuje specifickou formu stresu ER. V poslední době se ukazuje, že stres ER může vyvolat nejen nedostatek základních živin, ale i jejich přebytek. ER je proto nyní považováno za buněčný senzor metabolické nerovnováhy [5].

### 2.4. UPR

Nedávno byla identifikována sada intracelulárních drah, které signalizují přítomnost stresu ER. Aktivací těchto drah buňka v principu nastartuje procesy vedoucí ke zvýšení kapacity ER a tím i k zajištění přesnosti skládání proteinů a k prevenci akumulace nesbalených nebo částečně sbalených proteinů. Tyto dráhy jsou souhrnně známy jako unfolded-protein response (UPR). UPR upravuje buněčné transkripční a translační programy k zvládnutí stresových podmínek a vyřešení protein skládajícího defektu. V savčích buňkách jsou hlavní UPR signalizační kaskády iniciovány třemi proteiny lokalizovanými v ER: IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring 1 $\alpha$ ), PERK (double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase) a ATF6 (activating transcription factor 6) (obr. 1). Tyto transmembránové proteiny mají doménu v lumen ER, která má schopnost detekovat nesbalené proteiny, transmembránovou doménu a cytosolickou doménu, která přenáší signály do transkripčního nebo translačního aparátu [1]. Ve správně fungujícím ER jsou tyto tři proteiny inaktivovány chaperonem BiP na jejich intraluminální doméně. Akumulace nesprávně sbalených proteinů

v ER vede k odstranění chaperonu BiP ze senzorů UPR. To a potenciálně další, dosud neobjevené cytosolické události vedou k aktivaci PERK, IRE1 $\alpha$  a ATF6 [6].



**Obr. 1. Savčí UPR dráha**

Za normálního stavu je UPR inaktivována vazbou BiP. Při stresu ER je ale BiP preferenčně navázán na špatně sbalené proteiny. Uvolnění BiP vede k aktivaci všech 3 hlavních signálních kaskád UPR: PERK, IRE1 $\alpha$  a ATF6. Upraveno podle [1].

PERK je kináza eukaryotického iniciačního faktoru 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), zodpovědná za translační atenuaci doprovázející dysfunkci ER [2]. PERK má totiž schopnost fosforylovat  $\alpha$  podjednotku eIF2 $\alpha$ , která je nezbytná pro zahájení translace mRNA [1]. Mechanismus aktivace PERK během stresu ER zahrnuje oddělení BiP z vazebného místa, následuje dimerizace a autofosforylace cytoplazmatické domény, což dovoluje PERK fosforylovat eIF2 $\alpha$  [1, 2]. Fosforylace eIF2 $\alpha$  snižuje celkovou translaci, čímž dovoluje buňce uchovat zdroje a zahájit efektivní rekonfiguraci genové exprese k zvládnutí stresových podmínek [7]. Fosforylace eIF2 $\alpha$  inhibuje složení ribosomu 80S a následně syntézu proteinů. Tato cesta

podporuje buněčné přežití předcházením vtoku dalších vznikajících polypeptidů do již saturovaného lumen ER [1]. Navíc fosforylace eIF2 $\alpha$  indukuje translaci specifických mRNA, jako například mRNA pro transkripční regulátor ATF4. Zvýšená exprese ATF4 je umožněna díky dvěma upstream otevřeným čtecím rámcům (uORF), které jsou umístěny na 5' konci ATF4 mRNA, usnadňující translaci transkripčního aktivátoru v odpovědi na fosforylaci eIF2 [7]. ATF4 může indukovat expresi genů UPR, které zahrnují biosyntézu a transport aminokyselin, odpověď oxidačního stresu též zvyšuje expresi dalších transkripčních faktorů, ATF3 a CHOP (C/EBP-homologous protein), které napomáhají regulaci genů účastnících se metabolismu, redoxního stavu buňky a apoptózy [1, 7].

IRE1 $\alpha$  má protein kinázovou aktivitu a specifickou endoribonukleovou aktivitu. Autofosforylací IRE1 $\alpha$  se aktivuje RNázová aktivita, která poté iniciuje vyjmutí 26b intronu z mRNA kódující XBP1 (X-box-binding protein 1), což vede k translačnímu posunu a k translaci izoformy XBP1s se silnou aktivitou jako transkripční faktoru [1]. Jedná se o mRNA sestřih, který se odehrává v cytosolu, což je u savců unikátní, a konzervativnost této dráhy mezi živočišnými druhy svědčí o jejím významu.

ATF6 osvobozené od BiP, se přemístí do GA, kde je proteázami S1P a S2P odštěpena část proteinu. Tento proces vede k uvolnění funkčního ATF6 fragmentu do cytosolu a následně do jádra. Aktivní fragment ATF6 a XBP1s fungují v paralelních drahách, které indukují transkripci genů kódujících chaperony ER a enzymy, které podporují skládání proteinů, maturaci, sekreci a degradaci proteinů asociovanou s ER [1]. V současné době jsou ATF6 a XBP1 vnímány jako hlavní regulátory transkripční odpovědi, která je spouštěna během UPR [6].

Je jasné, že UPR nevede vždy k úspěšnému zmírnění stresu ER a ustanovení funkční rovnováhy v ER. Ústředním paradoxem UPR je, že odpověď je navržena tak, aby usnadnila jak přizpůsobení se stresu tak apoptózu, v závislosti na povaze a závažnosti stresoru. Při těžkých nebo dlouhotrvajících stresových signálech může UPR uvádět do pohybu pro-apoptotické signální kaskády, z nichž některé se zdají být poměrně specifické pro stres ER a jiné, které všeobecně navozují apoptotické dráhy [4]. Nejvýznamnější v první kategorii je štěpení kaspázy - 12 u myši (nebo ortologní kaspáza - 4 u lidí), která je lokalizována v ER. Nicméně je jasné, že apoptóza zprostředkovaná stresem ER také vede k depolarizaci mitochondriální membrány a k iniciaci dalších kaskád, které jsou dobře charakterizovány jako prvky apoptotické signalizace v odpovědi na jiné typy buněčných poškození. Porozumění, jak UPR může umožnit adaptaci, namísto apoptózy, má obrovský fyziologický význam [8].

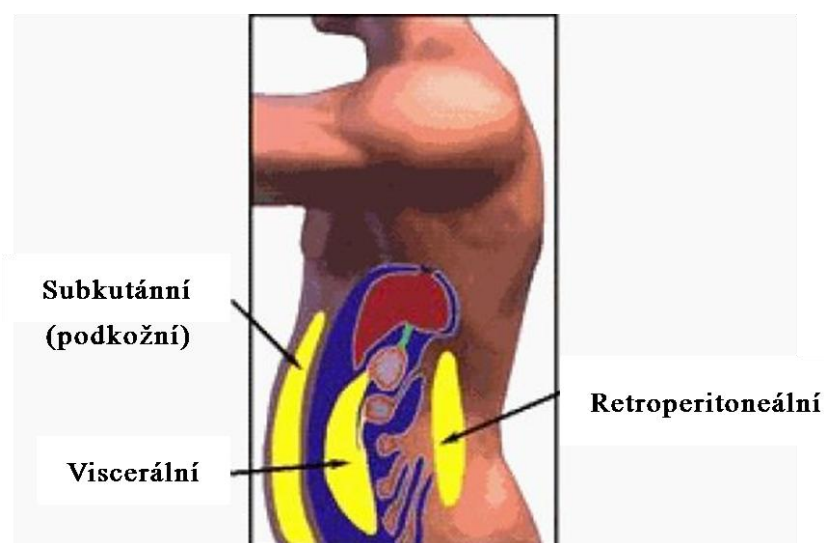
### 3. Tuková tkáň

#### 3.1. Význam a základní charakteristiky

U savců se tuková tkáň vyskytuje ve dvou formách: bílá tuková tkáň (WAT) a hnědá tuková tkáň (BAT). Většina tukové tkáně u savců je WAT a je považována za místo energetické zásobárny. Naproti tomu BAT se nachází hlavně u lidských novorozenců a je důležitá pro regulaci tělesné teploty během netřesové termogeneze [9]. To je možné díky expresi rozpřahujícího proteinu (UCP-1), proteinu velkého 32 kDa, který se nachází na vnitřní mitochondriální membráně a umožňuje disipaci proton elektrochemického gradientu vytvářeného v průběhu respirace ve formě tepla [10]. Hnědá tuková tkáň ale kvůli své úzké funkční specializaci nebude předmětem této práce.

##### 3.1.1. Distribuce tuku

U lidí je WAT rozptýlena v celém těle, ale akumuluje se ve velkých depech, která jsou nazývána dle své anatomické pozice. Základní umístění je podkožní nebo intraabdominální. Podkožní tuková tkáň je u normálních jedinců nejrozsáhlejší a je přítomna zejména na hýždích, stehnech a břichu. Intraabdominální tkáň se dělí na tzv. tkáň viscerální, mezi kterou patří omentální depo (omentum, neboli předstěra – *struktura uvnitř břišní dutiny odvozená od pobřišnice a připojená k povrchu žaludku*), a tuková tkáň okolo střev a dále tkáň retroperitoneální, kterou reprezentuje depo kolem ledvin. Navíc WAT se může vyskytovat i v mnoha ostatních oblastech, včetně retroorbitálního prostoru, na tvářích, v horních končetinách a v kostní dřeni [10] (obr. 2).



**Obr. 2. Tuková depa**

Upraveno podle <http://hubpages.com/hub/Why-You-Should-Not-Ignore-Belly-Fat>

Bylo prokázáno, že tuková tkáň je mesodermálního původu. Rozvoj WAT začíná u lidí uprostřed těhotenství nebo u hlodavců krátce po narození, a postupně se zvyšuje během života [10]. Tuková tkáň v dospělosti expanduje hlavně hypertroficky [5]. Rozvoj a funkce WAT jsou také ovlivněny mnoha vnějšími faktory, např. extracelulární matrix hraje důležitou roli v diferenciaci adipocytů. Distribuce tuku, dokonce i u štíhlých jedinců se stálou tělesnou hmotností a stabilním body mass indexem (BMI), se mění s věkem, klesá v retroorbitálním tuku a subkutánní tuk a narůstá v intra-abdominálním tuku [10].

### 3.1.2. Obezita

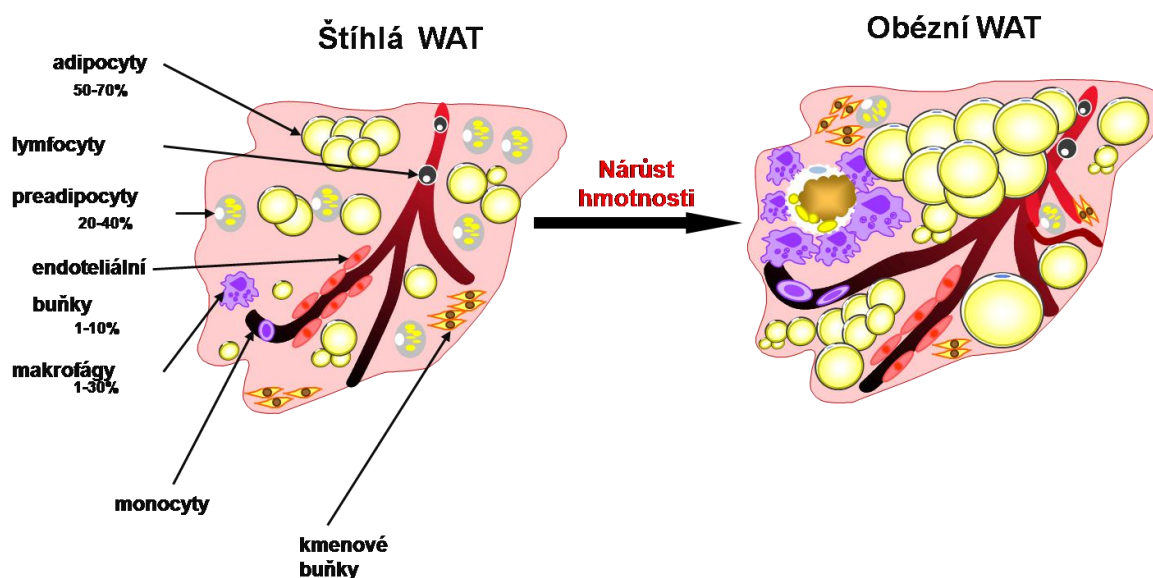
Udržení vyrovnané energetické bilance organismu vyžaduje vysoce regulovanou a koordinovanou operaci mnoha homeostatických systémů. Tyto systémy se evolučně vyvíjely v jiných podmínkách než v těch, kterým jsou moderní lidé zejména západní civilizace vystaveni nyní. Jedná se zejména o přebytek výživy, nových složek potravy, nedostatek fyzické aktivity a prodlužování délky života [6]. Když energetický příjem chronicky převyšuje energetický výdej, je přebytečná energie ukládána do tukové tkáně, což finálně vede k rozvoji obezity [5, 10]. Nejběžněji používanou metodou pro objektivní odhad stupně obezity je BMI, který je vypočítáván jako  $\text{hmotnost [kg]} / \text{výška}^2 [\text{m}^2]$ . Tento index je široce používán jako mezinárodní standard k měření tělesné hmotnosti a klasifikace, která může posoudit stupeň obezity. Obezita je definována jako  $\text{BMI} \geq 30$  [10].

Distribuce WAT se značně neliší pouze mezi druhy, ale také mezi jedinci stejného druhu [10]. Akumulace tukové tkáně v různých anatomických oblastech hraje roli v rozvoji chorob spojených s obezitou [10, 11]. Přebytek tukové hmotnosti v horní části těla obvykle představuje rizikový faktor pro diabetes 2. typu, hypertenzi, dyslipidemii a kardiovaskulární onemocnění, obzvláště u žen. Zdá se, že naproti tomu přebytek tukové hmotnosti v dolních částech těla (oblast hýždí a stehna) nemá významnější metabolické následky [11]. Existují dvě hlavní, ne vzájemně vylučné, teorie o významu rozdílné distribuce tuku pro rozvoj metabolických poruch. První je založena na anatomii a na faktu, že viscerální tuk odvádí své produkty (volné MK a různé sekreční produkty) do portálního oběhu, kde mohou působit přednostně na játra a ovlivňovat metabolismus. Druhá vychází z buněčné biologie a je založena na konceptu, že tukové buňky v různých depech mají různé vlastnosti (genová exprese, metabolická aktivita) přispívající různou měrou k rozvoji metabolických poruch. Expresní profil skutečně odhalil významné rozdíly mezi různými depech tukové tkáně. Tyto rozdíly nemusí pomoci pouze

s vysvětlením vlivu různých tukových dep na rozvoj metabolických komplikací, ale také naznačují možné rozdíly ve vývoji těchto tukových buněk [10].

### 3.1.3. Buněčné složení

WAT je velmi heterogenní tkáň. Je složena z různých typů buněk: maturované adipocyty a ostatní buňky, které bývají obvykle označovány jako buňky tzv. stromavaskulární frakce (SVF) [11]. Mezi ně patří preadipocyty (preadipocyty jsou prekurzory tukových buněk, které ještě nejsou naplněny lipidy), endoteliální buňky, fibroblasty a leukocyty - zejména makrofágy. Tyto makrofágy jsou deriváty kostní dřeně a jejich počet v bílé tukové tkáni koreluje s obezitou [9] (obr. 3).



**Obr. 3. Buněčné složení tukové tkáně.** Při nárůstu hmotnosti dochází k expanzi tukové tkáně a změně buněčného složení.

Přeměna preadipocytu na adipocyt (adipogeneze) zahrnuje 4 stupně: zastavení buněčného cyklu, klonální expanze, raná diferenciace a terminální diferenciace. Tyto stupně jsou řízeny transkripční kaskádou zahrnující jaderný receptor PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) a členy rodiny C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein). PPAR $\gamma$  hraje v adipogenezi zásadní roli, jelikož bylo ukázáno, že je nezbytný a dostačující (v nepřítomnosti jiných faktorů) k iniciaci diferenciace i k udržení terminálního diferenciovaného stavu adipocytů [10].

Jako ve všech tkáních, tak i buňky tukové tkáně mají přirozený životní cyklus [10]. Ačkoliv přesná míra obratu tukových buněk není známa, nedávné studie ukazují, že je



každoročně nahrazeno zhruba 10% adipocytů a že průměrný adipocyt v lidském těle setrvává 10 let [12]. Bylo prokázáno, že odumřelé nebo umírající adipocyty jsou často obklopeny makrofágy, které pohlcují tukové kapénky a nakonec tvoří vícejaderné obří buňky.

Předpokládá se, že pokud již tuková tkáň nedokáže více expandovat v odpovědi na vysoké koncentrace MK z potravy, musí být ukládány v jiných, k tomuto účelu nespecializovaných orgánech, jako jsou játra, pankreatické ostrůvky nebo kosterní svaly. Tento fenomén, znám jako „lipotoxicita“, může narušovat normální funkci těchto orgánů a přispívá k jejich patologiím. Dysfunkce tukové tkáně může být tedy centrem onemocnění souvisejících s obezitou, a porozuměním těchto onemocnění může být rozhodující k rozvoji účinných preventivních a léčebných strategií [3].

## **3.2. Základní metabolické dráhy**

### **3.2.1. Lipolýza**

Při hladovění nebo jiné zátěži vyžadující přísun energie se v tukové tkáni spouští enzymatický proces, tzv. lipolýza, vedoucí k rozpadu molekuly triglyceridu (TG) na glycerol a volné mastné kyseliny (MK). MK a glycerol vstupují do krevního oběhu a jsou transportovány do ostatních tkání (glycerol hlavně do jater, MK do kosterního svalstva, jater a srdce). Některé MK vytvořené během lipolýzy neopustí tukové buňky a mohou být reesterifikovány do intracelulárních TG. Během lipolýzy dochází k hydrolýze TG pomocí tří hlavních lipáz: tuková triglycerid lipáza (ATGL), hormon-senzitivní lipáza (HSL) a monoacylglycerol lipáza (MGL) [13].

Lipolýza v tukových buňkách je pod intenzivní hormonální kontrolou. HSL je považována za hlavní regulátor savčí lipolýzy. Je stimulována katecholaminy a ostatními prolipolytickými hormony a inhibována inzulinem [14]. In vitro, HSL katalyzuje hydrolýzu TG na DG a DG na monoacylglycerol [13].

Nedávno byla izolována ATGL [14]. ATGL je vysoce exprimována v tukové tkáni a její exprese značně narůstá během diferenciaci adipocytů [13]. Tento enzym má substrátovou specifitu k TG. Bylo naznačeno, že zatímco HSL je hlavní lipáza v lidské stimulované lipolýze, ATGL může hrát roli v regulaci bazální lipolýzy [14]. Hydrolyzační aktivita ATGL má zásadní význam ale i pro hormon-stimulovanou lipolýzu v lidských tukových buňkách. ATGL je důležitá v poskytování DG HSL v bazálních a stimulovaných podmínkách, přestože HSL má vlastní schopnost odštěpit první esterovou vazbu [13].

Aktivita MGL je vyžadována v konečné hydrolýze 2 - monoacylglycerolů produkovaných aktivitou HSL. MGL hydrolyzuje 1 a 2 - esterovou vazbu monoacylglycerolu ve stejné míře [13].

Mobilizace lipidů prostřednictvím lipolýzy je klíčová událost v energetické homeostáze. Lipolýza je narušena v mnoha onemocněních souvisejících s inzulinovou rezistencí, jako je obezita a syndrom polycystických ovárií [14]. Nerovnováha mezi hydrolýzou a syntézou TG může být důležitá pro rozvoj obezity [13].

### **3.2.2. Inzulinová dráha**

Inzulin za normálních okolností kontroluje homeostázu energetických zdrojů prostřednictvím stimulace příjmu glukózy do periferních tkání a tím, že potlačuje uvolnění uskladněných lipidů z tukové tkáně. Nedostatečná sekrece a aktivita inzulinu vede k mnoha metabolickým abnormalitám v diabetu 2. typu, včetně hyperglykémie, způsobené poruchou inzulin-stimulovaného příjmu glukózy a nekontrolovatelnou produkcí glukózy v játrech, a dyslipidémie, která narušuje homeostázu MK, TG a lipoproteinů. Chronicky zvýšená hladina cirkulující glukózy a lipidů může pak dále zhoršovat sekreci inzulinu [15]. Inzulinový receptor (IR) je jedna z nejdůležitějších molekul zapojených do inzulinové signalizace a buněčného metabolismu [16]. Navázání inzulinu na IR spouští autofosforylaci z IR, která vede k navázání různých proteinů, včetně substrátu inzulinového receptoru (IRS). IRS1 je klíčovým prostředníkem mezi inzulinem-stimulovaným příjmem glukózy a aktivací anabolické dráhy ve svalech a tukové tkáni, zatímco anabolické účinky inzulinu v játrech jsou převážně řízeny IRS2 [15]. Fosforylace tyrosinu proteinů IRS aktivuje signální dráhu fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K), která stimuluje různé buněčné odpovědi, včetně příjmu glukózy a buněčného růstu a proliferace [16].

### **3.3. Tuková tkáň jako endokrinní orgán**

Tuková tkáň již dlouho není považována za inertní tkáň fungující pouze jako zásobárna energie, ale ukazuje se jako důležitý faktor v regulaci mnoha fyziologických i patofyziologických procesů [9]. Bylo totiž prokázáno, že tuková tkáň je zdrojem hormonů, růstových faktorů nebo cytokinů, které působí místně i na vzdálené orgány jako jsou svaly, játra a mozek, za účelem udržení tělní energetické bilance a metabolického zdraví [3]. Proto je tuková tkáň vnímána jako endokrinní orgán, který je svým rozsahem pravděpodobně největší v celém těle a to zejména u obézních jedinců.

Byly charakterizovány různé produkty tukové tkáně, přičemž některé solubilní faktory produkované touto tkání jsou známy jako adipocytokiny. Termín adipocytokin je používán k popisu cytokinů, které jsou produkovány především tukovou tkání, ačkoli je důležité poznamenat, že všechny nejsou výlučně deriváty tohoto orgánu [9]. Adipocytokiny přispívají k udržení glukózové homeostázy, například modulací glukoneogeneze v játrech. Nicméně u obezity je jejich exprese dysregulována, což vede k různým metabolickým abnormalitám, včetně hyperglykémie a hyperlipidémie, které přispívají k inzulínové rezistenci a srdečním onemocněním. Proto porozumění, jak je regulována exprese adipocytokinů, je rozhodující pro možnost k terapeutickému přizpůsobení jejich aktivity v budoucnu [17].

Mezi nejdůležitější adipocytokiny patří leptin adiponektin, rezistin a visfatin. Na základě dosavadních znalostí lze říci, že představují významné spojení mezi obezitou, inzulínovou rezistencí a souvisejícími zánětlivými onemocněními. Adiponektin a leptin jsou abundantní adipocytokiny produkované adipocyty [9].

Adiponektin je důležitý adipocytokin, který zlepšuje využití glukózy a spalování MK. U obézních zvířat, léčba adiponektinem zlepšuje inzulínovou senzitivitu [9]. Adiponektin snižuje expresi prozánětlivého tumour-necrosis faktoru  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) a navíc zmírňuje jeho negativní efekt na inzulínovou signalizaci. [19]. Adiponektin též inhibuje aktivaci jaderného faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) v endoteliálních buňkách a zasahuje do funkce makrofágů, indukuje produkci důležitých proti-zánětlivých cytokinů, například interleukinu-10 (IL-10). Celkově, adiponektin má tedy přímý anti-diabetický, anti-aterogenní a anti-zánětlivý účinek. Adiponektin je syntetizován a následně shromažďován v ER a enzymy ER jsou nezbytné i k tvorbě jeho multimerů. Předpokládá se, že různé komplexy adiponektinu mají i různou biologickou aktivitu. Např. inzulínová senzitivita pozitivně koreluje zejména s hladinou tzv. „high molecular weight“ adiponektinu. Na rozdíl od prozánětlivých cytokinů, hladina adiponektinu v séru je při obezitě, inzulínové rezistenci a diabetu 2. typu značně snížena [18].

Leptin má základní roli v regulaci příjmu potravy a energetické rovnováhy [11]. Hladina leptinu v séru ukazuje množství energie uložené v tukové tkáni a je úměrná celkové objemu tukové masy u myši i lidí. U žen je hladina leptinu 2-3x vyšší než u mužů. Exprese leptinu narůstá s uvolněním pro-zánětlivých cytokinů, vyvolané v průběhu akutního zánětlivého onemocnění, jako je seps. V monocytech a u makrofágů leptin zvyšuje produkci pro-zánětlivých cytokinů jako je TNF, IL-6 a IL-12 [9].

Rezistin je sekretovaný polypeptid, který negativně ovlivňuje metabolismus glukózy. U hlodavců je odvozen výhradně z adipocytů. Obézní myši mají zvýšenou hladinu

cirkulujícího rezistinu, ale jeho genová exprese v tukové tkáni je paradoxně redukována. Ačkoliv rezistin je u lidí produkován spíše makrofágy než adipocyty a jeho role v lidské obezitě je kontroverzní, počet klinických studií spojené se zvýšenou hladinou rezistinu v séru a s kardiovaskulárními onemocněními naznačuje, že rezistin způsobuje metabolické poruchy u lidí stejně jako u myší [17].

Visfatin je adipocytokin, který je sekretován adipocyty ve viscerálním tuku a snižuje inzulinovou rezistenci. Tato molekula se váže k inzulinovému receptoru, aktivuje ho a přitom nebrání případné vazbě inzulinu [9].

Tuková tkáň je zdrojem i jiných cytokinů, jako je TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  a CC chemokin ligand 2 (CCL2, také znám jako MCP1); mediátorů srážecích procesů, jako je PAI-1 (plasminogen-activator inhibitor type 1); a některých faktorů komplementu. Tyto produkty mají dobře známé role v imunitním systému, a ačkoliv jsou některé z nich produkovány adipocyty, nejsou obvykle považovány za adipocytokiny; nicméně mají důležitou roli na rozhraní mezi imunitním a metabolickým systémem [9].

Zajímavé je, že míra exprese a sekrece mnoha cytokinů je vázána na anatomickém umístění depa v tukové tkáni. Leptin je preferenčně sekretován subkutánní tukovou tkání, zatímco exprese adiponektinu, PAI-1, IL-8 a IL-1 $\beta$ , je důležitější ve viscerálních tukových depech [11].

### **3.4. Infiltrace makrofágů**

WAT obézních hlodavců a lidí může být infiltrována makrofágy [11]. Obsah makrofágů v tukové tkáni pozitivně koreluje s BMI, masou tukové tkáně a velikostí adipocytů. Naopak pokles hmotnosti vede ke zlepšení zánětlivého profilu spolu se značnou redukcí počtu infiltrovaných makrofágů u obézních pacientů. Původ makrofágů v tukové tkáni je pravděpodobně z krevních monocytů, které jsou v prozánětlivém stavu u obézních subjektů. Monocyty migrují do tkání, kde diferencují v makrofágy [20].

Několik experimentů naznačuje, že molekuly patřící do širokého spektra zánětlivých faktorů (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, atd.) většinou pocházejí z buněčné SVF, která zahrnuje infiltrované makrofágy. Akumulace makrofágů může tedy v tukové tkáni zvyšovat produkci prozánětlivých molekul a tím přispívat k patofyziologickým následkům obezity. Makrofágy totiž produkují širokou sadu růstových faktorů, cytokinů, chemokinů a proteolytických enzymů [20]. Příčiny infiltrace makrofágů a jejich aktivace v obézní WAT jsou pravděpodobně multifaktoriální. Parakrinní, autokrinní, endokrinní signály stejně jako

mechanické modifikace (tj. hypertrofie adipocytů a hyperplazie) mohou hrát roli v tomto fenoménu [11].

Fyziologický důvod infiltrace makrofágů do tukové tkáně není plně znám. Různá pozorování podporují hypotézy o potenciálně škodlivé roli makrofágů infiltrovaných do tukové tkáně ve vzniku onemocnění souvisejících s obezitou. Nicméně nedávné studie ukazují, že většina makrofágů tukové tkáně je lokalizována kolem mrtvých adipocytů, což naznačuje, že jedna z jejich normálních funkcí je odstraňovat nekrotické tukové fragmenty z tukové tkáně [11].

Akumulace makrofágů se také zdá být potřebná k formaci nových krevních cév, významně v místě zánětu a v ischemických oblastech. Role makrofágů v angiogenezi je důležitá v rychle expandující tkáni, která je vystavena nějakému stupni hypoxie. V důsledku tak makrofágy mohou přispívat ke kontrole lokální expanze tukové masy a její biologii [11].

Lze tedy shrnout, že role makrofágů v WAT může být obojaká: 1) lokálně „prospěšný“ efekt v kontrole a eventuálně v omezení rozvoje tukové masy a 2) současně „škodlivý“ systémový efekt během zvýšení produkce a sekrece chemokinů a zánětlivých cytokinů, které usnadňují vznik a průběh komplikací obezity [11].

#### **4. ER a obézní tuková tkáň**

Obezita a abnormální inzulinová aktivita jsou asociovány s řadou zdravotních problémů včetně značného nárůstu rizika diabetu 2. typu, infiltrace jater tukem (jaterní steatoza), hepato-žlučové a žlučnickové onemocnění, kardiovaskulárních onemocnění, neurodegenerativních poruch, astmatu a dokonce různých druhů rakoviny [6, 9]. Seskupení patologií známé jako metabolický syndrom, včetně obezity, inzulinové rezistence, diabetu 2. typu a kardiovaskulární choroby, se stal jednou z nejvýznamnějších hrozeb pro lidské zdraví [21]. Primární buněčné příčiny selhávání funkcí tukové tkáně ale zůstávají nejasné. Existuje řada hypotéz a jedna z nich uvádí jako hlavní příčinu dysfunkci ER. Tato hypotéza je podpořena pozorováními, která jsou diskutována níže.

##### **4.1. Stres ER a rozvoj zánětu tukové tkáně**

Zánět je prvotní odpověď imunitního systému na infekci nebo zranění, která vede k ochraně lidského těla proti těmto poškozením. Prodlužování zánětu nebo chronický zánět vede naopak k poškození tkání. Zánět může být spuštěn chronickým nadbytkem metabolických faktorů (např. lipidy, glukóza a cytokiny) [1]. To je současně i jeden z důvodů

aktivace UPR. Další možnou stresovou podmínkou ER, která může vést k prozánětlivému stavu v tukové tkáni, je hypertrofie adipocytů, [5]. V hypertrofických adipocytech, stres ER totiž aktivuje NF- $\kappa$ B dráhu.

NF- $\kappa$ B je klíčový transkripční regulátor, který má ústřední roli v nástupu zánětu. V nepřítomnosti zánětlivých podnětů, NF- $\kappa$ B zůstává v neaktivním stavu prostřednictvím vazby člena rodiny inhibitorů NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), který je konstitutivně produkovan. Aktivace NF- $\kappa$ B je iniciováno signálem-indukovanou fosforylací I $\kappa$ B, který je následně degradován. Degradace I $\kappa$ B vede k uvolnění jaderného lokalizačního signálu v NF- $\kappa$ B, což umožňuje translokaci NF- $\kappa$ B do jádra, kde indukuje transkripci mnoha prozánětlivých genů. Ukazuje se, že zvýšená chaperonová aktivita v ER vede k aktivaci NF- $\kappa$ B. Nicméně mechanismus, kterým je NF- $\kappa$ B aktivována v těchto podmínkách, je zatím nedostatečně objasněn. Experimenty s užitím vápníkových chelátorů a antioxidantů ukazují, že aktivace NF- $\kappa$ B spojená s ER může být způsobena oxidačním stresem z nadměrného skládání proteinů a/nebo z ER stresem zprostředkovaného úniku vápníku do cytosolu. Navíc, v odpovědi na stres ER, může UPR přímo podporovat aktivaci NF- $\kappa$ B pomocí PERK - eIF2 $\alpha$  zprostředkovaný útlum translace. Protože poločas I $\kappa$ B je mnohem kratší než NF- $\kappa$ B, zeslabená translace zvyšuje poměr NF- $\kappa$ B k I $\kappa$ B, což uvolňuje NF- $\kappa$ B k translokaci do jádra v reakci na stres ER [1].

Stres ER tedy vede k aktivaci NF- $\kappa$ B dráhy. NF- $\kappa$ B je přitom zásadní pro expresi cytokinů, např. IL-1, IL-2, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , CCL2, které jsou ve zvýšené míře produkovány obézní tukovou tkání. Nepřímo byl tento vztah potvrzen např. pro TNF $\alpha$ . Na modelu makrofágů bylo ukázáno, že stres ER vyvolaný thapsigarginem významně zvyšuje TNF $\alpha$  sekreci. Thapsigargin je experimentálně využívaný induktor stresu ER. Působí jako selektivní a irreverzibilní inhibitor Ca<sup>2+</sup> ATPázy ER vedoucí k vyčerpání zásob vápníku v ER [22].

Jiný vztah byl prokázán u adipocytokinů rezistinu. Obezita je spjata se zvýšenými hladinami rezistinu v plazmě, ale exprese v tuku je překvapivě snížena. Na myším modelu samotný stres ER skutečně vedl k utlumení exprese rezistinu, jelikož způsobil snížení vazby PPAR $\gamma$  a C/EBP $\alpha$  transkripčních faktorů do jeho promotoru. Lze tedy dedukovat, že stres ER může tvořit základ lokální regulace genové exprese rezistinu v tuku u obézních myší a paradoxní nárůst v plazmě může být způsoben různými systémovými abnormalitami spojenými s obezitou a inzulínovou rezistencí [17].

Sekrece adiponektinu je kriticky vázaná na aktivitu řady enzymů ER. Navození stresu ER vede k downregulaci hladiny adiponektinu v 3T3-L1 adipocytech. Na rozdíl od tohoto, farmakologická léčba stresu ER (viz kapitola 4.3.2.) geneticky obézních db/db myší a u myší,

u kterých byla obezita navozena dietou, vedla k zvýšení buněčné a sérové hladiny adiponektinu [18].

## **4.2. ER a inhibice inzulínové signalizace**

### **4.2.1. c-Jun N-terminální kináza**

Schopnost inzulínu snížit produkci jaterní glukózy, potlačit lipolytickou míru tukové tkáně, a stimulovat příjem glukózy kosterními svaly, je rozhodující pro normální metabolickou funkci. Inzulínová rezistence má významný klinický důsledek, protože je zahrnuta v patogenezi mnoha metabolických komplikací spojených s obezitou [23]. Je definována jako snížená odpověď periferních tkání na inzulín a nastává v mnoha různých souvislostech [5]. Inzulínová rezistence lineárně stoupá s nárůstem BMI [23]. K těžkým inzulínovým rezistencím a diabetu vede ale i selhání vývoje adekvátní tukové masy (lipodystrofie) nebo absolutní chybění tukové masy (lipoatrofie) [5].

Centrální hráč v modulaci inzulínové aktivity a kritická součást v patogenezi obezity, steatozy, a diabetu 2. typu je c-Jun N-terminální kináza (JNK), která inhibuje inzulínovou signalizaci pomocí fosforylace substrátu inzulínového receptoru 1 (IRS1) [16]. Tři členové JNK skupiny serin/threoninových kináz, JNK-1, JNK-2 a JNK-3, patří do mitogen-aktivované rodiny protein kináz. Regulují mnohé aktivity v rozvoji a funkci buněk, ve velké části prostřednictvím jejich schopnosti regulovat transkripci pomocí fosforylace AP-1 (activator protein 1) [24].

Zdá se, že JNK1 je převládající izoformou ve svalech, játrech a v tukové tkáni [24]. JNK1 je proto hlavní izoforma zprostředkující obezitou indukovanou JNK aktivitu a následně inzulínovou rezistenci [24]. O tom svědčí i fakt, že JNK1 deficientní myši jsou chráněny před inzulínovou rezistencí a poškozením signalizace inzulínového receptoru. Nedávné studie ukazují, že stres ER vede k aktivaci JNK. Bylo ukázáno, že UPR aktivuje JNK v hepatocytech. Stres ER potlačuje inzulínovou signalizaci také v adipocytech. Ektopická exprese IRS výrazně narušuje inhibiční efekt stresu ER na inzulínovou signalizaci [25].

Zvýšená aktivita JNK byla detekovatelná i u obézních lidí před chirurgickou redukcí žaludku (GBP). GBP je běžně prováděná bariatrická chirurgická procedura a slouží jako efektivní přístup pro dosažení úbytku hmotnosti u obézních pacientů. Fosforylace JNK výrazně poklesla v tukové tkáni po GBP operaci, současně se snížením stresu ER detekovaným jako pokles eIF2 $\alpha$  a XBP1 a zlepšením inzulínové senzitivity [4].

#### **4.2.2. Mastné kyseliny**

Ukázalo se, že důležitou roli v rozvoji inzulinové rezistence hrají volné MK [5, 26]. Hladina plazmatických volných MK je u obézních jedinců zvýšená. Akutně zvýšená hladina plazmatických volných MK přitom zvyšuje inzulinovou rezistenci [26]. Inzulinová rezistence adipocytů, charakteristická nízkou liposyntetickou a vysokou lipolytickou kapacitou, dále zvyšuje uvolňování volných MK. MK uvolněné adipocyty mohou aktivovat Toll-like receptory 4, následně NF- $\kappa$ B dráhu a poté uvolněné chemokiny a cytokiny ještě více umocňují inzulinovou rezistenci, podporují nadbytečnou lipolýzu a zánět v tukové tkáni i systemicky [5].

Volné MK způsobují stres ER v 3T3-L1 adipocytech. Důležitým downstream efektem stresu ER indukovaným volnými MK je I $\kappa$ B kináza  $\beta$  (IKK $\beta$ ), jejíž exprese je zvýšena v adipocytech myši injikovaných lipidy nebo na vysoko-tukové dietě. Chemické i proteinové chaperony mohou tento nepříznivý efekt volných MK zmírnit. Zeslabení stresu ER indukovaného volnými MK pomocí chemických chaperonů účinně snižuje expresi zánětlivých cytokinů a zlepšuje inzulinovou signalizaci, která je doprovázena snížením IKK $\beta$  aktivity a fosforylace JNK. Je zajímavé, že experimentálně navozené zvýšení exprese proteinového chaperonu BiP částečně redukuje expresi zánětlivých cytokinů navozenou volnými MK, ale nemění fosforylační stav u JNK a IKK $\beta$ , a ani nezlepšuje inzulinovou signalizaci narušenou volnými MK. To naznačuje, že regulace exprese prozánětlivých cytokinů stresem ER může být nezávislá na regulaci inzulinové signalizace [27].

Zvýšení koncentrace MK uvnitř buňky může být způsobeno zvýšenou lipolytickou aktivitou. V 3T3-L1 adipocytech intracelulární akumulace MK přitom zvyšuje expresi zánětlivých cytokinů (IL-6, CCL2). Bylo prokázáno, že MK uvolněné pomocí HSL aktivují p38 a JNK. Pokud je HSL farmakologicky blokována, nedochází k aktivaci p38 ani JNK a současně ani indukci prozánětlivých genů, ale trochu překvapivě nedojde současně ke snížení exprese markerů stresu ER [28]. V tomto směru tedy stres ER nemůže být považován za základní příčinu zvýšeného zánětu.

### **4.3. Terapeutické možnosti**

#### **4.3.1. Redukce hmotnosti**

Bylo ukázáno, že dráhy stresu ER jsou aktivovány v tukové a jaterní tkáni obézních lidí, a že tyto jsou regulovány značným úbytkem hmotnosti spojeným se zlepšením metabolických parametrů [26]. U morbidně obézních lidí byl stres ER významně snižován



úbytkem hmotnosti indukovaný chirurgickou redukcí žaludku [4]. Lze předpokládat, že ke snížení stresu ER povede i dietní opatření vedoucí k redukcí pouze 5 - 10% původní hmotnosti, které je obézním pacientům doporučováno za účelem odstranění patofyziologických jevů s obezitou spojených. Dietní intervence totiž stále patří k nejbezpečnějším a efektivním léčebným postupům.

#### **4.3.2. Farmakologický přístup**

Stres ER je pravděpodobně klíčové spojení mezi obezitou, inzulinovou rezistencí a diabetem 2. typu. Toto mechanistické spojení lze využít pro léčebné účely pomocí orálně podaných aktivních chemických chaperonů. Ukazuje se, že chemické chaperony zvyšují adaptivní kapacitu ER a působí jako účinné antidiabetické s potenciálním využitím v léčbě diabetu 2. typu. Genetické důkazy ukazují silný a příčinný vztah mezi funkční kapacitou ER a působením inzulinu, což naznačuje možnost využití těchto mechanismů pro terapeutické použití. Chemické nebo farmaceutické chaperony, jako je 4-fenyl butyrylová kyselina (PBA), trimethyl N-oxid dihydrát a dimethyl sulfoxid, jsou skupinou nízkomolekulárních sloučenin, o kterých je známo, že stabilizují konformaci bílkovin a zlepšují skládací kapacitu ER [29]. Stejně tak, endogenní žlučové kyseliny a jejich deriváty jako ursodeoxycholová kyselina a její taurin-konjugovaný derivát (TUDCA) mohou také ovlivňovat funkci ER [23, 29]. PBA a TUDCA zmírňují stres ER v buňkách [29]. Léčba obézních a diabetických myší pomocí těchto sloučenin vedla k normalizaci hyperglykémie, snížení infiltrace jater lipidy, a zvýšení působení inzulinu v játrech, svalech a tukové tkáni [23, 29].

Studie prováděné na lidech ukazují, že léčba pomocí TUDCA zlepšuje inzulinovou aktivitu v játrech a svalech, spolu s doprovodným nárůstem aktivační fosforylace složek inzulinové signalizace ve svalech. Navíc, míra zlepšení inzulinové senzitivity v játrech a svalech je podobná jako u léků dostupných v současné době na diabetes, jako jsou thiazolinediony a metformin. U lidí, jaterní a svalová inzulinová senzitivita po léčbě TUDCA narůstá o ~ 30% ( $P < 0,05$ ), ale nemění se po terapii placebem. TUDCA by tedy mohla být efektivně využívána ve farmakologickém přístupu pro léčbu inzulinové rezistence [23].

Stresová odpověď je také zmírněna salicyláty, které mohou přispívat k zvýšení inzulinové senzitivity v adipocytech. Bylo ukázáno, že salicylát úspěšně zmírňuje stres ER indukovaný lipopolysacharidy, tunicamycinem, vysokou hladinou glukózy a nasycenými MK. Ale přesný mechanismus, kterým salicylát snižuje stres ER je neznámý [30].

## 5. Závěr

Obezita je spojena s mechanickým stresem, zvýšeným požadavkem na syntetický aparát buněk tukové tkáně, nadměrným hromaděním tuků, s abnormalitami v intracelulárních energetických tocích a dostupností živin. S ohledem na tato pozorování můžeme předpokládat, že obezita je chronický stimul pro stres ER v periferních tkáních [21].

Nedávné studie poskytují pádné důkazy, které podporují úlohu stresu ER při metabolických onemocnění u lidí. Nezávislé skupiny studující lidi v kontextu metabolických onemocnění našly významný vztah obezitou a stresem. Ukazuje se, že stres ER a UPR mají fyziologickou a patofyziologickou úlohu v rozvoji zánětu a v inzulinové signalizaci. Stres ER pravděpodobně také může přispívat ke ztrátě  $\beta$ -buněk u diabetu. Obnovení funkce ER za současného zlepšení metabolického stavu celého organismu by mohlo být dosaženo terapeuticky pomocí chemických chaperonů, které usnadňují skládání proteinů a chrání ER před stresem. Nicméně i nyní jsou nutné nové studie, které by dále dokumentovaly komplikované vztahy mezi stresem ER a dysfunkcí buněk tukové tkáně.

## 6. Literatura

1. Zhang, K. and R.J. Kaufman, *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 455-62.
2. Brostrom and M., *Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability*. Cell Calcium, 2003. **34**(4-5): p. 345-363.
3. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease*. The Journal of Lipid Research, 2007. **48**(9): p. 1905-1914.
4. Gregor, M.F., et al., *Endoplasmic Reticulum Stress Is Reduced in Tissues of Obese Subjects After Weight Loss*. Diabetes, 2008. **58**(3): p. 693-700.
5. Lionetti, L., et al., *From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009. **19**(2): p. 146-52.
6. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): p. 900-17.
7. Wek, R.C., H.Y. Jiang, and T.G. Anthony, *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 1): p. 7-11.
8. Rutkowski, D.T. and R.J. Kaufman, *That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(10): p. 469-76.
9. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 772-83.
10. Gesta, S., Y.H. Tseng, and C.R. Kahn, *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source*. Cell, 2007. **131**(2): p. 242-56.
11. Cencello, R. and K. Clement, *Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue*. BJOG, 2006. **113**(10): p. 1141-7.
12. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
13. Lafontan, M. and D. Langin, *Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue*. Prog Lipid Res, 2009. **48**(5): p. 275-97.

14. Ryden, M., et al., *Comparative studies of the role of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(6): p. E1847-55.
15. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 193-205.
16. Zhou, L., et al., *Autophagy-mediated insulin receptor down-regulation contributes to endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance*. Mol Pharmacol, 2009. **76**(3): p. 596-603.
17. Lefterova, M.I., et al., *Endoplasmic reticulum stress regulates adipocyte resistin expression*. Diabetes, 2009. **58**(8): p. 1879-86.
18. Zhou, L., et al., *DsbA-L Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Adiponectin Downregulation*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2809-2816.
19. [www.genecards.org](http://www.genecards.org).
20. Lacasa, D., et al., *Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes*. Endocrinology, 2007. **148**(2): p. 868-77.
21. Ozcan, U., *Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-461.
22. Kmonickova, E., et al., *Modulator of intracellular Ca(2+), thapsigargin, interferes with in vitro secretion of cytokines and nitric oxide*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2005. **149**(2): p. 321-4.
23. Kars, M., et al., *Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women*. Diabetes, 2010. **59**(8): p. 1899-905.
24. Hotamisligil, G.S., *Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes*. Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S73-8.
25. Xu, L., G.A. Spinas, and M. Niessen, *ER stress in adipocytes inhibits insulin signaling, represses lipolysis, and alters the secretion of adipokines without inhibiting glucose transport*. Horm Metab Res, 2010. **42**(9): p. 643-51.

26. Boden, G., et al., *Increase in Endoplasmic Reticulum Stress-Related Proteins and Genes in Adipose Tissue of Obese, Insulin-Resistant Individuals*. *Diabetes*, 2008. **57**(9): p. 2438-2444.
27. Jiao, P., et al., *FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKKbeta pathways*. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. **19**(3): p. 483-91.
28. Mottillo, E.P., X.J. Shen, and J.G. Granneman, *beta3-adrenergic receptor induction of adipocyte inflammation requires lipolytic activation of stress kinases p38 and JNK*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1801**(9): p. 1048-55.
29. Ozcan, U., *Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes*. *Science*, 2006. **313**(5790): p. 1137-1140.
30. Alhusaini, S., et al., *Lipopolysaccharide, high glucose and saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress in cultured primary human adipocytes: Salicylate alleviates this stress*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. **397**(3): p. 472-478.