

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.
Oddělení biologie tukové tkáně

Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences
Department of Adipose Tissue Biology

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physiology



Autoreferát dizertační práce

Synopsis of the PhD thesis

Analýza mechanismů spojených s benefičním účinkem různých lipidových forem Omega-3 polynenasycených mastných kyselin z mořských zdrojů na metabolismus.

The analysis of mechanisms associated with beneficial metabolic effects of marine Omega-3 polyunsaturated fatty acids in different lipid forms.

Jana Pavlišová
Praha/Prague
2018

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Doctoral Study Programs in Biomedicine

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Charles University in Prague and Czech Academy of Sciences

Studijní program / Study program: Fyziologie živočichů / Animal Physiology

Předseda oborové rady / President of Subject Area Board: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště / Training center: Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i. / Institute of Physiology CAS, v.v.i.

Autor / Author: Mgr. Jana Pavlišová

Školitel / Supervisor: MUDr. Martin Rossmesl, Ph.D.

*S dizertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty
Univerzity Karlovy v Praze*

Obsah / Contents

ČESKÁ ČÁST (CZECH PART)	2
Abstrakt	2
Teoretický úvod.....	3
Cíle práce	5
Metody a uspořádání pokusů.....	6
Metabolické testy <i>in vivo</i>	6
Biochemické analýzy a měření <i>ex vivo</i>	7
Uspořádání pokusů.....	7
Výsledky a diskuze.....	8
Publikace A. Kukuříčný olej vs. Sádlo: Metabolické účinky omega-3 mastných kyselin u myší krmených obezogenními dietami s odlišnou kompozicí mastných kyselin	8
Publikace B: Dopad dlouhodobého podávání Omega-3 na inkretinový systém obezích myší krmených vysokotukovou dietou.	9
Publikace C: Omega-3 fosfolipidy z rybího masa potlačují jaterní steatózu obezích myší komplexní inhibicí biosyntetických drah.	10
Publikace D: Omega-3 PL, ne však Omega-3 TAG, zlepšují u obezích myší kmene C57BL/6 citlivost k inzulinu.	11
Závěry.....	12
Profesní životopis	14
ANGLICKÁ ČÁST (ENGLISH PART)	15
Abstract.....	15
Introduction.....	16
Aims of the thesis.....	18
Methods and experimental design	19
In vivo metabolic tests	19
Biochemical analyses and <i>ex vivo</i> measurements	19
Experimental setups.....	20
Results and discussions.....	21
Publication A: Corn-oil versus lard: metabolic effects of omega-3 fatty acids in mice fed obesogenic diets with different fatty acid composition.....	21
Publication B: The impact of long-term Omega-3 supplementation on the incretin system of dietary obese mice.....	22
Publication C: Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice.....	22
Publication D: Omega-3 PL but not Omega-3 TAG, improve insulin sensitivity in obese C57BL/6 mice fed a high fat diet	23
Conclusions.....	24
Curriculum vitae	26
Seznam všech impaktovaných publikací / List of scientific publications.....	27
Seznam literatury / References	28

Seznam zkratk / List of abbreviations

CVD	Cardiovascular disease	Kardiovaskulární onemocnění
DHA	Docosahexaenoic acid (C22:6 <i>n</i> -3)	Kyselina docosahexaenová (C22:6 <i>n</i> -3)
DPP-4	Dipeptidyl peptidase 4	Dipeptidylpeptidáza 4
EPA	Eicosapentaenoic acid (C20:5 <i>n</i> -3)	Kyselina eicosapentaenová (C20:5 <i>n</i> -3)
FA	Fatty acid	Mastná kyselina
GIP	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide	
GIPR	GIP receptor	Receptor GIP
GLP-1	Glucagon-like protein 1	
i.p.GTT	Intraperitoneal glucose tolerance test	Intraperitoneální glukózový toleranční test
IR	Insulin resistance	Inzulínová rezistence
MUFA	Monounsaturated fatty acids	Mononenasycené mastné kyseliny
NEFA	Non-esterified fatty acid	Volné mastné kyseliny
OGTT	Oral glucose tolerance test	Orální glukózový toleranční test
Omega-3	Polyunsaturated fatty acids of <i>n</i> -3 series	<i>n</i> -3 polynenasycené mastné kyseliny
Omega-3 PL	Omega-3 in a form of phospholipids	Omega-3 ve formě fosfolipidů
Omega-3 TAG	Omega-3 in a form of triacylglycerols	Omega-3 ve formě triacylglycerolů
Omega-6	Polyunsaturated fatty acids of <i>n</i> -6 series	<i>n</i> -6 polynenasycené mastné kyseliny
PUFA	Polyunsaturated fatty acids	Polynenasycené mastné kyseliny
SFA	Saturated fatty acids	Nasycené mastné kyseliny
T2DM	Type 2 diabetes mellitus	Diabetes mellitus 2. typu
TAG	Triacylglycerols	Triacylglyceroly
WAT	White adipose tissue	Bílá tuková tkáň

ČESKÁ ČÁST (CZECH PART)

Abstrakt

Obezita, jakožto jeden z nejzávažnějších zdravotních problémů 21. století, vzniká často v důsledku nerovnováhy mezi příjmem a výdejem energie. Příjem tuků pak hraje v rozvoji obezity důležitou roli částečně proto, že tuky jsou ve srovnání s ostatními makronutrienty nejkoncentrovanějším zdrojem energie. Zdravotní dopady konkrétní diety však nezáleží pouze na absolutním množství přijatých tuků. Důležitá je také kompozice mastných kyselin, přičemž nasycené mastné kyseliny (SFA) jsou kvůli svým prozánětlivým a lipotoxickým účinkům obecně považovány za méně zdravé, zatímco mononenasyčené (MUFA) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) představují zdravější alternativu, protože jsou v organismu pohotově oxidovány a nenarušují fyziologické vlastnosti buněčných membrán. Zcela unikátní třídu lipidů pak představují *n*-3 polynenasycené mastné kyseliny (Omega-3), jejichž příjem v potravě působí u lidí jako ochrana proti rozvoji kardiovaskulárního onemocnění a dyslipidemie, zatímco u zvířecích modelů obezity zlepšuje, kromě výše zmíněných parametrů, také citlivost k inzulinu a glukózovou toleranci.

Bylo již popsáno mnoho molekulárních mechanismů, jakými mohou Omega-3 působit na metabolismus. Omega-3 mohou modifikovat biochemické složení buněčných membrán, působit jako ligandy různých transkripčních faktorů či membránových receptorů, nebo sloužit jako prekurzory v syntéze bioaktivních lipidových molekul s protizánětlivými a rezolučními vlastnostmi. V této práci se zabýváme novými molekulárními mechanismy a systémy, které mohou být ovlivněny dlouhodobým příjmem Omega-3 u samců myšičího kmene C57BL/6 s obezitou indukovanou příjmem vysokotukové potraviny bohaté na *n*-6 polynenasycené mastné kyseliny (Omega-6). Dále jsme porovnávali účinky Omega-3 podávaných ve formě triacylglycerolů (Omega-3 TAG) a fosfolipidů (Omega-3 PL), přičemž Omega-3 PL vykazují v mnoha současných studiích silnější a reprodukovatelnější metabolické účinky především na glukózovou homeostázu a akumulaci tuku v játrech (jaterní steatózu) a mohly by tak představovat lepší alternativu podání Omega-3 za účelem prevence a potenciálně také léčby metabolických poruch spojených s obezitou.

V rámci prvního projektu (Publikace A) jsme analyzovali metabolické účinky Omega-3 TAG v závislosti na chemickém složení ostatních tuků v potravě, konkrétně na pozadí diety CHF, bohaté na Omega-6, a diety LHF, která obsahovala především SFA a MUFA. Podávání těchto dvou vysokotukových diet jako takových indukovalo u myši C57BL/6 srovnatelný nárůst tělesné hmotnosti a tukové masy (adipozity). Také narušení citlivosti k inzulinu, měřené metodou hyperinzulinemického-euglykemického zámku, se ukázalo být srovnatelné, což mohlo souviset s protektivním navýšením aktivity stearoyl-CoA desaturázy-1 (SCD-1), enzymu, který přetváří potenciálně lipotoxické SFA, obsažené v dietě LHF, na méně škodlivé MUFA. Akumulace MUFA však může být spojena s rozvojem silné jaterní steatózy, která byla typická právě pro myši, krmené dietou LHF. Suplementace Omega-3 rozvoj jaterní steatózy

potlačila prostřednictvím inhibice lipogeneze a stimulace oxidace mastných kyselin, přičemž tento efekt byl zcela nezávislý na složení ostatních tuků v dietě. Oproti tomu chronický zánět bílé tukové tkáně a glukózová intolerance byly suplementací Omega-3 pozitivně ovlivněny pouze na pozadí diety CHF, zatímco na pozadí diety LHF se tyto metabolické problémy působením Omega-3 spíše prohlubovaly. Výsledky tohoto projektu naznačují, že suplementace Omega-3 na pozadí diety bohaté na SFA může být problematická, jelikož aktivita Omega-3 může interferovat s protektivní stimulací aktivity SCD-1.

Cílem druhého projektu (Publikace B) bylo prověřit hypotézu, podle které vede dlouhodobá suplementace Omega-3 ke zvýšení aktivity inkretinového systému. Tato hypotéza vychází z pozorování, že myši C57BL/6, suplementované Omega-3, mají v odpovědi na podání glukózy výrazně zvýšenou hladinu inzulínu v krvi, ovšem pouze v případě, že je glukóza podána orálně. Tato hypotéza nebyla potvrzena, jelikož suplementace Omega-3 nevedla na našem modelu k navýšení sekrece GLP-1 (glucagon-like peptide-1), k potlačení aktivity degradačního enzymu dipeptidylpeptidázy 4 (DPP-4), ani ke změnám v citlivosti organismu k hormonu GIP (glucose dependent insulinotropic polypeptide). Nicméně hypersekrece GIP a zvýšená koncentrace GIP receptorů v bílé tukové tkáni, typické pro obézní myši, byly vlivem podávání Omega-3 částečně normalizovány, přičemž tento účinek by mohl představovat nový mechanismus působení Omega-3 na adipozitu.

Konečně, v Publikacích C a D jsme se zaměřili na metabolické účinky dlouhodobé suplementace Omega-3 PL izolovaných z masa sledů, případně obsažených v oleji z mořského krilu. Ukázali jsme, že při podávání Omega-3 PL dochází ke komplexní regulaci *de novo* lipogeneze, biosyntézy cholesterolu a oxidace mastných kyselin na úrovni genové exprese v játrech, což ve výsledku vede k účinné redukci jaterní steatózy a potlačení dyslipidemie. K dosažení maximálního účinku je přitom potřeba přítomnosti obou složek molekul Omega-3 PL, tedy Omega-3 jako takových a jejich fosfolipidového nosiče, jmenovitě fosfatidylcholinu (PC). Použitím metody hyperinzulinemického-euglykemického zámku jsme také ukázali, že dlouhodobé podávání Omega-3 PL vedlo k oslabení celotělové glukózové intolerance a inzulínové rezistence u obézních myší, přičemž tento efekt byl spojen především s posílením svalové a jaterní citlivosti k inzulínu a výrazně převyšoval efekt srovnatelné dávky Omega-3 ve formě triacylglycerolů.

Teoretický úvod

Obezita je charakterizována nadměrným hromaděním tuku v podkožní nebo v abdominální bílé tukové tkáni (WAT), nebo dokonce ektopicky mezi buňkami ostatních orgánů. Zvýšený metabolický obrat lipidů v hypertrofovaných adipocytech vede k chronickému nárůstu hladiny volných mastných kyselin (NEFA) v krvi¹. NEFA jako takové přímo interferují s inzulínovou signalizací², čímž mohou navodit rozvoj inzulínové rezistence (IR), zatímco metabolity NEFA, jako jsou diacylglyceroly nebo ceramidy, indukují rozvoj zánětu,

mitochondriální poškození a apoptózu³. Hypertrofované adipocyty a buňky imunitního systému, které jsou přítomné v tukové tkáni, musí odolávat mnoha stresovým faktorům, což vede k přepnutí buněčné signalizace do pro-zánětlivého módu, jehož cílem je revaskularizace, přestavba tukové tkáně a odstranění odumřelých adipocytů. Přitom příčinné spojení chronického zánětu a IR již bylo také jasně prokázáno. Obezita, především pak "centrální typ obezity" s vysokým poměrem obvodu pasu vůči obvodu boků, a IR jsou pak hnacími motory pro rozvoj metabolického syndromu, který může dále postupovat k diabetu 2. typu (T2DM) a kardiovaskulárnímu onemocnění (CVD).

Inkretiny jsou hormony vylučované endokrinními buňkami střeva v odpovědi na příjem živin. Dva nejvíce studované inkretiny jsou GLP-1 (glucagon-like peptide-1) a GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide). Tyto hormony významně umocňují endogenní sekreci inzulínu, zvyšují životnost pankreatických β -buněk a vykazují mnohé další biologické účinky, které společně připravují organismus, aby maximálně využil nabídku živin bez výrazných oscilací glykémie⁴. Receptory GIP (GIPR) jsou kromě toho bohatě exprimovány na membránách dospělých adipocytů, kde se jejich aktivita pojí s ukládáním lipidů⁵. Ztráta "inkretinového efektu", tedy významný pokles v rané fázi sekrece inzulínu, je velmi časným a specifickým ukazatelem rozvoje T2DM⁶. Tyto změny jsou spojeny s poklesem hladiny aktivního GLP-1 a/nebo s rozvojem rezistence vůči GIP, která je, podobně jako inzulínová rezistence, spojena s chronickým nárůstem sekrece GIP. Obezita je také spojena se zvýšenou aktivitou degradačního enzymu dipeptidyl peptidázy 4 (DPP-4), který štěpí aktivní GLP-1 a GIP na jejich zkrácené, inaktivované formy⁷. V léčbě T2DM představuje inkretinový systém v současné době významný terapeutický cíl⁸.

Při prevenci metabolických poruch spojených s obezitou je potřeba zohledňovat nejen absolutní množství přijatého tuku, ale také složení mastných kyselin (FA), které se výrazně podílí na výsledném dopadu konkrétní diety na zdraví jedince. Některé klinické studie ukazují, že nadměrný příjem nasycených tuků (SFA) vede ve srovnání s mononenasyčenými FA (MUFA) a polynenasycenými FA (PUFA) k rozvoji centrální obezity a ke zvýšené akumulaci ektopického tuku v jaterní tkáni^{9,10}. PUFA představují obecně zdravější alternativu, protože jsou v mitochondriích pohotově oxidovány, a navíc se jedná o esenciální živiny, které slouží jako prekurzory pro syntézu různých bioaktivních lipidových mediátorů. PUFA ze skupiny *n*-6 (Omega-6) slouží mimo jiné pro syntézu eikosanoidů a endokannabinoidů, které se účastní mnoha fyziologických procesů spojených se stresem, zánětem nebo reakcí na poranění; zprostředkují například vasokonstrikci, bolest, horečku, shlukování krevních destiček nebo kontrakce hladké svaloviny¹¹.

PUFA ze skupiny *n*-3 (Omega-3), konkrétně kyselina eikosapentaenová (EPA, C20:5 *n*-3) a kyselina dokosahexaenová (DHA, C22:6 *n*-3), představují zcela unikátní typ lipidů, který se uplatňuje například v prevenci CVD¹² nebo dyslipidemie¹³. Omega-3 indukují nejrůznější účinky na metabolismus prostřednictvím interakce s membránovým receptorem GPR120¹⁴ a s transkripčními faktory, jako jsou například receptory z rodiny PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors)¹⁵ nebo SREBP-1 (sterol regulatory element binding

protein-1)¹⁶. Omega-3 a Omega-6 jsou si po biochemické stránce značně podobné, což znamená, že mnohé enzymy, například elongázy, desaturázy, enzymy pro syntézu fosfolipidů, endokannabinoidů i eikosanoidů, reagují s oběma skupinami PUFA. Kompeticí o aktivní místa těchto enzymů pak Omega-3 snižují celkovou tvorbu pro-zánětlivých mediátorů odvozených od Omega-6¹⁷, případně tyto pro-zánětlivé molekuly přímo nahrazují méně aktivními, nebo dokonce protizánětlivými a pro-rezolučními látkami, které se souhrnně nazývají protektiny a resolviny¹⁸.

Současný výzkum ukazuje, že metabolický dopad lipidů přijímaných v potravě nezáleží jen na kompozici FA, ale také na komplexní struktuře molekul, na které jsou FA navázány. Konkrétně existuje mnoho důkazů o tom, že metabolické účinky Omega-3 podávaných ve formě fosfolipidů (Omega-3 PL) významně převyšují účinky Omega-3 podávaných ve formě triacylglycerolů (Omega-3 TAG). Tento fakt může být dán rozdíly ve způsobu trávení různých lipidových molekul, což může ve výsledku ovlivnit dostupnost samotných FA v krevním oběhu¹⁹. Omega-3 PL tak, na rozdíl od Omega-3 TAG, vykazují reprodukovatelné benefiční účinky na glukózovou homeostázu u lidí, díky čemuž se Omega-3 PL zdají být slibnou alternativou v suplementaci Omega-3.

Cíle práce

Hlavním cílem, který propojuje všechny čtyři projekty, na kterých je tato dizertační práce založena, bylo prozkoumat molekulární mechanismy, které zprostředkují benefiční účinky Omega-3, především pak Omega-3 ve formě fosfolipidů, na glukózový a lipidový metabolismus myši kmene C57BL/6 s obezitou indukovanou konzumací vysokotukové diety.

Konkrétní cíle této práce byly následující:

1. Porovnat vysokotukové diety s odlišným složením FA s důrazem na jejich dopad na rozvoj obezity, inzulinové rezistence, jaterní steatózy a zánětu v tukové tkáni;
2. analyzovat změny metabolismu indukované dlouhodobým příjmem Omega-3 TAG v závislosti na složení FA obsažených v konzumované vysokotukové dietě;
3. ověřit hypotézu, podle které dlouhodobá suplementace Omega-3 TAG zvyšuje glukózou-stimulovanou sekreci inzulínu prostřednictvím aktivace inkretinového systému;
4. odhalit molekulární mechanismus, který by mohl vysvětlit, proč Omega-3 PL vykazují ve srovnání s Omega-3 TAG silnější biologické účinky (například na glukózovou homeostázu nebo akumulaci tuku v játrech).

5. posoudit, jaký příspěvek má fosfolipidová kostra k celkové metabolické účinnosti Omega-3 PL;
6. porovnat účinky dlouhodobé suplementace Omega-3 TAG a Omega-3 PL na citlivost k inzulinu u obézních myší krmených vysokotukovou dietou za použití vysoce specializované metodiky hyperinzulinemického-euglykemického zámku.

Metody a uspořádání pokusů

Samci myšího kmene C57BL/6N ve věku 10 týdnů (výjimky jsou specifikovány v dizertační práci) byli zakoupeni v Charles River Laboratories (Sulzfeld, Německo) a chováni při 12h cyklu světlo/tma, ve 22° C a s *ad libitum* přístupem k pitné vodě a příslušné experimentální dietě. Za těchto podmínek byly na myších provedeny dlouhodobé experimenty (7-18 týdnů), zahrnující různé dietní intervence a *in vivo* metabolické testy. Štíhlá kontrolní zvířata byla krmena standardní nízkotukovou dietou (**Chow**; Ssniff Spezialdieten GmbH, Německo), zatímco obezita a s ní spojené metabolické poruchy byly indukovány pomocí dvou různých obezogenních diet: (i) diety **CHF**, založené na kukuřičném oleji a bohaté na Omega-6; (ii) diety **LHF**, založené na vepřovém sádle a bohaté především na SFA, MUFA a sacharózu. Metabolické účinky různých lipidových forem Omega-3 byly testovány pomocí obezogenních diet CHF a LHF s přidanou složkou Omega-3 TAG (Epax, Norsko), nebo Omega-3 PL (původem z masa sledů, nebo z oleje lisovaného z antarktického krilu). Na konci každého experimentu byly myši usmrceny cervikální dislokací v éterové narkóze za účelem odběru krve a tkání pro následné biochemické a imunohistochemické analýzy.

Metabolické testy *in vivo*

Při **glukózovém tolerančním testu** byla myším nalačno podána jednorázová dávka glukózy, a to buď formou intragastrické gaváže (**OGTT**), nebo injekce do peritonea (**i.p. GTT**). Za účelem měření hladiny různých hormonů byly odebrány vzorky krve před a 30 minut po podání glukózy. Míra tolerance glukózy pak byla posouzena podle glykemické křivky, která byla sestavena z hodnot hladiny glykémie v několika časových bodech před a po podání glukózy.

Za účelem analýzy citlivosti k inzulinu metodou **hyperinzulinemického-euglykemického zámku** byl myším voperován permanentní katetr *v. jugularis*, díky kterému se pak myši mohly podrobit několikahodinové infuzi bez anestezie a omezení volného pohybu. Myši byly konstantní rychlostí infundovány směsí inzulinu (HumulinR, Eli Lilly, USA) a radioaktivní D-[3-³H]glukózy (Perkin Elmer, USA), zatímco jejich glykémie byla pravidelně monitorována a udržována na hladině 5.5 mmol/l (euglykémie) prostřednictvím infuze neznačené glukózy, jejíž rychlost byla operativně regulována. Po dosažení stabilní glykémie byly v desetiminutových intervalech odebírány vzorky krve, ve kterých byla stanovena koncentrace glukózy a aktivita spojená s radioaktivní glukózou a radioaktivní vodou. Tyto hodnoty byly

použity pro výpočet celkového obrátu glukózy a dalších parametrů spojených s citlivostí organismu k inzulínu a glukózovým metabolizmem (jaterní produkce glukózy, celková míra glykolýzy, celotělová syntéza glykogenu a rychlost glukózové infuze potřebná k udržení euglykémie).

Biochemické analýzy a měření *ex vivo*

Ke stanovení hladiny **TAG, cholesterolu** (celkový a frakce HDL), **NEFA, žlučových kyselin, adiponektinu, inzulínu, celkového GIP a GLP-1, aktivního GLP-1 a glukózy** v plasmě jsme použili komerčně dostupné enzymatické soupravy. Plasmatické koncentrace **inzulínu, aktivního GLP-1 a celkového GIP** byly také měřeny multiplexovou analýzou pomocí magnetických kuliček se specifickými protilátkami. Koncentrace **TAG, FA a cholesterolu v játrech a ve stolici** byly měřeny v extraktech vytvořených prostřednictvím alkalické hydrolyzy nebo různými modifikacemi Folchovy metody extrakce lipidů. **Kompozice mastných kyselin** byla stanovena metodou plynové chromatografie. **Analýza genové exprese** byla provedena metodou izolace a purifikace RNA pomocí TRIzol reagent (MilliporeSigma). Reverzní transkripce celkové RNA do cDNA byla provedena za použití Oligo thymidine primerů (Generi Biotech, ČR) a soupravy M-MLV reverzní transkriptázy (Invitrogen, USA) podle instrukcí udaných výrobcem. Relativní množství individuálních transkriptů bylo kvantifikováno metodou kvantitativního RT PCR (qPCR) za použití přístroje LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Německo) a soupravy LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics, Německo). **Aktivita DPP-4** v plasmě a v tkáňových homogenátech byla stanovena spektrofotometricky měřením kinetiky degradace H-Gly-Pro-pNA • p-tosylátu, specifického substrátu DPP-4.

Uspořádání pokusů

V **PUBLIKACI A, experimentu 1.** jsme pomocí metody hyperinzulinemického–euglykemického zámku srovnávali dopad rozdílné kompozice FA v obezogenní dietě na míru IR u myší, krmených po dobu 8 týdnů dietami Chow, CHF a LHF. V rámci **experimentu 2.** jsme srovnávali myši krmené 8 týdnů dietami Chow, CHF, LHF a jejich protějšky suplementovanými Omega-3 (tj. CHF+F a LHF+F), přičemž v 7. týdnu byl proveden i.p. GTT.

V **PUBLIKACI B** jsme se zabývali možným propojením účinku dlouhodobé suplementace Omega-3 na hladinu inzulínu v krvi s aktivací inkretinového systému. V **experimentu 1.** byly myši krmené Chow, CHF a CHF+F po osmi týdnech studie podrobeny buď i.p. GTT nebo OGTT. V **experimentu 2.** podstoupily tytéž experimentální skupiny OGGT v 8. týdnu studie, zatímco v 9. týdnu obdržely gaváž buď fyziologický roztok nebo roztok glukózy a 30 minut po gaváži byl za účelem stanovení hladiny inzulínu a inkretinových hormonů proveden odběr krve kanylací portální žíly. Při pitvě jsme za účelem analýzy genové exprese různých prvků inkretinového systému odebrali také několik segmentů tenkého a tlustého střeva. V rámci **experimentu 3.** byly myši po dobu 10 týdnů krmeny dietami Chow nebo CHF. Obézní myši na CHF dietě byly pak dále rozděleny do dvou skupin, které pokračovaly s konzumací diety CHF nebo CHF+F. V 18. týdnu studie byly myši podrobeny OGTT a následně byla provedena pitva.

V **PUBLIKACI C** jsme se zabývali dopady suplementace Omega-3 PL izolovaných z masa sledů na akumulaci tuku v játrech a metabolismus lipidů. V rámci **experimentu 1.** jsme porovnávali účinky samotných Omega-3 PL (exp. skupina **PC**) s účinky nízké dávky rosiglitazonu (exp. skupina **R** suplementovaná pouze rosiglitazonem a **PC+R** suplementovaná kombinací rosiglitazonu a Omega-3 PL). V 6. týdnu studie byly experimentální skupiny myší (tj. Chow, CHF, PC, R a PC+R) podrobeny i.p. GTT, zatímco v 7. týdnu byla provedena pitva s odběrem tkání a krve pro následné biochemické analýzy. Cílem **experimentu 2.** bylo odlišit příspěvky jednotlivých složek koncentrátů Omega-3 PL na celkový metabolický účinek prostřednictvím přímého srovnání dvou koncentrátů bohatých na PC: (i) **PC-M**, koncentrát mořského původu s vysokým obsahem Omega-3; (ii) **PC-S**, koncentrát původem ze soji bez obsahu Omega-3, bohatý především na Omega-6. Experimentální skupiny myší (tj. Chow, CHF, PC-M a PC-S) byly v 6. týdnu studie podrobeny i.p. GTT a v 7. týdnu byla provedena pitva. V rámci **experimentu 3.**, který zahrnoval pouze skupiny Chow, CHF a PC byla v 6. týdnu studie provedena analýza exkrece lipidů ve stolici pomocí kvantitativního sběru stolice vyprodukované za 24 hodin.

V **PUBLIKACI D** byly porovnány metabolické účinky osmítýdenní suplementace Omega-3 TAG (**CHF+F**, ~30g/kg EPA/DHA), a dvou různých dávek Omega-3 PL původem z oleje lisovaného z mořského krillu (**K-L** pro nízkou dávku Omega-3, tj. ~11g/kg EPA/DHA; a **K-H** pro vysokou dávku Omega-3, tj. ~30 g/kg EPA/DHA) prostřednictvím metody hyperinzulinemického-euglykemického zámku.

Výsledky a diskuze

Publikace A. Kukuřičný olej vs. Sádlo: Metabolické účinky omega-3 mastných kyselin u myší krmených obezogenními dietami s odlišnou kompozicí mastných kyselin.

(publikováno)

V rozporu s některými dříve publikovanými články^{10,20,21} vedla dlouhodobá konzumace dvou vysokotukových diet srovnatelných v celkovém obsahu energie a tuku, ale nikoliv ve složení FA (tj. CHF bohaté na Omega-6 a LHF bohaté na SFA a MUFA) k podobným váhovým přírůstkům, srovnatelné míře adipozity a zánětu bílé tukové tkáně (WAT), stejně tak jako ke srovnatelnému poškození citlivosti k inzulinu a tolerance glukózy. Tyto výsledky jsou, nicméně, podpořeny jinými studiemi, které se zabývaly dopadem příjmu SFA obsažených ve smíšené dietě^{22,23}. Potenciální rozdíly mohly být také maskovány vysokým obsahem lipidů v použitých dietách (60 % energie)⁹. Jediným výrazným rozdílem mezi účinky diet CHF a LHF byla míra akumulace ektopického tuku v jaterní tkáni, přičemž fakt, že příjem SFA vede k rozvoji jaterní steatózy je skutečně v literatuře dobře známý^{10,20,22}. Dlouhodobý příjem diety LHF vedl ke zvýšení exprese genů *Scd1* a *Elovl5* v játrech a k nárůstu aktivity enzymu SCD1. Zhoršení jaterní steatózy na dietě LHF může být proto vysvětleno akumulací MUFA

syntetizovaných endogenní cestou prostřednictvím SCD1, jelikož právě tyto FA jsou považovány za velmi významný substrát jaterní syntézy TAG a cholesterolu²⁴. Zvýšená aktivita enzymu SCD1 by pak mohla u myší krmených dietou s vysokým obsahem SFA představovat protektivní mechanismus, prostřednictvím kterého jsou potenciálně lipotoxické SFA přeměněny na méně škodlivé MUFA²⁵.

Metabolické účinky Omega-3 TAG se ukázaly být částečně závislé na složení vysokotukové diety, na jejímž pozadí jsou podávány. Nehledě na složení diety dokázaly Omega-3 účinně redukovat jaterní steatózu a koncentraci TAG v plasmě. Naopak redukce adipozity a zlepšení glukózové homeostázy bylo dosaženo pouze na pozadí diety bohaté na Omega-6, tedy u skupiny CHF+F. Na pozadí diety bohaté na SFA (tj. LH+F) neměly Omega-3 na adipozitu žádný vliv a v případě IR došlo dokonce k mírnému zhoršení. Na obou dietních pozadích snižovaly Omega-3 aktivitu enzymu SCD1, což mohlo souviset s redukcí jaterní steatózy²⁴, nicméně s ohledem na potenciálně protektivní roli aktivace SCD1 u myší krmených dietou LHF mohlo potlačení aktivity tohoto enzymu přispět ke zhoršení glukózové homeostázy a zánětu WAT, které jsme pozorovali u myší ze skupiny LHF+F^{10,26,27}.

Publikace B: Dopad dlouhodobého podávání Omega-3 na inkretinový systém obézních myší krmených vysokotukovou dietou.

(manuskript v přípravě)

Porovnáním výsledků i.p. GTT a OGTT v rámci experimentu 1. jsme zjistili, že dlouhodobé podávání Omega-3 TAG vedlo u obézních myší k navýšení hladiny inzulínu v krvi po stimulaci glukózou, přičemž tento efekt byl výrazně silnější v případě, že byla glukóza podána orálně. V následujících pokusech jsme se proto zaměřili přímo na inkretinový systém. Zatímco analýza hladiny aktivního GLP-1 byla kvůli masivní degradaci neúspěšná, koncentrace celkového GLP-1 (tedy součtu aktivní a zkrácené inaktivované formy GLP-1) byla, v kontrastu s některými publikovanými články^{6,28}, u obézních myší ze skupin CHF a CHF+F oproti štíhlým kontrolám zvýšená. Aktivita enzymu DPP-4 je podle existující literatury u obézních jedinců zvýšená²⁹, nicméně změny v aktivitě DPP-4 nárůst glukózou-stimulované sekrece inzulínu vysvětlit nemohly, jelikož aktivita DPP-4 byla v našem případě zvýšená jak u myší ze skupiny CHF, tak u skupiny CHF+F.

V experimentu 2. jsme ukázali, že v souladu s literaturou^{30,31} došlo u obou obézních skupin (tj. CHF a CHF+F) k nárůstu koncentrace celkového GIP, nicméně suplementace Omega-3 měla tendenci koncentraci GIP v plasmě normalizovat, přičemž tyto změny odpovídaly poklesu v expresi genu *progip* v proximální části tenkého střeva. Tato tendence se pak ukázala být statisticky významnou na modelu „reverze obezity“ v experimentu 3. Za předpokladu, že zvýšená koncentrace GIP v plasmě je projevem rezistence spojené s poklesem koncentrace receptorů GIPR v pankreatických β -buňkách³², by mohly Omega-3 stimulovat aktivitu inkretinového systému zlepšením citlivosti organismu k GIP. V naší studii nicméně není potenciální vliv Omega-3 na citlivost k GIP relevantní, jelikož mezi obézními skupinami CHF

a CHF+F a štíhlými kontrolami nebyl odhalen žádný rozdíl v koncentraci GIPR receptorů v pankreatu a našem modelu dietou indukované obezity tedy k rozvoji rezistence vůči GIP nedochází.

Ve spojitosti s faktem, že u obézních jedinců dochází k navýšení celkové aktivity GIP ve WAT^{30,33}, jsme odhalili, že exprese genu *Gipr* v epididymální tukové tkáni (eWAT) byla skutečně signifikantně zvýšená, ovšem pouze u skupiny CHF, nikoliv u CHF+F. Jelikož dlouhodobá suplementace Omega-3 vedla také k poklesu hmotnosti eWAT, která nebyla doprovázena poklesem v příjmu energie, je možné, že část tohoto anti-lipogenního efektu byla zprostředkována potlačením signalizace GIP ve WAT, které se manifestovalo jako pokles koncentrace GIP v plasmě a snížený počet receptorů GIPR ve WAT.

Publikace C: Omega-3 fosfolipidy z rybího masa potlačují jaterní steatózu obézních myší komplexní inhibicí biosyntetických drah.

(publikováno)

Dlouhodobá suplementace Omega-3 PL, původem z masa sledů, vedla ke zlepšení mnoha metabolických poruch navozených konzumací vysokotukové diety. Konkrétně se jednalo o prevenci nárůstu tělesné hmotnosti, dyslipidemie, glukózové intolerance, hyperinzulinemie a rozvoje zánětu WAT a snížení ukládání tuků jak ve WAT, tak ektopicky v jaterní tkáni. Účinky Omega-3 PL na nárůst hmotnosti a adipozitu nemohly být vysvětleny změnami v příjmu energie, termogenní aktivitou hnědé tukové tkáně ani ztrátami lipidů ve stolici, které byly ve skupině PC dokonce nižší než ve skupině CHF.

Nízká dávka rosiglitazonu sama o sobě nedokázala u skupiny R zlepšit citlivost k inzulinu, a navíc indukovala nárůst exprese genů jaterní lipogeneze a rozvoj mírné jaterní steatózy. Nicméně v kombinaci s Omega-3 PL (tj. ve skupině PC+R) byl tento lipogenní efekt rosiglitazonu kompletně potlačen. Analýza genové exprese odhalila několik metabolických drah, které byly účinkem Omega-3 PL silně a komplexně regulovány. Konkrétně, β -oxidace FA byla zvýšená, zatímco *de novo* lipogeneze byla u skupin PC a PC+R silně potlačena, přičemž obě tyto metabolické dráhy se pravděpodobně podílí na redukcii jaterní steatózy vlivem podávání Omega-3 PL³⁴. Nejsilnějších změn však Omega-3 PL dosáhly v regulaci metabolismu cholesterolu. Exprese genů pro biosyntézu cholesterolu byla konzistentně snižena, zatímco exprese genů *Scarb1* a *Abcg5*, jejichž produkty se uplatňují v exkreci cholesterolu do střev, byla zvýšená. Tomu odpovídal také pokles koncentrace cholesterolu jak v plasmě, tak v jaterní tkáni.

K posouzení příspěvku PC na celkové účinky koncentráту Omega-3 PL jsme porovnali dva koncentráty PL bohaté na PC, přičemž jeden z nich Omega-3 obsahoval (PC-M) a druhý nikoliv (PC-S). Na rozdíl od PC-M, PC-S nedokázal zabránit nárůstu tělesné hmotnosti a adipozity, ani rozvoji IR, dyslipidemie a jaterní steatózy, stejně tak jako nedokázal snížit expresi genů pro syntézu FA a cholesterolu v játrech. Nicméně EPA a DHA nejsou jediné komponenty nezbytné pro indukci výše zmíněných metabolických účinků, jelikož naše předchozí studie ukázaly,

že dokonce ani vyšší dávka Omega-3 (~30 g/kg diety) podávaná ve formě TAG nemá významný vliv na expresi genů pro syntézu FA a cholesterolu v játrech a také její účinek na koncentraci lipidů v játrech a v plasmě je ve srovnání s Omega-3 PL významně slabší¹⁹. Zdá se tedy, že maximálního metabolického účinku je dosaženo primárně díky kombinaci Omega-3 a vhodného lipidového nosiče, v tomto případě konkrétně PL bohatých na PC.

Publikace D: Omega-3 PL, ne však Omega-3 TAG, zlepšují u obézních myší kmene C57BL/6 citlivost k inzulinu.

(nepublikováno)

Přímé srovnání suplementace Omega-3 PL a Omega-3 TAG ukázalo, že obě formy Omega-3 dokázaly snížit tělesnou hmotnost a adipozitu, aniž by měly vliv na příjem energie, což může být vysvětleno potlačením jaterní *de novo* lipogeneze a stimulací β -oxidace FA³⁵, případně změnami v aktivitě GIP ve WAT, jak bylo ukázalo v rámci Publikace B. Podle očekávání vedla dlouhodobá konzumace vysokotukové diety u skupiny CHF k rozvoji mnoha metabolických poruch včetně rozvoje IR v kosterních svalech a v játrech. Kvůli významně sníženému celotělovému obratu glukózy bylo k udržení euglykémie v hyperinzulinemických podmínkách potřeba méně exogenní glukózy, zatímco procesy, které glukózu spotřebovávají (tj. celotělová glykolýza a syntéza glykogenu), byly u skupiny CHF taktéž potlačené. Míra jaterní glukoneogeneze, která může být posuzována jako nepřímý ukazatel jaterní IR³⁶, měla u myší ze skupiny CHF tendenci růst, zatímco plasmatická koncentrace NEFA byla u této skupiny v hyperinzulinemických podmínkách významně zvýšená, což naznačovalo rozvoj IR také ve WAT³⁷.

I přes pozitivní účinek na tělesnou hmotnost a adipozitu neměly Omega-3 TAG na IR žádný dopad. Schopnost Omega-3 TAG zlepšit citlivost k inzulinu je stále předmětem debaty, přičemž rybí tuk, jakožto typický zdroj Omega-3 TAG, v některých studiích IR a glukózovou toleranci skutečně zlepšil^{38–41}, zatímco v jiných studiích selhal^{42–44}. V souladu se současnou literaturou^{19,45}, Omega-3 PL úměrně dávkování zlepšily různé aspekty glukózové homeostázy a citlivosti k inzulinu, přičemž nízká dávka krilového oleje (skupina K-L) se ukázala být efektivnější než 3x vyšší dávka Omega-3 ve formě TAG u skupiny CHF+F. Vysoká efektivita Omega-3 PL může být vysvětlena zvýšenou dostupností EPA a DHA na úrovni buněčných membrán^{19,46,47}, která je pravděpodobně důsledkem odlišného rozdělení natrávených lipidů mezi různé druhy a vrstvy nascentních apolipoproteinů. Některé benefiční účinky pak mohou být indukovány také jinými bioaktivními složkami krilového oleje, například antioxidantem astaxanthinem^{48,49} nebo samotnými fosfolipidy^{50,51}.

Závěry

V návaznosti na konkrétní cíle této dizertační práce jsme došli k následujícím závěrům:

1. Dlouhodobé podávání obezogených diet CHF a LHF s odlišným složením FA, vedlo ke srovnatelným váhovým přírůstkům, a míře zánětu WAT, IR a glukózové intolerance. Tyto diety měly naopak odlišný dopad na akumulaci tuků v játrech, přičemž závažná jaterní steatóza byla hlavním charakterizujícím faktorem myší, krmených dietou LHF. Akumulace tuků v játrech byla pravděpodobně spojena s protektivním zvýšením aktivity enzymu SCD-1, který transformoval potenciálně lipotoxické a prozánětlivé SFA na MUFA.
2. Ukázalo se, že metabolické účinky Omega-3 TAG jsou z části závislé na složení lipidů v konzumované dietě. Benefiční účinky na akumulaci tuku v játrech a plasmatickou hladinu TAG byly na dietě nezávislé. Naopak redukce adipozity a zlepšení glukózové homeostázy bylo dosaženo pouze v případě, že byly Omega-3 TAG podávány v dietě, bohaté na Omega-6 (tedy v dietě CHF+F), zatímco u diety s převahou SFA a MUFA (tedy LHF+F) nebyla adipozita ovlivněna a u glukózové homeostázy a zánětu tukové tkáně došlo k mírnému zhoršení. Hypolipidemický účinek Omega-3 TAG je částečně zprostředkován potlačením aktivity SCD-1, nicméně je možné, že na dietním pozadí s vysokým obsahem SFA může být toto potlačení aktivity SCD-1 nežádoucí.
3. Dlouhodobé podávání Omega-3 TAG obézním myším kmene C57BL/6 vede k nárůstu plasmatické hladiny inzulínu po orálním podání glukózy. Jelikož jsme u těchto myší nedetekovali nárůst sekrece GLP-1, ani pokles aktivity degradačního enzymu DPP-4, není pravděpodobné, že za tímto efektem stojí zvýšená aktivace inkretinového systému. Vliv Omega-3 na snížení rezistence organismu k GIP nemohl být potvrzen, jelikož u tohoto experimentálního modelu k rozvoji rezistence k GIP nedochází. Na druhou stranu, Omega-3 TAG normalizovaly plasmatickou hladinu GIP a koncentraci receptorů GIPR v tukové tkáni, které jsou vlivem obezity patologicky zvýšené. Tento efekt by mohl představovat nový molekulární mechanismus, kterým Omega-3 TAG ovlivňují celotělovou adipozitu.
4. Dlouhodobé podávání Omega-3 PL mělo pozitivní dopad na řadu metabolických poruch spojených s obezitou, přičemž tento efekt byl významně silnější než efekt Omega-3 TAG nebo samotných fosfolipidů. Analýza genové exprese odhalila komplexní represi genů, kódujících enzymy *de novo* lipogeneze a biosyntézy cholesterolu, a naopak stimulaci genů pro mitochondriální i peroxisomální β -oxidaci mastných kyselin v játrech. Tento výsledek naznačuje, že zlepšení jaterní steatózy a dyslipidemie na celotělové úrovni může být způsobeno koordinovaným posunem metabolismu lipidů od anabolických procesů ke katabolickým.

5. Na rozdíl od PC-M bohatého na Omega-3, podávání PC-S bez obsahu Omega-3 nemělo žádný pozitivní dopad na metabolické poruchy spojené s obezitou a neovlivnilo ani expresi genů pro metabolismus FA a cholesterolu. Naše předchozí studie pak ukázala, že exprese těchto genů není ovlivněna ani výrazně vyšší dávkou EPA/DHA (~30 g/kg diety) ve formě Omega-3 TAG, což naznačuje, že maximálního metabolického účinku je dosaženo kombinací Omega-3 a vhodného lipidového nosiče, v tomto případě PL bohatých na PC.

6. Na rozdíl od Omega-3 TAG, podávání Omega-3 PL obsažených v krilovém oleji vedlo ke konzistentnímu zlepšení IR, které bylo úměrné dávce Omega-3 PL. Zvýšení citlivosti k inzulinu se manifestovalo jako vzestup celotělového obratu glukózy a syntézy glykogenu a pokles jaterní glukoneogeneze. Jelikož účinnost Omega-3 PL byla zachována i v případě, že obsah EPA/DHA v dietě byl třikrát nižší než u kontrolní skupiny, která přijímala Omega-3 TAG, přítomnost fosfolipidového nosiče se ukázala být pro biologický dopad Omega-3 PL klíčová.

Profesní životopis

Jana Pavlišová

Narozena: 7.8.1987 v Praze

Vzdělání: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

- 2016 – 2018 Studium přerušeno, mateřská dovolená
- 2011 – 2016 **Postgraduální studium Fyziologie živočichů**
Výzkumný projekt: Metabolické účinky dlouhodobého podávání Omega-3 polynenasycených mastných kyselin u obézních myši.
- 2009 – 2011 **Magisterské studium Fyziologie živočichů**
Ukončeno s vyznamenáním
DP: Metabolické účinky chronického podávání metforminu u obézních myši v závislosti na složení vysokotukové diety
- 2006 – 2009 **Bakalářské studium Biologie**
Ukončeno s vyznamenáním
BP: Kortizol a jeho účast na regulaci energetického metabolismu.

Profesní zkušenosti:

- 2009 – 2016 **Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., odd. Biologie tukové tkáně**
Pregraduální a postgraduální student
- 2007 **VIDIA, s.r.o., Nad Safinou II 365, 25250 Vestec**
Laboratorní asistent

Vědecká aktivita a další vzdělávání:

Plakátová sdělení na konferencích:

Metabolism 2012, Německo; EASD 2012, Německo; ECO 2013, UK; Warwick 2013, UK; Diabetologické dny 2014, ČR; Keystone 2015, Dánsko; ECO 2015, ČR

Orální prezentace na konferencích:

Fyziologické dny 2013, ČR; II Doctoral Workshop on Molecular Nutrition BIOCLAIMS 2013, Španělsko;

Kurzy a certifikáty:

Academic writing I+II; Kurz práce s laboratorními zvířaty, ČZU Praha
First certificate in English, Grade A, Level B2

Další aktivity: Účast na popularizačních projektech AV ČR, v.v.i.

1. TRIANGL: Podpora zájmu žáků o přírodovědné obory ve Středočeském kraji
2. Projekt OP VK Propagace přírodovědných oborů prostřednictvím badatelsky orientované výuky a popularizace výzkumu a vývoje

ANGLICKÁ ČÁST (ENGLISH PART)

Abstract

Obesity, one of the most serious health problems of the 21st century, often occurs as a result of an imbalance between energy intake and energy expenditure. Dietary lipids play an important role in the development of obesity, partly because they represent the richest source of energy amongst all macronutrients. It is, however, not only the amount of consumed lipids, but also the composition of fatty acids, which strongly influences health effects of a particular diet. Saturated fatty acids (SFA) are generally considered as unhealthy due to their pro-inflammatory and lipotoxic properties, while monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) represent a healthier alternative, as they are more readily oxidized and do not disrupt biochemical properties of cellular membranes. Amongst PUFA, PUFA of *n-3* series (Omega-3) represent an utterly unique class of lipids that have been documented to protect against cardiovascular disease and dyslipidemia in men and improve insulin sensitivity and glucose tolerance primarily in animal models of obesity.

Some molecular mechanisms of Omega-3 action have been already uncovered, such as the modification of biological membranes composition, activation of various transcription factors and membrane receptors, and their role as precursors for the synthesis of bioactive lipid mediators with anti-inflammatory and pro-resolving properties. In this thesis, we explored novel mechanisms and systems, which may be influenced by long term dietary supplementation of Omega-3 to male C57BL/6 mice with obesity induced by a high fat diet rich in PUFA of *n-6* series (Omega-6). Furthermore, we compared the effects of Omega-3 administered either in the form of triacylglycerols (Omega-3 TAG) or marine Omega-3 phospholipids (Omega-3 PL); the latter form of Omega-3 has been recently shown to induce more potent and consistent metabolic effects, especially on glucose metabolism and liver fat accumulation (i.e. hepatic steatosis), and, therefore, could represent a better alternative regarding the prevention and potentially also the treatment of obesity-linked metabolic diseases.

In the first project (Publication A), we analyzed the effects of Omega-3 TAG depending on the type of other lipids in the diet, i.e. the diets with the prevalence of either Omega-6 (CHF diet) or SFA and MUFA (LHF diet). Without Omega-3 supplementation, the two diets *per se* did not differ in their impact on body weight, the amount of body fat (adiposity) or insulin sensitivity examined by the hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique, which could be due to the protective up regulation of the enzyme stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) that converts potentially harmful SFA contained in the LHF diet into less toxic MUFA. The accumulation of MUFA, however, might be connected to more pronounced hepatic steatosis, which was typical for LHF-fed animals. Omega-3 supplementation ameliorated hepatic steatosis by repressing lipogenesis and promoting fat oxidation, and these effects were independent of other lipids in the diet. On the contrary, white adipose tissue (WAT)

inflammation and glucose tolerance were beneficially affected by Omega-3 only when supplemented within the CHF background, while these parameters tended to deteriorate further when Omega-3 were present in the LHF diet. The results of this project suggested that the supplementation of Omega-3 on SFA rich dietary background could be problematic, since under these conditions Omega-3 supplementation interferes with the protective mechanism based on the increased activity of SCD1 in response to LHF feeding.

The second project (Publication B) was based on the observation that the long-term supplementation of Omega-3 TAG in dietary obese mice leads to increased plasma insulin levels following glucose administration, but only when glucose is applied orally; it was predicted that increased activity of the incretin system could be involved. We were unable to prove that Omega-3 supplementation increased the activity of the incretin system, as neither an increased secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1), decreased activity of the degrading enzyme dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), nor changes in sensitivity towards glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) were observed following Omega-3 intake. However, Omega-3 supplementation normalized hypersecretion of GIP and increased concentrations of GIP receptors in WAT, which was otherwise observed in obese mice. Thus, the above effects of Omega-3 on GIP may represent a novel pathway by which these fatty acids could affect adiposity.

Finally, in Publication C and Publication D, we focused on the long-term dietary supplementation with Omega-3 PL derived from either herring meat or Krill-oil. We showed that Omega-3 PL were able to efficiently reduce hepatic steatosis and normalize dyslipidemia by a complex and integrated inhibition of *de novo* lipogenesis and cholesterol biosynthesis together with stimulation of the oxidation of fatty acids, observed at the level of hepatic gene expression. To achieve the maximum effect the presence of both Omega-3 and their lipid carrier, i.e. phospholipids, namely phosphatidylcholine (PC), is necessary. Furthermore, by using the hyperinsulinemic-euglycemic clamps in obese mice, we showed that Omega-3 PL ameliorated obesity linked glucose intolerance and whole-body insulin resistance, mainly due to the beneficial effects on hepatic and muscle insulin sensitivity, i.e. the effect which was superior to Omega-3 TAG administered at a comparable dose.

Introduction

Obesity is characterized by an excessive storage of lipids, either in the subcutaneous or abdominal white adipose tissue (WAT) depots, or even ectopically in non-adipose organs. Increased lipid turn-over in hypertrophied adipocytes leads to a chronic elevation of circulating non-esterified fatty acids (NEFA)¹. NEFA *per se* interfere directly with insulin signaling², thus inducing insulin resistance (IR), while their metabolites such as diacylglycerols or ceramides promote inflammation, apoptosis and mitochondrial damage³. Hypertrophied adipocytes and immune cells residing within WAT have to endure various stress stimuli which

makes them to switch intercellular signalization to a pro-inflammatory mode, thus calling for revascularization, tissue rebuild, and clearance of dying cells. The causal link between chronic WAT inflammation and IR progression has been also firmly established. Obesity, especially the central type with high waist/hip ratio, and IR are the driving force for development of metabolic syndrome, which can further progress to type 2 diabetes (T2DM) and cardio-vascular disease (CVD).

Incretins are peptide hormones secreted from the intestinal endocrine cells in response to the ingestion of nutrients. Currently, the two most studied incretins are glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). They significantly potentiate endogenous secretion of insulin, enhance viability of pancreatic β -cells, and exert many other biological effects, which cooperatively prepare the organism to maximize the utilization of ingested meal and prevent big oscillations of glycemia⁴. Moreover, GIP receptors are profusely expressed on the membranes of mature adipocytes and their activity is connected to the promotion of lipid storage⁵. Loss of incretin effect, i.e. a significant decrease in the early phase insulin secretion, is an early specific marker of T2DM⁶; it is connected to a decrease in active GLP-1 and/or the development of GIP resistance⁸, which is, similarly to IR, linked to a chronic elevation in GIP secretion. Obesity is also linked to elevated activity of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), which turns active GLP-1 and GIP into their truncated inactive forms⁷. Incretin system presents an important target for the treatment of T2DM⁸.

Regarding the prevention of obesity-linked metabolic disorders, it is not only the total amount of consumed lipids, but also the composition of fatty acids (FA) that determines the impact of specific diet on the metabolic health. Some human studies provide evidence that increased consumption of saturated FA (SFA) supports the development of visceral obesity and the ectopic accumulation of liver fat, when compared to monounsaturated (MUFA) or polyunsaturated FA (PUFA)^{9,10}. PUFA present a generally healthier alternative as they are readily oxidized by mitochondria and serve as essential nutrients in the formation of bioactive lipid mediators. PUFA of *n*-6 series (Omega-6) serve for the synthesis of eicosanoids and endocannabinoids, which take part in many processes associated with stress, inflammation, and injury, such as vasoconstriction, pain, fever, platelet aggregation, or smooth muscle contraction¹¹.

PUFA of *n*-3 series (Omega-3), namely the eicosapentaenoic (EPA, C20:5 *n*-3) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 *n*-3), present an utterly unique lipid class which has been shown to prevent CVD¹² and dyslipidemia¹³. Omega-3 exert their various metabolic actions via the interaction with membrane receptor GPR120¹⁴ and transcription factors, such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)¹⁵ or sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)¹⁶. Omega-3 share many biochemical properties with Omega-6, which also means that many enzymes, including some elongases, desaturases, and the enzymes for the synthesis of phospholipids and endocannabinoids, as well as cyclooxygenases and lipoxygenases, freely cross-react with both classes of these PUFA. By competition for these

enzymes Omega-3 can decrease production of Omega-6-derived pro-inflammatory molecules¹⁷ and even replace them with less active or anti-inflammatory and pro-resolving molecules, i.e. protectins and resolvins¹⁸.

Recent data have suggested that the metabolic effects of dietary lipids do not depend only on the FA composition, but also on the complex structure of the molecules, in which FA are delivered to the organism. In this regard, there is an evidence that metabolic effects of Omega-3 ingested in the form of phospholipids (Omega-3 PL) are superior to Omega-3 in the form of TAG (Omega-3 TAG). Such superiority may be given by the differences in the digestion of respective lipid molecules, which influence final bioavailability of FA in the bloodstream¹⁹. Unlike Omega-3 TAG, Omega-3 PL show a beneficial impact on glucose homeostasis in man, which makes them a promising alternative in Omega-3 supplementation.

Aims of the thesis

The main goal, which brings together all four projects that represent the basis of this thesis, was to investigate molecular mechanisms mediating the beneficial effects of Omega-3, especially those administered in the form of Omega-3 PL, on glucose and lipid metabolism of obesity-prone C57BL/6 mice fed a high-fat diet.

The specific objectives were as follows:

1. to compare the effects of two obesogenic high-fat diets, differing mainly in the FA composition, on the development of obesity, IR, liver fat accumulation, and WAT inflammation;
2. to analyze changes in metabolism induced by long-term Omega-3 TAG supplementation, and their dependence on the type of FA contained in the background high-fat diet;
3. to verify the hypothesis that long-term dietary intervention with Omega-3 TAG increases glucose-stimulated insulin secretion by stimulating the activity of the incretin system;
4. to unveil molecular mechanisms that could explain why Omega-3 exert stronger biological effects (e.g. on glucose homeostasis and liver fat) when administered in the form of Omega-3 PL as compared to Omega-3 TAG;
5. to assess the contribution of the PC part of Omega-3 PL molecule to the metabolic efficacy of Omega-3 PL administration; and
6. to compare insulin-sensitizing properties of Omega-3 TAG and Omega-3 PL supplementation in obese mice fed a high-fat diet, using the state-of-the-art technique of hyperinsulinemic-euglycemic clamps.

Methods and experimental design

Male C57BL/6N mice at the age of 10 weeks (exceptions are specified in the thesis) were obtained from the Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) and maintained on a 12 h light/dark cycle at 22°C with ad libitum access to water and an appropriate experimental diet in order to perform long-term dietary interventions (7-18 weeks) including *in vivo* metabolic analyses. Lean control animals were maintained on a low-fat standard diet (**Chow**; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Germany), while the obesity and various metabolic disorders were induced by high-fat obesogenic diets: **CHF**, based on corn-oil, rich in Omega-6; **LHF**, based on pork lard, rich in SFA/MUFA and sucrose. Metabolic effects of different lipid forms of Omega-3 were tested using CHF and LHF diets supplemented with Omega-3 TAG (Epax, Norway), or Omega-3 PL (derived from herring meat or Krill-oil). At the end of all experiments, mice were killed by cervical dislocation in diethyl ether anesthesia to collect blood and tissue samples for subsequent biochemical and immunohistochemical analyses.

In vivo metabolic tests

For the **glucose tolerance test**, fasted mice were given a single dose of glucose either by oral gavage (**OGTT**) or intraperitoneal injection (**i.p. GTT**). For the analysis of hormone levels in plasma, blood samples were collected before and 30 min after glucose administration. For the analysis of glucose tolerance, glycemic curve was compiled by measuring blood glucose levels in several timepoints before and after glucose administration.

To conduct the **hyperinsulinemic-euglycemic clamps**, mice were surgically equipped with a permanent catheter in the jugular vein, which enabled us to perform a several hours-long infusion without anesthesia and movement restrictions. Mice were infused with insulin (HumulinR, Eli Lilly, USA) and radioactive D-[3-³H]glucose (Perkin Elmer, USA) at a constant rate, while their blood glucose was monitored regularly and maintained at euglycemia (~5.5 mmol/l) by periodically adjusting a variable infusion of unlabeled D-glucose solution. After reaching a stable blood glucose level, blood samples were collected from the tail at 10 min intervals for one hour to evaluate the concentration of total glucose, as well as the activities associated either with radioactive glucose or radioactive water. These values were used to calculate total glucose turnover as well as the other parameters linked to insulin sensitivity and glucose metabolism, i.e. glucose infusion rate, hepatic glucose production, and the rate of glycolysis and whole-body glycogen synthesis.

Biochemical analyses and *ex vivo* measurements

We used commercially available kits to measure plasmatic concentrations of **TAG, cholesterol** (total and HDL fraction), **NEFA, total bile acids, adiponectin, insulin, total GIP** and **GLP-1, active GLP-1** and **glucose**. **Insulin, active GLP-1** and **total GIP** were also analyzed by multiplex magnetic-beads assay. Concentrations of **TAG, FA and cholesterol in the liver or feces** were measured in extracts obtained by alkaline hydrolysis or several modifications

of Folch's method. **Composition of FA** was determined by gas chromatography technique. **Gene expression analysis** was performed by isolating and purifying RNA using TRIzol reagent (MilliporeSigma). Reverse transcription of total RNA into cDNA was done by using Oligo thymidine primers (Generi Biotech, Czech Republic) and the M-MLV reverse transcriptase kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. Relative amounts of the individual transcripts were quantified by quantitative RT PCR (qPCR) using the LightCycler 480 II instrument (Roche Diagnostics, Germany) and the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics, Germany). **The activity of DPP-4** in plasma and tissue homogenates was assessed spectrophotometrically as the kinetics of DPP-4 substrate H-Gly-Pro-pNA • p-tosylate degradation.

Experimental setups

In **PUBLICATION A, experiment 1.**, an impact of FA composition of a background high-fat diet on IR was assessed by hyperinsulinemic-euglycemic clamp comparing mice fed with Chow, cHF, and LHF for 8 weeks. In **experiment 2.** we compared mice fed with Chow, cHF, LHF and Omega-3 TAG supplemented diets cHF+F and LHF+F for 8 weeks, while i.p. GTT was performed in 7th week of the study.

In **PUBLICATION B**, we investigated a possible link between the effect of Omega-3 supplementation on plasma insulin levels and activation of the incretin system. In **experiment 1.**, mice fed with Chow, cHF, and cHF+F were subjected to either i.p.GTT or OGTT in the 8th week of the study. In **experiment 2.**, same experimental groups were subjected to OGTT in 8th week of the study, while at the 9th week of the study, mice were gavaged with either saline or glucose and blood samples were collected 30 min after the gavage by the cannulation of portal vein to determine incretin and insulin hormones levels. Different segments of the gut were collected to analyze gene expression of different members of incretin system. In **experiment 3.**, mice were fed with Chow or cHF for 10 weeks. After that, obese cHF-fed animals were further divided to two subgroups which continued on cHF or cHF+F, respectively. In the 18th week, mice were subjected to OGTT and dissected.

In **PUBLICATION C** we assessed the effects of Omega-3 PL derived from herring meat on liver fat accumulation and tissue lipid metabolism. In **experiment 1.** we compared the effects of Omega-3 PL alone (exp. group **PC**), or in combination with a low dose of thiazolidine drug rosiglitazone (exp. group **R**, supplemented only with rosiglitazone and **PC+R**, supplemented with Omega-3 PL and rosiglitazone). In 6th week experimental groups of mice (i.e. Chow, cHF, PC, R, and PC+R) were subjected to i.p. GTT, and in the 7th week mice were dissected for subsequent biochemical analyses. In **experiment 2.**, we aimed to decipher the contribution of different parts of the PL concentrate to the overall metabolic effect of Omega-3 PL by directly comparing the PC-rich PL concentrates that contain or do not contain Omega-3 (i.e. **PC-M** of the marine origin rich in EPA/DHA and **PC-S** derived from soy, containing various FA with the prevalence of Omega-6). Experimental groups of mice (i.e. Chow, cHF, PC-M and PC-S) were subjected to i.p. GTT in the 6th week and dissected

in the 7th week of the study. In the **experiment 3**, where only the Chow, cHF, and PC experimental groups were present, the excretion of lipids in the stool was analyzed after quantitative collection of 24-h feces production in the 6th week of the study.

Finally, in **PUBLICATION D**, the effects of supplementation with either Omega-3 TAG (**cHF+F**, ~30g/kg EPA/DHA), or two different doses of Omega-3 PL derived from krill-oil (**K-L** for the low dose, i.e. ~11g/kg EPA/DHA; and **K-H** for the high dose, i.e. ~30 g/kg EPA/DHA) were compared using the hyperinsulinemic-euglycemic clamps after 8 weeks of experimental feeding.

Results and discussions

Publication A: Corn-oil versus lard: metabolic effects of omega-3 fatty acids in mice fed obesogenic diets with different fatty acid composition

(published)

In contrast to some literature^{10,20,21}, long-term consumption of two high-fat diets comparable in total energy and lipid content, but different in FA composition (i.e. cHF rich in Omega-6 and LHF rich in SFA and MUFA) lead to comparable increases in body weight, adiposity, and WAT inflammation, as well as comparable disruptions of insulin sensitivity and glucose tolerance. These results are supported by other studies of SFA contained in mixed meals^{22,23}. Potential differences could be also masked by high content of lipids in our diets (60 % energy)⁹. The cHF and LHF diets differed substantially only in the degree of ectopic lipid accumulation in the liver, while the potent induction of hepatic steatosis by SFA feeding is, indeed, firmly established in the literature^{10,20,22}. LHF diet increased gene expression of *Scd1* and *Elovl5* in the liver as well as the enzyme activity of SCD1. Thus, deterioration of steatosis can be explained by the accumulation of MUFA synthesized endogenously by SCD1, as they are considered to be the main substrate for hepatic TAG and cholesterylester synthesis²⁴. The up-regulation of SCD1 activity in mice consuming a high fat diet rich in SFA could represent a protective mechanism by which lipotoxic SFA are transformed into MUFA²⁵.

Effects of Omega-3 TAG supplementation proved to be partially dependent on the background diet. Irrespective of the background diet, Omega-3 reduced hepatic steatosis and plasma TAG concentrations. On the contrary, only on the Omega-6-rich dietary background (i.e. the cHF+F diet) Omega-3 managed to reduce adiposity and improve glucose homeostasis. In contrast, Omega-3 supplemented on the SFA-rich dietary background (i.e. the LHF+F diet) had no effect on adiposity and even tended to worsen IR. Irrespective of dietary background Omega-3 reduced the activity of SCD1, which could be connected to the amelioration of hepatic steatosis²⁴; however, given the potentially protective role of SCD1 when mice are fed the SFA-rich diet, the reduced SCD1 activity could also contribute to deteriorations of glucose metabolism and inflammation observed in the LHF+F mice^{10,26,27}.

Publication B: The impact of long-term Omega-3 supplementation on the incretin system of dietary obese mice

(manuscript in preparation)

Comparing the results of i.p. GTT and OGTT in the experiment 1. we found out that long-term Omega-3 TAG supplementation in cHF-fed obese mice increased glucose-stimulated insulin levels in both cases; however, the effect was much stronger when glucose was applied orally. Therefore, in following experiments, we focused directly on the incretin system. While the analysis of active GLP-1 concentration was hampered by severe degradation, concentration of total (i.e. active + truncated) GLP-1 was, in contrast to some publications^{6,28}, increased in cHF and cHF+F groups as compared to lean controls. The activity of DPP-4 in obese subjects has been shown to be increased²⁹; however, changes in the activity of DPP-4 could not explain the increase in glucose-stimulated insulin secretion in Omega-3-supplemented animals, as we revealed increased activity of both plasma and WAT DPP-4 activity in the cHF, but also in the cHF+F group.

In accordance with the literature^{30,31}, in experiment 2., glucose-stimulated levels of total GIP were increased in both cHF and cHF+F mice, as compared to lean controls; however, Omega-3 supplementation tended to normalize plasma GIP concentrations, while these results corresponded with the changes in *progip* gene expression in the proximal segment of the gut. This tendency was proven to be significant using a model of "reversal of obesity" in the experiment 3. Assuming that increased levels of GIP in plasma compensate for the development of GIP resistance manifesting as a decrease in GIPR expression in pancreatic β -cells³² Omega-3 supplementation could stimulate the activity of the incretin system by alleviating the resistance towards GIP. This is, however, not the case in our study, as we found no difference in pancreatic GIPR expression between obese cHF mice and lean chow-fed controls.

Regarding the increased tonus of GIP signaling in WAT of obese subjects^{30,33}, we found that *Gipr* expression in eWAT was, indeed, significantly increased in the cHF but not in the cHF+F group. Since long term dietary intake of Omega-3 also decreased the eWAT weight without lowering energy intake, it is plausible that part of this anti lipogenic effect was mediated by a suppression of GIP signaling in WAT, possibly as a response to lower levels of GIP in plasma and reduced number of GIPR in WAT.

Publication C: Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice

(published)

Dietary supplementation with Omega-3 PL derived from herring meat improved various metabolic disorders induced by high-fat feeding; namely, Omega-3 PL prevented the weight gain, dyslipidemia, glucose intolerance, hyperinsulinemia and WAT inflammation, and

lowered the deposition of lipids both in WAT and in the liver. The effect of Omega-3 PL on weight gain and adiposity could not be explained by changes in energy intake, thermogenic activity of brown adipose tissue, or losses of lipids in stool, which were actually lower in the PC mice as compared to cHF.

The low dose of rosiglitazone by itself could not ameliorate IR, but it increased the expression of lipogenic genes in the liver and induced mild hepatic steatosis in the R mice; however, the lipogenic properties of rosiglitazone were completely overridden by the effect of Omega-3 PL in the combination PC+R group. The analysis of gene expression in the liver revealed a complex regulation of several metabolic pathways that were markedly affected by Omega-3 PL; the pathway of β -oxidation of FA was enhanced, while *de novo* lipogenesis was strongly suppressed in both the PC and PC+R group. Both these metabolic pathways are likely to contribute to the reduction of hepatic lipids in response to Omega-3 PL supplementation³⁴. Omega-3 PL caused the biggest changes in the pathway of cholesterol metabolism. The expression of cholesterol biosynthetic genes was consistently reduced, while the expression of *Scarb1* and *Abcg5*, which take part in cholesterol excretion to the intestines, was increased. Correspondingly, both plasma and liver cholesterol levels were significantly reduced.

To evaluate the contribution of PC, two PC-rich phospholipid (PL) concentrates with and without the content of Omega-3, i.e. PC-M and PC-S, were compared. In contrast to PC-M, PC-S completely failed to prevent the weight gain, body fat accumulation, IR, dyslipidemia, and hepatic steatosis, and it failed to down-regulate hepatic expression of genes encoding FA synthesis and cholesterol biosynthesis enzymes. However, EPA and DHA are not the only components necessary for the induction of the above-mentioned metabolic effects, as our previous study showed that even the higher dose of EPA and DHA (~30 g/kg of the diet) in the form of Omega-3 TAG failed to significantly down-regulate hepatic genes involved in FA synthesis and cholesterol biosynthesis in association with a much weaker effect on hepatic and plasma lipids when compared to Omega-3 PL¹⁹. Thus, it seems that it is primarily the combination of Omega-3, and the proper lipid carrier, i.e. the PC rich PL as in this case, which provides the maximum metabolic effect of Omega-3-based dietary supplements.

Publication D: Omega-3 PL but not Omega-3 TAG, improve insulin sensitivity in obese C57BL/6 mice fed a high fat diet

(unpublished)

Both Omega-3 TAG and Omega-3 PL were able to reduce the body weight gain and adiposity without causing a reduction in energy intake, which can be explained by the suppression of *de novo* lipogenesis and activation of β -oxidation of FA³⁵, or by changes in GIP activity in WAT, as we showed earlier (Publication B). As expected, in our study high-fat feeding induced a variety of disturbances associated with IR in the skeletal muscle and the liver. Due

to a significantly lower whole-body glucose turn-over, less exogenous glucose was needed to maintain euglycemia in hyperinsulinemic conditions, while the glucose-consuming processes, i.e. the whole-body glycolysis and glycogen synthesis, were also decreased in the CHF group. The level of hepatic glucose production, which could be used as an indirect marker of hepatic IR³⁶, tended to be increased in CHF-fed mice. Finally, the concentration of plasma NEFA in hyperinsulinemic conditions was also increased in the CHF group, thus suggesting the development of IR also in WAT³⁷.

Despite body weight- and adiposity-lowering effect, Omega-3 TAG had no beneficial impact on IR. The ability of Omega-3 TAG to improve insulin sensitivity is still a subject of controversy, as fish oil supplementation has been shown to improve insulin sensitivity and glucose tolerance in some studies³⁸⁻⁴¹, while it failed in the others⁴²⁻⁴⁴. With accordance to current literature^{19,45}, Omega-3 PL improved in a dose dependent manner various aspects of glucose homeostasis and insulin sensitivity, while the lower dose of Krill-oil (i.e. in the K-L group) proved to be more efficient than Omega-3 TAG supplementation in the CHF+F mice. The superiority of Omega-3 PL may be explained by an increased bioavailability of EPA and DHA at the level of cellular membranes^{19,46,47}, which is likely linked to different partitioning of digested lipids between nascent apolipoprotein species and their layers. Some beneficial effects may be induced by other compounds of krill-oil concentrate, i.e. an antioxidant astaxanthin^{48,49} or PL backbone^{50,51}.

Conclusions

According to specific aims of this thesis we made following conclusions:

1. Obesogenic CHF and LHF diets induced comparable weight gains, rate of insulin resistance and glucose intolerance, and WAT inflammation. They, however, differed in the impact on accumulation of lipids in the liver. Severe hepatic steatosis was, in fact, the main distinguishing factor of LHF fed animals and could be connected with protective up-regulation of SCD-1 activity which transformed potentially harmful SFA into MUFA, thus protecting the organism against inflammation and lipotoxic damage.
2. Metabolic effects of long-term Omega-3 TAG supplementation proved to be partially dependent on the composition of lipids in the background diet. Irrespective of the background diet, Omega-3 supplementation proved to be efficient in reducing hepatic steatosis and plasma TAG concentrations. On the contrary, only on the Omega-6-rich dietary background (i.e. the CHF+F diet) Omega-3 managed to reduce adiposity and improve glucose homeostasis. On the other hand, Omega-3 supplemented on the SFA-rich dietary background (i.e. the LHF+F diet) had no effect on adiposity and even tended to worsen WAT inflammation and IR. It was hypothesized that the suppression of SCD-1 activity by Omega-3 TAG, which contributes

to hypolipidemic effect on Omega-6-rich dietary background, could be harmful when substantial amounts of SFA are present in the diet.

3. Long-term supplementation of obese C57BL/6 mice with Omega-3 TAG leads to increased concentration of insulin in plasma after oral load of glucose; however, the involvement of incretin system in this effect is unlikely as we detected neither the increase in GLP-1 secretion, or decrease in the DPP-4 degrading enzyme activity. Also alleviating the resistance towards GIP by Omega-3 TAG could not be confirmed, as the GIP resistance was not present in used model of obesity. On the other hand, Omega-3 TAG normalized the obesity-induced GIP over secretion and GIPR overexpression in WAT. These effects could represent novel molecular mechanisms by which Omega-3 TAG influence whole-body adiposity.
4. Omega-3 PL improved various aspects of obesity related metabolic comorbidities in the manner that is significantly more efficacious than that of either Omega-3 TAG or PL themselves. We have revealed integrated repression of genes encoding the enzymes for *de novo* lipogenesis and cholesterol biosynthesis in the liver while both mitochondrial and peroxisomal β -oxidation of FA was up-regulated. Thus, the improvement of hepatic steatosis as well as dyslipidemia at the systemic level can be associated with the shift from anabolic to catabolic metabolism of lipids.
5. In contrast to PC-M, rich in Omega-3, the PC-S diet completely failed to prevent the weight gain and obesity-associated comorbidities, and it failed to down regulate hepatic expression of genes encoding FA synthesis and cholesterol biosynthesis enzymes. Together with our previous study where even the higher dose of EPA and DHA (~30 g/kg of the diet) in the form of Omega-3 TAG failed to significantly down regulate hepatic genes involved in FA synthesis and cholesterol biosynthesis, these results show that it is primarily the combination of EPA and DHA and the proper lipid carrier, i.e. the PC rich PL as in this case, which provides the maximum metabolic effect of Omega-3-based dietary supplements.
6. Unlike Omega-3 TAG, Omega-3 PL contained in krill-oil induced consistent and dose-dependent improvement in insulin resistance, characterized as the increase in whole-body glucose turn-over and glycogen synthesis and decrease in hepatic glucose production. The PL lipid carrier showed to be indispensable for Omega-3 PL effect, as Omega-3 PL showed to be effective even when the total amount of EPA/DHA in the diet was 3-fold lower than in the diet containing Omega-3 TAG.

Curriculum vitae

Jana Pavlišová

Born: 7.8.1987 in Prague

Education: Charles University in Prague, Faculty of Science

2016 – 2018 Studies interrupted, maternity leave

2011 – 2016 **Doctoral studies in Animal Physiology**
Research project: Metabolic effects of long-term Omega-3 polyunsaturated fatty acid administration in dietary-obese mice.

2009 – 2011 **Master's studies in Animal Physiology**
Graduated with honors
Thesis: Metabolic effects of chronic metformin administration in obese mice depending on the composition of high-fat diet

2006 – 2009 **Bachelor's studies in Biology**
Graduated with honors
Thesis: Cortisol and its role in the regulation of energetic metabolism

Professional experience:

2009 – 2016 **Institute of Physiology, CAS, v.v.i., Department of Adipose Tissue Biology**
Undergraduate and postgraduate student

2007 **VIDIA, s.r.o., Nad Safinou II 365, 25250 Vestec**
Laboratory assistant

Scientific activity and other education

Poster presentations at conferences:

Metabolism 2012, Germany; EASD 2012, Germany; ECO 2013, UK; Warwick 2013, UK; Diabetologické dny 2014, CZ; Keystone 2015, Denmark; ECO 2015, CZ

Oral presentations at conferences:

Fyziologické dny 2013, CZ; II Doctoral Workshop on Molecular Nutrition BIOCLAIMS 2013, Spain;

Courses and certificates:

Academic writing I+II; The handling of laboratory animals course, CZU, Prague
First certificate in English, Grade A, Level B2

Other activities: Contribution to scientific popularization projects of CAS v.v.i.

1. TRIANGL: Podpora zájmu žáků o přírodovědné obory ve Středočeském kraji
2. Projekt OP VK Propagace přírodovědných oborů prostřednictvím badatelsky orientované výuky a popularizace výzkumu a vývoje

Seznam všech impaktovaných publikací / List of scientific publications

Pavlisova J, Bardova K, Stankova B, Tvrzicka E, Kopecky J, Rossmeisl M.: Corn-oil versus lard: Metabolic effects of omega-3 fatty acids in mice fed obesogenic diets with different fatty acid composition. *Biochimie*. 2016, **IF = 3,188**

Rossmeisl M, Medrikova D, van Schothorst EM, **Pavlisova J**, Kuda O, Hensler M, Bardova K, Flachs P, Stankova B, Vecka M, Tvrzicka E, Zak A, Keijer J, Kopecky J.: Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. *Biochim Biophys Acta*. 2014, **IF = 4,966**

Rossmeisl M, **Pavlisova J**, Janovska P, Kuda O, Bardova K, Hansikova J, Svobodova M, Oseeva M, Veleba J, Kopecky J Jr, Zacek P, Fiserova E, Pelikanova T, Kopecky J: Differential modulation of white adipose tissue endocannabinoid levels by n-3 fatty acids in obese mice and type-2 diabetic patients. *Biochim Biophys Acta*. 2018, **IF = 4,966**

Manuskripty v přípravě / Manuscripts in writing

Omega-3 phospholipids, but not Omega-3 triacylglycerols, improve insulin sensitivity in C57Bl/6 mice with high fat diet induced obesity.

The impact of long-term Omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation on incretin system in dietary obese mice.

Seznam literatury / References

1. Boden, G. & Shulman, G. I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.* **32**, 14–23 (2002).
2. Hue, L. & Taegtmeier, H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, E578–591 (2009).
3. Chaurasia, B. & Summers, S. A. Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **26**, 538–550 (2015).
4. Baggio, L. L. & Drucker, D. J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**, 2131–2157 (2007).
5. Yip, R. G.-C., Boylan, M. O., Kieffer, T. J. & Wolfe, M. M. Functional GIP Receptors Are Present on Adipocytes. *Endocrinology* **139**, 4004–4007 (1998).
6. Holst, J. J., Knop, F. K., Vilsbøll, T., Krarup, T. & Madsbad, S. Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. *Diabetes Care* **34 Suppl 2**, S251–257 (2011).
7. Lamers, D. *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* **60**, 1917–1925 (2011).
8. George, R. E. & Joseph, S. A review of newer treatment approaches for type-2 diabetes: Focusing safety and efficacy of incretin-based therapy. *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.* **22**, 403–410 (2014).
9. Vessby, B. *et al.* Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* **44**, 312–319 (2001).
10. Bjermo, H. *et al.* Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 1003–1012 (2012).
11. Masoodi, M., Kuda, O., Rossmesl, M., Flachs, P. & Kopecky, J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 503–518 (2015).
12. Mozaffarian, D. & Rimm, E. B. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* **296**, 1885–1899 (2006).
13. von Schacky, C. A Review of Omega-3 Ethyl Esters for Cardiovascular Prevention and Treatment of Increased Blood Triglyceride Levels. *Vasc. Health Risk Manag.* **2**, 251–262 (2006).
14. Oh, D. Y. *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**, 687–698 (2010).
15. Xu, H. E. *et al.* Molecular Recognition of Fatty Acids by Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Mol. Cell* **3**, 397–403 (1999).
16. Jump, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* **19**, 242–247 (2008).
17. James, M. J., Gibson, R. A. & Cleland, L. G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 343S–8S (2000).
18. Calder, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **77**, 327–335 (2007).
19. Rossmesl, M. *et al.* 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 (2012).
20. Rosqvist, F. *et al.* Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes* **63**, 2356–2368 (2014).
21. Storlien, L. H. *et al.* Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* **40**, 280–289 (1991).
22. Duivenvoorde, L. P. M. *et al.* A Difference in Fatty Acid Composition of Isocaloric High-Fat Diets Alters Metabolic Flexibility in Male C57BL/6J.OlaHsd Mice. *PLoS One* **10**, e0128515 (2015).

23. Enos, R. T. *et al.* Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: composition matters. *J. Lipid Res.* **54**, 152–163 (2013).
24. Chu, K., Miyazaki, M., Man, W. C. & Ntambi, J. M. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6786–6798 (2006).
25. Peter, A. *et al.* Induction of stearyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E339–349 (2008).
26. Listenberger, L. L. *et al.* Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3077–3082 (2003).
27. Nolan, C. J. & Larter, C. Z. Lipotoxicity: Why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **24**, 703–706 (2009).
28. Toft-Nielsen, M. B. *et al.* Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 3717–3723 (2001).
29. Sell, H. *et al.* Adipose Dipeptidyl Peptidase-4 and Obesity Correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes Care* **36**, 4083–4090 (2013).
30. Miyawaki, K. *et al.* Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat. Med.* **8**, 738–742 (2002).
31. Suzuki, K. *et al.* Transcriptional Regulatory Factor X6 (Rfx6) Increases Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) Expression in Enteroendocrine K-cells and Is Involved in GIP Hypersecretion in High Fat Diet-induced Obesity. *J. Biol. Chem.* **288**, 1929–1938 (2013).
32. Piteau, S. *et al.* Reversal of islet GIP receptor down-regulation and resistance to GIP by reducing hyperglycemia in the Zucker rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 1007–1012 (2007).
33. Althage, M. C. *et al.* Targeted Ablation of Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide-producing Cells in Transgenic Mice Reduces Obesity and Insulin Resistance Induced by a High Fat Diet. *J. Biol. Chem.* **283**, 18365–18376 (2008).
34. Postic, C. & Girard, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 829–838 (2008).
35. Rossmeisl, M. *et al.* Omega-3 phospholipids from fish suppress hepatic steatosis by integrated inhibition of biosynthetic pathways in dietary obese mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 267–278 (2014).
36. Girard, J. The Inhibitory Effects of Insulin on Hepatic Glucose Production Are Both Direct and Indirect. *Diabetes* **55**, S65–S69 (2006).
37. Reaven, G. M., Hollenbeck, C., Jeng, C. Y., Wu, M. S. & Chen, Y. D. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* **37**, 1020–1024 (1988).
38. de Castro, G. S. *et al.* Dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid influence liver triacylglycerol and insulin resistance in rats fed a high-fructose diet. *Mar. Drugs* **13**, 1864–1881 (2015).
39. Cavaliere, G. *et al.* Polyunsaturated Fatty Acids Attenuate Diet Induced Obesity and Insulin Resistance, Modulating Mitochondrial Respiratory Uncoupling in Rat Skeletal Muscle. *PLoS One* **11**, e0149033 (2016).
40. Freire, T. O. *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reduces insulin resistance in hepatitis C virus infected patients: a randomised controlled trial. *J. Hum. Nutr. Diet.* **29**, 345–353 (2016).
41. Derosa, G., Cicero, A. F. G., D'Angelo, A., Borghi, C. & Maffioli, P. Effects of n-3 pufas on fasting plasma glucose and insulin resistance in patients with impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. *BioFactors* n/a-n/a (2016). doi:10.1002/biof.1277
42. Oh, P. C. *et al.* Omega-3 fatty acid therapy dose-dependently and significantly decreased triglycerides and improved flow-mediated dilation, however, did not significantly improve insulin sensitivity in patients with hypertriglyceridemia. *Int. J. Cardiol.* **176**, 696–702 (2014).

43. Lalia, A. Z. *et al.* Effects of Dietary n-3 Fatty Acids on Hepatic and Peripheral Insulin Sensitivity in Insulin-Resistant Humans. *Diabetes Care* **38**, 1228–1237 (2015).
44. Clark, L. F. *et al.* Fish oil supplemented for 9 months does not improve glycaemic control or insulin sensitivity in subjects with impaired glucose regulation: a parallel randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* **115**, 75–86 (2016).
45. Bjørndal, B. *et al.* Phospholipids from herring roe improve plasma lipids and glucose tolerance in healthy, young adults. *Lipids Health Dis.* **13**, 82 (2014).
46. Ulven, S. M. & Holven, K. B. Comparison of bioavailability of krill oil versus fish oil and health effect. *Vasc. Health Risk Manag.* **11**, 511–524 (2015).
47. Ramprasath, V. R., Eyal, I., Zchut, S., Shafat, I. & Jones, P. J. H. Supplementation of krill oil with high phospholipid content increases sum of EPA and DHA in erythrocytes compared with low phospholipid krill oil. *Lipids Health Dis.* **14**, 142 (2015).
48. Tou, J. C., Jaczynski, J. & Chen, Y.-C. Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits. *Nutr. Rev.* **65**, 63–77 (2007).
49. Rao, A. R., Sarada, R., Shylaja, M. D. & Ravishankar, G. A. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of astaxanthin and astaxanthin esters from microalga-Haematococcus pluvialis. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 6703–6710 (2015).
50. Chakravarthy, M. V. *et al.* Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* **138**, 476–488 (2009).
51. Lee, J. M. *et al.* A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature* **474**, 506–510 (2011).