

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Kateřina Krsková

**Metabolismus tukové tkáně u myší s obezitou indukovanou dietou
s vysokým obsahem tuku: závislost na anatomické lokalizaci tkáně a složení
diety**

**The metabolism of an adipose tissue in mice with high-fat diet-induced
obesity: the role of anatomical localization of the tissue and diet
composition**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Ing. Petra Janovská, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, dne 2. 5. 2016

.....
Bc. Kateřina Krsková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Petře Janovské, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce a její laskavý přístup. Také děkuji RNDr. Pavlu Flachsovi, Ph.D. a Mgr. Kateřině Adamcové za jejich odbornou pomoc, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Dále chci poděkovat MUDr. Janu Kopeckému, DrSc. i všem ostatním členům Oddělení biologie tukové tkáně FGÚ AV ČR za poskytnutou pomoc a přátelské prostředí v laboratoři. V neposlední řadě děkuji i své rodině a přátelům za poskytnutí podpory během mého studia i vypracovávání této práce, zejména Alče, Annie a Barče.

Abstrakt

Regulace toku mastných kyselin (MK) pomocí prázdného cyklování (TG/MK cyklus) v bílé tukové tkáni (BTK) je důležitým mechanismem regulace metabolismu MK, jehož ovlivnění je v zájmu výzkumu jako možný terapeutický cíl při léčbě obezity a inzulínové rezistence. Na myším modelu zvýšený příjem *n*-3 polynenasycených mastných kyselin (PUFA) v potravě v kombinaci s mírnou kalorickou restrikcí (KR) pravděpodobně indukuje TG/MK cyklus hlavně v epididymálním tukovém depu. Kombinace *n*-3 PUFA a KR rovněž přispívá k potlačení zánětu v BTK a snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Na myším modelu C57BL/6 jsme se zaměřili na sledování exprese genů kódujících klíčové enzymy TG/MK cyklu (PEPCK, ATGL, HSL, DGAT1 a DGAT2) v dorzolumbálním (DL), gonadálním (GON) a mezenterickém (MEZ) tuku pomocí qPCR. Zajímá nás vliv složení tuků v dietě, podávání *n*-3 PUFA, případně v kombinaci s 10% KR, na expresi těchto genů a rozdíl genové exprese mezi depy BTK. Výsledky práce naznačují, že suplementace diety *n*-3 PUFA přispívá k poklesu exprese genu pro DGAT2 a kombinace *n*-3 PUFA s KR zvyšuje expresi genů ovlivňujících TG/MK cyklus. V MEZ na rozdíl od GON a DL nebyly v expresi genů významné rozdíly, zatímco různé složení tuků v dietě ovlivňovalo expresi sledovaných genů.

Klíčová slova: prázdný metabolický cyklus, tuková tkáň, reesterifikace, *n*-3 polynenasycené mastné kyseliny

Abstract

Regulation of the flow of fatty acids (FA) by futile cycle (TAG/FA cycle) in white adipose tissue (WAT) is an important mechanism of controlling metabolism of FA and therefore its regulation is in the interest of research as a possible therapeutic target in the treatment of obesity and insulin resistance. The study of the murine model suggests that the treatment of the *n*-3 PUFA with mild caloric restriction (CR) probably induces the TAG/FA cycle mainly in epididymal depot. It also reduces inflammation in WAT and the risk of cardiovascular diseases. We focused on monitoring the gene expression encoding key enzymes of the TAG/FA cycle (PEPCK, ATGL, HSL, DGAT1 and DGAT2) in dorzolumbar (DL), gonadal (GON) and mesenteric (MEZ) depot in a murine model C57BL/6 using qPCR. We were interested in the influence of the composition of fats in the diet, the influence of administration of *n*-3 PUFA with combination of 10% CR and the difference of gene expression among depots of WAT. The results indicate that the

supplementation of high-fat diet with *n*-3 PUFA contributes mainly to reduction of gene expression for DGAT2 and the combination of *n*-3 PUFA and CR increases expression of genes influencing the TAG/FA cycle. In MEZ unlike GON and DL fat depot were no significant differences in gene expression, while the different composition of fats in the diet had an influence on the expression of monitored genes.

Key words: futile metabolic cycle, re-esterification, adipose tissue, *n*-3 polyunsaturated fatty acids

OBSAH

Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod	10
2. Literární přehled	12
2.1. Tuková tkáň	12
2.2. Bílá tuková tkáň – charakteristika s ohledem na rozdílnou anatomickou lokalizaci	14
2.2.1. Lokalizace	14
2.2.2. Fyziologie a patofyziologie bílé tukové tkáně	15
2.3. Metabolismus bílé tukové tkáně	19
2.3.1. Lipolýza triacylglycerolů v bílé tukové tkáni	19
2.3.2. Lipogeneze	22
2.3.3. Cyklus lipolýzy/reesterifikace v bílé tukové tkáni	27
2.4. Ovlivnění metabolismu bílé tukové tkáně	29
2.4.1. Vliv složení mastných kyselin v dietě	29
2.4.2. Polynenasycené mastné kyseliny řady <i>n-3</i>	31
2.4.3. Kalorická restrikce	34
3. Cíle	37
4. Materiál a metody	38
4.1. Pokusná zvířata a experimentální podmínky	38
4.2. Přehled experimentů	38
4.2.1. Experiment č. 1	38
4.2.2. Experiment č. 2	40
4.2.3. Experiment č. 3	44
4.3. Izolace RNA	47
4.3.1. Homogenizace	47
4.3.2. Separace fází	47
4.3.3. Precipitace RNA	47
4.3.4. Promývání RNA	47
4.3.5. Rozpuštění a stanovení koncentrace RNA	48
4.4. Reverzní transkripce	48
4.5. Kvantitativní PCR (qPCR)	49
4.5.1. Vyhodnocení množství transkriptu	51
4.6. Materiál	53
4.6.1. Přístroje	53

4.6.2. Chemikálie	53
4.7. Statistické vyhodnocení	54
5. Výsledky	55
5.1. Experiment č. 1	55
5.1.1. Vývoj hmotnosti a váha tukových dep	55
5.1.2. Genová exprese	57
5.2. Experiment č. 2	64
5.2.1. Vývoj hmotnosti a váha tukových dep	64
5.2.2. Genová exprese	66
5.3. Experiment č. 3	73
5.3.1. Vývoj hmotnosti a váha tukových dep	73
5.3.2. Genová exprese	75
6. Diskuze.....	82
7. Závěr	88
8. Použitá literatura	89

Seznam použitých zkratk

β -AR	β -adrenergní receptory
AA	kyselina arachidonová
AC	adenylát cykláza
ACC1	acetyl koenzym A karboxyláza
ACP	přenašeč acylových skupin
AMPK	AMP aktivovaná protein kináza
ATGL	triacylglycerolová lipáza
ATP	adenosin trifosfát
BMI	index tělesné hmotnosti
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CHF	dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje
CHFc	dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje s přidavkem kaseinu
CPT1	karnitin palmitoyltransferáza I
CRP	C-reaktivní protein
DAP	dihydroxyacetonfosfát
DG	diacylglyceroly
DGAT1	acyl-CoA:diacylglycerolacyltransferáza 1
DGAT2	acyl-CoA:diacylglycerolacyltransferáza 2
DGLA	kyselina dihomogamma-linolenová
DHA	kyselina dokosaheptaenová
EPA	kyselina eikosapentaenová
EPAX	rybí olej 1050 TG
FABP4	mastné kyseliny vázající protein 4
FAS	komplex syntázy mastných kyselin
FAT/CD36	translokáza mastných kyselin CD36
G3P	glycerol-3-fosfát
GLA	kyselina γ -linolová
GLUT4	glukózový přenašeč 4
GPAT	glycerol-3-fosfátacyltransferáza
HSD	dieta s vysokým obsahem tuku na bázi vepřového sádla
HSL	hormon-senzitivní lipáza
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
K	kril
KR	kalorická restrikce
LA	kyselina linolová
LPL	lipoproteinlipáza
MCP-1	monocytární chemoatraktivní protein 1
MG	monoacylglyceroly
MGAT	acyl-CoA:monoacylglycerolacyltransferáza
MGL	monoacylglycerolová lipáza
MK	mastné kyseliny
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
<i>n</i> -3 PUFA	polynenasycené mastné kyseliny řady <i>n</i> -3
<i>n</i> -6 PUFA	polynenasycené mastné kyseliny řady <i>n</i> -6
NAD	nikotinamidadeninukleotid oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadeninukleotid redukovaná forma

NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaná forma
NRF1	jaderný respirační faktor 1
PDE3B	fosfodiesteráza 3B
PDK	fosfoinositid dependentní kináza
PDK4	pyruvát dehydrogenáza kináza 4
PEPCK	fosfoenolpyruvát karboxykináza
PGC-1 α	transkripční faktor peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	fosfatidylinositol 3-kinázový komplex
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bifosfát
PIP ₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PKA	protein kináza A
PKB	protein kináza B
PLIN1	perilipin 1
PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxizomů
qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RBP4	retinol vázající protein 4
SCD1	desaturáza mastných kyselin 1
SIRT1	histon deacetyláza SIRT1
SREBP1c	transkripční faktor sterol regulatory element-binding protein 1
ST	standartní dieta s nízkým obsahem tuku
TG	triacylglyceroly
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α
TZD	thiazolidindiony
UCP1	odpřahovací protein 1

1. Úvod

Přestože na světě stále existují místa, kde lidé trpí nedostatkem potravy, zejména oblasti Asie a Afriky, následky nadváhy a obezity jsou v současnosti paradoxně spojeny s vyšším počtem úmrtí než podvýživa. Obezita patří k celosvětově nejrozšířenějšímu metabolickému onemocnění a Česká republika se bohužel řadí mezi státy s nejvyšší prevalencí obezity a nadváhy v Evropě. Obezita je spojena s častějším výskytem metabolických, kardiovaskulárních a nádorových onemocnění. Rovněž bývá často provázána výskytem dalších chorob jako hypertenze, dyslipidémie, inzulinová rezistence a diabetes mellitus 2. typu, které bývají souhrně označovány jako metabolický syndrom. Nadměrná hmotnost rovněž přispívá k častějším onemocněním pohybového aparátu a v potaz je nutno brát i psychické a socioekonomické následky spojené s horší integrací obézního jedince do společnosti.

Obezita je charakterizována nadměrnou akumulací tukové tkáně a hodnotou indexu tělesné hmotnosti (BMI, z anglického body mass index) $BMI > 30$. Rozlišují se dva základní typy obezity podle charakteru distribuce tuku. Viscerální (útrobní) obezita je spojena s nadměrnou akumulací tuku v oblasti břicha a hrudníku a je spojena s vysokým rizikem rozvoje metabolických a kardiovaskulárních onemocnění. Tento typ obezity bývá někdy označován jako androidní, jelikož bývá častěji přítomný u mužů. Naopak povrchová akumulace tukové tkáně, zejména v oblasti stehen a hýždí, nebývá spojena s tak častým rizikem vzniku metabolických komplikací. Tento typ obezity je více zastoupen u žen, a proto bývá označován jako typ gynoidní. Léčba obezity a metabolického syndromu v současné době spočívá v komplexním přístupu – v první řadě v dietní a pohybové intervenci, případně psychoterapii. Tato režimová opatření ale v léčbě obezity a metabolického syndromu většinou vykazují jen velmi malý efekt. Další možností léčby je využití bariatrické chirurgie, která sice dnes již dosahuje špičkové úrovně, ale stále se jedná o invazivní zákrok, nesoucí svá rizika. Navíc i tato léčba vyžaduje spolupráci pacienta a dodržování režimových opatření a nehodí se proto pro všechny pacienty. Poslední možností v přístupu k léčbě obezity a metabolického syndromu je farmakologická terapie. V minulosti bylo na trh uvedeno několik preparátů, které sice vykazovaly efekt na redukci hmotnosti, ale většina z nich byla posléze zakázána, kvůli závažným vedlejším účinkům. V současnosti mezi legálně dostupná antiobezitika patří pouze přípravky, které ovlivňují aktivitu střevních lipáz a tím omezují absorpci dietně přijatých tuků.

Dietní intervence patří mezi důležitou součást léčebné strategie obézních pacientů a pacientů s metabolickým syndromem. Mezi složky, které příznivě ovlivňují metabolismus, patří také *n*-3 polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), zejména pak eikosapentaenová (EPA) a dokosaheptaenová (DHA) kyselina. Hlavním zdrojem EPA a DHA je mořský fytoplankton a mořští živočichové, zejména pak paradoxně tučné ryby.

Výzkumem vlivu *n*-3 PUFA na metabolismus ve spojení s obezitou a inzulínovou rezistencí se zabývá i naše laboratoř. Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na schopnost *n*-3 PUFA modulovat expresi genů zapojených do metabolismu bílé tukové tkáně na modelu myši.

2. Literární přehled

2.1. Tuková tkáň

Tuková tkáň je tvořena buňkami zvanými adipocyty, které vykazují schopnost skladovat ve svých vakuolách lipidy. Kromě adipocytů tuková tkáň obsahuje i další buňky označované jako stromální vaskulární frakce zahrnující preadipocyty, endoteliální buňky, fibroblasty a buňky imunitního systému. U savců je možné rozlišit dva základní typy tukové tkáně – bílou a hnědou, které se navzájem liší rozdílnou lokalizací, morfologií a funkcí (Giordano et al., 2014). Jejich vzájemný podíl v organismu se v průběhu života může značně měnit a je ovlivněn zejména věkem, stravou a teplotou prostředí, ve kterém živočich žije.

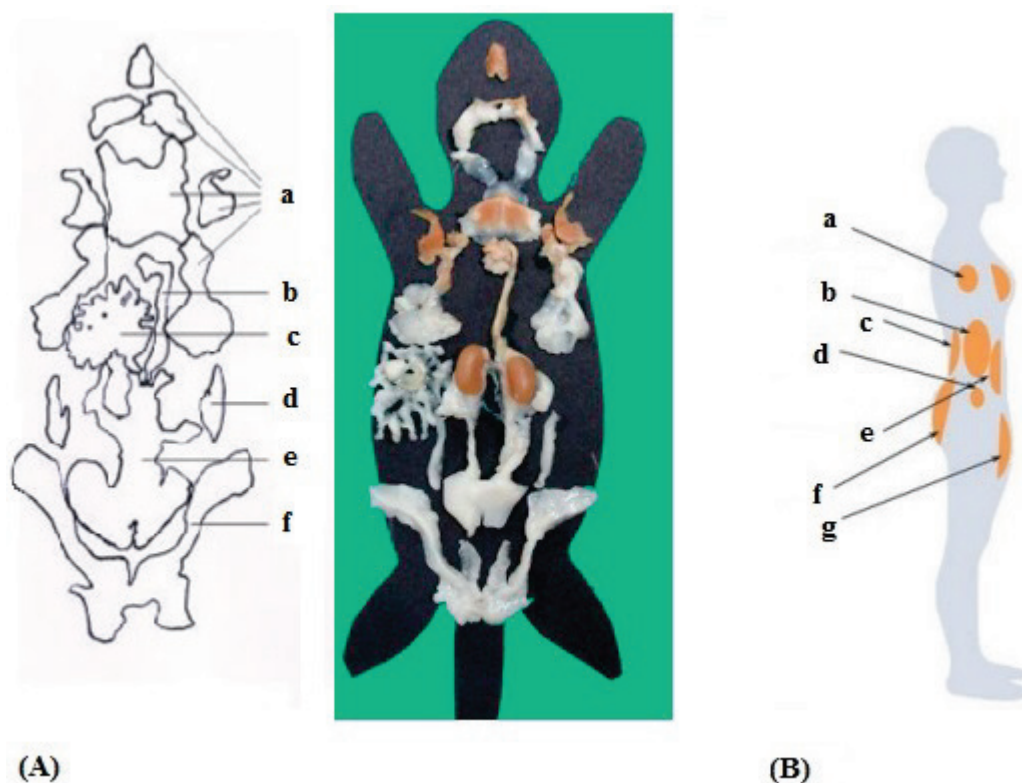
Funkce bílé tukové tkáně spočívá ve schopnosti akumulovat nadbytek přijaté energie ve formě triacylglycerolů, které slouží jako zdroj energie pro období nedostatku potravy. Hnědá tuková tkáň naopak umožňuje uvolňovat energii tvorbou tepla v průběhu netřesové termogeneze a chrání tak organismus před hypotermií. Rozdílná funkce jednotlivých typů tukové tkáně je spojena i s rozdílnou morfologií adipocytů. Adipocyty bílého tuku slouží především jako zásobárna energie. Obsahují jednu velkou lipidovou kapénku zabírající zhruba 90 % objemu buňky, podle které jsou nazývány jako unilokulární. Jádro je v nich stlačeno k periferii a cytoplazma tvoří úzký proužek. Organely jsou redukovány, mitochondrie jsou malé a v nízkém počtu. Hnědé adipocyty jsou ve srovnání s bílými menší a nazývají se multilokulární, protože jejich cytoplazma obsahuje více malých lipidových kapének a také velké množství mitochondrií obsahujících odpráhovací protein 1 (UCP1), který umožňuje zkratovat protonový gradient, který vzniká v dýchacím řetězci při čerpání protonů do mezimembránového prostoru mitochondrií. Odpřažením oxidativní fosforylace pomocí UCP1 tak nedojde k tvorbě ATP, ale energie je uvolněna ve formě tepla. Takto je zajištěna termogenní funkce hnědé tukové tkáně (Vitali et al., 2012). Tuková tkáň navíc vykazuje velkou míru plasticity ve své morfologii a fyziologii, jelikož adipocyty se za určitých okolností dokáží reverzibilně diferencovat v jiné. Např. pokusy s chladovou adaptací ukázaly, že myši vystavené chronickému chladu dokáží v bílé tukové tkáni indukovat tvorbu multilokulárních adipocytů obsahujících UCP1 a diferencovat se v tzv. „běžový“ tuk. Tento proces bývá označován jako hnědnutí bílé tukové tkáně (Murano et al., 2009; Wu et al.,

2012). V poslední době se do oblasti zájmu dostává i podkožní bílá tuková tkáň samic, která se během těhotenství a laktace dokáže morfologicky i funkčně transdiferencovat za účelem tvorby mateřského mléka. Vzhledem k tomu, že tato tkáň je růžová, ale morfologicky se liší od hnědých či „béžových“ buněk, je navrhováno prof. Cinti zavést třetí typ tukové tkáně – růžová („pink“) (Giordano et al., 2014; Morroni et al., 2004). Různé strukturální a funkční rozdíly jsou patrné nejen mezi typy tukové tkáně, ale rovněž i mezi jednotlivými depy samotného bílého tuku.

2.2. Bílá tuková tkáň – charakteristika s ohledem na rozdílnou anatomickou lokalizaci

2.2.1. Lokalizace

Rozdílná tělesná distribuce bílé tukové tkáně je závislá na mnoha faktorech, jakými mohou být: věk, pohlaví, genotyp, etnická příslušnost, hormonální aktivita, dieta či fyzická aktivita (Kyle et al., 2001; Wu et al., 2007, 2001). Bílou tukovou tkáň lze rozlišit na dva hlavní typy: tuk viscerální (útrobní) obklopující vnitřní orgány a tuk subkutánní (podkožní) uložený v podkoží (Obr. 1).



Obr. 1: Srovnání anatomie tukové tkáně u myši (A) a člověka (B).

(A) Vypreparovaná podkožní a viscerální tuková depa samice myši kmene Sv129 chované v termoneutrální teplotě 28 °C. Tuková depa umístěná na šabloně zachovávají původní anatomickou pozici. Subkutánní depa: a – dorzální subkutánní (hluboké cervikální, povrchové cervikální, interskapulární, subskapulární, axilo-thorakální), f – ventrální subkutánní depo (dorzolumbální, inguinální, gluteální); viscerálních depa: b – mediastinální, c – mezenterické, d – retroperitoneální, e – abdomino-pelvikální. Převzato a upraveno z (Vitali et al., 2012).

(B) Viscerální tuková depa: a – epikardiální, b – mezenterické a omentální, c – retroperitoneální, d – gonadální; subkutánní tuková depa: e – subkutánní abdominální, f – gluteální, g – femorální. Převzato a upraveno z (Wronska and Kmiec, 2012).

Viscerální tuková depa obklopují vnitřní orgány v oblasti dutiny břišní a mediastina. Podle lokalizace se viscerální tuk rozděluje na: i) omentální obklopující střevo povrchově, ii) mezenterický uložený kolem střev v hloubce, iii) retroperitoneální obklopující ledviny na jejich dorzální straně a iv) gonadální uložený kolem pohlavních orgánů (Obr. 1). Gonadální tuk představuje u hlodavců jedno z největších viscerálních tukových dep. U samců je uložen v oblasti varlat (epididymální) a u samic se nachází kolem vaječníků (periovariální). U myší množství gonadálního tuku přibývá jak s věkem, tak u zvířat krmených dietou s vysokým obsahem tuku (Medrikova et al., 2012). U člověka je gonadální tuk vyvinutý jen velmi málo, zato je velmi dobře vyvinuté depo mezenterické a omentální. Zvláště omentální tuk bývá u lidí často využíván k výzkumným účelům pro svůj relativně dobrý chirurgický přístup (Wronska and Kmiec, 2012). Malé množství viscerálního tuku bývá uloženo rovněž v mediastinu (intrathorakální a parakardiální), kolem srdce (epikardiální), žaludku (epigastrický) a kolem cév (perivaskulární) (Iozzo, 2011). Pokud množství přijaté energie překročí akumulační schopnosti adipocytů, začne se tuk ukládat ektopicky i v orgánech, které k tomuto účelu nejsou uzpůsobené, jako jsou: játra, srdce, kosterní sval, pankreas a vnitřní stěna cév (Gallagher et al., 2009; Heilbronn et al., 2004; Perseghin et al., 2003; Tushuizen et al., 2007). Následně může dojít k poškození těchto tkání jak samotným mechanickým tlakem tukové tkáně, tak narušením nebo změnou její sekreční aktivity.

Subkutánní tuková tkáň je uložena na povrchu těla v podkožní vrstvě. U hlodavců lze na dorzální straně těla rozlišit tuk uložený v oblasti krční (cervikální), mezi lopatkami (interskapulární), pod lopatkou (subskapulární) a v oblasti hrudníku (thorakální). Na ventrální straně těla lze rozlišit tukové depo na přechodu hrudní a bederní páteře (dorzolumbální), v oblasti třísel (inguinální) a v oblasti hýždí (gluteální) (Obr. 1). U člověka se nejvíce akumuluje subkutánní tuk v oblasti boků a stehen (gluteofemorální) a v oblasti břicha (abdominální). Subkutánní tukové depo v abdominální oblasti lze podle uložení vůči *fascii superficialis* dále rozlišit na povrchově a hluboko uložené (Smith et al., 2001).

2.2.2. Fyziologie a patofyziologie bílé tukové tkáně

Bílá tuková tkáň v organismu zastává mnoho důležitých funkcí, na kterých se jednotlivá tuková depa podílí různou měrou. Základní funkcí bílé tukové tkáně je skladovat a uvolňovat energii v závislosti na aktuálních potřebách organismu. Energie je skladována ve formě zásobních triacylglycerolů (TG), které jsou v případě potřeby metabolizovány za uvolnění glycerolu a mastných kyselin (MK). Subkutánní tuková tkáň dokáže, na rozdíl od viscerální,

téměř neomezeně expandovat, jelikož není limitována rozměry útrobních prostor a je tak specializovaná na dlouhodobé ukládání tuků (Bjørndal et al., 2011). Depa subkutánní tukové tkáně hrají úlohu i v mechanické ochraně a vykazují schopnost růstu jako odpověď na mechanický stres, což je dobře patrné např. na tuku uloženém kolem kloubů, dlaní a chodidel (Knippenberg et al., 2005). Subkutánní tuk navíc slouží i jako tepelná izolace bránící nadměrným ztrátám tepla.

Viscerální tuková tkáň se od subkutánní značně liší v několika oblastech. Mezi jednotlivými tukovými depy byly zaznamenány odlišnosti v genové expresi jak u lidí (Vidal, 2001; Vohl et al., 2004) tak i u myší (Gesta et al., 2006). Rozdíl genové exprese mezi tukovými depy (subkutánní vs. intra-abdominální) u lidí pravděpodobně závisí na míře citlivosti k inzulinu jednotlivých dep. Mnoho genů vykazujících změny v expresi úzce koreluje se stupněm obezity a rozložením jednotlivých tukových dep (Gesta et al., 2006). Na experimentálním modelu potkanů Wistar byla porovnávána exprese genů mezi viscerálním (retrioperitoneální a mezenterický) a subkutánním (inguinální) tukovým depem. Exprese genů zahrnutých do lipogeneze (Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR γ 2), sterol regulatory element binding protein (SREBP1c), acetyl-koenzym A-karboxyláza 1 (ACC1), glycerol-3-fosfátacyltransferáza (GPAT), lipoproteinlipáza (LPL), fatty acid translocase CD36, glukózový přenašeč 4 (GLUT4)) byla zvýšena v retrioperitoneálním depu v porovnání s mezenterickým a inguinálním depem, kde exprese genů pro PPAR γ 2, ACC1, CD36 a GLUT4 byly v mezenterickém depu vyšší ve srovnání s depem inguinálním. Exprese genu hexokinázy II (glukózový metabolismus) byla vyšší v obou depech viscerálního typu ve srovnání s inguinálním tukovým depem. Exprese lipolytických genů (triacylglycerolové lipázy (ATGL); hormon-senzitivní lipázy (HSL)) byla vyšší v retrioperitoneálním tuku v porovnání s mezenterickým a inguinálním tukem zatímco exprese genů zahrnutých v oxidaci mastných kyselin (PPAR α , karnitinpalmitoyltransferáza 1 (CPT1)) byla nižší v retrioperitoneálním tuku v porovnání s mezenterickým a inguinálním tukem. Vyšší genová exprese pro lipogenezi a lipolytickou dráhu a nižší exprese genů pro oxidaci mastných kyselin v depech viscerálního tuku ukazuje na rozdílnost funkcí tukových dep u tohoto modelu (Palou, 2009).

Viscerální tuk také ve srovnání se subkutánním obsahuje větší množství buněk na jednotku hmotnosti, je více prokrvený a obsahuje větší množství glukokortikoidních receptorů (Björntorp, 1996). Některé studie dokonce vyslovují domněnku, že viscerální obezita by

mohla být adaptace organismu na stres (Drapeau et al., 2003). Mnoho studií potvrzuje, že nadměrná akumulace abdominálního tuku se pojí s rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění, hypertenze a inzulínové rezistence (Carey et al., 1996; Catalano et al., 2010; Chiba et al., 2007; Hayashi et al., 2003; Kanai et al., 1990). Zatímco u myši tvoří největší viscerální tukové depo tuk gonadální, u lidí je toto tukové depo vyvinuté jen minimálně. Zásadní rozdíl mezi různými depy viscerální tukové tkáně spočívá v jejich napojení na portální či systémový oběh. Mezenterické a omentální tukové depo je napojeno na portální oběh (Björntorp, 1990) a krev obsahující velké množství mastných kyselin a adipokinů vyloučených z útrobní tukové tkáně je tak odváděna přímo do jater. Játra jsou tak u obezních jedinců vystavena velkému množství vyplavených mastných kyselin a zánětlivých cytokinů a tento stav může vyústit v ektopické ukládání tuku v jaterní tkáni a s tím spojenou inzulínovou rezistenci (Bergman and Ader, 2000; Björntorp, 1990). Zatímco ostatní viscerální depa včetně gonadálního tuku jsou napojena na systémový oběh a pro rozvoj metabolických onemocnění nepředstavují tak velké riziko jako tuk mezenterický a omentální.

Bílá tuková tkáň dále slouží jako významný endokrinní orgán. Vylučuje značné množství cytokinů (adipokinů) s parakrinním ale i endokrinním účinkem, které v organismu regulují metabolické dráhy a řídí zánětlivé a imunitní procesy. Adipokiny hrají významnou roli ve zprostředkování imunitní reakce. Řada z nich vykazuje prozánětlivý charakter jako např. leptin (Loffreda et al., 1998), faktor nádorové nekrózy α (TNF- α) (Winkler et al., 2003), interleukin 6 (IL-6) (Maachi et al., 2004), rezistin (Fain et al., 2003; McTernan, 2002), retinol binding protein 4 (RBP4) (Moraes-Vieira et al., 2014) nebo lipocalin 2 (Auguet et al., 2011). Některé adipokiny, jako např. adiponektin a secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5), naopak vykazují protizánětlivý účinek (Kern et al., 2003; Ouchi, 2003). Pokud dojde k nerovnováze mezi sekrecí pro- a protizánětlivých faktorů, což bývá stav charakteristický pro obezitu, dochází k rozvoji mírného chronického zánětu, který je spojen s rozvojem inzulínové rezistence (Bastard, 2002) a aterosklerózou (Cho et al., 2011; Mihai et al., 2014). Za patologických stavů jako je obezita, ale např. i HIV infekce, se zvláště viscerální tuková tkáň účastní imunitní odpovědi a vylučuje velké množství prozánětlivých cytokinů jako monocytární chemoatraktivní protein 1 (MCP-1), TNF- α , IL-6, IL-1, leptin a rezistin (Harman-Boehm et al., 2007; Kanda et al., 2006) a následně dochází ke zvýšené infiltraci tukové tkáně makrofágy a lymfocyty (Kintscher et al., 2008; Lumeng et al., 2007; Weisberg et al., 2003). Příčinou zvýšeného průniku makrofágů do tukové tkáně je zřejmě reakce na

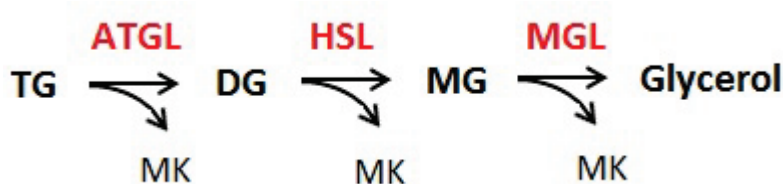
hypertofii adipocytů, které ve zvýšené míře podléhají nekróze (Jo et al., 2010). Makrofágy odstraňující zbytky mrtvých adipocytů se kolem nich hromadí a vytváří charakteristické histologické struktury označované jako „crown like structures“ (Cinti et al., 2005). Přítomnost těchto struktur je u myši s geneticky indukovanou obezitou daleko vyšší ve viscerálním tukovém depu ve srovnání se subkutánním (Murano et al., 2008). Makrofágy však nevykazují pouze prozánětlivý efekt. V současné době jsou na základě *in vitro* pokusů definované dvě formy makrofágů (M1-sekretující prozánětlivé cytokiny a M2-sekretující protizánětlivé cytokiny), ale jejich polarizace je v prostředí *in vivo* mnohem dynamičtější a mění se na základě změny lokálního prostředí. Dietou indukovaná obezita vede ke změně fenotypu makrofágů z nezánnětlivého M2 stavu (u hubených zvířat) na zánnětlivý M1 stav (obézní zvířata) (Lumeng et al., 2007). Chronický zánnět bílé tukové tkáně je navíc spojen s remodelací extracelulární matrix, kdy narůstá podíl kolagenu VI a ubývá množství elastinu vedoucího ke ztrátě elasticity extracelulárního prostředí buňky (Pasarica et al., 2009; Spencer et al., 2011). Při expanzi adipocytů dochází také ke změnám ve vaskularizaci bílé tukové tkáně. Snižuje se počet malých kapilár a naopak narůstá množství větších cév (Spencer et al., 2011).

Dysregeulace sekrečních a skladovacích funkcí adipocytů bílé tukové tkáně hraje ústřední roli v rozvoji metabolických onemocnění. Pokud postprandiální plazmatické hladiny volných mastných kyselin a triacylglycerolů převýší skladovací kapacitu bílé tukové tkáně, začnou se posléze nadbytečné triacylglyceroly ukládat na ektopických místech (zejména v játrech, srdci a svalech) (Lara-Castro and Garvey, 2008). Tento stav vede k morfologické, sekreční a funkční změně tkání, mění se jejich citlivost k inzulinu a rozvíjí se inzulinová rezistence, která hraje ústřední roli v patofyziologii metabolického syndromu (Galgani et al., 2008).

2.3. Metabolismus bílé tukové tkáně

2.3.1. Lipolýza triacylglycerolů v bílé tukové tkáni

Triacylglyceroly jsou lipidy zastávající klíčovou úlohu v buněčném metabolismu, jelikož slouží jako zásobárna metabolické energie a u lidí tvoří 90 % lipidů přijatých v potravě. Molekula triacylglycerolu je tvořena esterem glycerolu a třemi molekulami mastných kyselin. Jelikož TG nejsou schopné volně prostupovat biologickými membránami, musí být nejprve hydrolyzovány v katabolickém procesu zvaném lipolýza. Tento děj je umožněn pomocí hydrolytických enzymů (lipáz), schopných štěpit TG na glycerol a volné mastné kyseliny. Lipolýza probíhá jak extracelulárně, tak intracelulárně. Při trávení lipidů přijatých v potravě se v gastrointestinálním traktu uplatňují lingální, žaludeční a pankreatické lipázy. V plazmě jsou přítomné lipoproteinové lipázy, které z chylomikronů odštěpují TG a MK a ty jsou následně vychytávány cílovými buňkami. Adipocyty přijaté triacylglyceroly ukládají v tukových kapénkách a v případě potřeby jsou pomocí intracelulárních lipáz hydrolyzovány a následně vyplavovány do krve (Frayn et al., 2006). Zatímco glycerol se přenáší volně rozpuštěný v plazmě, uvolněné mastné kyseliny se váží na sérový albumin, který je dopravuje k cílovým tkáním, ve kterých jsou oxidovány za vzniku metabolické energie ve formě ATP a redukováných koenzymů. Glycerol je transportován do jater, kde je pomocí glycerolkinázy a glycerol-3-fosfátdehydrogenázy přeměn na dihydroxyacetonfosfát a zapojen do glykolýzy a glukoneogeneze (Robinson and Newsholme, 1969). Intracelulární lipolýza je zprostředkována třemi hlavními lipázami (Obr. 2).



Obr. 2: Schéma enzymatické kaskády účastnící se intracelulární lipolýzy TG. Triacylglyceroly (TG); diacylglyceroly (DG); monoacylglyceroly (MG); mastné kyseliny (MK); tuková triacylglycerolová lipáza (ATGL); hormon-senzitivní lipáza (HSL); monoglycerolová lipáza (MGL).

Triacylglycerolová lipáza, známá také jako fosfolipáza A2 či desnutrin byla objevená v roce 2004 třemi na sobě nezávislými vědeckými týmy (Jenkins et al., 2004; Villena et al., 2004; Zimmermann et al., 2004). ATGL vykazuje vysokou substrátovou specifitu pro triacylglycerol a katalyzuje počáteční krok hydrolýzy molekuly triacylglycerolu za vzniku jedné molekuly diacylglycerolu (DG) a volné mastné kyseliny (Zimmermann et al., 2004). Ke

své aktivaci ATGL potřebuje protein comparative gene identification-58 (CGI-58), který s ATGL tvoří komplex určující rychlost lipolýzy (Lass et al., 2006). Aktivita ATGL je inhibována proteinem G0S2 (Yang et al., 2010), jehož exprese je indukována inzulinem a PPAR γ a inhibována agonisty β -adrenergických receptorů (AR) a TNF- α (Yang et al., 2010; Zandbergen et al., 2005). ATGL je přítomna téměř ve všech tkáních, ale nejvíce je zastoupena v adipocytech bílé a hnědé tukové tkáně (Villena et al., 2004; Zimmermann et al., 2004). Enzym je kódován genem *Patatin like phospholipase domain containing 2* (*Pnpla-2*). Jeho exprese se v pokusech *in vitro* zvyšovala vlivem působení PPAR agonistů a glukokortikoidů (Kim, 2006; Liu et al., 2009; Villena et al., 2004) a u lidí při hladovění (Nielsen et al., 2011). Exprese mRNA naopak klesala pod vlivem TNF- α , inzulinu a zvýšeného příjmu potravy (Kershaw et al., 2006).

Další, již více než 50 let známý, lipolytický enzym je hormon senzitivní lipáza (HSL), která hydrolyzuje molekulu DG na monoacylglycerol (MG) a volnou mastnou kyselinu (Vaughan et al., 1964). Aktivita ATGL a HSL jsou společně zodpovědné za více než 95 % lipolytické aktivity v adipocytech (Schweiger et al., 2006). Stejně jako u ATGL je exprese HSL nejvyšší v adipocytech bílé a hnědé tukové tkáně (Kraemer et al., 1993). HSL vykazuje nejvyšší substrátovou specifitu pro DG, ale v menší míře dokáže hydrolyzovat i triacylglyceroly, monoacylglyceroly, estery cholesterolu a retinolu (Fredrikson et al., 1981). Hormon senzitivní lipáza je aktivována po vazbě na cytozolický protein fatty acid-binding protein 4 (FABP4). Tento komplex se následně přemísť na povrch lipidové kapénky, kde probíhá hydrolyza DG (Jenkins-Kruchten et al., 2003).

Poslední krok hydrolytické kaskády TG vykonává monoacylglycerolová lipáza (MGL), která hydrolyzuje molekulu monoacylglycerolu na jednu molekulu glycerolu a mastné kyseliny. MGL je specifická pouze pro MG, k TG ani DG nevykazuje afinitu (Taschler et al., 2011; Tornqvist and Belfrage, 1976).

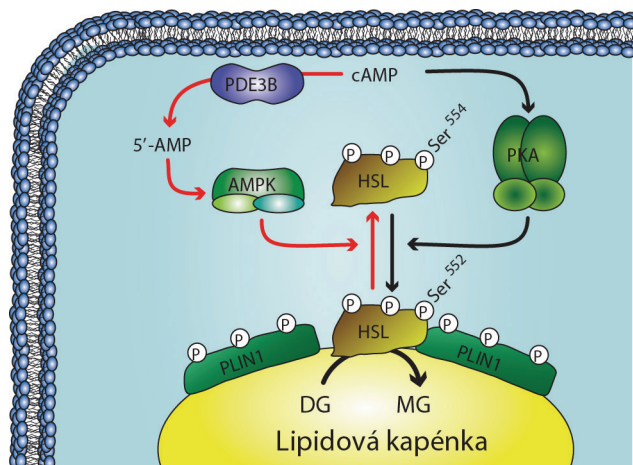
Lipolýza v adipocytech probíhá i za bazálních podmínek, ale může být stimulována různými faktory. Mezi hlavní regulátory stimulované lipolýzy patří katecholaminy (Lafontan and Berlan, 1993). Podle toho na jaký druh AR se katecholaminy na povrchu adipocytu váží, vykazují stimulační či inhibiční účinek. Vazba adrenalinu či noradrenalinu na β -AR spouští v adipocytech lipolytickou kaskádu. Po navázání katecholaminu na β -AR je aktivována stimulační G_s podjednotka receptoru aktivující adenylát cyklázu (AC), která konvertuje ATP na cAMP. Zvýšené hladiny cAMP aktivují protein kinázu A (PKA), která fosforilyje protein

perilipin 1 (PLIN1) lokalizovaný na lipidové kapénce (Greenberg et al., 1991). Perilipin 1 je důležitý regulátor lipolýzy, který je v nefosforylovaném stavu navázán na protein CGI-58. Po fosforylaci PLIN 1 se CGI-58 uvolní z vazby a aktivuje ATGL (Lass et al., 2006). Aktivovaná PKA navíc fosforyluje cytozolickou formu HSL, která se přemístí na povrch lipidové kapénky, kde hydrolyzuje DG (Egan et al., 1992). Mezi další látky stimulující lipolýzu patří zejména natriuretický peptid (Yu et al., 2008), růstový hormon (Bergan et al., 2015), glukagon (Harmon et al., 1993), parathyroidní hormon (Larsson et al., 2016), ale i některé cytokiny jako leptin (Frühbeck et al., 1997), TNF- α (Zhang et al., 2002) a IL-6 (van Hall et al., 2003).

Pokles aktivity lipolýzy je zprostředkován vazbou katecholaminů na α_2 AR, které přes inhibiční G_i podjednotku inhibují aktivitu AC a tvorbu cAMP (Galitzky et al., 1993; Lafontan and Berlan, 1981). Další významná antilipolytická dráha je zprostředkována inzulinem. Po vazbě inzulinu dojde k autofosforylaci tyrosin kinázového receptoru a následně k fosforylaci inzulinových receptorových substrátů 1 a 2 (IRS-1/2) (White, 1998). Tyto substráty aktivují fosfatidylinositol 3-kinázový komplex (PI3K), který následně fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bifosfát (PIP₂) na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP₃) (Whitman et al., 1988). PIP₃ aktivuje fosfoinositid dependentní kinázu (PDK) fosforylující protein kinázu B (PKB/Akt) (Alessi et al., 1997), která aktivuje fosfodiesterázu 3B (PDE3B) degradující cAMP na 5'-AMP (Degerman et al., 1998). Snížená koncentrace cAMP deaktivuje PKA. Zabrání se tím tak fosforylaci PLIN 1 a HSL a to následně vede k inhibici lipolýzy. Antilipolytický efekt vykazuje také např. adiponektin (Qiao et al., 2011) a kortizol (Ottosson, 2000).

Lipolýza je kontrolována také enzymem AMP-aktivovanou proteinovou kinázou (AMPK), která v organismu obecně podporuje katabolické procesy. Tento enzym hraje klíčovou úlohu v zachování energetické homeostázy buňky. Za stavu hladovění či zvýšené fyzické zátěže klesá v organismu poměr ATP/AMP a dochází k aktivaci AMPK (Davies et al., 1995). Dlouho nebylo zřejmé, zda AMPK lipolýzu v adipocytech bílé tukové tkáně aktivuje (Yin et al., 2003), či inhibuje (Anthony et al., 2009). V současné době převládá názor, že AMPK je v adipocytech aktivována jako důsledek snížení energetického stavu během lipolýzy (Gauthier et al., 2008). AMPK indukuje fosforylaci HSL na 554 serinovém zbytku a tím potlačuje aktivaci HSL pomocí PKA (Obr. 3). Inhibováním aktivity HSL tedy AMPK v bílé tukové tkáni vykazuje antilipolytický efekt. Při dlouhodobé aktivaci AMPK v adipocytech zároveň dochází ke stimulaci aktivity ATGL a k nárůstu koncentrace diacylglycerolů (Gaidhu et al., 2009). Jelikož však stále přetrvává inhibiční efekt AMPK na

HSL, diacylglyceroly nemohou být dále hydrolyzovány a hromadí se v adipocyty. Tento stav vede k usnadnění reesterifikace MK zpět do TG a dochází k nárůstu prázdného metabolického cyklování (Daval et al., 2005), podrobněji popsáno v kapitole 5.3.3.



Obr. 3: Regulace aktivity HSL. HSL je aktivována pomocí PKA, která enzym aktivuje fosforylací enzymu na serinovém zbytku 552. Pokud se aktivuje AMPK nárůstem intracelulární koncentrace 5'AMP, fosforyluje AMPK HSL na 554 serinovém zbytku a tím potlačuje aktivaci HSL přes PKA, jelikož fosforylace na serinovém zbytku 554 a 552 se vzájemně vylučují. AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMPK); diacylglyceroly (DG); hormon-senzitivní lipáza (HSL); monoacylglyceroly (MG); fosfodiesteráza 3B (PDE3B); proteinkináza A (PKA); perilipin 1 (PLIN1). Převzato a upraveno z (Nielsen et al., 2014).

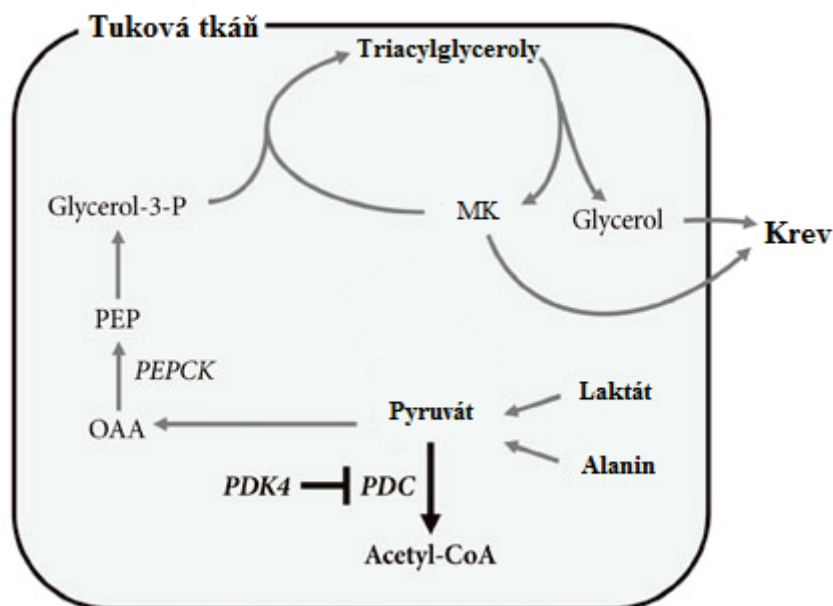
Aktivovaná AMPK dále v adipocytech reguluje příjem glukózy regulací translokace glukózového přenašeče GLUT4. AMPK se také podílí na regulaci oxidace mastných kyselin v adipocytech a to fosforylací a tím inaktivací ACC, multifunkčního enzymu katalyzujícího konverzi acetylkoenzym A (-CoA) na malonyl-CoA. Malonyl-CoA je inhibitorem přenašeče CPT1, který transportuje mastné kyseliny do mitochondrií, kde jsou oxidovány. Aktivace AMPK vede ke zvýšení exprese transkripčního faktoru (transkripční koaktivátor PGC-1 α (PPAR γ koaktivátor-1 α) (Cantó and Auwerx, 2009), který spolu s transkripčními faktory z rodiny PPAR a NRF1 (nuclear respiratory factors 1) zvyšuje expresi genů zapojených do β -oxidace a mitochondriální biogeneze (Wenz, 2009).

2.3.2. Lipogeneze

Opačným procesem lipolýzy je lipogeneze. Jedná se o anabolickou dráhu zahrnující esterifikaci MK a glycerolu za vzniku TG. Substráty využívané pro syntézu TG mohou být přijaté z potravy (exogenní) ale i syntetizované *de novo* (endogenní).

Syntéza MK *de novo* probíhá v cytoplazmě adipocytů a hepatocytů za účasti multienzymatického komplexu syntázy mastných kyselin (FAS). Jako výchozí látky slouží acetyl-CoA a malonyl-CoA, kdy nejprve dochází k odštěpení koenzymu A a jeho výměně za přenašeč acylových skupin (ACP). Acetyl-ACP a malonyl-ACP pak kondenzují za vzniku β -ketoacyl-ACP. Ten je redukován koenzymy NADPH + H⁺ na β -hydroxyacyl-ACP a posléze dehydratován na trans-2-enoyl-ACP a znovu redukován za vzniku acyl-ACP, který je o dva uhlíky delší než byl původní acetyl-ACP. Acyl-ACP opět kondenzuje s malonyl-CoA a celý cyklus se opakuje (Karlson, 1975). Takto vzniká kyselina palmitová, která pod vlivem působení elongáz a desaturáz slouží jako prekurzor pro syntézu dalších nasycených i nenasycených mastných kyselin. Předtím než jsou mastné kyseliny využity jako substrát pro syntézu TG, musí být nejprve aktivovány vazbou na koenzym A za vzniku acyl-CoA. K aktivaci mastných kyselin dochází v cytosolu za účasti acyl-CoA syntetázy a spotřeby ATP (Coleman et al., 2002).

Jako kostra pro navázání aktivovaných mastných kyselin slouží molekula glycerol-3-fosfátu (G3P). V tukové tkáni dochází k tvorbě G3P částečně v glykolytické dráze, kde glycerol-3-fosfát vzniká z glukózy přes meziprodukt dihydroxyacetonfosfát (DAP) (Robertson et al., 1982). V poslední době se však ukazuje, že dominantní dráhou syntézy G3P v bílé tukové tkáni je pravděpodobně glyceroneogeneze (Obr. 4) (C. K. Nye et al., 2008).

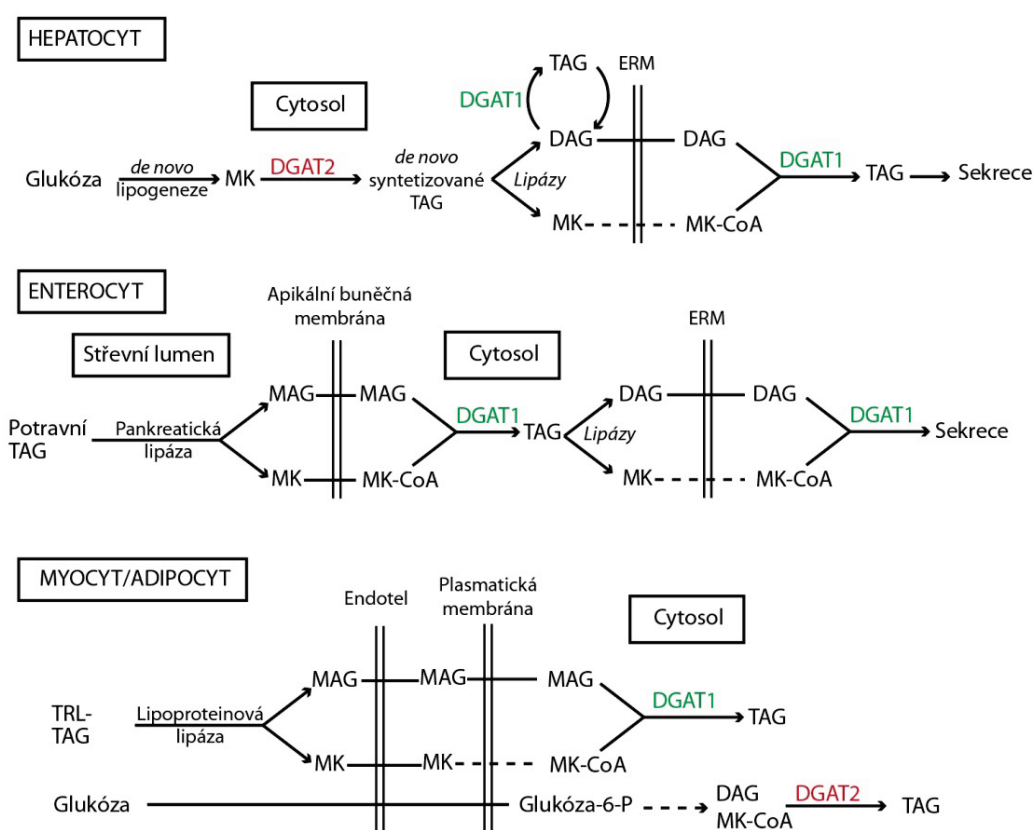


Obr. 4 Glyceroneogenní dráha vzniku G3P v bílé tukové tkáni. Fosfoenolpyruvát karboxikináza (PEPCK); fosfoenolpyruvát (PEP); mastné kyseliny (MK); oxaloacetát (OAA); pyruvát dehydrogenáza lipoamid kináza izozym 4 (PDK4); pyruvát dehydrogenázový komplex (PDC). Převzato a upraveno z (Jeoung and Harris, 2010).

V této dráze, která je nezbytná pro správnou funkci bílé tukové tkáně, vzniká glycerol-3-fosfát z nesacharidových substrátů, jakými mohou být pyruvát, laktát a některé aminokyseliny. Glyceroneogeneze je zprostředkována aktivitou cytosolického enzymu fosfoenolpyruvát karboxykinázy (PEPCK), která katalyzuje dekarboxylaci oxaloacetátu na fosfoenolpyruvát (PEP), který je posléze konvertován přes dihydroxyaceton na G3P (C. Nye et al., 2008). Dalším důležitým enzymem této glyceroneogenní dráhy je pyruvát dehydrogenáza kináza 4 (PDK4), která funguje jako metabolický přepínač mezi dráhou využívající jako hlavní substrát glukózu či mastné kyseliny. Inhibice glyceroneogenní dráhy přes PDK4 umožní využít pyruvát pro glyceroneogenezi za podmínek, kdy je nízký příjem glukózy (Cadoudal et al., 2008).

Vzniklý glycerol-3-fosfát postupně reaguje v tzv. glycerol-3-fosfátové dráze se třemi molekulami aktivovaných mastných kyselin v reakci katalyzované acyltransferázami. Postupně vzniká kyselina lysofosfatidová, fosfatidová, 1,2-diacylglycerol a nakonec triacylglycerol. V tukové tkáni jsou nově nasyntetizované molekuly TG uloženy do lipidových kapének adipocytů (Alves-Bezerra and Gondim, 2012). Kromě G3P dráhy, která je přítomná ve všech eukaryotických buňkách, se ve tkáních s vysokým obrátem TG uplatňuje i tzv. monoacylglycerolová dráha (MAG). Jedná se především o játra, tukovou tkáň a tenké

střevo, kde hraje zásadní úlohu esterifikace tuků přijatých z potravy. V této dráze slouží jako počáteční akceptor mastných kyselin monoacylglyceroly, které jsou působením enzymu monoacylglycerolacyltransferázy (MGAT) acylovány za vzniku diacylglycerolů (Kayden et al., 1967). Obě dráhy (Obr. 5) vedou ke tvorbě diacylglycerolů, které jsou využity jako substrát pro syntézu triacylglycerolů za účasti acyl-CoA:diacylglycerolacyltransferáz (DGAT). Dosud jsou známy dvě formy a to DGAT1 a DGAT2 (Cases et al., 2001, 1998). I když obě katalyzují poslední krok syntézy triacylglycerolů (esterifikace diacylglycerolu), jejich úloha v metabolismu triacylglycerolů je zřejmě odlišná.



Obr. 5: Schéma syntézy triacylglycerolů v buňkách hepatocytů, enterocytů, myocytů a adipocytů. V buňkách tkání, ve kterých syntéza mastných kyselin ve velké míře probíhá z glukózy, se uplatňuje především enzym DGAT2 (játra, adipocyt). V ostatních tkáních, kde glukóza není primárním zdrojem syntézy TG, se esterifikace mastných kyselin účastní enzym DGAT1. Acyl-CoA:diacylglycerolacyltransferáza 1 (DGAT1); acyl-CoA:diacylglycerolacyltransferáza 2 (DGAT2); mastné kyseliny (MK); triacylglyceroly (TAG); diacylglyceroly (DAG); monoacylglyceroly (MAG); aktivované mastné kyseliny (MK-CoA); membrána endoplazmatického retikula (ERM). Převzato a upraveno z (Zammit, 2013).

Funkce DGAT1 a DGAT2 v organismu není vzájemně nahraditelná (Stone et al., 2004). Zatímco myši s delecí obou alel genu *Dgat1*^{-/-} vykazovaly na standardní dietě normální průběh

růstu a byly rezistentní k dietou indukované obezitě (Smith et al., 2000). Na modelu myši s delecí obou alel genu $Dgat2^{-/-}$ zvířata umírala do 24 hodin po narození a myši vykazovaly redukcí TG a MK, což by naznačovalo zásadní význam enzymu DGAT2 v lipogenezi (Stone et al., 2004).

DGAT1 se v buňce účastní především esterifikace exogenně přijatých MK a také v recyklační dráze MK zahrnující reesterifikaci hydrolyzovaných TG. Jako substrát preferuje spíše mononenasycené mastné kyseliny. Aktivita DGAT1 je významná až při vysoké koncentraci mastných kyselin v buňce. Přispívá tak k ochraně buněk před příliš vysokou koncentrací volných MK a před jejich lipotoxickým účinkem (Cases et al., 2001). Na pokusech s transgenním modelem myši $aP2-Dgat1$ s genetickým pozadím C57BL/6, které vykazovaly dvakrát vyšší expresi DGAT1 v bílé tukové tkáni než obvykle, byly pozorovány významné změny v metabolismu, pokud byly myši krmeny standartní nebo vysokotukovou dietou. U myši $aP2-Dgat1$ krmených dietou s vysokým obsahem tuku sice došlo k rozvoji obezity, přesto ale nebyla poškozená inzulinová a glukózová tolerance. Zvýšená exprese DGAT1 přispívala k nárůstu akumulace TG v bílé tukové tkáni, ale redukovala množství TG v ostatních tkáních a tím přispívala k ochraně před rozvojem glukózové intolerance u myši krmených dietou s vysokým podílem tuků v dietě (Chen et al., 2002).

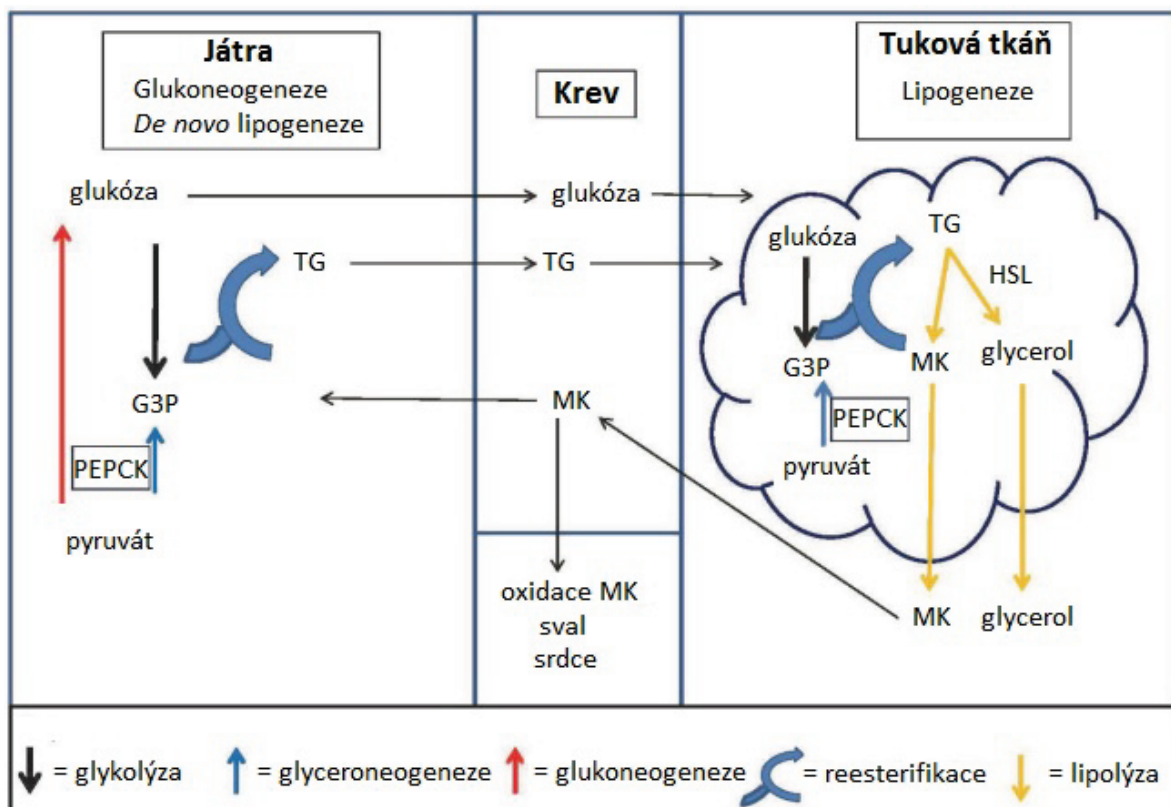
Aktivita enzymu DGAT2 je spojena nejvíce se syntézou TG *de novo* a inkorporací endogenně vzniklých MK do TG (Stone et al., 2004). Vyšší specifitu DGAT2 vykazuje pro DG obsahující acyl-CoA o krátkém až středně dlouhém řetězci. Na rozdíl od DGAT1 je DGAT2 aktivní už při nízké koncentraci substrátu a zatímco nedostatek DGAT2 vede u myši k výrazné redukcí TG, nedostatek DGAT1 ovlivní množství TG jen mírně (Smith et al., 2000).

Expresí genů obou enzymů je stimulována během diferenciací a adipogeneze. Thiazolidindiony (TZD), deriváty používané v léčbě diabetu mellitus 2. typu, zvyšují expresi genu DGAT1 pravděpodobně přes aktivaci $PPAR\gamma$. V *in vitro* modelech (adipocyty v kultuře) byla pozorována regulace genové exprese v odpovědi na přidání glukózy nebo inzulinu do media. Expresí DGAT genů byla pozitivně regulována glukózou na rozdíl od inzulinu, který zvýšil expresi genu pouze u DGAT2. Geneticky nebo dietou indukovaná obezita je spojena se zvýšenou expresí genu pro DGAT2 ale se sníženou expresí genu pro DGAT1. Podobně je spojena exprese genů s nutričním stavem, kdy v době hladovění je exprese genu DGAT2 snížena a zvýšena po příjmu potravy. Expresí genu pro DGAT1 je v těchto dvou stavech opačná (Yen et al., 2008).

2.3.3. Cyklus lipolýzy/reesterifikace v bílé tukové tkáni

Během lipolýzy triacylglycerolů v bílé tukové tkáni je část volných mastných kyselin reesterifikována zpět na triacylglyceroly. Tento proces bývá označován jako prázdný metabolický cyklus mastných kyselin. V nestimulovaném stavu je v adipocytech bílé tukové tkáně zpětně reesterifikováno až 90 % mastných kyselin (Leibel and Hirsch, 1985). Po vystavení adipocytu lipolytickému stimulu (hladovění, β -adrenergní stimulace) se reesterifikuje 10–20 % lipolyzovaných MK (Wang et al., 2003). Celková úroveň prázdného cyklování se ale během hladovění a fyzické zátěže zvyšuje (Brooks et al., 1983).

Cyklování mezi lipolýzou a reesterifikací probíhá nejen v bílé tukové tkáni ale také mimo tuto tkáň a spočívá v regulaci cirkulace mastných kyselin mezi tukovou tkání a periferií (játra a svaly) (Obr. 6). Lipolýzou uvolněné MK jsou buď reesterifikovány zpět tukovou tkání, kde jsou oxidovány nebo zpět zabudovány do nových TG (prázdné cyklování) nebo jsou krví dopraveny do další tkáni, kde jsou oxidovány (sval, srdce) nebo reesterifikovány do TG (játra).



Obr. 6: Cyklus lipolýzy/reesterifikace mastných kyselin v organismu. Enzym PEPCK reguluje reesterifikaci MK zpět na TG v játrech a tukové tkáni a přispívá tak ke snížení hladin mastných

kyselin v krvi. Fosfoenolpyruvát karboxykináza (PEPCK); triacylglyceroly (TG); mastné kyseliny (MK); glycerol-3-fosfát (G3P); hormon-senzitivní lipáza (HSL). Převzato a upraveno z (Hsieh et al., 2011).

Fyziologický význam cyklování mastných kyselin spočívá ve schopnosti puffrovat nadbytek mastných kyselin a regulovat tak jejich zvýšené hladiny v krvi (Campbell et al., 1992). Tkáně jsou takto chráněny před lipotoxickým účinkem mastných kyselin. Vysoké plazmatické hladiny MK jsou navíc spojeny se zvýšeným rizikem vzniku inzulínové rezistence a diabetu mellitu 2. typu (Paolisso et al., 1995). Cyklování MK tedy zvyšuje inzulínovou senzitivitu a to nejen snižováním koncentrací MK v plazmě, ale také přímým působením na metabolismus sacharidů. Při reesterifikaci MK totiž dochází ke spotřebě G3P, který je v bílé tukové tkáni a játrech tvořen z glukózy a v důsledku toho dochází ke snížení hladin krevní glukózy. Důležitým vedlejším efektem při cyklování mastných kyselin je rovněž spotřeba metabolické energie. Výzkum regulace prázdného metabolického cyklování MK je tedy v popředí zájmu i jako možný terapeutický cíl při léčbě obezity a inzulínové rezistence.

Poměr mezi volnými mastnými kyselinami uvolněnými během lipolýzy a jejich zpětnou reesterifikací zpět do tukové tkáně závisí mimo jiné na koncentraci G3P, který slouží jako kostra pro navázání mastných kyselin. Glycerol-3-fosfát je v bílé tukové tkáni získáván z glukózy v průběhu glykolýzy (Robertson et al., 1982) nebo z nesacharidových substrátů v procesu glyceroneogeneze (Saggerson and Greenbaum, 1970), jak bylo popsáno v kapitole 5.3.2. V pokusu na potkanech tvořila glyceroneogeneze v tukové tkáni až 90 % celkové tvorby glycerolu (C. K. Nye et al., 2008). Glyceroneogeneze tedy v tukové tkáni hraje klíčovou úlohu při syntéze TG a zvýšená aktivita PEPCK napomáhá inkorporaci MK do TG a podporuje syntézu TG nejen v tukové tkáni ale i v játrech (C. K. Nye et al., 2008). Regulací PEPCK lze navýšit úroveň cyklování MK v bílé tukové tkáni. Tohoto efektu se využívá i při léčbě diabetu mellitu 2. typu pomocí skupiny léčiv TZD, které působí jako inzulínové senzitivizéry (Cavaghan et al., 1997). TZD fungují jako ligandy pro jaderné receptory PPAR- γ (Lehmann et al., 1995), které zvyšují expresi PEPCK v tukové tkáni (Tontonoz et al., 1995).

V regulaci cyklu lipolýzy/reesterifikace mastných kyselin hraje klíčovou roli také enzym AMPK. Aktivita AMPK je při akutní odpovědi na lipolýzu regulována PKA, která enzym fosforyluje na serinu (S173) a deaktivuje, což má za následek odblokování inhibičního efektu AMPK na HSL. Během dlouhodobé aktivace AMPK dochází ke zprostředkování jejího inhibičního efektu na HSL. Aktivací ATGL je stimulována lipolýza TG na DG, které se hromadí v buňce díky inhibičnímu vlivu AMPK na HSL. Hromadící se diacylglyceroly

následně slouží jako substrát pro mastné kyseliny, které jsou takto snáze reesterifikovány (Daval et al., 2005; Djouder et al., 2010).

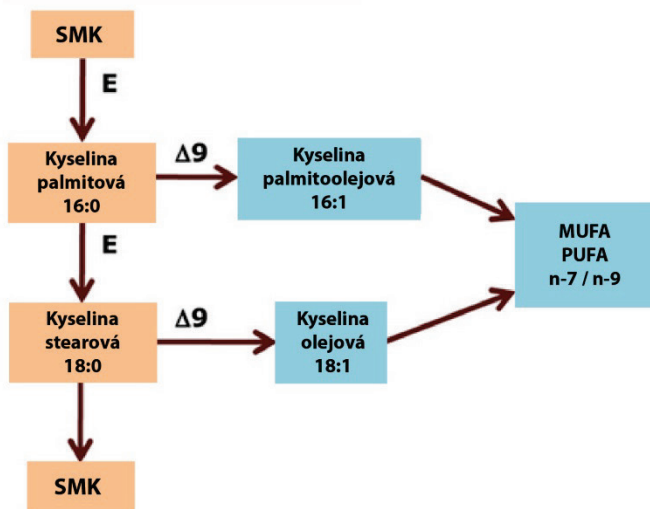
2.4. Ovlivnění metabolismu bílé tukové tkáně

2.4.1. Vliv složení mastných kyselin v dietě

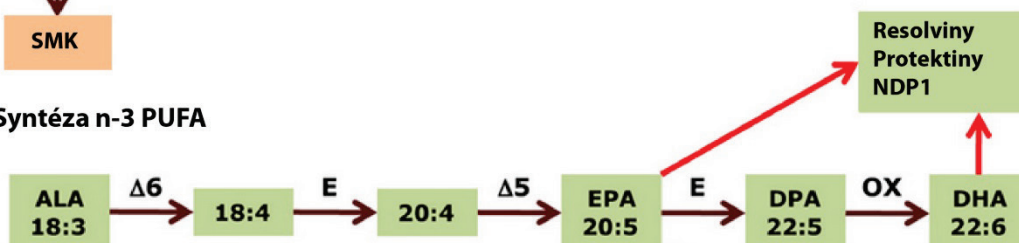
Nadměrná konzumace diety s vysokým obsahem tuků přispívá k rozvoji obezity a dalších metabolických onemocnění. Výsledky pokusů z dietních intervencí se však liší jak u potkanů a myši, které se nejčastěji využívají jako modelový organismus pro studování vlivu diety na rozvoj metabolických poruch, tak v klinických studiích. Rozdílné složení tuků v experimentálních podmínkách ovlivňuje různou měrou parametry, jako je hmotnostní přírůstek pokusných zvířat, glykémie, inzulinémie, triglyceridémii, koncentraci mastných kyselin v séru či hladiny adiponektinu a rezistinu (Buettner et al., 2007). Zásadní význam v rozvoji metabolických komplikací má zřejmě složení, množství a vzájemný poměr zastoupených mastných kyselin v dietě (Dulloo et al., 1995). Mastné kyseliny jsou alifatické monokarboxylové kyseliny, které se vyskytují v tucích živočišného nebo rostlinného původu. Pokud MK ve své molekule neobsahují žádnou dvojnou vazbu, bývají označovány jako nasycené mastné kyseliny. Nadměrný příjem nasycených mastných kyselin je spojován s vyšším rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění, diabetu mellitu 2. typu (de Souza et al., 2015) a nádorových onemocnění (Chavarro et al., 2013; Xia et al., 2015; Yao and Tian, 2015). Nasycené mastné kyseliny jsou obsaženy zejména v tucích živočišného původu, jejichž zdrojem je maso a další živočišné produkty, ale také palmový a kokosový tuk. V experimentálních dietách se jako zdroj těchto kyselin nejčastěji využívá vepřové sádlo, hovězí lůj, mléčný a kokosový tuk.

Mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou se označují jako mononenasycené (MUFA) a podle polohy dvojně vazby od methylového konce se rozlišují na MUFA řady *n-7* a *n-9*. Prekurzorem pro syntézu MUFA v těle slouží kyselina palmitová (C_{16:0}) a stearová (C_{18:0}). Průběh biosyntézy mastných kyselin v organismu znázorňuje Obr. 7. MUFA pravděpodobně částečně přispívají ke snížení rizik kardiovaskulárních onemocnění a dalších metabolických komplikací (Kris-Etherton and Committee, 1999). Zdrojem mononenasycených mastných kyselin je olivový, slunečnicový, kukuřičný olej, ale také např. avokádo a drůbeží maso.

Syntéza MUFA



Syntéza n-3 PUFA



Syntéza n-6 PUFA



Obr. 7: Schéma biosyntézy mastných kyselin. Prekurzorem pro syntézu mono- a polynenasycených mastných kyselin je kyselina palmitová či stearová, z kterých činností elongáz a desaturáz mohou vznikat MUFA a PUFA řady n-7/n-9. Kyselina α -linolenová slouží jako prekurzor pro syntézu n-3 PUFA, ze kterých dále mohou vznikat lipidové mediátory především s protizánětlivým účinkem (zejména resolviny, protektiny). Jako prekurzor pro PUFA řady n-6 slouží kyselina linolová, která podporuje vznik zánětlivých eikosanoidů. Nasycené mastné kyseliny (SMK); mononenasycené mastné kyseliny (MUFA); polynenasycené mastné kyseliny (PUFA); kyselina α -linolenová (ALA); kyselina eikosapentaenová (EPA); kyselina dokosaheptaenová (DHA); neuroprotektin D1 (NDP1); kyselina linolová (LA); kyselina γ -linolová (GLA); kyselina dihomogamma-linolenová (DHGLA); kyselina arachidonová (AA); desaturáza $\delta 6$ ($\Delta 6$); elongáza (E); peroxizomální β -oxidace (OX). Převzato z (Hussain et al., 2013).

Mastné kyseliny, které obsahují dvě a více dvojných vazeb se označují jako polynenasycené MK (PUFA) a podle polohy první dvojný vazby od methylového konce se rozdělují na polynenasycené mastné kyseliny řady *n*-3 a *n*-6. Prekurzorem pro syntézu *n*-6 PUFA je kyselina linolová ($C_{18:2n-6}$; LA). Zdrojem LA je zejména slunečnicový, kukuřičný a olivový olej. Z kyseliny linolové působením enzymů elongáz a desaturáz vzniká buď kyselina γ -linolová ($C_{18:3n-6}$; GLA) nebo kyselina arachidonová ($C_{20:4n-6}$; AA). Zatímco GLA podporuje

přes syntézu dihomogamma-linolenové kyseliny ($C_{20:3n-6}$; DGLA) vznik protizánětlivých eikosanoidů a je hojně obsažená v mateřském mléce a ve stopovém množství také v zelené listové zelenině a ořechách (Kapoor and Huang, 2006). Kyselina arachidonová, ze které vznikají aktivní lipidové mediátory – eikosanoidy (zejména leukotrieny, prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany), se podílí na vzniku zánětlivých mediátorů (Higgs et al., 1981). Zdrojem kyseliny arachidonové jsou především maso a vejce. Zvýšený příjem $n-6$ PUFA podporuje produkci protrombotických a prozánětlivých cytokinů, mezi které patří zvláště tromboxan A₂, leukotrien B₄, IL-6 a IL-1b, TNF- α a C-reaktivní protein (CRP) (Calder, 2006). Nárůst koncentrace těchto faktorů v organismu přispívá k rozvoji celé řady onemocnění, jakými jsou kardiovaskulární choroby, diabetes mellitus 2. typu, obezita, nádorová onemocnění, revmatoidní artritida, astma či depresivní poruchy (Simopoulos, 2008; Tempel et al., 1990; Vaz et al., 2014). Poměr přijatých $n-6/n-3$ PUFA v potravě významně přispívá k ovlivnění metabolických funkcí (Simopoulos, 2002). Doporučený poměr $n-6/n-3$ přijatých PUFA v potravě činí 1-2/1. Vysoký nárůst zemědělské výroby v industriálně rozvinutých zemích přispěl ke zvýšenému příjmu $n-6$ a naopak sníženému příjmu $n-3$ PUFA. U diety charakteristické pro vyspělé státy se odhaduje poměr přijatých $n-6 / n-3$ PUFA v potravě na 10-20/1 (Eaton et al., 1988; Pella et al., 2003; Sanders, 2000).

2.4.2. Polynenasycené mastné kyseliny řady $n-3$

Metabolismus a sekreční funkci bílé tukové tkáně je možné ovlivnit příjmem $n-3$ polynenasycených mastných kyselin ($n-3$ PUFA). Jsou to PUFA, které obsahují dvojnou vazbu mezi třetím a čtvrtým uhlíkem od methylového konce. V organismu jsou vázány buď v molekulách triacylglycerolů nebo tvoří součást buněčné membrány vázané v molekulách fosfolipidů, kde svou přítomností ovlivňují fluiditu membrány a funkci membránových proteinů. Mezi $n-3$ PUFA se řadí kyselina α -linolenová (ALA) ($C_{18:3n-3}$), eikosapentaenová (EPA) ($C_{20:5n-3}$) a dokosahexaenová (DHA) ($C_{22:6n-3}$). Zatímco ALA se nachází především ve lněném, řepkovém, sójovém a konopném oleji, chia semínkách, vlašských ořechách a zelené listové zelenině. Největším producentem EPA a DHA je mořský fytoplankton, kterým se živí např. drobní korýši a na samotném vrcholu potravní pyramidy se EPA a DHA akumulují v těle mořských ryb (zvláště losos, treska a sled). Prokázalo se, že silnější metabolické účinky vykazují $n-3$ PUFA vázané ve formě fosfolipidů ve srovnání s triacylglyceroly (Rossmeisl et al., 2012). Ve formě fosfolipidů se $n-3$ PUFA vyskytují převážně v tělech mořských korýšů ve srovnání s rybami, kdy se $n-3$ PUFA akumulují převážně ve formě zásobních TG. Ukazuje se,

že právě EPA a DHA fungují jako přírodní hypolipidemika vykazující pozitivní účinky na zdravotní stav lidí i pokusných zvířat (Rustan et al., 1992).

I když účinky těchto látek na organismus se u zvířat a lidí mírně liší. Příjem *n*-3 PUFA u lidí vede ke snížení plazmatických hladin TG a naopak zvýšení HDL, potlačuje zánětlivé procesy na systémové úrovni i v bílé tukové tkáni, redukuje ektopickou akumulaci tuků v játrech a snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Calder, 2006; Couet et al., 1997; Lankinen et al., 2009; MacLean et al., 2004; Mori et al., 1999; Mozaffarian and Rimm, 2006; Parker et al., 2012; Spencer et al., 2013). Aplikace *n*-3 PUFA u obezních žen, u kterých byla současně po dobu tří týdnů aplikovaná dieta s velmi nízkým kalorickým příjmem (VLCD), přispěla k redukci hmotnosti a úbytku obvodu pasu, zvýšila hladinu β -hydroxybutyrátu, pravděpodobně kvůli vyšší oxidaci MK, a zvýšila množství EPA a DHA v sérových triacylglycerolech a fosfolipidech (Kunesová et al., 2006).

U myši potrava obohacená o *n*-3 PUFA navíc přispívá k redukci obezity (Ruzickova et al., 2004) a zvýšení inzulínové senzitivity (Vemuri et al., 2007). Stejně jako u lidí i u myši suplementace *n*-3 PUFA snižuje plazmatické hladiny TG, chrání ostatní tkáně před ektopickým ukládáním lipidů a potlačuje zánětlivé procesy (Qi et al., 2008; Soni et al., 2015; Todoric et al., 2006). Endogenní syntéza EPA a DHA sice u živočichů probíhá z ALA, avšak jen v minimální míře (Plourde and Cunnane, 2007). Navíc navýšení příjmu ALA zároveň vede ke snížení syntézy DHA (Portolesi et al., 2007). Proto je za účelem zvýšení hladin EPA/DHA v organismu a dosažení maxima jejich benefičních účinků výhodnější přijímat tyto látky v potravě přímo ve formě EPA a DHA.

Schopnost potlačovat zánětlivé procesy patří k jednomu z nejvýznamějších pozitivních účinků *n*-3 PUFA na organismus (Balsinde et al., 2002). Zánětlivé procesy jsou v organismu ovlivňovány jak přímo polynenasycenými mastnými kyselinami, tak především aktivními lipidovými metabolity z těchto kyselin odvozených – eikosanoidy. Zatímco eikosanoidy původem z řady *n*-3 PUFA vykazují protizánětlivé účinky, eikosanoidy odvozené z řady *n*-6 zánětlivé procesy naopak stimulují (James et al., 2000). V rozvoji zánětlivé odpovědi se poměr mezi přijatými *n*-3 a *n*-6 PUFA zdá být důležitější než celkové množství *n*-3 PUFA (Simopoulos, 2008). Relativně malý podíl EPA/DHA v potravě přispívá ke zvýšené inkorporaci těchto látek do membránových fosfolipidů (Luo et al., 1996). Dochází tak ke kompetici *n*-3 PUFA o vazbu ve fosfolipidech s dalšími polynenasycenými mastnými kyselinami, zejména hojně přítomnou kyselinou arachidonovou. Kyselina arachidonová po

uvolnění z vazby fosfolipidu pomocí fosfolipázy A2 slouží jako prekurzor zánětlivých mediátorů (prostaglandiny, tromboxany, prostacykliny, leukotrieny) vzniklých aktivací cyklooxygenázové a 5 lipoxygenázové dráhy (Balsinde et al., 2002). Inkorporace EPA a DHA do membránových fosfolipidů vede ke zpomalení produkce prozánětlivých eikosanoidů odvozených od kyseliny arachidonové (Lokesh and Kinsella, 1987). DHA navíc aktivuje produkci protizánětlivých lipidových mediátorů (protektiny, resolviny) (Schwab et al., 2007), které mimo jiné ovlivňují polarizaci makrofágů k M2 fenotypu (Titos et al., 2011).

Kromě protizánětlivého efektu *n*-3 PUFA je významný i jejich hypolipidemický účinek, který obecně spočívá ve schopnosti navodit katabolismus lipidů a inhibovat lipogenezi v tukové tkáni (Camargo et al., 2014), játrech (Bargut et al., 2014) a tenkém střevu (van Schothorst et al., 2009). Následkem toho dochází k zlepšení lipidového profilu, inzulínové senzitivity a snížení ektopického ukládání tělesného tuku (Lombardo and Chicco, 2006; Todorčević and Hodson, 2015). Výsledky naší laboratoře naznačují, že *n*-3 PUFA pravděpodobně přispívají k indukci reesterifikace mastných kyselin v TG/MK cyklu mastných kyselin v epididymálním tuku myši krmených vysokotukovou dietou chovaných v termoneutralní teplotě (Janovská et al., 2013). A zdá se, že zvláště kyselina dokosaheptaenová má schopnost indukovat mRNA expresi PEPCCK v adipocytech (Duplus et al., 2002).

Stejně jako kalorická restrikce (Lpez-Lluch et al., 2006), i příjem EPA/DHA zvyšuje mitochondriální biogenezi. Výsledky naší laboratoře ukazují, že suplementace potravy o *n*-3 PUFA indukuje v bílé tukové tkáni mitochondriální biogenezi s výrazným efektem ve viscerálním (epididymálním) tuku (Flachs et al., 2005). Na transkripční úrovni je tento efekt zprostředkován zvýšenou expresí transkripčních faktorů PGC-1 α a NRF-1, které hrají klíčovou úlohu v mitochondriální biogenezi a β -oxidaci mastných kyselin (Flachs et al., 2005). Rovněž byl zaznamenán pokles exprese genu *Scd-1* kódujícího desaturázu mastných kyselin (SCD1), která se účastní syntézy mononenasycených mastných kyselin (Paton and Ntambi, 2009). Regulace PGC-1 α a NRF-1 je pravděpodobně pod kontrolou enzymů AMPK a SIRT1 (Cantó and Auwerx, 2009), jejichž aktivitu zvyšují právě *n*-3 PUFA (Flachs et al., 2011; Kopecky et al., 2009). Aktivovaná AMPK v adipocytech také stimuluje vychytávání glukózy (Wu et al., 2003) a inhibuje adipogenezi snížením exprese PPAR γ (Habinowski and Witters, 2001).

Schopnost *n*-3 PUFA indukovat katabolismus lipidů a inhibovat lipogenezi přispívá celkově ke zmenšení velikosti zralých adipocytů (Parrish et al., 1990). Malé adipocyty jsou ve srovnání s hypertrofovanými více senzitivní k inzulinu, méně lipolytické, vyplavují nižší hladiny zánětlivých cytokinů a sekretují vyšší hladiny adiponektinu (Bahceci et al., 2007). Malé adipocyty navíc vykazují vysokou pufrací kapacitu pro mastné kyseliny a chrání tak tkáň před jejich lipotoxickými účinky (Virtue and Vidal-Puig, 2010). Suplementace potravy o *n*-3 PUFA u myši vede kromě inhibice růstu adipocytů také k zvýšené indukci apoptózy preadipocytů (Kim et al., 2006). Celkově vede redukce hypertrofie a hyperplázie adipocytů k úbytku tělesného tuku a to preferenčně v abdominální oblasti.

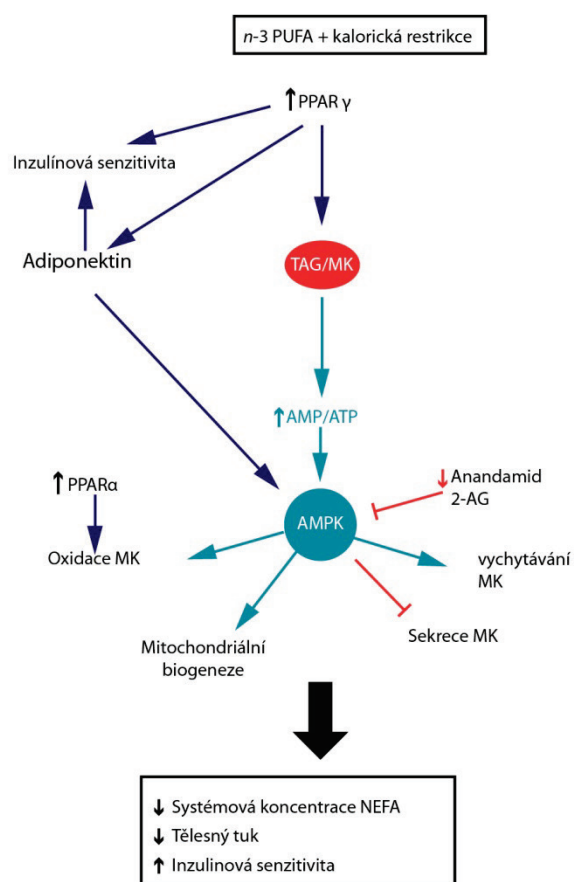
2.4.3. Kalorická restrikce

Za posledních 80 let byl již v mnoha studiích popsán efekt kalorické restrikce (KR) prováděné na různých laboratorních zvířatech, který vedl ke zpomalení s věkem spojených patofyziologických procesů a prodloužení délky života (Fontana et al., 2004; Masoro, 2005; Sinclair, 2005).

Základem léčby obezity a přidružených onemocnění je indukce kalorické restrikce se zachováním dostatečného kalorického příjmu bez navození efektu malnutričních změn (Sacks et al., 1994). V lidských studiích se prokázalo, že i mírná kalorická restrikce významně přispívá ke snížení rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Bales and Kraus, 2013). Předpokládá se, že KR ovlivňuje organismus velmi komplexně a jedna z možných hypotéz, jakým způsobem by mohla KR pozitivně působit na zdravotní stav, je navození metabolických změn v bílé tukové tkáni. Navýšení katabolismu v bílé tukové tkáni, ke kterému dochází při KR, vede k redukci akumulace TG, zmenšení velikosti adipocytů a ovlivnění jejich sekreční funkce (Arvidsson et al., 2004; Taskinen and Nikkilä, 1979; Verhoeven et al., 2013). Dochází k redukci akumulace viscerální tukové tkáně a poklesu inzulinové rezistence (Barzilai et al., 1998). Kalorická restrikce v pokusech na potkanech krmených dietou s nízkým obsahem tuku stimulovala expresi PECK a lipogenních genů (Frasson et al., 2012; Higami et al., 2004) a zároveň zvyšovala míru syntézy mastných kyselin specificky v bílé tukové tkáni (Bruss et al., 2010). Hladovění v pokusech na myších také vedlo ke specifické redukci podkožního (dorzolumbálního) depa bílé tukové tkáně, což by mohlo odrážet rozdíly v reesterifikaci mastných kyselin řízené aktivitou PECK v závislosti na anatomické lokalizaci bílé tukové tkáně (Sponarova et al., 2005).

Snížení kalorického příjmu rovněž ovlivňuje genovou expresi v tukové tkáni. Mnoho klinických studií zaměřených na dietou indukovaný úbytek hmotnosti prokázal výrazné změny v genové expresi spojených zejména s metabolismem mastných kyselin, zánětem, citrátovým cyklem, oxidativní fosforylací a apoptózou (Mutch et al., 2011). Kalorická restrikce přispívá ke zvýšené expresi PGC-1 α (Ranhotra, 2010) a u potkanů snížený příjem kalorií po dobu 6 měsíců zvýšil v bílé tukové tkáni expresi genů proteinů zahrnutých v syntéze mastných kyselin *de novo*, zejména SREBP1c (hlavní transkripční faktor biosyntézy MK *de novo*) (Okita et al., 2015).

Naše laboratoř se v minulosti zabývala účinkem kombinované léčby spočívající v suplementaci diety o *n*-3 PUFA v kombinaci s mírnou 10% kalorickou restrikcí. U myší krmených dietou s vysokým obsahem tuku v kombinaci se suplementací diety *n*-3 PUFA a s mírnou 10% kalorickou restrikcí, působila kombinační léčba preventivně na rozvoj obezity i chronického zánětu bílé tukové tkáně spojené s obezitou. Tato kombinovaná intervence přispívala k poklesu akumulace tělesného tuku, účinkovala na zvýšení inzulinové senzitivity a podporovala nárůst mitochondriální oxidativní fosforylace v epididymální tukové tkáni. Ke všem těmto změnám docházelo bez indukce UCP1 v bílé tukové tkáni (Flachs et al., 2011). Rovněž byl patrný nárůst oxidace mastných kyselin a nárůst exprese PEPCCK v epididymálním tuku, což by mohl být následek stimulace prázdného metabolického cyklování mastných kyselin v adipocytech bílé tukové tkáně (Flachs et al., 2011). Předpokládá se, že exprese PEPCCK v bílé tukové tkáni je regulována transkripčním faktorem PPAR γ (Tontonoz et al., 1995) a lze se domnívat, že nárůst exprese PEPCCK jako následek suplementace diety o *n*-3 PUFA v kombinaci s kalorickou restrikcí v adipocytech bílé tukové tkáně bude rovněž zahrnovat aktivaci signální dráhy PPAR γ (Obr. 8).



Obr. 8: Předpokládaný mechanismus účinku kombinované léčby zahrnující mírnou kalorickou restrikci a suplementaci *n*-3 PUFA v adipocytech bílé tukové tkáně. Příjem *n*-3 PUFA podporuje vznik lipidových mediátorů, zejména prostaglandin 15d-PGJ 2, který funguje jako endogenní ligand pro intracelulární receptor PPAR γ , jež je součástí signální dráhy, která podporuje glyceroneogenezi, mitochondriální biogenezi, katabolizmu lipidů a syntézu mastných kyselin. PPAR α,γ , Peroxisome Proliferator Activated Receptor α,γ ; TAG, triacylglyceroly; MK, mastné kyseliny; AMPK, AMP-aktivovaná proteinová kináza; 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; NEFA, neesterifikované mastné kyseliny. Převzato a upraveno z (Flachs et al., 2013).

3. Cíle

V naší laboratoři již byl prokázán benefiční vliv *n*-3 PUFA ve formě TG přidaných do diety s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje, tj. s vysokým obsahem *n*-6 MK. Jak již bylo popsáno v literárním přehledu (kapitola 4.3.2 a 4.3.3), příjem *n*-3 PUFA (EPA a DHA) zejména pak v kombinaci s mírnou kalorickou restrikcí měl pozitivní vliv na úbytek hmotnostního přírůstku, adipozitu, glukózovou homeostázi, akumulaci tuku v játrech a metabolity v plazmě. Dietní intervence také ovlivnila genovou expresi mitochondriální biogeneze a lipidového metabolismu (Flachs et al., 2013).

Do popředí zájmu se v současné době dostává i reesterifikace MK uvolněných lipolýzou rovnou zpět do adipocytu (TG/MK prázdné cyklování) v bílé tukové tkáni a jeho ovlivnění ve vztahu k obezitě a metabolickému syndromu. Již dříve byl publikován možný účinek *n*-3 PUFA na tento cyklus (Janovská et al., 2013; Flachs et al., 2011).

Základním cílem této diplomové práce bylo pomocí kvantitativní PCR analýzy změřit expresi vybraných genů zapojených do TG/MK prázdného cyklování v bílé tukové tkáni. Jako zástupci drah zapojených do prázdného cyklování v bílé tukové tkáni bylo vybráno pět genů: i) ATGL a ii) HSL – zástupci lipolytické dráhy, iii) DGAT1 – zástupce esterifikace exogenně přijatých MK, iv) DGAT2 – zástupce syntézy TG *de novo* a inkorporace endogenně vzniklých MK do TG a v) PEPCCK, který je klíčovým enzymem v glyceroneogenní dráze. Jako hlavní depa bílé tukové tkáně pro porovnání exprese vybraných genů byla vybrána i) dorzolumbální ii), gonadální a iii) mezenterická tuková tkáň.

Specifické cíle:

- 1) vliv *n*-3 PUFA příp. v kombinaci s kalorickou restrikcí na expresi genů zapojených do TG/MK prázdného cyklování
- 2) rozdíl v účinku *n*-3 PUFA podávaných ve formě TG a fosfolipidů
- 3) vliv složení diety s vysokým obsahem tuku na účinek *n*-3 PUFA
- 4) rozdíl exprese klíčových genů mezi třemi základními tukovými depy

4. Materiál a metody

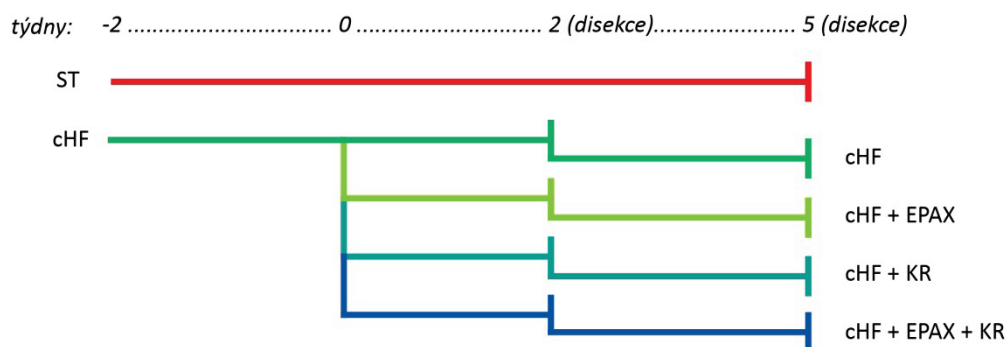
4.1. Pokusná zvířata a experimentální podmínky

Všechny tři zde popisované experimenty byly prováděny na samcích inbredního kmene myši C57BL/6. Jedná se o standartní laboratorní kmen myši se sklonem k rozvoji dietou indukované obezity. Zvířata byla chována samostatně v klecích s 12-hodinovým umělým světelným režimem při pokojové teplotě 22 °C. Po čtyřech až šesti týdnech podávání experimentální diety byly myši usmrceny cervikální dislokací v éterové narkóze. Odebrané vzorky tukové tkáně určené pro analýzu genové exprese byly zmrazeny v tekutém dusíku a následně uchovány při teplotě -70 °C.

4.2. Přehled experimentů

4.2.1. Experiment č. 1

Experiment č. 1 byl proveden v podobném uspořádání jako v publikaci (Flachs et al., 2011) se zaměřením na výzkum vlivu *n*-3 PUFA ve formě TG příp. v kombinaci s mírně sníženým kalorickým příjmem (10%) na expresi genů zapojených do TG/MK cyklování v bílých tukových depech. V pokusu bylo použito 52 myších samců ve věku 16 týdnů. Na začátku experimentu byla zvířata rozdělena do dvou skupin. První skupinu tvořila kontrolní skupina zvířat, která byla po celou dobu experimentu krmena standartní dietou s nízkým obsahem tuku (ST; R/M-H V1536-000 (firma Ssniff Spezialdiäten) *n*=5)). U druhé skupiny zvířat byla indukována obezita aplikací diety s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje (cHF; 35 hm. % obsah lipidů; *n*=26) po dobu 2 týdnů ad libitum. Poté byla tato skupina zvířat opět rozdělena (rovnoměrně podle tělesné hmotnosti) do skupin s různou dietní intervencí (Obr. 9).

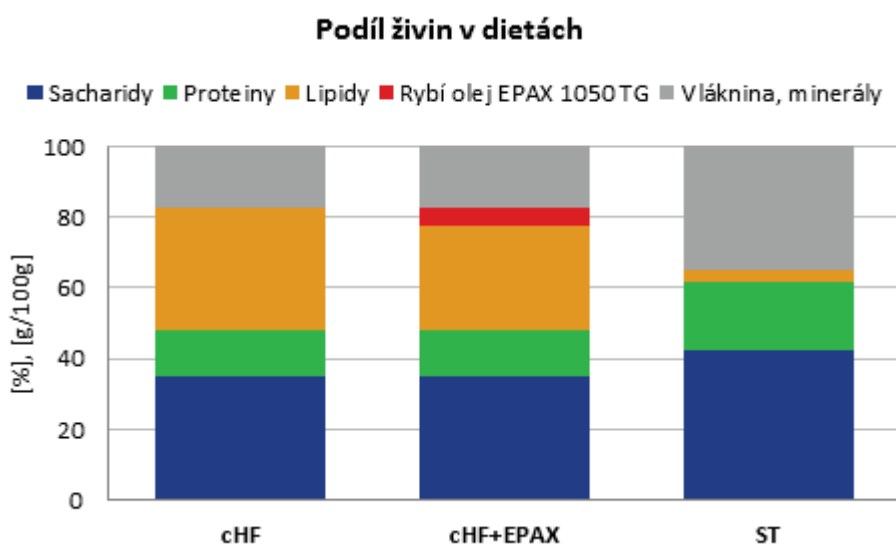


Obr. 9: Schéma experimentu č. 1. Barevné přímky znázorňují jednotlivé diety použité v experimentu. Na začátku experimentu byla zvířata krmena CHF nebo ST dietou. Po dvou týdnech byla CHF skupina rozdělena na další experimentální diety. Disekce probíhala po dvou a pěti týdnech od nasazení experimentálních diet. Standartní dieta (ST); dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje (CHF); dieta s přidavkem rybího oleje EPAX 1050 TG (CHF+EPAX); dieta v kombinaci s 10% kalorickou restrikcí (CHF+KR), dieta s přidavkem rybího oleje v kombinaci s kalorickou restrikcí (CHF + EPAX + KR).

Část zvířat krmených dva týdny CHF dietou zůstala dále krmená touto dietou ($n=12$). U zbylé části zvířat byla nasazena buď i) experimentální dieta s obsahem rybího oleje (CHF+EPAX; 46 hm.% DHA, 14 hm.% EPA; produkt EPAX 1050 Tg; EPAX Alesund, Norsko; $n=11$), kde bylo produktem EPAX nahrazeno 15 hm.% celkových lipidů v dietě nebo byla ii) indukována 10% kalorická restrikce (CHF+KR; $n=10$), kdy denní příjem energie byl snížen o 10 hm.% ve srovnání s příjmem u myší krmenných CHF dietou ad libitum anebo byla aplikována iv) kombinace rybího oleje i kalorické restrikce zároveň (CHF+EPAX+KR; $n=13$). Složení diet a schéma pokusu charakterizuje Tab 1. a Obr. 10. U zvířat na kalorické restrikci byl přiděl potravy vypočten podle kontrolní skupiny myší krmenné CHF dietou ad libitum, u které byla na začátku každého týdne zjištěna denní spotřeba potravy, a z této hodnoty se následně vypočetl přiděl potravy pro zvířata na 10% kalorické restrikci na celý týden. Vzorky pro analýzu genové exprese byly získány po dvou či pěti týdnech trvání pokusu od nasazení na experimentální diety.

Tab. 1: Složení a energetická hodnota jednotlivých diet aplikovaných v experimentu č. 1.

	cHF	cHF+EPAX	ST
Charakteristika diety	Vysoký obsah kukuřičného oleje	Vysokotuková dieta s přidavkem rybího oleje EPAX 1050TG bohatého na <i>n</i> -3 PUFA	Standartní dieta
Hrubá energetická hodnota [kJ/100 g]	2219	2219	1660
Složení diety (1 kg)	400 g standartní diety R/M-H, 340 g Sunaru, 10 g kukuřičného škrobu (Maizena), 250 g kukuřičného oleje (Oleofarm)	400 g standardní diety R/MH 340 g Sunaru 10 g kukuřičného škrobu (Maizena) 197,5 g kukuřičného oleje (Oleofarm) 52,5 g přípravku EPAX 1050 TG (přípravek EPAX obsahuje 150 mg/g EPA, 400 mg/g DHA a 4 mg/g α -tokoferolu)	R/M-H V1536-000 (firma Ssniff Spezialdiäten)



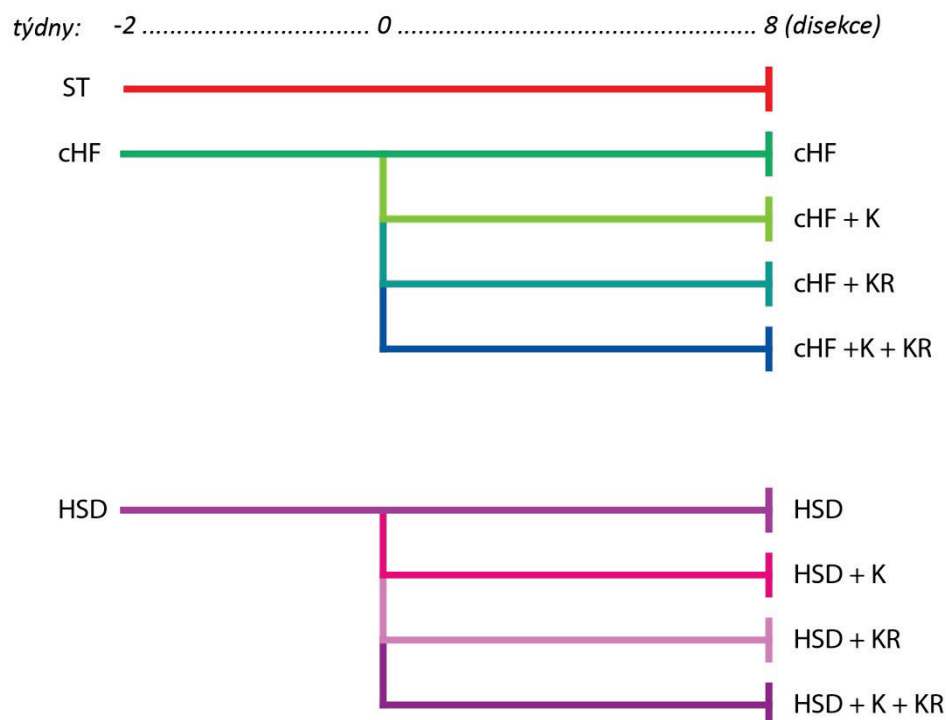
Obr. 10: Zastoupení živin v jednotlivých dietách aplikovaných v experimentu č. 1.

4.2.2. Experiment č. 2

V experimentu č. 2 jsme se zaměřili na účinek *n*-3 PUFA ve formě fosfolipidů (získaného z krilu) samotných nebo opět v kombinaci s mírnou kalorickou restrikcí. Pokus byl rozšířen o pozorování vlivu dvou diet s obsahem různých typů mastných kyselin, ale stejným energetickým obsahem, na změny genové exprese ve vztahu k suplementaci *n*-3 PUFA, kalorické restrikce nebo ke kombinované intervenci.

Na pokus bylo použito 68 myších samců ve věku 9–10 týdnů. Zvířata byla po dobu dvou týdnů krmena buď standartní dietou (ST; $n=4$) nebo u nich byla indukována obezita dietou s vysokým obsahem tuku. V tomto experimentu byly použity dva typy diet s vysokým obsahem tuku, jedna založená na vysokém obsahu kukuřičného oleje (CHF; $n=32$) a druhá s vysokým obsahem vepřového sádla (HSD; $n=32$). Schéma pokusu bylo podobné jako v experimentu č. 1. Na začátku experimentu byly myši rozděleny do třech skupin podle aktuální tělesné hmotnosti: i) standartní dieta, ii) CHF dieta a iii) HSD dieta. Dieta byla myším podávána po dobu 2 týdnů ad libitum a poté byla zvířata rozdělena do skupin s různou dietní intervencí (Obr. 11) podobně jako v experimentu č. 1.

Kontrolní zvířata na ST dietě měla v průběhu celého experimentu stejný typ diety. Část zvířat krmených CHF či HSD dietou byla dále krmena těmito dietami s vysokým obsahem tuku. U zbylé části zvířat byla nasazena experimentální dieta s přidavkem krilu (CHF+K nebo HSD+K; $n=8$) nebo byla indukována 10% kalorická restrikce (CHF+KR nebo HSD+KR; $n=8$) anebo byla aplikována kombinace krilu i kalorické restrikce současně (CHF+K+KR nebo HSD+K+KR; $n=8$). Tabulka 2 (Tab. 2) a obrázek 12 (Obr. 12) shrnuje složení diet použitých v tomto experimentu. Příděl diety pro skupiny s kalorickou restrikcí byl počítán stejně jako v experimentu č.1 s tím rozdílem, že základem k výpočtu spotřeby potravy byla kromě spotřeby myši na CHF dietě ad libitum i skupina myši na HSD dietě ad libitum. Experiment č. 2 byl ukončen po osmi týdnech od nasazení myši na experimentální diety.

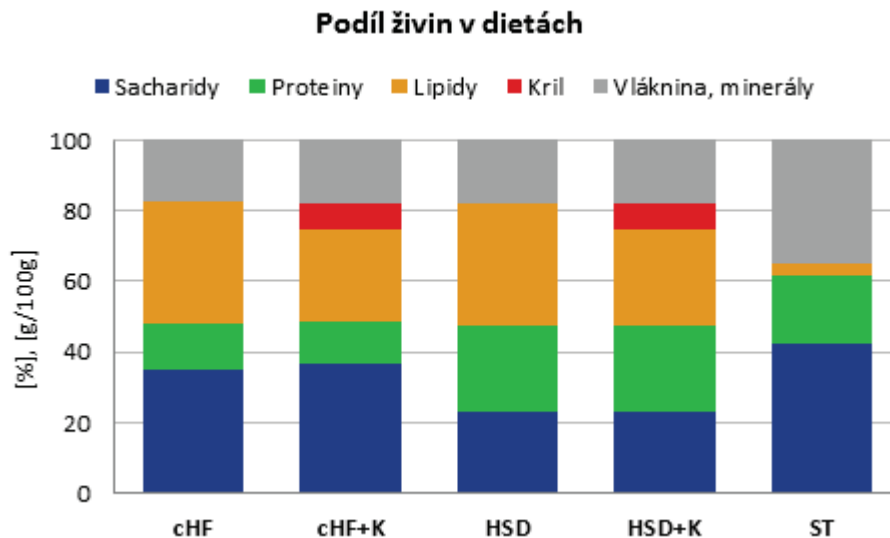


Obr. 11: Schéma experimentu č. 2. Barevné přímky znázorňují jednotlivé diety použité v experimentu. Na začátku experimentu byla zvířata krmena CHF, HSD nebo ST dietou. Po dvou týdnech byly nasazeny experimentální diety. Disekce probíhala po osmi týdnech od nasazení experimentálních diet. Standartní dieta (ST); dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje (CHF); dieta s vysokým obsahem vepřového sádla (HSD); dieta s přidavkem krilu (CHF+K; HSD+K); dieta v kombinaci s 10% kalorickou restrikcí (CHF+KR; HSD+KR); dieta s přidavkem krilu v kombinaci s kalorickou restrikcí (CHF + K + KR; HSD+K+KR).

Tab. 2: Složení a energetická hodnota jednotlivých diet aplikovaných v experimentu č. 2.

*Kril – obsah n-3 PUFA = 20,6 g/100g (EPA 13,6 g/100g, DHA 7 g/100g + 400 mg/kg Astaxanthin).

	cHF	cHF+K	HSD	HSD+K	ST
Charakteristika diety	Vysoký obsah kukuřičného oleje	Vysokotuková dieta s přídavkem oleje bohatého na n-3 MK původem z antarktického krilu	Vysoký obsah vepřového sádla	Vysokotuková dieta založená na HSD dietě, ve které je 23 % vepřového sádla nahrazeno krilem	Standartní dieta
Hrubá energetická hodnota [kJ/100 g]	2219	2189	2400	2400	1660
Složení diety (1 kg)	400 g standartní diety R/M-H, 340 g Sunaru, 10 g kukuřičného škrobu (Maizena), 250 g kukuřičného oleje (Oleofarm)	400 g standartní diety R/M-H, 340 g Sunaru, 10 g kukuřičného škrobu (Maizena), 177 g kukuřičného oleje (Oleofarm) 72,8 g oleje z antarktického *krilu (Euphausia Superba)	Semi-syntetická dieta objednaná u firmy Ssniff Spezialdiäten (kód diety: D12492)	Semi-syntetická dieta na bázi HSD diety (kód diety: D12492) objednaná u firmy Ssniff Spezialdiäten, 72,8g vepřového sádla je nahrazeno krilem (Euphausia Superba)	R/M-H V1536-000 (firma Ssniff Spezialdiäten)

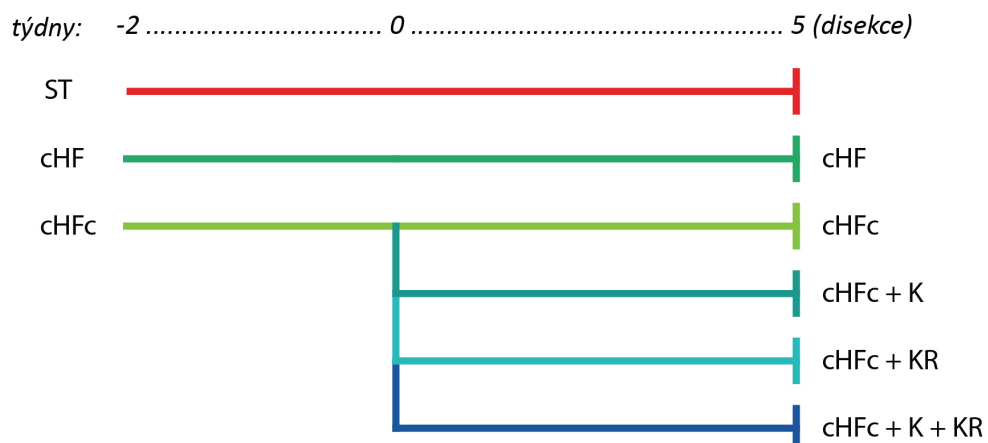


Obr. 12: Zastoupení živin v jednotlivých dietách aplikovaných v experimentu č. 2.

4.2.3. Experiment č. 3

Vzhledem k tomu, že dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje (cHF) má snížený obsah proteinu ve srovnání s kontrolní dietou ST (12 hm.% vs. 17 hm.%), rozhodli jsme se zjistit zda větší příjem proteinu (kaseinu) v cHF dietě (cHFc) neovlivní změny v expresi sledovaných genů ve vztahu k *n*-3 PUFA.

Na pokus bylo použito 46 myších samců ve věku 12 týdnů a schéma pokusu bylo podobné jako v experimentu č. 1. Jako kontrolní skupiny byly použity myši krmené ST ($n=6$) a cHF ($n=8$) dietou po celou dobu experimentu. U ostatních zvířat byla po dobu dvou týdnů indukována obezita dietou s vysokým obsahem kukuřičného oleje s vyšším množstvím proteinu (cHFc; suplementace kaseinem; $n=24$). Po dvou týdnech byly myši na cHFc dietě rozděleny do skupin s různou dietní intervencí (Obr. 13): i) experimentální dieta s obsahem krilu (cHFc+K; $n=8$) nebo ii) byla indukována 10% kalorická restrikce (cHFc+KR; $n=8$) anebo iii) byla aplikována kombinace suplementace krilu i kalorické restrikce zároveň (cHFc+KR+K; $n=8$). Tabulka 3 (Tab.3) a obrázek č.14 (Obr. 14) shrnuje složení diet použitých v tomto experimentu. U zvířat na kalorické restrikci byl přiděl potravy vypočten podle skupiny myši krmené dietou cHFc ad libitum, stejně jako v experimentu č. 1. Experiment č. 3 byl ukončen po pěti týdnech od nasazení myši na experimentální diety.

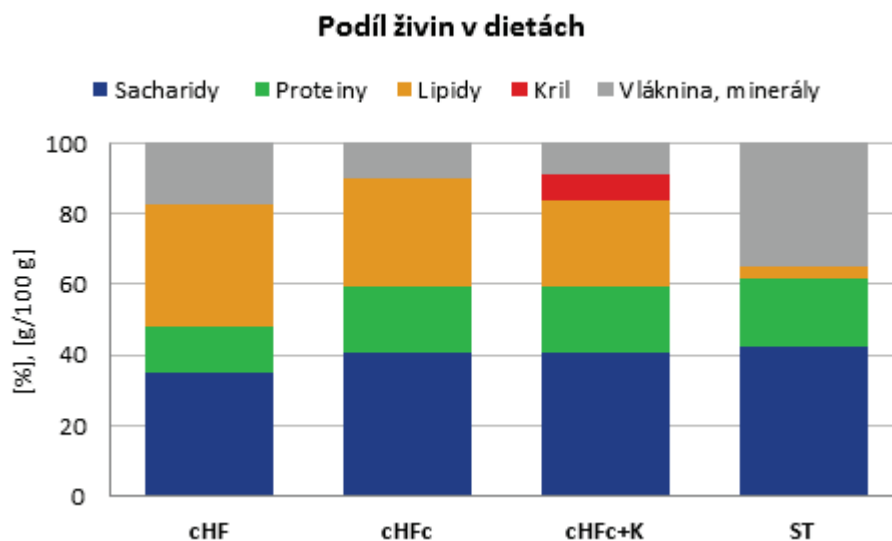


Obr. 13: Schéma experimentu č. 3. Barevné přímky znázorňují jednotlivé diety použité v experimentu. Na začátku experimentu byla zvířata krmena ST, cHF nebo cHFc dietou. Po dvou týdnech byly myši na cHFc nasazeny experimentální diety. Disekce probíhala po pěti týdnech od nasazení experimentálních diet. Standartní dieta (ST); dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje (cHF); dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje a přídavkem kaseinu (cHFc); dieta s přídavkem krilu (cHFc+K); dieta v kombinaci s 10% kalorickou restrikcí (cHFc+KR); dieta s přídavkem krilu v kombinaci s kalorickou restrikcí (cHFc+K+KR).

Tab. 3: Složení a energetická hodnota jednotlivých diet aplikovaných v experimentu č. 3.

*Kril – obsah n-3 PUFA = 20,6 g/100g (EPA 13,6 g/100g, DHA 7 g/100g + 400 mg/kg Astaxanthin).

	cHF	cHFc	cHFc+K	ST
Charakteristika diety	Vysoký obsah kukuřičného oleje	Vysoký obsah kukuřičného oleje s přidavkem kaseinu	Vysokotuková dieta s přidavkem caseinu a oleje bohatého na n-3 MK původem z antarktického krilu	Standartní dieta
Hrubá ener-getická hodnota [kJ/100 g]	2219	2060	2060	1660
Složení diety (1 kg)	400 g standartní diety R/M-H, 340 g Sunaru, 10 g kukuřičného škrobu (Maizena), 250 g kukuřičného oleje (Oleofarm)	370,8 g standartní diety R/M-H, 315,2 g Sunaru, 9,3 g kukuřičného škrobu (Maizena), 231,8 g kukuřičného oleje (Oleofarm) 73 g kaseinu	370,8 g standartní diety R/M-H, 315,2 g Sunaru, 9,3 g kukuřičného škrobu (Maizena), 159 g kukuřičného oleje (Oleofarm) 73 g kaseinu, 72,8 g krilu (Euphausia Superba)	R/M-H V1536-000 (firma Ssniff Spezialdiäten)



Obr. 14: Zastoupení živin v jednotlivých dietách aplikovaných v experimentu č. 3.

4.3. Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí metody Guanidium thiokyanát-fenol-chloroformové extrakce (Chomczynski and Sacchi, 1987). Guanidiumthiokyanát a fenol jsou dodávány firmou Invitrogen ve společném roztoku pod komerčním názvem TRIzol. S výjimkou centrifugací, které byly prováděny ve 4 °C, probíhaly všechny kroky izolace za pokojové teploty. Při práci s RNA byly vždy používány rukavice a zvláště vyčleněné pipety, chemikálie a roztoky pouze pro práci s RNA, aby se snížilo riziko kontaminace vzorků všudypřítomnými ribonukleázami.

4.3.1. Homogenizace

Zmražený vzorek tukové tkáně (cca 100 mg) byl homogenizován ve vymražených bločcích pomocí keramické kuličky v 1 ml TRIzolu po dobu 2–3 minut v oscilačním mlýnu MM400 (Retsch). Homogenát byl následně centrifugován 10 minut při 12 000 g ve 4 °C. Do nové mikrozkuhavky byla odebrána růžová mezifáze obsahující RNA a inkubována za pokojové teploty 5 minut. V tomto kroku je zvláště důležité nekontaminovat vzorek horní fázi obsahující tuk.

4.3.2. Separace fází

Pro separaci fází bylo přidáno 0,2 ml chloroformu/1ml TRIzolu a směs byla vortexována 20 sekund a následně inkubována 10 minut při pokojové teplotě. Jednotlivé fáze byly separovány centrifugací 15 minut při 14 000 g ve 4 °C. Do nové mikrozkuhavky byla opatrně odebrána vrchní vodná čirá fáze obsahující RNA.

4.3.3. Precipitace RNA

K odebrané vodné fázi bylo přidáno 0,5 ml izopropanolu (0,5 ml/1ml Trizolu). Vzorky se několikrát protřepaly v ruce a inkubovaly při pokojové teplotě 10 minut. Dále se centrifugovaly 10 minut při 12 000 g ve 4°C. Na dně mikrozkuhavky došlo k vysrážení RNA ve formě gelovitého peletu.

4.3.4. Promývání RNA

Po odebrání supernatantu byl přidán 1 ml 75% ethanolu (1 ml ethanolu/1 ml Trizolu). Po zvortexování se uvolnil dobře viditelný pelet. Vzorek byl dále opět centrifugován 5 minut při

12 000 g ve 4°C a následně byl odebrán supernatant. Pelet se sušil cca 5 minut při 40°C na rotační vakuové odparce (VR-1 Heto, Thermo Scientific, USA).

4.3.5. Rozpuštění a stanovení koncentrace RNA

Získaná RNA byla rozpouštěna 15 minut při 60 °C v adekvátním množství ultračisté vody dle velikosti peletu (gonadální a dorzolumbální tuk v 11 µl a mezenterický ve 20 µl). Během rozpouštění byly vzorky každých 5 minut vortexovány. Po dokončení izolace RNA byla změřena její koncentrace a ověřena čistota RNA pomocí UV spektrofotometru Nanodrop. RNA dosahuje absorbního maxima při 260 nm vlnové délky na rozdíl od proteinů, které dosahují absorbního maxima při 280 nm vlnové délky. Poměr absorbancí 260/280 vyjadřuje míru znečištění vzorku proteiny a ideálně by se tento poměr měl pohybovat okolo 2. Nízké hodnoty tohoto poměru značí kontaminaci proteiny. Kontrolován byl i poměr absorbancí 260/230, který by se měl ideálně nacházet v rozmezí 1,8-2. Nižší poměr signalizuje kontaminaci vzorku různými organickými látkami (v tomto případě zejména fenoly). Vzorky vyizolované RNA byly dále skladovány v -80 °C.

4.4. Reverzní transkripce

Aby bylo možné měřit genovou expresi, je třeba ze směsi vyizolované RNA získat pouze mRNA kódující dané geny. Toho bylo dosaženo použitím primeru polyT oligonukleotidu, který je komplementární k sekvenci polyA na 3' konci mRNA. Pro měření genové exprese metodou kvantitativní PCR je dále třeba převést získanou mRNA na komplementární DNA (cDNA), která je dále použita jako templát pro PCR reakci.

Ve vysvíceném UV dekontaminačním boxu byly nejdříve připraveny zásobní roztoky A a B (Tab. 4). Roztok A se smísil s jednotlivými vzorky v takovém poměru, aby byl v každé reakci 1 µg RNA a reakční objem před přidáním roztoku B tvořil 12 µl.

Tab. 4: Složení roztoků A a B na reverzní transkripci.

Mix A	Počet μl na 1 reakci
Oligo T primer	0,5
Ultračistá voda	8
Mix B	Počet μl na 1 reakci
5 x pufr	4
DTT	2
dNTP mix	1
M-MLV RT	1

Vzorek RNA s mixem A byl denaturována 5 minut při 65 °C a poté byl rychle schlazen na 4 °C. Dále bylo přidáno 8 μl mixu B a reakce probíhala dalších 50 minut při 37 °C. Nakonec proběhla denaturace při 72 °C a zchlazení na 4 °C. Pro vlastní qPCR reakci byly vzorky cDNA 20x naředěny ultračistou vodou, aby pufr z reverzní transkripce neovlivňoval podmínky PCR reakce.

4.5. Kvantitativní PCR (qPCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce je laboratorní technika molekulární biologie založená na současně probíhající amplifikaci a detekci množství cDNA v každém cyklu reakce. Množství PCR produktu narůstá exponenciálně a je měřeno pomocí fluorescenční sondy, která poskytuje nárůstající signál fluorescence přímo úměrný k nově vytvořenému PCR produktu. Aby reakce probíhala optimálně, je velmi důležité správně navrhnout primery. Primery byly navrženy pomocí softwaru Lasergene 7.1 (DNA Star) tak, aby splňovaly následující kritéria: délka produktu 70–220 pb, délka primeru 17–24 pb, nasedání obou párů primerů při teplotě 60 ± 2 °C. Primery s tendencí tvořit dimery a vlásenky byly vyřazeny. Aby nedošlo ke kontaminaci genomickou DNA byly primery navrženy do dvou různých exonů, mezi nimiž je dlouhý intron nebo na přechod intronu a exonu. Seznam použitých primerů je uveden v Tabulce 5.

Tab. 5: Seznam použitých primerů.

Gen	Kód GenBank	Sekvence	Délka produktu [bp]	Teplota nasedání [°C]
EF-1 α 1	13627	5'TGACAGCAAAAACGACCCACCA 5'GGGCCATCTTCCAGCTTCTTACCA	192	58,6
β -aktin	11461	5'GAACCCTAAGGCCAACCGTGAAAA GAT 5'ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	434	60,2
PEPCK	18534	5'GGCAGCATGGGGTGTTTGTAGGA 5'TTTGCCGAAGTTGTAGCCGAAGAAG	248	60,5
ATGL	66853	5'GGCAATCAGCAGGCAGGGTCTTTA 5'GCCAACGCCACTCACATCTACG	248	60,6
HSL	16890	5'TGCGCCCCACGGAGTCTATGC 5'CTCGGGGCTGTCTGAAGGCTCTGA	137	60,8
DGAT1	13350	5'TGGCCAGGACAGGAGTATTTTGA 5'CTCGGGCATCGTAGTTGAGCA	249	59,6
DGAT2	67800	5'CCAGCCCCCAGGTGTCAGAGGAG 5'GGGGCCGACGGGTCCAGAAGAAG	99	60,1

Měření probíhalo na přístroji LightCycler® 480 Real-Time PCR System od firmy Roche na 96-jamkové bílé destičce. Jako kit byl použit The LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 2x koncentrovaný a voda v PCR kvalitě. V Tabulce 6 je uvedeno složení reakční směsi pro qPCR reakci.

Tab. 6: Složení reakční směsi pro qPCR reakci.

Složka	Přidaný objem [μl] na1 vzorek
2 x Master mix roztok	5
Voda	3
5' primer	0,5
3' primer	0,5
cDNA (20x naředěná)	1
Celkem	10

Během qPCR reakce proběhla nejprve počáteční denaturace. Poté 45 cyklů, ve kterých se opakovala fáze denaturace, nasednutí primerů a elongace. Fluorescence byla měřena na konci každé elongační fáze. V závěru měření proběhla denaturační analýza, kdy dochází k postupnému kontinuálnímu zahřívání vzorků až na 98 °C. Dosáhne-li teplota určitého stupně, při kterém produkt již denaturuje, dvouvláknová DNA se rozpadne na jednovláknovou. Přitom dojde k uvolnění interkalačního činidla z vazby dvouvláknového

řetězce a fluorescence skokově klesne. Takto lze se záznamu fluorescence měřené v průběhu denaturační analýzy odvodit teplotu tání DNA, která by měla být pro všechny vzorky obsahující identický produkt stejná. Z grafu závislosti fluorescence na teplotě tání by mělo být patrné pouze jedno maximum fluorescence. Tím lze ověřit specifitu vzniklého produktu, nepřítomnost dimerů primerů a vyloučí se tak možnost kontaminace vzorku genomickou DNA. V Tabulce 7 je znázorněn průběh jednotlivých fází qPCR reakce na přístroji LightCycler® 480 System.

Tab. 7: Nastavení jednotlivých fází RT-PCR reakce na přístroji LightCycler® 480 System.

	Cílová teplota [°C]	Doba udržování teploty [s]	Rychlost změny teploty [°C/s]
Počáteční denaturace	95	300	4,4
Amplifikace 45 cyklů			
Denaturace	95	10	4,4
Nasednutí primerů	60	20	2,2
Elongace	72	20	4,4
Denaturační analýza			
Denaturace	95	5	4,4
Renaturace	65	60	2,2
Postupná denaturace	97	–	–
Zchlazení	40	10	1,5

4.5.1. Vyhodnocení množství transkriptu

Vzorky byly měřeny ve dvou paralelních dubletech a použit jejich průměr. Ke zjištění přesného množství PCR produktu byla použita metoda absolutní kvantifikace. Z jednoho ze vzorků byla vytvořena ředící řada, ze které byla spočítána kalibrační křivka. Podle té bylo stanoveno přesné množství koncentrace PCR produktu. Vzorky pro vytvoření kalibrační přímky byly ředěny 1x, 2x, 4x a 5x. Negativní kontrolu tvořila reakční směs bez měřeného vzorku. Výsledky změřené exprese genů byly standardizovány pomocí „house-keeping“ genů. Jedná se o referenční geny, jejichž exprese je co nejvíce podobná u všech sledovaných skupin. Jako referenční geny byly použity EF-1- α 1 a β -aktin. Hodnota absolutní genové exprese byla vydělena geometrickým průměrem těchto referenčních genů. Pro porovnávání genové exprese mezi jednotlivými tukovými depy byla využita metoda $2^{-\Delta\Delta C_T}$ na analýzu dat absolutní kvantifikace mezi různými tkáněmi (Livak and Schmittgen, 2001). Hodnota absolutní genové exprese (standardizována „house-keeping“ geny) byla navíc vydělena koeficientem, který

tvořila exponenciála o základu 2, kde exponent byl spočítán z rozdílu C_T „house-keeping“ genů a konkrétního sledovaného genu, a od této hodnoty se odečetla hodnota jednoho vybraného srovnávacího genu pro všechny porovnávané tkáně.

4.6. Materiál

4.6.1. Přístroje

automatické pipety v rozsahu 0,2 – 1000 µl	Gilson, Francie
centrifuga Universal 320 R	Hettich, Německo
LightCycler® 480 Systém	Roche, Německo
mini centrifuga	Labnet, USA
multikanálová pipeta	Gilson, Francie
Oscilační mlýn Mill MM400	Retsch, Německo
přístroj na reverzní transkripci TGradient	Biometra, Německo
spektrofotometr NanoDrop	NanoDrop, USA
termoblok	Biometra, Německo
váhy ADAM	Adam Equipment, Velká Británie
vakuová sušička VR-1 Heto	Thermo Scientific, USA
vortex	Scientific Industries, USA

4.6.2. Chemikálie

5x pufr pro reverzní transkripci	Invitrogen, Německo
adeninové nukleotidy (AMP, ATP)	Sigma, USA
diethylether	Penta, ČR
dithiotreitol (DTT)	Sigma, USA
dNTP	Invitrogen, Německo
DTT	Invitrogen, Německo
EDTA	Serva, Německo
ethanol	Penta, ČR
H ₂ O, PCR kvalita	Roche, Německo
chloroform	Penta, ČR
izopropanol	Serva, Německo
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Německo
M-MLV reverzní transkriptáza	Invitrogen, Německo
oligo thymidin	Generi Biotech, ČR
primery pro PCR	Generi Biotech, ČR
TRIzol	Sigma, USA

4.7. Statistické vyhodnocení

Vyhodnocení exprese genů bylo popsáno v kapitole 6.5.1. Pro statistické zpracování dat byl použit program Sigma Stat. Pro porovnání změny exprese genu v rámci jednoho depa a jednoho experimentu byla použita jednocestná ANOVA. Pro porovnání exprese jednoho genu mezi třemi typy tukových dep v rámci jednoho experimentu byla použita dvoucestná ANOVA. Pokud data neprošla normálním rozložením, byla normalizována transformací v nabídce programu Sigma Stat. Všechny výsledky jsou prezentovány jako průměry a variability jsou vyjádřeny jako střední chyby výběrového průměru (SE).

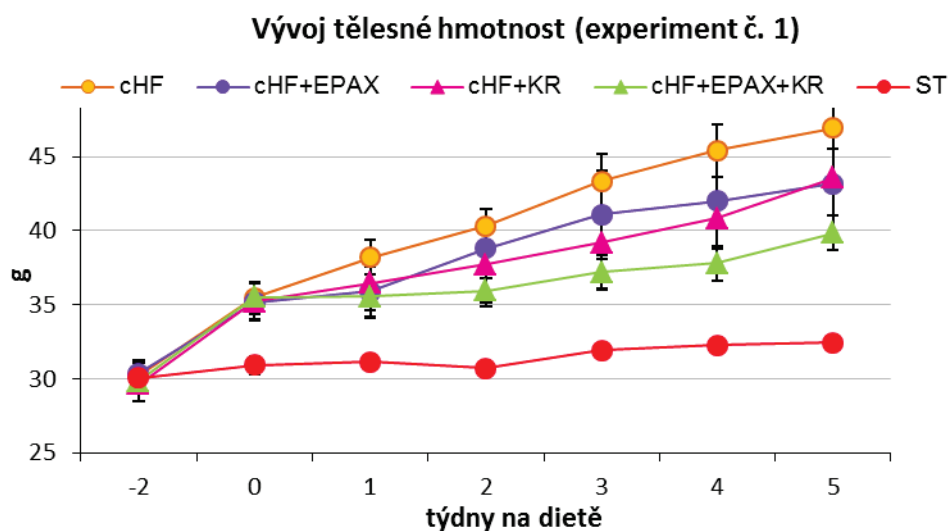
5. Výsledky

5.1. Experiment č. 1

V experimentu č. 1 byly všechny skupiny myší krmeny CHF dietou s vysokým obsahem kukuřičného oleje. U skupiny (CHF+EPAX) byla dieta obohacena o EPA/DHA původem z rybího oleje ve formě TG. U skupiny (CHF+KR) byla aplikována 10% kalorická restrikce a u skupiny (CHF+EPAX+KR) bylo kombinováno podávání rybího oleje i 10% kalorické restrikce zároveň. Aby bylo možné zohlednit efekt délky aplikace experimentální diety, byla u všech skupin aplikována léčba ve dvou odlišných intervalech – po dobu dvou anebo pěti týdnů.

5.1.1. Vývoj hmotnosti a váha tukových dep

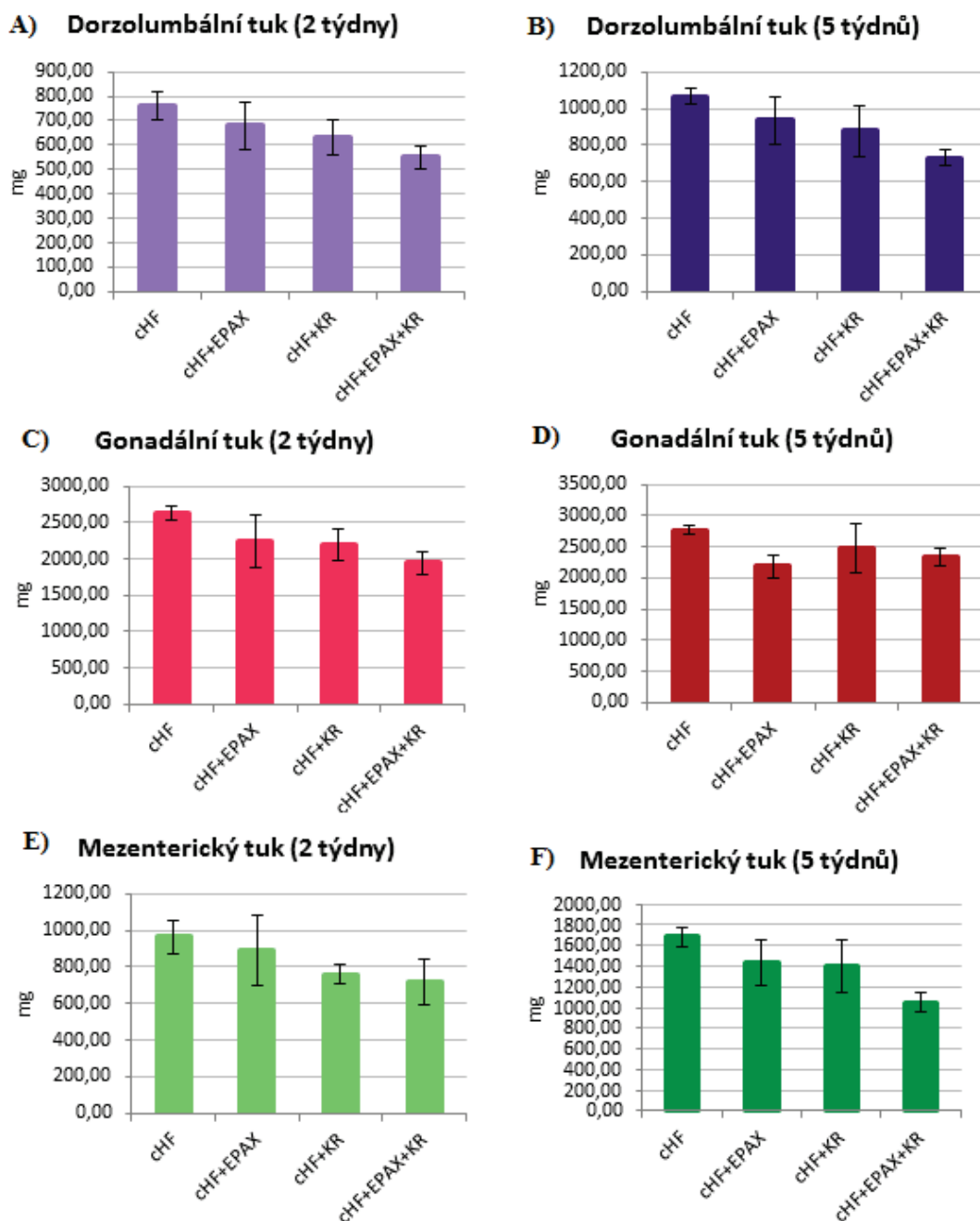
Jak již bylo publikováno (Flachs et al., 2011) i v experimentu č. 1 došlo po sedmi týdnech krmení CHF dietou k rozvoji obezity, dieta obohacená o *n*-3 PUFA ve formě TG (CHF+EPAX) tak i mírná kalorická restrikce (CHF+KR) snižovala přírůstek tělesné hmotnosti. Největší preventivní účinek na rozvoj obezity měla kombinovaná léčba (CHF+EPAX+KR) (Obr. 15).



Obr. 15: Vývoj tělesné hmotnosti myší během pokusu (experiment č. 1).

Experimentální diety měly vliv i na rozvoj hmotnosti bílých tukových dep, tendence zmírnění nárůstu všech tří dep byla zaznamenána již po dvou týdnech aplikace. Na konci experimentu měla kombinovaná léčba (CHF+EPAX+KR) nejvýraznější protektivní účinek na

nárůst hmotnosti všech sledovaných tukových dep ve srovnání se skupinou krmenou dietou s vysokým obsahem tuku, rozdíly však nebyly signifikantní (Obr. 16).

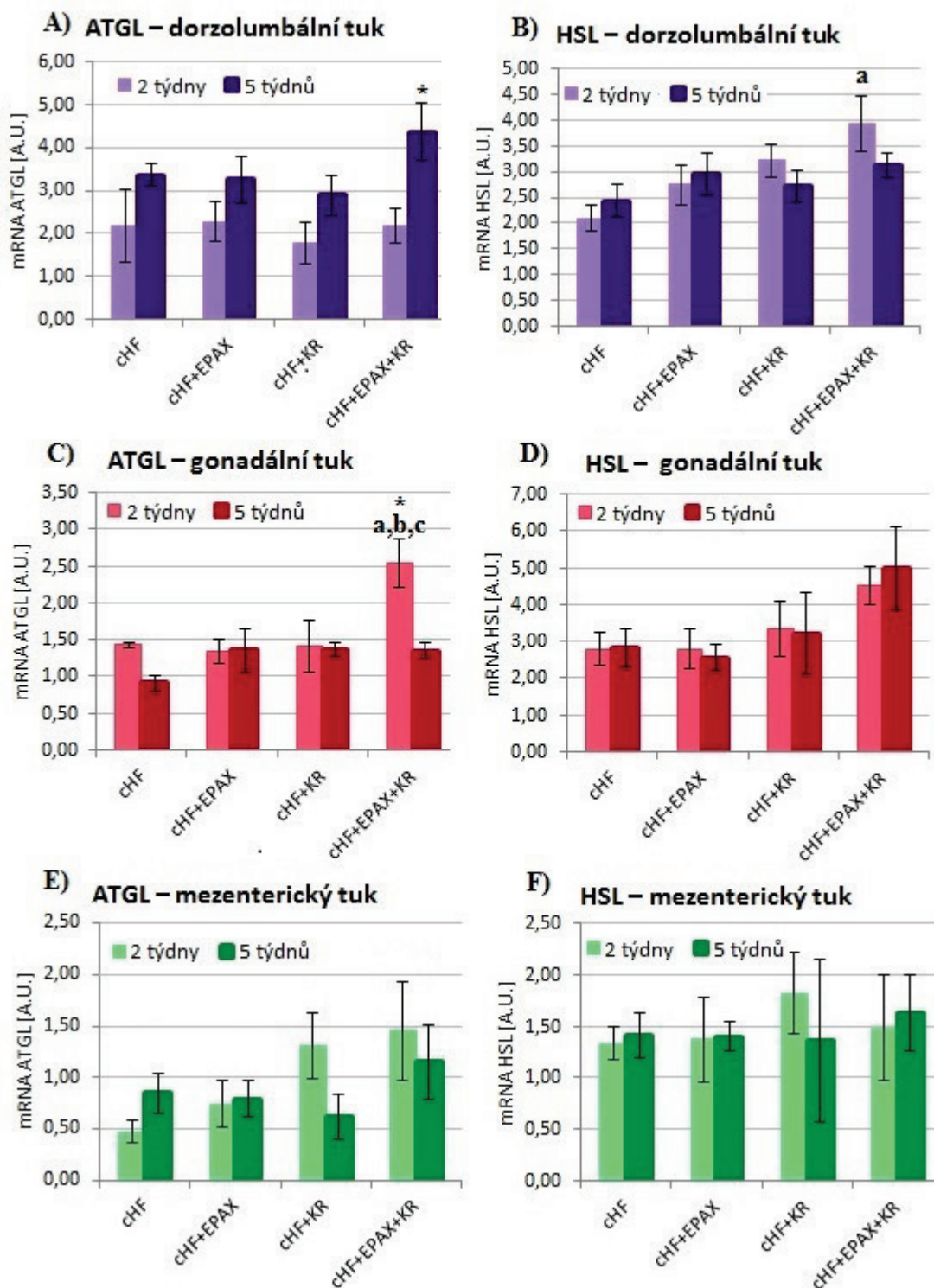


Obr. 16: Hmotnost dep dorzolumbálního, gonadálního a mezenterického tuku po dvou a pěti týdnech léčebné diety (experiment č. 1). V experimentu byly všechny skupiny krmeny dietou s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje (CHF). U skupiny (CHF+EPAX) byla dieta obohacena o EPA/DHA pocházející z rybího oleje. U skupiny (CHF+KR) byla aplikována pouze 10% kalorická restrikce (KR) nebo v kombinaci s rybím olejem (CHF+EPAX+KR).

5.1.2. Genová exprese

Vliv experimentálních diet na genovou expresi vybraných genů byl sledován ve dvou časových bodech a to po dvou a pěti týdnech intervence. Změna exprese vybraných genů byla porovnávána hlavně s genovou expresí skupiny myší na cHF.

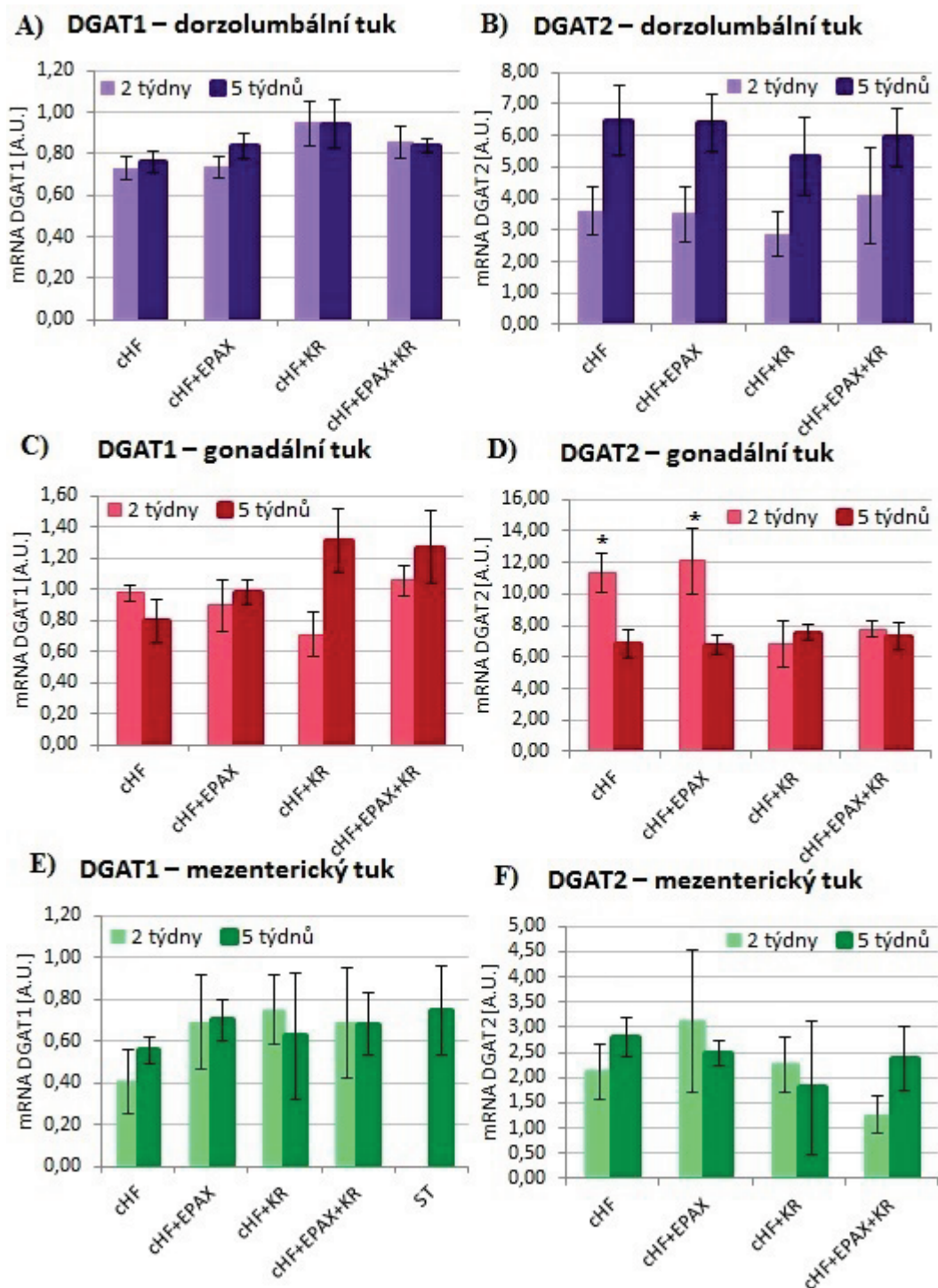
U vybraných genů zastupujících lipolytickou dráhu kombinace rybího oleje s 10% kalorickou restrikcí (cHF+EPAX+KR) signifikantně zvýšila po dvou týdnech aplikace expresi ATGL v gonadálním tuku. V mezenterickém tuku byl zaznamenán pouze trend na rozdíl od konce experimentu, kdy tato indukce byla pozorována už pouze v dorzolumbálním tuku. Nárůst exprese genu pro ATGL byl v dorzolumbálním tuku signifikantní mezi druhým a pátým týdnem experimentu u skupiny cHF+EPAX+KR. Dieta s *n*-3 PUFA kombinovaná s kalorickou restrikcí také po dvou týdnech signifikantně indukovala expresi genu pro HSL v dorzolumbálním tuku, v gonadálním tuku toto zvýšení nebylo tak výrazné. Na konci experimentu již nebyl naměřen žádný signifikantní nárůst exprese tohoto genu, zůstalo pouze trendové zvýšení v dorzolumbálním a gonadálním tuku (Obr. 17).



Obr. 17: Vliv experimentálních diet na expresi genů kódující lipolytické enzymy ATGL a HSL v dorzolumbálním (A, B), gonadálním (C, D) a v mezenterickém tukovém depu (E, F) ve dvou a pěti týdnech experimentu č. 1. V experimentu byly všechny skupiny krmeny dietou s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje (CHF). U skupiny (CHF+EPAX) byla dieta obohacena o EPA/DHA pocházející z rybího oleje. U skupiny (CHF+KR) byla aplikována pouze 10% kalorická restrikce (KR) nebo v kombinaci s rybím olejem (CHF+EPAX+KR). ^aSignifikantní rozdíl ve srovnání s CHF skupinou ad libitum, ^bsignifikantní rozdíl ve srovnání s CHF+EPAX, ^csignifikantní rozdíl mezi CHF+KR skupinou ($p=0,05$). *Signifikantní rozdíl genové exprese mezi skupinami se

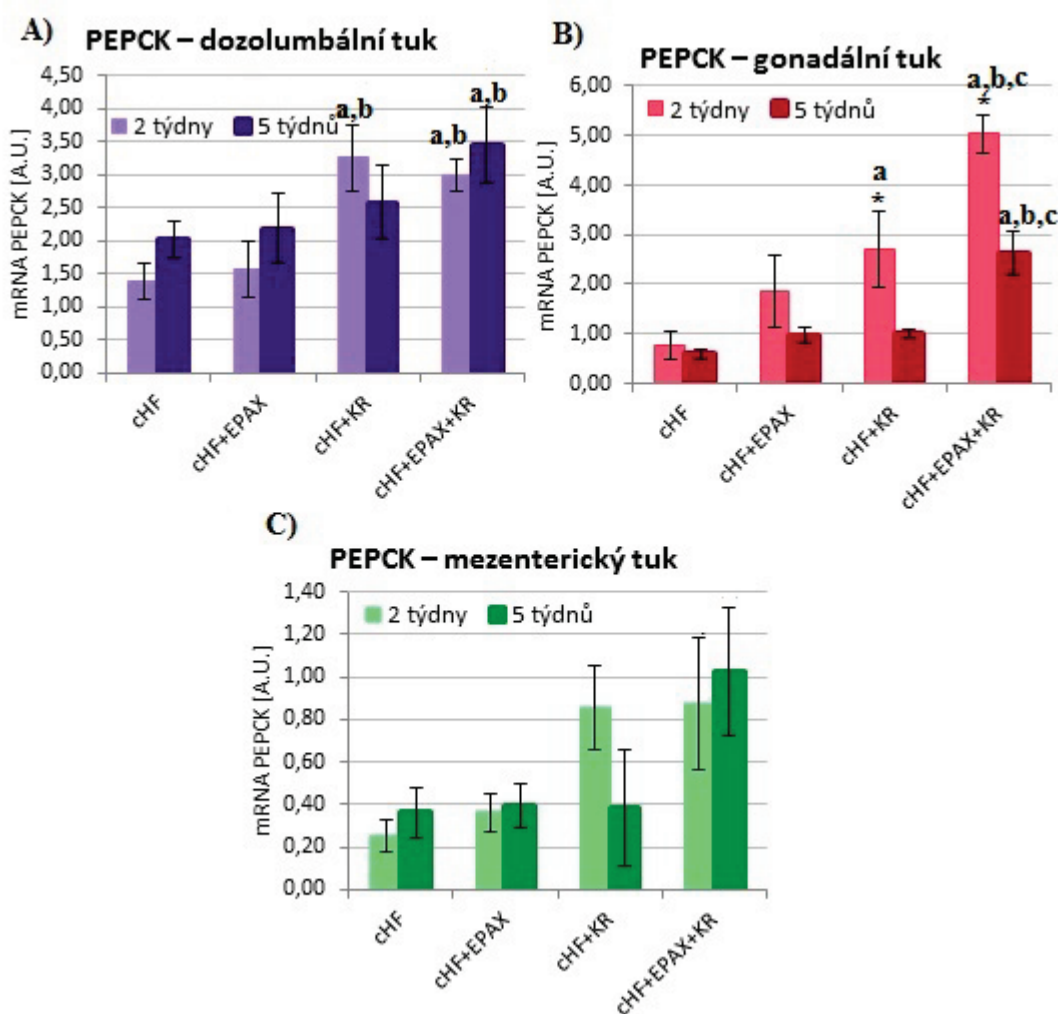
stejnými experimentálními dietami ve dvou a pěti týdnech ($p=0,05$). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (jednocestná a dvoucestná ANOVA).

Suplementace diety rybím olejem, 10% kalorická restrikce ani jejich vzájemná kombinace příliš neovlivnila expresi genů enzymů DGAT1 a DGAT2, spojených se syntézou TG a reesterifikací. V rámci dietní skupiny mezi druhým a pátým týdnem aplikace diety nebyla pozorována žádná výrazná změna, pouze v dorzolumbálním tuku náznak zvýšené exprese DGAT2 při aplikaci diety s vysokým obsahem tuku po delší dobu. Signifikantní pokles exprese genu pro DGAT2 byl pozorován mezi druhým a pátým týdnem experimentu ve skupinách CHF a CHF+EPAX v gonadálním tuku, opačný trend byl pozorován u genu pro DGAT1 u skupin s kalorickou restrikcí (CHF+KR; CHF+EPAX+KR). V mezenterickém tuku nebyl, pravděpodobně díky velkému rozptylu dat, pozorován žádný signifikantní rozdíl ani trend (Obr. 18).



Obr. 18: Vliv experimentálních diet na expresi genů enzymů DGAT1 a DGAT2 zahrnutých do biosyntézy triacylglycerolů a reesterifikace v dorzolumbálním (A, B), gonadálním (C, D) a mezenterickém tukovém depu (E, F) ve dvou a pěti týdnech experimentu č. 1. V experimentu byly všechny skupiny krmeny dietou s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje (CHF). U skupiny (CHF+EPAX) byla dieta obohacena o EPA/DHA pocházející z rybiho oleje. U skupiny (CHF+KR) byla aplikována pouze 10% kalorická restrikce (KR) nebo pak v kombinaci s rybím olejem (CHF+EPAX+KR). Experimentální dieta byla aplikována po dobu dvou nebo pěti týdnů. *Signifikantní rozdíl genové exprese mezi skupinami se stejnými experimentálními dietami ve dvou a pěti týdnech ($p=0,05$). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (jednocestná ANOVA).

Po dvou týdnech aplikace experimentálních diet došlo k signifikantnímu nebo trendovému (mezenterický tuk) nárůstu exprese genů pro klíčový enzym glyceroneogeneze PEPCK ve všech třech typech tukové tkáně u skupin s kalorickou restrikcí (cHF+KR a cHF+EPAX+KR). Na konci experimentu (po pěti týdnech aplikace) došlo k poklesu exprese tohoto genu v gonadálním tuku. Signifikantní (trendový u mezenterického tuku) nárůst exprese zůstal u skupiny s kombinovanou intervencí jak v dorzolumbálním, tak v gonadálním tuku (Obr. 19).

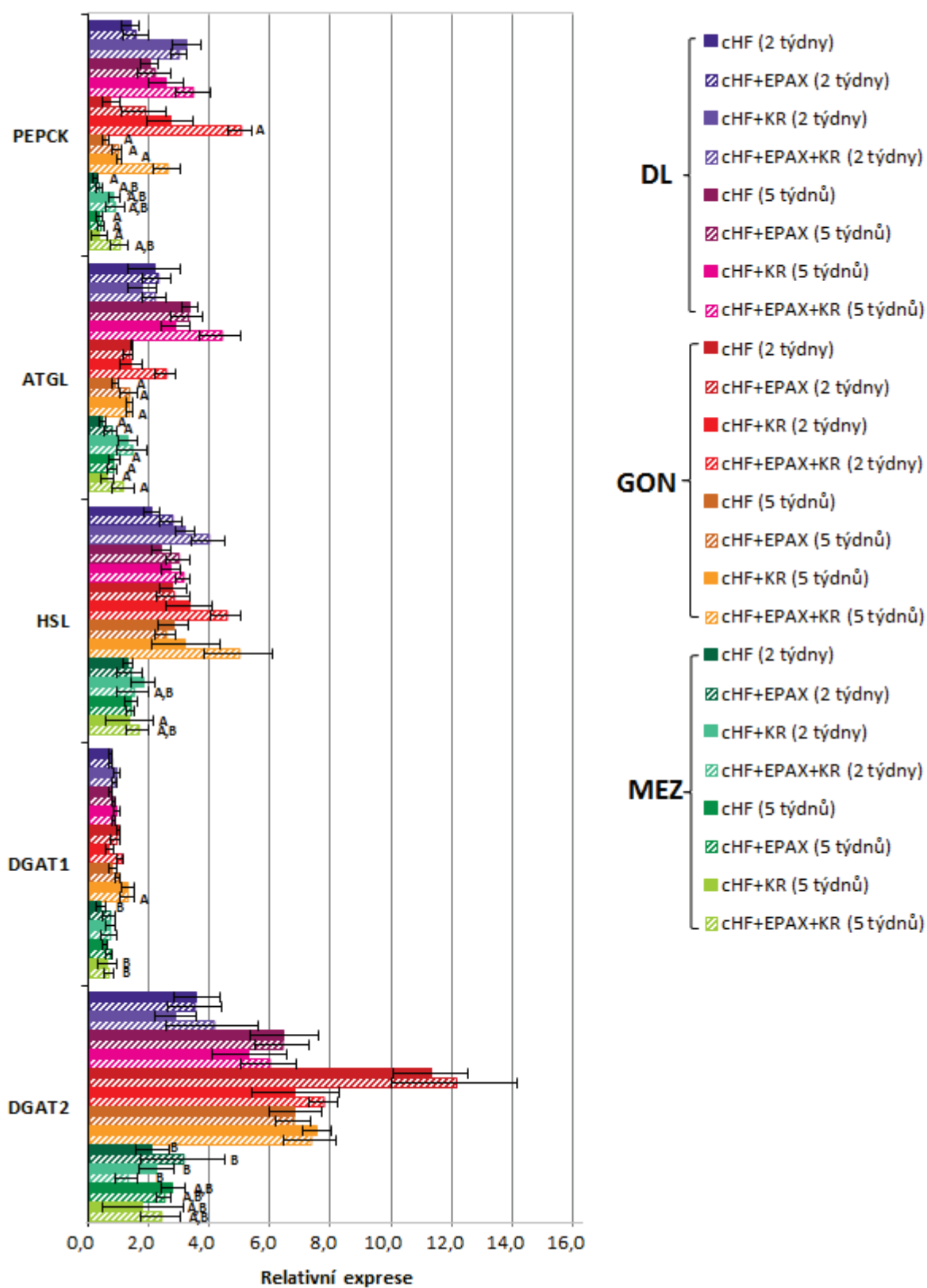


Obr. 19: Exprese genu kódujícího glyceroneogenní enzym PEPCK v dorzolumbální (A), gonadální (B) a mezenterické (C) tukové tkáni (experiment č. 1). V experimentu byly všechny skupiny krmeny cHF dietou s vysokým obsahem tuku původem z kukuřičného oleje. U skupiny (cHF+EPAX) byla dieta obohacena o EPA/DHA původem z rybího oleje. U skupiny (cHF+KR) byla aplikována 10% kalorická restrikce (KR) nebo kombinovaná aplikace rybího oleje i KR zároveň (cHF+EPAX+KR). Experimentální dieta byla aplikována po dobu dvou nebo pěti týdnů. ^aSignifikantní rozdíl v porovnání s cHF ad libitum; ^bSignifikantní rozdíl v porovnání s cHF+EPAX; ^cSignifikantní rozdíl v porovnání s cHF+EPAX+KR ($p<0,05$). *Signifikantní rozdíl genové exprese

mezi skupinami krmenými stejnou dietou mezi 2 a 5 týdnem ($p < 0,05$). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (jednocestná ANOVA).

V rámci experimentu č. 1 jsme se také pokusili porovnat zastoupení exprese genů jednotlivých metabolických drah mezi depy bílé tukové tkáně pomocí metody $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Vyšší exprese pro lipolytický gen ATGL probíhala hlavně v dorzolumbálním tuku (> gonadální tuk ~ mezenterický tuk) na rozdíl od druhého lipolytického genu pro HSL, jehož exprese byla srovnatelná jak v dorzolumbálním, tak gonadálním tuku (>> mezenterický tuk), stejně jako exprese genu pro DGAT2. Exprese genu klíčového enzymu glyceroneogeneze PECK byla zastoupena v tkáních podobně jako u genu pro ATGL. Genová exprese DGAT1 se nelišila mezi jednotlivými typy tkáně (Obr. 20).

Srovnání exprese mezi depy v experimentu č. 1



Obr. 20: Srovnání genové exprese mezi tukovými depy v experimentu č. 1. ^ASignifikantní rozdíl ve srovnání se stejnou dietou v dorzolumbálním tuku (DL); ^Bv gonadálním tuku (GON)

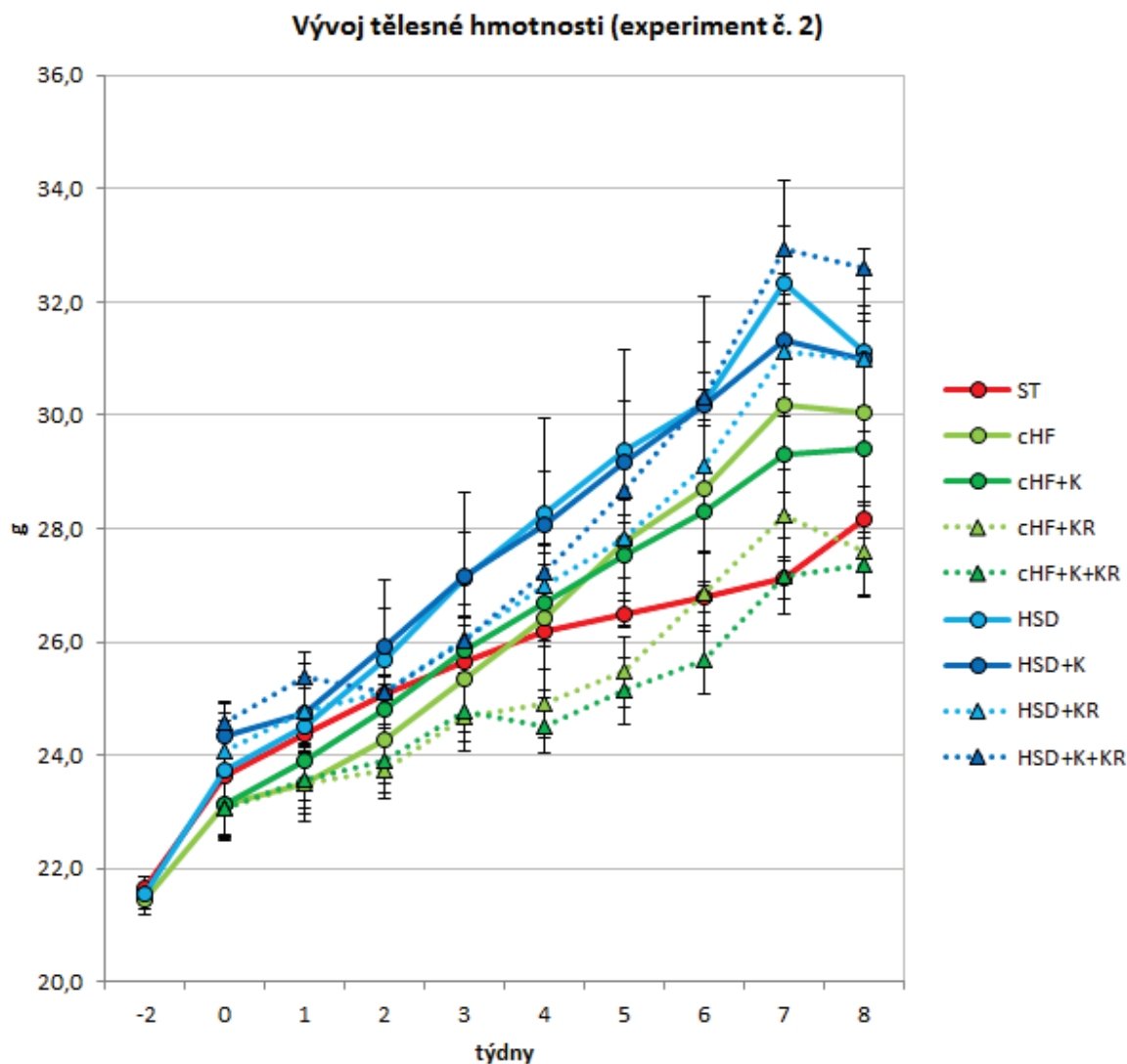
($p < 0,05$). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). Do statistiky nebyla zahrnuta standardní dieta (ST). DL, dorzolumbální tuk; GON, gonadální tuk; MEZ, mezenterický tuk; cHF, dieta s vysokým obsahem tuku založená na kukuřičném oleji; cHF+EPAX, dieta suplementovaná rybím olejem; cHF+KR, dieta s 10% kalorickou restrikcí; cHF+EPAX+KR, dieta kombinovaná se suplementací rybím olejem a 10% kalorickou restrikcí.

5.2. Experiment č. 2

V experimentu č. 2 byly aplikovány dva typy diet s vysokým obsahem tuku – cHF dieta s vysokým podílem kukuřičného oleje a HSD dieta s vysokým obsahem vepřového sádla. U jednotlivých skupin byla dieta s vysokým obsahem tuku obohacena o EPA/DHA původem z krilu (cHF+K; HSD+K), tj. ve formě fosfolipidů, nebo byla aplikována 10% kalorická restrikce (cHF+KR; HSD+KR) nebo kombinovaná léčba – suplementace krilu a kalorické restrikce (cHF+K+KR; HSD+K+KR). V experimentu byla zahrnuta i kontrolní standardní dieta s nízkým obsahem tuků (ST).

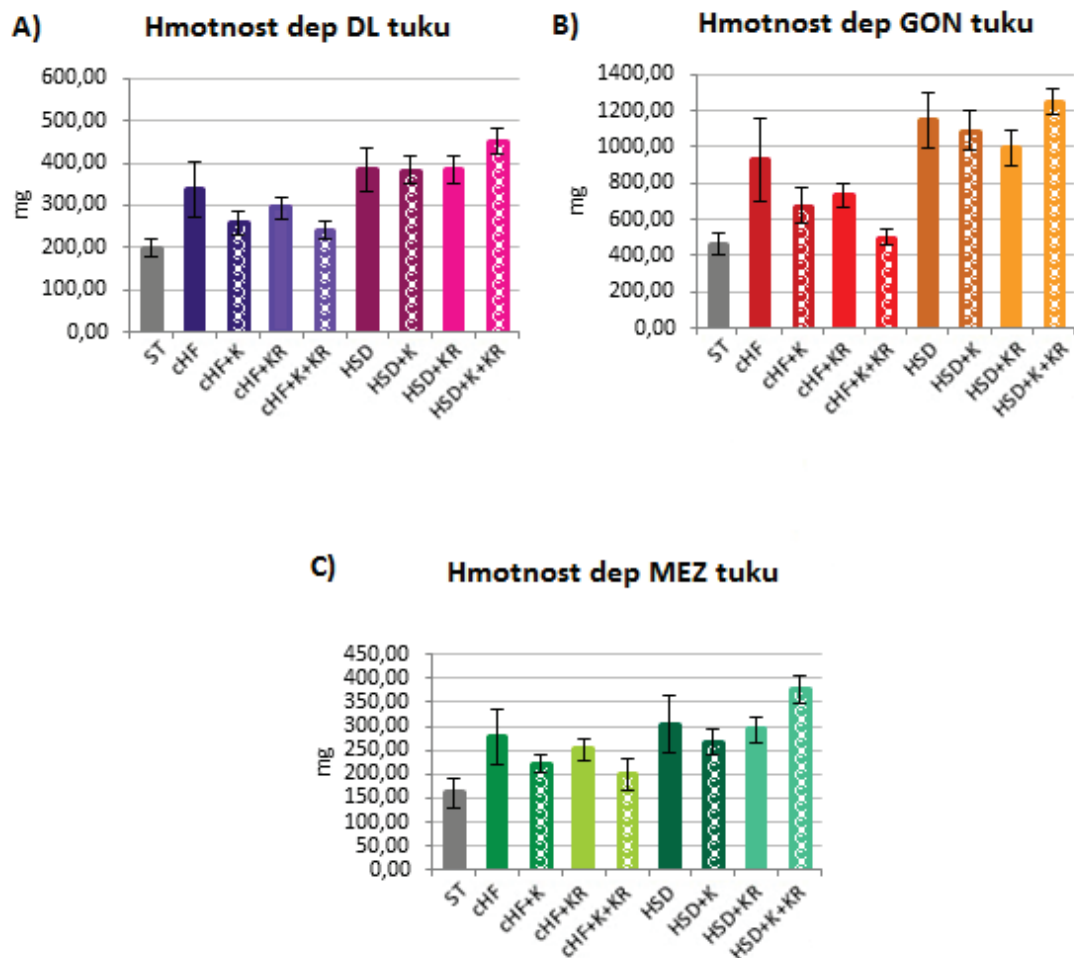
5.2.1. Vývoj hmotnosti a váha tukových dep

V tomto experimentu dieta s vysokým obsahem vepřového sádla indukovala obezitu ve větší míře než dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje. V pátém týdnu experimentu (kdy byl ukončen experiment č. 1) nebyl pozorován vliv suplementace diety *n*-3 PUFA na hmotnostní přírůstek, pouze snížený kalorický příjem zmírňoval nárůst hmotnosti u obou typů diet. Na konci experimentu č. 2 v osmém týdnu intervence, nebyl u diet odvozených od HSD pozorován vliv žádné intervence. Kalorická restrikce měla vliv pouze u diety cHF (cHF+K; cHF+K+KR) (Obr. 21).



Obr. 21: Vývoj tělesné hmotnosti myši v experimentu č. 2. HSD, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi vepřového sádla; cHF+K, HSD+K, dieta s vysokým obsahem tuku suplementovaná krilem; cHF+KR, HSD+KR, dieta s vysokým obsahem tuku s kalorickou restrikcí; cHF+K+KR, HSD+K+KR, dieta s vysokým obsahem tuku kombinovaná se suplementací krilu a s kalorickou restrikcí.

Podobný vliv experimentálních diet jako na hmotnostní přírůstek byl pozorován i u hmotností jednotlivých tukových dep. Dieta s vysokým obsahem vepřového sádla zvyšovala hmotnost všech sledovaných bílých tukových dep bez výrazného preventivního vlivu intervencí. Dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje indukovala menší přírůstek tukových dep ve srovnání s HSD. Kalorická restrikce (cHF+KR) měla preventivní účinek na hmotnost u všech sledovaných dep. Dieta obohacená krilem (cHF+K) neměla vliv na váhu tukových dep ve srovnání s nesuplementovanou dietou. Kombinace krilu a kalorické restrikce signifikantně snížila přírůstek gonadálního depa pouze v kombinaci s cHF dietou (Obr.22).

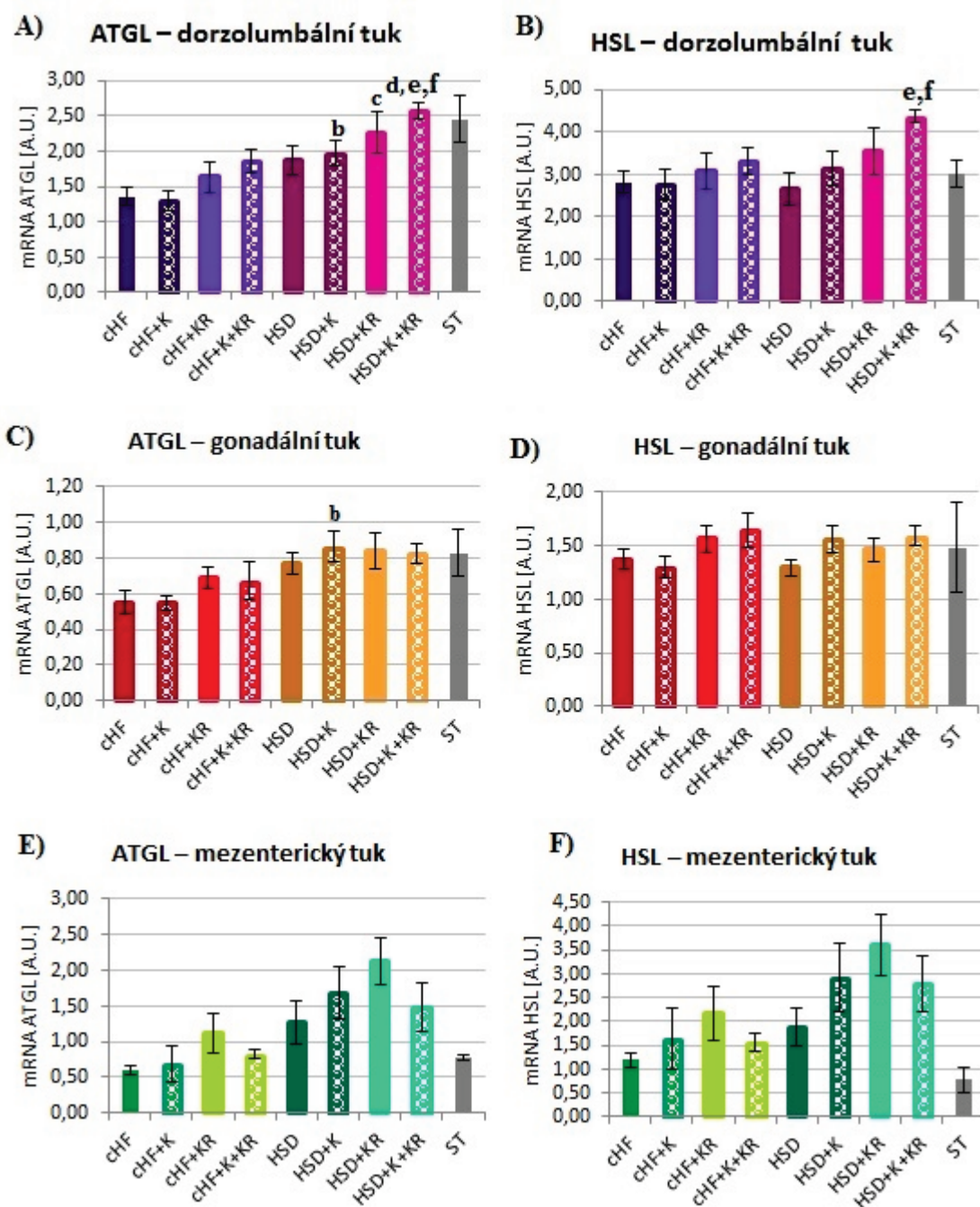


Obr. 22: Hmotnost dep dorzolumbálního- DL (A), gonadálního - GON (B) a mezenterického - MEZ (C) tuku (experiment č. 2). ST, standardní dieta; CHF, dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje; HSD, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi vepřového sádla; CHF+K, HSD+K, dieta s vysokým obsahem tuku obohacená krilem; CHF+KR, HSD+KR, dieta s vysokým obsahem tuku s kalorickou restrikcí; CHF+K+KR, HSD+K+KR, dieta s vysokým obsahem tuku kombinovaná se suplementací krilu a s kalorickou restrikcí.

5.2.2. Genová exprese

Rozdíl složení diet (kukuřičný olej vs. vepřové sádlo) ovlivnilo expresi genu pro ATGL ve všech třech tukových depech na rozdíl od genu pro HSL, který byl ovlivněn pouze v tuku mezenterickém. Obohacení CHF diety krilem (CHF+K) nemělo vliv na expresi lipolytických genů (ATGL, HSL) v žádném tukovém depu. Kalorická restrikce CHF+KR i kombinace CHF+K+KR velmi mírně přispěly k nárůstu exprese, ale v naměřených datech byly velké odchylky. Obohacení HSD diety krilem (HSD+K) také nijak neovlivnilo expresi lipolytických

genů, ale HSD dieta v kombinaci s krilem a 10% kalorickou restrikcí přispívala k nárůstu exprese ATGL i HSL, který byl v dorzolumbálním tuku signifikantní (Obr. 23).

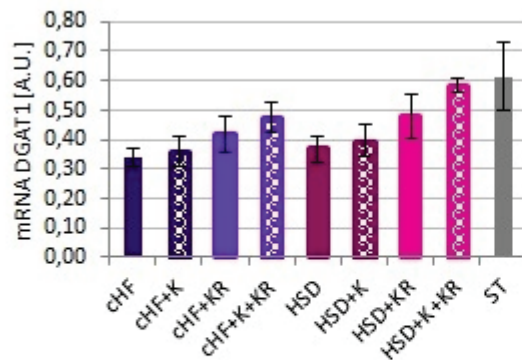


Obr. 23: Vliv diety obohacené o *n-3* PUFA původem z krilu ve formě fosfolipidů, vliv 10% kalorické restrikce a vzájemné kombinace krilu a kalorické restrikce na expresi genů kódujících lipolytické enzymy ATGL a HSL v dorzolumbálním (A, B), gonadálním (C, D) a v mezenterickém tukovém depu (E, F) v experimentu č. 2. CHF, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje; HSD, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi vepřového sádla; CHF+K, HSD+K, dieta s vysokým obsahem tuku suplementovaná krilem; CHF+KR, HSD+KR, dieta s vysokým obsahem tuku s kalorickou restrikcí; CHF+K+KR, HSD+K+KR, dieta s vysokým obsahem tuku kombinovaná se suplementací krilu a s kalorickou restrikcí; Signifikanční rozdíl

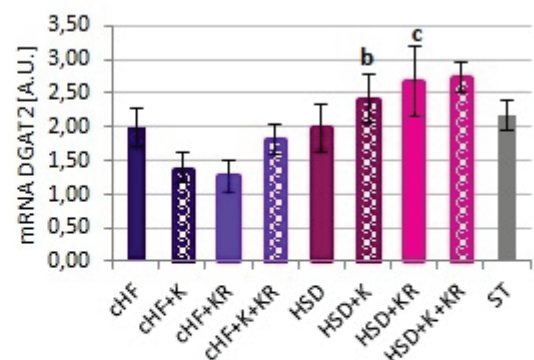
v porovnání s ^bcHF+K; ^ccHF+KR; ^dcHF+K+KR; ^eHSD; ^fHSD+K. ($p<0,05$) Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (jednocestná ANOVA). Do statistiky nebyla zahrnuta standardní dieta (ST).

Složení diety (cHF a HSD) nemělo vliv na genovou expresi pro enzymy DGAT1 a DGAT2 v žádném ze tří tukových dep. Kalorická restrikce zvyšovala expresi genu pro DGAT1 jak u cHF, tak u HSD diety a snižovala expresi DGAT2 u diety cHF na rozdíl od HSD+KR, kde došlo k mírnému nárůstu (ve srovnání s HSD dietou) ve všech třech depech. Suplementace diety *n*-3 PUFA přispívala k mírnému snížení exprese DGAT2 na cHF dietě a naopak mírně přispívala ke zvýšení exprese na HSD dietě ve všech depech (Obr. 24).

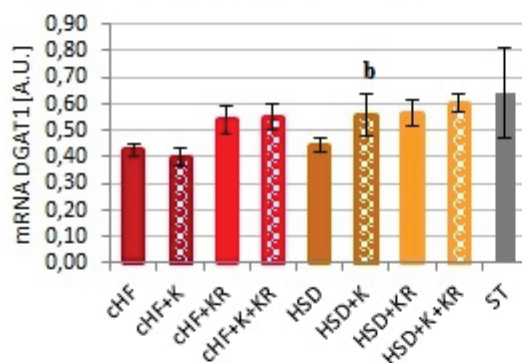
A) DGAT1 – dorzolumbální tuk



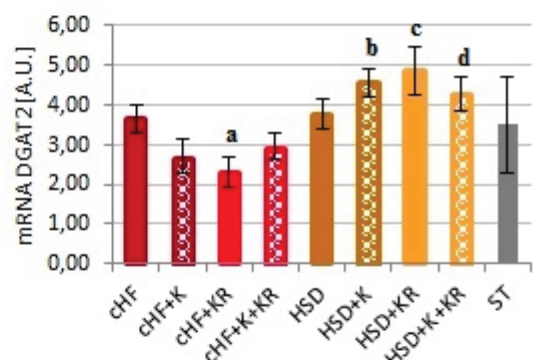
B) DGAT2 – dorzolumbální tuk



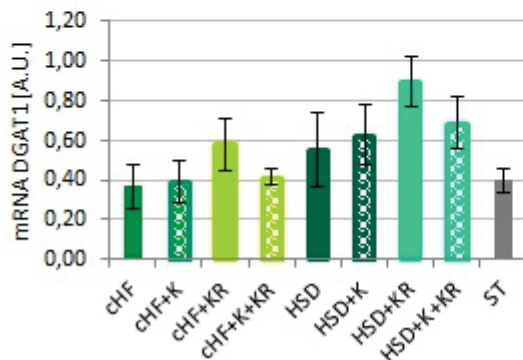
C) DGAT1 – gonadální tuk



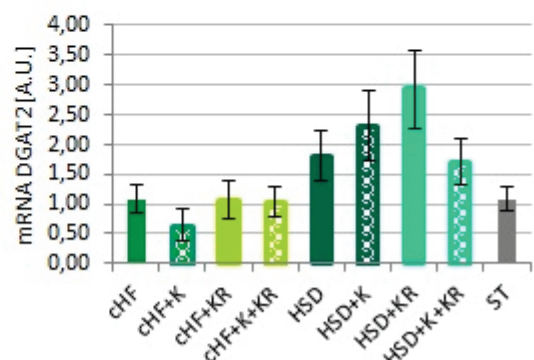
D) DGAT2 – gonadální tuk



E) DGAT1 – mezenterický tuk

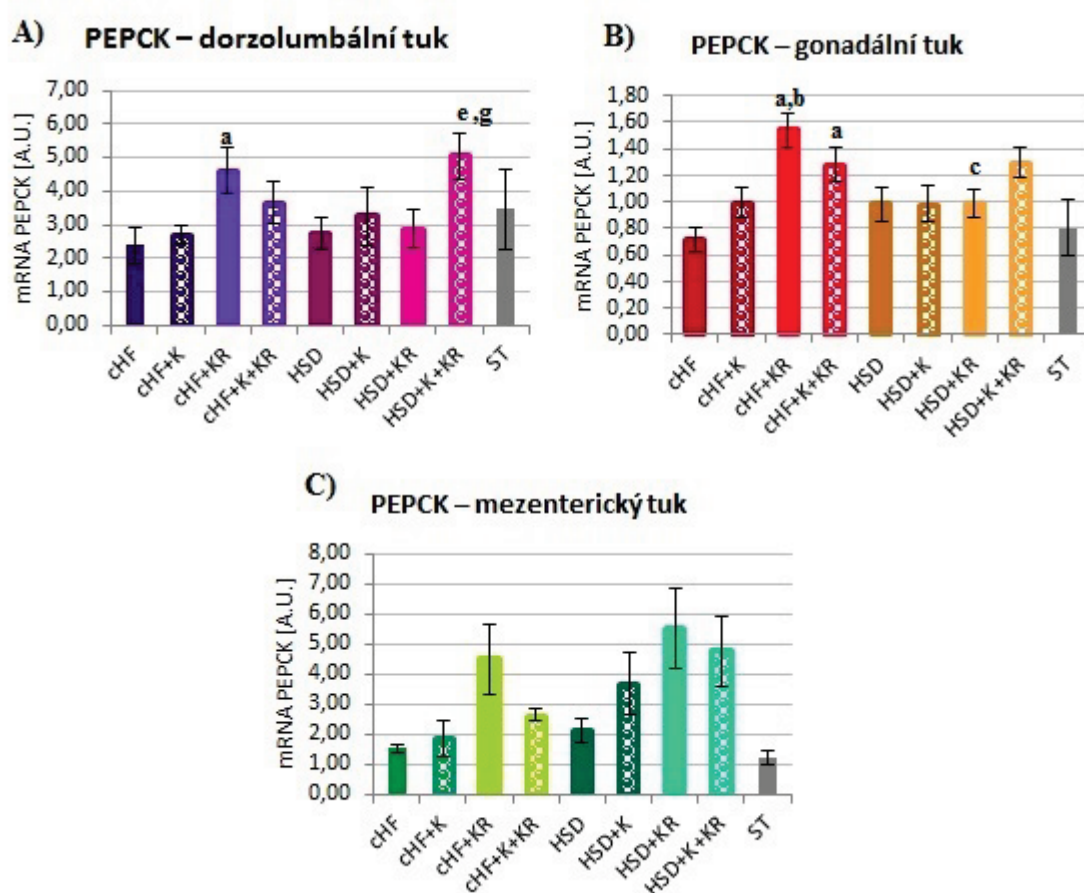


F) DGAT2 – mezenterický tuk



Obr. 24: Vliv diety obohacené o *n*-3 PUFA původem z krilu ve formě fosfolipidů, vliv 10% kalorické restrikce a vzájemné kombinace krilu a kalorické restrikce na expresi genů kódujících enzymy zapojené do biosyntézy triacylglycerolů DGAT1 a DGAT2 v dorzolumbálním (A, B), gonadálním (C, D) a v mezenterickém tukovém depu (E, F) v experimentu č. 2. CHF, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje; HSD, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi vepřového sádla; CHF+K, HSD+K, dieta s vysokým obsahem tuku suplementovaná krilem; CHF+KR, HSD+KR, dieta s vysokým obsahem tuku s kalorickou restrikcí; CHF+K+KR, HSD+K+KR, dieta s vysokým obsahem tuku kombinovaná se suplementací krilu a s kalorickou restrikcí; Signifikantní rozdíl v porovnání s ^bCHF+K; ^cCHF+KR; ^dCHF+K+KR; ^eHSD; ^fHSD+K. ($p < 0,05$) Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (jednocestná ANOVA). Do statistiky nebyla zahrnuta standartní dieta (ST).

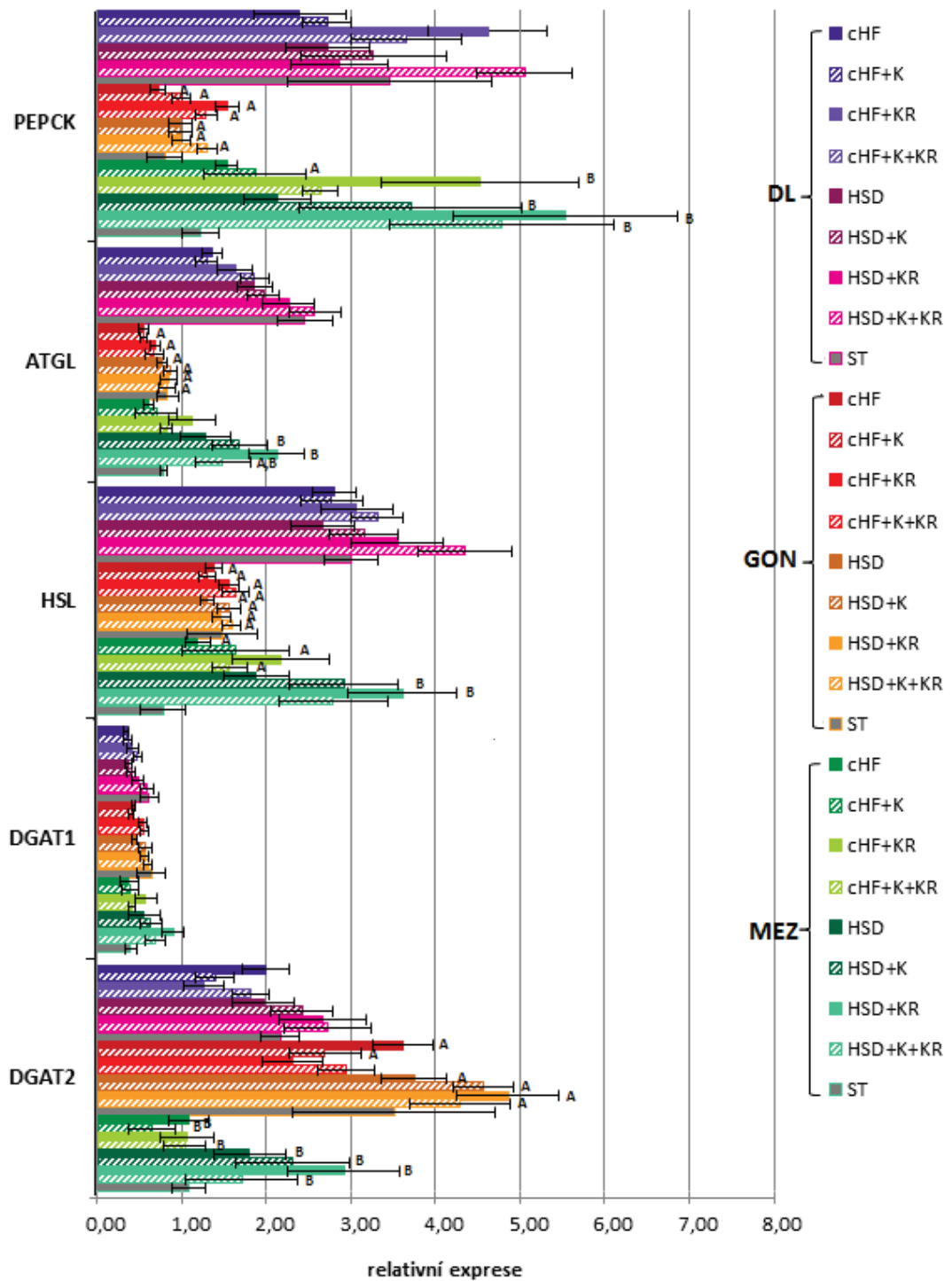
Různé složení mastných kyselin v základu diet výrazně neovlivnilo expresi genu pro glyceroneogenezi – PEPCK, pouze v gonadálním tuku HSD dieta mírně zvyšovala jeho expresi. Mírná kalorická restrikce měla signifikantní vliv na nárůst exprese pro PEPCK u CHF diety (cHF+KR) jak v dorzolumbálním, tak v gonadálním tuku, v mezenterickém depu došlo díky velkému rozptylu dat pouze k mírnému nárůstu exprese. Kombinace krilu a kalorické restrikce u HSD diety signifikantně zvyšovala expresi genu pro PEPCK v dorzolumbálním tuku a stejnou tendenci vykazovala i v gonadálním a mezenterickém tuku (Obr. 25).



Obr. 25: Vliv diety obohacené o *n*-3 PUFA původem z krilu ve formě fosfolipidů, vliv 10% kalorické restrikce a vzájemné kombinace krilu a kalorické restrikce na expresi genu kódujícího glyceroneogenní enzym PEPCK v dorzolumbálním (A), gonadálním (B) a v mezenterickém tukovém depu (C) v experimentu č. 2. CHF, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje; HSD, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi vepřového sádla; CHF+K, HSD+K, dieta s vysokým obsahem tuku suplementovaná krilem; CHF+KR, HSD+KR, dieta s vysokým obsahem tuku s kalorickou restrikcí; CHF+K+KR, HSD+K+KR, dieta s vysokým obsahem tuku kombinovaná se suplementací krilu a s kalorickou restrikcí; Signifikantní rozdíl v porovnání s ^bCHF+K; ^cCHF+KR; ^dCHF+K+KR; ^eHSD; ^fHSD+K. ($p < 0,05$). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (jednocestná ANOVA). Do statistiky nebyla zahrnuta standartní dieta (ST).

Při srovnávání exprese genů jednotlivých metabolických drah mezi depy bílé tukové tkáně pomocí metody $2^{-\Delta\Delta C_T}$ jsme zjistili vyšší expresi pro lipolytické geny ATGL a HSL hlavně v dorzolumbálním tuku (> mezenterický tuk ~ gonadální tuk), podobný trend byl i pro druhý lipolytický gen HSL. Exprese genů pro klíčové enzymy reesterifikace mastných kyselin byla podobná jako v experimentu č. 1, exprese pro DGAT1 byla podobná ve všech depech, exprese DGAT2 byla nejvyšší v gonadálním tuku (> mezenterický tuk ~ gonadální tuk). Exprese genu klíčového enzymu glyceroneogeneze PECK byla nejvíce zastoupena v mezenterickém a dorzolumbálním depu (> gonadální tuk) (Obr. 26).

Srovnání exprese mezi depy v experimentu č. 2



Obr. 26: Srovnání genové exprese mezi tukovými depy v experimentu č. 2. ^ASignifikantní rozdíl ve srovnání se stejnou dietou v dorzolumbálním tuku (DL); ^Bv gonadálním tuku (GON)

($p < 0,05$). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). Do statistiky nebyla zahrnuta standardní dieta (ST). cHF, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje; HSD, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi vepřového sádla; cHF+K, HSD+K, dieta s vysokým obsahem tuku suplementovaná krilem; cHF+KR, HSD+KR, dieta s vysokým obsahem tuku s kalorickou restrikcí; cHF+K+KR, HSD+K+KR, dieta s vysokým obsahem tuku kombinovaná se suplementací krilu a s kalorickou restrikcí.

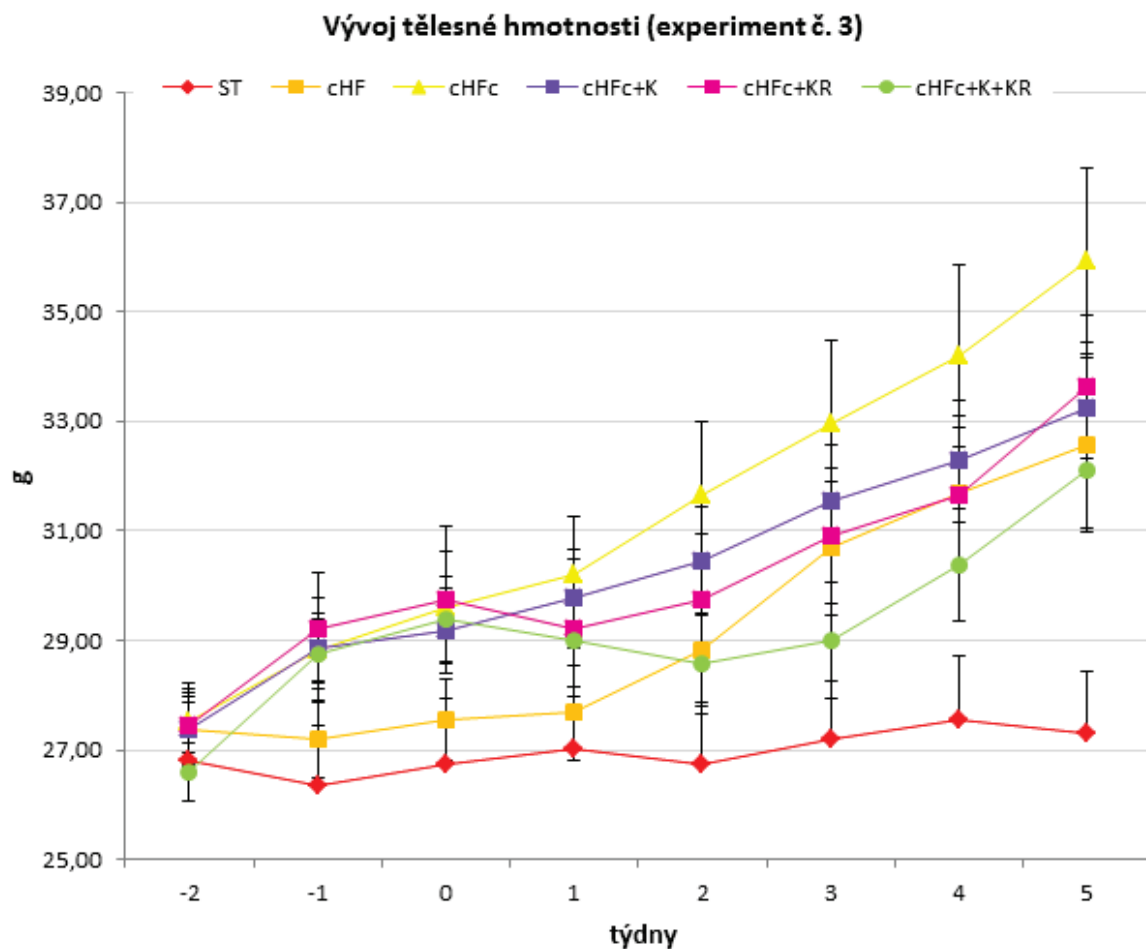
5.3. Experiment č. 3

V experimentu č. 3 byla jako základní experimentální dieta použita dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje se zvýšeným množstvím proteinu (kaseinu; cHFc), dále cHF dieta a ST dieta, které byly použity jako kontrolní skupiny. U jednotlivých skupin byla cHFc dieta i) obohacena přísadkou EPA/DHA původem z krilu (cHFc+K), ii) aplikována 10% kalorická restrikce (cHFc+KR) nebo byla iii) aplikována kombinace krilu a kalorické restrikce zároveň (cHFc+K+KR).

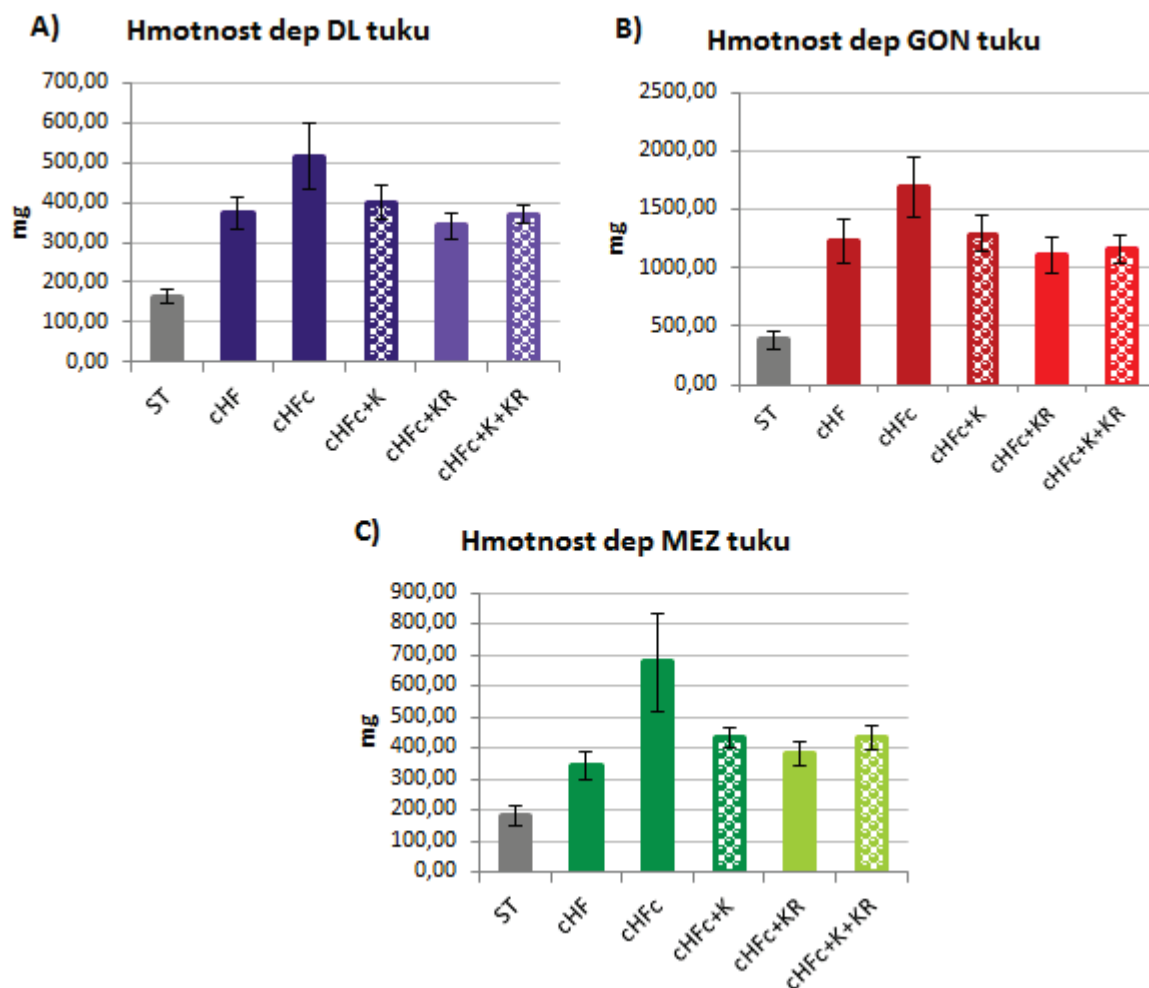
5.3.1. Vývoj hmotnosti a váha tukových dep

V experimentu č. 3 cHFc dieta nejvíce indukovala obezitu ve srovnání s ostatními experimentálními dietami včetně cHF diety. Již po prvních dvou týdnech od nasazení na experimentální diety došlo k výraznému hmotnostnímu nárůstu u skupiny cHFc na rozdíl od ostatních experimentálních diet. Myši krmené cHF měly nejmenší přírůstek v porovnání skupin na dietách s vysokým obsahem tuku. Na konci pokusu byl signifikantní rozdíl pouze skupiny cHFc, vliv intervencí se neprojevil (Obr.27).

Podobný vliv experimentálních diet byl pozorován i u hmotností tukových dep, kdy cHFc zvyšovala signifikantně hmotnost všech měřených tukových dep, na rozdíl od ostatních intervenčních skupin a kontrolní skupiny cHF, která se hmotnostmi mezi sebou nelišila (Obr. 28).



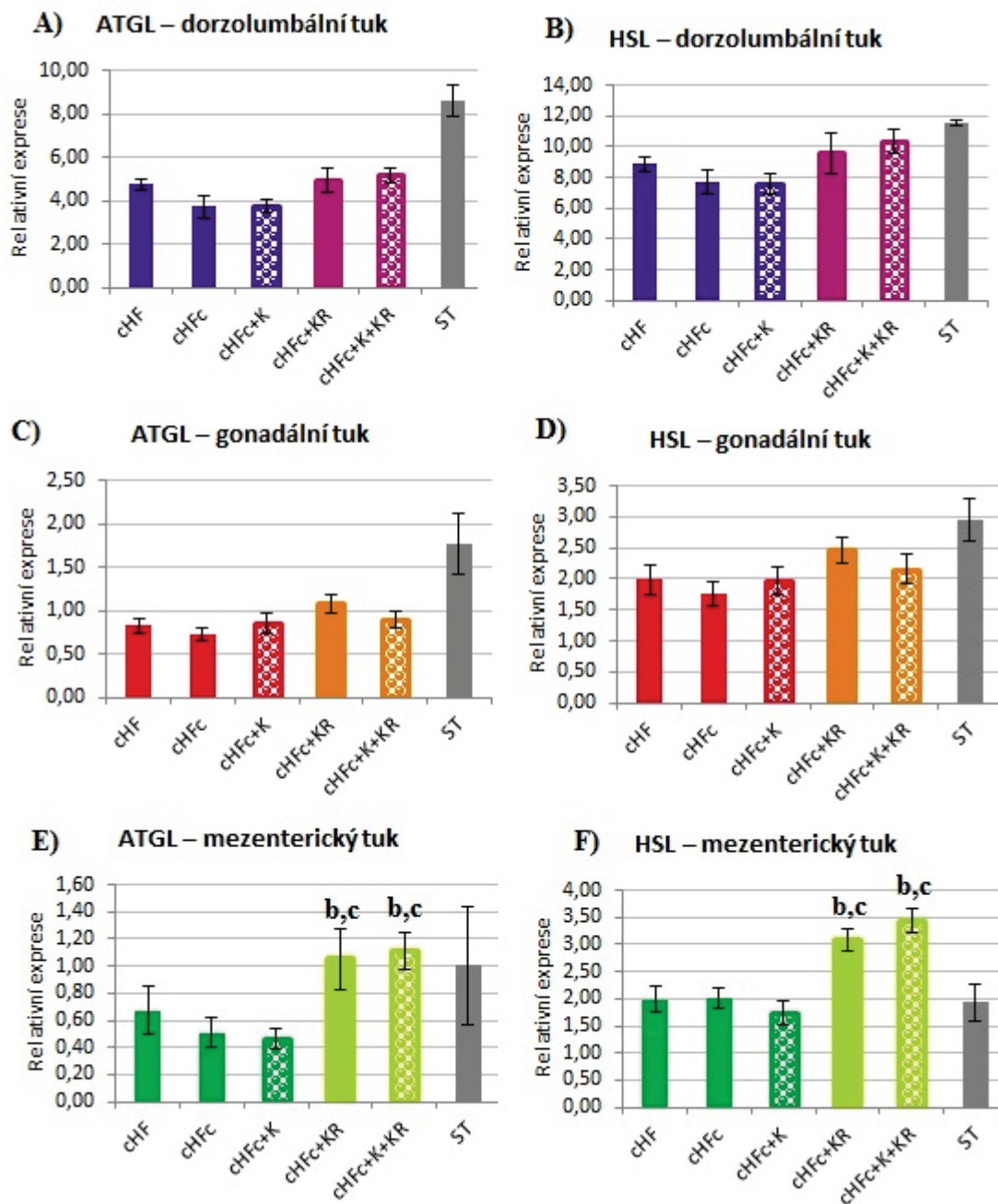
Obr. 27: Vývoj tělesné hmotnosti myší v experimentu č. 3. ST, standartní dieta s nízkým obsahem tuku; CHF, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje; CHFc, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje s přidavkem kaseinu; CHFc+K, CHFc dieta se suplementací krilem; CHFc+K+KR, CHFc dieta se suplementací krilem a kalorická restrikce.



Obr. 28: Hmotnost dep dorzolumbálního - DL (A), gonadálního - GON (B) a mezenterického - MEZ (C) tuku. ST, standardní dieta s nízkým obsahem tuku; CHF, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje; CHFc, dieta s vysokým obsahem tuku na bázi kukuřičného oleje s přidavkem kaseinu; CHFc+K, CHFc dieta se suplementací krilem; CHFc+K+KR, CHFc dieta se suplementací krilem a kalorická restrikce.

7.3.2 Genová exprese

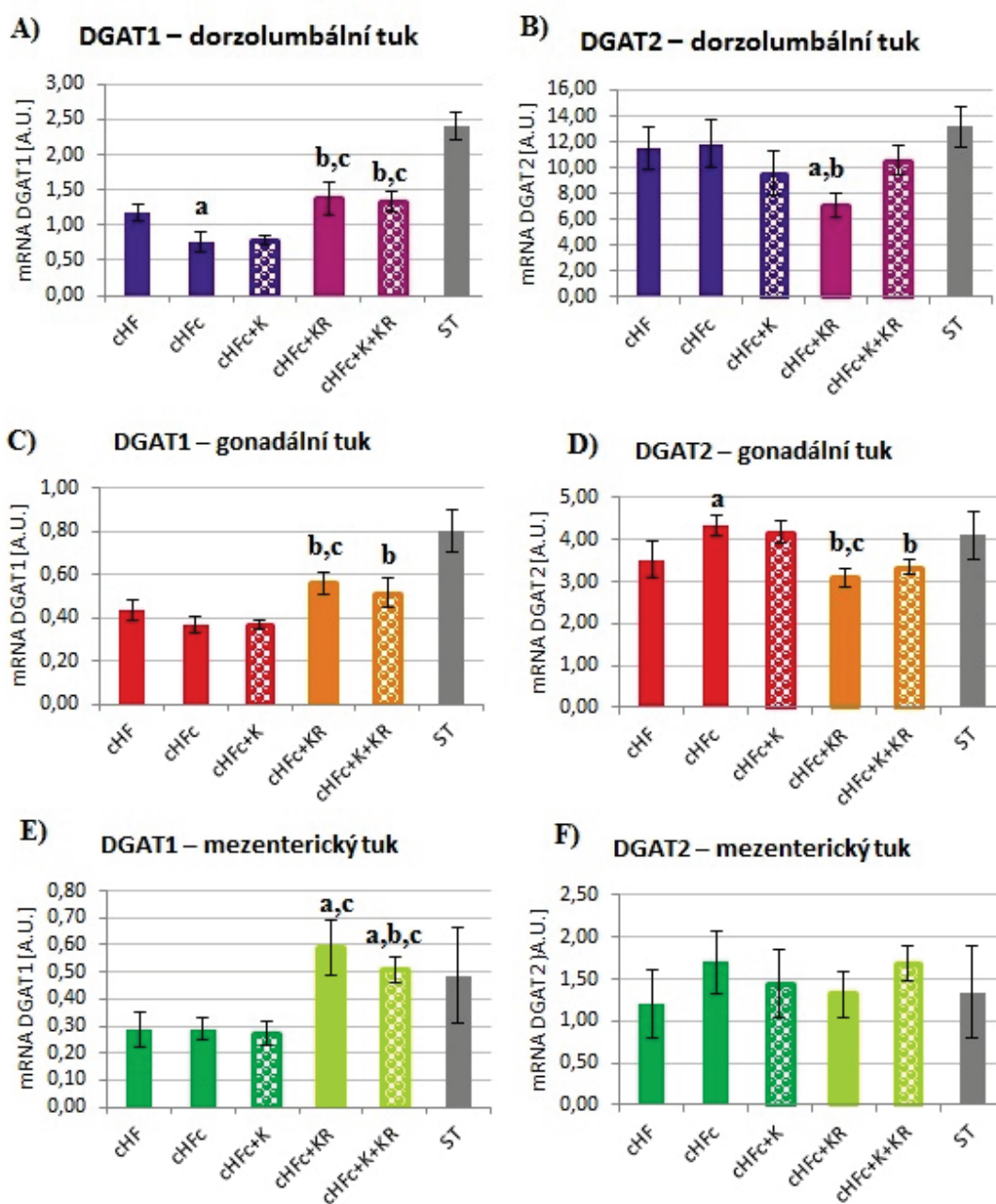
Dieta obohacená kaseinem (CHF_c) mírně snižovala genovou expresi obou genů kódující enzymy lipolytické dráhy. Suplementace diety *n*-3 PUFA – krilem (CHF_c+K) neměla vliv na genovou expresi, na rozdíl od kalorické restrikce (CHF_c+KR, CHF_c+K+KR), která indukovala nárůst exprese jak ATGL, tak HSL signifikantně v mezenterickém tuku, v dorzolumbálním a gonadálním tuku byl pozorován pouze trend (Obr. 29).



Obr. 29: Vliv diety obohacené kaseinem, suplementace *n*-3 PUFA původem z krilu, 10% kalorické restrikce a kombinace krilu a kalorické restrikce na expresi genů kódujících lipolytické enzymy ATGL a HSL v dorzolumbálním (A, B), gonadálním (C, D) a v mezenterickém tukovém depu (E, F) (experiment č. 3). CHF, dieta s vysokým obsahem kukuřice, CHFc, dieta s vysokým obsahem kukuřice obohacená kaseinem, CHFc+K, CHFc dieta obohacená krilem, CHFc+K, dieta CHFc s kalorickou restrikcí, CHFc+K+KR, dieta CHFc suplementovaná krilem v kombinaci s kalorickou restrikcí. ^bSignifikantní rozdíl ve srovnání s CHFc dietou s přidavkem kaseinu ad libitum; ^cCHFc+K dietou obohacenou o *n*-3 PUFA (kril) ad libitum ($p < 0,001$). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). Do statistiky nebyla zahrnuta standardní dieta (ST).

Dieta obohacená kaseinem ovlivnila inverzně genovou expresi pro DGAT1 a DGAT2 ve srovnání s kontrolní dietou CHF. Přídavek kaseinu významně snížil expresi genu pro

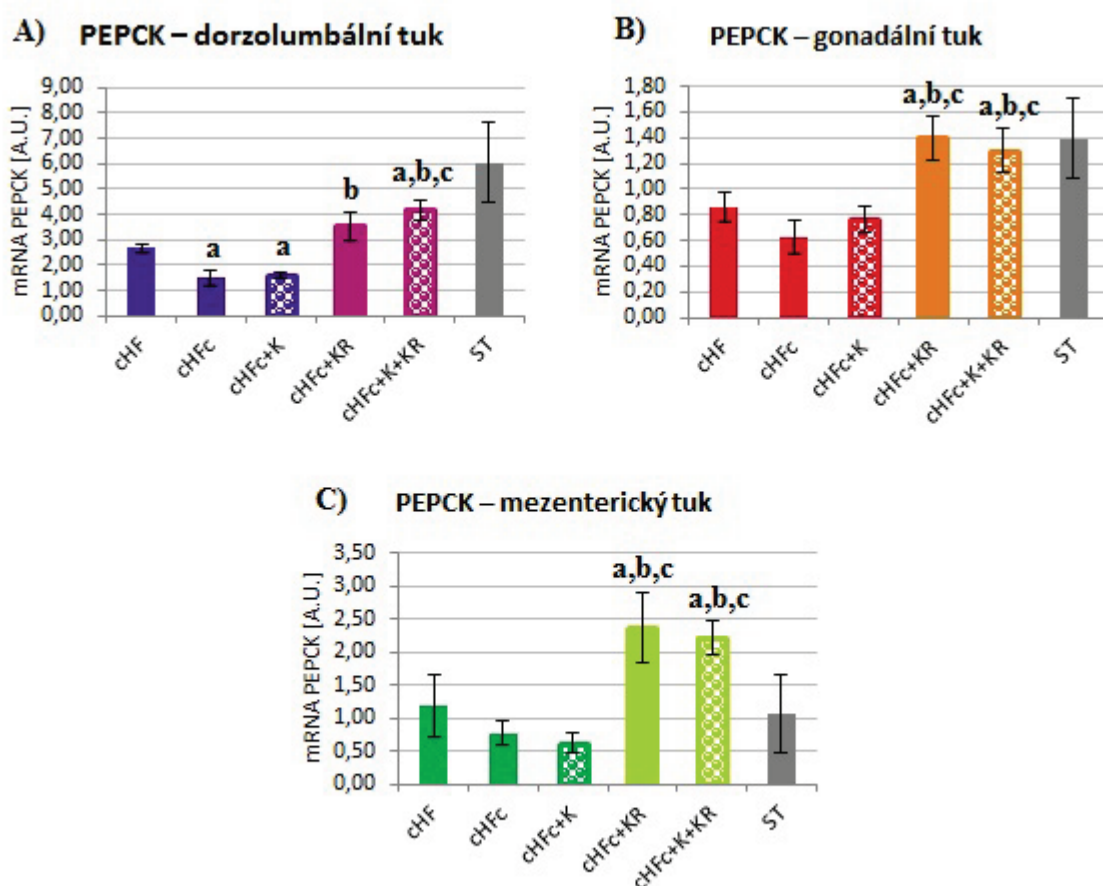
DGAT1 v dorzolumbálním depu a zvýšil expresi genu pro DGAT2 v depu gonadálním. Suplementace diety neměla žádný vliv na genovou expresi u těchto genů. Kalorická restrikce indukovala signifikantně zvýšení genové exprese genu pro DGAT1 ve všech tukových depech a snížení genu pro DGAT2 zejména v dorzolumbálním a gonadálním tuku. Stejný signifikantní vliv na expresi genů byl pozorován i u kombinace krilu a kalorické restrikce, zejména pak u DGAT1. Velikost exprese však byla podobná jako u skupiny s kalorickou restrikcí, která měla na změnu pravděpodobně největší vliv (Obr. 30).



Obr. 30: Vliv diety obohacené kaseinem, suplementace *n*-3 PUFA původem z krilu , 10% kalorické restrikce a kombinace krilu a kalorické restrikce na expresi genů kódujících

enzymy DGAT1 a DGAT2 v dorzolumbálním (A, B), gonadálním (C, D) a mezenterickém (E, F) tukovém depu (experiment č. 3). cHF, dieta s vysokým obsahem kukuřice, cHFc, dieta s vysokým obsahem kukuřice obohacená kaseinem, cHFc+K, cHFc dieta suplementovaná krilem, cHFc+K, dieta cHFc s kalorickou restrikcí, cHFc+K+KR, dieta cHFc suplementovaná krilem v kombinaci s kalorickou restrikcí. ^aSignifikantní rozdíl ve srovnání s cHF vysokotukovou dietou na bázi kukuřičného oleje ad libitum; ^bcHFc dietou s přidavkem kaseinu ad libitum; ^ccHFc+K dietou obohacenou o *n*-3 PUFA (kril) ad libitum ($p=0,05$). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). Do statistiky nebyla zahrnuta standardní dieta (ST).

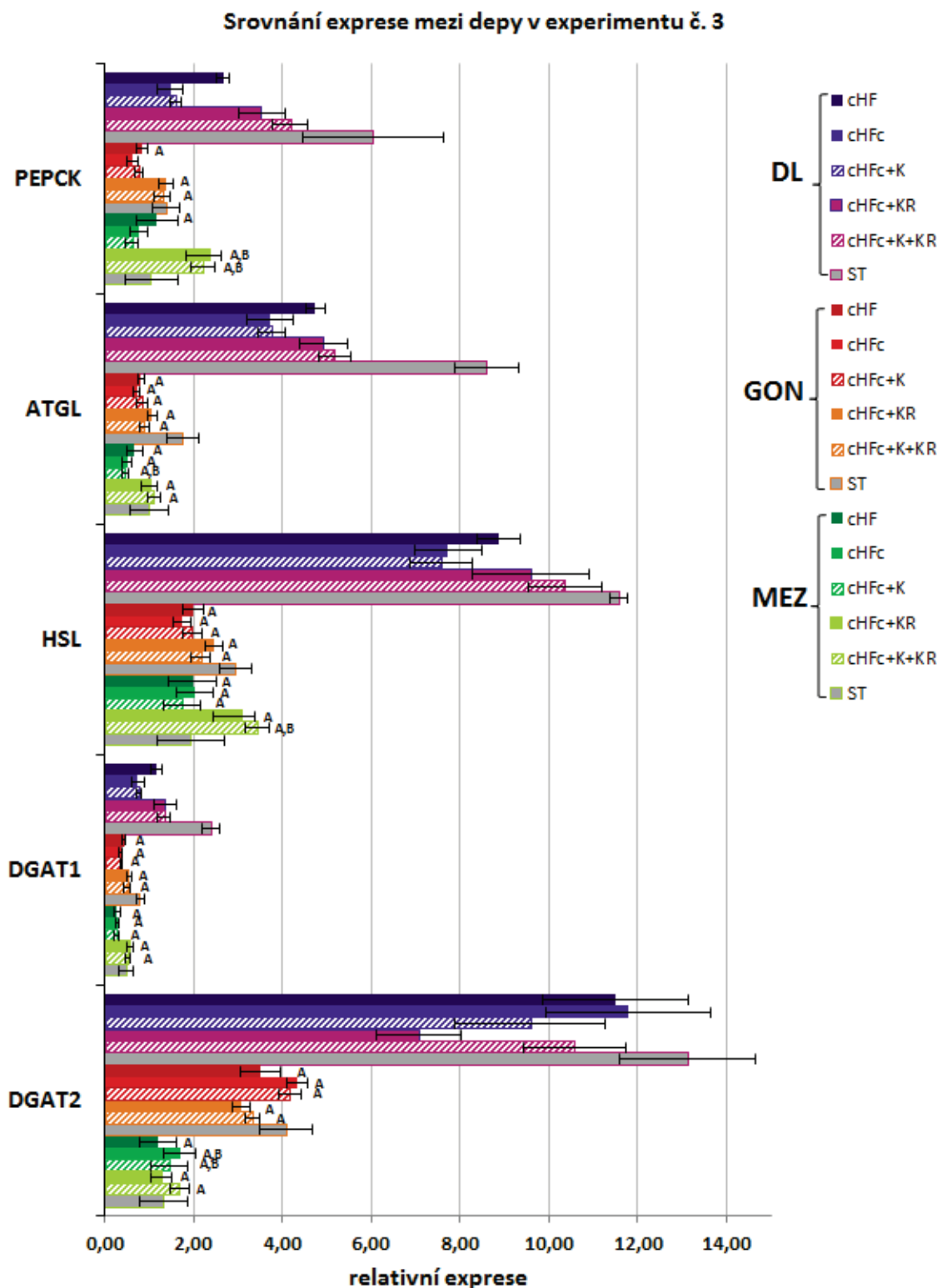
Kasein přidaný do diety snížil expresi genu kódujícího PEPCK ve všech tukových depech, signifikantně však pouze v tuku dorzolumbálním. Kalorická restrikce zvyšovala signifikantně expresi genu pro PEPCK i v kombinaci s *n*-3 PUFA. Vzhledem k tomu, že *n*-3 PUFA získaných z krilu neměly žádný vliv na expresi tohoto genu, jedná se pravděpodobně pouze o účinek samotné kalorické restrikce (Obr. 31).



Obr. 31: Data z qPCR ukazují vliv diety obohacené o *n*-3 PUFA původem z krilu (K), vliv 10% kalorické restrikce (KR) a vzájemné kombinace krilu a kalorické restrikce (K+KR) na expresi genů kódujících lipogenní enzym PEPCK v dorzolumbální (A), gonadální (B) a mezenterické (C) tukové tkáni (experiment č. 3). cHFc, dieta s vysokým obsahem kukuřice

obohacená kaseinem, cHFc+K, cHFc dieta obohacená krilem, cHFc+K, dieta cHFc s kalorickou restrikcí, cHFc+K+KR, dieta cHFc obohacená krilem v kombinaci s kalorickou restrikcí. ^aSignifikantní rozdíl ve srovnání s CHF vysokotukovou dietou na bázi kukuřičného oleje ad libitum; ^bcHFc dietou s přídavkem kaseinu ad libitum; ^ccHFc+K dietou obohacenou o *n*-3 PUFA (kril) ad libitum ($p < 0,05$). Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (jednocestná ANOVA). Do statistiky nebyla zahrnuta standartní dieta.

V experimentu č. 3 byly všechny sledované geny nejvíce exprimovány v dorzolumbálním (DL) tuku ve srovnání s tukem gonadálním (GON) a mezenterickým (MEZ), kde byla exprese srovnatelná. Pouze exprese genu pro DGAT2 se lišila ve všech třech tkáních a to s největší expresí v DL tuku a s nejnižší expresí v MEZ tuku.



Obr. 32: Srovnání genové exprese mezi tukovými depy v experimentu č. 3. cHFc, dieta s vysokým obsahem kukuřice obohacená kaseinem, cHFc+K, cHFc dieta suplementovaná krilem, cHFc+K, dieta cHFc s kalorickou restrikcí, cHFc+K+KR, dieta cHFc suplementovaná krilem v kombinaci s kalorickou restrikcí. ^ASignifikantní rozdíl ve srovnání se stejnou dietou v dorzolumbálním tuku (DL); ^B v gonadálním tuku (GON) ($p < 0,05$). Statistické vyhodnocení dat

bylo provedeno pomocí programu SigmaStat (dvoucestná ANOVA). Do statistiky nebyla zahrnuta standardní dieta. Dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje (cHF), dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje a přídavkem kaseinu (cHFc); kril (K); 10% kalorická restrikce (KR); kombinace krilu a kalorické restrikce zároveň (K+KR); standardní dieta s nízkým obsahem tuku (ST).

6. Diskuze

Výsledky naší laboratoře již v minulosti prokázaly, že kombinace *n*-3 PUFA a kalorické restrikce se podílí na prevenci obezity u myší krmených dietou s vysokým obsahem tuku (Flachs et al., 2011). Dieta obohacená *n*-3 PUFA v kombinaci s kalorickou restrikcí byla spojena s hypolipidemickým a inzulin senzitivizujícím účinkem, prevencí zánětu a indukci oxidace mastných kyselin s výrazným efektem především v epididymálním depu bílé tukové tkáně. Jelikož k těmto změnám docházelo bez indukce aktivity UCP1, lze se domnívat, že v adipocytech bílé tukové tkáně mohla kombinace podávání *n*-3 PUFA s kalorickou restrikcí ve zvýšené míře přispívat k aktivaci prázdného metabolického cyklování mastných kyselin. Tento jev je založen na intracelulární aktivaci lipolýzy triacylglycerolů a reesterifikaci mastných kyselin ve spojení s indukci mitochondriální oxidativní fosforylace, β -oxidací mastných kyselin a nárůstem energetického výdeje. Vyšší schopnost aktivace tohoto prázdného metabolického cyklu mastných kyselin byla na myším modelu dokumentována ve viscerálním, konkrétně v gonadálním tukovém depu, v porovnání se subkutánním (Sponarova et al., 2005). Gonadální tuk u myší představuje největší viscerální depo s vysokou metabolickou aktivitou, u kterého byla popsána výrazná schopnost indukce TG/MK cyklu, pokud k tomu byl organismus stimulován. U lidí však gonadální tuk není téměř vůbec vyvinutý a na energetickém metabolismu se podílí minimálně. Nejvýznamějším představitelem viscerální tukové tkáně u člověka je tuk obklopující střeva – tuk omentální a mezenterický. U lidí byl rovněž pozorován vyšší obrat TG/MK cyklování mastných kyselin ve viscerálním (abdominálním) tuku (Mårin et al., 1992). Zásadní rozdíl mezi abdominálním a gonadálním depem spočívá v napojení mezenterického a omentálního tuku na portální oběh, kterým jsou mastné kyseliny a další metabolicky aktivní látky vyloučené z tukové tkáně, odváděny *venou portae* rovnou do jater. Játra jsou pak u obézních jedinců vystavena velkému množství vyplavených mastných kyselin a zánětlivých cytokinů a tento stav může vyústit v ektopické ukládání tuku v játrech a s tím spojený vznik inzulinové rezistence. Ostatní viscerální depa včetně gonadálního tuku jsou napojena na systémový oběh a pro rozvoj metabolických onemocnění nepředstavují tak velké riziko. Proto jsme se na myším modelu zaměřili na měření genové exprese právě i v mezenterické tukové tkáni. Zajímalo nás, jak je na úrovni genové exprese aktivní TG/MK cyklus právě v mezenterické tukové tkáni a do jaké míry lze u myší ovlivnit genovou expresi v této tukové tkáni dietní intervencí. Konkrétně,

jaký vliv bude mít podávání *n*-3 PUFA v dietě s vysokým obsahem tuku, případně v kombinaci s mírnou kalorickou restrikcí, na expresi genů kódujících lipolytické, lipogenní a glyceroneogenní enzymy v mezenterickém tuku. Pro porovnání výsledků jsme měřili expresi genů klíčových pro TG/MK cyklus (PEPCK, ATGL, HSL, DGAT1 a DGAT2) také v gonadálním a subkutánním (dorzolumbálním) tuku.

Experiment č 1:

V experimentu č. 1 jsme se zabývaly vlivem podávání EPA/DHA (původem z rybího oleje ve formě TG) myším krmených dietou s vysokým obsahem kukuřičného oleje. Aby bylo možné rovněž zohlednit efekt délky aplikace experimentální diety, byla u všech skupin aplikována léčba ve dvou odlišných intervalech – po dobu dvou anebo pěti týdnů.

Samotný přídavek *n*-3 PUFA v dietě ve formě rybího oleje neměl na expresi genů u dvou- ani pětítýdenního podávání téměř žádný vliv, ale v kombinaci rybího oleje s kalorickou restrikcí došlo k nárůstu exprese ATGL a HSL v gonadálním depu a HSL v dorzolumbálním depu u dvoutýdenní aplikace této léčby. V mezenterickém depu se u kombinované léčby rovněž zvýšila exprese ATGL, ale větší měrou k tomu pravděpodobně přispívala samotná kalorická restrikce. Myši, kterým byla kombinovaná léčba aplikována po dobu dvou týdnů, vykazovaly větší trend v expresi lipolytických genů ve srovnání s pětítýdenní aplikací. Tento trend by mohl podporovat hypotézu, kterou navrhuje Djouder et al. (2010). Předpokládá, že PKA působí pouze při zajištění krátkodobé akutní odpovědi na lipolytický stimul a brání inhibičnímu efektu AMPK na HSL. Zatímco při dlouhodobé aktivaci AMPK dochází ke zprostředkování jejího inhibičního efektu na HSL a nastává útlum lipolýzy. Rozdíl mezi dvou- a pětítýdenní léčbou bylo možné pozorovat i v expresi DGAT2 ve viscerálním a subkutánním depu. Dvoutýdenní aplikace kalorické restrikce v gonadálním depu signifikantně snižovala expresi DGAT2, zatímco pětítýdenní kalorická restrikce na expresi DGAT2 neměla žádný vliv. Je známo, že pokles exprese DGAT2 je spojený s výrazným úbytkem TG (Stone et al., 2004). Myši u kterých byla aplikována 10% kalorická restrikce pouze dva týdny, tedy pravděpodobně redukovaly zásoby triacylglycerolů v gonadálním depu výrazněji než myši vystavené mírné kalorické restrikci po delší dobu. U skupiny s pětítýdenní kalorickou restrikcí se exprese DGAT2 v gonadálním tuku sice nijak neměnila, ale exprese DGAT1 měla tendenci se zvyšovat. Nárůst exprese DGAT1 v bílé tukové tkáni bývá popisován ve spojitosti s ochranným mechanismem adipocytů pufrovat vysoké hladiny mastných kyselin v krvi a chránit tak ostatní tkáně před ektopickým ukládáním tuku (Cases et al., 2001).

V dorzolumálním, stejně jako v mezenterickém depu nebyla lipogenní dráha kalorickou restrikcí nijak ovlivněna.

Rozdíl v délce léčby byl patrný i ve schopnosti indukovat expresi PEPCK. Zatímco u dvoutýdenní skupiny expresi PEPCK zvyšovala pouze samotná kalorická restrikce, což je známý jev (Frasson et al., 2012). U pětitydenní skupiny kalorická restrikce, ani pouze podávání *n*-3 PUFA na expresi PEPCK nemělo žádný efekt, ale kombinovaná léčba (cHF+EPAX+KR) expresi signifikantně zvyšovala. Tento efekt bylo možné sledovat ve všech třech typech tukových dep, jenom v mezenterickém depu kvůli větším odchylkám nebyl nárůst signifikantní. Lze se tak domnívat, že kombinace *n*-3 PUFA s mírnou kalorickou restrikcí pravděpodobně mohou přispívat ke stimulaci TG/MK cyklu v adipocytech bílé tukové tkáně. To by podporovalo i výsledky z našich dřívějších publikací, kde se ukázalo, že kombinace *n*-3 PUFA a kalorické restrikce indukuje ve zvýšené míře oxidaci mastných kyselin v bílé tukové tkáni (Flachs et al., 2011).

Shrnutí: V experimentu č. 1 neměl samotný přídavek *n*-3 PUFA v dietě ve formě rybího oleje na expresi genů u dvou- ani pětitydenního podávání téměř žádný vliv. V kombinaci s kalorickou restrikcí *n*-3 PUFA přispívaly k nárůstu exprese PEPCK a lipolytických genů ve všech sledovaných tukových depech. Dietní intervence ovlivňovala expresi genů v mezenterickém depu o něco méně než v ostatních sledovaných tukových depech. Stejně jako celková exprese všech sledovaných genů byla v mezenterickém tuku spíše nižší než v gonadálním a dorzolumbálním depu.

Experiment č. 2:

V experimentu č. 2 byly aplikovány dva typy diet s vysokým obsahem tuku – cHF dieta s vysokým podílem kukuřičného oleje a HSD dieta s vysokým obsahem vepřového sádla. U jednotlivých skupin byla vysokotuková dieta obohacena o EPA/DHA původem z krilu nebo byla aplikována 10% kalorická restrikce anebo kombinovaná léčba pomocí suplementace krilu a kalorické restrikce zároveň.

V mezenterickém tukovém depu vykazovaly výsledky měření poměrně velké odchylky. Odchylky ukazující na velkou variabilitu genové exprese nezi pokusnými zvířaty v tomto depu V mezenterickém depu u myší krmených cHF i HSD dietou ovlivňovala expresi genů zapojených do TG/MK cyklu pravděpodobně jen kalorická restrikce a to jen ve velmi malé míře.

V gonadálním tukovém depu (GON) myši krmených cHF dietou, u kterých byla aplikována 10% kalorická restrikce, bylo možné sledovat signifikantní nárůst exprese PEPCCK a pokles exprese DGAT2. Tento efekt kalorické restrikce je popisován i v jiných experimentech (Frasson et al., 2012; Higami et al., 2004; Mangravite et al., 2007; Sponarova et al., 2005). Expres ostatních genů účastnících se cyklování MK nebyla v gonadálním tuku příliš ovlivněna. Stejný, i když nesignifikantní, výsledek je možné sledovat u skupiny myši krmených cHF dietou suplementovanou *n*-3 PUFA a u skupiny s aplikovanou 10% kalorickou restrikcí. Zdá se tedy, že i samotná suplementace diety *n*-3 PUFA ve formě krilu pravděpodobně může mít malý vliv na nárůst exprese PEPCCK a pokles exprese DGAT2 v gonadálním tukovém depu a částečně tak přispívat k nárůstu pufrční kapacity adipocytů. Balogun a Cheema (2016) popsali podobný efekt aplikace *n*-3 PUFA na snížení exprese DGAT2 v gonadální tukové tkáni myši C57BL/6 a Duplus et al. (2002) dokumentuje schopnost DHA indukovat expresi PEPCCK v adipocytech epididymální tukové tkáně. U myši krmených HSD dietou byl v gonadálním depu u skupiny léčené kombinovaným podáváním krilu a 10% kalorické restrikce jen velmi mírný trend v nárůstu exprese genů účastnících se TG/MK cyklování.

V dorzolumbálním tukovém depu kalorická restrikce u myši krmených cHF dietou signifikantně zvyšovala expresi PEPCCK, což je poměrně neobvyklé, jelikož exprese PEPCCK v dorzolumbálním depu jako i v jiných subkutánních depech nebývá kalorickou restrikcí příliš ovlivňována (Sponarova et al., 2005). V dorzolumbálním depu u myši krmených HSD dietou nebyl sice patrný žádný efekt na genovou expresi při obohacení diety pouze *n*-3 PUFA, ale kombinace krilu a kalorické restrikce přispívala ke zvýšení, i když nesignifikantní, expresi všech měřených genů zapojených do cyklování mastných kyselin. Kombinovaná léčba spočívající v obohacení diety o kril a současné 10% snížení energetického příjmu tak u myši krmených HSD dietou mohlo významně přispívat k nárůstu prázdného metabolického cyklování MK v dorzolumbální tukové tkáni.

Mezi dietami s vysokým obsahem tuků bylo možné pozorovat rozdíly v ovlivnění genové exprese. cHF dieta (vysoký podíl *n*-6 PUFA ve formě kukuřičného oleje) při aplikaci 10% kalorické restrikce v dorzolumbálním i gonadálním tukovém depu signifikantně snižovala expresi DGAT2. Stejný efekt podávání diety bohaté na kukuřičný olej zaznamenal Zhou et al. (2012), který srovnával vliv různého složení tuků v dietě na genovou expresi a pozoroval, že exprese jaterní diacylglycerol O-acyltransferázy 2 (DGAT2) se snižuje právě při podávání

diety bohaté na kukuřičný olej ve srovnání s dietou bohatou na tuk mléčného původu. U myší krmených HSD dietou (vysoký podíl MK ve formě vepřového sádla) se při aplikaci 10% kalorické restrikce signifikantně zvyšovala exprese DGAT2 ve všech tukových depech. Zajímavé je, že v expresi genu pro DGAT2 mezi cHF a HSD dietou nebyl ve skupině bez jakékoli dietní intervence žádný rozdíl, ale právě aplikace 10% kalorické restrikce ovlivnila expresi DGAT2 mezi dietami. Lze se proto domnívat, že pokud byla kalorická restrikce aplikována u diety s vysokým obsahem *n*-6 PUFA, docházelo k redukci zásob TG. Pokud byla ale kalorická restrikce aplikována u diety s vysokým podílem nasycených mastných kyselin, paradoxně docházelo ke stimulaci syntézy TG *de novo*. Pokud však byla u myší krmených HSD dietou aplikována léčba v podobě suplementace diety *n*-3 PUFA, projevil se efekt nárůstu cyklování MK v gonadálním tuku zvýšenou expresí lipolytického genu ATGL a lipogenního genu DGAT1. Lze se proto domnívat, že přídavek *n*-3 PUFA v dietě s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin, by mohl pravděpodobně přispívat k ochrannému mechanismu před cytotoxickým účinkem zvýšeného příjmu MK, jelikož dochází k nárůstu pufrací kapacity adipocytů pomocí aktivace TG/MK cyklu v gonadální tukové tkáni. V mezenterickém tukovém depu bylo možné sledovat obdobný trend, ale data vykazovala velké odchylky. V dorzolumbálním depu nárůst exprese genů účastnících se TG/MK cyklování ovlivnila až kombinace krilu s aplikací 10% kalorické restrikce.

Shrnutí: V experimentu č. 2 suplementace diety *n*-3 PUFA měla největší vliv na nárůst exprese genů pro PEPCCK a naopak pokles pro DGAT2 v gonadálním tuku u myší krmených cHF dietou. Kombinovaná aplikace *n*-3 PUFA s 10% kalorickou restrikcí vykazovaly největší vliv na nárůst TG/MK cyklu mastných kyselin v dorzolumbálním tuku u myší krmených HSD dietou. V mezenterickém tukovém depu působila na mírný nárůst TG/MK cyklování mastných kyselin jen kalorická restrikce, *n*-3 PUFA měly jen minimální vliv. Dieta na bázi kukuřičného oleje (cHF) podporovala spíše pokles exprese genu pro DGAT2 na rozdíl od diety na bázi vepřového sádla (HSD), která měla spíše tendenci podporovat prázdné metabolické cyklování mastných kyselin, zvláště v kombinaci se současnou aplikací *n*-3 PUFA a 10% kalorickou restrikcí.

Experiment č.3:

V experimentu č. 3 byla kromě cHF diety založené na vysokém obsahu kukuřičného oleje použita také cHFc dieta obohacená o přídavek kaseinu. U jednotlivých skupin byla vysokotuková dieta suplementována přídatkem EPA/DHA původem z krilu nebo byla

aplikována 10% kalorická restrikce anebo byla kombinace krilu a kalorické restrikce opět podána zároveň.

Suplementace cHFc diety *n*-3 PUFA měla jen minimální efekt na ovlivnění genové exprese ve všech třech typech tukové tkáně. Kombinace *n*-3 PUFA a 10% kalorické restrikce sice ovlivňovala expresi genů účastnících se cyklování MK, ale tento vliv byl zprostředkován zřejmě pouze kalorickou restrikcí. Na rozdíl od předešlých experimentů, v tomto pokusu kalorická restrikce vykazovala nejvyšší efekt na expresi genů účastnících se prázdného metabolického cyklování MK v mezenterickém tukovém depu. V gonadálním, stejně jako v dorzolumbálním tuku sice kalorická restrikce zvyšovala expresi DGAT1 a PEPCCK, ale exprese ATGL a HSL byla navýšena jen minimálně. V gonadální a dorzolumbální tukové tkáni byla aktivní především lipogenní dráha syntézy triacylglycerolů a k prázdnému metabolickému cyklování mastných kyselin nedocházelo v gonadálním ani dorzolumbálním tuku v tak velké míře jako v mezenterickém tukovém depu.

Přídavek kaseinu ke klasické CHF dietě vykazoval mírně odlišný efekt mezi jednotlivými depy. V gonadálním depu přídavek kaseinu v dietě zvýšil expresi DGAT2. V dorzolumbálním depu kasein přispěl k signifikantnímu poklesu exprese DGAT1 a PEPCCK a mírně přispěl k poklesu ATGL a HSL. V gonadálním depu tak přídavek kaseinu v dietě podporoval akumulaci TG a v dorzolumbálním depu kasein přispěl k poklesu cyklování MK. V mezenterickém tuku přídavek kaseinu v dietě neměl na genovou expresi vliv.

Shrnutí: Exprese lipolytických genů byla nejvíce ovlivněna kalorickou restrikcí, která signifikantně zvyšovala expresi ATGL a HSL v mezenterickém depu. V gonadálním i dorzolumbálním depu byla lipolýza ovlivněna jen velmi málo. Dráha esterifikace TG nebyla samotným podáváním *n*-3 PUFA příliš ovlivněna, ale kalorická restrikce ve všech depech signifikantně zvyšovala expresi DGAT1 a v gonadálním a mezenterickém tuku snižovala expresi DGAT2. Glyceroneogeneze byla vlivem kalorické restrikce signifikantně zvýšena ve všech depech. Celkově dieta obohacená o přídavek kaseinu přispívala k vyššímu nárůstu hmotnosti zvířat než dieta bez kaseinu.

7. Závěr

Čtyři cíle této diplomové práce byly naplněny s následujícími zjištěními:

1. Suplementace diety *n*-3 PUFA pravděpodobně může přispívat k lehce snížené expresi DGAT2. V kombinaci s mírnou kalorickou restrikcí *n*-3 PUFA vykazují tendenci zvyšovat expresi genů ovlivňujících prázdný metabolický cyklus mastných kyselin.

2. Podávání *n*-3 PUFA v dietě ve formě fosfolipidů (kril) i ve formě triacylglycerolů zvyšují expresi genů zapojených do TG/MK cyklu. Dieta s vysokým obsahem tuku obohacená o *n*-3 PUFA původem z krilu (ve formě fosfolipidů) navíc vykazuje tendenci snižovat expresi genu pro DGAT2.

3. Dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje v kombinaci s podáváním *n*-3 PUFA (kril) či mírnou kalorickou restrikcí přispívala ke snížení exprese genu kódujícího enzym DGAT2, který významně podporuje akumulaci triacylglycerolů. Dieta s vysokým obsahem vepřového sádla tento efekt nevykazovala, ale pokud byla doplněna kombinovaným podáním *n*-3 PUFA se současnou 10% kalorickou restrikcí, došlo k navýšení exprese genů účastníků se prázdného metabolického cyklování mastných kyselin.

4. Exprese sledovaných genů se lišila v jednotlivých depech bílé tukové tkáně. Exprese genů pro lipolytické enzymy (ATGL, HSL) a pro enzym PEPCK byla zvýšena hlavně v dorzolumbálním tuku ve srovnání s tukem gonadálním. Exprese genu pro DGAT2 byla kromě experimentu č. 3 vyšší v depu gonadálním ve srovnání s tukem dorzolumbálním a exprese genu pro DGAT1 se nijak výrazně nelišila. Data změřená v mezenterickém tuku vykazovala velkou variabilitu. Variabilitu jsme zaznamenali i mezi jednotlivými pokusy, která mohla být způsobena různým věkem myši vstupujících do experimentu, dodávkou myši z různých chovných zařízení a tím i jejich odlišnou střevní mikroflorou, a ročním obdobím.

8. Použitá literatura

- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Cohen, P., 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. *Curr. Biol.* 7, 261–269.
- Alves-Bezerra, M., Gondim, K.C., 2012. Triacylglycerol biosynthesis occurs via the glycerol-3-phosphate pathway in the insect *Rhodnius prolixus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 1462–1471. doi:10.1016/j.bbalip.2012.08.002
- Anthony, N.M., Gaidhu, M.P., Ceddia, R.B., 2009. Regulation of visceral and subcutaneous adipocyte lipolysis by acute AICAR-induced AMPK activation. *Obesity (Silver Spring)* 17, 1312–1317. doi:10.1038/oby.2008.645
- Arvidsson, E., Viguerie, N., Andersson, I., Verdicch, C., Langin, D., Arner, P., 2004. Effects of different hypocaloric diets on protein secretion from adipose tissue of obese women. *Diabetes* 53, 1966–1971.
- Auguet, T., Quintero, Y., Terra, X., Martínez, S., Lucas, A., Pellitero, S., Aguilar, C., Hernández, M., del Castillo, D., Richart, C., 2011. Upregulation of Lipocalin 2 in Adipose Tissues of Severely Obese Women: Positive Relationship With Proinflammatory Cytokines. *Obesity* 19, 2295–2300. doi:10.1038/oby.2011.61
- Bahceci, M., Gokalp, D., Bahceci, S., Tuzcu, A., Atmaca, S., Arian, S., 2007. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J. Endocrinol. Invest.* 30, 210–214.
- Bales, C.W., Kraus, W.E., 2013. Caloric Restriction. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 33, 201–208. doi:10.1097/HCR.0b013e318295019e
- Balogun, K.A., Cheema, S.K., 2016. Dietary Omega-3 Fatty Acids Prevented Adipocyte Hypertrophy by Downregulating DGAT-2 and FABP-4 in a Sex-Dependent Fashion. *Lipids* 51, 25–38. doi:10.1007/s11745-015-4105-x
- Balsinde, J., Winstead, M.V., Dennis, E.A., 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531, 2–6.
- Bargut, T.C.L., Frantz, E.D.C., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Aguila, M.B., 2014. Effects of a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in mice. *Lipids* 49, 431–444. doi:10.1007/s11745-014-3892-9
- Barzilai, N., Banerjee, S., Hawkins, M., Chen, W., Rossetti, L., 1998. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. *J Clin Invest* 101, 1353–1361.
- Bastard, J.-P., 2002. Adipose Tissue IL-6 Content Correlates with Resistance to Insulin Activation of Glucose Uptake both in Vivo and in Vitro. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 2084–2089. doi:10.1210/jc.87.5.2084
- Bergan, H.E., Kittilson, J.D., Sheridan, M.A., 2015. Nutritional state modulates growth hormone-stimulated lipolysis. *General and Comparative Endocrinology* 217–218, 1–9. doi:10.1016/j.ygcen.2015.04.017
- Bergman, R.N., Ader, M., 2000. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 351–356.

- Bjørndal, B., Burri, L., Staalesen, V., Skorve, J., Berge, R.K., 2011. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes* 2011, 490650. doi:10.1155/2011/490650
- Björntorp, P., 1996. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 20, 291–302.
- Björntorp, P., 1990. “Portal” adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10, 493–496.
- Brooks, B.J., Arch, J.R., Newsholme, E.A., 1983. Effect of some hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty-acid substrate cycle in adipose tissue of the mouse in vivo. *Biosci. Rep.* 3, 263–267.
- Bruss, M.D., Khambatta, C.F., Ruby, M.A., Aggarwal, I., Hellerstein, M.K., 2010. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E108–116. doi:10.1152/ajpendo.00524.2009
- Buettner, R., Schölmerich, J., Bollheimer, L.C., 2007. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15, 798–808. doi:10.1038/oby.2007.608
- Cadoudal, T., Distel, E., Durant, S., Fouque, F., Blouin, J.-M., Collinet, M., Bortoli, S., Forest, C., Benelli, C., 2008. Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes* 57, 2272–2279. doi:10.2337/db08-0477
- Calder, P.C., 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1505S–1519S.
- Camargo, A., Meneses, M.E., Perez-Martinez, P., Delgado-Lista, J., Jimenez-Gomez, Y., Cruz-Teno, C., Tinahones, F.J., Paniagua, J.A., Perez-Jimenez, F., Roche, H.M., Malagon, M.M., Lopez-Miranda, J., 2014. Dietary fat differentially influences the lipids storage on the adipose tissue in metabolic syndrome patients. *Eur J Nutr* 53, 617–626. doi:10.1007/s00394-013-0570-2
- Campbell, P.J., Carlson, M.G., Hill, J.O., Nurjhan, N., 1992. Regulation of free fatty acid metabolism by insulin in humans: role of lipolysis and reesterification. *Am. J. Physiol.* 263, E1063–1069.
- Cantó, C., Auwerx, J., 2009. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 98–105. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4
- Carey, D.G., Jenkins, A.B., Campbell, L.V., Freund, J., Chisholm, D.J., 1996. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes* 45, 633–638.
- Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusis, A.J., Erickson, S.K., Farese, R.V., 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13018–13023.
- Cases, S., Stone, S.J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K.D., Voelker, T., Farese, R.V., 2001. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J. Biol. Chem.* 276, 38870–38876. doi:10.1074/jbc.M106219200
- Catalano, K.J., Stefanovski, D., Bergman, R.N., 2010. Critical Role of the Mesenteric Depot Versus Other Intra-abdominal Adipose Depots in the Development of Insulin Resistance in Young Rats. *Diabetes* 59, 1416–1423. doi:10.2337/db08-0675

- Cavaghan, M.K., Ehrmann, D.A., Byrne, M.M., Polonsky, K.S., 1997. Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves beta cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. *Journal of Clinical Investigation* 100, 530–537. doi:10.1172/JCI119562
- Chavarro, J.E., Kenfield, S.A., Stampfer, M.J., Loda, M., Campos, H., Sesso, H.D., Ma, J., 2013. Blood Levels of Saturated and Monounsaturated Fatty Acids as Markers of De Novo Lipogenesis and Risk of Prostate Cancer. *Am. J. Epidemiol.* 178, 1246–1255. doi:10.1093/aje/kwt136
- Chiba, Y., Saitoh, S., Takagi, S., Ohnishi, H., Katoh, N., Ohata, J., Nakagawa, M., Shimamoto, K., 2007. Relationship between visceral fat and cardiovascular disease risk factors: the Tanno and Sobetsu study. *Hypertens. Res.* 30, 229–236. doi:10.1291/hypres.30.229
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159. doi:10.1006/abio.1987.9999
- Cho, Y., Lee, S.-E., Lee, H.-C., Hur, J., Lee, S., Youn, S.-W., Lee, J., Lee, H.-J., Lee, T.-K., Park, J., Hwang, S.-J., Kwon, Y.-W., Cho, H.-J., Oh, B.-H., Park, Y.-B., Kim, H.-S., 2011. Adipokine Resistin Is a Key Player to Modulate Monocytes, Endothelial Cells, and Smooth Muscle Cells, Leading to Progression of Atherosclerosis in Rabbit Carotid Artery. *Journal of the American College of Cardiology* 57, 99–109. doi:10.1016/j.jacc.2010.07.035
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., Obin, M.S., 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46, 2347–2355. doi:10.1194/jlr.M500294-JLR200
- Coleman, R.A., Lewin, T.M., Van Horn, C.G., Gonzalez-Baró, M.R., 2002. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J. Nutr.* 132, 2123–2126.
- Couet, C., Delarue, J., Ritz, P., Antoine, J.M., Lamière, F., 1997. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21, 637–643.
- Daval, M., Diot-Dupuy, F., Bazin, R., Hainault, I., Viollet, B., Vaulont, S., Hajduch, E., Ferré, P., Foufelle, F., 2005. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 25250–25257. doi:10.1074/jbc.M414222200
- Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T., Hardie, D.G., 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* 377, 421–425. doi:10.1016/0014-5793(95)01368-7
- Degerman, E., Landström, T.R., Wijkander, J., Holst, L.S., Ahmad, F., Belfrage, P., Manganiello, V., 1998. Phosphorylation and activation of hormone-sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B. *Methods* 14, 43–53.
- de Souza, R.J., Mente, A., Maroleanu, A., Cozma, A.I., Ha, V., Kishibe, T., Uleryk, E., Budyłowski, P., Schuenemann, H., Beyene, J., Anand, S.S., 2015. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ-British Medical Journal* 351, h3978. doi:10.1136/bmj.h3978
- Djouder, N., Tuerk, R.D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R.F., Scholz, R., Vaahtomeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R.A., Viollet, B., Mäkelä, T.P., Wallimann, T., Neumann, D., Krek, W., 2010. PKA phosphorylates and inactivates AMPKα to promote efficient lipolysis. *The EMBO Journal* 29, 469–481. doi:10.1038/emboj.2009.339
- Drapeau, V., Therrien, F., Richard, D., Tremblay, A., 2003. Is visceral obesity a physiological adaptation to stress? *Panminerva Med* 45, 189–195.

- Dulloo, A., Mensi, N., Seydoux, J., Girardier, L., 1995. Differential-Effects of High-Fat Diets Varying in Fatty-Acid Composition. *Metabolism-Clinical and Experimental* 44, 273–279. doi:10.1016/0026-0495(95)90277-5
- Duplus, E., Glorian, M., Tordjman, J., Berge, R., Forest, C., 2002. Evidence for selective induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by unsaturated and nonmetabolized fatty acids in adipocytes. *J. Cell. Biochem.* 85, 651–661. doi:10.1002/jcb.10175
- Eaton, S.B., Konner, M., Shostak, M., 1988. Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. *Am. J. Med.* 84, 739–749.
- Egan, J.J., Greenberg, A.S., Chang, M.K., Wek, S.A., Moos, M.C., Londos, C., 1992. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 8537–8541. doi:10.1073/pnas.89.18.8537
- Fain, J.N., Cheema, P.S., Bahouth, S.W., Lloyd Hiler, M., 2003. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300, 674–678. doi:10.1016/S0006-291X(02)02864-4
- Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal, N., Ruzickova, J., Sponarova, J., Drahota, Z., Vlcek, C., Keijer, J., Houstek, J., Kopecky, J., 2005. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia* 48, 2365–2375. doi:10.1007/s00125-005-1944-7
- Flachs, P., Rühl, R., Hensler, M., Janovska, P., Zouhar, P., Kus, V., Macek Jilkova, Z., Papp, E., Kuda, O., Svobodova, M., Rossmeisl, M., Tsenov, G., Mohamed-Ali, V., Kopecky, J., 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, 2626–2638. doi:10.1007/s00125-011-2233-2
- Fontana, L., Meyer, T.E., Klein, S., Holloszy, J.O., 2004. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *PNAS* 101, 6659–6663. doi:10.1073/pnas.0308291101
- Frasson, D., Boschini, R.P., Chaves, V.E., dos Santos, M.E.S.M., Paula Gomes, S. de, Valentim, R.R., Garófalo, M.A.R., Navegantes, L.C.C., Migliorini, R.H., Kettelhut, I. do C., 2012. The sympathetic nervous system regulates the three glycerol-3P generation pathways in white adipose tissue of fasted, diabetic and high-protein diet-fed rats. *Metab. Clin. Exp.* 61, 1473–1485. doi:10.1016/j.metabol.2012.03.014
- Frayn, K.N., Arner, P., Yki-Järvinen, H., 2006. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem.* 42, 89–103. doi:10.1042/bse0420089
- Fredrikson, G., Strålfors, P., Nilsson, N.O., Belfrage, P., 1981. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 256, 6311–6320.
- Frühbeck, G., Aguado, M., Martínez, J.A., 1997. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 590–594. doi:10.1006/bbrc.1997.7716
- Gaidhu, M.P., Fediuc, S., Anthony, N.M., So, M., Mirpourian, M., Perry, R.L.S., Ceddia, R.B., 2009. Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. *J. Lipid Res.* 50, 704–715. doi:10.1194/jlr.M800480-JLR200
- Galgani, J.E., Moro, C., Ravussin, E., 2008. Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1009–1017. doi:10.1152/ajpendo.90558.2008
- Galitzky, J., Lafontan, M., Nordenström, J., Arner, P., 1993. Role of vascular alpha-2 adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 91, 1997–2003. doi:10.1172/JCI116421

- Gallagher, D., Kelley, D.E., Yim, J.-E., Spence, N., Albu, J., Boxt, L., Pi-Sunyer, F.X., Heshka, S., MRI Ancillary Study Group of the Look AHEAD Research Group, 2009. Adipose tissue distribution is different in type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 807–814. doi:10.3945/ajcn.2008.26955
- Gauthier, M.-S., Miyoshi, H., Souza, S.C., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Greenberg, A.S., Ruderman, N.B., 2008. AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J. Biol. Chem.* 283, 16514–16524. doi:10.1074/jbc.M708177200
- Gesta, S., Bluher, M., Yamamoto, Y., Norris, A.W., Berndt, J., Kralisch, S., Boucher, J., Lewis, C., Kahn, C.R., 2006. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 6676–6681. doi:10.1073/pnas.0601752103
- Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., Cinti, S., 2014. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur. J. Endocrinol.* 170, R159–171. doi:10.1530/EJE-13-0945
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., Londos, C., 1991. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* 266, 11341–11346.
- Habinowski, S.A., Witters, L.A., 2001. The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 852–856. doi:10.1006/bbrc.2001.5484
- Harman-Boehm, I., Blüher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Klöting, N., Stumvoll, M., Bashan, N., Rudich, A., 2007. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2240–2247. doi:10.1210/jc.2006-1811
- Harmon, J.S., Rieniets, L.M., Sheridan, M.A., 1993. Glucagon and insulin regulate lipolysis in trout liver by altering phosphorylation of triacylglycerol lipase. *Am. J. Physiol.* 265, R255–260.
- Hayashi, T., Boyko, E.J., Leonetti, D.L., McNeely, M.J., Newell-Morris, L., Kahn, S.E., Fujimoto, W.Y., 2003. Visceral adiposity and the risk of impaired glucose tolerance: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care* 26, 650–655.
- Heilbronn, L., Smith, S.R., Ravussin, E., 2004. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28 Suppl 4, S12–21. doi:10.1038/sj.ijo.0802853
- Higami, Y., Pugh, T.D., Page, G.P., Allison, D.B., Prolla, T.A., Weindruch, R., 2004. Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J.* 18, 415–417. doi:10.1096/fj.03-0678fje
- Higgs, G., Palmer, R., Eakins, K., Moncada, S., 1981. Arachidonic-Acid Metabolism as a Source of Inflammatory Mediators and Its Inhibition as a Mechanism of Action for Anti-Inflammatory Drugs. *Mol. Asp. Med.* 4, 275–301. doi:10.1016/0098-2997(81)90007-8
- Hsieh, C.-W., DeSantis, D., M, C., 2011. Role of Triglyceride/Fatty Acid Cycle in Development of Type 2 Diabetes, in: Croniger, C. (Ed.), *Role of the Adipocyte in Development of Type 2 Diabetes*. InTech.
- Hussain, G., Schmitt, F., Loeffler, J.-P., Gonzalez De Aguilar, J.L., 2013. Fattening the brain: a brief of recent research. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 144. doi:10.3389/fncel.2013.00144
- Iozzo, P., 2011. Myocardial, perivascular, and epicardial fat. *Diabetes Care* 34 Suppl 2, S371–379. doi:10.2337/dc11-s250

- James, M.J., Gibson, R.A., Cleland, L.G., 2000. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 343S–8S.
- Janovská, P., Flachs, P., Kazdová, L., Kopecký, J., 2013. Anti-obesity effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in mice fed high-fat diet is independent of cold-induced thermogenesis. *Physiol Res* 62, 153–161.
- Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., Gross, R.W., 2004. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J. Biol. Chem.* 279, 48968–48975. doi:10.1074/jbc.M407841200
- Jenkins-Kruchten, A.E., Bennaars-Eiden, A., Ross, J.R., Shen, W.-J., Kraemer, F.B., Bernlohr, D.A., 2003. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *J. Biol. Chem.* 278, 47636–47643. doi:10.1074/jbc.M307680200
- Jeoung, N.H., Harris, R.A., 2010. Role of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in regulation of blood glucose levels. *Korean Diabetes J* 34, 274–283. doi:10.4093/kdj.2010.34.5.274
- Jo, J., Guo, J., Liu, T., Mullen, S., Hall, K.D., Cushman, S.W., Periwai, V., 2010. Hypertrophy-Driven Adipocyte Death Overwhelms Recruitment under Prolonged Weight Gain. *Biophysical Journal* 99, 3535–3544. doi:10.1016/j.bpj.2010.10.009
- Kanai, H., Matsuzawa, Y., Kotani, K., Keno, Y., Kobatake, T., Nagai, Y., Fujioka, S., Tokunaga, K., Tarui, S., 1990. Close correlation of intra-abdominal fat accumulation to hypertension in obese women. *Hypertension* 16, 484–490. doi:10.1161/01.HYP.16.5.484
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., Kasuga, M., 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116, 1494–1505. doi:10.1172/JCI26498
- Kapoor, R., Huang, Y.-S., 2006. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Curr Pharm Biotechnol* 7, 531–534.
- Karlson, P., 1975. *Introduction to modern biochemistry*, 4th ed. ed. Academic Press, New York.
- Kayden, H.J., Senior, J.R., Mattson, F.H., 1967. The Monoglyceride Pathway of Fat Absorption in Man*. *Journal of Clinical Investigation* 46, 1695–1703. doi:10.1172/JCI105660
- Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., Rassouli, N., Ranganathan, G., 2003. Adiponectin Expression From Human Adipose Tissue: Relation to Obesity, Insulin Resistance, and Tumor Necrosis Factor-Expression. *Diabetes* 52, 1779–1785. doi:10.2337/diabetes.52.7.1779
- Kershaw, E.E., Hamm, J.K., Verhagen, L.A.W., Peroni, O., Katic, M., Flier, J.S., 2006. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 55, 148–157.
- Kim, H.-K., Della-Fera, M., Lin, J., Baile, C.A., 2006. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr.* 136, 2965–2969.
- Kim, J.Y., 2006. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF- in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPAR. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 291, E115–E127. doi:10.1152/ajpendo.00317.2005
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T.F.E., Drägen, D., Skurk, T., Hauner, H., Bluher, M., Unger, T., Wolf, A.-M., Knippschild, U., Hombach, V., Marx, N., 2008. T-lymphocyte Infiltration in Visceral Adipose Tissue: A Primary Event in Adipose Tissue Inflammation and the Development of Obesity-Mediated Insulin Resistance.

- Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 28, 1304–1310.
doi:10.1161/ATVBAHA.108.165100
- Knippenberg, M., Helder, M.N., Doulabi, B.Z., Semeins, C.M., Wuisman, P.I.J.M., Klein-Nulend, J., 2005. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Eng.* 11, 1780–1788. doi:10.1089/ten.2005.11.1780
- Kopecky, J., Rossmeisl, M., Flachs, P., Kuda, O., Brauner, P., Jilkova, Z., Stankova, B., Tvrzicka, E., Bryhn, M., 2009. n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proc Nutr Soc* 68, 361–369. doi:10.1017/S0029665109990231
- Kraemer, F.B., Patel, S., Saedi, M.S., Sztalryd, C., 1993. Detection of hormone-sensitive lipase in various tissues. I. Expression of an HSL/bacterial fusion protein and generation of anti-HSL antibodies. *J. Lipid Res.* 34, 663–671.
- Kris-Etherton, P.M., Committee, for the N., 1999. Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation* 100, 1253–1258. doi:10.1161/01.CIR.100.11.1253
- Kunesová, M., Braunerová, R., Hlavatý, P., Tvrzická, E., Stanková, B., Skrha, J., Hilgertová, J., Hill, M., Kopecký, J., Wagenknecht, M., Hainer, V., Matoulek, M., Parízková, J., Zák, A., Svčina, S., 2006. The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. *Physiol Res* 55, 63–72.
- Kyle, U.G., Genton, L., Hans, D., Karsegard, L., Slosman, D.O., Pichard, C., 2001. Age-related differences in fat-free mass, skeletal muscle, body cell mass and fat mass between 18 and 94 years. *Eur J Clin Nutr* 55, 663–672. doi:10.1038/sj.ejcn.1601198
- Lafontan, M., Berlan, M., 1993. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* 34, 1057–1091.
- Lafontan, M., Berlan, M., 1981. Alpha-adrenergic receptors and the regulation of lipolysis in adipose tissue. *Trends in Pharmacological Sciences* 2, 126–129. doi:10.1016/0165-6147(81)90286-8
- Lankinen, M., Schwab, U., Erkkilä, A., Seppänen-Laakso, T., Hannila, M.-L., Mussalo, H., Lehto, S., Uusitupa, M., Gylling, H., Orešič, M., 2009. Fatty Fish Intake Decreases Lipids Related to Inflammation and Insulin Signaling—A Lipidomics Approach. *PLOS ONE* 4, e5258. doi:10.1371/journal.pone.0005258
- Lara-Castro, C., Garvey, W.T., 2008. Intracellular Lipid Accumulation in Liver and Muscle and the Insulin Resistance Syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 37, 841–856. doi:10.1016/j.ecl.2008.09.002
- Larsson, S., Jones, H.A., Göransson, O., Degerman, E., Holm, C., 2016. Parathyroid hormone induces adipocyte lipolysis via PKA-mediated phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Cellular Signalling* 28, 204–213. doi:10.1016/j.cellsig.2015.12.012
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., Zechner, R., 2006. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism* 3, 309–319. doi:10.1016/j.cmet.2006.03.005
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., Kliewer, S.A., 1995. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *Journal of Biological Chemistry* 270, 12953–12956. doi:10.1074/jbc.270.22.12953
- Leibel, R.L., Hirsch, J., 1985. A radioisotopic technique for analysis of free fatty acid reesterification in human adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 248, E140–147.

- Liu, L.-F., Purushotham, A., Wendel, A.A., Koba, K., DeIuliis, J., Lee, K., Belury, M.A., 2009. Regulation of adipose triglyceride lipase by rosiglitazone. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 11, 131–142. doi:10.1111/j.1463-1326.2008.00916.x
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Loffreda, S., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Karp, C.L., Brengman, M.L., Wang, D.J., Klein, A.S., Bulkley, G.B., Bao, C., Noble, P.W., Lane, M.D., Diehl, A.M., 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* 12, 57–65.
- Lokesh, B.R., Kinsella, J.E., 1987. Modulation of prostaglandin synthesis in mouse peritoneal macrophages by enrichment of lipids with either eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids in vitro. *Immunobiology* 175, 406–419. doi:10.1016/S0171-2985(87)80069-4
- Lombardo, Y.B., Chicco, A.G., 2006. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J. Nutr. Biochem.* 17, 1–13. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.08.002
- Lopez-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M.V., Allard, J., Ingram, D.K., Navas, P., de Cabo, R., 2006. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 1768–1773. doi:10.1073/pnas.0510452103
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* 117, 175–184. doi:10.1172/JCI29881
- Luo, J., Rizkalla, S.W., Boillot, J., Alamowitch, C., Chaib, H., Bruzzo, F., Desplanque, N., Dalix, A.M., Durand, G., Slama, G., 1996. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids improve adipocyte insulin action and glucose metabolism in insulin-resistant rats: relation to membrane fatty acids. *J. Nutr.* 126, 1951–1958.
- Maachi, M., Piéroni, L., Bruckert, E., Jardel, C., Fellahi, S., Hainque, B., Capeau, J., Bastard, J.-P., 2004. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF α , leptin and IL-6 levels in obese women. *International Journal of Obesity* 28, 993–997. doi:10.1038/sj.ijo.0802718
- MacLean, C.H., Mojica, W.A., Morton, S.C., Pencharz, J., Hasenfeld Garland, R., Tu, W., Newberry, S.J., Jungvig, L.K., Grossman, J., Khanna, P., Rhodes, S., Shekelle, P., 2004. Effects of omega-3 fatty acids on lipids and glycemic control in type II diabetes and the metabolic syndrome and on inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, renal disease, systemic lupus erythematosus, and osteoporosis. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 1–4.
- Mangravite, L.M., Dawson, K., Davis, R.R., Gregg, J.P., Krauss, R.M., 2007. Fatty acid desaturase regulation in adipose tissue by dietary composition is independent of weight loss and is correlated with the plasma triacylglycerol response. *Am J Clin Nutr* 86, 759–767.
- Mårin, P., Andersson, B., Ottosson, M., Olbe, L., Chowdhury, B., Kvist, H., Holm, G., Sjöström, L., Björntorp, P., 1992. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metab. Clin. Exp.* 41, 1242–1248.
- Masoro, E.J., 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126, 913–922. doi:10.1016/j.mad.2005.03.012
- McTernan, P.G., 2002. Increased Resistin Gene and Protein Expression in Human Abdominal Adipose Tissue. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 2407–2407. doi:10.1210/jc.87.5.2407
- Medrikova, D., Jilkova, Z.M., Bardova, K., Janovska, P., Rossmeisl, M., Kopecky, J., 2012. Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control. *Int J Obes (Lond)* 36, 262–272. doi:10.1038/ijo.2011.87

- Mihai, B.M., Petriș, A.O., Ungureanu, D.A., Lăcătușu, C.M., 2014. Insulin resistance and adipokine levels correlate with early atherosclerosis – a study in prediabetic patients. *Open Medicine* 10. doi:10.1515/med-2015-0003
- Moraes-Vieira, P.M., Yore, M.M., Dwyer, P.M., Syed, I., Aryal, P., Kahn, B.B., 2014. RBP4 Activates Antigen-Presenting Cells, Leading to Adipose Tissue Inflammation and Systemic Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 19, 512–526. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.018
- Mori, T.A., Bao, D.Q., Burke, V., Puddey, I.B., Watts, G.F., Beilin, L.J., 1999. Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 817–825.
- Morrone, M., Giordano, A., Zingaretti, M.C., Boiani, R., De Matteis, R., Kahn, B.B., Nisoli, E., Tonello, C., Pisoschi, C., Luchetti, M.M., Marelli, M., Cinti, S., 2004. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16801–16806. doi:10.1073/pnas.0407647101
- Mozaffarian, D., Rimm, E.B., 2006. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* 296, 1885–1899. doi:10.1001/jama.296.15.1885
- Murano, I., Barbatelli, G., Giordano, A., Cinti, S., 2009. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. *J. Anat.* 214, 171–178. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.01001.x
- Murano, I., Barbatelli, G., Parisani, V., Latini, C., Muzzonigro, G., Castellucci, M., Cinti, S., 2008. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J. Lipid Res.* 49, 1562–1568. doi:10.1194/jlr.M800019-JLR200
- Mutch, D.M., Pers, T.H., Temanni, M.R., Pelloux, V., Marquez-Quinones, A., Holst, C., Martinez, J.A., Babalis, D., van Baak, M.A., Handjieva-Darlenska, T., Walker, C.G., Astrup, A., Saris, W.H.M., Langin, D., Viguerie, N., Zucker, J.-D., Clément, K., DiOGenes Project, 2011. A distinct adipose tissue gene expression response to caloric restriction predicts 6-mo weight maintenance in obese subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 1399–1409. doi:10.3945/ajcn.110.006858
- Nielsen, T.S., Jessen, N., Jorgensen, J.O.L., Moller, N., Lund, S., 2014. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of Molecular Endocrinology* 52, R199–R222. doi:10.1530/JME-13-0277
- Nielsen, T.S., Vendelbo, M.H., Jessen, N., Pedersen, S.B., Jørgensen, J.O., Lund, S., Møller, N., 2011. Fasting, but not exercise, increases adipose triglyceride lipase (ATGL) protein and reduces G(0)/G(1) switch gene 2 (G0S2) protein and mRNA content in human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1293–1297. doi:10.1210/jc.2011-0149
- Nye, C.K., Hanson, R.W., Kalhan, S.C., 2008. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *J. Biol. Chem.* 283, 27565–27574. doi:10.1074/jbc.M804393200
- Nye, C., Kim, J., Kalhan, S.C., Hanson, R.W., 2008. Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 356–361. doi:10.1016/j.tem.2008.08.003
- Okita, N., Tsuchiya, T., Fukushima, M., Itakura, K., Yuguchi, K., Narita, T., Hashizume, Y., Sudo, Y., Chiba, T., Shimokawa, I., Higami, Y., 2015. Chronological analysis of caloric restriction-induced alteration of fatty acid biosynthesis in white adipose tissue of rats. *Experimental Gerontology* 63, 59–66. doi:10.1016/j.exger.2015.01.043
- Ottosson, M., 2000. Effects of Cortisol and Growth Hormone on Lipolysis in Human Adipose Tissue. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85, 799–803. doi:10.1210/jc.85.2.799

- Ouchi, N., 2003. Reciprocal Association of C-Reactive Protein With Adiponectin in Blood Stream and Adipose Tissue. *Circulation* 107, 671–674. doi:10.1161/01.CIR.0000055188.83694.B3
- Paolisso, G., Tataranni, P.A., Foley, J.E., Bogardus, C., Howard, B.V., Ravussin, E., 1995. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 38, 1213–1217.
- Parker, H.M., Johnson, N.A., Burdon, C.A., Cohn, J.S., O'Connor, H.T., George, J., 2012. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology* 56, 944–951. doi:10.1016/j.jhep.2011.08.018
- Parrish, C.C., Pathy, D.A., Angel, A., 1990. Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats. *Metab. Clin. Exp.* 39, 217–219.
- Pasarica, M., Gowronska-Kozak, B., Burk, D., Remedios, I., Hymel, D., Gimble, J., Ravussin, E., Bray, G.A., Smith, S.R., 2009. Adipose tissue collagen VI in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 5155–5162. doi:10.1210/jc.2009-0947
- Paton, C.M., Ntambi, J.M., 2009. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 297, E28–E37. doi:10.1152/ajpendo.90897.2008
- Pella, D., Dubnov, G., Singh, R.B., Sharma, R., Berry, E.M., Manor, O., 2003. Effects of an Indo-Mediterranean diet on the omega-6/omega-3 ratio in patients at high risk of coronary artery disease: the Indian paradox. *World Rev Nutr Diet* 92, 74–80.
- Perseghin, G., Lattuada, G., Danna, M., Sereni, L.P., Maffi, P., De Cobelli, F., Battezzati, A., Secchi, A., Del Maschio, A., Luzi, L., 2003. Insulin resistance, intramyocellular lipid content, and plasma adiponectin in patients with type 1 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1174–E1181. doi:10.1152/ajpendo.00279.2003
- Plourde, M., Cunnane, S.C., 2007. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 619–634. doi:10.1139/H07-034
- Portolesi, R., Powell, B.C., Gibson, R.A., 2007. Competition between 24:5n-3 and ALA for 6 desaturase may limit the accumulation of DHA in HepG2 cell membranes. *The Journal of Lipid Research* 48, 1592–1598. doi:10.1194/jlr.M700081-JLR200
- Qiao, L., Kinney, B., Schaack, J., Shao, J., 2011. Adiponectin Inhibits Lipolysis in Mouse Adipocytes. *Diabetes* 60, 1519–1527. doi:10.2337/db10-1017
- Qi, K., Fan, C., Jiang, J., Zhu, H., Jiao, H., Meng, Q., Deckelbaum, R., 2008. Omega-3 fatty acid containing diets decrease plasma triglyceride concentrations in mice by reducing endogenous triglyceride synthesis and enhancing the blood clearance of triglyceride-rich particles. *Clinical Nutrition* 27, 424–430. doi:10.1016/j.clnu.2008.02.001
- Ranhotra, H.S., 2010. Long-term caloric restriction up-regulates PPAR gamma co-activator 1 alpha (PGC-1alpha) expression in mice. *Indian J. Biochem. Biophys.* 47, 272–277.
- Robertson, J.P., Faulkner, A., Vernon, R.G., 1982. Regulation of glycolysis and fatty acid synthesis from glucose in sheep adipose tissue. *Biochemical Journal* 206, 577–586. doi:10.1042/bj2060577
- Robinson, J., Newsholme, E.A., 1969. Some properties of hepatic glycerol kinase and their relation to the control of glycerol utilization. *Biochem. J.* 112, 455–464.
- Rossmesl, M., Jilkova, Z.M., Kuda, O., Jelenik, T., Medrikova, D., Stankova, B., Kristinsson, B., Haraldsson, G.G., Svensen, H., Stoknes, I., Sjövall, P., Magnusson, Y., Balvers, M.G.J., Verhoeckx, K.C.M., Tvrzicka, E., Bryhn, M., Kopecky, J., 2012. Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are

- superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS ONE* 7, e38834. doi:10.1371/journal.pone.0038834
- Rustan, A.C., Christiansen, E.N., Drevon, C.A., 1992. Serum lipids, hepatic glycerolipid metabolism and peroxisomal fatty acid oxidation in rats fed omega-3 and omega-6 fatty acids. *Biochem. J.* 283 (Pt 2), 333–339.
- Ruzickova, J., Rossmeisl, M., Prazak, T., Flachs, P., Sponarova, J., Vecka, M., Tvrzicka, E., Bryhn, M., Kopecky, J., 2004. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* 39, 1177–1185. doi:10.1007/s11745-004-1345-9
- Sacks, G.S., Walker, J., Dickerson, R.N., Kudsk, K.A., Brown, R.O., 1994. Observations of hypophosphatemia and its management in nutrition support. *Nutr Clin Pract* 9, 105–108.
- Saggerson, E.D., Greenbaum, A.L., 1970. The regulation of triglyceride synthesis and fatty acid synthesis in rat epididymal adipose tissue. *Biochem. J.* 119, 193–219.
- Sanders, T.A., 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr* 71, 176s–178s.
- Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., Serhan, C.N., 2007. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869–874. doi:10.1038/nature05877
- Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., Zimmermann, R., 2006. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J. Biol. Chem.* 281, 40236–40241. doi:10.1074/jbc.M608048200
- Simopoulos, A.P., 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 233, 674–688. doi:10.3181/0711-MR-311
- Simopoulos, A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56, 365–379. doi:10.1016/S0753-3322(02)00253-6
- Sinclair, D.A., 2005. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126, 987–1002. doi:10.1016/j.mad.2005.03.019
- Smith, S.J., Cases, S., Jensen, D.R., Chen, H.C., Sande, E., Tow, B., Sanan, D.A., Raber, J., Eckel, R.H., Farese, R.V., 2000. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat. Genet.* 25, 87–90. doi:10.1038/75651
- Smith, S.R., Lovejoy, J.C., Greenway, F., Ryan, D., deJonge, L., de la Bretonne, J., Volafava, J., Bray, G.A., 2001. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metab. Clin. Exp.* 50, 425–435. doi:10.1053/meta.2001.21693
- Soni, N.K., Nookaew, I., Sandberg, A.-S., Gabrielsson, B.G., 2015. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched high fat diet delays the development of fatty liver in mice. *Lipids Health Dis* 14, 74. doi:10.1186/s12944-015-0072-8
- Spencer, M., Finlin, B.S., Unal, R., Zhu, B., Morris, A.J., Shipp, L.R., Lee, J., Walton, R.G., Adu, A., Erfani, R., Campbell, M., McGehee, R.E., Peterson, C.A., Kern, P.A., 2013. Omega-3 fatty acids reduce adipose tissue macrophages in human subjects with insulin resistance. *Diabetes* 62, 1709–1717. doi:10.2337/db12-1042
- Spencer, M., Unal, R., Zhu, B., Rasouli, N., McGehee, R.E., Peterson, C.A., Kern, P.A., 2011. Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1990–1998. doi:10.1210/jc.2011-1567

- Sponarova, J., Mustard, K.J., Horakova, O., Flachs, P., Rossmeisl, M., Brauner, P., Bardova, K., Thomason-Hughes, M., Braunerova, R., Janovska, P., Hardie, D.G., Kopecky, J., 2005. Involvement of AMP-activated protein kinase in fat depot-specific metabolic changes during starvation. *FEBS Lett.* 579, 6105–6110. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.078
- Stone, S.J., Myers, H.M., Watkins, S.M., Brown, B.E., Feingold, K.R., Elias, P.M., Farese, R.V., 2004. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 279, 11767–11776. doi:10.1074/jbc.M311000200
- Taschler, U., Radner, F.P.W., Heier, C., Schreiber, R., Schweiger, M., Schoiswohl, G., Preiss-Landl, K., Jaeger, D., Reiter, B., Koefeler, H.C., Wojciechowski, J., Theussl, C., Penninger, J.M., Lass, A., Haemmerle, G., Zechner, R., Zimmermann, R., 2011. Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 286, 17467–17477. doi:10.1074/jbc.M110.215434
- Taskinen, M.R., Nikkilä, E.A., 1979. Effects of caloric restriction on lipid metabolism in man: changes of tissue lipoprotein lipase activities and of serum lipoproteins. *Atherosclerosis* 32, 289–299.
- Tempel, H. van der, Tulleken, J.E., Limburg, P.C., Muskiet, F.A., Rijswijk, M.H. van, 1990. Effects of fish oil supplementation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 49, 76–80. doi:10.1136/ard.49.2.76
- Titos, E., Rius, B., González-Pérez, A., López-Vicario, C., Morán-Salvador, E., Martínez-Clemente, M., Arroyo, V., Clària, J., 2011. Resolvin D1 and Its Precursor Docosahexaenoic Acid Promote Resolution of Adipose Tissue Inflammation by Eliciting Macrophage Polarization toward an M2-Like Phenotype. *J Immunol* 187, 5408–5418. doi:10.4049/jimmunol.1100225
- Todorčević, M., Hodson, L., 2015. The Effect of Marine Derived n-3 Fatty Acids on Adipose Tissue Metabolism and Function. *Journal of Clinical Medicine* 5, 3. doi:10.3390/jcm5010003
- Todoric, J., Löffler, M., Huber, J., Bilban, M., Reimers, M., Kadl, A., Zeyda, M., Waldhäusl, W., Stulnig, T.M., 2006. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* 49, 2109–2119. doi:10.1007/s00125-006-0300-x
- Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E.G., Spiegelman, B.M., 1995. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 15, 351–357.
- Tornqvist, H., Belfrage, P., 1976. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 251, 813–819.
- Tushuizen, M.E., Bunck, M.C., Pouwels, P.J., Bontemps, S., van Waesberghe, J.H.T., Schindhelm, R.K., Mari, A., Heine, R.J., Diamant, M., 2007. Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30, 2916–2921. doi:10.2337/dc07-0326
- van Hall, G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock, N., Møller, K., Saltin, B., Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., 2003. Interleukin-6 Stimulates Lipolysis and Fat Oxidation in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 3005–3010. doi:10.1210/jc.2002-021687
- van Schothorst, E.M., Flachs, P., Franssen-van Hal, N.L., Kuda, O., Bunschoten, A., Molthoff, J., Vink, C., Hooiveld, G.J., Kopecky, J., Keijer, J., 2009. Induction of lipid oxidation by polyunsaturated fatty acids of marine origin in small intestine of mice fed a high-fat diet. *BMC Genomics* 10, 110. doi:10.1186/1471-2164-10-110
- Vaughan, M., Berger, J.E., Steinberg, D., 1964. HORMONE-SENSITIVE LIPASE AND MONOGLYCERIDE LIPASE ACTIVITIES IN ADIPOSE TISSUE. *J. Biol. Chem.* 239, 401–409.
- Vaz, J.S., Kac, G., Nardi, A.E., Hibbeln, J.R., 2014. Omega-6 fatty acids and greater likelihood of suicide risk and major depression in early pregnancy. *J. Affect. Disord.* 152, 76–82. doi:10.1016/j.jad.2013.04.045

- Vemuri, M., Kelley, D.S., Mackey, B.E., Rasooly, R., Bartolini, G., 2007. Docosahexaenoic Acid (DHA) But Not Eicosapentaenoic Acid (EPA) Prevents Trans-10, Cis-12 Conjugated Linoleic Acid (CLA)-Induced Insulin Resistance in Mice. *Metab Syndr Relat Disord* 5, 315–322. doi:10.1089/met.2007.0007
- Verhoef, S.P.M., Camps, S.G.J.A., Bouwman, F.G., Mariman, E.C.M., Westerterp, K.R., 2013. Physiological Response of Adipocytes to Weight Loss and Maintenance. *PLOS ONE* 8, e58011. doi:10.1371/journal.pone.0058011
- Vidal, H., 2001. Gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissues. *Ann. Med.* 33, 547–555.
- Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.-H., Sul, H.S., 2004. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 279, 47066–47075. doi:10.1074/jbc.M403855200
- Virtue, S., Vidal-Puig, A., 2010. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 338–349. doi:10.1016/j.bbalip.2009.12.006
- Vitali, A., Murano, I., Zingaretti, M.C., Frontini, A., Ricquier, D., Cinti, S., 2012. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J. Lipid Res.* 53, 619–629. doi:10.1194/jlr.M018846
- Vohl, M.-C., Sladek, R., Robitaille, J., Gurd, S., Marceau, P., Richard, D., Hudson, T.J., Tchernof, A., 2004. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes. Res.* 12, 1217–1222. doi:10.1038/oby.2004.153
- Wang, T., Zang, Y., Ling, W., Corkey, B.E., Guo, W., 2003. Metabolic partitioning of endogenous fatty acid in adipocytes. *Obes. Res.* 11, 880–887. doi:10.1038/oby.2003.121
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 112, 1796–1808. doi:10.1172/JCI200319246
- Wenz, T., 2009. PGC-1 α activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. *IUBMB Life* 61, 1051–1062. doi:10.1002/iub.261
- White, M.F., 1998. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* 182, 3–11.
- Whitman, M., Downes, C.P., Keeler, M., Keller, T., Cantley, L., 1988. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 332, 644–646. doi:10.1038/332644a0
- Winkler, G., Kiss, S., Keszthelyi, L., Sapi, Z., Ory, I., Salamon, F., Kovacs, M., Vargha, P., Szekeres, O., Speer, G., Karadi, I., Sikter, M., Kaszas, E., Dworak, O., Gero, G., Cseh, K., 2003. Expression of tumor necrosis factor (TNF)- α protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF- α , soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. *European Journal of Endocrinology* 149, 129–135. doi:10.1530/eje.0.1490129
- Wronska, A., Kmiec, Z., 2012. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiologica* 205, 194–208. doi:10.1111/j.1748-1716.2012.02409.x
- Wu, C.-H., Heshka, S., Wang, J., Pierson, R.N., Heymsfield, S.B., Laferrère, B., Wang, Z., Albu, J.B., Pi-Sunyer, X., Gallagher, D., 2007. Truncal fat in relation to total body fat: influences of age, sex, ethnicity and fatness. *International Journal of Obesity* 31, 1384–1391. doi:10.1038/sj.ijo.0803624

- Wu, C.H., Yao, W.J., Lu, F.H., Yang, Y.C., Wu, J.S., Chang, C.J., 2001. Sex differences of body fat distribution and cardiovascular dysmetabolic factors in old age. *Age Ageing* 30, 331–336.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W.D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., Spiegelman, B.M., 2012. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* 150, 366–376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016
- Wu, X., Motoshima, H., Mahadev, K., Stalker, T.J., Scalia, R., Goldstein, B.J., 2003. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52, 1355–1363.
- Xia, H., Ma, S., Wang, S., Sun, G., 2015. Meta-Analysis of Saturated Fatty Acid Intake and Breast Cancer Risk. *Medicine (Baltimore)* 94, e2391. doi:10.1097/MD.0000000000002391
- Yang, X., Lu, X., Lombès, M., Rha, G.B., Chi, Y.-I., Guerin, T.M., Smart, E.J., Liu, J., 2010. The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase. *Cell Metabolism* 11, 194–205. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.003
- Yao, X., Tian, Z., 2015. Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids Intake and Risk of Pancreatic Cancer: Evidence from Observational Studies. *PLoS One* 10, e0130870. doi:10.1371/journal.pone.0130870
- Yen, C.-L.E., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., Farese, R.V., 2008. Thematic Review Series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *The Journal of Lipid Research* 49, 2283–2301. doi:10.1194/jlr.R800018-JLR200
- Yin, W., Mu, J., Birnbaum, M.J., 2003. Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis In 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 43074–43080. doi:10.1074/jbc.M308484200
- Yu, J., Yu, H.-C., Kim, K.-A., Kwon, K.-B., Park, J.-W., Kim, S.-Z., Kim, S.H., Park, B.-H., 2008. Differences in the amount of lipolysis induced by atrial natriuretic peptide in small and large adipocytes. *Journal of Peptide Science* 14, 972–977. doi:10.1002/psc.1035
- Zammit, V.A., 2013. Hepatic triacylglycerol synthesis and secretion: DGAT2 as the link between glycaemia and triglyceridaemia. *Biochem. J.* 451, 1–12. doi:10.1042/BJ20121689
- Zandbergen, F., Mandard, S., Escher, P., Tan, N.S., Patsouris, D., Jatkoe, T., Rojas-Caro, S., Madore, S., Wahli, W., Tafuri, S., Müller, M., Kersten, S., 2005. The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene. *Biochem. J.* 392, 313–324. doi:10.1042/BJ20050636
- Zhang, H.H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V.C., Greenberg, A.S., 2002. Tumor Necrosis Factor-Stimulates Lipolysis in Differentiated Human Adipocytes Through Activation of Extracellular Signal-Related Kinase and Elevation of Intracellular cAMP. *Diabetes* 51, 2929–2935. doi:10.2337/diabetes.51.10.2929
- Zhou, A.L., Hintze, K.J., Jimenez-Flores, R., Ward, R.E., 2012. Dietary Fat Composition Influences Tissue Lipid Profile and Gene Expression in Fischer-344 Rats. *Lipids* 47, 1119–1130. doi:10.1007/s11745-012-3729-3
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., Zechner, R., 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383–1386. doi:10.1126/science.1100747