

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Нариа Ироденко

Studium energetického metabolismu myších modelů obezity
Characterization of energy metabolism of murine models of obesity

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Kristina Bardová, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování:

Děkuji své školitelce Mgr. Kristině Bardové, Ph.D za odborné vedení, čas a velkou trpělivost, se kterou se mi věnovala během vypracovávání magisterské práce. Dále bych ráda poděkovala celému týmu z Oddělení biologie tukové tkáně FGÚ AV ČR za vstřícný přístup, podnětné připomínky a přátelské prostředí a v neposlední řadě i své rodině za podporu během mého studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Kristiny Bardové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, dne 1. 6. 2020

Ilaria Irodenko

Abstrakt

Energetický metabolismus zahrnuje procesy příjmu a výdeje energie a zahrnuje ukládání přebytečné energie do tukových zásob. Bílá tuková tkáň je zásobárnou energie a zároveň hraje důležitou roli v zajištění energetické homeostázy. Živočiškové získávají energii pomocí oxidace substrátů z potravy. Nepřímá kalorimetrie je často používanou metodou sloužící k odhadu energetického výdeje na základě měření příjmu kyslíku a výdeje oxidu uhličitého. Poměr V_{CO_2}/V_{O_2} (respirační koeficient) je indikátorem oxidace metabolických substrátů. Schopnost jedince přizpůsobovat oxidaci substrátů jejich dostupnosti se považuje za měřítko metabolické flexibility. Snížení metabolické flexibility souvisí se sníženou schopností přizpůsobit se změnám v dostupnosti metabolických substrátů a s nadměrným ukládáním tuku v těle. V této diplomové práci jsme zkoumali souvislost metabolické flexibility definované na základě nepřímé kalorimetrie s metabolismem tukové tkáně u dvou kmenů laboratorních myší C57BL/6J a A/J, které se liší náchylností k obezitě indukované dietou. Myši kmene A/J vykazovaly vyšší metabolickou flexibilitu na úrovni celého organismu společně s vyšší schopností tukové tkáně uvolňovat a přijímat lipidy. Studium rozdílů v reakci na působení diety s vysokým obsahem tuků umožňuje definovat rozdíly v „metabolicky zdravé“ a „metabolicky poškozené“ tukové tkáni. Definování těchto mechanismů pak cílí na pozdější vývoj léčiv na obezitu a související komorbidity.

Klíčová slova:

Energetický metabolismus, bílá tuková tkáň, energetická homeostáza, nepřímá kalorimetrie, respirační koeficient, metabolická flexibilita, obezita

Abstract

Energy metabolism involves processes of energy intake and energy expenditure, including storage of excessive energy in a form of lipids. White adipose tissue stores energy and plays an important role in maintenance of energy homeostasis. Animals obtain energy by oxidation of substrates from diet. Indirect calorimetry is a method for assessment of energy expenditure based on a measurement of oxygen consumption and carbon dioxide production. The V_{CO_2}/V_{O_2} ratio (Respiratory Quotient) indicates oxidation of specific metabolic substrates. Metabolic flexibility is the ability of an organism to match substrate oxidation to its availability. The decrease of a metabolic flexibility is linked to inability to adapt to available substrate and with excessive lipid storage in the body. In this thesis we evaluated correlation between the metabolic flexibility defined by indirect calorimetry and the adipose tissue metabolism in two strains of mice, C57Bl/6J and AJ, that differ in their propensity to diet-induced obesity. Increased whole-body metabolic flexibility in A/J mice was connected to higher ability of adipose tissue to release and uptake lipids. The study of reaction to high-fat diet enables us to distinguish „metabolically healthy“ and „metabolically unhealthy“ adipose tissue. The knowledge of these mechanisms forms a basement for further development of anti-obesity drugs.

Key words:

Energy metabolism, white adipose tissue, energy homeostasis, indirect calorimetry, Respiratory Quotient, metabolic flexibility, obesity

Seznam zkratek

ACAT	acyl-CoA cholesterol-acyltransferáza (<i>acyl-CoA cholesterol acyltransferase</i>)
Acetyl-CoA	acetyl koenzym A (<i>acetyl coenzyme A</i>)
ACSL	syntetáza acyl-CoA s dlouhým řetězcem (<i>long-chain acyl-CoA synthetase</i>)
aP2	adipocytový protein 2 (<i>adipocyte protein 2</i>)
ATGL	triacylglycerolová lipáza (<i>adipose triglyceride lipase</i>)
ATP	adenosintrifosfát (<i>adenosine triphosphate</i>)
BAT	hnědá tuková tkáň (<i>brown adipose tissue</i>)
B6	C57BL/6J
CACT	karnitin-acylkarnitin translokáza (<i>carnitine-acylcarnitine translocase</i>)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CGI-58	komparativní genový identifikátor-58 (<i>comparative gene identification-58</i>)
cHF	dieta s vysokým obsahem tuku (<i>diet with high amount of fat</i>)
CPT1	karnitin palmitoyl transferáza 1 (<i>carnitine palmitoyltransferase 1</i>)
CPT2	karnitin palmitoyl transferáza 2 (<i>carnitine palmitoyltransferase 2</i>)
DAG	diacylglycerol (<i>diglyceride</i>)
DGAT	diacylglycerol-acyltransferáza (<i>diglyceride acyltransferase</i>)
DIO	obezita indukovaná dietou (<i>diet-induced obesity</i>)
EE	energetický výdej (<i>energy expenditure</i>)
EI	energetický příjem (<i>energy intake</i>)
ER	endoplazmatické retikulum (<i>endoplasmic reticulum</i>)
FA	mastná kyselina (<i>fatty acid</i>)
FABP	protein vázající mastné kyseliny (<i>fatty acid-binding protein</i>)
FAS	syntáza mastných kyselin (<i>fatty acid synthase</i>)
FM	hmotnost tuku (<i>fat mass</i>)
G0S2	G0/G1 přepínač genu 2 (<i>G0/G1 switch gene 2</i>)
G-3-P	glycerol-3-fosfát (<i>glycerol-3-phosphate</i>)

GLUT4	glukózový přenašeč typu 4 (<i>glucose transporter type 4</i>)
HFD	vysokotuková dieta (<i>high fat diet</i>)
HL	játerní lipáza (<i>hepatic lipase</i>)
HSL	hormon senzitivní lipáza (<i>hormone-sensitive lipase</i>)
IDL	lipoprotein o střední hustotě (<i>intermediate-density lipoprotein</i>)
LBM	hmotnost metabolicky aktivní tkáně (<i>lean body mass</i>)
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (<i>long chain fatty acids</i>)
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (<i>low-density lipoprotein</i>)
LPL	lipoproteinová lipáza (<i>lipoprotein lipase</i>)
MAG	monoacylglycerol
MAM	membrány asociované s mitochondriemi (<i>mitochondria associated membranes</i>)
MGAT	monoacylglycerol-acyltransferáza (<i>monoacylglycerol acyltransferase</i>)
MGL	monoacylglycerolová lipáza (<i>monoacylglycerol lipase</i>)
mPFC	mediální prefrontální kortex (<i>medial prefrontal cortex</i>)
NEFA	neesterifikované mastné kyseliny (<i>non-esterified fatty acids</i>)
PDH	pyruvát dehydrogenáza (<i>pyruvate dehydrogenase</i>)
PKA	protein kináza A (<i>protein kinase A</i>)
PLIN	perilipin
Pnpla2	protein obsahující patatinovou fosfolipázovou doménu 2 (<i>patatin-like phospholipase domain-containing protein</i>)
PPAR	peroxizomálním proliferátorem aktivovaný receptor (<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (<i>polyunsaturated fatty acids</i>)
RQ	respirační koeficient (<i>respiratory quotient</i>)
SCD	stearoyl-CoA desaturáza (<i>stearoyl-CoA desaturase</i>)
SCN	suprachiasmatické jádro (<i>suprachiasmatic nucleus</i>)
STD	standardní dieta (<i>standard diet</i>)

TAG	triacylglycerol (<i>triacylglycerol</i>)
TBM	celková tělesná hmotnost (<i>total body mass</i>)
UCP1	odpřahující protein 1 (<i>uncoupling protein 1</i>)
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě (<i>very low density lipoprotein</i>)
WAT	bílá tuková tkáň (<i>white adipose tissue</i>)

Obsah

Úvod	1
1. Literární přehled	2
1.1. Energetický metabolismus.....	2
1.1.1. Energetická rovnováha	2
1.2. Nepřímá kalorimetrie	3
1.2.1. Principy nepřímé kalorimetrie.....	4
1.2.2. Kalkulace substratové oxidace.....	5
1.2.3. Výpočet energetického výdeje	6
1.3. Metabolická flexibilita	7
1.3.1. Randlův cyklus	9
1.4. Tuková tkáň.....	10
1.5. Metabolismus lipidů	12
1.5.1. Lipolýza	13
1.5.2. Lipogeneze.....	16
1.6. Integrace metabolismu lipidů.....	19
1.6.1. Vliv HFD na energetickou rovnováhu	19
1.6.2. Kalorická restrikce.....	20
1.6.3. Vliv teploty.....	21
1.6.4. Cirkadiánní regulace energetického metabolismu	21
2. Cíle práce	23
3. Materiál	24
3.1. Seznam použitých přístrojů	24
3.2. Seznam použitých chemikálií.....	25
3.3. Laboratorní zvířata.....	27
4. Experimenty	27
4.1. Experiment 1 – nepřímá kalorimetrie	27
4.2. Experiment 2 – odběr po 3 dnech na dietách	29
4.3. Experiment 3 – cirkadiánní rytmy.....	29
5. Metody	29
5.1. Nepřímá kalorimetrie	29
5.2. Měření koncentrace lipidových metabolitů v plazmě	30
5.2.1. TAG.....	30
5.2.2. NEFA.....	31

5.2.3.	Glycerol.....	32
5.3.	Kvantifikace mRNA	32
5.3.1.	Izolace RNA.....	32
5.3.2.	Reverzní transkripce	33
5.3.3.	Kvantitativní PCR.....	34
5.4.	Histologie.....	38
5.4.1.	Barvení hematoxylinem a eosinem	38
5.5.	Imunohistochemie v tuku (eWAT)	39
5.5.1.	Barvení protilátkou proti ATGL	39
5.6.	Statistické vyhodnocení.....	41
6.	Výsledky.....	42
6.1.	Nepřímá kalorimetrie	42
6.1.1.	Tělesná hmotnost, příjem potravy, energetický výdej a koncentrace TAG v exkrementech.....	42
6.1.2.	Respirační koeficient a oxidace lipidů a sacharidů	44
6.2.	Koncentrace lipidových metabolitů v plazmě.....	47
6.3.	Genová exprese v tkáních.....	49
6.3.1.	Uptake lipidů, aktivace FA a reesterifikace v epididymálním tukovém depu	49
6.3.2.	Lipogeneze v játrech	51
6.3.3.	Lipolýza v epididymálním tukovém depu	52
6.4.	Barvení hematoxylinem a eozinem	54
6.4.1.	Stanovení velikosti adipocytů	54
6.5.	Imunohistochemické barvení ATGL	56
7.	Diskuze.....	57
7.1.	Nepřímá kalorimetrie	57
7.1.1.	Celotělová energetická homeostáza.....	57
7.1.2.	Metabolická flexibilita	58
7.2.	Koncentrace lipidových metabolitů v plazmě.....	58
7.3.	Metabolismus lipidů v tkáních.....	60
8.	Závěr	62
9.	Seznam použité literatury.....	63

Úvod

Obezita je komplexním chronickým onemocněním, které v celosvětovém měřítku představuje zátěž pro zdravotnický systém. Obezita je důsledkem porušení energetické homeostázy, což je rovnováha mezi příjmem a výdejem energie. Různé endogenní a enviromentální faktory mohou vést k rozvoji této nemoci, avšak hlavní příčinou obezity je nadměrný příjem potravy a nedostatek fyzické aktivity. K následkům obezity patří kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus druhého typu, metabolický syndrom a jiné zdravotní komplikace.

Studium metabolické flexibility, která se projevuje mimo jiné i ve schopnosti organismu efektivně skladovat živiny z potravy a regulovat hladinu krevní glukózy v postprandiálním stavu, může vést k pochopení mechanismů energetické homeostázy. Tuková tkáň je důležitým orgánem pro zajištění celotělové metabolické flexibility a zachování zdravého fenotypu. Příklad diety s vysokým obsahem tuků negativně souvisí s funkcí tukové tkáně udržovat procesy spojené s ukládáním a uvolňováním energie ve vyrovnaném stavu.

Diplomová práce je zaměřena na pochopení role bílé tukové tkáně v regulaci energetického metabolismu. Experimenty byly prováděny na myších modelech pro rozdílnou náchylnost k dietou indukované obezitě, což jsou inbrední kmeny C57BL/6J a A/J. Dieta s vysokým obsahem tuku má různý vliv na energetický metabolismus u těchto kmenů, což se projevuje v jejich odlišné schopnosti přizpůsobovat se dietě. Součástí této práce bylo stanovení celotělového metabolismu metodou nepřímé kalorimetrie a propojení těchto výsledků s metabolismem bílé tukové tkáně měřeným na úrovni genové exprese.

Pochopení metabolismu tukové tkáně a metabolické flexibility by mohlo vést k rozvoji nových farmaceutických preparátů pro léčbu obezity a metabolického syndromu.

1. Literární přehled

1.1. Energetický metabolismus

1.1.1. Energetická rovnováha

Změny v tělesné hmotnosti musí odpovídat prvnímu termodynamickému zákonu (Ravussin, Gutman et al. 2013). Změna energetického obsahu v těle je jednoznačně definována celkovým energetickým příjmem a celkovým energetickým výdejem (Leibel, Rosenbaum et al. 1995). Jednotlivé složky této rovnováhy mohou být přímo změřené a umožňují stanovit obsah energie v těle uskladněné ve formě tuku.

Energetický příjem (EI) je považován za energetický obsah přijatý ve formě potravy. Energii z potravy můžeme charakterizovat jako hrubou (obsah tepla uvolněný při spalování potravy v bombovém kalorimetru), stravitelnou (hrubá energie minus energetická ztráta v exkrementech), metabolizovatelnou (stravitelná energie minus energetická ztráta v moči) a čistou (metabolizovatelná energie minus energetická ztráta během trávení) (Hall, Melendez et al. 2013).

Energetický výdej (EE) je měřen zejména pomocí přímé nebo nepřímé kalorimetrie a skládá se ze 4 komponent: bazální metabolický obrat, termický efekt příjmu potravy, energetický výdej spojený s fyzickou aktivitou a tvorba tepla třesovou nebo netřesovou termogenezí. Energetický výdej je možné měřit na mnoha úrovních, v případě měření celotělové energetické homeostázy se používá zejména přímá a nepřímá kalorimetrie. Zatímco přímá kalorimetrie využívá pro stanovení energetického výdeje měření přímého výdeje tepla organizmem, nepřímá kalorimetrie odhaduje energetický výdej na základě měření spotřeby O₂ a měření uvolněného CO₂ (Levine 2005).

Celosvětový problém spojený s nárůstem obezity vyvolal velký zájem o studium mechanismů energetické homeostázy, tedy stanovení rovnováhy mezi EI a EE. I když současné metody měření EE u myší jsou citlivé a široce použitelné, jejich schopnost odhadnout rozdíly v EE je limitována vinou rozdílů v tělesné hmotnosti studovaných objektů. Obezita může být považována za důsledek trvalého zvýšení EI oproti EE. Nicméně toto jednoduché vysvětlení nezahrnuje patofyziologické mechanismy, jimž je třeba porozumět pro efektivní léčbu obezity.

1.2. Nepřímá kalorimetrie

Všechny žijící organizmy jsou zapojené do neustálé výměny energie s prostředím. Oxidace substrátů v potravě poskytuje energii potřebnou pro zajišťování biologické homeostázy (Simonson and DeFronzo 1990). Nejběžnějším způsobem získání chemické energie ze substrátů je úplná oxidace na oxid uhličitý a vodu. Zároveň je teplo vytvořené u savců a ptáků v průběhu biologického spalování potřebné pro udržování teploty těla (Ferrannini 1988). Chemická energie uložená v chemických vazbách hlavních energetických substrátů je využita zejména pro zajištění elektrochemických gradientů přes buněčné membrány, pro biosyntézu makromolekul jako jsou proteiny, glykogen a triacylglyceroly (TAG) a pro svalovou kontrakci (Schutz 1995).

Termín „nepřímá kalorimetrie“ souvisí s nepřímým odhadnutím energetického výdeje na základě měření výměny respiračních plynů, na rozdíl od přímé kalorimetrie, kde je přímo měřen přenos tepla z organismu (Schutz 1995). Pro subjekt za bazálních podmínek (při odpočinku, v termoneutrálním prostředí a 3-5 hodin po jídle) představuje rozdíl mezi metabolickou produkcí tepla a ztrátou tepla tzv. tepelnou rovnováhu, kterou lze vyjádřit:

Produkce tepla = tepelné ztráty +/- uskladnění tepla

Uskladnění tepla může být pozitivní, kdy je teplo získané, což ve výsledku znamená zvýšení vnitřní tělesné teploty. Uskladnění tepla může být i negativní, kdy se teplo ztrácí a tělo se ochlazuje. Veličina uskladnění tepla může být vypočtena z tělesné hmotnosti, specifické tepelné kapacity těla (která záleží na složení těla) a na poměru změny ve vnitřní tělesné teplotě. V praxi tento výpočet není jednoznačný, protože změny v teplotě v rámci těla nejsou rovnoměrně rozložené (distribuované) mezi tkáněmi (Schutz 1995).

Měření přeměny metabolické volné energie je uplatněním termodynamiky v živočišném světě. Nepřímá kalorimetrie je metodou stanovení metabolického obratu na základě měření spotřeby kyslíku (O₂) a produkce oxidu uhličitého (CO₂) v organismu. Tato metoda používá princip prvního termodynamického zákona – energie v izolované soustavě nemůže samovolně vznikát ani zanikat, ale může se vyměňovat mezi organismem a jeho prostředím (Simonson and DeFronzo 1990) (Ferrannini 1988).

Nepřímá kalorimetrie je založená na jednoduchých principech, avšak v praxi je technicky složitou metodou, protože malé změny v obsahu kyslíku ve vzduchu detekované v metabolickém boxu jsou zatíženy velkou chybou měření, která je spojena se změnou teploty, tlaku a vlhkosti vzduchu. Nepřímá kalorimetrie je nicméně běžnou metodou pro zjištění

energetické rovnováhy u zvířat i u lidí (Arch, Hislop et al. 2006) (Schadewaldt, Nowotny et al. 2013).

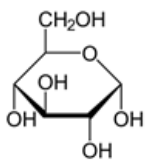
1.2.1. Principy nepřímé kalorimetrie

Sacharidy, tuky a proteiny jsou hlavními energetickými substráty pro produkci energie. Tyto tři energetické substráty se liší v poměrech spotřebovaného kyslíku (VO_2) ku produkovanému oxidu uhličitému (VCO_2) a také v množství energie uvolněné na gram substrátu. Poměr mezi VCO_2 a VO_2 je charakterizován jako respirační koeficient (RQ):

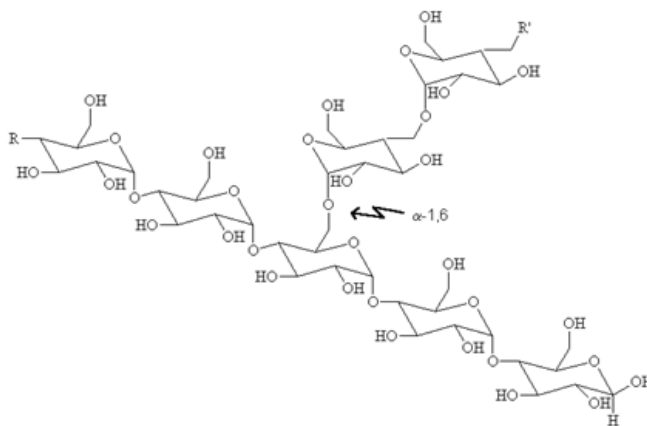
$$RQ = VCO_2/VO_2$$

Při oxidaci sacharidů je RQ rovno 1,0; 15,7 kJ energie je uvolněno na gram oxidované glukózy. Pro glykogen je toto množství stanoveno na 16,7 kJ/g díky dodatečné energii uložené v dalších chemických vazbách.

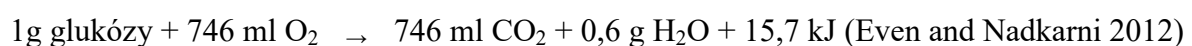
D - glukóza



glykogen



Celková rovnice je:



Pro lipidy se RQ blíží přibližně 0,705 v závislosti na délce a stupni saturace daného lipidu; na gram oxidovaného lipidu je uvolněno přibližně 37,7 kJ energie. Celková rovnice je:

1g palmitátu + 2,029 ml O₂ → 1,430 ml CO₂ + 0,45 g H₂O + 37,7 kJ (Even and Nadkarni 2012)

Pro proteiny se RQ pohybuje okolo 0,81 v závislosti na aminokyselinovém složení daného proteinu; na gram oxidovaného proteinu je uvolněno cca 16,7 kJ energie. Celkovou rovnicí lze popsat jen přibližnou oxidaci standardního proteinu kvůli variabilitě ve složení. Celková rovnice za předpokladu, že močovina je hlavním odpadním produktem, je:

1g proteinu + 966 ml O₂ → 782 ml CO₂ + 0,45 g H₂O + 0,50 g močoviny + 16,7 kJ (Even and Nadkarni 2012)

Jak lze vidět z předchozích rovnic, oxidace glukózy a lipidů je úplná (výslednými produkty jsou CO₂ a H₂O), zatímco oxidace proteinů není úplná díky exkreci dusíku ledvinami ve formě močoviny [CO(NH₂)₂]. Tvorba močoviny vyžaduje energii, a proto se metabolizovatelná energie proteinu sníží na 16,7 kJ/g, podobně jako u sacharidů. U tuků energetický obsah a RQ záleží na jejich délce a stupni saturace (Even and Nadkarni 2012).

RQ může nabývat i hodnot mimo interval 0,7-1,0. V případě, že překračuje hodnotu 1, pravděpodobně dochází k *de novo* lipogenezi. Pokud má hodnotu nižší než 0,7, pak pravděpodobně dochází ke glukoneogenezi nebo ketogenezi (Schutz 1995).

1.2.2. Kalkulace substratové oxidace

Hospodaření se substráty v rámci organismu

Koncepce „mizení“ sacharidů, lipidů a proteinů z jejich metabolických zásob je klíčová pro správnou interpretaci kalorimetrických dat. Ve většině případů je hlavní metabolickou dráhou spotřebování substrátu oxidace. Nepřímá kalorimetrie měří úroveň oxidace substrátu bez ohledu na metabolické přeměny. Avšak existují i výjimečné procesy, které mohou mít podstatný vliv na rychlost substrátové oxidace a energetické produkce. Těmito procesy jsou glukoneogeneze, ketogeneze nebo lipogeneze nebo oxidace substrátů po podání diet s neobvyklým složením. V tomto případě termíny „zmizení“ a oxidace nejsou zaměnitelné a pro poskytnutí nezávislé kvantifikace glukoneogeneze, lipogeneze a ketogeneze musí být použita nepřímá kalorimetrie kombinovaná s využitím radioizotopových technik (Simonson and DeFronzo 1990).

Oxidace standardního sacharidu (glukózy) G_{ox} a lipidu (palmitátu) L_{ox} mohou být stanovené na základě výměny respiračních plynů, zatímco jediným způsobem stanovení oxidace proteinů P_{ox} je určení exkrece dusíku v moči (Even and Nadkarni 2012). Složení oxidovaného

proteinu reflektuje spíš složení proteinů v dietě než složení živočišného svalu (Simonson and DeFronzo 1990). Vzhledem k tomu, že dusík představuje 16% hmotnosti proteinu, oxidace proteinů může být určena pomocí kvantifikace exkrece dusíku z moči:

$$P_{ox} (g) = 100/16 \cdot N (g) = 6,25 \cdot N (g) \text{ (Ferrannini 1988)}$$

Rovnice oxidace sacharidů a lipidů:

$$G_{ox} (mg) = 4,55 \cdot VO_2 (ml) - 3,21 \cdot VCO_2 (ml) - 2,87 \cdot N (mg) \text{ (Ferrannini 1988)}$$

$$L_{ox} (mg) = 1,67 \cdot VO_2 (ml) - 1,67 \cdot VCO_2 (ml) - 1,92 \cdot N (mg) \text{ (Ferrannini 1988)}$$

(když se P_{ox} bere v úvahu)

a

$$G_{ox} (mg) = 4,55 \cdot VO_2 (ml) - 3,21 \cdot VCO_2 (ml) \text{ (Even and Nadkarni 2012)}$$

$$L_{ox} (mg) = 1,67 \cdot VO_2 (ml) - 1,67 \cdot VCO_2 (ml) \text{ (Even and Nadkarni 2012)}$$

(když se P_{ox} nebere v úvahu)

Exkrece dusíku se obecně musí zahrnovat do výpočtu G_{ox} a L_{ox} , když proteiny přispívají více než 10 -15 % k energetickému obsahu diety.

1.2.3. Výpočet energetického výdeje

Existuje více rovnic pro výpočet EE, které poskytují přibližně stejný odhad EE (maximálně 1% odchylka měřených dat) vycházející ze změn v koncentracích respiračních plynů (Even and Nadkarni 2012). Nejběžnější ze čtyř běžně používaných je rovnice:

$$EE (kcal/min) = 3,91 VO_2 (l) + 1,10 VCO_2 (l) - 1,93 N (g) \text{ (Simonson and DeFronzo 1990)}$$

Vzhledem k tomu, že obsah dusíku v moči nemusí přesně reflektovat oxidaci proteinů, tak je často vliv oxidace proteinů na EE zanedbáván (Simonson and DeFronzo 1990). Výše zmíněná rovnice se pak vyjadřuje jako:

$$EE (kcal/min) = 3,91 VO_2 (l) + 1,10 VCO_2 (l) \text{ (Even and Nadkarni 2012)}$$

Pro správnou interpretaci hodnoty energetického výdeje při různých teplotách okolí je třeba stanovit tzv. termoneutrální teplotu. V subtermoneutrálních podmínkách je EE nepřímo

uměrný teplotě okolí, tak jak pozorovaný objekt musí využívat třesové i netřesové mechanismy k tvorbě tepla a zvýšit tím svou spotřebu energie. Zóna kolem 30 °C pak představuje pro laboratorní myši termoneutrální zónu, při které je metabolismus na bazální úrovni a v období, kdy nedochází k fyzickému pohybu, pak můžeme v termoneutrální teplotě změřit odpočinkový metabolický obrat (Cannon and Nedergaard 2011).

1.3. Metabolická flexibilita

Dieta člověka obsahuje sacharidy a tuky v různých poměrech. Efektivní skladování živin, pocházejících z potravy, a minimalizace výkyvů hladin krevní glukózy po jídle jsou typickými znaky zdravého metabolismu sacharidů a tuků. Ten vyžaduje koordinovanou regulaci funkce významných orgánů: pankreatu, jater, kosterního svalu a tukové tkáně (Storlien, Oakes et al. 2004).

Metabolická flexibilita je schopnost systému (organismu, tkáně nebo buňky) přepínat mezi oxidací lipidů za stavu vysokých hladin mastných kyselin (FA) v krvi v průběhu hladovění a potlačením oxidace lipidů a zvýšením oxidace glukózy za inzulínem stimulovaných podmínek. Jinými slovy je to udržení rovnováhy mezi dvěma hlavními energetickými substráty (glukózou a lipidy) na základě jejich dostupnosti a přizpůsobení oxidace substrátu jeho dostupnosti (Kelley and Mandarino 2000).

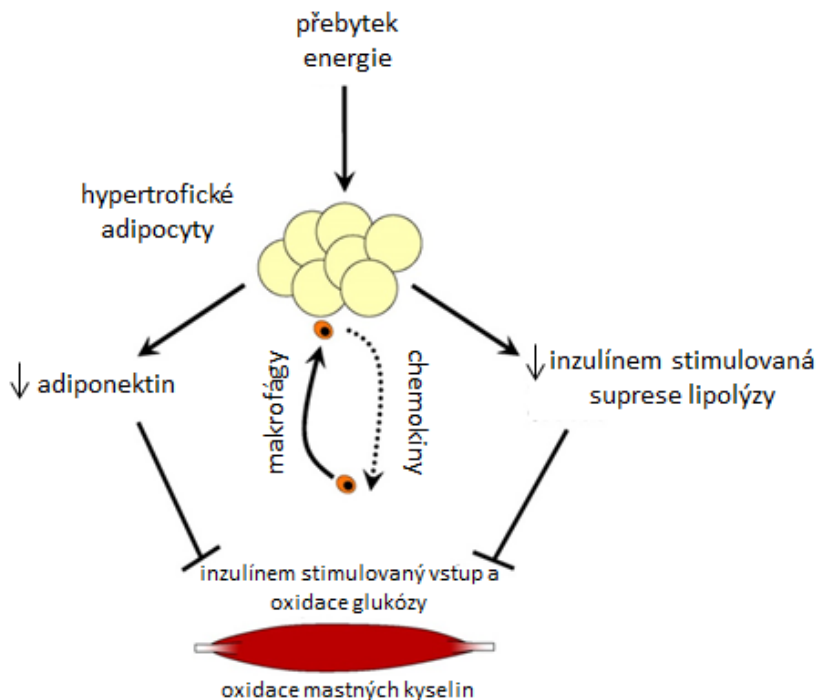
Metabolická flexibilita zahrnuje celou řadu přirozeně se vyskytujících stavů, jako například přechod mezi oxidací sacharidů a oxidací tuků v průběhu hladovění nebo jako odpověď na vysokotukovou dietu (HFD). Metabolická flexibilita těsně souvisí s inzulínovou senzitivitou a je ovlivněná jak funkcí kosterního svalu, tak tukové tkáně. Kosterní sval je základní tkání, která zajišťuje periferní inzulínovou senzitivitu a glukózovou homeostázu (Kelley and Mandarino 2000).

Existují dva základní znaky redukované (snížené) metabolické flexibility. Prvním aspektem snížené metabolické flexibility je snížená oxidace tuků během stavu hladovění (což může být detekováno jako relativně vyšší RQ proti flexibilnímu organismu) a snížená oxidace glukózy za inzulínem stimulovaných podmínek (což může být detekováno jako relativně nižší RQ proti flexibilnímu organismu). V laboratoři Kelleyho a kolegů (Kelley, Goodpaster et al. 1999, Kelley and Mandarino 2000) byla provedena studie, ve které charakterizovali flexibilitu kosterních svalů v oxidaci substrátů u zdravých a obézních jedinců v hladovém stavu a za inzulínem stimulovaných podmínek. RQ u zdravého jedince se zvyšuje z 0,8 na 1,0 mezi hladověním a inzulínem stimulovaným stavem, což odpovídá přechodu od oxidace lipidů

k oxidaci glukózy. Naopak, RQ 0,9 u obézních jedinců přetrvávalo jak ve stavu hladovění, tak po infuzi inzulínu (Storlien, Oakes et al. 2004). Druhým aspektem je snížená schopnost regulace lipolýzy a následné schopnosti uvolňovat neesterifikované mastné kyseliny (NEFA) do krve pod vlivem inzulínu. Snížená metabolická flexibilita úzce souvisí se sníženou schopností inzulínu potlačovat uvolňování NEFA a také se sníženou hladinou adiponektinu v krvi (obr. 1). Tuková tkáň proto hraje důležitou roli v zajištění metabolické flexibility. Bílá tuková tkáň (WAT) skladuje energii v adipocytech ve formě TAG v případě pozitivní energetické rovnováhy a uvolňuje energii ve formě NEFA, když EE převyšuje EI. Schopnost tukové tkáně reagovat na inzulín je pak důležitým aspektem metabolické flexibility organismu (Sparks, Ukropcova et al. 2009).

Metabolická flexibilita je často narušená u jedinců rezistentních k inzulínu a dá se detekovat zejména při měření nepřímé kalorimetrie za podmínek hyperinzulinemického-euglykemického clampu. Inflexibilita je převážně důsledkem sníženého vstupu glukózy do buněk. Pro porozumění vzniku inzulínové rezistence při zvýšeném ukládání TAG do svalových vláken je modelovým stavem vznik metabolické inflexibility v průběhu krmení HFD (Galgani, Moro et al. 2008). Metabolická flexibilita zahrnuje nejen schopnost přepínat mezi oxidací sacharidů a tuků, ale také kapacitu pro využití těchto substrátů. Byl pozorován rozdíl v oxidativní kapacitě svalových vláken a také v morfologii mitochondrií mezi zdravými a obézními jedinci a také u jedinců s diabetem 2. typu. Zvýšený poměr svalových vláken typu I, charakteristických pomalým oxidativním metabolismem, je spojen s vysokou inzulínovou senzitivitou a zdravým fenotypem, zatímco u vláken typu II, charakteristických rychlým oxidativním nebo glykolytickým metabolismem, se projevuje opačný fenotyp (Storlien, Oakes et al. 2004).

Bylo zjištěno, že metabolická flexibilita negativně koreluje s obsahem tuku v těle, velikostí tukových buněk a pozitivně koreluje s potlačením lipolýzy inzulínem. Metabolicky flexibilní jedinci jsou méně obézní, mají menší tukové buňky a vykazují nižší koncentrace NEFA v plazmě po podání inzulínu. Metabolicky flexibilní jedinci také mají zdravější tukovou tkáň a nižší zánět v tukové tkáni, což bylo prokázáno na úrovni nižší exprese genů pro chemokiny MCP-1 a MIP-1 α a také markerů makrofagů CD8 a MAC-2 (Sparks, Ukropcova et al. 2009).



Obr. 1: Role tukové tkáně v zajištění metabolické flexibility

Přebytek energie vede k hypertrofii adipocytů. Hypertrofické adipocyty sekretují chemokiny, což vede k infiltraci tukové tkáně makrofágy. Důsledkem je snížení inzulínem stimulované suprese lipolýzy a snížení sekrece adiponektinu. Zvýšená koncentrace NEFA po výlevu inzulínu a snížená koncentrace adiponektinu v krvi vede k inhibici inzulínem stimulovaného vstupu a oxidace glukózy v kosterním svalu a také snížení kapacity pro oxidaci lipidů.

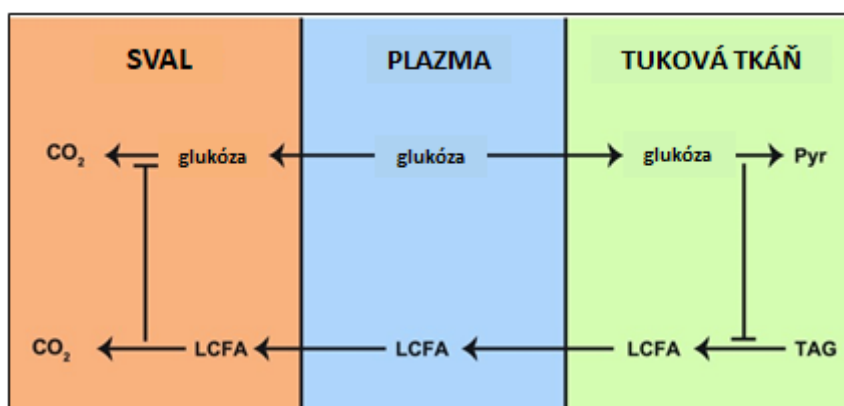
(převzato a upraveno podle (Sparks, Ukropcova et al. 2009))

1.3.1. Randlův cyklus

V roce 1963 Randle a kol. navrhli cyklus zpětné regulace metabolismu glukózy a FA (obr. 2), který popisuje tok substrátů a také výběr substrátů určených pro oxidaci. Cyklus charakterizuje kompetici v oxidaci mezi glukózou a FA ve svalu a v tukové tkáni. Tento biochemický mechanismus kontroluje výběr substrátu pro oxidaci a přizpůsobuje dodávku substrátů ve tkáních hormonům kontrolujícím koncentraci substrátů v krvi. Enzymy kontrolující lipolýzu v tukové tkáni ovlivňují koncentraci FA v krvi, FA zároveň regulují výběr substrátů pro oxidaci ve svalu. V hladovém stavu aktivace lipolýzy poskytuje tkáním FA, které se stávají přednostním substrátem pro oxidaci. V játrech β -oxidace FA slouží jako

lokální zdroj energie a může vést ke ketogenezi. Ketolátky jsou přednostně oxidované mimo játra. FA a ketolátky tlumí oxidaci glukózy a tím umožňují použití glukózy v mozku v průběhu hladovění.

Bylo prokázáno, že potlačení spalování glukózy pomocí oxidace FA nebo ketolátek je zprostředkováno krátkodobou inhibicí několika kroků glykolýzy. Nejsilnější je inhibice na úrovni pyruvát dehydrogenázy (PDH). Genetická suprese PDH v srdečním a kosterním svalu u myši má dramatické následky – mláďata umírají během odstavu. PDH-deficientní myši mohou přežít, pouze pokud jsou krmené HFD, ale vyvíjí se u nich svalová hypertrofie a srdeční poruchy (Hue and Taegtmeyer 2009).



Obr. 2: Schéma Randlova cyklu

Cyklus je mechanismem homeostázy pro kontrolu koncentrací glukózy a mastných kyselin v krvi. Termín „cyklus“ je použit pro znázornění vzájemné kontroly mezi oxidací glukózy a mastných kyselin.

LCFA-mastné kyseliny s dlouhým řetězcem; TAG-triacylglycerol; Pyr-pyruvát

(převzato a upraveno podle (Hue and Taegtmeyer 2009))

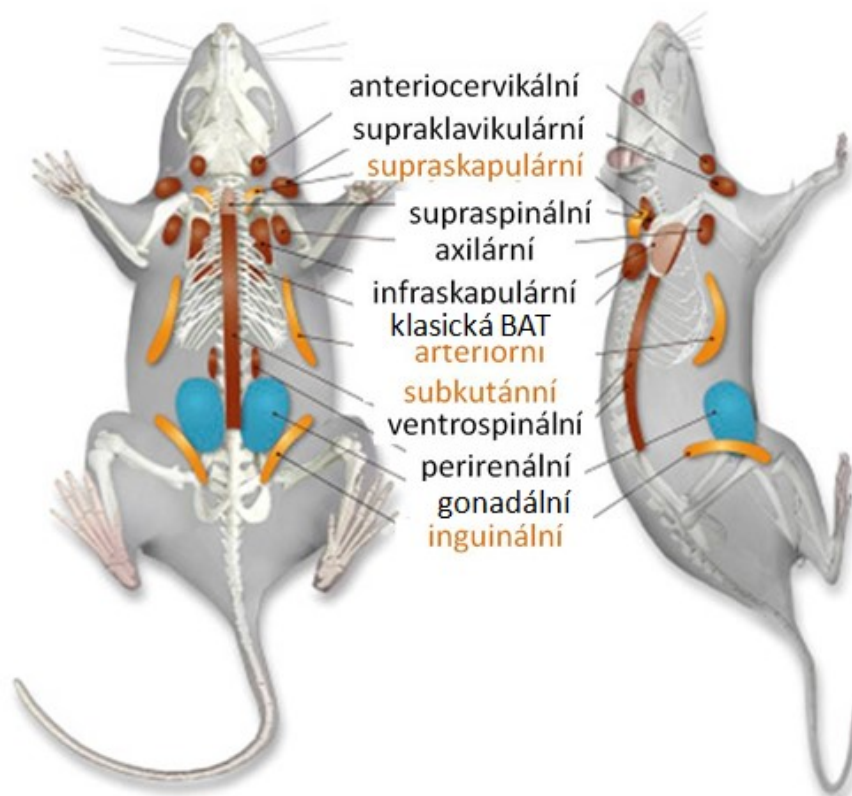
1.4. Tuková tkáň

Živé organismy potřebují pro svoje přežití přijímat energii ve formě potravy. Uskladnění přebytečné energie v těle je nezbytným fyziologickým procesem, který umožňuje přežití organismu v nepříznivých podmínkách. Tuková tkáň je pojivovou tkání, která je schopna uskladňovat přebytečnou energii ve formě lipidů a zajišťovat celotělovou lipidovou homeostázu (Choe, Huh et al. 2016). Tuková tkáň neslouží pouze jako zásobárna energie, ale je také endokrinním orgánem, který zajišťuje sekreci adipokinů, lipidů, cytokinů a jiných

látek. Tuková tkáň se primárně skládá z adipocytů a stroma-vaskulární frakce, která zahrnuje preadipocyty, fibroblasty, endotelové buňky, makrofágy a leukocyty (Luo and Liu 2016).

Tuková tkáň je všeobecně považovaná za pojivou tkáň bez specifické anatomie. Nicméně dva typy tukové tkáně obsahující adipocyty s rozdílnými funkcemi mohou být považovány za velký „tukový orgán“ s diskrétní anatomií, specifickou vaskularizací, inervací a vysokou fyziologickou plasticitou (Cinti 2011). Takto definovaný tukový orgán je tvořen několika tukovými depy, která jsou umístěna v těle ve dvou kompartmentech: pod kůží a mezi orgány, případně jinde mezi svaly. U savců je tuková tkáň tvořena několika samostatnými depy, tvořícími jeden funkčně a anatomicky částečně provázaný orgán: anteriocervikálním, supraklavikulárním, supraskapulárním, supraspinálním, axilárním, infraskapulárním, klasickou interskapulární BAT, anteriorním subkutánním, ventrospinálním, perirenálním, gonadálním (epididymálním nebo periovariálním) a inguinálním tukovým depem (obr. 3) (Zhang, Hao et al. 2018).

U savců se z funkčního hlediska vyskytují dvě formy tukové tkáně: bílá tuková tkáň (WAT, white adipose tissue) a hnědá tuková tkáň (BAT, brown adipose tissue). WAT je zásobárnou a zdrojem energie, zajišťuje tepelnou izolaci a mechanickou ochranu vnitřních orgánů. BAT hraje roli v termogenezi (Berry, Stenesen et al. 2013). Tukový orgán u myši vystavených chladu je i makroskopicky v některých depech výrazně hnědě zbarvený a má hustší inervaci, než u myši aklimatizovaných v termoneutrální teplotě (Barbatelli, Murano et al. 2010).



Obr. 3: Schéma lokalizace tukových dep u myši

(převzato a upraveno podle (Zhang, Hao et al. 2018))

Bílé adipocyty mají sférický tvar a v cytoplazmě velkou tukovou kapénku, která se skládá z TAG a esterů cholesterolu. Bílé adipocyty skladují energii ve formě lipidů a uvolňují energii hydrolýzou lipidů. Tato funkce organismu umožňuje využívat uloženou energii v obdobích mezi jednotlivými příjmy potravy a v průběhu dlouhodobého hladovění.

Hnědé adipocyty jsou menší než bílé a obsahují velké množství malých tukových kapének. Hnědá barva BAT je dána rozsáhlou vaskularizací a přítomností velkého počtu mitochondrií, které vytvářejí teplo pomocí funkce odpráhujícího proteinu 1 (UCP1). Cévy v hnědé tukové tkáni zajišťují přísun živin a odvádí teplo do dalších částí těla (Coelho, Oliveira et al. 2013).

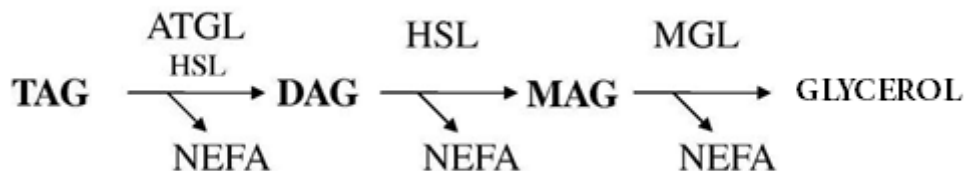
1.5. Metabolismus lipidů

Akumulace tuků v těle je určena rovnováhou mezi syntézou tuků (lipogenezí), příjmem tuků z potravy a štěpením tuků (lipolýzou). Tyto procesy probíhají a dynamicky se mění v období hladovění a sytosti. Lipolýza je inhibována inzulínem (inhibice lipolytických enzymů) po

jídle a je aktivována katecholaminy (aktivace lipolytických enzymů) při hladovění. Lipogeneze je aktivovaná inzulínem a inhibována přítomností tuků v potravě (Saponaro, Gaggini et al. 2015).

1.5.1. Lipolýza

Většina tuků je uložena ve WAT ve formě TAG a esterů cholesterolu. Lipolýza je biochemickým procesem, který zajišťuje katabolismus lipidů v tukových kapénkách, a tím se uvolňuje uložená energie ve formě NEFA. Lipolýza je zajištěna specifickými lipázami. U savců existují nejméně tři lipázy hydrolyzující TAG a estery cholesterolu (obr. 4). Triacylglycerolová lipáza (ATGL) selektivně zajišťuje první krok hydrolyzy TAG na diacylglycerol (DAG) a volnou FA a je limitujícím enzymem v hydrolyze TAG. Hormon senzitivní lipáza (HSL) je schopná hydrolyzy různých acylesterů včetně TAG, DAG a MAG. HSL je limitujícím enzymem v katabolismu DAG. V posledním kroku monoacylglycerolová lipáza (MGL) štepí monoacylglycerol (MAG) na glycerol a volnou FA (Lass, Zimmermann et al. 2011). U savců existují i jiné enzymy s lipázovou aktivitou. Například lysozomální lipáza v buňkách hydrolyzuje estery cholesterolu na volný cholesterol a FA (Li and Zhang 2019) a pankreatická a gastrická lipáza zajišťují hydrolyzu tuků v trávicí soustavě (Carriere, Barrowman et al. 1993).



Obr. 4: Schéma lipolýzy

(převzato a upraveno podle (Lass, Zimmermann et al. 2011))

ATGL

Enzym je exprimován hlavně v tukové tkáni, ale je také přítomen v jiných tkáních, zejména v játrech, srdečním a kosterním svalu.

ATGL je členem rodiny proteinů obsahujících tzv. patatinovou doménu a je kódována genem *Pnpla2* (protein obsahující patatinovou fosfolipázovou doménu 2). Patatinová doména

vykazuje u některých členů této rodiny fosfolipázovou aktivitu, avšak fosfolipázová aktivita ATGL je velmi nízká (Zimmermann, Strauss et al. 2004). V adipocyty se ATGL v neaktivním stavu nachází v cytozolu (Granneman and Moore 2008).

V důsledku lipolýzy zprostředkované ATGL se uvolňují FA, které hrají roli v intracelulární signalizaci nebo jsou přenášeny pomocí komplexu CPT1-CACT-CPT2 (karnitin-palmitoyl transferáza 1 – karnitin-acylkarnitin translokáza – karnitin-palmitoyl transferáza 2) transportního systému do matrix mitochondrie, kde vstupují do β -oxidace nebo jsou uvolněny do krve jako energetické substráty pro další tkáň. V jádře FA fungují jako ligandy pro jaderné receptory a transkripční faktory, zejména pro rodinu peroxizomálních proliferátorem aktivovaného receptoru (PPAR). ATGL zajišťuje aktivaci PPAR α prostřednictvím FA, následkem je zvýšená exprese enzymů pro oxidaci lipidů (Haemmerle, Moustafa et al. 2011). Aktivace PPAR- δ , zprostředkovaná ATGL, pak má vliv na mitochondriální aktivitu v hnědých adipocytech a β -buňkách pankreatu (Mottillo, Bloch et al. 2012). U ATGL KO myši se vyvíjí jaterní steatóza a porušení inzulínové signalizace v tukové tkáni, játrech a svalu. ATGL KO myši akumulují lipidy v srdci a předčasně umírají na srdeční dysfunkce (Haemmerle, Lass et al. 2006).

Aktivita ATGL je regulovaná také přítomností specifických koaktivátorů a represorů. Aktivátorem ATGL je komparativní genový identifikátor-58 (CGI-58), zatímco inhibitorem je G0/G1 přepínající gen 2 (G0S2) (Lass, Zimmermann et al. 2006).

CGI-58 aktivuje ATGL v tukové tkáni, játrech, kosterním a srdečním svalu. Ve WAT se CGI-58 váže na povrch tukových kapének, interaguje s ATGL a tím zajišťuje její dostatečnou enzymatickou aktivitu. Aktivita ATGL je také regulována pomocí strukturního proteinu perilipinu (PLIN). V tukové tkáni je vysoce exprimován PLIN1, který je asociován s tukovými kapénkami. Za bazálních podmínek PLIN1 chrání tukové kapénky před působením CGI-58 a před následnou aktivací ATGL. V podmínkách stimulovaných katecholaminy se aktivuje adenylátcykláza, která přemění ATP na cAMP. cAMP aktivuje protein kinázu A (PKA), která následně fosforyluje PLIN. Fosforylace způsobuje uvolnění CGI-58 z vazby s PLIN a následně se aktivuje ATGL (Zimmermann, Lass et al. 2009).

G0S2 inhibuje aktivitu ATGL v tukové tkáni, játrech a kosterním svalu. Hydrofobní doména G0S2 může přímo vázat patatinovou doménu ATGL a tím zajistit její inhibici. G0S2 může vázat ATGL nezávisle na CGI-58 pomocí nekompetitivního mechanismu (Laurens, Badin et al. 2016).

HSL

HSL hydrolyzuje TAG, DAG a MAG, a také cholesterol estery. Aktivita HSL vůči DAG je 10x vyšší než její aktivita vůči TAG a 5x vyšší než její aktivita vůči MAG. HSL je limitujícím enzymem pro hydrolýzu DAG a cholesteryl esterů v tukové tkáni. HSL nevykazuje detekovatelnou fosfolipázovou aktivitu. Schopnost štěpit různé estery umožňuje enzymu zajišťovat různé funkce v několika tkáních. HSL je zejména exprimována v tukové tkáni, ale také v kosterním a srdečním svalu, varlatech a vaječnicích (Yeaman, Smith et al. 1994). V buňce se HSL nachází v cytozolu v neaktivním stavu (Granneman, Moore, Location, location: Protein trafficking, 2008). Hydrolytická aktivita enzymu vůči TAG a cholesteryl esterům je stimulována pomocí fosforylace protein kinázou A (Kraemer and Shen 2002). Za bazálních podmínek chrání PLIN tukové kapénky před působením HSL. Za stimulovaných podmínek se aktivuje PKA, která následně fosforyluje PLIN a HSL. Fosforylace PLIN usnadňuje translokaci HSL z cytozolu na tukovou kapénku (Kraemer and Shen 2006). HSL KO myši jsou rezistentní k obezitě, vykazují snížené množství WAT a zvýšené množství BAT. HSL KO myši na HF dietě vykazují zvýšený obsah cholesterolu v tukové tkáni (Harada, Shen et al. 2003). U těchto myši byl také pozorován zvýšený obsah makrofágů a hypertrofie adipocytů ve WAT (Cinti, Mitchell et al. 2005).

HSL je aktivována pomocí proteinu vázajícího mastné kyseliny 4 (FABP4), který je také nazýván adipocytový protein 2 (aP2). Proteiny vázající mastné kyseliny (FABP) jsou rodinou intracelulárních lipidových chaperonů, které regulují lipidový přenos (Furuhashi, Ishimura et al. 2011). FABP mohou reverzibilně vázat hydrofóbní ligandy, jako jsou FA, eikosanoidy a jiné lipidy (Coe and Bernlohr 1998). FABP4 je vysoce exprimován v tukové tkáni. Expres proteinu je vysoká zejména v průběhu diferenciacie adipocytů a kontrola jeho transkripce je zajištěna pomocí agonistů PPAR γ , FA, dexametazonu a inzulínu (Furuhashi, Saitoh et al. 2014). Pro zajištění interakce musí FABP4 vytvářet komplex s FA a HSL musí být ve fosforylovaném stavu (Smith, Sanders et al. 2008). FABP4-deficientní myši vykazují sníženou schopnost lipolýzy v adipocytech a také zvýšení tělesné hmotnosti (Furuhashi, Saitoh et al. 2014).

1.5.2. Lipogeneze

Lipogeneze obecně je proces, který zahrnuje jak syntézu FA *de novo*, tak i esterifikaci FA do TAG. Pro esterifikaci musí být FA aktivována na acyl-CoA, nicméně takto vzniklý acyl-CoA zároveň může vstupovat i do dalších metabolických drah, jako je např. β -oxidace. Lipogeneze probíhá v játrech a v tukové tkáni (Coelho, Oliveira et al. 2013).

Syntéza FA *de novo*

Syntéza FA probíhá v cytoplazmě a začíná postupným přidáváním dvouhlíkatých zbytků k acetyl-CoA (Kersten 2001). Nezbytné enzymy pro syntézu FA jsou syntáza mastných kyselin (FAS) a stearoyl-CoA desaturáza 1 (SCD1). FAS katalyzuje syntézu satureovaných FA *de novo* z jednoduchých prekurzorů. Enzym je kódován genem *Fasn*. Primárními produkty reakce katalyzované FAS je palmitát (C16:0), ale také stearát (C18:0) nebo kratší FA. Substrátem pro FAS je acetyl-CoA, malonyl-CoA a NADPH. Elongace FA je zajištěna opakovanou kondenzací acetylu-CoA s malonylem-CoA nebo s acyl-CoA, který poskytuje 2 uhlíky v každém cyklu kondenzace. Syntéza palmitátu vyžaduje sedm cyklů připojení malonylu-CoA k acetylu-CoA (Jensen-Urstad and Semenkovich 2012).

FAS se podílí na *de novo* syntéze lipidů jednak pro jejich uskladnění do zásob ve formě TAG, jednak pro export ve formě lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) do krve. Na druhou stranu se FAS účastní syntézy ligandů pro PPAR α , který ovlivňuje transkripci genů pro uptake a β -oxidaci FA (Dreyer, Keller et al. 1993). Enzym je přítomen v játrech, tukové tkáni a v plicích. V buňce je FAS pravděpodobně lokalizována v cytoplazmě díky své rozpustnosti, subcelulární lokalizace enzymu není zatím dostatečně prozkoumána (Semenkovich, Coleman et al. 1995).

Celotělová absence *Fasn* způsobuje letalitu myších embryí, což ukazuje na nezbytnost *de novo* lipogeneze během raného vývoje (Chirala, Chang et al. 2003). Myši postrádající *Fasn* specificky v játrech mají normální koncentraci TAG v plazmě (Chakravarthy, Lodhi et al. 2009).

Stearoyl-CoA desaturáza (SCD) je limitujícím enzymem v biosyntéze mononenasyčených FA. Enzym katalyzuje zavedení cis dvojné vazby do acyl-CoA substrátů v $\Delta 9$ pozici. Preferované substráty SCD jsou palmitoyl-CoA a stearoyl-CoA, které jsou přeměněny na palmitoleoyl-CoA (C16:1) a oleoyl-CoA (C18:1). Tyto FA jsou součástí membránových fosfolipidů, TAG a esterů cholesterolu (Ntambi, Miyazaki et al. 2002).

Existují 4 známé izoformy SCD u myši. SCD1 je nejznámější formou enzymu a hraje důležitou roli v regulaci energetického metabolismu a v syntéze lipidů. U dospělých myši je SCD1 exprimována v játrech, tukové tkáni a mazových žlázách. V buňce je enzym asociován s ER (Miyazaki, Dobrzyn et al. 2005) (Tracz-Gaszewska and Dobrzyn 2019).

Myši s celotělovou delecí *Scd1* vykazují zvýšení množství nasycených (C16:0 a C18:0) FA a nedostatečné množství TAG a esterů cholesterolu v játrech (Miyazaki, Kim et al. 2001).

Aktivace FA na acyl-CoA

Syntetázy acyl-CoA s dlouhým řetězcem (ACSL) katalyzují první krok metabolismu FA. ACSL esterifikují FA s dlouhým řetězcem na acyl-CoA. Estery acylu-CoA následně vstupují do anabolických a katabolických drah. U savců existuje 5 izoform ACSL (Mashek, Bornfeldt et al. 2004).

ACSL1 je nejvíce studovanou izoformou této rodiny. ACSL1 má vysokou substrátovou specifitu vůči saturevaným FA s 16 a 18 uhlíky a nesaturevaným FA s 16-20 uhlíky. ACSL1 je přítomna v játrech, tukové tkáni, srdci a svalu. Transkripce *Acs11* je regulována pomocí zástupců rodiny PPAR (Singh, Kan et al. 2016). ACSL1 je důležitým enzymem pro syntézu TAG v adipocytech a fibroblastech. V buňce je enzym lokalizován v ER a v membránách asociovaných s mitochondriemi (MAM), což jsou místa, kde probíhá syntéza TAG. ACSL1 je také přítomna ve vezikulech společně s GLUT4 transportérem v adipocytech a na plazmatické membráně (Coleman, Lewin et al. 2002). Bylo zjištěno, že ACSL1 má schopnost usnadňovat vstup FA do buňky a směřovat FA k různým metabolickým drahám (Mashek, Li et al. 2007).

Myši postrádající *Acs11* specificky v tukové tkáni mají normální tukové zásoby, ale silně sníženou oxidaci FA, což je důkazem funkce ACSL1 ve směrování FA k mitochondriální β -oxidaci (Ellis, Li et al. 2010).

Syntéza TAG

Syntéza TAG probíhá dvěma biochemickými dráhami. V enterocytech tenkého střeva a v tukové tkáni probíhá MAG-dráha. Během ní je 2-monoacylglycerol z potravy přeměněn na DAG pomocí monoacylglycerol-acyltransferázy (MGAT). V játrech a tukové tkáni probíhá glycerol-3-fosfátová (G-3-P) dráha. G-3-P dráha zajišťuje syntézu TAG *de novo* a probíhá v endoplazmatickém retikulu. Během ní je G-3-P esterifikován zbytky FA a přeměněn na DAG. Na konci obou drah diacylglycerol-acyltransferáza (DGAT) přeměňuje DAG na TAG (Cheng, Iqbal et al. 2008). TAG se v tukové tkáni ukládá do zásob v tukových kapénkách,

zatímco TAG z hepatocytů je sekretován ve formě VLDL do krve. VLDL pak transportují endogenní lipidy do jiných orgánů (Voet and Voetova 1994).

Diacylglycerol transferázy

U eukaryot je syntéza TAG zajištěna pomocí enzymu DGAT, který má dvě izoformy: DGAT1 a DGAT2. Oba enzymy katalyzují stejnou reakci kondenzace DAG a acylu-CoA na TAG. Tyto enzymy však nejsou evolučně příbuzné (Yen, Stone et al. 2008).

DGAT1 patří k savčí acyl-CoA cholesterol-acyltransferázové (ACAT) genové rodině, zatímco DGAT2 je členem rodiny acyltransferáz. DGAT1 je exprimován v tenkém střevě a v tukové tkáni, zatímco DGAT2 je exprimován v játrech, tukové tkáni a kůži (Shi and Cheng 2009). DGAT1 je lokalizován v membráně ER s aktivní podjednotkou na lumenální straně ER (Owen, Corstorphine et al. 1997). DGAT1 může přenášet acyl-CoA kromě DAG také na retinol pro formaci retinyl esterů, a na alkoholy s dlouhým řetězcem pro formaci vosků. Na rozdíl od DGAT1, DGAT2 má katalytickou podjednotku na cytoplazmatické straně ER a je vysoce specifickým enzymem pro syntézu TAG. DGAT2 se také může nacházet na tukových kapénkách, kde slouží k ukládání TAG. DGAT1 vyžaduje vysokou koncentraci substrátů pro zahájení katalýzy, zatímco DGAT2 může zajišťovat esterifikaci i za nízkých koncentrací substrátů (Chitraju, Walther et al. 2019). FA pocházející z lipolýzy mohou být zpět reesterifikované na TAG v průběhu reesterifikačně-lipolytického cyklu. Tento důležitý mechanismus cyklování sice spotřebovává neustále energii pro aktivaci FA, ale zároveň umožňuje rychlou odpověď tukové tkáně na energetické požadavky v periferních tkáních (Wolfe, Klein et al. 1990).

DGAT1 KO myši jsou metabolicky zdravé, vykazují zvýšený EE a také jsou rezistentní k obezitě vyvolané HFD a ke glukózové intoleranci. Tyto myši mají o 50% nižší obsah TAG v tukové tkáni (Chen, Smith et al. 2002).

DGAT2 KO myši vykazují porušení kožní bariéry krátce po narození, což vede k rychlé dehydrataci a smrti. Bylo zjištěno, že DGAT2 KO myši také měly méně než 10% normálního obsahu TAG v tukové tkáni (Stone, Myers et al. 2004). Myši postrádající DGAT 2 specificky v tukové tkáni mají normální tukové zásoby (Chitraju, Walther et al. 2019). Vzhledem k letálnímu fenotypu DGAT2 KO myši se dá říci, že DGAT2 je nezbytným enzymem pro přežití organismu.

1.6. Integrace metabolismu lipidů

Lipidy, jako jsou TAG a cholesterol, jsou nerozpustné ve vodě, proto musí být vázané na proteiny a přenášeny v krvi ve formě lipoproteinů. Existují dvě cesty vstupu lipidů do krve - endogenní a exogenní. Exogenní lipoproteinová dráha začíná inkorporací lipidů z potravy do chylomikronů v tenkém střevě. V krvi jsou TAG ve formě chylomikronů hydrolyzované ve svalech a v tukové tkáni pomocí lipoproteinové lipázy (LPL), což umožňuje uvolnění volných FA a následně jejich vstřebání buňkami. Po hydrolyze většiny TAG jsou zbytky chylomikronů vstřebány játry (Feingold and Grunfeld 2000).

Endogenní lipoproteinová dráha začíná formací VLDL v játrech. VLDL jsou sestavovány z TAG, cholesterolu a apolipoproteinů. V krvi pak LPL opět hydrolyzuje TAG z VLDL částic. Tím je zajištěn přísun FA ke svalovým buňkám a adipocytům. Nakonec je takto VLDL přeměněna na lipoproteiny o střední hustotě (IDL) (Wang and Eckel 2009). Játerní lipáza (HL) zajišťuje hydrolyzu zbývajících TAG, čímž se IDL přeměňují na lipoproteiny o nízké hustotě (LDL). LDL se váže na LDL-receptor ve většině tkání a zajišťují přísun lipidů nebo slouží k sestavení VLDL v játrech (Connelly 1999).

1.6.1. Vliv HFD na energetickou rovnováhu

Analýza EE u myších modelů obezity je nezbytným přístupem ke studiu obezity (Morton, Cummings et al. 2006). EE se zvyšuje se zvětšující se tělesnou hmotností, nicméně díky menšímu poměru velikosti k povrchu těla není poměr EE k hmotnosti lineární. Proto je nutné EE standardizovat podle tělesné hmotnosti a zejména přihlídnout k případnému zvyšování metabolicky méně aktivní tukové tkáně. Celkovou tělesnou hmotnost TBM (total body mass) lze zhruba rozdělit na hmotnost metabolicky aktivní tkáně (LBM, lean body mass) a hmotnost tuku (FM, fat mass) (Himms-Hagen 1997). Bylo prokázáno, že ačkoliv je FM často opomíjena ve výpočtech zabývajících se EE, tak její příspěvek je signifikantní, a proto by se jak FM tak LBM měly brát v úvahu při kalkulaci EE (Arch, Hislop et al. 2006). S přechodem ze standardní diety (STD) na HFD se EI u zdravých myší prudce zvyšuje v průběhu prvních několika dnů a pak se postupně snižuje k původním hodnotám v průběhu 1-2 týdnů (Oh, Thaler et al. 2010). I přes to, že EI se časem normalizuje, tělesná hmotnost často ve srovnání s kontrolní skupinou na STD dietě narůstá po dobu několika týdnů. V některých experimentech bylo prokázáno i snížení EE u myší při přechodu na HFD (Choi, Kim et al. 2015).

Autoři Longo a kol. charakterizovali vztah mezi RQ a EI na modelu krátkodobého a dlouhodobého příjmu HFD. Myši kmene C57BL/6J byly krmené HFD po dobu 4 dnů nebo 17 týdnů a nepřímá kalorimetrie byla použita pro stanovení RQ a EI a také pro určení vlivu spontánní pohybové aktivity v rozvoji obezity indukované dietou (DIO, diet-induced obesity). 24-hodinový RQ se dal predikovat na základě 24-hod EI, tento vztah byl závislý na typu diety (HFD nebo STD), ale nezávislý na délce krmení HFD. DIO v rané fázi byla charakterizovaná hyperfágií a ukládáním lipidů v noční fázi měření, což bylo kompenzováno vyšší oxidací lipidů v průběhu dne. DIO v pozdní fázi byla charakterizovaná mírnější hyperfágií a nižší substrátovou flexibilitou (Longo, Charoenthongtrakul et al. 2010).

Tuková tkáň je obecně zdrojem velkého množství adipokinů, které umožňují komunikaci tukové tkáně s dalšími orgány v těle, jako například s játry, mozkem a se svaly. Patofyziologie obezity zahrnuje jak změněnou interakci mezi geny a jejich prostředím tak i například vliv leptinu jako jednoho z hormonů produkovaných tukovou tkání na celotělovou energetickou homeostázu. Leptin reguluje EI a EE a také přispívá k zajištění adaptačních změn v hnědé tukové tkáni a v kosterním svalu (Rosenbaum, Goldsmith et al. 2005). Zvýšení EE u obézních myší může být důsledkem zvýšené cirkulace leptinu v krvi (Kaiyala, Morton et al. 2010). Některé studie ukazují, že změny v koncentraci leptinu v krvi jsou klíčovým mechanismem pro pochopení vztahu mezi FM a EE. U leptin-deficientních ob/ob myší není FM spolehlivým faktorem pro odhad EE pomocí lineární regrese na rozdíl od WT kontrol. V průběhu podávání leptinu ob/ob myším změna jeho koncentrace v plazmě ovlivňovala EE. To znamená, že FM může mít částečný vliv na EE prostřednictvím změn v cirkulující koncentraci leptinu. Obezita leptin-deficientních ob/ob myší je způsobena hyperfágií a sníženou EE v porovnání s WT kontrolami (Kaiyala and Schwartz 2011).

1.6.2. Kalorická restrikce

Kalorická restrikce je režim diety, který omezuje příjem potravy, ale nezpůsobuje malnutrici. Je proto vhodnější pro studium efektů sníženého kalorického příjmu než hladovění, které u myší vyvolává vstup do torporu. Torpor je stav snížené fyziologické aktivity u živočichů v důsledku zredukované tělesné teploty a metabolického obratu. Torpor umožňuje živočichům přežít období snížené dostupnosti potravy (Vuarin, Dammhahn et al. 2015). Bylo zjištěno, že kalorická restrikce zpomaluje rozvoj chronických onemocnění a prodlužuje délku života. Myši na kalorické restrikci vykazovaly zvýšenou expresi genů pro oxidaci FA a sníženou expresi genů pro syntézu FA v porovnání se skupinou myší krmených *ad libitum* (Cao, Dhahbi et al. 2001). Experimenty ukazují, že dlouhodobá kalorická restrikce vede k selekci

substrátů pro oxidaci a je v denním profilu charakterizovaná krátkou periodou zvýšené syntézy FA v tukové tkáni a následnou dlouhotrvající periodou zvýšené celotělové oxidace FA. Výsledky potvrzují názor, že absolutní rozsah celotělové oxidace FA je vyšší u myši na kalorické restrikci v porovnání s kontrolami krměnými *ad libitum*. Tuková tkáň může hrát u myši na kalorické restrikci důležitější roli v zajištění celotělové endogenní syntézy FA v porovnání s játry. Bylo zjištěno, že po 3 hodinách přístupu k potravě myši akumulovaly 14 mg endogenně syntetizovaného palmitátu v subkutánním depu a 3 mg v epididymálním depu. Na rozdíl od tukové tkáně, v játrech bylo ve stejném časovém úseku akumulováno jen 4 mg endogenně syntetizovaného palmitátu. Navíc, v průběhu 3 hodin po začátku přístupu k dietě se endogenně syntetizovaný palmitát akumuloval v subkutánním depu 5 krát rychleji u myši na kalorické restrikci než u myši krměných *ad libitum*. V játrech tento rozdíl mezi skupinami nebyl pozorován (Bruss, Khambatta et al. 2010). Kalorická restrikce tak svým vlivem na endogenní syntézu lipidů pravděpodobně významně ovlivňuje zdraví organismu (Flachs, Ruhl et al. 2011)

1.6.3. Vliv teploty

Malí homoiotermní živočichové, jako jsou myši, mají větší ztráty tepla kvůli menšímu povrchu těla v porovnání s velkými živočichy, a proto jejich fyziologické mechanismy jsou většinou orientované na tvorbu tepla. Tělesná teplota většinou závisí na cirkadiánním rytmu a na fyzické aktivitě živočicha, ale také na teplotě okolí. Bylo zjištěno, že tělesná teplota se u myši zvyšuje v průběhu noční fáze (období aktivity u myši) a v denní fázi měření je tělesná teplota nižší. V denní fázi se pak zvyšuje jen při zvýšení teploty okolí na 30-33 °C. Tělesná teplota myši se snižuje v případě, že se teplota okolí snižuje na 4-12 °C. Variace v tělesné teplotě u savců je obecně více ovlivněna cirkadiánní fází a fyzickou aktivitou, než teplotou okolí (Abreu-Vieira, Xiao et al. 2015).

1.6.4. Cirkadiánní regulace energetického metabolismu

Homeostáza organismu je zajištěna pomocí koordinace fyziologických odpovědí mezi orgány a tkáněmi. Cirkadiánní hodiny hrají v tomto procesu důležitou roli (Roenneberg and Merrow 2016). Metabolické choroby jsou často charakterizovány poruchou vzájemné komunikace cirkadiánních hodin v různých tkáních (Dyar, Lutter et al. 2018). Specifické metabolické dráhy jsou klíčovými regulátory cirkadiánních hodin. Oscilace metabolitů může mít vliv na synchronizaci biologických hodin, na modulaci transkripce a na regulaci dostupnosti chromatinu (Aviram, Manella et al. 2016).

Dyar a kol. analyzovali na modelu C57BL/6J myši profil metabolitů v osmi různých tkáních v průběhu 24 hodin na STD a na HF dietě, diety byly před experimentem podávány po dobu 10 týdnů. Tkáně byly odebrány každé 4 hodiny v průběhu 24 hodin. Myši na HFD se nelišily v EI od myši na STD dietě. Metabolity ve WAT, játrech, BAT, svalech a séru byly nejvíce ovlivněny HF dietou. 40-60 % metabolitů v těchto tkáních a v séru vykazovalo signifikantní cirkadiánní změny, největší počet tvořily lipidy – FA s dlouhým řetězcem, polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), DAG, fosfolipidy, sfingolipidy, glycerolipidy, lysofosfolipidy. Obsah lipidů, které vykazovaly signifikantní cirkadiánní změny, se lišil mezi tkáněmi pod vlivem obou diet. Více lipidů, které vykazují cirkadiánní změny, bylo pozorováno v BAT, mediálním prefrontálním kortexu (mPFC) a séru u myši na STD dietě na rozdíl od suprachiasmatického jádra (SCN), svalů, WAT a jater. Byla také zjištěna ztráta oscilace lipidů u BAT, mPFC a séru vlivem HF diety. Glycerol a NEFA v játrech a kosterním svalů byly u myši na HF dietě velmi zvýšené, což potvrzuje patologické ukládání lipidů při obezitě a inzulínové rezistenci. Na druhou stranu, velké snížení obsahu NEFA v BAT u myši na HF dietě je zajímavé, protože přímo aktivují UCP1 a tím tvorbu tepla (Dyar, Lutter et al. 2018).

Souhrnem lze říci, že jak EE, tak i metabolity v krvi a v tkáních vykazují významný cirkadiánní rytmus.

2. Cíle práce

Experimenty popisované v této diplomové práci byly prováděny na myších modelech inbredních kmenů C57BL/6 a A/J, které se liší náchylností k dietou indukované obezitě. Primárním cílem bylo lépe pochopit roli metabolismu WAT v energetické homeostáze a ověřit, že metabolismus WAT se může přímo podílet na vzniku metabolické inflexibility.

Specifické cíle:

1. Po přechodu na HF dietu definovat celotělový metabolismus metodou nepřímé kalorimetrie a stanovit dobu, kdy se rozdílně přizpůsobuje celotělový metabolismus C57BL/6 a A/J kmenů myší.
2. Zjistit, zda schopnost celého organismu přizpůsobit se HF dietě souvisí s pufrační kapacitou WAT.
3. Zjistit, zda souvisí cirkadiánní profil RQ a EE s cirkadiánní změnou hladin metabolitů v plazmě a s metabolismem NEFA ve WAT.

3. Materiál

3.1. Seznam použitých přístrojů

automatické pipety	Gilson, Francie
centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
glukometr One Touch Ultra	Lifescan, USA
LightCycler® 480 RT PCR System	Roche, Německo
microtom Leica RM2235	Leica Biosystems, ČR
mikroskop Olympus AX70	Olympus, Japonsko
mini centrifuga	Labnet, USA
mini-Mitter ER 4000	Starr Life Sciences Corp., USA
nepřímá kalorimetrie INCA Somic	Somic, Sweden
oscilační mlýn MM400	Retsch, Německo
PCR přístroj Tgradient	Biometra, Německo
software Lasergene 7.1	DNA Star, USA
software NIS elements AR	Nikon, Japonsko
spektrofotometr NanoDrop	NanoDrop, USA
spektrofotometr Sunrise basic	Tecan, Švýcarsko
termoblok	Biometra, Německo
třepačka PST-60 plus Biosan	Merci, Česká republika
třepačka WT 12	Biometra, Německo
váhy ADAM	ADAM eqp., Velká Británie
vakuová sušička VR-1 Heto	Thermo Scientific, USA
vortex	Scientific Industries, USA
záznamové zařízení DP 70	Olympus, Japonsko

3.2. Seznam použitých chemikálií

5x RT pufr	Invitrogen, Německo
ABC kit	Vector, USA
DAB (3,3'-diaminobenzidin) tablety	Merck KGaA, Německo
DakoCytomation Retrieval Solution S170	Agilent, USA
dNTP	Invitrogen, Německo
DTT	Invitrogen, Německo
EDTA	Serva, Německo
etanol	Penta, ČR
glycerol kit	Randox, Velká Británie
H ₂ O ₂	Penta, ČR
chloroform	Penta, ČR
isopropanol	Serva, Německo
KCl	Merck KGaA, Německo
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Německo
KOH	Penta, ČR
kozí sérum S-1000	Vector, USA
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Německo
methanol	Penta, ČR
M-MLV RT	Invitrogen, Německo
montovací médium	Merck KGaA, Německo
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Německo
NaCl	Merck KGaA, Německo
NaOH	Penta, ČR
NEFA liquid 250 S kit	Wako Chemicals, Německo
Oligo T	Generi Biotech, ČR

PCR primery	Generi Biotech, ČR
primární protilátka 2138 proti myšimu ATGL	CellSignaling Technology, Nizozemsko
sekundární protilátka BA-100 proti králičím IgG	Vector, USA
Triacylglycerol liquid 250 S kit	Erba Lachema, ČR
Trizol	Sigma, USA
vodný roztok eozinu	Merck KGaA, Německo
vodný roztok hematoxylinu	Merck KGaA, Německo
xylén	Penta, ČR

3.3. Laboratorní zvířata

V pokusech zmiňovaných v této práci byli použiti samci laboratorních myši dvou inbredních kmenů: C57BL/6 (B6) a A/J. Kmen A/J je rezistentní, zatímco kmen B6 je náchylný k obezitě způsobené dietou s vysokým obsahem tuku (Black, Croom et al. 1998). Myši v chovu byly ustájené za standardních podmínek, tj. teplota chovu 22 ± 2 °C, vlhkost 55 ± 5 %, světelný režim 12:12 h, světlo v 6 hod ráno.

Pro první pokus byla použita zvířata chovaná ve zvěřinci oddělení Biologie tukové tkáně Fyziologického ústavu AV ČR. Základem kolonie byly chovné páry dovezené z The Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) v roce 1998. Pro druhý a třetí pokus byly použité myši v SPF kvalitě C57BL/6JbomTac (Taconic) a A/JolaHsd (Envigo), dodané ve stáří 5 týdnů.

4. Experimenty

4.1. Experiment 1 – nepřímá kalorimetrie

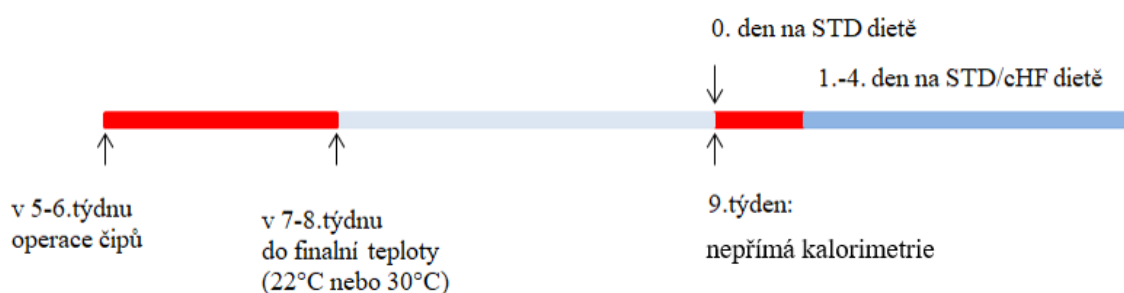
V pokusu byli použiti samci kmenů B6 a A/J. Myši do 9. týdne věku měly 12-hod světelný režim, byly krmené standardní udržovací dietou (STD) Ssniff R/M control diet (Ssniff, Německo) a měly neomezený přístup k potravě a vodě. V 5.-6. týdnu byly myšim v celkové anestezii isofluranem implantované telemetrické čipy Mini-Mitter ER 4000 do intraperitoneální dutiny pro sledování tělesné teploty a fyzické aktivity. Po operaci byly myši chované v klecích po jedné s neomezeným přístupem k potravě a vodě. Na počátku 7. týdne věku byly myši umístěny do finální teploty (22 °C nebo 30 °C) na dobu dvou týdnů pro aklimatizaci v laboratorní a nebo v termoneutrální teplotě. V průběhu 9. týdne byly myši měřené za světelného režimu ve 22 °C nebo 30 °C v systému nepřímé kalorimetrie (Somedic, Sweden), který umožňuje kromě sledování výměny respiračních plynů i záznam aktivity a tělesné teploty zvířete. Měření probíhalo následovně: ve dni 0 měly myši neomezený přístup k standardní dietě Ssniff R/M, následně ode dne 1 do dne 4 pokračovaly na STD dietě nebo jim byla ráno vyměněna dieta za dietu s vysokým obsahem tuku (cHF) (Obr. 5). Podíl živin v dietách (Rossmeisl, Pavlisova et al. 2018) je uveden v Tabulce 1.

Živiny	STD	cHF
Proteiny [g/100 g]	16,9	11,7
Sacharidy [g/100 g]	64,3	47,2
Tuky [g/100 g]	2,9	31,8
Energetická hodnota [kJ/g]	14,9	21,8

Tabulka 1: Procentuální zastoupení živin v dietách

Ve dnech 1-4 ráno mezi 8.-9. hodinou proběhla údržba systému nepřímé kalorimetrie, myši byly zváženy, byla zvážena dieta a byly odebrány všechny exkrementy z předchozího dne. Exkrementy byly zváženy a uskladněny při teplotě -20 °C. Po 5 dnech bylo měření ukončeno. Následně byla zvířata uspaná v éterové narkóze a usmrcená cervikální dislokací. Byla odebrána krev do mikrozkuvek s 5 µl 0,5M EDTA a změřena glykemie pomocí glukometru. Mikrozkuvky byly stočeny (5320 g, 4 °C) po dobu 10 minut. Plazma byla uskladněna v -80 °C.

Celkem bylo proměřeno 8 skupin myši preaklimatizovaných a měřených ve 22 °C nebo 30 °C, kmene A/J nebo B6 a na STD nebo cHF dietě (A/J 22 °C STD, B6 22 °C STD, A/J 22 °C cHF, B6 22 °C cHF, A/J 30 °C STD, B6 30 °C STD, A/J 30 °C cHF, B6 30 °C cHF). V každé skupině n=7-8.



Obr. 5: Schéma experimentu 1

4.2. Experiment 2 – odběr po 3 dnech na dietách

Experiment 2 byl zaměřen jen na myši preaklimatizované ve 22 °C, kmenů A/J a B6 a na STD nebo cHF dietě. Cílem byl odběr tkání po 3 dnech na dietách. Pitva proběhla v 9-11 hodin dopoledne v sytém stavu.

Myši byly zváženy a usmrceny podstřížením v éterové narkóze. Myším byla odebrána krev do mikrozkušavek s 5 µl 0,5M EDTA a změřená glykémie pomocí glukometru (Lifescan, USA). Vzorky krve byly následně centrifugovány (5320 g, 4 °C) po dobu 10 minut. Plazma byla uskladněna v -80 °C. Během pitvy byly odebrány vzorky pro další analýzy: epididymální tukové depo, játra, sval (m.gastrocnemius) a hnědá tuková tkáň. Vzorky byly zamraženy v tekutém dusíku a následně uskladněny při teplotě -80 °C.

4.3. Experiment 3 – cirkadiánní rytmy

Experiment 3 byl zaměřen opět na myši preaklimatizované ve 22 °C, kmeny A/J a B6 a pouze na cHF dietě. V tomto pokusu byly charakterizovány cirkadiánní rytmy v plazmatických parametrech a odebrány vzorky pro genovou expresi v různých tkáních. Cílem bylo propojit data z nepřímé kalorimetrie s parametry na úrovni jednotlivých tkání.

Pokus probíhal 24 hodin v průběhu třetího dne na dietě (začátek v 6:00 ráno). Celkový počet myší byl 56 v 7 skupinách (4 A/J a 4 B6 myši v každém časovém bodě). Disekce probíhaly každé 4 hodiny, tedy v 6:00 (čas 0 hod), 10:00 (čas 4 hod), 14:00 (čas 8 hod), 18:00 (čas 12 hod), 22:00 (čas 16 hod), 2:00 (čas 20 hod), 6:00 (čas 24 hod), v nočních hodinách proběhlo usmrcení zvířat pod červeným osvětlením. Zvířata měla neomezený přístup k potravě a vodě. Byla zjištěna spotřeba diety. Myši byly zváženy a usmrceny podstřížením v éterové narkóze. Myším byla odebrána krev do mikrozkušavek s 5 µl 0,5M EDTA a změřená glykémie pomocí glukometru (Lifescan, USA). Vzorky krve byly následně centrifugovány (5320 g, 4 °C) po dobu 10 minut. Plazma byla uskladněna v -80 °C. Během pitvy byly odebrány vzorky pro další analýzy: epididymální tukové depo, játra, sval (m.gastrocnemius) a hnědá tuková tkáň. Vzorky byly zamraženy v tekutém dusíku a následně uskladněny při teplotě -80 °C.

5. Metody

5.1. Nepřímá kalorimetrie

Nepřímá kalorimetrie byla provedena v systému INCA Somedic (Somedic, Sweden). Systém obsahuje 8 měřících beden vybavených analyzátoři a umožňuje monitorování jednotlivých myší (v klecích Eurostandard type II mouse plastic cages, 6000 ml, Techniplast, Italy).

Kalibrace kyslíkových analyzátorů byla provedena před každým měřením, kalibrace CO₂ analyzátorů každých 6 měsíců. Měření bylo provedeno za konstantního průtoku vzduchu (1000 ml/min). Spotřeba kyslíku $\dot{V}O_2$ a produkce oxidu uhličitého $\dot{V}CO_2$ byla zaznamenávána každé 2 minuty. RQ, EE, G_{ox} a L_{ox} byly vypočteny na základě rovnic (viz. Kapitola 2.2):

$$RQ = \dot{V}CO_2 / \dot{V}O_2$$

$$EE \text{ (cal/min)} = 3,9 \cdot \dot{V}O_2 \text{ (ml)} + 1,1 \cdot \dot{V}CO_2 \text{ (ml)}$$

$$G_{ox} \text{ (mg)} = 4,55 \cdot \dot{V}O_2 \text{ (ml)} - 3,21 \cdot \dot{V}CO_2 \text{ (ml)}$$

$$L_{ox} \text{ (mg)} = 1,67 \cdot \dot{V}O_2 \text{ (ml)} - 1,67 \cdot \dot{V}CO_2 \text{ (ml)}$$

5.2. Měření koncentrace lipidových metabolitů v plazmě

Koncentrace lipidových metabolitů byla stanovena ve vzorcích plazmy získané v rámci disekce a v homogenátech exkrementů. V plazmě byly měřeny NEFA, TAG a glycerol. V homogenátech exkrementů byla stanovena pouze koncentrace TAG.

K měření byly použity diagnostické soupravy včetně příslušných standardů dodaných výrobcem (Erba Lachema, ČR pro TAG; Wako Chemicals GmbH, Německo pro NEFA; Randox, Velká Británie pro glycerol). Reakce probíhala na 96-jamkových destičkách a výsledek byl vyhodnocen pomocí spektrofotometru. Každá destička obsahovala jamky použité pro blank, který slouží jako pozadí reakce a jamky pro standard, následně byl zjištěn průměr dubletů měřených standardů. Podle doporučeného postupu byly vzorky plazmy nebo homogenátů exkrementů smíchány s reakčním činidlem ze specifických kitů. Každý vzorek byl měřen paralelně ve dvou jamkách a jejich hodnoty byly následně zprůměrovány.

Principem metody je měření změny absorbance, ke které dochází reakcí barviva s detekovanou látkou. Od naměřené absorbance vzorků byla odečtena průměrná hodnota blanku a pak proběhlo porovnání s absorbancí standardu. Míra absorbance přímo úměrně odpovídá koncentraci metabolitů ve vzorcích.

5.2.1. TAG

V plazmě

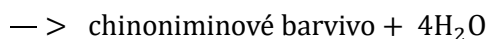
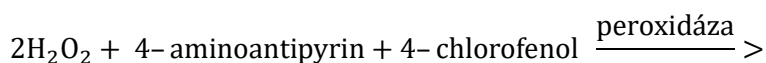
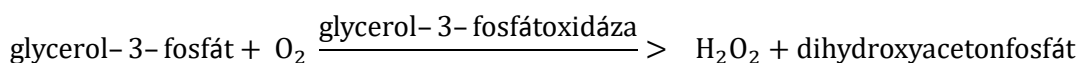
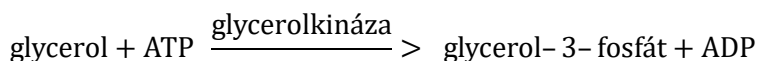
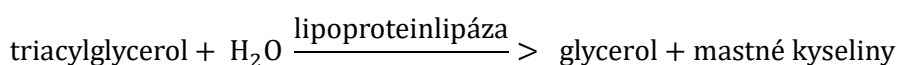
96-jamková destička byla popsána a do každé jamky bylo napipetováno 3 μ l destilované vody, standardu nebo vzorku. Následně bylo do jamek přidáno 300 μ l reakčního činidla a destička byla umístěna do třepačky v termostatu při 37 °C. Po 10 min byla změřena absorbance v jamkách na spektrofotometru Sunrise basic (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 500 nm.

V exkrementech

Přibližně 50 mg nadrcených exkrementů bylo vloženo do 2 ml mikrozkušavek a inkubováno po dobu 2 hod při teplotě 70 °C ve 300 µl 3 M KOH rozpuštěného v 65 % etanolu. Po inkubaci byly vzorky centrifugované po dobu 1 min. Následně byl odebrán supernatant ze vzorků a byl změřen obsah TAG stejným postupem, jaký byl použit v případě měření TAG v plasmě.

Vzorky byly měřeny bez předchozího ředění a výsledek byl přepočten na množství exkrementů.

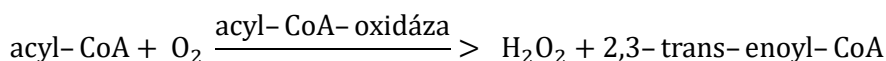
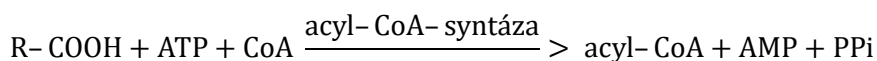
Princip metody

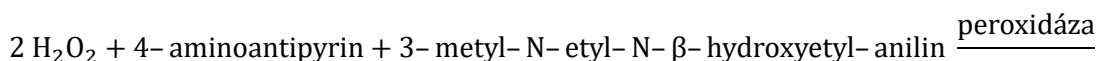


5.2.2. NEFA

96-jamková destička byla popsána a do každé jamky bylo napipetováno 2 µl destilované vody, standardu nebo vzorku. Následně bylo do jamek přidáno 86 µl reakčního činidla R1 a destička byla umístěna do třepačky v termostatu při 37 °C. Po 10 min byla destička ochlazená na kovovém bločku z lednice po dobu 1 min a pak bylo do jamek přidáno 43 µl reakčního činidla R2. Po dalších 10 minutách na třepačce při 37 °C byla destička změřena na spektrofotometru Sunrise basic (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 546 nm.

Princip metody



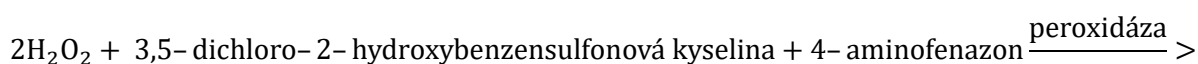
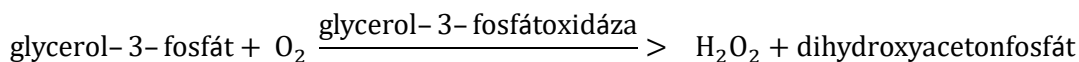
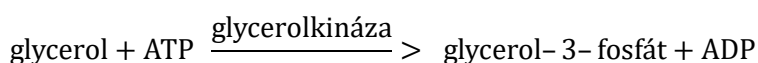


— > fialový anilinový pigment + 3 H₂O

5.2.3. Glycerol

Diagnostický kit obsahoval R1a pufr, R1b lyofilizované reakční činidlo a Standard. Nejprve bylo připraveno reakční činidlo R1 smícháním R1b s 15ml pufru R1a. Následně podle návodu byly za neustálého chlazení připraveny následující roztoky: roztok “Reagent blank” obsahoval destilovanou vodu a R1, roztok “Standard blank” obsahoval Standard a R1a, roztok “Standard” obsahoval Standard a R1, roztok “Vzorek blank” obsahoval vzorek a R1a, roztok “Vzorek” obsahoval vzorek a R1. Roztoky byly rozpipetované na popsanou 96-jamkovou destičku, která pak byla umístěna do třepačky v termostatu při 37 °C. Po 5 min byla destička změřena na spektrofotometru Sunrise basic (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 520 nm. Měření probíhalo oproti negativní kontrole “Reagent blank”.

Princip metody



— > n- (4- antipryl)- 3- chloro- 5- sulfonat- p- benzochinonimin

5.3. Kvantifikace mRNA

5.3.1. Izolace RNA

Vzorky tkání pro izolaci RNA byly skladované při teplotě -80 °C. Není-li uvedeno jinak, jednotlivé kroky probíhaly za pokojové teploty.

Homogenizace

Do připravených mikrozkušavek byla vložena keramická kulička a přidán 1ml TRIzol. Dále byla do mikrozkušavek s TRIzolem přenesena zmražená tkáň (50-80 mg) a homogenizovaná

v oscilačním mlýnu po dobu 3-5 min podle druhu tkáně. Následně byl homogenát centrifugován (10 minut, 12000 g, 4 °C). Do nových mikrozkuvek byla odebrána čirá mezifáze, která obsahovala RNA. Mezifáze byla inkubovaná po dobu 5 min za pokojové teploty.

Separace fází

Do mikrozkuvek s mezifází bylo přidáno 0,2 ml chloroformu a následně byly zkumavky důkladně vortexované po dobu 15 s. Vzorky byly inkubované po dobu 10 min za pokojové teploty. Následně byly vzorky centrifugované (15 minut, 14000 g, 4 °C). Po centrifugaci byla opatrně odebrána do nových mikrozkuvek vrchní vodná fáze tak, aby se nenabrala proteinová mezifáze.

Precipitace RNA

K odebrané vodné fázi bylo přidáno 0,5 ml izopropanolu. Vzorky byly následně několikrát protřepané v ruce a RNA se nechala srážet po dobu 10 min za pokojové teploty. Dále byly vzorky centrifugované (10 minut, 12000 g, 4 °C). Po centrifugaci byl pozorován bělavý nebo gelovitý pelet vysrážené RNA na dně mikrozkuvek. Supernatant byl poté odstraněn.

Promývání RNA

Do mikrozkuvek s peletem RNA byl přidán 1ml 70% ethanolu. Vzorky byly následně vortexované a inkubované po dobu 5 min za pokojové teploty. Dále byly vzorky centrifugované (5 minut, 12000 g, 4 °C). Po centrifugaci byl odebrán supernatant a následně byl pelet sušen na vakuové sušičce po dobu 5 min při 40 °C.

Rozpuštění a změření koncentrace RNA

Vysušený pelet byl rozpouštěn v redestilované vodě po dobu 20 min při 60 °C za občasného vortexování. Následně byla stanovena koncentrace a čistota RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop (NanoDrop, USA). Poměr absorbance při různých vlnových délkách reflektuje čistotu RNA. Poměr 260/280 nm znázorňuje kontaminaci proteiny, poměr 260/230 nm znázorňuje kontaminaci organickými rozpouštědly. Naizolovaná RNA byla následně skladovaná při teplotě -80 °C. Oba poměry by měly být kolem hodnoty 2.

5.3.2. Reverzní transkripce

Vzorky izolované RNA byly umístěné na led, aby se zabránilo degradaci RNA. Vzorky byly naředěné redestilovanou vodou na stejnou koncentraci (1000 ng/μl). Následně byly připraveny mix A a mix B v UV dekontaminačním boxu. Složení mixů je v Tabulce 2. Oligo T

nukleotidy v mixu A se vážou k poly A konci mRNA a vystupují jako primery. Tím je zajištěn přepis jen mRNA do cDNA. Do připravených mikrozkušavek byl napipetován 1 µl naředěné RNA a 11 µl mixu A. Následně byly mikrozkušavky vloženy do přístroje TGradient (Biometra, Německo), ve kterém probíhala reakce reverzní transkripce. Nejprve byly vzorky zahřáté na teplotu 65 °C, za které proběhla denaturace. Poté byly vzorky rychle zchlazené na teplotu 4 °C. V tomto kroku bylo do mikrozkušavek přidáno 8 µl mixu B. Reverzní transkriptáza v mixu B katalyzuje přepis mRNA na cDNA. Reakce dále pokračovala po dobu 50 min při teplotě 37 °C. Následně byly vzorky zahřáty na teplotu 72 °C po dobu 10 min a pak rychle zchlazené na teplotu 4 °C. Vzorky cDNA byly skladované při teplotě -20 °C.

Mix A	
redestilovaná H ₂ O	10,5 µl
oligo T primery	0,5 µl
Mix B	
5x RT pufr	4 µl
DTT	2 µl
dNTP mix	1 µl
M-MLV RT	1 µl

Tabulka 2: Složení mixů (množství na jeden vzorek)

5.3.3. Kvantitativní PCR

Metoda je založena na amplifikaci cílového úseku cDNA mezi specifickými primery a měření je zajištěno pomocí fluorescenční sondy, která při styku s dsDNA emituje signál zaznamenávaný po každém cyklu reakce. Jako fluorescenční sonda sloužilo interkalační barvivo SYBR Green (Roche, Německo). Software Lasergene 7.1 (DNA Star, USA) byl použit pro navržení primerů. Seznam použitých primerů je uveden v Tabulce 3.

Ze vzorků cDNA, získaných pomocí reverzní transkripce, byl vytvořen směsný vzorek (cDNAmix). Následně byla ze směsného vzorku vytvořena ředící řada (ředění 10x, 20x, 40x,

80x a 100x). Ředící řada sloužila pro vytvoření kalibrační křivky. Reakční směs bez přidaného cDNA sloužila jako blank.

Ve sterilním boxu byla připravena reakční směs (Tabulka 4) bez přidané cDNA, která byla následně rozpipetovaná do jamek 96-jamkové destičky. Vzorky cDNA byly 20x naředěné redestilovanou vodou. Na destičku byly napipetované naředěné vzorky a ředící řada. Všechny vzorky byly pipetované v dubletech. Poté byla destička krátce stočena (2500 rpm, Z 300, Hermlle) a vložena do měřicího přístroje LightCycler® 480 Real-Time PCR System, ve kterém probíhala reakce. Fáze reakce jsou uvedené v Tabulce 5.

Podle kalibrační křivky bylo stanoveno množství PCR produktu ve vzorcích. Výsledky genové exprese cílových genů byly vztaženy na geometrický průměr měření referenčních genů, jejichž hladina exprese je vyrovnaná v rámci skupin pokusných zvířat. Jako referenční geny byly použity Hprt, 18S rRna a B2m.

Gen	kód GenBank	sekvence primeru	délka produktu [bp]	teplota nasedání [°C]
Hprt	15452	5' GCTGAGGCGGCGAGGGAGAG 5' GCTAATCACGACGCTGGGACTGC	148	63
18S rRna	19791	5' GCCCGAGCCGCCTGGATAC 5' CCGGCGGGTCATGGGAATAAC	299	61
B2m	12010	5' AATTGAAGTCTGTCACTGTGCCCAA 5' ACAAAGCAGAAGTAGCCACAGGGT	72	53
Atgl	66853	5' CAAGGGGTGCGCTCTGTGGATGG 5' AGGCGGTAGAGATTGCGAAGGTTG	188	60
Cgi-58	67469	5' ATGCTTCAGCGGATAGGTGG 5' GCATACACATAATGCCCCGC	164	56

G0s2	14373	5' AGCTGCGGGAAGCGTGTGAA 5' ACCGGCCTTAAGAGGCGTGC	126	62
Hsl	16890	5' TCGCCCCACGGAGTCTATGC 5' CTCGGGGCTGTCTGAAGGCTCTGA	137	61
Fabp4	11770	5' CCAGGCCTCTTCCTTTGGCTCA 5' TGGTGACAAGCTGGTGGTGAAT	89	55
Acs11	14081	5' GAAGCCGTGGCCCAGGTGTTTGTC 5' TTCGCCTTCAGTGTTGGAGTCAGA	290	59
Dgat2	67800	5' CCAGCCCCCAGGTGTCAGAGGAG 5' GGGGCCGACGGGTCCAGAAGAAG	99	60
Lpl	16956	5' AGCCCCCAGTCGCCTTTCTCCT 5' TGCTTTGCTGGGGTTTTCTTCATTCA	286	60
Fas	14102	5' TGGGTGTGGAAGTTCGTCAG 5' GTCGTGTCAGTAGCCGAGTC	130	60
Scd1	20249	5' GCTCCAGCCAAGGTGCCTCTTA 5' CAGAGTGTCCTCCTGAGCTGATGC	181	57

Tabulka 3: Seznam použitých primerů

Složka	objem [μ l]
2x master mix	5
redestilovaná H ₂ O	3
5' primer	0,5
3' primer	0,5
20x ředěná cDNA	1

Tabulka 4: Reakční směs (množství na jeden vzorek)

Fáze	teplota [°C]	čas udržování teploty [s]
počáteční denaturace	95	300
amplifikace (45 cyklů)		
denaturace	95	10
nasednutí primerů	60	20
elongace	72	20
denaturační analýza		
denaturace	95	5
renaturace	65	60
postupná denaturace	98	-
zchlazení	40	10

Tabulka 5: Fáze kvantitativní PCR (LightCycler 480 Real-Time PCR System)

5.4. Histologie

5.4.1. Barvení hematoxylinem a eosinem

Vzorky WAT z epididymálního tukového depa byly fixovány v 4% formaldehydu, dehydratované pomocí vzestupné alkoholové řady, následně zalité do parafinu a byly vytvořeny řezy o tloušťce 3 μm pomocí přístroje Microtom Leica RM2235 (Leica Biosystems, ČR).

Barvení hematoxylinem a eosinem je jednou ze základních metod používaných v histologii. Kombinace obou barviv zajišťuje celkový přehled struktur studované tkáně ve vzorku. Hematoxylin je zásaditou sloučeninou, která barví hlavně buněčná jádra, ale také jiné kyselé složky buněk tmavě fialově. Eozin je kyselým barvivem a barví zásadité buněčné struktury růžově (hlavně cytoplazmu a extracelulární matrix).

Použité roztoky:

xylén (Penta, ČR)

96% etanol (Penta, ČR)

75% etanol (Penta, ČR)

50% etanol (Penta, ČR)

vodný roztok hematoxylinu (Gill III Hematoxylin Labonord) (Merck KGaA, Německo)

vodný roztok eozinu (Aqueous Eosin-Y Labonord) (Merck KGaA, Německo)

montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium) (Merck KGaA, Německo)

Vzorky byly deparafinované a hydratované pomocí sestupné alkoholové řady (xylén -> 96% etanol -> 75% etanol -> 50% etanol) po dobu 10 nebo 15 minut (pro xylén) v každém roztoku. Následně byly vzorky opláchnuté 2 min v tekoucí vodě a inkubovány v hematoxylinu po dobu 5 min. Po opláchnutí byly vzorky inkubovány v eozinu po dobu 10 min. Po opláchnutí byly vzorky dehydratované (krátce v každém roztoku) pomocí vzestupné alkoholové řady (50% etanol -> 75% etanol -> 96% etanol). Následně proběhlo sušení vzorků a montáž v montovacím médiu. Digitální snímky vzorků byly pořízeny na světelném mikroskopu Olympus AX70 záznamovým zařízením DP 70 (Olympus, Japonsko) a následně byla vyhodnocena jejich plocha s použitím nástroje prahování v softwaru NIS elements AR (Nikon, Japonsko).

5.5. Imunohistochemie v tuku (eWAT)

5.5.1. Barvení protilátkou proti ATGL

Imunohistochemické barvení probíhalo s využitím nepřímé trojstupňové metody. V prvním kroku se k cílovému antigenu (v našem případě ATGL) v tkáni váže primární protilátka. V druhém kroku se k primární protilátce váže sekundární protilátka. Sekundární protilátka musí být vyvinutá proti IgG živočišného druhu, ve kterém byla vyvinuta primární protilátka. V našem případě sekundární protilátka byla biotinylovaná, tedy měla na sobě navázaný biotin. V dalším kroku do reakce vstupují komplex avidinu a křenové peroxidázy, které jsou součástí ABC kitu. Avidin obsahuje několik vazebných míst pro biotin, který je navázán na sekundární protilátku, a je na něm navázaná peroxidáza. Výsledkem reakce je tvorba avidin-biotin komplexů s navázanou peroxidázou. Substrátem pro peroxidázu je chromogen 3,3'-diaminobenzidin (DAB), který je následně přidán do reakce. Výsledkem oxidace DAB je hnědé zbarvení, které indikuje přítomnost sledovaného antigenu (v našem případě ATGL). Vazbou avidinu k několika biotinylovaným sekundárním protilátkám je zajištěna specifita barvení, tedy nespecificky navázaná ojedinelá primární protilátka neumožní vazbu komplexu biotinu a peroxidázy. Naopak navázaná peroxidáza umožní s délkou inkubace zvýšit intenzitu specifického barvení a tím je zajištěna amplifikace signálu.

Použité roztoky:

xylen (Penta, ČR)

96% etanol (Penta, ČR)

75% etanol (Penta, ČR)

50% etanol (Penta, ČR)

30% H₂O₂ (Penta, ČR)

100% metanol (Penta, ČR)

PBS (pH=7,4): NaCl	1.06404	24g (Merck KGaA, Německo)
KCl	P3911	1,2 g (Merck KGaA, Německo)
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	71650	8,4 g (Merck KGaA, Německo)
KH ₂ PO ₄	795488	0,6 g (Merck KGaA, Německo)

DakoCytomation Target Retrieval Solution S170 (Agilent, USA)

kozí sérum S-1000 (Vector, USA)

primární protilátka 2138, vyvinutá v králíkovi proti myšimu ATGL (Cell Signaling Technology, Nizozemsko)

sekundární protilátka BA-1000 proti králičím IgG (Vector, USA)

ABC kit PK-6100 (Vector, USA)

DAB (3,3'-diaminobenzidin) tablety D4168 (Merck KGaA, Německo)

montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium) (Merck KGaA, Německo)

Vzorky byly deparafinované a hydratované pomocí sestupné alkoholové řady (xylen -> 96% etanol -> 75% etanol -> 50% etanol) vždy po 10 nebo 15 minutách (15 min jen v xyleny) a opláchnuté destilovanou vodou 1-5 min. Následně byly vzorky inkubované v DakoCytomation Target Retrieval Solution S1700 20 min při 95 °C. Po vychladnutí byly vzorky opláchnuté 2x 15 min ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem (PBS). Následně byly vzorky 30 min inkubované s 0,3% H₂O₂ v metanolu pro blokádu endogenní aktivity peroxidáz ve vzorku a poté zase opláchnuté 2x 15 min PBS. V dalším kroku byly vzorky inkubované v boxu 30 min s kozím sérem, ředěným v PBS v koncentraci 1:50. Kozí sérum blokuje nespecifické vazby primární a sekundární protilátky ke vzorku. Následně byla ke vzorkům přidána primární protilátka ředěná v PBS (s 1% kozím sérem) v koncentraci 1:800. Inkubace probíhala v inkubačním boxu se zvýšenou vlhkostí při 4 °C přes noc. Druhý den byly vzorky opláchnuté 2x 15 min v PBS a následně byla přidána sekundární protilátka ředěná v PBS v koncentraci 1:200. Inkubace probíhala v inkubačním boxu po dobu 30 min, poté proběhlo opláchnutí 2x 15 min v PBS. Mezitím byl připraven ABC kit (20 µl roztoku A + 20 µl roztoku B + 1960 µl PBS). Po vyjmutí z PBS byly vzorky inkubované v ABC kitu. Po 1 hod inkubace byly vzorky opláchnuté 2x 15 min v PBS. V dalším kroku byl ke vzorkům přidán DAB (1 tableta rozpuštěná ve 2,5 ml H₂O). Po 2 min inkubace proběhlo promytí vzorků dvakrát tekoucí kohoutkovou vodou. Následně byly vzorky inkubované v hematoxylinu (barvení jader) 1 min a promyté tekoucí vodou. V posledním kroku byly vzorky dehydratované pomocí vzestupné alkoholové řady (50% etanol -> 75% etanol -> 96% etanol), usušené a zamontované médiem. Digitální snímky byly pořízeny na světelném

mikroskopu Olympus AX70 záznamovým zařízením DP 70 (Olympus, Japonsko) a následně vyhodnocené softwarem NIS elements AR (Nikon, Japonsko).

5.6. Statistické vyhodnocení

Data byla statisticky vyhodnocena v programu GraphPad Prism (GraphPad Software, USA). Byla použita jednocestná ANOVA s Tukeyho srovnávacím testem nebo mnohonásobné t-testy (Holm-Sidak method). Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. Výsledky jsou udávány jako průměry a odchylky jsou vyjádřeny jako střední chyby průměrů (SE).

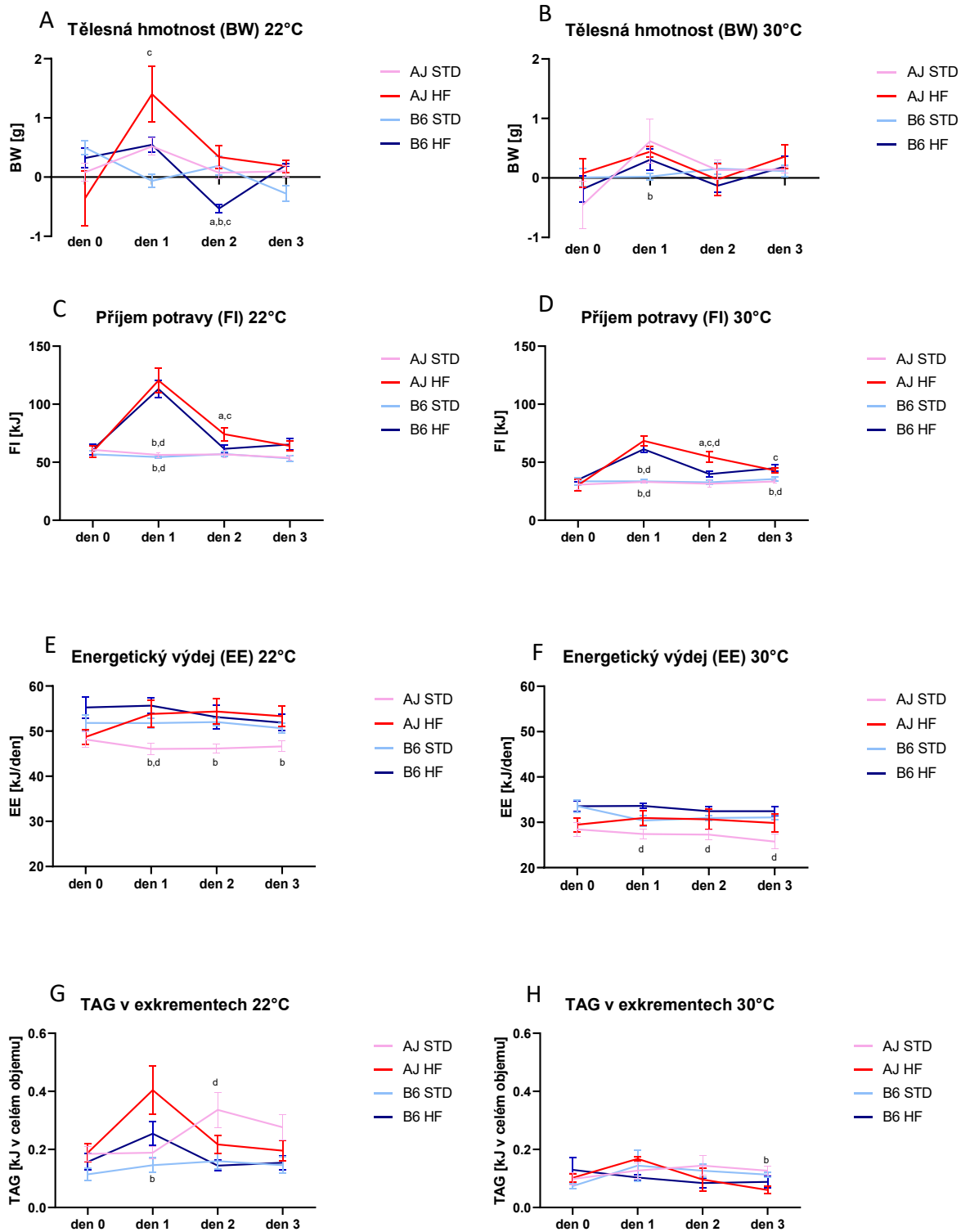
6. Výsledky

6.1. Nepřímá kalorimetrie

V experimentu 1 byli porovnáváni samci dvou myších kmenů B6 a A/J, preaklimatizovaní a měření v různých teplotách. Od 7. týdne byly myši s implantovanými čipy umístěny do 22 °C nebo 30 °C a v 9. týdnu pak byly tyto myši měřené v téže teplotě, tedy ve 22 °C nebo 30 °C, v systému nepřímé kalorimetrie. V průběhu měření ve dni „0“ 9. týdne měly myši neomezený přístup k STD dietě, ode dne „1“ do dne „4“ pokračovaly na STD dietě nebo jim byla ráno vyměněna STD dieta za cHF dietu. Ve dnech „1-4“ ráno proběhlo vážení myší, jejich diet a byly odebrány exkrementy pro analýzu TAG. Data z nepřímé kalorimetrie byla použita pro výpočet průběhu, denních a půldenních průměrů pro veličiny EE, RQ, L_{ox} a G_{ox} .

6.1.1. Tělesná hmotnost, příjem potravy, energetický výdej a koncentrace TAG v exkrementech

Ve 22 °C po přechodu AJ myší na cHF dietu byla ve dni 2 tělesná hmotnost B6 myší na cHF dietě signifikantně nižší v porovnání se všemi ostatními skupinami. Po přechodu obou kmenů myší na cHF dietu prudce stoupl příjem potravy, signifikantní rozdíl byl pozorován ve dni 1 v porovnání se skupinami na STD dietě a to jak ve 22 °C, tak i ve 30 °C. U skupiny AJ cHF ve 22 °C ve dni 2 byl signifikantně vyšší příjem potravy v porovnání se skupinou na STD dietě. Signifikantní rozdíl v příjmu potravy byl také pozorován u myší ve 30 °C ve dnech 2 a 3 ($p < 0,05$; Graf 1 C,D). Celkový příjem potravy byl výrazně nižší u myší preaklimatizovaných a měřených v termoneutralní teplotě než u myší z laboratorní teploty. EE u skupiny AJ STD byl signifikantně nižší v porovnání s AJ HF skupinou ve 22 °C ve dnech 1-3 ($p < 0,05$; Graf 1 E). Celkově byla EE výrazně nižší u myší preaklimatizovaných a měřených v termoneutralní teplotě než u myší z laboratorní teploty, což odpovídá energetickému příjmu. Ve 30 °C skupina AJ STD měla signifikantně vyšší koncentrace TAG v exkrementech v porovnání se skupinou AJ HF ve dni 3 ($p < 0,05$; Graf 1 G,H). Celkově byla akumulace TAG v exkrementech na mnohonásobně nižší úrovni než byl příjem a výdej energie celého organismu, exkrece TAG tudíž nehraje velkou roli v energetické homeostáze ani u jednoho kmene laboratorních myší a to ani za různých dietních podmínek.

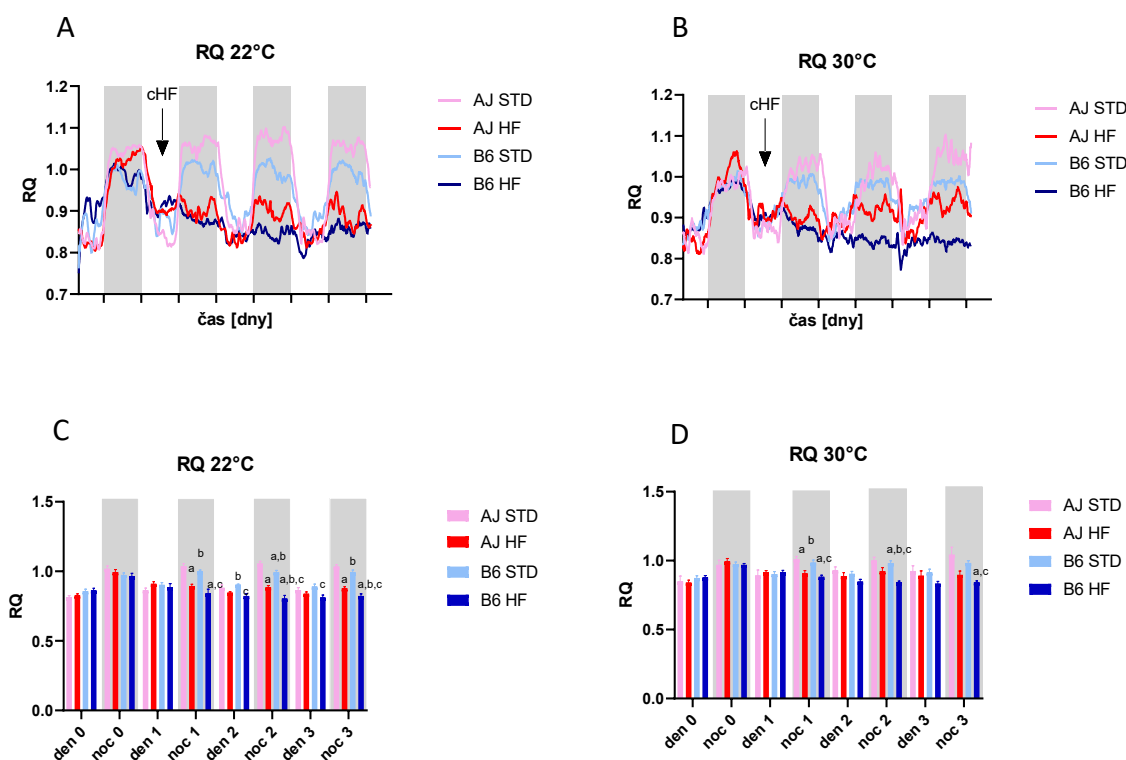


Graf 1: Tělesná hmotnost (BW) při 22 °C (A) a 30 °C (B), příjem potravy (FI) při 22 °C (C) a 30 °C (D), energetický výdej (EE) při 22 °C (E) a 30 °C (F) a obsah triacylglycerolů (TAG) v exkrementech při 22 °C (G) a 30 °C (H). Signifikantní rozdíl ve srovnání s AJ STD (^a), AJ cHF (^b), B6 STD (^c), B6 cHF (^d) ($p < 0,05$; jednocestná ANOVA).

6.1.2. Respirační koeficient a oxidace lipidů a sacharidů

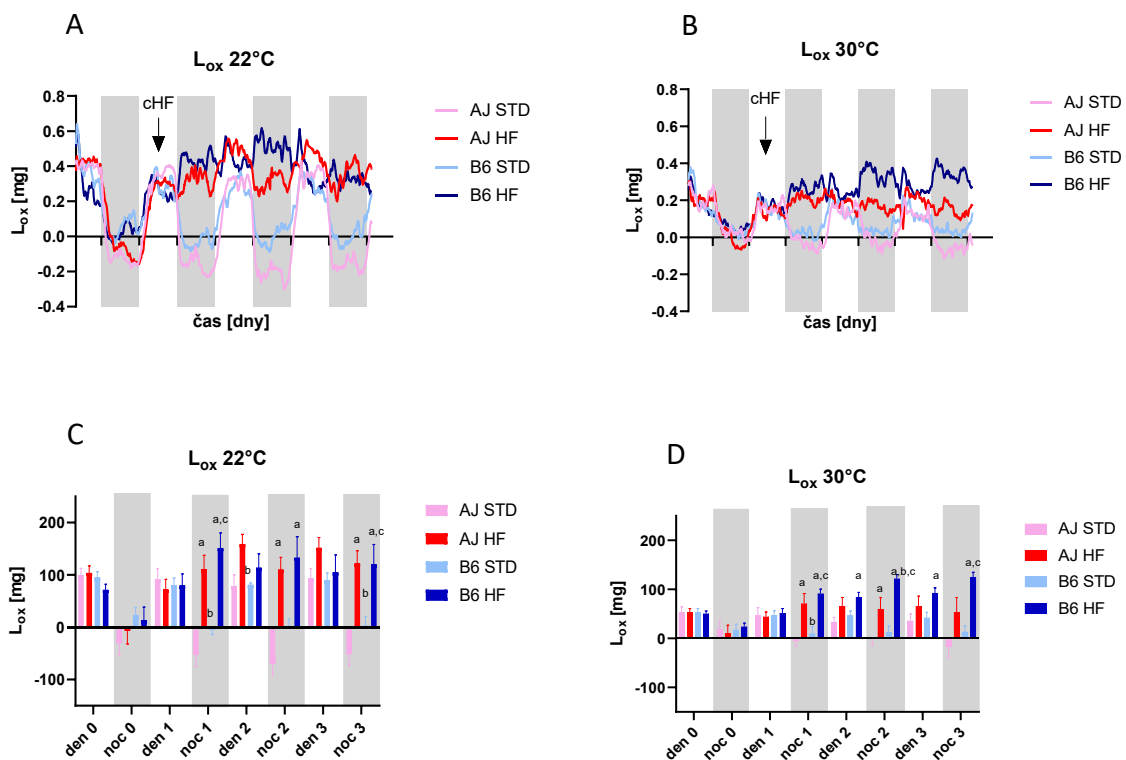
RQ vykazuje zachovaný cirkadiánní rytmus v průběhu dne u skupin myši na STD dietě a ztrátu tohoto rytmu u skupin na HF dietě. U myši na STD dietách v obou teplotách jsou hodnoty RQ vyšší přes noc, což odpovídá vyššímu příjmu a oxidaci cukrů z potravy, a nižší přes den, což odpovídá vyšší oxidaci lipidů z tělesných zásob v období sníženého příjmu potravy (Graf 2 A,B). Křivky RQ se nicméně nelišily výrazně u myši měřených ve 22 a 30 °C.

Při vyhodnocení průměrných hodnot RQ za 12 hodin (tedy v denní a noční fázi dne) byly pozorované signifikantní rozdíly mezi skupinami ve 22 °C (Graf 2 C) a ve 30 °C (Graf 2 D) ($p < 0,05$). RQ u myši na STD dietě vykazuje v některých případech v noční fázi měření signifikantní rozdíl mezi kmeny. Toto relativně vyšší RQ v noční fázi měření může být dané buď vyšší oxidací cukrů nebo vyšší lipogenezi, na což by ukazovaly i hodnoty často překračující 1.



Graf 2: Průběh respiračního koeficientu (RQ) při 22 °C (A) a 30 °C (B) a 12 hodinový průměr RQ při 22 °C (C) a 30 °C (D). Signifikantní rozdíl ve srovnání s AJ STD (^a), AJ cHF (^b), B6 STD (^c), B6 cHF (^d) ($p < 0,05$; jednocestná ANOVA).

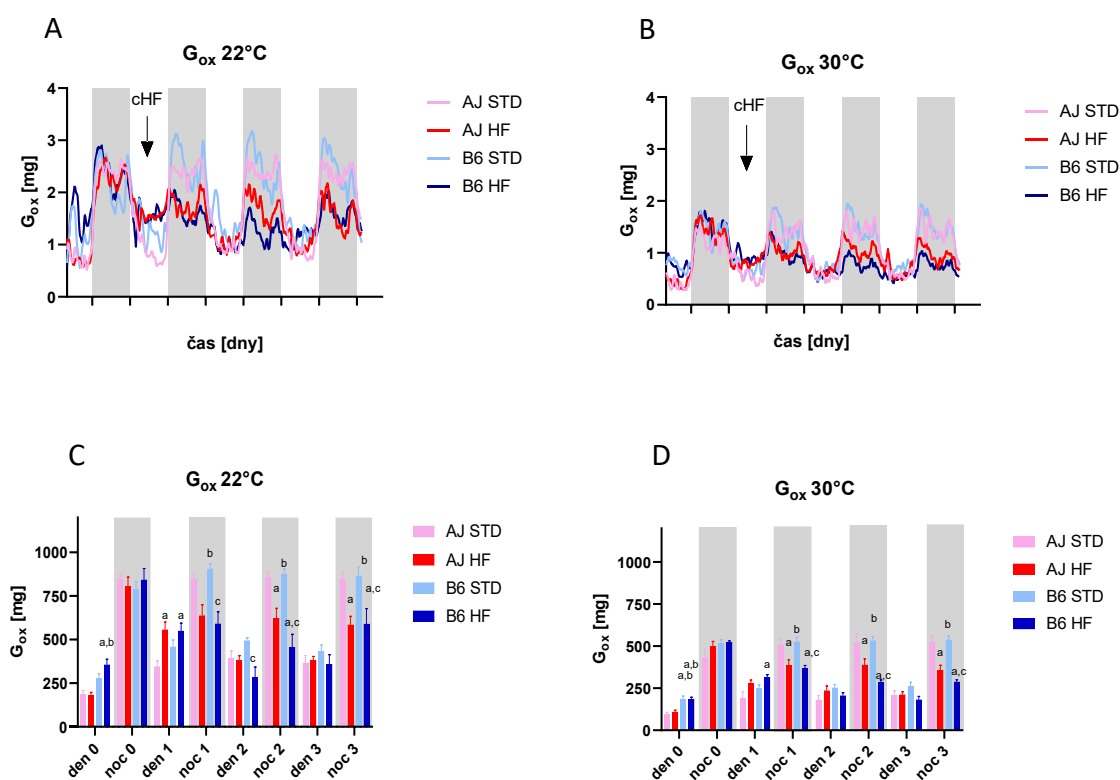
Celotělová oxidace lipidů L_{ox} vypočtená z výstupů nepřímé kalorimetrie vykazovala zachovaný cirkadiánní rytmus u skupin myši na STD dietě a ztrátu cirkadiánního rytmu u skupin na HF dietě. Hodnoty L_{ox} jsou v případě zachovaného cirkadiánního rytmu vyšší přes den a nižší přes noc bez ohledu na teplotu měření (Graf 3 A,B). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou pozorované ve 22 °C (Graf 3 C) a i ve 30 °C (Graf 3 D) ($p < 0,05$), zejména konzistentní a většinou signifikantní nárůst L_{ox} v noční fázi měření u myši na HF ve srovnání se STD dietou pozorovaný u obou myších kmenů. Celkově je oxidace lipidů nižší u myši preaklimatizovaných a měřených v termoneutrální než v laboratorní teplotě, což odpovídá i nižšímu celkovému příjmu i výdeji energie. Oxidace lipidů u myši preaklimatizovaných a měřených v termoneutrální teplotě obecně vykazuje nižší změny mezi denní a noční fází měření. Zatímco u myši AJ STD 22 °C klesá oxidace lipidů v noční fázi měření pod 0 (což indikuje lipogenezi), u myši AJ STD 30 °C k tomuto jevu nedochází. U myši na STD dietě je v noční fázi měření zejména ve 22 °C nesignifikantně nižší L_{ox} u AJ než u B6 myši.



Graf 3: Průběhová křivka oxidace lipidů (L_{ox}) při 22 °C (A) a 30 °C (B) a 12 hodinová průměrná L_{ox} při 22 °C (C) a 30 °C (D). Signifikantní rozdíl ve srovnání s AJ STD (^a), AJ cHF (^b), B6 STD (^c), B6 cHF (^d) ($p < 0,05$; jednocestná ANOVA).

V průběhovém grafu oxidace cukrů (G_{ox}) byl pozorován zachovaný cirkadiánní rytmus u skupin myši na STD dietě a ztráta cirkadiánního rytmu u skupin na HF dietě. Hodnoty G_{ox} jsou v případě zachovaného cirkadiánního rytmu vyšší přes noc a nižší přes den bez ohledu na teplotu preaklimatizace a měření (Graf 4 A,B). Signifikantní rozdíly mezi skupinami byly pozorované ve 22 °C (Graf 4 C) a ve 30 °C (Graf 4 D) ($p < 0,05$).

Oxidace cukrů je opět vyšší u myši preaklimatizovaných a měřených v laboratorní než v termoneutrální teplotě, což odpovídá vyššímu energetickému příjmu i výdeji, a vykazuje vyšší změny v rámci cirkadiánního rytmu u myši z laboratorní teploty.



Graf 4: Průběhová křivka oxidace sacharidů (G_{ox}) při 22 °C (A) a 30 °C (B) a 12 hodinová G_{ox} při 22 °C (C) a 30 °C (D). Signifikantní rozdíl ve srovnání s AJ STD (^a), AJ CHF (^b), B6 STD (^c), B6 CHF (^d) ($p < 0,05$; jednocestná ANOVA).

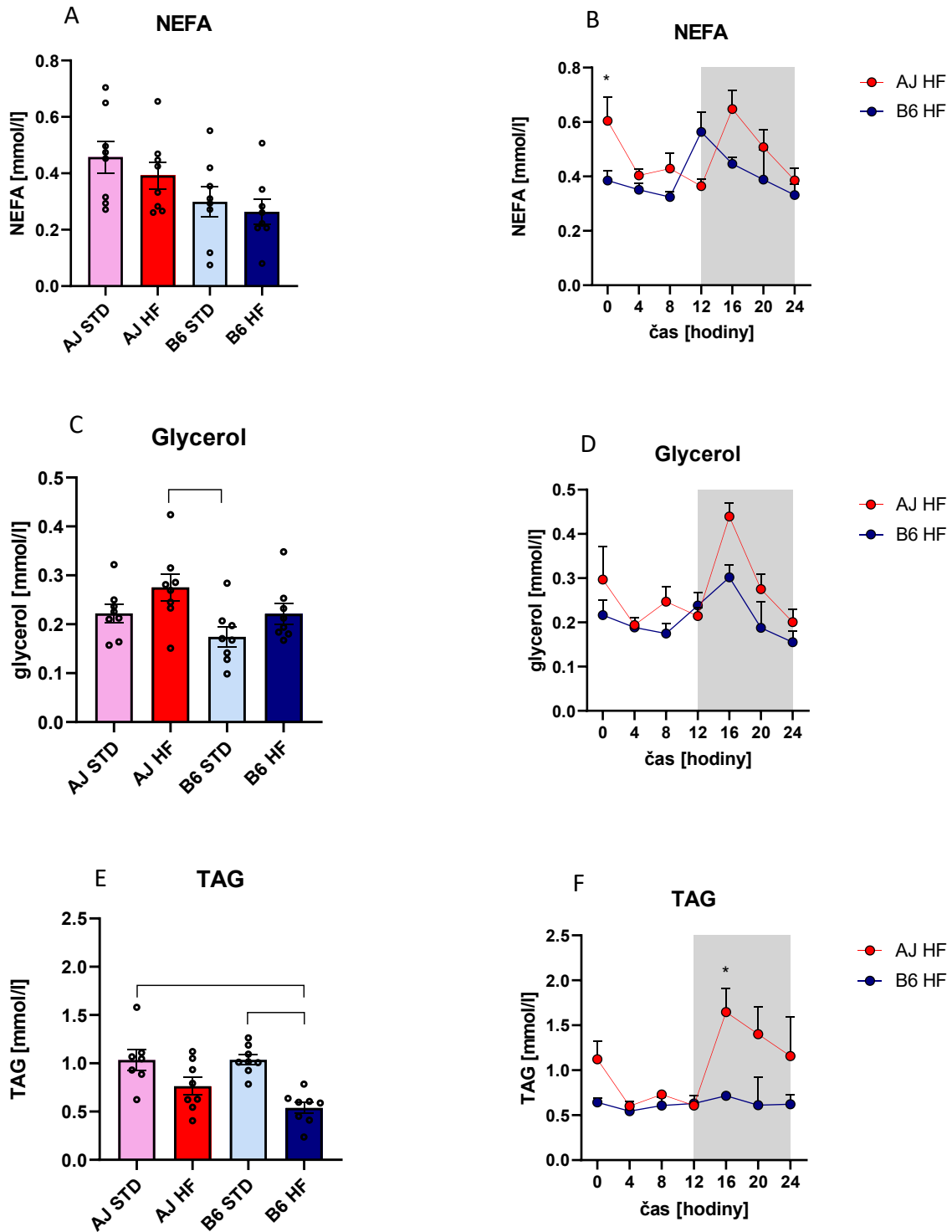
Závěrem je možné shrnout, že zvýšené RQ u AJ STD oproti B6 STD (Graf 2) v obou teplotách je pravděpodobně více ovlivněné nesignifikantně vyšší lipogenezí než oxidací sacharidů. Rozdíly v RQ v noční fázi měření mezi AJ HF a B6 HF v obou teplotách, pozorované ve dni 2 a 3 u myši ze 22 °C a ve dni 2 u myši ze 30 °C po přechodu na HF dietu, indikují vyšší metabolickou flexibilitu myši kmene A/J (Graf 2). Výstupy RQ se výrazně nelišily u myši preaklimatizovaných a měřených v termoneutrální a laboratorní teplotě (Graf

2), proto byly další experimenty provedeny pouze na myších z laboratorní teploty, které měly navíc indikaci zvýšené lipogeneze.

6.2. Koncentrace lipidových metabolitů v plazmě

Pro provázání výstupů z nepřímé kalorimetrie s funkcí tukové tkáně v pufování hladin lipidových metabolitů v plazmě byly provedeny experimenty 2 a 3. V experimentu 2 byly myši umrceny po 3 dnech na pokusných dietách, tedy v čase, kdy se lišilo RQ u AJ HF a B6 HF skupiny. V experimentu 3 pak probíhala disekce myši na HF dietě v průběhu 3. dne měření, tak, aby bylo možno cirkadiánní profil v RQ propojit s profilem lipidových metabolitů v plazmě a s aktivitou metabolických drah v tukové tkáni. V experimentu 2 byli porovnáváni samci kmenů B6 a A/J po 3 dnech na STD nebo cHF dietě a to pouze ve 22 °C. Myši byly usmrceny podstřížením v éterové narkóze a byla jim odebrána krev. Po centrifugaci krve byla odpipetována plazma, ve které byla změřena koncentrace lipidových metabolitů. Cílem bylo charakterizovat rozdíl v plazmatických parametrech mezi skupinami (Graf 5 A,C,E). V experimentu 3 byli porovnáváni samci kmenů B6 a A/J pouze na cHF dietě a ve 22 °C. Pokus probíhal 24 hodin v průběhu třetího dne na dietách. Cílem bylo charakterizovat cirkadiánní rytmy v plazmatických parametrech (Graf 5 B,D,F).

Signifikantní rozdíly jsou pozorované v koncentraci TAG mezi skupinami B6 STD a B6 HF (Graf 5 E). Signifikantní rozdíly jsou pozorované mezi skupinami v koncentraci NEFA v 0. hodině (Graf 5 B) a v koncentraci TAG v 16. hodině (Graf 5 F). Ztráta cirkadiánního rytmu v plazmatických parametrech u myši na HFD je v souladu s daty z nepřímé kalorimetrie, avšak nárůst hladin NEFA a glycerolu v noci byl překvapivý. Celkově vyšší hladiny plazmatických parametrů NEFA a glycerolu u skupiny AJ HF v porovnání se skupinou B6 HF potvrzují vyšší schopnost tukové tkáně uvolňovat lipidy u AJ kmene (Graf 5 B,D). Zvýšení hladin NEFA a TAG v noční fázi v 16. hodině u AJ HF myši pravděpodobně ukazuje na reesterifikaci uvolněných FA z tukové tkáně v játrech a jejich následující vyloučení do krevního oběhu ve formě VLDL částic (Graf 5 B,F). Pravděpodobný původ NEFA z potravních zdrojů důsledkem „spill-over“ není potvrzen nárůstem genové exprese LPL ve stejném časovém bodě. Nárůst TAG v plazmě v tomto bodě pravděpodobně není důsledkem *de novo* lipogeneze FA v játrech, protože není detekovatelný na úrovni nepřímé kalorimetrie.



Graf 5: Koncentrace v plazmě: neesterifikované mastné kyseliny (NEFA) (A,B), glycerol (C,D) a triacylglyceroly (TAG) (E,F). Experiment 2 (A,C,E), experiment 3 (B,D,F). Signifikantní rozdíly jsou vyznačeny v grafech (C,E; $p < 0,05$) a * mezi skupinami v čase 0 (B) a v čase 16 (F) ($p < 0,05$). Jednocestná ANOVA (A,C,E); mnohonásobné t-testy (B,D,F).

6.3. Genová exprese v tkáních

V experimentech 2 a 3 v průběhu disekce bylo kromě krevní plazmy u myší odebráno i epididymální tukové depo a játra pro změření genové exprese enzymů lipidového metabolismu. Cílem obou experimentů bylo provázání výstupů z nepřímé kalorimetrie s expresí genů lipidového metabolismu. Cílem experimentu 2 bylo charakterizovat rozdíl v expresi genů lipogeneze a lipolýzy mezi skupinami. Cílem experimentu 3 bylo charakterizovat cirkadiánní rytmy v expresi genů lipogeneze a lipolýzy. Hodnoty získané z kvantitativní PCR byly vztaženy na geometrický průměr hladin referenčních genů Hprt, 18S rRna a B2m.

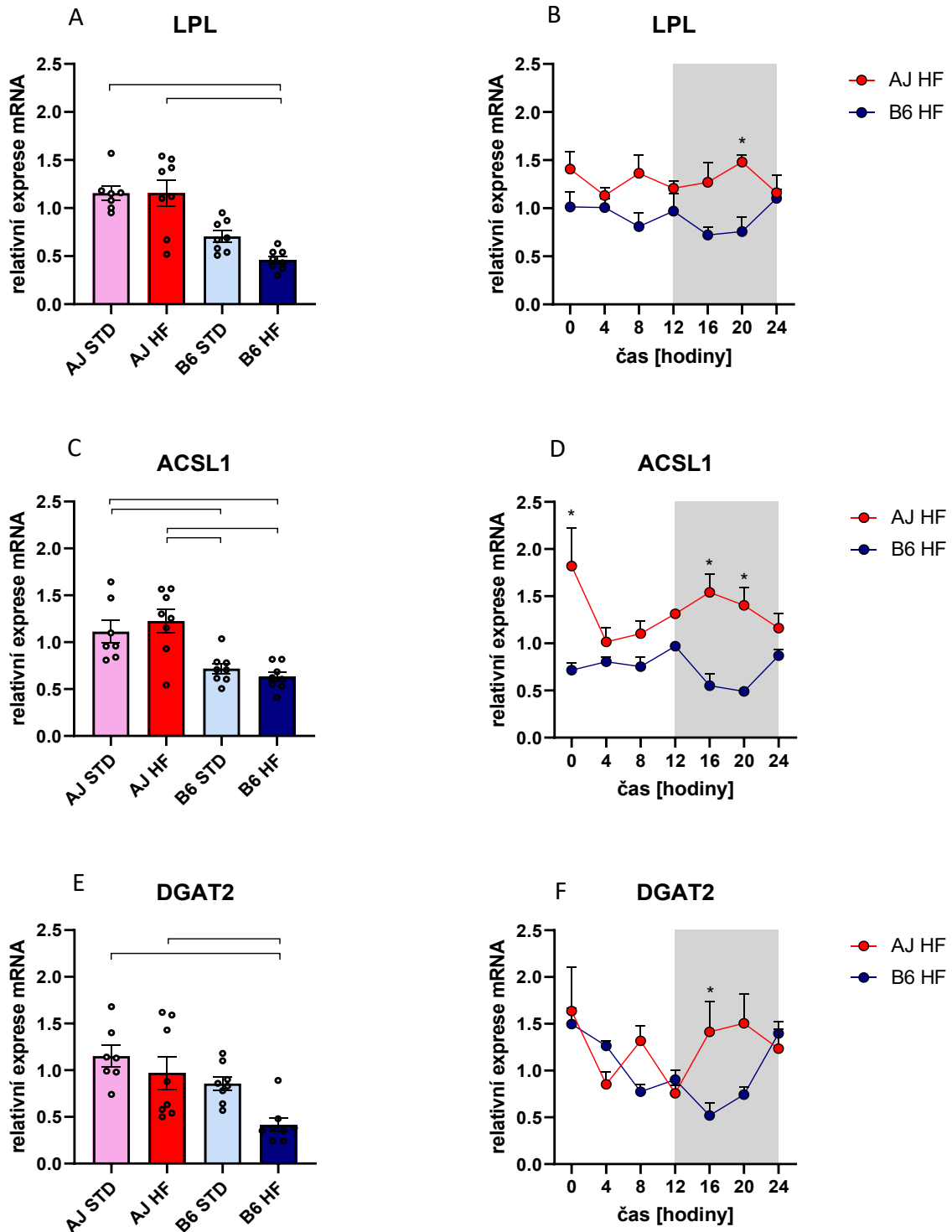
6.3.1. Uptake lipidů, aktivace FA a reesterifikace v epididymálním tukovém depu

Signifikantní rozdíly v expresi mRNA pro LPL jsou pozorované mezi skupinami AJ HF a B6 HF (Graf 6 A) a mezi skupinami na HF dietě v 20. hodině (Graf 6 B). Signifikantní rozdíly v expresi mRNA pro ACSL1 jsou pozorované mezi skupinami AJ STD a B6 STD, AJ HF a B6 HF (Graf 6 C) a mezi skupinami na HF dietě v čase 0, 16 a 20 hodin (Graf 6 D).

Signifikantní rozdíly v expresi mRNA pro DGAT2 jsou pozorované mezi skupinami AJ HF a B6 HF (Graf 6 E) a mezi skupinami na HF dietě v 16. hodině (Graf 6 F).

Očekávaný celkový nárůst LPL v noční fázi měření nebyl pozorován, avšak vyšší hladiny mRNA pro LPL u AJ HF oproti B6 HF myši ukazují na vyšší schopnost přijímat FA u kmene AJ. Hladina mRNA pro LPL v 16. hodině také nesouvisí s nárůstem hladiny NEFA v tomto bodě, což vylučuje pravděpodobnost vzniku NEFA důsledkem „spill-over“ (Graf 6 B).

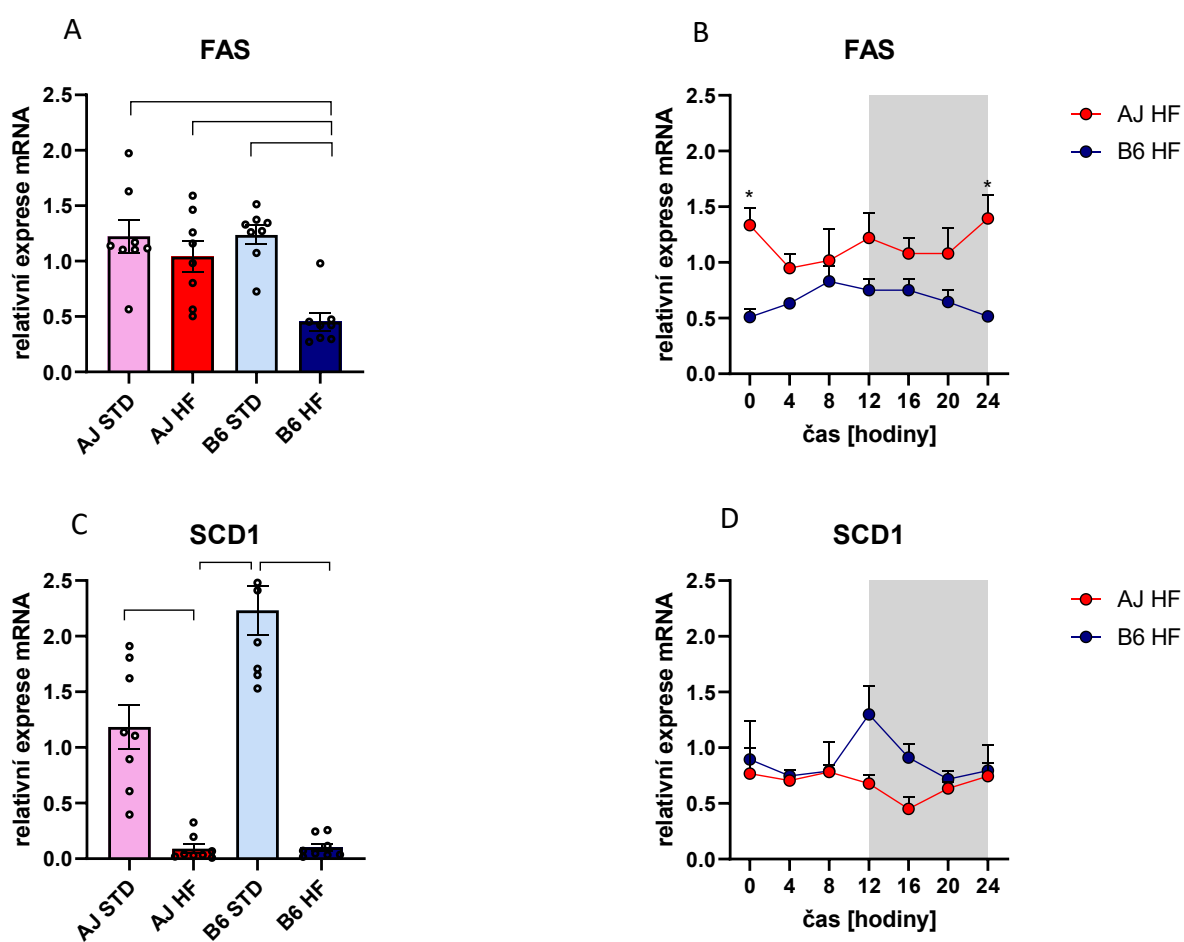
Vyšší hladiny mRNA pro ACSL1 a DGAT2 u AJ myši na obou dietách jak v denní tak i v noční fázi ukazují na vyšší reesterifikační aktivitu v tukové tkáni tohoto kmene (Graf 6 C,D,E,F).



Graf 6: Hladina genové exprese pro lipoproteinovou lipázu (LPL) (A,B), syntetázu acyl-CoA s dlouhým řetězcem (ACSL1) (C,D) a diacylglycerol-acyltransferázu 2 (DGAT2) (E,F) v epididymálním tukovém depu. Experiment 2 (A,C,E), experiment 3 (B,D,F). Signifikantní rozdíly jsou vyznačeny v grafech (A,C,E; $p < 0,05$) a * mezi skupinami v čase 20 (B), v čase 0,16,20 (D) a v čase 16 (F) ($p < 0,05$). Jednocestná ANOVA (A,C,E); mnohonásobné t-testy (B,D,F).

6.3.2. Lipogeneze v játrech

Signifikantní rozdíly v expresi mRNA pro FAS jsou pozorované mezi skupinami AJ HF a B6 HF, B6 STD a B6 HF (Graf 7 A) a mezi skupinami na HF dietě v čase 0 a 24 hodin (Graf 7 B). Signifikantní rozdíly v expresi mRNA pro SCD1 jsou pozorované mezi skupinami AJ STD a AJ HF, B6 STD a B6 HF (Graf 7 C). Tyto rozdíly na úrovni genové exprese naznačují, že lipogeneze by mohla být vyšší a zachovaná u AJ myši na HF dietě v porovnání s B6 myši na HF dietě a tento rozdíl by mohl vysvětlit pozorované rozdíly v RQ. Je nicméně zářející, že mRNA pro FAS nevykazuje výrazný cirkadiánní rytmus, který by lépe odpovídal změnám v RQ (tedy že není vyšší v noční fázi měření).



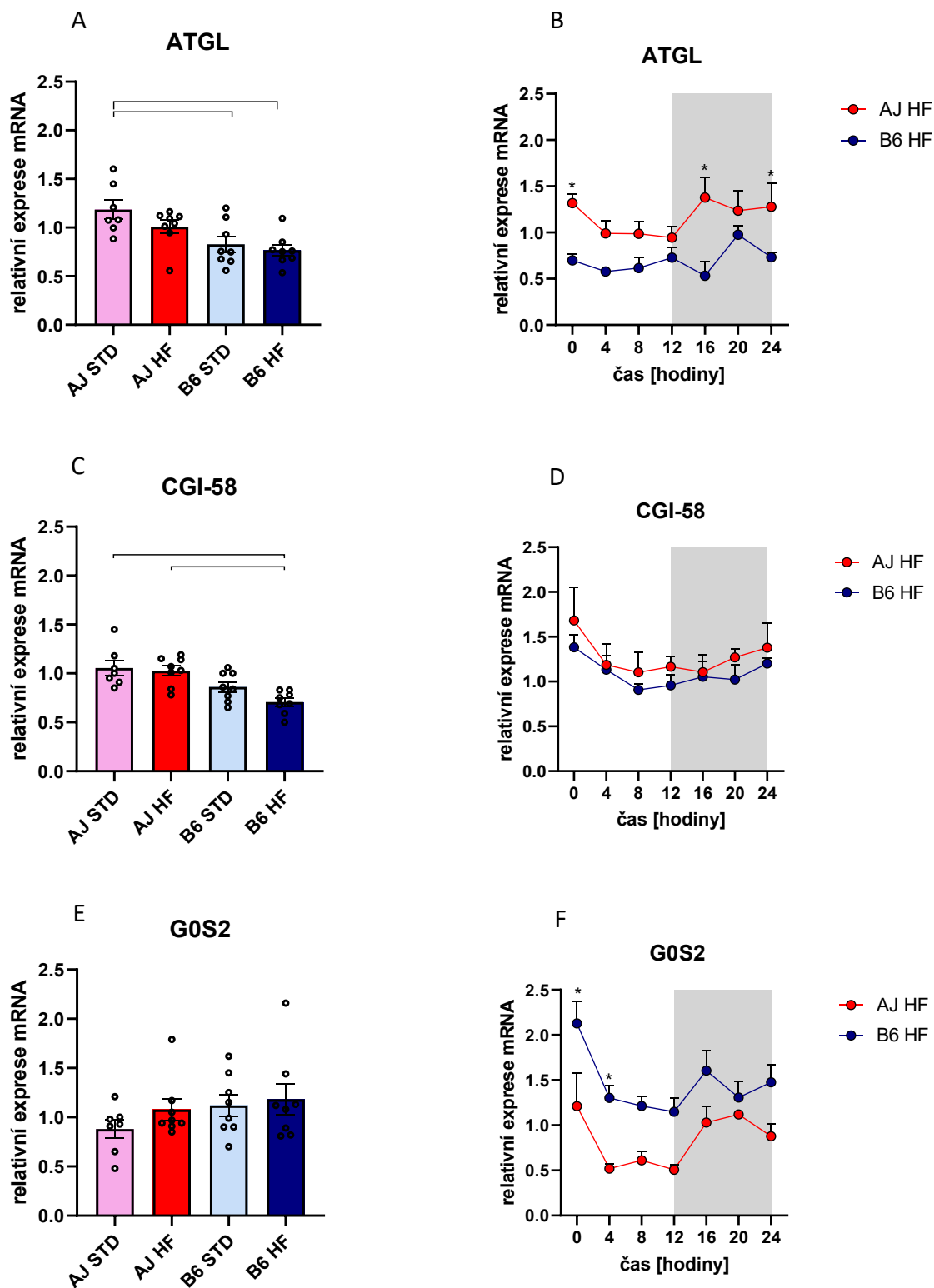
Graf 7: Hladina genové exprese pro syntázu mastných kyselin (FAS) (A,B) a stearyl-coA desaturázu (SCD1) (C,D) v játrech. Experiment 2 (A,C), experiment 3 (B,D). Signifikantní rozdíly jsou vyznačeny v grafech (A,C; $p < 0,05$) a * mezi skupinami v čase 0 a 24 (B) ($p < 0,05$). Jednocestná ANOVA (A,C); mnohonásobné t-testy (B,D).

6.3.3. Lipolýza v epididymálním tukovém depu

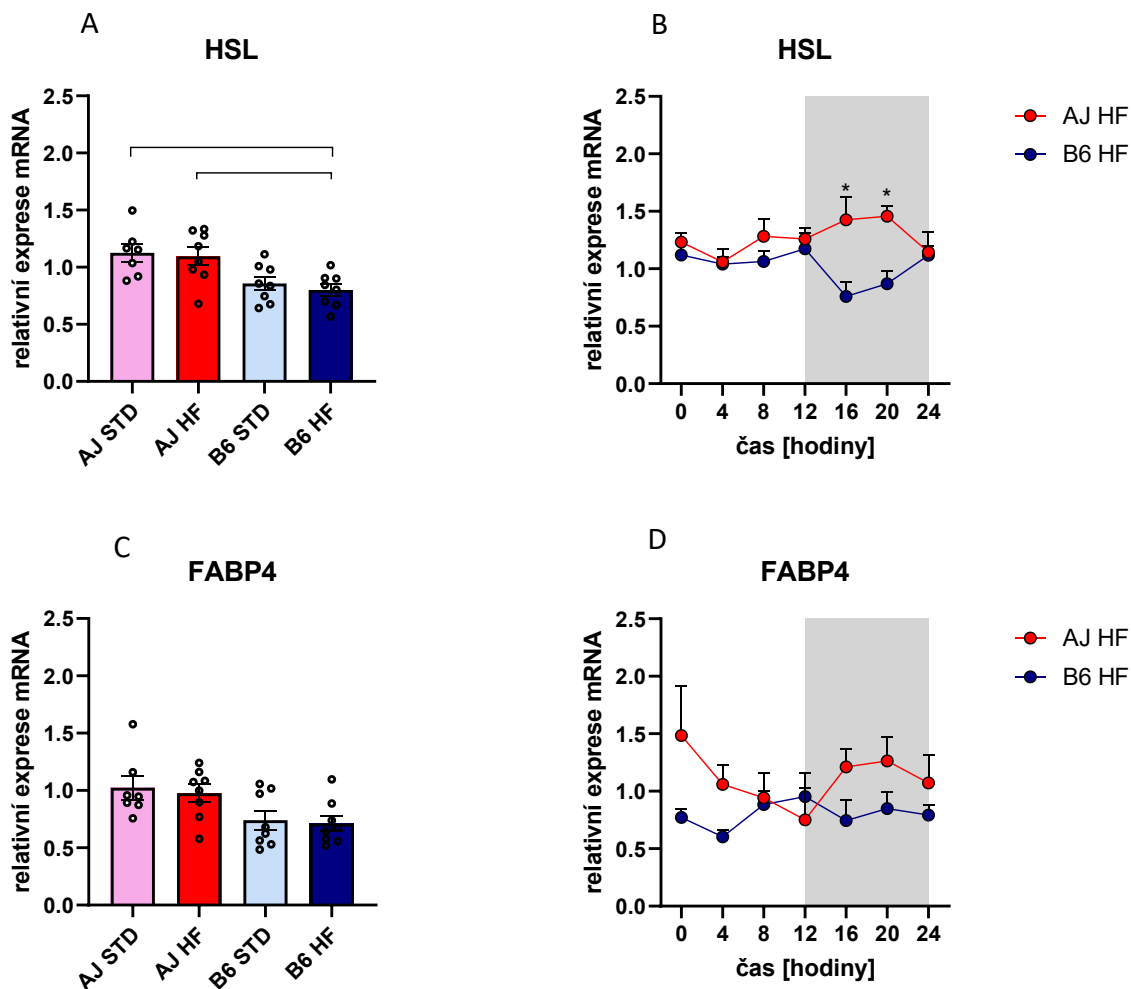
mRNA pro ATGL je signifikantně rozdílná mezi skupinami AJ STD a B6 STD (Graf 8 A) a mezi skupinami na HF dietě v čase 0, 16 a 24 hodin (Graf 8 B). mRNA pro aktivátor ATGL CGI-58 se signifikantně liší mezi skupinami AJ HF a B6 HF (Graf 8 C) a mRNA pro inhibitor ATGL G0S2 vykazuje signifikantní rozdíly v cirkadiánním rytmu mezi skupinami na HF dietě v čase 0 a 4 hodin (Graf 8 F). Stejně jako ATGL je i aktivátor ATGL vyšší a inhibitor ATGL nižší u AJ myši na HF dietě, což ukazuje na zvýšení lipolýzy v eWAT u těchto myši.

Signifikantní rozdíly v expresi mRNA pro HSL jsou pozorované mezi skupinami AJ HF a B6 HF (Graf 9 A) a také mezi skupinami myši na HF dietě v čase 16 a 20 hodin (Graf 9 B). Rozdíly mezi skupinami v expresi mRNA pro FABP4, který na sebe váže FA uvolněné z lipolýzy a je důležitý pro funkci HSL, nejsou signifikantní (Graf 9 C,D).

Očekávané vyšší hladiny mRNA genů lipolýzy a jejich aktivátorů nebyly pozorované v denní fázi (Graf 8,9 B,D). AJ myši na obou dietách vykazují vyšší expresi lipolytických genů a jejich aktivátorů v porovnání s B6 myšmi (Graf 8,9 A,C), což je důkazem vyšší lipolytické aktivity tukové tkáně u AJ myši.



Graf 8: Hladina genové exprese pro triacylglycerolovou lipázu (ATGL) (A,B), komparativní genový identifikátor-58 (CGI-58) (C,D) a G0/G1 přepínač genu 2 (G0S2) (E,F) v epididymálním tukovém depu. Experiment 2 (A,C,E), experiment 3 (B,D,F). Signifikantní rozdíly jsou vyznačeny v grafech (A,C; $p < 0,05$) a * mezi skupinami v čase 0,16,24 (B) a v čase 0,4 (F) ($p < 0,05$). Jednocestná ANOVA (A,C,E); mnohonásobné t-testy (B,D,F).

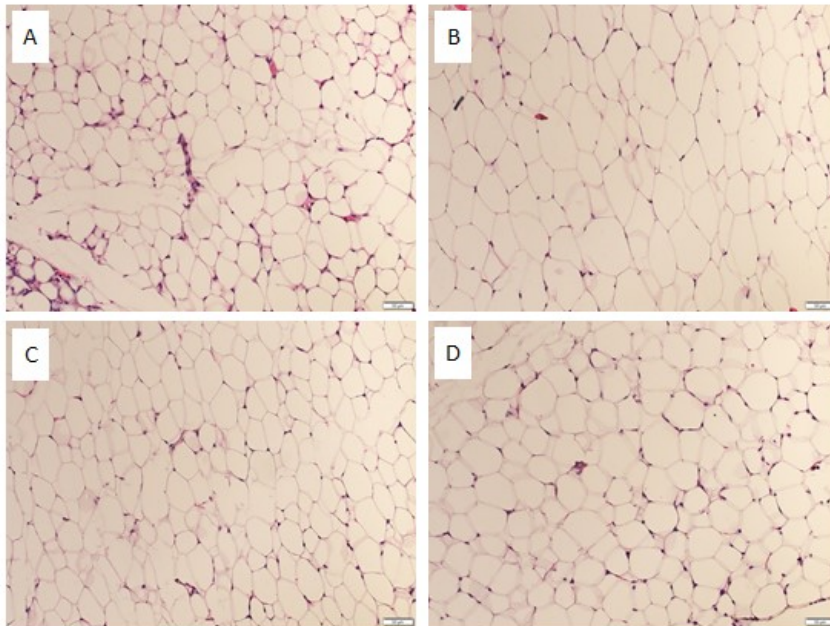


Graf 9: Hladina genové exprese pro hormon-senzitivní lipázu (HSL) (A,B) a protein vázající mastné kyseliny 4 (FABP4) (C,D) v epididymálním tukovém depu. Experiment 2 (A,C), experiment 3 (B,D). Signifikantní rozdíly jsou vyznačeny v grafech (A; $p < 0,05$) a * mezi skupinami v čase 16,20 (B) ($p < 0,05$). Jednocestná ANOVA (A,C); mnohonásobné *t*-testy (B,D).

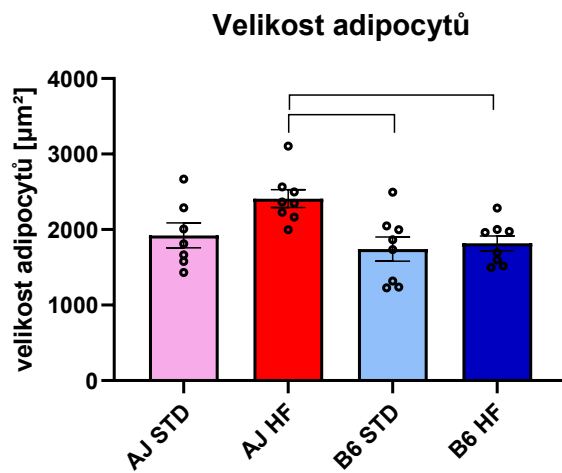
6.4. Barvení hematoxylinem a eozinem

6.4.1. Stanovení velikosti adipocytů

Ze čtyř skupin myší z experimentu 2 (AJ STD, AJ HF, B6 STD, B6 HF) bylo odebráno epididymální tukové depo a následně vytvořeny řezy, které byly obarvené hematoxylinem a eozinem (Obr. 5). Na světelném mikroskopu bylo vytvořeno 7 snímků z každého řezu a vypočtená plocha průřezu adipocytu pomocí nástroje prahování (přibližně vypovídající o velikosti adipocytu) v softwaru NIS elements AR. Signifikantní rozdíly v takto stanovené velikosti adipocytů jsou pozorovány mezi skupinami na HF dietě ($p < 0,05$; Graf 10).



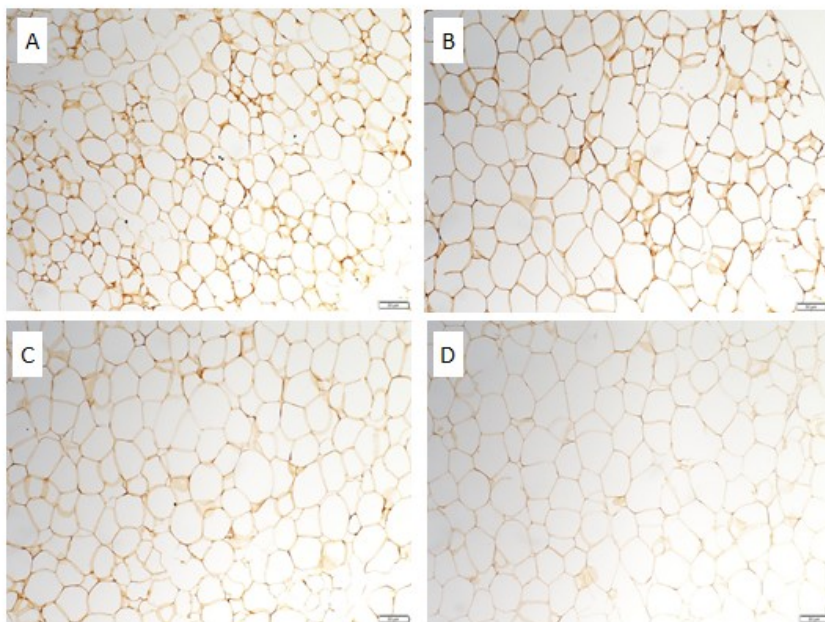
Obr. 5: Epididymální tukové depo barvené hematoxylinem a eozinem. AJ STD (A), AJ HF (B), B6 STD (C), B6 HF (D). Délka úsečky 50 μm , 20 x zvětšení.



Graf 10: Velikost adipocytů. Signifikantní rozdíly mezi skupiny AJ HF - B6 HF, AJ HF - B6 STD ($p < 0,05$; jednocestná ANOVA).

6.5. Imunohistochemické barvení ATGL

V řezech vzorků epididymálního tukového depa z experimentu 2 ze skupin myší AJ STD, AJ HF, B6 STD a B6 HF byla imunohistochemicky detekovaná ATGL. Hnědá barva slouží jako indikátor přítomnosti ATGL ve tkáni (Obr. 6). Imunohistochemická detekce neprokázala výraznou diverzifikaci množství proteinu mezi jednotlivými adipocyty, intenzita barvení je nicméně vyšší ve vzorcích z myší kmene AJ než B6 bez ohledu na dietu.



Obr. 6: Imunohistochemická detekce ATGL v epididymálním tukovém depu. AJ STD (A), AJ HF (B), B6 STD (C), B6 HF (D). Délka úsečky 50 µm, 20 x zvětšení.

7. Diskuze

Cílem této práce bylo definování vztahu mezi metabolizmem tukové tkáně a metabolickou flexibilitou. Myši model inbredních kmenů B6 a A/J, které se liší náchylností obezitě, byl vystaven krátkodobé zátěži dietou s vysokým obsahem tuků. V období 3 dnů po přechodu na dietu byla sledována celotělová homeostáza pomocí nepřímé kalorimetrie. Zároveň byl charakterizován metabolismus tukové tkáně a stanovena koncentrace lipidových metabolitů v plazmě.

7.1. Nepřímá kalorimetrie

Cílem experimentu 1 bylo charakterizovat celotělový metabolismus myších kmenů B6 a A/J metodou nepřímé kalorimetrie za různých teplot a dietních podmínek a zjistit vliv krátkodobé HFD na metabolickou flexibilitu. Samcům myších kmenů B6 a A/J byl do břišní dutiny v 5. týdnu po narození implantován telemetrický čip a poté byli dlouhodobě krmeni STD dietou a preaklimatizováni buď v laboratorní nebo v termoneutralní teplotě mezi 6 a 8 týdnem po narození. Následně byly myši v 9. týdnu po narození umístěny do systému nepřímé kalorimetrie, kde pak probíhal přechod na HFD po dobu 3 dnů.

7.1.1. Celotělová energetická homeostáza

V experimentu použité myši kmene B6 a A/J se liší náchylností k obezitě způsobené dietou s vysokým obsahem tuku. HFD u B6 myši způsobuje DIO a inzulinovou rezistenci (Alexander, Chang et al. 2006). AJ myši jsou rezistentní k obezitě způsobenou HFD (Wang and Liao 2012). První den po přechodu myši na HFD bylo pozorováno zvýšení EI, tedy hyperfágie, bez ohledu na teplotu měření. Hyperfágie je běžnou počáteční odpovědí zdravých myši na dietu s vysokým obsahem tuků (Mercer and Trayhurn 1987) (Oh, Thaler et al. 2010). Tělesná hmotnost u AJ myši na HFD se zvýšila u myši chovaných a měřených ve 22 °C, což by mohlo být důsledkem zvýšeného EI. Některé studie také ukazují, že se po přechodu na HFD zvyšuje i EE, což je interpretováno jako adaptace pro zamezení přibírání na váze (Kus, Prazak et al. 2008). My jsme však tento efekt pozorovali jen v případě myši kmene AJ, které bez ohledu na teplotu měření po přechodu na HF dietu zvyšovaly EE. Měření TAG v exkrementech ukázalo, že množství energie, které je touto formou vylučováno z těla, je mnohonásobně nižší v porovnání s úrovní EI a EE, a ukazuje na zanedbatelný vliv vyloučených TAG na energetickou homeostázu u všech skupin myši.

Celkově byly tělesná hmotnost, EI, EE a koncentrace TAG v exkrementech nižší u myši preaklimatizovaných a měřených ve 30 °C, v porovnání s těmi, které byly preaklimatizovány

a měřeny ve 22 °C. Teplota 30 °C představuje pro myši termoneutrální teplotu, což znamená, že do udržování tělesné teploty je zapojen jen bazální metabolismus (Fischer, Cannon et al. 2018). Teplota 22 °C je pod termoneutrální zónou (28-35 °C) a představuje pro myši chladový stres. V těchto podmínkách se zvyšují energetické nároky na udržování tělesné teploty a zapojuje se mechanismus netřesové termogeneze zajišťované funkcí UCP1 proteinu v hnědé tukové tkáni (Cannon and Nedergaard 2004). Celkově nižší oxidace lipidů a sacharidů, vypočtená z výstupů nepřímé kalorimetrie, u myši preaklimatizovaných a měřených ve 30 °C, odpovídá celkově nižšímu příjmu i výdeji energie.

7.1.2. Metabolická flexibilita

Ztráta cirkadiálního rytmu v hodnotách RQ u myši po přechodu na HFD je v souladu se studií autorů Longo a kol. (Longo, Charoenthongtrakul et al. 2010). Hodnoty RQ a rychlost přizpůsobení HFD byly přibližně stejné u myši měřených ve 22 i 30 °C, proto další experimenty probíhaly s použitím myši chovaných v laboratorní teplotě. Zároveň z těchto dat můžeme usuzovat, že v rychlosti, jakou se myši přizpůsobují HFD, nehraje roli aktivita BAT, která je u myši preaklimatizovaných po dobu 2 týdnů v termoneutrální teplotě velmi nízká. Pozorované nižší hodnoty RQ v cirkadiálním rytmu v průběhu denní fáze měření ukazují na zvýšenou oxidaci lipidů z tukových zásob a zvýšené hodnoty L_{ox} v denní fázi měření toto potvrzují. Vyšší hodnoty RQ v případě zachovaného cirkadiálního rytmu na STD dietě v průběhu noci ukazují spíše na *de novo* lipogenezi, než na oxidaci sacharidů, což potvrzuje pokles L_{ox} pod nulovou hodnotu zejména u AJ myši preaklimatizovaných a měřených ve 22 °C. Při porovnání skupin na HFD byly pozorované vyšší hodnoty RQ v průběhu noční fáze měření u AJ myši, což potvrzuje vyšší metabolickou flexibilitu tohoto kmene, pokud ji definujeme jako zachovanou schopnost přepínat mezi metabolickými substráty a tím měnit hodnotu RQ. Snížená metabolická flexibilita souvisí u myšního modelu se sníženou schopností lipolýzy a uvolňování FA do krve (Sparks, Ukropcova et al. 2009). Pokles metabolické flexibility u myši po krátkodobé konzumaci HFD byl již dříve pozorován (Galgani, Moro et al. 2008). Souhrnem je možné říci, že AJ, na rozdíl od B6 myši, vykazují vyšší metabolickou flexibilitu po přechodu na HFD.

7.2. Koncentrace lipidových metabolitů v plazmě

Cílem experimentů 2 a 3 bylo propojení celotělového metabolismu s aktivitou metabolických drah v tukové tkáni. Jelikož výstupy z nepřímé kalorimetrie, zejména metabolická flexibilita měřená na úrovni RQ, se nelišily u myši preaklimatizovaných a měřených v různých

teplotách, byly tyto experimenty provedeny již jen ve 22 °C. V experimentech byli použiti samci myších kmenů B6 a A/J v čase, kdy se výrazně lišila metabolická flexibilita mezi skupinami na HFD, tedy ve třetím dni po přechodu na HF dietu. V experimentu 2 byly porovnávány myši ve 3. dni po přechodu na STD nebo cHF dietu. Cílem bylo zjistit souvislost mezi schopností přizpůsobení HFD na úrovni RQ a plazmatickými parametry. V experimentu 3 byly porovnávány myši v průběhu 3. dne po přechodu na HFD. Cílem bylo zjistit souvislost cirkadiálního profilu RQ s cirkadiální změnou metabolitů v plazmě.

Zvýšené plazmatické hladiny NEFA a glycerolu by měly reflektovat proces lipolýzy z tukových zásob pro zajištění energetických potřeb organismu. Hladiny NEFA ani glycerolu v experimentu 2 se neliší mezi skupinami, s výjimkou rozdílu mezi AJ HF a B6 STD skupinou v hladině glycerolu. Nicméně v čase disekce, tedy mezi 8.-11. hodinou dopolední, se také neliší úroveň oxidace lipidů změřená pomocí nepřímé kalorimetrie. Plazmatické hladiny NEFA a glycerolu v experimentu 3 vykazují u AJ myši na HFD nárůst hladin v noci. Ztráta cirkadiálního rytmu v hladinách NEFA a glycerolu vlivem HFD je v souladu s literaturou (Dyar, Lutter et al. 2018), nicméně po dlouhodobé HFD dochází k úplné ztrátě cirkadiálních rytmů v hladinách NEFA. Vzhledem k tomu, že myši na STD dietě vykazují vyšší hladiny NEFA v denní fázi a nižší v noční fázi, je nárůst NEFA v noční fázi měření, zaznamenaný u AJ myši po 3 dnech na HFD, překvapivý (Dyar, Lutter et al. 2018). Celkově vyšší hladiny NEFA u AJ myši by pak mohly ukazovat na vyšší schopnost mobilizace FA z tukové tkáně. Zvýšení hladiny NEFA v noční fázi měření u AJ HF by také mohl být výsledkem funkce LPL, která uvolňuje FA z TAG v lipoproteinových částicích. Po uvolnění FA může dojít k „spill-over“ efektu, kdy FA nejsou efektivně vstřebané tkání a uniknou do krevního oběhu (A, C et al. 2019). Avšak úroveň genové exprese LPL v eWAT u skupiny AJ HF ve stejném časovém bodě to nepotvrzuje.

Hladiny TAG v plazmě pochází z lipoproteinových částic, což jsou buď VLDL, IDL a LDL částice nebo chylomikrony. TAG zvýšené u AJ myši na HFD v průběhu noci mohou buď pocházet z potravy (lipogeneze v enterocytech tenkého střeva) a nebo z FA uvolněných z tukové tkáně, které jsou v játrech vychytávány a dále uvolněny do krevního oběhu jako VLDL (Feingold and Grunfeld 2000), případně z FA, které jsou nově syntetizované v játrech (Hems, Rath et al. 1975). Vznik FA *de novo* je však vysoce nepravděpodobný, protože na úrovni nepřímé kalorimetrie byl pozorován jen u skupiny AJ STD. Naproti tomu nejvyšší koncentrace NEFA v krvi v 16. hodině odpovídá nejvyšší koncentraci TAG, je proto možné, že FA uvolněné z tukové tkáně jsou posléze detekovány ve formě TAG sekretovaných z jater.

Hladiny TAG u B6 myši na HFD jsou signifikantně nižší v porovnání s B6 na STD dietě. Tyto výsledky souhlasí s výsledky práce Duarte a kol., kteří uvádějí, že většina TAG pocházejících z jater u myši krmených HFD byly důsledkem reesterifikace FA z tukové tkáně nebo z potravy, nejsou důsledkem *de novo* lipogeneze (Duarte, Carvalho et al. 2014).

7.3. Metabolismus lipidů v tkáních

Ve vzorcích jater a epididymální tukové tkáně byla měřena exprese genů lipidového metabolismu. Vzorky byly odebrané v experimentech 2 a 3.

Co se týká příjmu FA z krevního oběhu do tukové tkáně, LPL v kapilárách tukové tkáně uvolňuje FA z TAG v lipoproteinových částicích a tím zajišťuje přísun FA adipocytům (Rinninger, Kaiser et al. 1998). Exprese LPL je u AJ bez ohledu na dietu vyšší než u B6 myši. Zároveň v průběhu noční fáze měření ve 20. hodině je signifikantně vyšší u AJ než u B6 myši na HFD. Jelikož procesy *de novo* lipogeneze v játrech a lipogeneze v enterocytech tenkého střeva probíhají hlavně v noci (Sun, Feng et al. 2011), zvýšené hladiny exprese LPL byly očekávané v této fázi měření. Náš výsledek na úrovni genové exprese LPL v experimentu 3 to nepotvrzuje - nárůst LPL v noční fázi měření nebyl pozorován. Navíc vrchol NEFA v plazmě v 16. hodině v noci neodpovídá vrcholu exprese LPL ve stejném čase, neodpovídá tedy efektu „spill-over“.

ACSL1 a DGAT2 se podílejí na esterifikaci FA na TAG (Yan, Yang et al. 2015) (Choi, Savage et al. 2007). mRNA pro oba geny je obecně vyšší u AJ v porovnání s B6 myšmi bez ohledu na dietu, navíc v noční fázi měření dochází ke zvýraznění tohoto rozdílu.

ATGL s aktivátorem CGI-58 a inhibítorem G0S2 se podílí na hydrolýze TAG v tukových kapénkách adipocytů (Lu, Yang et al. 2010). HSL s aktivátorem FABP4 se podílejí zejména na hydrolýze DAG, ale také i TAG v tukových kapénkách adipocytů (Smith, Sanders et al. 2008). Oba enzymy zajišťují lipolýzu, která by měla probíhat hlavně ve dne u myši pro zajištění energetických potřeb. Očekávali jsme tedy vyšší expresi těchto enzymů v denní fázi měření, kterou jsme nicméně nepozorovali. Vyšší hladiny exprese ATGL u AJ HF myši v porovnání s B6 HF korespondují s vyššími hladinami exprese CGI-58 a s nižšími hladinami exprese G0S2, na této úrovni je tedy možné říci, že lipolýza je vyšší u AJ myši. Exprese mRNA pro HSL je také vyšší u skupiny AJ HF, avšak v případě FABP4 signifikance mezi skupinami nebyla pozorována. Tento výsledek koresponduje s vyšší hladinou NEFA v krvi u AJ myši.

Ani příjem FA z krevního oběhu ani lipolýza a reesterifikace nejsou obecně detekovatelné na

úrovni nepřímé kalorimetrie, nicméně tyto výsledky naznačují vyšší flexibilitu v příjmu a výdeji FA z tukové tkáně, a tedy i vyšší flexibilitu v odpovědi na nutriční změny u myši kmene AJ v porovnání s B6.

Na úrovni nepřímé kalorimetrie bychom mohli pozorovat změny v *de novo* lipogenezi, které by se projeví poklesem hodnoty L_{ox} pod nulu. Tento pokles byl nicméně pozorován jen u AJ myši na STD dietě. S tím koresponduje měření genové exprese FAS a SCD1 v játrech, které se podílejí na syntéze FA, a tím i na *de novo* lipogenezi (Jensen-Urstad and Semenkovich 2012) (Ntambi, Miyazaki et al. 2002). Výsledek experimentu 2 ukazuje, že u skupin na STD dietě je signifikantně vyšší úroveň exprese genů FAS a SCD1 v játrech v porovnání se skupinami na HFD. Výsledek experimentu 3 v noční fázi měření koresponduje s výstupy z nepřímé kalorimetrie jen v případě FAS: AJ HF skupina je signifikantně vyšší v porovnání s B6 HF skupinou (signifikance v časovém bodě 24). Expresse genů FAS a SCD1 v játrech nevykazuje vrchol v noci v 16. hodině u skupiny AJ HF a nekoresponduje tedy s vrcholem TAG v plazmě ve stejném bodě, což vylučuje *de novo* lipogenezi jako zdroj detekovaných TAG v plazmě.

Porušení energetické rovnováhy může být příčinou nadměrného ukládání energie ve formě TAG do adipocytů, což způsobuje jejich zvětšení (hypertrofie) nebo zvýšení počtu (hyperplázie) (Parlee, Lentz et al. 2014). Proto velikost adipocytů odráží míru ukládání lipidů do tukových zásob. Největší adipocyty byly pozorovány u skupiny AJ HF. Pozorovali jsme vyšší metabolickou flexibilitu i vyšší flexibilitu tukové tkáně v příjmu a uvolňování lipidů, což by spolu mohlo souviset s velikostí adipocytů u kmene AJ.

Metabolickou aktivitu WAT jsme stanovovali pouze nepřímo pomocí měření genové exprese. Ta nám ale nemůže poskytnout informace o aktivitě daných metabolických drah *in vivo*, protože jednak syntéza jednotlivých enzymů podléhá posttranskripčním úpravám a dále je aktivita těchto enzymů regulována dalšími posttranslačními úpravami.

8. Závěr

U myších modelů inbredních kmenů B6 a A/J, které se liší náchylností k dietou indukované obezitě, jsme stanovovali vztah mezi metabolismem tukové tkáně a metabolickou flexibilitou.

1. Definovali jsme celotělový metabolismus myši metodou nepřímé kalorimetrie a stanovili jsme dobu, kdy se rozdílně přizpůsobuje jejich metabolismus po přechodu na HF dietu, tedy ve 3.dni měření. Zjistili jsme, že zachovaný cirkadiánní rytmus RQ u myši na STD dietě souvisí s vyšším příjmem a oxidací sacharidů z potravy v noci a vyšší oxidací lipidů z tukových zásob ve dne. Ztráta cirkadiánního rytmu u skupin myši na HF dietě, zejména v případě kmene B6, svědčí o ztrátě metabolické flexibility.

2. Zjistili jsme, že schopnost celého organismu přizpůsobit se HF dietě souvisí s pufrační kapacitou WAT. Pozorovali jsme celkově vyšší hladiny plazmatických parametrů NEFA a glycerolu u AJ kmene na HF dietě, což svědčí o vyšší schopnosti jejich tukové tkáně uvolňovat FA a pravděpodobně je pak reesterifikovat v játrech na TAG, jejichž hladina byla také zvýšena. Celkově vyšší hladiny mRNA genů pro lipolýzu a lipogenezi u kmene A/J potvrzují vyšší lipolytickou a reesterifikační aktivitu tukové tkáně u tohoto kmene.

3. Zjistili jsme, že cirkadiánní profil RQ a EE nesouvisí s cirkadiánní změnou metabolitů v plazmě a s metabolismem NEFA ve WAT. Pozorovali jsme neočekávaný nárůst plazmatických parametrů NEFA a glycerolu v noci.

Souhrnem lze říci, že jsme prokázali vyšší metabolickou flexibilitu myši kmene A/J v porovnání s B6, což by mohlo souviset s jejich nižší náchylností k dietou indukované obezitě. Zároveň jsme u myši kmene A/J prokázali vyšší úroveň lipolýzy jak na úrovni hladiny plazmatických parametrů, tak i na úrovni detekce genů v epididymální tukové tkáni. Fenotyp vyšší metabolické flexibility na úrovni celého organismu se tak u tohoto kmene vyskytuje společně s vyšší flexibilitou tukové tkáně, což spolu pravděpodobně souvisí.

9. Seznam použité literatury

A, I. S. S., A. B. C and J. S. A (2019). "Changes in Plasma Free Fatty Acids Associated with Type-2 Diabetes." Nutrients **11**(9).

Abreu-Vieira, G., C. Xiao, O. Gavrilova and M. L. Reitman (2015). "Integration of body temperature into the analysis of energy expenditure in the mouse." Mol Metab **4**(6): 461-470.

Alexander, J., G. Q. Chang, J. T. Dourmashkin and S. F. Leibowitz (2006). "Distinct phenotypes of obesity-prone AKR/J, DBA2J and C57BL/6J mice compared to control strains." Int J Obes (Lond) **30**(1): 50-59.

Arch, J. R. S., D. Hislop, S. J. Y. Wang and J. R. Speakman (2006). "Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals." International Journal of Obesity **30**(9): 1322-1331.

Aviram, R., G. Manella, N. Kopelman, A. Neufeld-Cohen, Z. Zwihaft, M. Elimelech, Y. Adamovich, M. Golik, C. Wang, X. Han and G. Asher (2016). "Lipidomics Analyses Reveal Temporal and Spatial Lipid Organization and Uncover Daily Oscillations in Intracellular Organelles." Mol Cell **62**(4): 636-648.

Barbatelli, G., I. Murano, L. Madsen, Q. Hao, M. Jimenez, K. Kristiansen, J. P. Giacobino, R. De Matteis and S. Cinti (2010). "The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(6): E1244-1253.

Berry, D. C., D. Stenesen, D. Zeve and J. M. Graff (2013). "The developmental origins of adipose tissue." Development **140**(19): 3939-3949.

Black, B. L., J. Croom, E. J. Eisen, A. E. Petro, C. L. Edwards and R. S. Surwit (1998). "Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice." Metabolism **47**(11): 1354-1359.

Bruss, M. D., C. F. Khambatta, M. A. Ruby, I. Aggarwal and M. K. Hellerstein (2010). "Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates." Am.J.Physiol Endocrinol.Metab **298**(1): E108-E116.

Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev. **84**(1): 277-359.

Cannon, B. and J. Nedergaard (2011). "Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies." J Exp Biol **214**(Pt 2): 242-253.

Cao, S. X., J. M. Dhahbi, P. L. Mote and S. R. Spindler (2001). "Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10630-10635.

Carriere, F., J. A. Barrowman, R. Verger and R. Laugier (1993). "Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans." Gastroenterology

105(3): 876-888.

Cinti, S. (2011). "Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation." Ann Med **43**(2): 104-115.

Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A. S. Greenberg and M. S. Obin (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." J Lipid Res. **46**(11): 2347-2355.

Coe, N. R. and D. A. Bernlohr (1998). "Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins." Biochim Biophys Acta **1391**(3): 287-306.

Coelho, M., T. Oliveira and R. Fernandes (2013). "Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ." Arch Med Sci **9**(2): 191-200.

Coleman, R. A., T. M. Lewin, C. G. Van Horn and M. R. Gonzalez-Baro (2002). "Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways?" J Nutr **132**(8): 2123-2126.

Connelly, P. W. (1999). "The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism." Clin Chim Acta **286**(1-2): 243-255.

Dreyer, C., H. Keller, A. Mahfoudi, V. Laudet, G. Krey and W. Wahli (1993). "Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)." Biol Cell **77**(1): 67-76.

Duarte, J. A., F. Carvalho, M. Pearson, J. D. Horton, J. D. Browning, J. G. Jones and S. C. Burgess (2014). "A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice." J Lipid Res **55**(12): 2541-2553.

Dyar, K. A., D. Lutter, A. Artati, N. J. Ceglia, Y. Liu, D. Armenta, M. Jastroch, S. Schneider, S. de Mateo, M. Cervantes, S. Abbondante, P. Tognini, R. Orozco-Solis, K. Kinouchi, C. Wang, R. Swerdloff, S. Nadeef, S. Masri, P. Magistretti, V. Orlando, E. Borrelli, N. H. Uhlénhaut, P. Baldi, J. Adamski, M. H. Tschop, K. Eckel-Mahan and P. Sassone-Corsi (2018). "Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks." Cell **174**(6): 1571-1585 e1511.

Ellis, J. M., L. O. Li, P. C. Wu, T. R. Koves, O. Ilkayeva, R. D. Stevens, S. M. Watkins, D. M. Muoio and R. A. Coleman (2010). "Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis." Cell Metab **12**(1): 53-64.

Even, P. C. and N. A. Nadkarni (2012). "Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives." Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol **303**(5): R459-R476.

Feingold, K. R. and C. Grunfeld (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce et al. South Dartmouth (MA).

Ferrannini, E. (1988). "The theoretical bases of indirect calorimetry: a review." Metabolism

37(3): 287-301.

Fischer, A. W., B. Cannon and J. Nedergaard (2018). "Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: An experimental study." Mol Metab 7: 161-170.

Flachs, P., R. Ruhl, M. Hensler, P. Janovska, P. Zouhar, V. Kus, J. Z. Macek, E. Papp, O. Kuda, M. Svobodova, M. Rossmeisl, G. Tsenov, V. Mohamed-Ali and J. Kopecky (2011). "Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids." Diabetologia 54(10): 2626-2638.

Furuhashi, M., S. Ishimura, H. Ota and T. Miura (2011). "Lipid chaperones and metabolic inflammation." Int J Inflam 2011: 642612.

Furuhashi, M., S. Saitoh, K. Shimamoto and T. Miura (2014). "Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases." Clinical Medicine Insights: Cardiology.

Galgani, J. E., C. Moro and E. Ravussin (2008). "Metabolic flexibility and insulin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab 295(5): E1009-1017.

Granneman, J. G. and H. P. Moore (2008). "Location, location: protein trafficking and lipolysis in adipocytes." Trends Endocrinol Metab 19(1): 3-9.

Haemmerle, G., A. Lass, R. Zimmermann, G. Gorkiewicz, C. Meyer, J. Rozman, G. Heldmaier, R. Maier, C. Theussl, S. Eder, D. Kratky, E. F. Wagner, M. Klingenspor, G. Hoefler and R. Zechner (2006). "Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase." Science 312(5774): 734-737.

Haemmerle, G., T. Moustafa, G. Woelkart, S. Buttner, A. Schmidt, T. van de Weijer, M. Hesselink, D. Jaeger, P. C. Kienesberger, K. Zierler, R. Schreiber, T. Eichmann, D. Kolb, P. Kotzbeck, M. Schweiger, M. Kumari, S. Eder, G. Schoiswohl, N. Wongsiriroj, N. M. Pollak, F. P. Radner, K. Preiss-Landl, T. Kolbe, T. Rulicke, B. Pieske, M. Trauner, A. Lass, R. Zimmermann, G. Hoefler, S. Cinti, E. E. Kershaw, P. Schrauwen, F. Madeo, B. Mayer and R. Zechner (2011). "ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1." Nat.Med. 17(9): 1076-1085.

Hall, J. A., L. D. Melendez and D. E. Jewell (2013). "Using Gross Energy Improves Metabolizable Energy Predictive Equations for Pet Foods Whereas Undigested Protein and Fiber Content Predict Stool Quality." Plos One 8(1).

Harada, K., W. J. Shen, S. Patel, V. Natu, J. Wang, J. Osuga, S. Ishibashi and F. B. Kraemer (2003). "Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice." Am J Physiol Endocrinol Metab 285(6): E1182-1195.

Hems, D. A., E. A. Rath and T. R. Verrinder (1975). "Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of normal and genetically obese (ob/ob) mice during the 24-hour cycle." Biochem J 150(2): 167-173.

Himms-Hagen, J. (1997). "On raising energy expenditure in ob/ob mice." Science **276**: 1132-1133.

Hue, L. and H. Taegtmeier (2009). "The Randle cycle revisited: a new head for an old hat." Am.J.Physiol Endocrinol.Metab **297**(3): E578-E591.

Chakravarthy, M. V., I. J. Lodhi, L. Yin, R. R. V. Malapaka, H. E. Xu, J. Turk and C. F. Semenkovich (2009). "Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR α in liver." Cell **138** 476-488.

Chen, H. C., S. J. Smith, Z. Ladha, D. R. Jensen, L. D. Ferreira, L. K. Pulawa, J. G. McGuire, R. E. Pitas, R. H. Eckel and R. V. Farese, Jr. (2002). "Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1." J Clin Invest **109**(8): 1049-1055.

Cheng, D., J. Iqbal, J. Devenny, C. H. Chu, L. Chen, J. Dong, R. Seethala, W. J. Keim, A. V. Azzara, R. M. Lawrence, M. A. Pellemounter and M. M. Hussain (2008). "Acylation of acylglycerols by acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). Functional importance of DGAT1 in the intestinal fat absorption." J Biol Chem **283**(44): 29802-29811.

Chirala, S. S., H. Chang, M. Matzuk, L. Abu-Elheiga, J. Mao, K. Mahon, M. Finegold and S. J. Wakil (2003). "Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6358-6363.

Chitraju, C., T. C. Walther and R. V. Farese, Jr. (2019). "The triglyceride synthesis enzymes DGAT1 and DGAT2 have distinct and overlapping functions in adipocytes." J Lipid Res **60**(6): 1112-1120.

Choe, S. S., J. Y. Huh, I. J. Hwang, J. I. Kim and J. B. Kim (2016). "Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders." Front Endocrinol (Lausanne) **7**: 30.

Choi, C. S., D. B. Savage, A. Kulkarni, X. X. Yu, Z. X. Liu, K. Morino, S. Kim, A. Distefano, V. T. Samuel, S. Neschen, D. Zhang, A. Wang, X. M. Zhang, M. Kahn, G. W. Cline, S. K. Pandey, J. G. Geisler, S. Bhanot, B. P. Monia and G. I. Shulman (2007). "Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance." J Biol Chem **282**(31): 22678-22688.

Choi, M. S., Y. J. Kim, E. Y. Kwon, J. Y. Ryoo, S. R. Kim and U. J. Jung (2015). "High-fat diet decreases energy expenditure and expression of genes controlling lipid metabolism, mitochondrial function and skeletal system development in the adipose tissue, along with increased expression of extracellular matrix remodelling- and inflammation-related genes." Br J Nutr **113**(6): 867-877.

Jensen-Urstad, A. P. and C. F. Semenkovich (2012). "Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?" Biochim Biophys Acta **1821**(5): 747-753.

Kaiyala, K. J., G. J. Morton, B. G. Leroux, K. Ogimoto, B. Wisse and M. W. Schwartz (2010). "Identification of body fat mass as a major determinant of metabolic rate in mice." Diabetes

59(7): 1657-1666.

Kaiyala, K. J. and M. W. Schwartz (2011). "Toward a more complete (and less controversial) understanding of energy expenditure and its role in obesity pathogenesis." Diabetes **60**(1): 17-23.

Kelley, D. E., B. Goodpaster, R. R. Wing and J. A. Simoneau (1999). "Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **277**(6): E1130-E1141.

Kelley, D. E. and L. J. Mandarino (2000). "Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination." Diabetes **49**(5): 677-683.

Kersten, S. (2001). "Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis4." EMBO Rep. **21**(41): 282-286.

Kraemer, F. B. and W. J. Shen (2002). "Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis." J Lipid Res **43**(10): 1585-1594.

Kraemer, F. B. and W. J. Shen (2006). "Hormone-sensitive lipase knockouts." Nutr Metab (Lond) **3**: 12.

Kus, V., T. Prazak, P. Brauner, M. Hensler, O. Kuda, P. Flachs, P. Janovska, D. Medrikova, M. Rossmeisl, Z. Jilkova, B. Stefl, E. Pastalkova, Z. Drahota, J. Houstek and J. Kopecky (2008). "Induction of muscle thermogenesis by high-fat diet in mice: association with obesity-resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(2): E356-367.

Lass, A., R. Zimmermann, G. Haemmerle, M. Riederer, G. Schoiswohl, M. Schweiger, P. Kienesberger, J. G. Strauss, G. Gorkiewicz and R. Zechner (2006). "Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome." Cell Metab **3**(5): 309-319.

Lass, A., R. Zimmermann, M. Oberer and R. Zechner (2011). "Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores." Prog Lipid Res **50**(1): 14-27.

Laurens, C., P. M. Badin, K. Louche, A. Mairal, G. Tavernier, A. Marette, A. Tremblay, S. J. Weisnagel, D. R. Joannise, D. Langin, V. Bourlier and C. Moro (2016). "G0/G1 Switch Gene 2 controls adipose triglyceride lipase activity and lipid metabolism in skeletal muscle." Mol Metab **5**(7): 527-537.

Leibel, R. L., M. Rosenbaum and J. Hirsch (1995). "Changes in energy expenditure resulting from altered body weight." N.Engl.J Med. **332**(10): 621-628.

Levine, J. A. (2005). "Measurement of energy expenditure." Public Health Nutr **8**(7A): 1123-1132.

Li, F. and H. Zhang (2019). "Lysosomal Acid Lipase in Lipid Metabolism and Beyond." Arterioscler Thromb Vasc Biol **39**(5): 850-856.

Longo, K. A., S. Charoenthongtrakul, D. J. Giuliana, E. K. Govek, T. McDonagh, P. S. Distefano and B. J. Geddes (2010). "The 24-hour respiratory quotient predicts energy intake and changes in body mass." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **298**(3): R747-754.

Lu, X., X. Yang and J. Liu (2010). "Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and G0S2." Cell Cycle **9**(14): 2719-2725.

Luo, L. and M. Liu (2016). "Adipose tissue in control of metabolism." J Endocrinol **231**(3): R77-R99.

Mashek, D. G., K. E. Bornfeldt, R. A. Coleman, J. Berger, D. A. Bernlohr, P. Black, C. C. DiRusso, S. A. Farber, W. Guo, N. Hashimoto, V. Khodiyar, F. A. Kuypers, L. J. Maltais, D. W. Nebert, A. Renieri, J. E. Schaffer, A. Stahl, P. A. Watkins, V. Vasiliou and T. T. Yamamoto (2004). "Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family." J Lipid Res **45**(10): 1958-1961.

Mashek, D. G., L. O. Li and R. A. Coleman (2007). "Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling." Future Lipidol **2**(4): 465-476.

Mercer, S. W. and P. Trayhurn (1987). "Effect of high fat diets on energy balance and thermogenesis in brown adipose tissue of lean and genetically obese ob/ob mice." J Nutr **117**(12): 2147-2153.

Miyazaki, M., A. Dobrzyn, P. M. Elias and J. M. Ntambi (2005). "Stearoyl-CoA desaturase-2 gene expression is required for lipid synthesis during early skin and liver development." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12501-12506.

Miyazaki, M., Y. C. Kim and J. M. Ntambi (2001). "A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis." J Lipid Res **42**(7): 1018-1024.

Morton, G. J., D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh and M. W. Schwartz (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." Nature **443**(7109): 289-295.

Mottillo, E. P., A. E. Bloch, T. Leff and J. G. Granneman (2012). "Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply." J Biol.Chem. **287**(30): 25038-25048.

Ntambi, J. M., M. Miyazaki, J. P. Stoehr, H. Lan, C. M. Kendziorski, B. S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J. M. Friedman and A. D. Attie (2002). "Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **99**(17): 11482-11486.

Oh, I. S., J. P. Thaler, K. Ogimoto, B. E. Wisse, G. J. Morton and M. W. Schwartz (2010). "Central administration of interleukin-4 exacerbates hypothalamic inflammation and weight gain during high-fat feeding." Am J Physiol Endocrinol Metab **299**(1): E47-53.

Owen, M. R., C. C. Corstorphine and V. A. Zammit (1997). "Overt and latent activities of diacylglycerol acyltransferase in rat liver microsomes: possible roles in very-low-density

lipoprotein triacylglycerol secretion." Biochem J **323** (Pt 1): 17-21.

Parlee, S. D., S. I. Lentz, H. Mori and O. A. MacDougald (2014). "Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue." Methods Enzymol **537**: 93-122.

Ravussin, Y., R. Gutman, C. A. LeDuc and R. L. Leibel (2013). "Estimating energy expenditure in mice using an energy balance technique." Int J Obes (Lond) **37**(3): 399-403.

Rinninger, F., T. Kaiser, W. A. Mann, N. Meyer, H. Greten and U. Beisiegel (1998). "Lipoprotein lipase mediates an increase in the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by hepatic cells in culture." J Lipid Res **39**(7): 1335-1348.

Roenneberg, T. and M. Merrow (2016). "The Circadian Clock and Human Health." Curr Biol **26**(10): R432-443.

Rosenbaum, M., R. Goldsmith, D. Bloomfield, A. Magnano, L. Weimer, S. Heymsfield, D. Gallagher, L. Mayer, E. Murphy and R. L. Leibel (2005). "Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight." J Clin Invest **115**(12): 3579-3586.

Rossmeisl, M., J. Pavlisova, P. Janovska, O. Kuda, K. Bardova, J. Hansikova, M. Svobodova, M. Oseeva, J. Veleba, J. Kopecky, Jr., P. Zacek, E. Fiserova, T. Pelikanova and J. Kopecky (2018). "Differential modulation of white adipose tissue endocannabinoid levels by n-3 fatty acids in obese mice and type 2 diabetic patients." Biochim Biophys Acta **1863**(7): 712-725.

Saponaro, C., M. Gaggini, F. Carli and A. Gastaldelli (2015). "The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis." Nutrients **7**(11): 9453-9474.

Semenkovich, C. F., T. Coleman and F. T. Fiedorek, Jr. (1995). "Human fatty acid synthase mRNA: tissue distribution, genetic mapping, and kinetics of decay after glucose deprivation." J Lipid Res **36**(7): 1507-1521.

Shi, Y. and D. Cheng (2009). "Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(1): E10-18.

Schadewaldt, P., B. Nowotny, K. Strassburger, J. Kotzka and M. Roden (2013). "Indirect calorimetry in humans: a postcalorimetric evaluation procedure for correction of metabolic monitor variability." Am J Clin Nutr **97**(4): 763-773.

Schutz, Y. (1995). "The basis of direct and indirect calorimetry and their potentials." Diabetes Metab Rev **11**(4): 383-408.

Simonson, D. C. and R. A. DeFronzo (1990). "Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems." Am J Physiol **258**(3 Pt 1): E399-412.

Singh, A. B., C. F. Kan, B. Dong and J. Liu (2016). "SREBP2 Activation Induces Hepatic Long-chain Acyl-CoA Synthetase 1 (ACSL1) Expression in Vivo and in Vitro through a

Sterol Regulatory Element (SRE) Motif of the ACSL1 C-promoter." J Biol Chem **291**(10): 5373-5384.

Smith, A. J., M. A. Sanders, B. E. Juhlmann, A. V. Hertzell and D. A. Bernlohr (2008). "Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP). Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain." J Biol Chem **283**(48): 33536-33543.

Sparks, L. M., B. Ukropcova, J. Smith, M. Pasarica, D. Hymel, H. Xie, G. A. Bray, J. M. Miles and S. R. Smith (2009). "Relation of adipose tissue to metabolic flexibility." Diabetes Res Clin Pract **83**(1): 32-43.

Stone, S. J., H. M. Myers, S. M. Watkins, B. E. Brown, K. R. Feingold, P. M. Elias and R. V. Farese, Jr. (2004). "Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice." J Biol Chem **279**(12): 11767-11776.

Storlien, L., N. D. Oakes and D. E. Kelley (2004). "Metabolic flexibility." Proc.Nutr.Soc. **63**(2): 363-368.

Sun, Z., D. Feng, L. J. Everett, A. Bugge and M. A. Lazar (2011). "Circadian epigenomic remodeling and hepatic lipogenesis: lessons from HDAC3." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **76**: 49-55.

Tracz-Gaszewska, Z. and P. Dobrzyn (2019). "Stearoyl-CoA Desaturase 1 as a Therapeutic Target for the Treatment of Cancer." Cancers (Basel) **11**(7).

Voet, D. and J. G. Voetova (1994). Biochemie2. Praha, Victoria Publishing.

Vuarin, P., M. Dammhahn, P. M. Kappeler and P. Y. Henry (2015). "When to initiate torpor use? Food availability times the transition to winter phenotype in a tropical heterotherm." Oecologia **179**(1): 43-53.

Wang, C. Y. and J. K. Liao (2012). "A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance." Methods Mol Biol **821**: 421-433.

Wang, H. and R. H. Eckel (2009). "Lipoprotein lipase: from gene to obesity." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(2): E271-288.

Wolfe, R. R., S. Klein, F. Carraro and J. M. Weber (1990). "Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise." Am.J.Physiol **258**(2 Pt 1): E382-E389.

Yan, S., X. F. Yang, H. L. Liu, N. Fu, Y. Ouyang and K. Qing (2015). "Long-chain acyl-CoA synthetase in fatty acid metabolism involved in liver and other diseases: an update." World J Gastroenterol **21**(12): 3492-3498.

Yeaman, S. J., G. M. Smith, C. A. Jepson, S. L. Wood and N. Emmison (1994). "The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism." Advan.Enzyme Regul. **34**: 355-370.

Yen, C. L., S. J. Stone, S. Koliwad, C. Harris and R. V. Farese, Jr. (2008). "Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis." J Lipid Res **49**(11): 2283-2301.

Zhang, F., G. Hao, M. Shao, K. Nham, Y. An, Q. Wang, Y. Zhu, C. M. Kusminski, G. Hassan, R. K. Gupta, Q. Zhai, X. Sun, P. E. Scherer and O. K. Oz (2018). "An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents." Cell Metab **27**(1): 252-262 e253.

Zimmermann, R., A. Lass, G. Haemmerle and R. Zechner (2009). "Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis." Biochim Biophys Acta **1791**(6): 494-500.

Zimmermann, R., J. G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter and R. Zechner (2004). "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase." Science **306**(5700): 1383-1386.