

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Terezie Čížková

Vliv pravidelné pohybové aktivity na metabolismus tukové tkáně u seniorů
Effect of regular physical exercise on metabolism of adipose tissue in elderly

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Michaela Šiklová, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze dne 20. 4. 2019

Terezie Čížková

Poděkování:

Děkuji své školitelce Ing. Michaele Šiklové, Ph.D. za odborné vedení, laskavý přístup a především čas, který mi věnovala. Rovněž jsem jí vděčna za poskytnutí příležitosti podílet se na klinické studii podporované grantem AZV ČR (16-29182A-EXODYA). Mé poděkování patří také Mgr. Lence Rossmeislové, Ph.D., RNDr. Michalu Kocovi, Ph.D. a všem ostatním z Laboratoře patofyziologie tukové tkáně na 3. LF UK za jejich ochotu, odborné rady a přátelské prostředí. Dále děkuji svému kamarádovi Ing. Jonášovi Šerých za vytvoření programu pro analýzu velikosti adipocytů. V neposlední řadě bych ráda poděkovala také své rodině a manželovi, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Abstrakt

Ve stáří dochází ke změně kompozice těla, při níž ubývá svalová hmota, a naopak se zvyšuje podíl tukové tkáně. Současně převládá ukládání lipidů do viscerálních a ektopických tukových dep, což je spojováno se zvýšeným rizikem rozvoje inzulínové rezistence a dalších metabolických poruch. K těmto patologickým stavům přispívá také dysfunkce tukové tkáně, která zahrnuje sníženou adipogenezi, zhoršenou metabolickou flexibilitu a změnu sekreční aktivity.

Pravidelná pohybová aktivita je beze sporu součástí zdravého životního stylu lidí všech věkových kategorií. U seniorů jsou popisovány její benefiční účinky zejména na svalovou funkci, kardiovaskulární zdatnost a metabolické zdraví. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda pravidelná pohybová aktivita ovlivňuje vybrané charakteristiky tukové tkáně u seniorek a zda jsou tyto charakteristiky asociovány s lepší inzulínovou senzitivitou.

Ve skupině dlouhodobě trénovaných a netrénovaných seniorek byla analyzována abdominální podkožní tuková tkáň, ve které byla stanovena exprese řady metabolických genů, distribuce velikosti adipocytů a míra lipolýzy za bazálních podmínek a po stimulaci isoproterenolem. Dále byly sledovány antropometrické parametry a inzulínová senzitivita.

Výsledky práce ukazují, že pravidelná pohybová aktivita zlepšuje fyzickou zdatnost seniorů, působí proti věkem indukovanému nárůstu tukové tkáně a vyvolává posun v distribuci velikosti adipocytů směrem k menším adipocytům. Pravidelná pohybová aktivita ovlivňovala taktéž expresi metabolických genů (jako např. CGI58, ADRB2, DGAT2, PCK2, CPT1A, ACOX1, SIRT1) a u trénovaných seniorek byla zjištěna vyšší míra lipolýzy po stimulaci isoproterenolem ve srovnání s netrénovanými seniorkami. Většina těchto parametrů korelovala s inzulínovou senzitivitou, velikostí adipocytů a fyzickou zdatností, což naznačuje, že změny v tukové tkáni mohou přispívat k lepšímu metabolickému profilu u pohybově aktivních seniorek.

Klíčová slova:

tuková tkáň, pravidelná pohybová aktivita, stárnutí, metabolismus, inzulínová senzitivita

Abstract

Ageing is associated with changes in body composition, which is caused by decreases in muscle mass and a progressive increase of fat mass. It is also associated with redistribution of adipose tissue with increased visceral and ectopic fat deposition. These changes are related to insulin resistance and other metabolic disturbances. Adipose tissue dysfunction is important contributor to the disturbed metabolic status of elderly and it is characterized by altered adipogenesis, metabolic flexibility and changes in secretory activity.

Regular exercise is indisputably a key part of a healthy lifestyle. It was shown to improve muscle function, cardiovascular fitness and metabolic health of elderly. The aim of this thesis was to investigate whether a regular physical exercise can influence characteristics of an adipose tissue in elderly women, and if these changes in the adipose tissue can contribute to an improvement in an insulin sensitivity.

In the two groups of elderly women, a long-term trained and a sedentary, the subcutaneous adipose tissue was analyzed for a gene expression of number of metabolic genes, an adipocyte size and a lipolytic rate at the basal state and after the isoproterenol stimulation. Anthropometric parameters and insulin sensitivity were also determined.

Outcomes of this thesis present, that regular physical exercise improves fitness of elderly. Physical exercise counteracts the age dependent increase of fat mass and it also influences the distribution of adipocyte size with increased number of smaller adipocytes and decreased percentage of big adipocytes. The RNA expression of several metabolic genes was modulated by physical activity (namely CGI58, ADRB2, DGAT2, PCK2, CPT1A, ACOX1, SIRT1). Moreover, the isoproterenol-stimulated lipolysis was higher in the trained women. Most of these parameters correlated with the physical performance, the insulin sensitivity and the adipocyte size. Our results indicate that the regular physical activity induces changes in the adipose tissue, which are associated with better metabolic profile in the trained elderly women.

Key words:

adipose tissue, regular physical exercise, ageing, metabolism, insulin sensitivity

Seznam použitých zkratk

AC	adenylátcyklasa
ACC	acetyl-CoA karboxylasa (<i>acetyl-CoA carboxylase</i>)
ACOX1	acyl-CoA oxidasa 1
ADIPOQ	adiponektin
AdipoR1	adiponektinový receptor typu 1
AdipoR2	adiponektinový receptor typu 2
ADRA2A	α -2 adrenergní receptor
ADRB1, 2	β -1 a β -2 adrenergní receptor
AGPAT	1-acylglycerol-3-fosfát acyltransferasa (<i>1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase</i>)
AGRP	(<i>agouti-related peptide</i>)
AMPK	AMP aktivovaná proteinová kinasa
ATGL	lipasa tukové tkáně (<i>adipose triglyceride lipase</i>)
ATP	adenosintrifosfát
BMI	(<i>body mass index</i>)
BMP4	(<i>bone morphogenetic protein 4</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD36	translokasa MK (<i>fatty acid translocase / cluster of differentiation 36</i>)
cDNA	(<i>complementary DNA</i>)
C/EBPs	(<i>CCAAT-enhancer binding proteins</i>)
CGI58	(<i>comparative gene identification 58</i>)
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CIDEA	(<i>cell death-inducing DFFA-like effector a</i>)
CLS	struktury podobné koruně (<i>crown like structures</i>)
CoA	koenzym A
CPT1	carnitinpalmitoyltransferasa 1
CRP	C-reaktivní protein
DAG	diacylglycerol
DGAT	diacylglycerol acyltransferasa
DPBS	(<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ELOVL6	(<i>ELOVL fatty acid elongase 6</i>)
FABP4	protein vázající mastné kyseliny 4 (<i>fatty acid binding protein 4</i>)

FADH ₂	redukována forma flavinadenindinukleotidu
FAS	synthasa mastných kyselin (<i>fatty acid synthase</i>)
FATP1	(<i>fatty acid transport protein 1</i>)
G0S2	(<i>G0/G1 switch 2</i>)
G _i protein	inhibiční protein vázající guanosin
GLUT4	glukózový transportér 4
GPAT	glycerol-3-fosfát acyltransferasa (<i>G3P acyltransferase</i>)
G _s protein	stimulační protein vázající guanosin
GTP	guanosintrifosfát
HEPES	(<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HIF-1 α	hypoxií-indukovaný faktor 1 α
HOMA IR	(<i>Homeostatic model assessment for insulin resistance</i>)
HSL	hormosenzitivní lipasa
CHREBP	(<i>carbohydrate response element binding protein 1</i>)
IL	interleukin
IR	inzulínová rezistence
IRS1	(<i>insulin receptor substrate 1</i>)
LPL	lipoproteinlipasa
MAG	monoacylglycerol
MCP1	monocytární chemoatraktivní protein 1
MGL	monoacylglycerol lipasa
MK	mastná kyselina
mRNA	transferová ribonukleová kyselina (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSC	mesenchymální kmenová buňka (<i>mesenchymal stem cell</i>)
α -MSH	α -melanocyt stimuluující hormon
mtDNA	mitochondriální DNA
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukována forma nikotinamidadenindinukleotidu
NEFA	volné mastné kyseliny (<i>non-esterified fatty acid</i>)
NPY	neuropeptid Y
NRF1	(<i>nuclear respiratory factor 1</i>)
PBS	fosfátový pufr
PCK	fosfoenolpyruvátkarboxykinasa (<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>)
PDK4	pyruvátdehydrogenasakinas 4
PGC-1 α	(<i>PPAR-γ coactivator 1 α</i>)
PKA	proteinkinasa A

PPAR α	peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor α (<i>peroxisome proliferator-activated receptor α</i>)
PPAR γ	peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor γ (<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>)
qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RT	reverzní transkripce
RUNX2	(<i>Runt related transcription factor 2</i>)
SCD	(<i>stearoyl-CoA desaturase</i>)
SFT	(<i>senior fitness test</i>)
SIRT1	NAD ⁺ dependentní deacetylase – sirtuin 1
SREBP-1c	(<i>sterol regulatory element binding protein 1c</i>)
TAG	triacylglycerol
TBX1	(<i>T-box transcription factor 1</i>)
TFAM	mitochondriální transkripční faktor A
TNF α	tumor-nekrotizující faktor α
TT	tuková tkáň
UCP1	odpřahující protein 1 (<i>uncoupling protein 1</i>)
WISP2	(<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 2</i>)
Wnt	(<i>Wingless/Int-1</i>)
ZNF423	(<i>zinc finger protein 423</i>)

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled	2
2.1 Tuková tkáň.....	2
2.1.1 Adipogeneze	5
2.1.2 Energetický metabolismus v tukové tkáni	6
a) Lipogeneze	7
b) Lipolýza.....	9
c) Prázdný metabolický cyklus lipolýzy/reesterifikace MK v tukové tkáni.....	11
2.1.3 Inzulínová rezistence.....	12
2.1.4 Endokrinní funkce tukové tkáně.....	13
2.2 Charakteristika tukové tkáně u seniorů	15
2.3 Vliv pravidelné pohybové aktivity na charakteristiky TT u seniorů.....	19
3. Cíle diplomové práce.....	23
4. Metodiky	24
4.1 Charakteristika subjektů.....	24
4.1.1 Klinická vyšetření.....	24
a) Testy fyzické zdatnosti.....	24
b) Stanovení inzulínové senzitivity	25
c) Biochemické vyšetření krve	25
4.2 Analýza krevního séra.....	26
4.2.1 Stanovení koncentrace glycerolu a neesterifikovaných mastných kyselin v séru	26
a) Stanovení koncentrace glycerolu v krevním séru	26
b) Stanovení koncentrace NEFA v krevním séru	27
4.3 Analýza tukové tkáně	27
4.3.1 Exprese genů v tukové tkáni	27
Izolace RNA z tukové tkáně	27
Reverzní transkripce	28
Preamplifikace a „Fluidigm chip“	29
4.3.2 Sekrece glycerolu v explantech tukové tkáně	32
4.4 Analýza adipocytů	32
4.4.1 Izolace adipocytů z tukové tkáně.....	32
4.4.2 Analýza velikosti adipocytů.....	33
4.4.3 Exprese metabolických genů v adipocytech.....	37

Izolace RNA z adipocytů.....	37
Reverzní transkripce.....	37
Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).....	38
4.5 Statistické vyhodnocení	39
4.6 Materiál.....	40
4.6.1 Chemikálie.....	40
4.6.2 Přístroje a materiál	40
5. Výsledky	42
5.1 Biochemické a antropometrické parametry	42
5.2 Distribuce velikosti adipocytů	43
5.3 Genová exprese v tukové tkáni.....	45
a) Adipogeneze.....	45
b) Lipogeneze.....	46
c) Lipolýza a glyceroneogeneze	46
d) Mitochondriální biogeneze a metabolismus.....	47
e) Adipokiny a cytokiny	48
5.4 Genová exprese v izolovaných adipocytech.....	49
5.5 Bazální a stimulovaná lipolýza	50
5.6 Korelace.....	52
6. Diskuze	54
6.1 Biochemické a antropometrické parametry	54
6.2 Distribuce velikosti adipocytů	55
6.3 Genová exprese v tukové tkáni a v izolovaných adipocytech	56
a) Adipogeneze a lipogeneze	56
b) Lipolýza a glyceroneogeneze	57
c) Mitochondriální biogeneze a metabolismus.....	59
d) Adipokiny a cytokiny.....	61
e) Genová exprese v izolovaných adipocytech	62
6.4 Bazální a stimulovaná lipolýza	62
7. Závěr	64
8. Seznam použité literatury.....	65

1. Úvod

Jedním z velkých témat 21. století je problematika demografického stárnutí populace, které vzniká zejména kvůli nízké porodnosti a prodlužování délky života. Od roku 2007 do roku 2017 vzrostlo v Evropské unii zastoupení lidí starších 65 let z celkového počtu obyvatel v průměru o 2,4 %, v České republice pak dokonce o 4,3 % (Web. 1). V posledních statistických průzkumech z roku 2018 se uvádí, že lidé starší 65 let tvoří v Evropské unii 19,7 % obyvatel a konkrétně v České republice představují 19,2 % populace (Web. 2). Podle současných prognóz bude trend stárnutí populace pokračovat a odhaduje se, že do roku 2080 vzroste zastoupení seniorů v populaci na 29,1 % (Web.1). S ohledem na tuto problematiku se věnuje stále větší pozornost tématům týkajícím se stáří. Vzniká řada různých projektů s cílem zlepšit kvalitu života seniorů, jako jsou například projekty zabývající se celoživotním vzděláváním či volnočasovými aktivitami, které mimo jiné pomáhají udržovat sociální kontakty u starších lidí. Velmi důležitým kritériem kvality života seniorů je samozřejmě také zdraví a s ním spjatá soběstačnost jedince. Kromě zlepšování zdravotní péče je kladen důraz i na snahu předcházet vzniku zdravotních obtíží, například na úrovni informovanosti o zdravém stravování. Za velmi účinný způsob prevence proti rozvoji řady zdravotních komplikací spojených s vyšším věkem se považuje pravidelná pohybová aktivita. Její pozitivní účinky na zdraví byly zkoumány zejména z hlediska působení na svalovou tkáň. Pravidelná pohybová aktivita zmírňuje věkem indukovaný úbytek množství i funkčnosti svalové tkáně a zlepšuje inzulínovou senzitivitu svalových buněk. Cvičení také zvyšuje kardiorepirační zdatnost, a usnadňuje tak seniorům zvládnání každodenních úkonů.

Se zvyšujícím se věkem dochází ke změně kompozice těla, při které dochází k úbytku svalové hmoty a naopak k nárůstu tukové tkáně (TT). Je známo, že proti této nepříznivé změně působí pravidelná pohybová aktivita, avšak jen velmi málo se ví o tom, jaké konkrétní efekty má cvičení na TT u seniorů. Většina studií zkoumá účinky dlouhodobého tréninku na TT pouze v kontextu obezity. V tomto ohledu by mohla tato diplomová práce přinést nové poznatky, které by pomohly lépe pochopit pozitivní vliv pravidelné pohybové aktivity na změny v metabolismu TT u seniorů. V rámci této práce byly analyzovány vzorky krevního séra a abdominální podkožní tukové tkáně dlouhodobě trénovaných a netrénovaných žen ve věku od 60 do 80 let. Hlavním cílem bylo zhodnotit vliv pravidelné pohybové aktivity na charakteristiky TT spojené s metabolismem TT. Byla provedena analýza genové exprese v TT i v izolovaných adipocytech se zaměřením na metabolické dráhy. Dále byl sledován efekt pravidelné pohybové aktivity na bazální a stimulovanou lipolýzu na úrovni sekrece

glycerolu explanty TT a byla analyzována velikost adipocytů v TT trénovaných a netrénovaných seniorek. Sledovány byly také biochemické a antropometrické parametry seniorek.

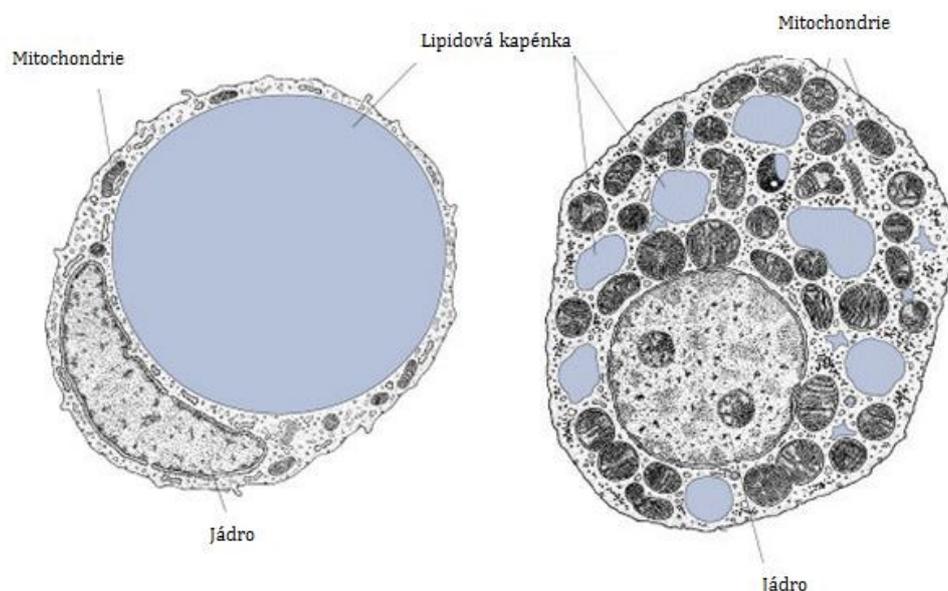
2. Literární přehled

2.1 Tuková tkáň

Tuková tkáň představuje u zdravého dospělého muže 15 – 20 % a u ženy 20 – 25 % celkové tělesné hmotnosti. Je tvořena tukovými buňkami – adipocyty a stromavaskulární frakcí obsahující preadipocyty, fibroblasty, endotelové, nervové a imunokompetentní buňky. TT hraje klíčovou roli v energetickém metabolismu, a to nejen na úrovni skladování energie, ale také na úrovni sekrece řady biologicky aktivních látek. Mezi další funkce TT patří tvorba tepla, tepelná izolace a mechanická ochrana.

Jsou popisovány dva hlavní typy tukové tkáně, a to bílá a hnědá TT. Bílá tuková tkáň obsahuje adipocyty s velkou centrální tukovou kapénkou, která zaujímá většinu objemu buňky a zatlačuje ostatní organely na periferii (Obrázek 1). Adipocyty v hnědé tukové tkáni mají naproti tomu více menších tukových kapének, jádro uložené centrálně a vyznačují se velkým množstvím mitochondrií, které spolu s vysokou vaskularizací dávají vznik specifickému nahnědlému zbarvení hnědé tukové tkáně (Saely et al., 2012). Morfologické rozdíly bílé a hnědé TT odrážejí jejich odlišné funkce. Bílá TT uskladňuje přebytečnou energii ve formě triacylglycerolů (TAG), zatímco hnědá tuková tkáň energii spotřebovává za účelem tvorby tepla. Tento způsob produkce tepla se nazývá netřesová termogeneze a je založený na přeměně energie uložené v mastných kyselinách (MK) na teplo. K netřesové termogenezi je využíván odpřahující protein 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*) specificky exprimovaný v hnědých adipocytech, který vytváří na vnitřní mitochondriální membráně kanál, a tím odpřahuje respirační řetězec od syntézy adenosintrifosfátu (ATP). Hnědé adipocyty v aktivním stavu vykazují vysokou míru β -oxidace MK, k čemuž potřebují efektivně štěpit TAG a uvolněné MK transportovat do mitochondrií, kde β -oxidace probíhá. A právě pro tyto účely je výše popsané uspořádání organel v hnědých adipocytech velmi výhodné. Více menších lipidových kapének poskytuje větší relativní povrch kapének, na němž probíhá štěpení TAG, a zároveň umožňuje těsný kontakt kapének a mitochondrií, což urychluje transport uvolněných MK (Saely et al., 2012).

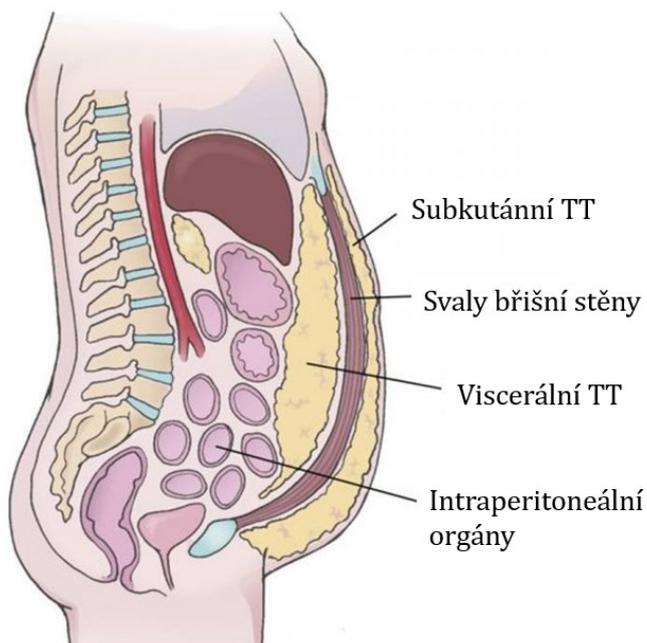
Ve srovnání s bílou TT je zastoupení hnědé TT u lidí minoritní. Nejvíce jí mají novorozenci, u kterých představuje primární zdroj tepla. Jak se u nich postupně vyvíjejí jiné mechanismy termogeneze, množství hnědé tukové tkáně se zmenšuje. U dospělého člověka se hnědá tuková tkáň nachází především v oblasti krku, hrudníku a okolo ledvin (Heaton, 1972).



Obrázek 1: Schématické znázornění adipocytů bílé (vlevo) a hnědé (vpravo) tukové tkáně
Převzato a upraveno z (Lentz, 1971).

U bílé tukové tkáně je podle jejího umístění rozlišována subkutánní (podkožní) TT, která tvoří okolo 80 % celkového tělesného tuku, a viscerální TT okolo vnitřních orgánů v abdominální oblasti (Obrázek 2), jejíž zastoupení je za fyziologických podmínek podstatně nižší a liší se mezi pohlavími (muži 10 – 20 %, ženy 5 – 8 %) (Kumari et al., 2018). Kromě distribuce je subkutánní a viscerální TT odlišná také v některých dalších aspektech. Adipocyty ve viscerální TT jsou například více metabolicky aktivní – mají vyšší bazální i katecholaminy stimulovanou lipolýzu a naopak snížený antilipolytický efekt inzulínu ve srovnání s adipocyty v subkutánní TT. Nadměrná akumulace viscerálního tuku při abdominální obezitě je asociována s poškozením glukózové homeostáze a inzulínové senzitivity, což zvyšuje riziko rozvoje cukrovky 2. typu. Taktéž zvýšené kardiovaskulární riziko při obezitě je připisováno zejména viscerálnímu tuku (Ibrahim, 2010).

V souvislosti s rizikem metabolických a kardiovaskulárních onemocnění je nutné zmínit také ektopický tuk, který představuje jakoukoli nadměrnou akumulaci TAG v orgánech mimo TT, typicky v játrech, svalech, srdci a velkých cévách (Kwok et al., 2016).



Obrázek 2: Tuková depa v abdominální oblasti

Převzato a upraveno z (Pilolla, 2018).

V současné době se v oblasti tukové tkáně hodně studují tzv. béžové adipocyty. Jejich název odráží skutečnost, že jsou tyto buňky svými charakteristikami někde na pomezí bílých a hnědých adipocytů. Morfologicky i funkčně jsou podobnější hnědým adipocytům, netvoří však samostatná tuková depa, nýbrž jsou rozptýleny v rámci bílé tukové tkáně. Mají stejně jako hnědé adipocyty schopnost generovat teplo odpráhováním oxidativního metabolismu od syntézy ATP pomocí proteinu UCP1 (Kajimura et al., 2015). Dalším společným markerem hnědých a béžových adipocytů popisovaných u myši je exprese genů CIDEA (*cell death-inducing DFFA-like effector a*) a PGC1 α (*PPAR γ coactivator 1 α*). TBX1 (*T-box transcription factor 1*) je gen exprimovaný specificky pouze v béžových adipocytech (Stanford et al., 2015). Zajímavé je, že navzdory podobnostem mezi hnědými a béžovými adipocyty nepochází tyto buňky ze stejných prekurzorů. V současné době existují dvě hlavní teorie o původu béžových adipocytů. První předpokládá jejich vznik *de novo* z prekurzorů v bílé tukové tkáni, druhá transdiferenciaci již stávajících maturovaných bílých adipocytů. Proces, při kterém vznikají béžové adipocyty, se nazývá hnědnutí adipocytů (z anglického *browning of adipocytes*). Nejlépe popsáním faktorem indukujícím hnědnutí adipocytů je chladová expozice, která aktivuje sympatický nervový systém. Noradrenalin uvolněný ze sympatických nervových zakončení se váže na β 3-adrenergní receptory v TT a spouští zde termogenní program. Dalším faktorem je pohybová aktivita, jejíž vliv na hnědnutí TT bude rozebrán v kapitole 2.3 (Kajimura et al., 2015).

2.1.1 Adipogeneze

Tuková tkáň se u člověka zakládá ve fetálním období okolo 14. týdne gestace. Růst TT se uskutečňuje skrze navyšování počtu tukových buněk (hyperplazie) nebo skrze zvětšování stávajících adipocytů (hypertrofie). Hyperplastický růst TT je výrazný zejména ve fetálním období, raném dětství a v pubertě. V dospělosti je množství adipocytů relativně stálé a hyperplazie slouží spíše k nahrazování starých nefunkčních adipocytů (Rosen and Spiegelman, 2014). Na aktuální energetický stav organismu pak odpovídá TT hlavně regulací velikosti tukových buněk.

Adipogeneze je proces vývoje tukových buněk ze svých prekurzorů a sestává ze dvou fází – determinační a diferenciační (James, 2013). Adipocyty jsou stejně jako osteocyty, chondrocyty a myocyty odvozeny od mesenchymálních kmenových buněk (MSC). Typ buněčné linie, ve kterou se bude kmenová buňka vyvíjet, je určena během determinační fáze. V případě adipogenní linie vznikají v této fázi preadipocyty, které mohou stále proliferovat, ale na rozdíl od MSC už nemohou dát vzniknout buňkám jiné linie. V druhé fázi adipogeneze se diferencují preadipocyty ve zralé adipocyty.

Regulace adipogeneze je komplexní děj probíhající na několika úrovních, jako je například regulace pomocí transkripčních faktorů, hormonů či miRNA. Jeden z hlavních proadipogenních transkripčních faktorů je peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor γ (PPAR γ). Existuje ve dvou isoformách. PPAR γ 2 je dominantně exprimován v tukové tkáni, zatímco PPAR γ 1 je exprimován ve více různých tkáních (např. játra, hladké a příčné pruhované svaly) (Tontonoz et al., 1994, Zhu et al., 1993).

Dalšími transkripčními faktory důležitými pro adipogenezi jsou proteiny C/EBPs (*CCAAT-enhancer binding proteins*) (Mosesti et al., 2016). Tato rodina transkripčních faktorů má celkem 6 členů, z toho se na regulaci adipogeneze podílí C/EBP α , C/EBP β a C/EBP δ . V rané fázi adipogeneze se uplatňují transkripční faktory C/EBP β a C/EBP δ , které následně indukují expresi C/EBP α a PPAR γ . Transkripční faktory C/EBP α a PPAR γ se vážou do promotorových oblastí genů důležitých pro funkční zralé adipocyty a stimulují jejich expresi. Mezi geny takto regulované patří například glukózový transportér typu 4 (GLUT4), protein vázající mastné kyseliny 4 (FABP4, *fatty acid binding protein 4*), translokasa MK (CD36, *fatty acid translocase*), lipoproteinlipasa (LPL) a adiponektin (ADIPOQ).

Jak již bylo zmíněno, v rámci determinační fáze adipogeneze dochází k určení směru vývoje mesenchymálních kmenových buněk. Bylo objeveno, že existuje určitá vzájemná kontrola diferenciací adipocytů a osteocytů. PPAR γ inhibuje hlavní osteogenní transkripční faktor RUNX2 (*Runt related transcription factor 2*), a naopak RUNX2 působí proti

adipogenezi (Zhang et al., 2006). Dalším propojením regulace adipogeneze a osteogeneze je kanonická dráha Wnt signalizace, která směřuje vývoj MSC k osteocytům a zároveň inhibuje adipogenezi (Kim et al., 2013). Při aktivaci této dráhy dochází k akumulaci β -cateninů v cytosolu, který následně vstupuje do jádra a inhibuje expresi transkripčních faktorů PPAR γ a C/EBP α . Wnt signalizace stimuluje také protein WISP2 (*WNT1 inducible signaling pathway protein 2*). V cytosolu interaguje WISP2 s transkripčním koaktivátorem ZNF423 (*zinc finger protein 423*), čímž mu brání vstoupit do jádra a stimulovat zde expresi PPAR γ . WISP2 je kromě cytosolické formy také vylučován ven z buňky a může tak působit zpětně další aktivaci kanonické dráhy Wnt signalizace. Proti WISP2 působí BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*), který vyvazuje ZNF423 z komplexu s WISP2, a tím umožňuje jeho translokaci do jádra a zdejší působení (Grunberg et al., 2018).

2.1.2 Energetický metabolismus v tukové tkáni

Tuková tkáň představuje největší energetický rezervoár lidského těla. Energie je zde uskladněna v lipidových kapénkách ve formě triacylglycerolů. Tento způsob uchování energie je velmi efektivní, kompletní oxidací TAG se uvolňuje přibližně dvakrát více energie než ze spalování stejného množství sacharidů (cca 38 kJ/g pro TAG, cca 17 kJ/g pro sacharidy). TAG jsou při lipolýze štěpeny na volné mastné kyseliny (*NEFA, non-esterified fatty acid*) a glycerol, které jsou následně uvolňovány do krevního oběhu, odkud mohou být vychytávány cílovými tkáněmi. Glycerol je využíván zejména v játrech pro glukoneogenezi a glyceroneogenezi. NEFA jsou pak vychytávány především buňkami kosterních a srdečních svalů, pro které jsou zdrojem energie skrze β -oxidaci. NEFA jsou v těchto buňkách nejdříve aktivovány esterifikací s koenzymem A (CoA). Ze vzniklého acyl-CoA je acylová skupina přenesena na carnitinpalmitoyltransferasu 1 (CPT1), která transportuje acylovou skupinu přes mitochondriální membránu. V matrix mitochondrie je acylová skupina esterifikována s mitochondriálním CoA. Samotná β -oxidace se skládá ze 4 opakujících se reakcí, během nichž jsou postupně odštěpovány dvouuhlíkaté zbytky ve formě acetyl-CoA za současného vzniku redukovaných koenzymů FADH₂ a NADH (redukovaná forma flavinadeninukleotidu a nikotinamadeninukleotidu). Oxidací redukovaných koenzymů v rámci oxidační fosforylace vznikají vysokoenergetické molekuly ATP. Acetyl-CoA může být dále metabolizován v Krebsově cyklu, čímž vzniká ATP, GTP a další redukované koenzymy FADH₂ a NADH (Voet and Voetová, 1995).

Ve stavu zvýšených energetických požadavků organismu, jako je například fyzická aktivita nebo nedostatečný příjem energie z potravy, klesá hladina NEFA a koncentrace glukózy v krvi. V této situaci jsou mobilizovány energetické zásoby z jater a TT. Jaterní

buňky začnou produkovat glukózu odbouráváním zásobního glykogenu a z MK vytváří ketonové látky (zdroj energie hlavně pro mozek, srdce a svaly při nedostatku glukózy). V TT je aktivována lipolýza, jejíž produkty jsou uvolňovány do oběhu.

Při energetickém nadbytku je naopak energie v játrech využita pro doplnění glykogenových zásob a k produkci MK, které mohou být použity pro tvorbu složitějších molekul, jako jsou fosfolipidy, nebo jsou transportovány v lipoproteinových partikulích do cirkulace. V TT jsou při nadbytku substrátů a energie tyto MK vychytávány a v rámci procesu lipogeneze jsou ukládány v lipidových kapénkách ve formě TAG.

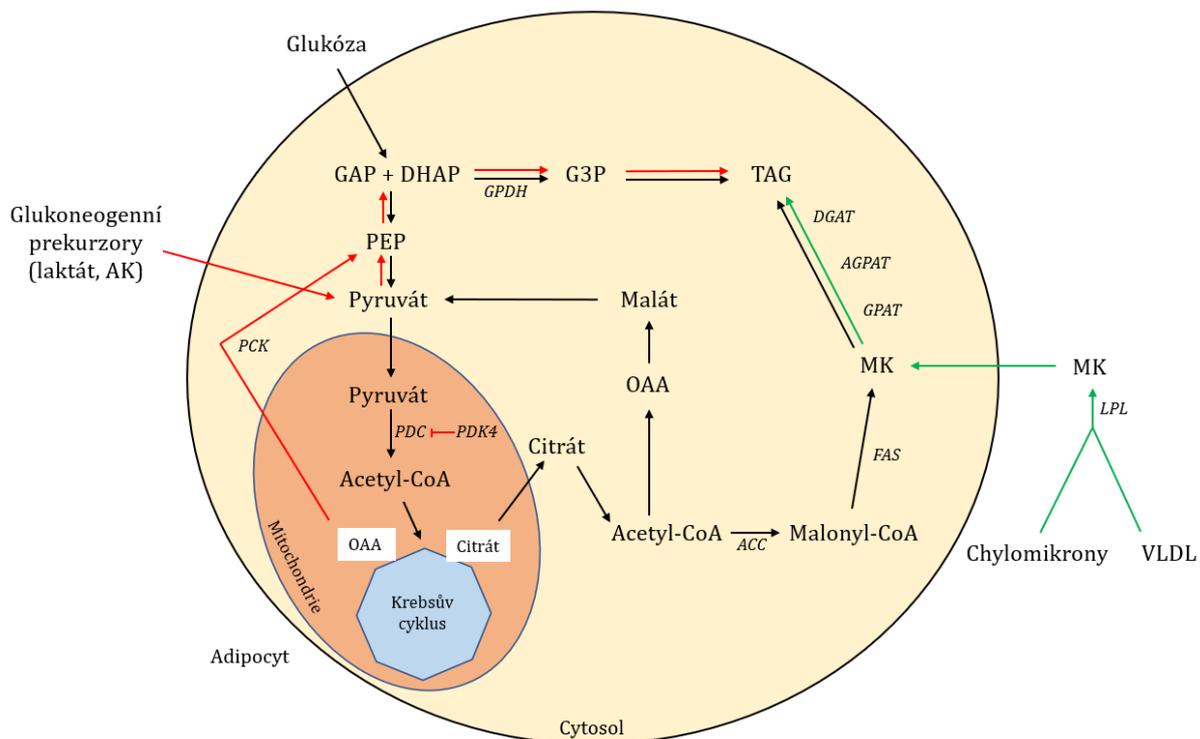
a) Lipogeneze

Lipogeneze zahrnuje jak syntézu samotných TAG tak také syntézu glycerol-3-fosfátu a MK. Přehled těchto drah je znázorněn na Obrázku 3. TAG se skládají ze tří mastných kyselin spojených s glycerol-3-fosfátem esterovou vazbou. Esterifikaci katalyzují enzymy hladkého endoplazmatického retikula – glycerol-3-fosfát acyltransferasa (GPAT), 1-acylglycerol-3-fosfát acyltransferasa (AGPAT) a diacylglycerol acyltransferasa (DGAT) (Coleman and Lee, 2004). Enzym DGAT existuje ve dvou isoformách – DGAT1 a DGAT2. Na základě experimentů na myších s delecí genu pro jednu či druhou isoformu bylo zjištěno, že větší roli v udržování homeostáze TAG zřejmě hraje DGAT2 (Stone et al., 2004). *Dgat2*^{-/-} myši vykazovaly snížený obsah TAG ve tkáních a umíraly brzy po narození. *Dgat1*^{-/-} myši byly naproti tomu životaschopné a měly normální hladiny TAG v plazmě. U *Dgat1*^{-/-} myší byla navíc prokázána zvýšená senzitivita k inzulínu a leptinu, což zřejmě souvisí s pozorovanou rezistencí k dietou indukované obezitě (Chen et al., 2002).

Pro syntézu TAG mohou být využívány mastné kyseliny z krevního řečiště. Zde jsou MK vázané na albumin nebo jsou transportovány v rámci lipoproteinových částic ve formě TAG. Na endotelu kapilár v TT je vázaná lipoproteinlipasa, která uvolňuje z lipoproteinů mastné kyseliny. Hlavním transportérem MK v adipocytech je integrální membránový protein CD36 a transmembránový protein FATP1 (*fatty acid transport protein 1*). V cytoplazmě se MK vyskytují navázané na plazmatický protein FABP4, který usnadňuje pohyb hydrofobní molekuly ve vodném prostředí buňky. Pro přenos MK do endoplazmatického retikula, kde probíhá syntéza TAG, je nutná její esterifikace s CoA. Tuto reakci katalyzuje enzym acyl-CoA synthasa (Proenca et al., 2014).

Dalším zdrojem MK pro syntézu TAG jsou MK syntetizované *de novo* z nelipidových prekurzorů. *De novo* lipogeneze probíhá u lidí zejména v játrech a tukové tkáni (Song et al., 2018). Acetyl-CoA karboxylasa (ACC) katalyzuje reakci, při níž je acetyl-CoA karboxylován a

vzniká malonyl-CoA. Tento počáteční krok syntézy MK je zároveň jejím důležitým regulačním bodem. Malonyl-CoA je substrátem pro syntézu mastných kyselin (FAS, *fatty acid synthase*), která sledem reakcí vytváří z těchto dvouuhlíkatých prekurzorů kyselinu palmitovou (šestnáctiuhlíkatá molekula). Tento základní produkt syntézy MK může být dále upravován v endoplazmatickém retikulu případně v mitochondriích, kde se nachází enzymy umožňující elongaci (např. ELOVL6, *ELOVL fatty acid elongase 6*) a desaturaci MK (např. SCD, *stearoyl-CoA desaturase*).



Obrázek 3: Přehled lipogenních drah

Černé šipky znázorňují *de novo* lipogenezi, zelené šipky syntézu TAG z MK z cirkulace a červené šipky znázorňují glyceroneogenezi. Bližší popis v textu. Vytvořeno podle (Proenca et al., 2014).

ACC – acetyl-CoA karboxylasa, AGPAT – 1-acylglycerol-3-fosfát acyltransferasa, AK – aminokyseliny, DGAT – diacylglycerol acyltransferasa, DHAP – dihydroxyacetonfosfát, FAS – synthasa mastných kyselin, G3P – glycerol-3-fosfát, GAP – glyceraldehyd-3-fosfát, GPAT – glycerol-3-fosfát acyltransferasa, GPDH – glycerolfosfátdehydrogenasa, LPL – lipoproteinlipasa, MK – mastné kyseliny, OAA – oxaloacetát, PCK – fosfoenolpyruvátkarboxykinasa, PDC – pyruvátdehydrogenasový komplex, PDK4 – pyruvátdehydrogenasakinas 4, PEP – fosfoenolpyruvát, TAG – triacylglyceroly, VLDL – lipoprotein o velmi nízké hustotě

Glycerol-3-fosfát vzniká v adipocytech několika způsoby. Může být vytvořen redukcí meziprojektu glykolýzy – dihydroxyacetonfosfátu pomocí enzymu glycerolfosfátdehydrogenasy. Dalšími zdroji pak mohou být pyruvát, laktát a aminokyseliny, které dávají vzniknout glycerol-3-fosfátu v procesu zvaném glyceroneogeneze. Tato dráha zahrnuje počáteční kroky glukoneogeneze až do vzniku glyceraldehyd-3-fosfátu, který je redukován

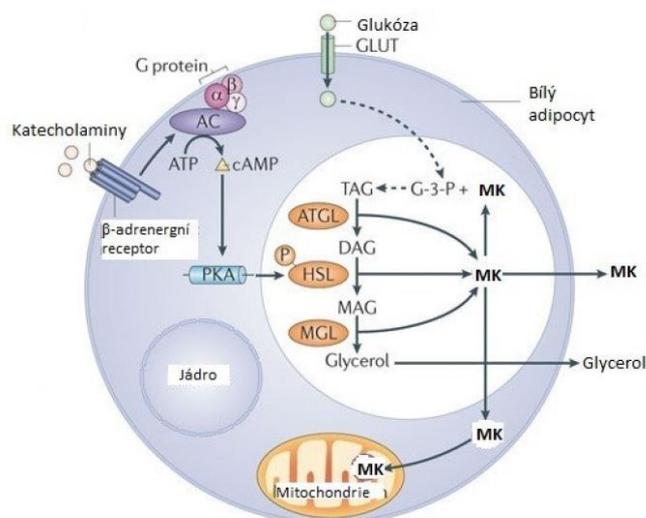
na dihydroxyacetonfosfát a následně na glycerol-3-fosfát. Glycerol-3-fosfát vzniká také přímo fosforylací glycerolu působením glycerolkinasy, avšak tento způsob syntézy glycerol-3-fosfátu je typický spíše pro jaterní buňky (Nye et al., 2008).

Míra lipogeneze je regulována zejména nutričním stavem a hormony, které s ním úzce souvisí. V postprandiálním stavu stoupá v krvi hladina glukózy a následně i inzulínu, který je syntetizován β -buňkami pankreatu. Inzulín aktivuje signalizační kaskádu vedoucí mimo jiné k translokaci glukózových přenašečů GLUT4 na plazmatickou membránu, čímž zvyšuje vychytávání glukózy z krve v dané buňce a zvyšuje tak dostupnost substrátu pro syntézu glycerol-3-fosfátu i MK (De Meyts, 2000). Dále inzulínová signalizační kaskáda aktivuje lipogenní a glykolytické enzymy a skrze transkripční faktor SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding protein-1c*, kódovaný genem SREBF1) zvyšuje také jejich genovou expresi. Pozitivní efekt SREBP-1c na *de novo* lipogenezi byl však pozorován hlavně v játrech. V TT hraje zřejmě důležitější roli transkripční faktor CHREBP (*carbohydrate response element-binding protein 1*), který je aktivován přímo glukózou a dalšími karbohydráty (Song et al., 2018). Při hladovění je lipogeneze utlumena. Snížená hladina glukózy v krvi stimuluje α -buňky pankreatu k produkci glukagonu, který snižuje aktivitu lipogenních enzymů a naopak aktivuje v organismu katabolické procesy.

b) Lipolýza

V rámci lipolýzy dochází k hydrolýze TAG uložených v lipidových kapénkách a k uvolňování vzniklých volných mastných kyselin a glycerolu do krevního řečiště (Obrázek 4). Hydrolýzu iniciuje lipasa tukové tkáně (ATGL, *adipose triglyceride lipase*), která odštěpuje první MK za vzniku diacylglycerolu (DAG). Hlavním aktivátorem této lipasy je CGI58 (*comparative gene identification 58*). Za bazálních podmínek je inaktivován vazbou na perilipin 1. Při hormonální stimulaci dochází k fosforylaci perilipinu 1, čímž se rozvolní jeho vazba s CGI58. Cytosolický CGI58 se následně váže na ATGL, a tím ji aktivuje (Lafontan and Langin, 2009). Opačný efekt má protein kódovaný genem G0S2 (*G0/G1 switch 2*), který vazbou na ATGL inhibuje její hydrolázovou aktivitu (Yang et al., 2010). Hormonsenzitivní lipasa (HSL) dokáže kompletně hydrolyzovat TAG, avšak s největší účinností hydrolyzuje DAG na monoacylglycerol (MAG). V neaktivním stavu se HSL nachází v cytosolu. Při zvýšení koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v buňce je aktivována proteinkinasa A (PKA), která následně fosforyluje HSL a perilipin 1. Fosforylovaný perilipin 1 je translokován z povrchu lipidové kapénky do cytoplazmy, čímž umožní vazbu fosforylované HSL na povrch lipidové kapénky a ta začne hydrolyzovat TAG (Lampidonis et al., 2011).

Poslední MK z glycerolové kostry může být odštěpena také monoacylglycerol lipasou (MGL), která je specifická pouze pro MAG.



Obrázek 4: Lipolytická dráha a její stimulace prostřednictvím β -adrenergního receptoru

Bližší popis v textu. Převzato a upraveno z (Altarejos and Montminy, 2011).

AC - adenylátcyklasa, ATGL - lipasa tukové tkáně, ATP - adenosintrifosfát, cAMP - cyklický adenosinmonofosfát, DAG - diacylglyceroly, G-3-P - glycerol-3-fosfát, GLUT - glukózový transportér, HSL - hormonsenzitivní lipasa, MAG - monoacylglyceroly, MGL - monoacylglycerol lipasa, MK - mastné kyseliny, PKA - proteinkinasa A, TAG - triacylglyceroly

Další protein, který je u lidí asociovaný s lipidovou kapénkou a podílí se na regulaci lipolýzy, je CIDEA. Zajímavé je, že lokalizace tohoto proteinu není u lidí a myši shodná. Jak již bylo zmíněno, protein CIDEA je u myši exprimován výhradně v hnědých a béžových adipocytech a je používán jako jeden z markerů pro detekci těchto adipocytů. U lidí je naproti tomu CIDEA exprimován především v bílé TT (Gao et al., 2017). Bylo zjištěno, že u lidí je exprese genu CIDEA v tukové tkáni silně ovlivněna množstvím tukové tkáně (Nordstrom et al., 2005). Nordstrom a kol. ve své studii uvádějí, že u obézních lidí byla o 50 % nižší exprese genu CIDEA v podkožní TT (i v adipocytech izolovaných z podkožní TT) ve srovnání s neobézními subjekty. Dále pozorovali na primárních buněčných kulturách, ve kterých inhibovali expresi CIDEA pomocí RNA interference, zvýšenou bazální lipolýzu. Na základě těchto experimentů se předpokládá, že CIDEA působí na lipolýzu inhibičně. Mechanismus, kterým CIDEA ovlivňuje míru lipolýzy, však dodnes není znám. Vzhledem k tomu, že CIDEA je protein asociovaný s lipidovou kapénkou, mohl by tento protein fungovat obdobně jako perilipin 1 (Xu et al., 2012).

Lipolýza je regulována zejména ovlivňováním cAMP signalizační dráhy, která jak již bylo zmíněno, aktivuje PKA (Lafontan and Langin, 2009). Jedním ze způsobů je regulace aktivity adenylátcyklasy (AC), která syntetizuje cAMP. Klíčovou roli zde hrají adrenergní receptory α -2, β -1 a β -2 (kódované geny ADRA2A, ADRB1 a ADRB2). β -adrenergní receptory jsou asociované s Gs-proteiny, které aktivují AC, zatímco α -adrenergní receptory jsou asociované s Gi-proteiny působící na AC inhibičně. Katecholaminy tedy mohou působit na lipolýzu pozitivně i negativně podle své afinity k jednotlivým adrenergním receptorům a podle zastoupení receptorů v dané buňce. Další receptor spřažený s Gi-proteinem je adenosinový receptor 1. Proti tomuto mechanismu inhibice lipolýzy adenosinem působí adenosindeaminasa, která adenosin degraduje (Johansson et al., 2008).

Hladina cAMP je dále regulována fosfodiesterasou 3B, která degraduje cAMP. Tato fosfatasa je aktivována inzulínovou signalizační kaskádou. Inzulín tedy patří mezi hlavní inhibitory lipolýzy.

c) Prázdný metabolický cyklus lipolýzy/reesterifikace MK v tukové tkáni

Prázdný metabolický cyklus označuje proces, při němž současně probíhají reakce proti sobě působící. Hlavní úlohou těchto dějů, které spotřebovávají energii (typicky ATP), je regulační funkce. V adipocytech bílé TT je část MK uvolněných během lipolýzy reesterifikována zpět s glycerol-3-fosfátem, čímž je regulováno množství MK uvolněných do cirkulace. Cyklus lipolýzy/reesterifikace MK se tedy podílí na udržování relativně stálé hladiny MK v cirkulaci (Campbell et al., 1992). Wolfe a kol. sledovali míru reesterifikace MK v průběhu čtyřhodinové fyzické aktivity a dvě hodiny po jejím skončení (Wolfe et al., 1990). V této studii bylo zjištěno, že před zahájením fyzické aktivity bylo reesterifikováno 70 % uvolněných MK. Po dobu fyzické aktivity se míra reesterifikace MK pohybovala okolo 30 %, což odráží zvýšenou potřebu energetických substrátů v této fázi. Bezprostředně po ukončení fyzické aktivity však stoupla míra reesterifikace na 90 %. Tento nárůst má zřejmě kompenzovat pomalejší odezvu hormonálně regulované lipolýzy na ukončení fyzické zátěže, a bránit tak zvýšenému vyplavování MK do cirkulace v zotavovací fázi. Po 2 hodinách byl pozorován pokles reesterifikace MK na výchozí hodnoty.

Rychlost reesterifikace MK je dána dostupností glycerol-3-fosfátu, který vzniká v adipocytech bílé TT především v rámci glyceroneogeneze. Limitním krokem glyceroneogeneze je enzym fosfoenolpyruvátcarboxykinasa (PCK), který katalyzuje reakci, při níž vzniká fosfoenolpyruvát z oxaloacetátu. Existují dvě isoformy tohoto enzymu, které katalyzují stejnou reakci, ale mají odlišnou lokalizaci. PCK1 se nachází v cytosolu a PCK2

v mitochondriích (Escos et al., 2016). Další enzym stimulující glyceroneogenezi je pyruvátdehydrogenasakinasa (PDK4), která inhibuje pyruvátdehydrogenasový komplex, a blokuje tak přeměnu pyruvátu na acetyl-Coa. Pyruvát může být následně použit pro glyceroneogenezi. Genová exprese PCK a PDK4 je regulována transkripčním faktorem PPAR γ (Cadoudal et al., 2008, Tontonoz et al., 1995).

2.1.3 Inzulínová rezistence

Inzulín patří mezi hlavní regulátory glukózového a lipidového metabolismu. Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, inzulín je syntetizovaný β -buňkami pankreatu v odpovědi na zvýšenou hladinu glukózy v krvi. Účinek je zprostředkován přes inzulínový receptor z třídy tyrosinkinasových receptorů. Vazbou ligandu prochází receptor konformační změnou, která vede k autofosforylaci tyrosinových zbytků na intracelulární doméně receptoru. Autofosforylace umožní přenos signálu pomocí adaptorového proteinu IRS1 (*insulin receptor substrate 1*). IRS1 aktivuje signální kaskádu zahrnující fosfatidylinositol-3 kinasu a proteinkinasu B, které zprostředkovávají většinu metabolických efektů inzulínu (De Meyts, 2000).

Inzulín působí primárně na zvýšený příjem glukózy okolními tkáněmi, který je zprostředkován transportem GLUT4 na plazmatickou membránu, zejména u svalové a tukové tkáně. Ve svalové tkáni inzulín stimuluje syntézu glykogenu případně MK, zatímco v TT primárně stimuluje syntézu MK a inhibuje lipolýzu. V jaterní tkáni inzulín stimuluje syntézu glykogenu a MK a naopak blokuje glukoneogenezi a glykogenolýzu.

Inzulínová rezistence (IR) je definována jako stav, při němž normální hladina inzulínu v plazmě vyvolává nižší biologickou odpověď organismu. Jedním z rizikových faktorů pro vznik IR je obezita a s ní související dysfunkční TT. V rámci expanze TT při obezitě dochází k nadměrnému zvětšování adipocytů, které pozitivně koreluje s IR. V těchto adipocytech dochází ke snížené translokaci GLUT4 na plazmatickou membránu, a tudíž sníženému vylučování glukózy z krve po stimulaci inzulínem, a zároveň není dostatečně inhibována lipolýza (Arner and Langin, 2014). Tyto skutečnosti ve výsledku vedou ke zvýšeným hladinám volných MK v krvi, které se následně ukládají v podobě ektopického tuku (Morigny et al., 2016). Asociace hypertrofických adipocytů s IR byla prokázána i u lidí s normální váhou, což potvrzuje důležitost velikosti adipocytů, jakožto parametru ovlivňujícího metabolické zdraví (Arner et al., 2011). Akumulace lipidů v kosterních svalech a játrech pak zhoršuje jejich citlivost k inzulínu, čímž dochází k dysregulaci glukózového metabolismu v těchto tkáních a k dalšímu rozvoji inzulínové rezistence (Banerji et al., 1995, Pan et al., 1997).

2.1.4 Endokrinní funkce tukové tkáně

V roce 1994 byl objeven první hormon sekretovaný TT – leptin (Zhang et al., 1994). Tento objev odstartoval nový směr ve výzkumu TT a záhy byly objeveny další biologicky aktivní látky sekretované TT, které se souhrnně označují jako adipokiny. Tyto molekuly působí lokálně i systémově, a ovlivňují tak nejenom samotnou TT, ale také jiné tkáně, zejména ve vztahu k regulaci energetického metabolismu. Například receptory pro již zmiňovaný leptin byly detekovány v mnoha různých tkáních (srdce, hypothalamus, tuková tkáň, slezina, atd.), což ukazuje na široké spektrum působení tohoto hormonu (Luoh et al., 1997). Jedním z důležitých cílů regulace pomocí leptinu je centrum sytosti a hladu v hypothalamu. Zde se nachází neurony vylučující orexigenní a anorexigenní peptidy, které ovlivňují stravovací chování. Leptin stimuluje expresi anorexigenního peptidu α -MSH (α -melanocyt stimulující hormon) a zároveň snižuje expresi orexigenních peptidů NPY (neuropeptid Y) a AGRP (*agouti-related peptide*). Tato zpětnovazebná smyčka napomáhá k udržení rovnováhy v příjmu a výdeji energie (Proenca et al., 2014). Vyšší hladiny leptinu tedy regulují negativně příjem energie a naopak pozitivně výdej energie, například prostřednictvím stimulace β -oxidace MK v kosterní svalovině (Minokoshi et al., 2002). Vzhledem k tomu, že obezita vzniká převahou energetického příjmu nad jejím výdejem, dalo by se předpokládat narušení tvorby leptinu u obézních lidí. Avšak obézní jedinci mají naopak často zvýšené hladiny leptinu v plazmě (Considine et al., 1996). Tento paradox pozorovaný u obézních lidí je vysvětlován sníženou citlivostí leptinových receptorů, která je označována jako leptinová rezistence. Mechanismus vzniku leptinové rezistence není zatím zcela znám, nicméně je popisováno několik dílčích mechanismů, jako například porucha v transportu leptinu přes hematoencefalickou bariéru nebo porucha v intracelulární transdukcii signálu z aktivovaného leptinového receptoru (Crujeiras et al., 2015).

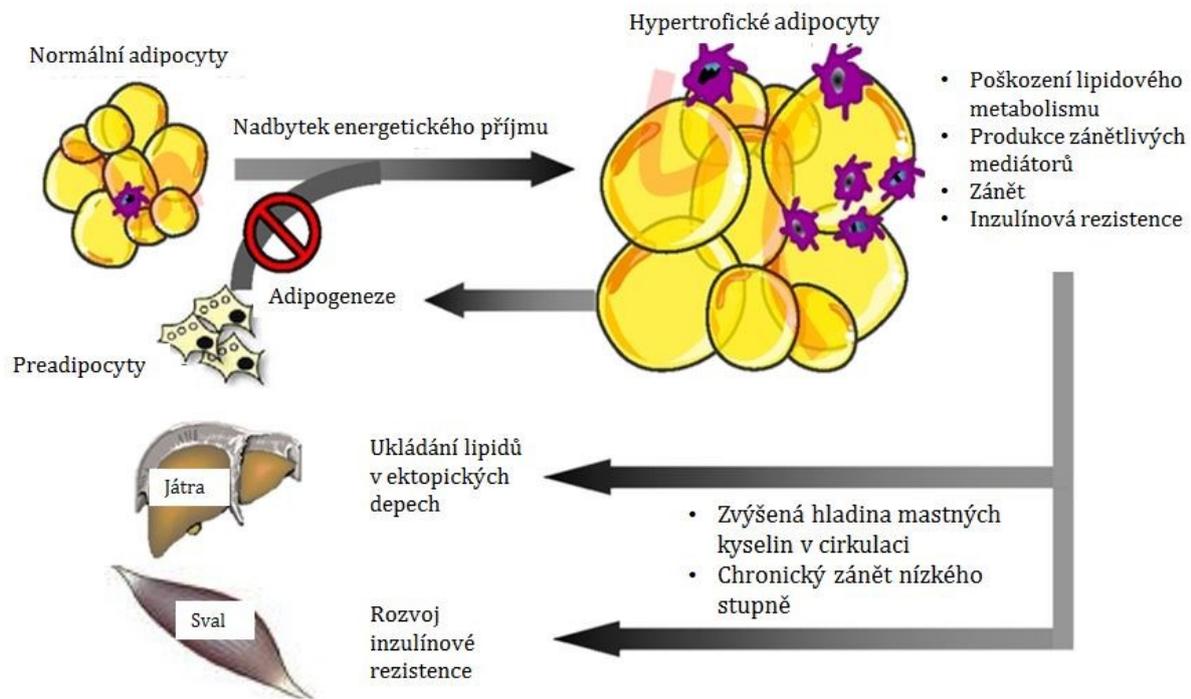
Dalším významným adipokinem je adiponektin, který je asociován se zlepšenou inzulinovou senzitivitou a jsou mu připisovány protizánětlivé a antiatherogenní účinky. U člověka je koncentrace adiponektinu v plazmě za fyziologických podmínek relativně vysoká (2 – 10 $\mu\text{g/ml}$) a na rozdíl od leptinu koreluje negativně s množstvím tukové tkáně (zejména s množstvím viscerální TT). Sekretovaný adiponektin má schopnost vytvářet různé oligomery pomocí disulfidických můstků. Nejčastěji vznikají trimery, hexamery a oligomerní komplexy s vysokou molekulární hmotností složené z 12-18 podjednotek, z nichž největší biologickou aktivitu mají oligomerní komplexy (Brochu-Gaudreau et al., 2010). Účinek adiponektinu je zprostředkován skrze vazbu na své receptory – AdipoR1 a AdipoR2. AdipoR1 je nejvíce exprimován v kosterních svalech, zatímco AdipoR2 je lokalizován

dominantně v játrech. Aktivované adiponektinové receptory stimulují AMP-aktivovanou proteinovou kinasu (AMPK) a peroxizomálními proliferátory aktivovaný receptor α (PPAR α), jejichž působením dochází ke zvýšení oxidace MK a vychytávání glukózy z cirkulace. Výše popsané účinky adiponektinu jsou považovány za jeden z mechanismů, kterými tento adipokin zlepšuje inzulínovou senzitivitu (Yamauchi et al., 2003). Již zmiňovaný protizánětlivý efekt adiponektinu zahrnuje například snížení exprese zánětlivých cytokinů TNF α (tumor-nekrotizující faktor α) a IL6 (interleukin 6) v makrofázích či naopak zvýšenou produkci protizánětlivého cytokinu IL10 (Wulster-Radcliffe et al., 2004).

Imunitní buňky v TT i adipocyty samy sekretují také celou řadu cytokinů, jako jsou TNF α , MCP1 (monocytární chemoatraktivní protein 1), interleukiny (IL1, IL6, IL8, IL10) či některé faktory komplementu (fibrinogen, komplementový faktor 3, inhibitor aktivátoru plazminogenu 1). Cytokiny v TT nezprostředkovávají pouze imunitní reakce, ale zřejmě zasahují též do regulace energetického metabolismu. Například TNF α snižuje vychytávání glukózy a MK z cirkulace snižováním aktivity LPL a redukcí exprese GLUT4. Dále ovlivňuje také inzulínovou signalizaci regulací fosforylace inzulínového receptoru a proteinu v následné inzulínové signalizační kaskádě IRS1. Zároveň byl pozorován pozitivní efekt TNF α na stimulaci HSL (Coppack, 2001). Lipolýzu a β -oxidaci MK stimuluje také IL6 (van Hall et al., 2003).

Při nadměrné akumulaci tukové tkáně nebo také vlivem stárnutí dochází k dysregulaci sekreční funkce TT. Obézní lidé a senioři mají dlouhodobě zvýšenou hladinu prozánětlivých mediátorů v krvi. Tento stav se označuje jako chronický zánět nízkého stupně a je asociován s různými zdravotními komplikacemi. Bylo zjištěno, že chronický zánět nízkého stupně přispívá k inzulínové rezistenci a zvyšuje riziko rozvoje cukrovky 2. typu, metabolického syndromu (Laaksonen et al., 2004) a kardiovaskulárních onemocnění (Ridker et al., 2000). V důsledku masivního nárůstu TT dochází u obézních k rozvoji hypertrofických adipocytů, které sekretují zánětlivé mediátory a chemoatraktanty stimulující migraci periferních monocytů do TT. Infiltrované makrofágy se následně stávají dalším významným zdrojem zánětlivých mediátorů (Bai and Sun, 2015). V souvislosti se zvýšeným množstvím imunitních buněk v TT byly pozorovány tzv. struktury podobné koruně (CLS, *crown like structures*), které vznikají shlukováním makrofágů kolem nekrotických adipocytů. Množství těchto struktur je výrazně vyšší u obézních jedinců ve srovnání se štíhlými (Cinti et al., 2005). Relativně nedávno bylo zjištěno, že akumulace makrofágů v TT při obezitě je dána

také proliferací makrofágů rezidujících v TT a že tato proliferace dokonce předchází migraci periferních monocytů do TT (Zheng et al., 2016).



Obrázek 5: Dysfunkce tukové tkáně přispívající k rozvoji inzulinové rezistence a chronického zánětu nízkého stupně při obezitě

Bližší popis v textu (kapitola o inzulinové rezistenci a endokrinní funkci TT). Převzato a upraveno z (Goossens and Blaak, 2015).

2.2 Charakteristika tukové tkáně u seniorů

Jedna z typických změn doprovázející stárnutí je změna kompozice těla, během níž ubývá zastoupení svalové hmoty ve prospěch tukové tkáně. TT pak sama o sobě prochází řadou změn, jako je například redistribuce TT, změna sekreční aktivity, snížená adipogeneze, poruchy metabolické funkce TT, redukce hnědého tuku či změna zastoupení imunitních buněk v rámci TT (Tchkonina et al., 2010).

Ve stáří převažuje ukládání energetických zásob v abdominální oblasti, a to zejména ve viscerálních tukových depech. Adipocyty podkožní tukové tkáně mají zřejmě sníženou schopnost ukládat MK, což vede ke zvýšení koncentrace MK v cirkulaci a ke vzniku ektopických uložišť tuku zejména v kosterní svalovině, játrech, srdci a kostní dřeni. Tyto změny mají negativní dopad na zdraví seniorů. Jedná se například o zhoršenou funkčnost svalů, a tedy i pohyblivost seniorů, zvýšené riziko zlomenin a kardiovaskulárních

onemocnění, či poruchy energetického metabolismu (Kuk et al., 2009). DeNino a kol. ve své studii potvrdili s věkem se zvyšující nárůst tukové tkáně v abdominální oblasti, který byl zároveň asociován se sníženou inzulínovou senzitivitou (DeNino et al., 2001).

Jak už bylo zmíněno v kapitole o endokrinní funkci TT, ve stáří dochází k rozvoji chronického zánětu nízkého stupně, k němuž pravděpodobně přispívá TT. O chronickém zánětu nízkého stupně spojeného s obezitou už bylo zjištěno mnoho faktů, naproti tomu systémový zánět u seniorů není zatím příliš probádán. Zdá se, že jsou mechanismy vzniku tohoto zánětu nízkého stupně u obézních lidí a u seniorů odlišné. Například dodnes není zcela jasný původ prozánětlivých mediátorů u seniorů. Lumeng a kol. objevili, že hlavním zdrojem TNF α u starých myší jsou makrofágy tukové tkáně a primárním zdrojem IL6 jsou preadipocyty a fibroblasty (Lumeng et al., 2011). Sekrece prozánětlivých mediátorů adipocyty se naopak příliš nelišila mezi mladými a starými myši, což naznačuje, že adipocyty se zřejmě významně nepodílí na rozvoji systémového zánětu u seniorů. Na rozdíl od zvýšené infiltrace makrofágů do viscerální TT popisované u obezity nebyl v této studii pozorován nárůst počtu makrofágů ve viscerální TT u starých myší proti mladým (počet makrofágů vztažen na množství viscerální TT). Avšak zaznamenali u starých myší fenotypovou změnu makrofágů viscerální tukové tkáně směrem k prozánětlivému typu (Lumeng et al., 2011). V jiné nedávné studii byla objevena zvýšená akumulace senescentních buněk v primárních kulturách z preadipocytů izolovaných z TT zdravých starých dobrovolníků ve srovnání s preadipocytů izolovanými z mladých subjektů (Xu et al., 2015). Zároveň bylo zjištěno, že tyto senescentní buňky sekretují velké množství prozánětlivých mediátorů, a podílejí se tedy zřejmě na věkem indukovaném chronickém zánětu nízkého stupně.

Stárnutí je asociováno se sníženou schopností preadipocytů replikovat se a dozrávat ve zralé adipocyty (Caso et al., 2013). V preadipocytech izolovaných z TT starých lidí byla zjištěna snížená genová exprese transkripčního faktoru PPAR γ ve srovnání s preadipocytů mladých lidí (Schipper et al., 2008). Na myších modelech byla objevena také nižší exprese transkripčního faktoru C/EBP α s rostoucím věkem (Karagiannides et al., 2001). Lze tedy předpokládat, že jednou z příčin zhoršené funkce TT u seniorů je její snížená schopnost adipogeneze. Dalším negativním projevem této zhoršené adipogenní aktivity může být zvětšování stávajících buněk. Množství hypertrofických adipocytů u obézních lidí je spojováno s inzulínovou rezistencí či cukrovkou 2. typu (Skurk et al., 2007). Bylo prokázáno, že velikost adipocytů pozitivně koreluje s inzulínovou rezistencí a výskytem cukrovky 2. typu i u lidí s normální vahou, a je tak jedním z prediktorů rizika rozvoje cukrovky 2. typu

(Acosta et al., 2016). S ohledem na přítomnost chronického zánětu nízkého stupně u seniorů by se dalo předpokládat, že během stárnutí bude také docházet ke zvětšování adipocytů a ke zvýšené sekreci prozánětlivých modulátorů dysfunkční tukovou tkání, nicméně toto zatím prokázáno nebylo. V současné době je jen velmi málo publikovaných studií zabývajících se velikostmi adipocytů u seniorů, a jejich výsledky jsou nejednoznačné. Například ve studii z roku 1989 nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v průměrné velikosti adipocytů izolovaných z mladých a starších mužů (Lonnqvist et al., 1990). Naproti tomu ve studii z loňského roku, ve které byly porovnávány skupiny potkanů starých tři týdny a čtyřicet dva týdnů, byla průměrná velikost adipocytů signifikantně větší u starých potkanů (Bonzon-Kulichenko et al., 2018).

Během stárnutí dochází také ke změnám v energetickém metabolismu. Nezbytným předpokladem pro udržení energetické homeostáze je schopnost organismu adekvátně reagovat na aktuální energetické potřeby. S přibývajícím věkem ovšem metabolická flexibilita klesá. U starých lidí byla zjištěna zhoršená lipolytická odpověď na katecholaminy, které signalizují potřebu uvolňovat energetické substráty z TT, například během hladovění nebo při fyzické aktivitě (Lonnqvist et al., 1990). Zároveň zřejmě ve stáří dochází ke snížené reesterifikaci MK a tedy ke zhoršené regulaci hladiny MK v krvi pomocí cyklování TAG a MK. Snížená reesterifikace MK pozorovaná u starých myší korelovala se sníženým množstvím enzymu PCK1 v epididimální TT (Mennes et al., 2014).

Efekt stárnutí na lipogenezi je relativně málo prozkoumán a obzvláště chybí studie provedené na lidech. Zhoršené schopnosti ukládat tuky ve stáří nasvědčují některé studie na zvířecích modelech. V perireální TT starých potkanů byla zjištěna snížená genová exprese transkripčního faktoru SREBP-1c ve srovnání s mladými potkany (Nogalska et al., 2005). SREBP-1c reguluje expresi lipogenních enzymů jako například FAS a ACC, jejichž exprese v TT byla také snížena u starých potkanů. U starých potkanů byla dále pozorována zvýšená exprese leptinu, která korelovala se sníženou expresí SREBP-1c. Tyto výsledky vedly k hypotéze o potenciálním inhibičním efektu leptinu na expresi SREBP-1c. V rozporu s touto hypotézou jsou však studie poukazující na rozvoj leptinové rezistence s přibývajícím věkem (Wang et al., 2001).

Mitochondrie jsou orgány úzce související s energetickým metabolismem. Ve stáří klesá jejich biogeneze a dochází k poškození některých mitochondriálních funkcí. Mezi mitochondriální změny asociované s věkem patří například zvýšená produkce volných kyslíkových radikálů a snížená aktivita enzymatických komplexů dýchacího řetězce, která vede mimo jiné k nižší produkci ATP (Boengler et al., 2017). Poškození mitochondriální

biogeneze souvisí se sníženou aktivitou NAD⁺ dependentní deacetylasy – sirtuin 1 (SIRT1), ke které přispívá úbytek NAD⁺ ve stáří (Braidý et al., 2011, Yuan et al., 2016). SIRT1 aktivuje hlavní regulátor mitochondriální biogeneze PGC1 α prostřednictvím deacetylace jeho lyzinových zbytků. Aktivovaný PGC1 α interaguje například s transkripčním faktorem NRF1 (*nuclear respiratory factor 1*), který stimuluje expresi proteinů dýchacího řetězce. PGC1 α je také koaktivátorem PPAR γ , jehož exprese je esenciální pro diferenciaci adipocytů (Scarpulla, 2011). SIRT1 dále ovlivňuje míru mitochondriální biogeneze downregulací hypoxií-indukovaného faktoru 1 α (HIF-1 α). HIF-1 α katalyzuje reakce vedoucí k inhibici exprese mitochondriálního transkripčního faktoru A (TFAM), jehož funkcí je udržování mitochondriální DNA (stabilita mtDNA, tvorba nucleoidů, regulace počtu kopií mtDNA) (Imai and Guarente, 2014, Kang et al., 2007). Ve stáří tedy vede pokles aktivity SIRT1 k akumulaci HIF-1 α a tento pseudohypoxický stav působí negativně na mitochondriální biogenezi. Dalším zajímavým místem působení SIRT1 v souvislosti s metabolismem a tukovou tkání je vliv na hnědnutí adipocytů. Khanh a kol. se ve své nedávno publikované studii zabývali efektem stárnutí a s ním souvisejícím poklesem exprese SIRT1 na schopnost mesenchymálních kmenových buněk izolovaných z lidské TT diferenciovat v běžové adipocyty (Khanh et al., 2018). Získané výsledky ukazují na sníženou schopnost hnědnutí adipocytů u starých lidí. Navíc indukce exprese SIRT1 v MSC izolovaných z TT starých lidí vedla k signifikantnímu zvýšení tvorby běžových adipocytů, což naznačuje pozitivní vliv SIRT1 na hnědnutí adipocytů, a naopak poukazuje na souvislost mezi poklesem SIRT1 a sníženou schopností MSC diferenciovat v běžové adipocyty (Khanh et al., 2018). Na věku závislý pokles schopnosti indukovat hnědnutí adipocytů byl pozorován i na myších, kterým byl injekčně podáván syntetický agonista β 3-adrenergních receptorů po dobu jednoho týdne. β 3-adrenergní stimulace vedla ke srovnatelné aktivaci hnědé tukové tkáně u mladých i starých myší, avšak indukce běžových adipocytů byla signifikantně snížena u starých myší (Shin et al., 2017). Nicméně výsledky získané na myších modelech nelze jednoduše používat pro vysvětlení lidské fyziologie a patofyziologie. Konkrétně v oblasti výzkumu hnědé TT a indukce běžových adipocytů byla objevena celá řada odlišností mezi lidmi a myšími modely. Například exprese genů souvisejících s hnědnutím adipocytů byla u lidí vyšší ve viscerální TT než v subkutánní a u myší tomu bylo právě naopak (Zuriaga et al., 2017). Dalším příkladem je schopnost pohybové aktivity indukovat hnědnutí adipocytů u myší, která ovšem nebyla pozorována u lidí. Již zmiňovaná studie Khanha má taktéž své limity, a to zejména v počtu zkoumaných subjektů (4 lidi v každé skupině). Zároveň zde byly porovnávány MSC získané z TT starých lidí ve věku od 70 do 80 let a dětí starých 1 až 11

měsíců, a chybí skupina dospělých jedinců. Tudíž nelze vyloučit, že pozorované rozdíly odráží spíše zvýšenou schopnost hnědnutí adipocytů u dětí, než pokles této schopnosti u starších lidí. Do budoucna tedy bude třeba provést další studie zabývající se vlivem věku na hnědnutí adipocytů u lidí.

2.3 Vliv pravidelné pohybové aktivity na charakteristiky TT u seniorů

Pravidelná pohybová aktivita patří ke zdravému životnímu stylu lidí všech věkových skupin. Zlepšuje fyzickou zdatnost, což je obzvláště u starších lidí velmi důležité (Todde et al., 2016). Pravidelná pohybová aktivita brání věkem indukovanému úbytku kosterní svaloviny a snížení její funkčnosti (Strasser et al., 2009). Zároveň bylo zjištěno, že cvičební intervence u seniorů snižuje celkové množství tukové hmoty (Steele et al., 2017) i ektopického tuku v játrech (Taniguchi et al., 2016). Tyto pozitivní účinky na tělesnou kompozici seniorů však zřejmě nevyvolávají volnočasové aktivity, jako jsou procházky a práce na zahrádce, nýbrž je třeba fyzická aktivita o vyšší intenzitě (Raguso et al., 2006).

V několika studiích bylo ukázáno, že po absolvování několikaměsíční cvičební intervence měli senioři vyšší inzulínovou senzitivitu a její zlepšení silně korelovalo s váhovým úbytkem subjektů, respektive s redukcí tukové hmoty (Ko et al., 2016, Mason et al., 2011). Lze se tedy domnívat, že pohybová aktivita zlepšuje inzulínovou senzitivitu především změnou tělesné kompozice. Toto potvrzuje i studie, ve které nedošlo po dvanáctiměsíční cvičební intervenci u postmenopauzálních žen k úbytku tukové hmoty ani ke zlepšení inzulínové senzitivity (van Gemert et al., 2015).

Kromě množství tukové tkáně ovlivňuje inzulínovou senzitivitu také velikost adipocytů. Bylo prokázáno, že hypertrofické adipocyty pozitivně korelují s inzulínovou rezistencí (Acosta et al., 2016). Jedním ze způsobů, jak může být ovlivněna velikost adipocytů je zřejmě i pohybová aktivita, jelikož u potkanů s normální váhou (Miyazaki et al., 2010) i s obezitou (Giles et al., 2016) bylo pozorováno snížení velikosti podkožních adipocytů po cvičební intervenci. Výsledky lidských studií však nejsou jednoznačné. Po dvanáctitýdenní cvičební intervenci nedošlo ke změně distribuce velikosti adipocytů u obézních mužů (Stinkens et al., 2018), a žádný efekt na velikost adipocytů nebyl zjištěn ani u dlouhodobě trénovaných obézních mužů ve srovnání s netrénovanými (Van Pelt et al., 2017). Naproti tomu u obézních žen bylo po pětíměsíční cvičební intervenci pozorováno snížení průměrné velikosti adipocytů (You et al., 2006). Bude tedy třeba dalších studií k lepšímu pochopení efektu pohybové aktivity na velikost adipocytů u lidí. V současné době také nejsou publikovány žádné články, které by se zabývaly touto problematikou u zdravých neobézních seniorů.

V předešlé kapitole je zmíněno, že stárnutí je asociováno se sníženou schopností preadipocytů replikovat se a dozrávat ve zralé adipocyty a že v preadipocytech starších lidí je snížená exprese genu pro hlavní adipogenní faktor PPAR γ . Efekt cvičení na sníženou adipogenezi TT u seniorů zatím nebyl prozkoumán. Genová exprese PPAR γ v TT byla analyzována u obézních mladých myší (Li et al., 2014). Autoři uvádějí, že po osmitýdenním cvičebním tréninku došlo k nárůstu exprese PPAR γ . Obdobné výsledky byly zjištěny i u dospělých lidí po čtyřtýdenní cvičební intervenci (Ruschke et al., 2010).

U starších lidí vzniká často systémový chronický zánět nízkého stupně. Bylo prokázáno, že pravidelná pohybová aktivita snižuje u seniorů hladinu IL6 a CRP (C-reaktivní protein) v krvi (Monteiro-Junior et al., 2018, Nicklas et al., 2008). Otázkou je, zda ke snížení zánětlivých cytokinů v cirkulaci u trénovaných seniorů přispívá změna sekreční aktivity TT nebo je to dáno jiným mechanismem. Analýza genové exprese v TT naznačuje spíše jiný mechanismus redukce chronického zánětu u seniorů, než je snížená exprese zánětlivých cytokinů v TT. U starších lidí s lehkou obezitou nebyla pozorována změna mRNA exprese IL6 v TT po šestiměsíční cvičební intervenci (Campbell et al., 2013). Zároveň autoři nezaznamenali ani efekt pohybové aktivity na expresi genů kódujících leptin, adiponektin a MCP1.

Vliv pravidelné pohybové aktivity na energetický metabolismus TT u seniorů není zatím příliš prozkoumán. Studie zabývající se tímto tématem jsou zaměřené spíše na obézní jedince, u kterých se předpokládá významné ovlivnění charakteristik TT pohybovou aktivitou. U seniorů se naproti tomu zkoumá zejména vliv pohybové aktivity na energetický metabolismus buněk kosterní a srdeční svaloviny.

Na úrovni sekrece glycerolu podkožní TT bylo již dříve zjištěno, že dlouhodobá pohybová aktivita zvyšuje u obézních mužů lipolytickou odpověď na hormonální stimulaci, a naopak snižuje míru bazální lipolýzy (De Glisezinski et al., 1998, Stich et al., 1999). U senierek, které podstoupily dvanáctitýdenní cvičební intervenci, nebyl pozorován žádný rozdíl v bazální lipolýze stanovené pomocí koncentrace glycerolu v intersticiální tekutině podkožní TT (Lange et al., 2001). Na rozdíl od obézních jedinců nebyl tedy u seniorů zjištěn vliv pravidelné pohybové aktivity na bazální lipolýzu. Ovlivnění lipolýzy fyzickou aktivitou bylo pozorováno také na úrovni exprese lipolytických genů. Trénovaní potkani měli v porovnání s netrénovanými zvýšenou expresi genů CGI58 a ATGL (Ramos et al., 2016). Dále byla zjištěna zvýšená míra cyklu lipolýzy/reesterifikace MK u vytrvalostně trénovaných cyklistů proti netrénované kontrolní skupině (Romijn et al., 1993). V jiné studii byla u mladých trénovaných mužů ve srovnání s netrénovanými muži pozorována zvýšená mRNA

exprese genů účastnících se glyceroneogeneze (PCK1 a PDK4) (Bertholdt et al., 2018). Vzhledem k tomu, že dostupnost glycerol-3-fosfátu určuje rychlost reesterifikace MK, může vést nárůst exprese PCK1 a PDK4 ke stimulaci reesterifikace MK.

Vliv pohybové aktivity na lipogenezi byl zatím zkoumán zejména na úrovni genové exprese. U obézních myší snižovalo cvičení mRNA expresi regulátorů lipogeneze (SREBP-1c, CHREBP), enzymů *de novo* lipogeneze (FAS, ACC) a syntézy TAG (DGAT1, DGAT2) v retroperitoneální TT (Giles et al., 2016). V souladu s těmito výsledky byla studie, ve které došlo k poklesu exprese genů SREBF1 a FAS v podkožní TT u obézních lidí po třítydenní cvičební intervenci a kalorické restrikci (Walhin et al., 2016).

Jak bylo popsáno v předešlé kapitole, stáří je spojené se sníženou mitochondriální biogenezí a se vznikem mitochondriálních dysfunkcí. Studie na myších modelech popisují pozitivní účinek tréninku na mitochondriální biogenezi a aktivitu. Například byla pozorována zvýšená genová exprese PGC1 α , NRF1, TFAM a zvýšená spotřeba kyslíku (měřená pomocí respirometrie) v podkožní TT u trénovaných myší (Lehnig et al., 2019, Stanford et al., 2015). U lidí jsou prezentovány odlišné výsledky exprese genů souvisejících s mitochondriální biogenezí v TT. U zdravých mladých mužů nedošlo ke změně mRNA exprese PGC1 α v TT po osmi týdnech cvičební intervence, a exprese SIRT1, který mimo jiné aktivuje PGC1 α , klesla (Alvehus et al., 2014). U obézních jedinců cvičební intervence naopak vedla k nárůstu mRNA exprese SIRT1 v TT (Rappou et al., 2016). V souladu s výsledky na myších modelech jsou studie zabývající se vlivem cvičení na aktivitu respiračního řetězce a oxidativní fosforylace u zdravých dospělých mužů. Trénovaní muži s normální vahou až nadváhou měli zvýšenou genovou (Ronn et al., 2014) i proteinovou (Bertholdt et al., 2018) expresi enzymů respiračního řetězce a oxidativní fosforylace. Naproti tomu cvičební intervence u obézních lidí byla bez efektu na expresi těchto proteinů (Stinkens et al., 2018). Dalším důležitým metabolickým dějem lokalizovaným v mitochondriích je β -oxidace MK. Zda pohybová aktivita ovlivňuje β -oxidaci MK v TT, a popřípadě jakým způsobem, není zatím zcela jasné. U obézních myší zabraňovalo cvičení snížené expresi genu ACOX1 (acyl-CoA oxidasa 1 – katalyzuje první reakci β -oxidaci MK), která byla pozorována u kontrolní necvičící skupiny (Bae, 2018), zatímco u lidí s nadváhou nebyl pozorován žádný efekt cvičební intervence na β -oxidaci MK (Larsen et al., 2015).

S energetickým metabolismem v TT souvisí také proces hnědnutí adipocytů, v rámci něhož vznikají béžové adipocyty, které jsou v porovnání s bílými více metabolicky aktivní. U myší je známo, že pohybová aktivita stimuluje tento proces v podkožní TT (Stanford et al.,

2015). Naproti tomu u lidí nebyl zaznamenán žádný vliv pohybové aktivity na hnědnutí adipocytů v podkožní TT (Dinas et al., 2017, Nakhuda et al., 2016, Tsiloulis et al., 2018).

3. Cíle diplomové práce

Tato diplomová práce byla vypracována na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy na Ústavu patofyziologie, konkrétně v Laboratoři patofyziologie tukové tkáně. Práce je součástí studie podporované grantem AZV ČR (Agentura pro zdravotnický výzkum České republiky) s názvem „Vliv pohybové aktivity a omega-3 mastných kyselin na metabolické zdraví a dysfunkci tukové tkáně u seniorů“ (EXODYA – *Effect of exercise training and omega-3 fatty acids on metabolic health and dysfunction of adipose tissue in elderly*). Cílem studie je objasnit, zda pozitivní účinky pravidelné pohybové aktivity na metabolický stav u seniorů souvisí s modulací funkcí tukové tkáně. Zkoumány jsou jak změny v metabolických funkcích TT, tak změny v jejím imunitním stavu. Této studii se účastní celkem 88 seniorek, které jsou rozděleny do dvou skupin podle míry trénovanosti. První část studie se zabývá efektem dlouhodobého tréninku a je koncipována jako průřezová studie, ve které je porovnávána skupina seniorek s pravidelnou pohybovou aktivitou a skupina netréovaných seniorek. V rámci druhé části studie je sledován efekt čtyřměsíčního tréninku na skupině netréovaných seniorek. Část z nich navíc užívala omega-3 polynenasycené mastné kyseliny, jejichž účinek je také studován.

Tato diplomová práce se zabývá vlivem dlouhodobého tréninku na metabolické zdraví seniorů v souvislosti s charakteristikami TT.

Specifické cíle:

1. Zhodnotit vliv pravidelné pohybové aktivity na biochemické a antropometrické parametry u seniorek
2. Charakterizovat distribuci velikosti adipocytů u trénované a netréované skupiny seniorek
3. V TT trénovaných a netréovaných seniorek stanovit expresi genů souvisejících s energetickým metabolismem, adipogenezí a produkcí adipokinů tukovou tkání.
4. Porovnat expresi několika vybraných genů v TT a v izolovaných adipocytech u trénovaných a netréovaných seniorek
5. Na úrovni sekrece metabolitů (glycerol, NEFA) zhodnotit vliv pravidelné pohybové aktivity na bazální a stimulovanou lipolýzu
6. Výsledky získané v rámci analýzy genové exprese a sekrece metabolitů korelovat s parametry fyzické zdatnosti, metabolického zdraví (inzulínová senzitivita) a s distribucí velikosti adipocytů.

4. Metodiky

4.1 Charakteristika subjektů

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, náplň této práce byla součástí grantu AZV ČR 16-29182A-EXODYA. Do této studie bylo zařazeno celkem 88 žen ve věku od 60 do 80 let. Vyřazovací kritéria byla: diabetes mellitus, jaterní nebo renální onemocnění, onkologické onemocnění (i prodělané v minulosti), neléčená abnormální funkce štítné žlázy, dlouhodobě užívané protizánětlivé léky (antirevmatika, analgetika působící na cyklooxygenasu), steroidní a omega-3 suplementace. Studie je provedena v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Dobrovolnice před vstupem do studie podepsaly informovaný souhlas.

V rámci této diplomové práce byla srovnávána skupina 27 dlouhodobě trénovaných a 27 netrénovaných senierek. Rekrutování do studie a do jednotlivých skupin proběhlo pomocí písemných dotazníků, finální zařazení do skupin (trénované / netrénované) pak bylo provedeno na základě zátěžových testů a terénních testů zdatnosti (viz kapitola 4.1.1). U těchto subjektů byla provedena klinická vyšetření ve spolupráci s lékaři z 3. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. V této práci pak byla analyzována séra získaná při odběrech krve a podkožní tuková tkáň získaná pomocí jehlové biopsie z abdominální oblasti.

4.1.1 Klinická vyšetření

Klinická vyšetření byla provedena ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady (FNKV). Dobrovolnice zde absolvovaly antropometrická měření, test inzulínové senzitivity, odběr krve na lačno a jehlovou biopsii podkožního tuku v abdominální oblasti. Zátěžové testy a terénní testy zdatnosti („seniortesty“) byly provedeny v Institutu sportovního lékařství ve spolupráci s Fakultou tělesné výchovy a sportu.

a) Testy fyzické zdatnosti

Ženy byly rozděleny do dvou skupin (trénované a netrénované) na základě testů fyzické zdatnosti. Tyto testy zahrnovaly měření maximální spotřeby kyslíku při zátěži a dále speciální testy pro seniory, jejichž cílem je zhodnotit určité parametry fyzické zdatnosti, jako je síla a vytrvalostní schopnosti.

Maximální spotřeba kyslíku byla stanovena spiroergometrií. Tato metoda se provádí na bicyklovém ergometru za současného použití speciální masky, která měří spotřebu kyslíku a množství vydechovaného oxidu uhličitého. Během zátěžového testu je měřeno rovněž EKG.

Pro zhodnocení fyzické zdatnosti senierek byly vybrány dva cviky z běžně používané testové baterie „*Senior Fitness Test (SFT)*“, kterou vytvořili R. E. Rikli a C. J. Jones (Web. 3). Pro posouzení síly dolních končetin byl použit „Test sed-vztyk“ ze židle, ve kterém je cílem udělat co nejvíce opakování během 30 sekund. „Test flexe v lokti“ vypovídá o síle horních končetin. Též je hodnocen podle počtu opakování za 30 sekund, přičemž jedinec zvedá činku vážící 2,3 kg. Pro výsledky jednotlivých testů byl vytvořen bodovací systém adjustovaný na věk, který umožňuje sjednotit všechny naměřené výsledky a vytvořit „Index zdatnosti“, podle kterého bylo upraveno rozdělení senierek do skupin.

b) Stanovení inzulínové senzitivity

U každé dobrovolnice byl vypočítán index inzulínové rezistence známý pod zkratkou HOMA IR (*Homeostatic model assessment for insulin resistance*). K výpočtu je třeba znát koncentraci inzulínu a glukózy v krvi odebrané ráno ve stavu na lačno.

$$HOMA\ IR = \frac{\text{koncentrace inzulínu} \left[\frac{mU}{l} \right] \cdot \text{koncentrace glukózy} \left[\frac{mmol}{l} \right]}{22,5}$$

Senzitivita k inzulínu byla hodnocena také podle výsledků získaných metodou hyperinzulinového euglykemického clampu. Princip této metody spočívá v měření množství glukózy potřebné pro udržení stálé glykémie při kontinuálním podávání infuze inzulínu. Čím více glukózy jedinec potřebuje pro vyrovnání účinku inzulínu, tím více je k inzulínu senzitivní. V tomto testu je vypočítáván parametr „Spotřeba glukózy (M_{kg})“, který je měřítkem účinku inzulínu. Vypočítává se z rovnovážného průtoku glukózy v posledních 30 – 40 minutách clampu dle vzorce:

$$M_{kg} = V_{glu}(\text{prům}) / K_{glu} \quad [mg \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}],$$

kde $V_{glu}(\text{prům})$ je průměrná rychlost infuze glukózy v daném časovém úseku [ml/hod] a K_{glu} je konstanta pro roztok glukózy vztažená k hmotnosti těla.

c) Biochemické vyšetření krve

Ze vzorků krve odebrané ženám ráno na lačno byly centrifugací získány séra a plazmy. Část z nich byla uskladněna v menších objemech při teplotě -80 °C pro pozdější analýzu. Druhá část byla odeslána do akreditované laboratoře (SPADIA LAB, a.s.) na stanovení biochemických parametrů. Takto byla stanovena glykémie a hladina inzulínu.

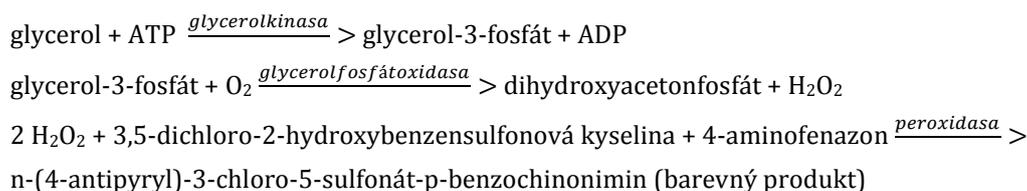
4.2 Analýza krevního séra

4.2.1 Stanovení koncentrace glycerolu a neesterifikovaných mastných kyselin v séru

Pro stanovení hladiny glycerolu a neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) v séru byly použity komerční analytické soupravy „RX Monza“ (Randox Laboratories, UK). Jedná se o spektrofotometrickou metodiku, jež je založena na Lambert-Beerově zákoně, podle kterého je přímá úměra mezi absorbancí a koncentrací roztoku při konstantní vlnové délce a tloušťce kyvety. Porovnáním absorbancí našeho vzorku se vzorkem o známé koncentraci zkoumané látky tedy můžeme vypočítat koncentraci této látky v našem vzorku. V případě, že chceme detekovat bezbarvé látky, musíme použít činidlo nebo chemickou reakci, které látku převedou na barevný produkt. Rozmražené vzorky séra byly po celou dobu analýzy udržovány na ledu.

a) Stanovení koncentrace glycerolu v krevním séru

Princip metody:

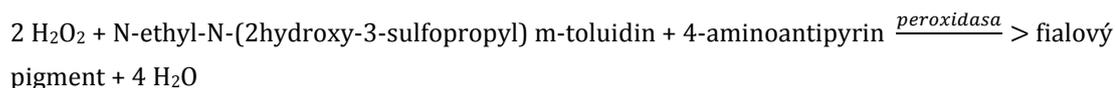
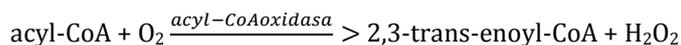
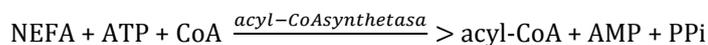


Nejdříve bylo připraveno reakční činidlo R1b rozpuštěním enzymů a substrátů popsanych výše v 15 ml pufru R1a. Následně bylo do 96-jamkové destičky přidáno 20 μl standardního roztoku glycerolu o koncentraci 100, 50, 25 $\mu\text{mol/l}$ a 20 μl redestilované vody. Absorbance těchto vzorků slouží k sestavení kalibrační křivky. Do destičky bylo dále přidáno dvakrát 20 μl od každého vzorku séra (naměřené absorbance technických duplikátů byly při vyhodnocování zprůměrovány). Na konec bylo ke vzorkům séra i kalibrační křivky přidáno 180 μl reakčního činidla R1b. Kvůli nejednotné barvě sér byl zároveň pro každý vzorek vytvořen blank, do nové 96-jamkové destičky bylo přidáno opět 20 μl od každého vzorku a k tomu bylo přidáno 180 μl bezbarvého pufru R1a. Kromě blanků pro jednotlivé vzorky byl vytvořen i tzv. standard blank (20 μl standardního roztoku glycerolu o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ a 180 μl pufru R1a). Destičky byly inkubovány při pokojové teplotě 10 minut a následně byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 520 nm. V rámci vyhodnocení výsledků byly od naměřených absorbancí jednotlivých vzorků odečteny absorbance příslušných blanků. Od kalibrační křivky byl odečten standard blank.

Z kalibrační křivky byla získána rovnice lineární regrese, z níž byla poté dopočítána koncentrace glycerolu v jednotlivých vzorcích.

b) Stanovení koncentrace NEFA v krevním séru

Princip metody:



Postup při měření koncentrace NEFA v séru je podobný výše popsané metodě stanovení glycerolu. Pro správnou posloupnost chemických reakcí se však při detekci NEFA používají dvě různá reakční činidla, která se ke vzorkům přidávají postupně (R1b: acyl-CoAsynthetasa, askorbátsynthetasa, CoA, ATP, 4-aminoantipyrin; R2c: acyl-CoAoxidasa, peroxidasa, TOOS). Do 96-jamkové destičky bylo přidáno 5 μl standardu o koncentraci 2, 1, 0,5 mmol/l a 5 μl redestilované vody pro sestavení kalibrační křivky. Jednotlivé vzorky byly pipetovány opět v duplikátech a zároveň byly změřeny také jejich blanky a standard blank. Do destičky s blanky bylo přidáno pouze 150 μl R1a pufru. Do druhé destičky bylo přidáno nejdříve 50 μl reakčního činidla R1b a po 10 minutách inkubace při 37 $^{\circ}\text{C}$ bylo přidáno ještě 100 μl reakčního činidla R2c. Po dalších 10 minutách inkubace při 37 $^{\circ}\text{C}$ byla změřena absorbance při vlnové délce 550 nm. Vyhodnocení naměřených hodnot bylo provedeno stejně jako u stanovení koncentrace glycerolu.

4.3 Analýza tukové tkáně

Podkožní tuk získaný jehlovou biopsií byl sterilně očištěn a následně rozdělen do zkumavek pro jednotlivé analýzy. V rámci této diplomové práce byla ve vzorcích TT měřena genová exprese a sekrece glycerolu v explantech z TT za bazálních podmínek a po stimulaci isoproterenolem. Další část tukové tkáně byla použita pro izolaci adipocytů, u kterých byla rovněž měřena genová exprese a dále byla analyzována velikost adipocytů.

4.3.1 Exprese genů v tukové tkáni

Izolace RNA z tukové tkáně

Z TT byla izolována celková RNA včetně microRNA pomocí metody guanidium thiokyanát-fenol-chloroformové extrakce. K tomu byl použit komerční izolační set

„miRNeasy Mini Kit“ (QIAGEN, Německo). Jako výchozího materiálu bylo využito 120 – 200 mg TT, která byla skladována v -80 °C. Izolace RNA byla prováděna v digestoři a byly použity špičky s filtrem.

Ke zmraženému vzorku byl přidán 1 ml lyzačního činidla, poté byl vzorek ihned homogenizován vrtákem a vzniklý homogenát inkubován 5 minut v pokojové teplotě. Tímto krokem došlo kromě rozrušení tkáně také k denaturaci proteinů a DNA. Následně bylo k homogenátu přidáno 200 µl chloroformu, celý vzorek byl důkladně promíchán, dále 3 minuty inkubován v pokojové teplotě a nakonec centrifugován při 12 000 G a 4 °C po dobu 15 minut. Centrifugací došlo k rozdělení homogenátu na horní vodnou fázi obsahující RNA, na mezifázi s DNA a proteiny a na spodní organickou fázi s lipidy. Vodná fáze byla opatrně odebrána do nové zkumavky, byl k ní přidán 100 % ethanol v poměru 1 : 1,5 (vodná fáze : ethanol) a vše důkladně promícháno. Následně byl vzorek aplikován na kolonku a centrifugován při 12 000 G v pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Filtrát byl odstraněn a kolonka, na které je již navázaná RNA, byla promyta nejdříve 700 µl pufru RWT a poté dvakrát 500 µl pufru RPE (centrifugace opět 12 000 G v pokojové teplotě po dobu 1 minuty). RNA byla z kolonky uvolněna 35 µl redestilované vody o teplotě 50 °C (centrifugace 12 000 G v pokojové teplotě po dobu 1 minuty). Koncentrace a čistota získané RNA byla změřena na spektrofotometru (Nanodrop 1000) při vlnové délce 230, 260 a 280 nm. Čistota RNA je určena poměrem absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm pro kontaminaci proteiny a poměrem absorbancí při vlnové délce 260 a 230 nm pro kontaminaci organickými látkami. RNA byla dále uchovávána v -80 °C.

Reverzní transkripce

RNA izolovaná z TT byla přepsána do molekul cDNA. V této diplomové práci byla použita komerční souprava „SuperScript IV Reverse Transcriptase“ (Invitrogen, USA) obsahující SuperScript IV reverzní transkriptasu (SSIV) i všechny další potřebné komponenty. Práce byla prováděna na ledu a opět byly použity špičky s filtry.

Rozmražené vzorky s RNA byly naředěny redestilovanou vodou tak, aby v 6 µl bylo 550 nebo 400 ng RNA (podle koncentrace RNA jednotlivých vzorků). Pro odstranění genomické DNA byly k naředěným vzorkům RNA přidány 4 µl směsi s DNasou z komerční soupravy „DNase I“ (Invitrogen, USA; složení viz Tabulka 1) a vzorky byly umístěny mimo led na 15 minut. Poté byl přidán 1 µl EDTA (také ze soupravy „DNase I“) a vzorky byly umístěny do termocykleru na 10 minut při teplotě 65 °C. Tímto krokem došlo k inaktivaci DNasy. Následně byly přidány 3 µl směsi náhodných hexamerů a deoxynukleotidů (složení viz

Tabulka 2) a vzorky byly opět umístěny do termocykleru na 5 minut při teplotě 65 °C. V této teplotě dochází k rozrušení sekundárních struktur molekul RNA a při závěrečném snižování teploty termocykleru na 4 °C se začínají hexamery vázat na RNA. Nakonec bylo ke vzorkům přidáno 7 µl směsi pro SSIV reverzní transkriptasu (složení viz Tabulka 3). Reverzní transkripce probíhala v termocykleru ve třech fázích po 10 minutách, nejdříve při teplotě 23 °C (vazba hexamerů na molekuly RNA), poté 52 °C (syntéza cDNA) a nakonec 80 °C (denaturace reverzní transkriptasy). Po ukončení programu byly vzorky cDNA naředěny redestilovanou vodou na koncentraci 4 ng/µl a uskladněny v -80 °C.

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro odstranění genomické DNA (na jednu reakci)

Komponenta	objem (µl)
DNasa pufr	1
dH ₂ O	2,5
DNasa I (1 U/µl)	0,5

Tabulka 2: Složení reakční směsi s deoxynukleotidy a náhodnými hexamery (na jednu reakci)

Komponenta	objem (µl)
náhodné hexamery	2
10mM dNTP mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)	1

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci (na jednu reakci)

Komponenta	objem (µl)
SSIV RT pufr	4
100 mM DTT	1
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1
SSVI reverzní transkriptasa (200 U/µl)	1

Preamplifikace a „Fluidigm chip“

Detekce genové exprese vybraných genů byla provedena pomocí metody „Fluidigm – The BioMark 96.96 Dynamic Array“, což je vysokokapacitní mnohonásobná qPCR (dále jen „Fluidigm chip“). Proti běžné qPCR (princip metody viz kapitola 4.4.3) je třeba cDNA nejdříve preamplifikovat, protože reakce na čipu probíhají ve velmi malých objemech.

Pro preamplifikaci cDNA byl použit komerční set „*TaqMan PreAmp Master Mix Kit*“ (Applied Biosystems, USA) a sondy „*TaqMan Gene Expression Assays*“ (Applied Biosystems, USA). Práce byla prováděna na ledu a byly použity špičky s filtry. Nejdříve byl namíchán Primer Mix, který obsahoval všech 96 sond stokrát nařaděných (celkový objem byl stanoven na základě počtu cDNA vzorků, které měly být preamplifikovány). Poté bylo do 96-jamkové destičky postupně přidáno 2,5 μ l všech vzorků cDNA o koncentraci 4 ng/ μ l, k tomu bylo přidáno 5 μ l Preamplifikačního Master Mixu a 2,5 μ l Primer Mixu. Nakonec byla destička zalepena fólií. Preamplifikace byla provedena na přístroji ABI7500 Real-Time PCR System a zahrnovala počáteční fázi denaturace, která se skládala z 2 minut při teplotě 50 °C a následných 10 minut při teplotě 95 °C. Poté následovalo 18 cyklů, během nichž se střídala fáze 15 sekund při 95 °C se čtyřminutovou fází při teplotě 59 °C. V rámci jednoho cyklu je nově vytvořená dvouvláknová DNA denaturována při 95 °C a při teplotě 59 °C jsou podle těchto jednovláknových templátů dosyntetizována druhá komplementární vlákna. Vzorky s preamplifikovanou cDNA byly nakonec dvacetkrát nařaděny redestilovanou vodou.

Finální PCR reakce vzorků na „*Fluidigm chipu*“ byla provedena v Biotechnologickém a biomedicínském centru Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci (BIOCEV) na přístroji „*BioMark Real-Time PCR System*“ (Fluidigm, USA). Tato metoda umožňuje na jednom čipu analyzovat až 96 genů v 96 různých vzorcích současně. V této práci byly analyzovány geny spojené s energetickým metabolismem, adipogenezí a sekreční aktivitou TT. Celkový seznam použitých sond je v Tabulce 4. Výstupem analýzy genové exprese na „*Fluidigm chipu*“ jsou stejně jako u polymerázové řetězové reakce hodnoty „*cycle treshold*“ – C_t (viz kapitola qPCR). Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech a výsledné hodnoty C_t byly zprůměrovány. Pro normalizaci dat byla u každého vzorku změřena zároveň exprese referenčních genů RPS13 a TBP. Z hodnot C_t referenčních genů byl vytvořen geometrický průměr, který byl následně odečten od všech analyzovaných genů (ΔC_t). Pro statistickou analýzu byla exprese genů vyjádřena jako $2^{-\Delta C_t}$ a pro grafické znázornění byla exprese vztažena k průměru kontrolní (netrénované) skupiny a vyjádřena tedy jako $\Delta \Delta C_t$.

Tabulka 4: Seznam použitých sond (TaqMan Gene Expression Assays) pro analýzu genové exprese v tukové tkáni

Zkratka genu	Název genu	ID sondy
ACC	<i>acetyl-CoA carboxylase alpha</i>	Hs01046047_m1
ACAT1	<i>acetyl-CoA acetyltransferase 1</i>	Hs00608002_m1
ACOX1	<i>acyl-CoA oxidase 1</i>	Hs01074241_m1
ADA	<i>adenosin deaminasa</i>	Hs01110945_m1
ADIPOQ	<i>adiponectin</i>	Hs00605917_m1
ADRA2A	<i>adrenoceptor α 2A</i>	Hs00265081_s1
ADRB1	<i>adrenoceptor β-1</i>	Hs02330048_s1
ADRB2	<i>adrenoceptor β-2</i>	Hs00240532_s1
ATGL	<i>patatin like phospholipase domain containing 2</i>	Hs00982040_g1
ATP50	<i>ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit</i>	Hs00426889_m1
CGI58	<i>abhydrolase domain containing 5 (comparative gene identification 58)</i>	Hs01104373_m1
CIDEA	<i>cell death-inducing DFFA-like effector a</i>	Hs00154455_m1
COX6C	<i>cytochrome c oxidase subunit 6C</i>	Hs00269977_m1
CPT1A	<i>carnitine palmitoyltransferase 1A</i>	Hs00912671_m1
DGAT1	<i>diacylglycerol O-acyltransferase 1</i>	Hs01017541_m1
DGAT2	<i>diacylglycerol O-acyltransferase 2</i>	Hs01045913_m1
ELOVL6	<i>ELOVL fatty acid elongase 6</i>	Hs00225412_m1
FABP4	<i>fatty acid binding protein 4</i>	Hs01086177_m1
FAS	<i>fatty acid synthase</i>	Hs01005622_m1
G0S2	<i>G0/G1 switch 2</i>	Hs00274783_s1
HSL	<i>hormone sensitive lipase</i>	Hs00943404_m1
CHREBP	<i>carbohydrate responsive element binding protein</i>	Hs00263027_m1
IL6	<i>interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>	Hs00985641_m1
IRS1	<i>insulin receptor substrate 1</i>	Hs00178563_m1
LEP	<i>leptin</i>	Hs00174877_m1
NRF1	<i>nuclear respiratory factor 1</i>	Hs00192316_m1
PCK2	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)</i>	Hs00388934_m1
PDK4	<i>pyruvate dehydrogenase kinase 4</i>	Hs01037712_m1
PGC1 α	<i>PPARγ coactivator 1 α</i>	Hs01016719_m1
PLIN1	<i>perilipin 1</i>	Hs00160173_m1
PPAR α	<i>peroxisome proliferator activated receptor α</i>	Hs00947539_m1
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator activated receptor γ</i>	Hs01115513_m1
RPS13	<i>ribosomal protein S13</i>	Hs01011487_g1
RUNX2	<i>runt related transcription factor 2</i>	Hs00231692_m1
SCD	<i>stearoyl-CoA desaturase</i>	Hs01682761_m1
SIRT1	<i>sirtuin 1</i>	Hs01009006_m1
SREBF1	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>	Hs01088691_m1
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>	Hs00427620_m1
UCP1	<i>uncoupling protein 1</i>	Hs00222453_m1
WISP2	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 2</i>	Hs00180242_m1

4.3.2 Sekrece glycerolu v explantech tukové tkáně

V den konání experimentu byly připraveny roztoky 0,5 % a 2 % BSA (bez volných mastných kyselin a endotoxinu) v pufru KRH (Krebs-Ringer bikarbonátový pufr + 125 mM HEPES). Pro vytvoření explantů byl použit přibližně 1 g čerstvě odebrané tukové tkáně, která byla nejdříve dvakrát promyta roztokem 0,5 % BSA vytemperovaným na 37 °C. Poté byl k TT přidán 1,5 ml roztoku 0,5 % BSA a vzorek byl inkubován po dobu jedné hodiny ve vodní lázni o teplotě 37 °C za stálého třepání. Tento krok slouží k odmytí proteinů a dalších interferujících faktorů z poškozených buněk. Po hodině byl roztok ze vzorku odsán a TT byla ještě jednou promyta roztokem 0,5 % BSA. Následně byla TT přenesena na síťku podloženou filtračním papírem, čímž byla odstraněna přebytečná tekutina. Vzorek byl rozdělen pomocí chirurgických nástrojů do 4 explantů o hmotnosti 100 ± 20 mg. Dále byl připraven roztok isoproterenolu o koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ smícháním 1 μl zásobního roztoku (koncentrace 1 mmol/l) s 1 ml roztoku 2 % BSA. Ke dvěma (kontrolním) explantům byl přidán roztok 2 % BSA, k dalším dvěma explantům byl přidán připravený roztok isoproterenolu pro β -adrenergní stimulaci. Roztoky byly přidány vždy v poměru 500 μl roztoku na 100 mg TT. Vzorky byly inkubovány 4 hodiny ve vodní lázni o teplotě 37 °C za stálého třepání. Po skončení inkubace byly vzorky krátce centrifugovány, umístěny na led a bylo odebráno medium z jednotlivých explantů. Odebraná media byla rozdělena do menších objemů (cca 100 μl) a umístěna do -80 °C. Po získání všech vzorků byla spektrofotometricky stanovena hladina glycerolu v odebraných mediích pomocí výše popsané metody (viz kapitola 4.2.1).

4.4 Analýza adipocytů

4.4.1 Izolace adipocytů z tukové tkáně

Pro izolaci adipocytů bylo použito vždy přibližně 0,5 g čerstvě odebrané TT. TT byla nejdříve nastříhána na malé kousky a následně k ní byla přidána kolagenasa v poměru 1 : 1,5 (TT (g) : kolagenasa (ml)). Vzorek byl takto inkubován jednu hodinu ve vodní lázni při 37 °C za stálého třepání. Natrávená tuková tkáň byla přefiltrována přes sterilní sítko a promyta PBS. Filtrát byl poté centrifugován při 300 G po dobu 10 minut. Následně byla odebrána horní fáze obsahující adipocyty. Adipocyty byly dvakrát promyty PBS, a poté bylo odebráno 50 μl na analýzu velikosti adipocytů a 250 – 500 μl bylo zamraženo v -80 °C na izolaci RNA (u některých vzorků TT se nepodařilo získat dostatek adipocytů, a tudíž u nich nebyla provedena analýza genové exprese).

4.4.2 Analýza velikosti adipocytů

Velikost adipocytů byla analyzována z fotek pořízených konfokálním mikroskopem. Během izolace adipocytů popsané výše byl připraven roztok methylenové modři v DPBS (1 ml DPBS + 33 μ l zásobního roztoku methylenové modři - 10 mg/ml dH₂O) a na podložní sklíčko byly Dako perem nakresleny tři kruhy o průměru cca 1 cm. Tyto kruhy po zaschnutí slouží jako bariéra proti kapalinám a fixují tak aplikovaný vzorek pod krycím sklíčkem. 50 μ l izolovaných adipocytů bylo ihned po odebrání smícháno s 50 μ l roztoku 1 % BSA v PBS. Poté bylo do každého kruhu na podložním sklíčku přidáno 100 μ l připraveného roztoku methylenové modři. Vzorek obsahující adipocyty byl důkladně protřepán, rychle bylo odebráno 10 μ l a tato suspenze s adipocyty byla přidána do roztoku methylenové modři v prvním kruhu na podložním sklíčku. Takto byly přidány adipocyty i do dalších dvou kruhů, a poté byly přiklopeny krycím sklíčkem. Pro každý subjekt bylo tímto způsobem připraveno jedno podložní sklíčko se třemi různými náběry adipocytů.

Obrázky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP5 na invertovaném mikroskopickém těle Leica DMI 6000 CS s připojenou fluorescenční kamerou Leica DFC 350 FX na pravém portu. Ke snímání byl mikroskop použit ve „*widefield módu*“ pouze s aktivovanou kamerou a ovládacím softwarem „*Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF)*“ ve verzi 2.7.2. Velikost snímaných adipocytů v rozsahu 10 – 145 mikrometrů umožnila použití základního objektivu Leica HC PL Fluotar 10x 0,3 DRY, který má rozlišení v XY 651 nm při 488 nm a rozlišení Z 4768 nm při 488 nm. Adipocyty byly snímány přes podložní sklíčko s výstupem ve stupních šedé (Obrázek 6). Pro získání dostatečného množství adipocytů pro analýzu byl použit skenovací stolek v tzv. „*TileScan (maticovém) módu*“.

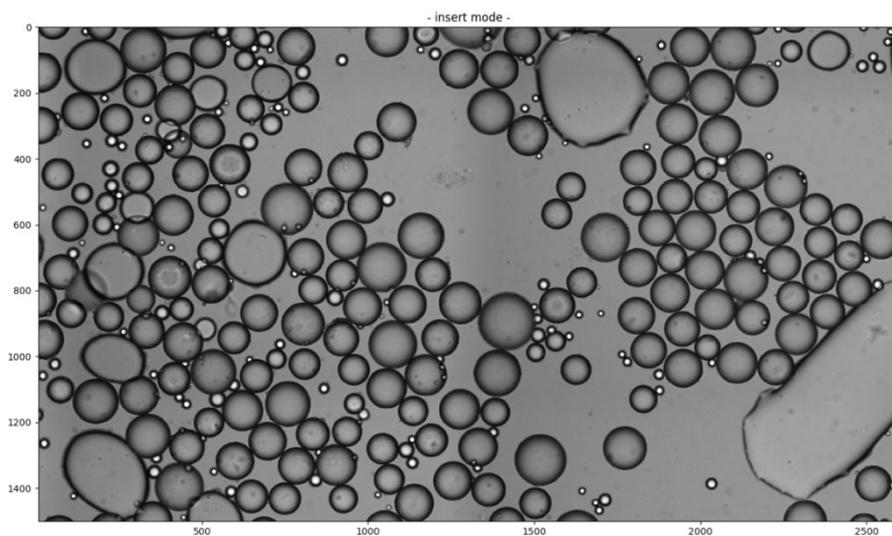
Z každého ze tří náběrů na podložním sklíčku byly nasnímány 2-3 matice o velikosti 3x4 pozic. Následně byla vybrána ta nejlepší matice z každého náběru, byla oříznuta na formát 2x3 nebo 3x2 pozice a načtena do volně šiřitelného softwaru CellProfiler (Carpenter et al., 2006, Lamprecht et al., 2007). Pro každý subjekt byly tedy analyzovány tři snímky. Pro analýzu adipocytů v CellProfileru a jejich odlišení od kapének a artefaktů byl připraven algoritmus („*pipeline*“), který sestává z několika kroků od prahování (použito OTSU) a primární identifikace objektů v načteném obraze, až ke změření rozpoznávaných objektů. Objekty byly následně filtrovány na základě poměru hlavní a vedlejší osy rozpoznávaného objektu (od kruhového po eliptický tvar). Toto filtrování umožňuje zahrnout nejenom samostatné adipocyty, ale také navzájem se různě překrývající adipocyty nebo jejich koexistence s kapénkami a jinými artefakty.

Výstupem analýzy snímku pomocí CellProfileru je soubor s daty o rozpoznaných objektech. Mezi hlavní údaje patří pozice objektu v obrázku (XY souřadnice) a vnitřní průměr v pixelech (viz níže). Vzhledem k přítomnosti kapének a jiných artefaktů ve vzorcích bylo nutno u každého analyzovaného obrázku manuálně zkontrolovat, zda nejsou tyto artefakty započítány mezi rozpoznané objekty. Původně byla tato kontrola prováděna dohledáváním jednotlivých rozpoznaných objektů podle jejich umístění v souřadnicovém systému, což bylo velmi časově náročné (průměrný počet rozpoznaných objektů na jedné fotce je cca 500). Proto byl v rámci této diplomové práce vytvořen program umožňující interaktivní propojení analyzovaného snímku s výstupem ze softwaru CellProfiler. Tento program vznikl ve spolupráci s Ing. Jonášem Šerých, který se v rámci svého postgraduálního studia zabývá počítačovým viděním.

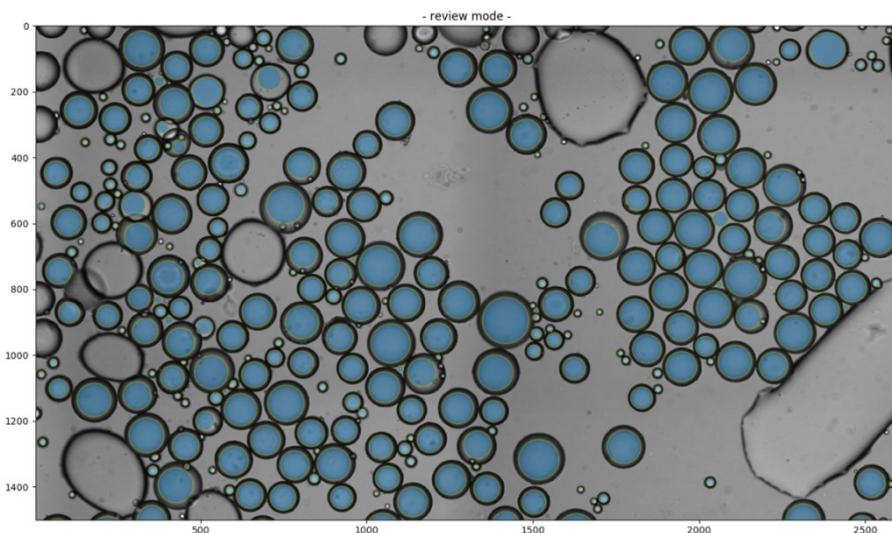
Vytvořený program načítá výstupní grafická a textová data (tabulku) ze CellProfileru. Výsledkem je interaktivní zobrazení analyzovaného snímku s vykreslenými modrými kruhy představujícími jednotlivé rozpoznané objekty, velikost kruhu je dána velikostí delší osy objektu v pixelech (Obrázek 7). Následně je třeba u každého objektu určit, zda se jedná o adipocyt či nikoli. Myší lze jednoduše vybrat modrý kruh, a pokud představuje adipocyt, je pomocí klávesové zkratky označen jako skupina A a kruh se zbarví do zelena. Kapénky a jiné artefakty jsou označeny jako skupina B a jsou znázorněny červenou barvou (Obrázek 8). Adipocyty, které nebyly rozpoznány CellProfilerem, lze přidat tahem myší po průměru adipocytu, nově vzniklý kruh je označen jako skupina A. Finálním výstupem programu u takto analyzované fotky je tabulka, ve které jsou průměry (přepočítané z pixelů na mikrometry) všech přítomných adipocytů, respektive objektů skupiny A.

V CellProfileru jsou detekovány vnitřní oblasti objektů. Při detekci vnějších okrajů by program nebyl schopen rozlišit překrývající se adipocyty v kombinaci s kapénkami, které se na vyhodnocovaných snímcích vyskytují velmi často. Získané hodnoty průměrů jednotlivých adipocytů jsou pak menší než reálné hodnoty a ke všem těmto vnitřním průměrům tedy musí být na závěr přičten určitý počet pixelů k získání výsledného průměru. K tomu byla v rámci této diplomové práce vytvořena matematická funkce. Počet přičítaných pixelů byl empiricky stanoven manuálním přeměřením rozpoznaného vnitřního průměru a nezapočítaných okrajů u cca 400 adipocytů různé velikosti. Naměřenými hodnotami byla proložena křivka a její rovnice byla použita pro výpočet pixelů, které se mají přičíst k detekovaným vnitřním průměrům. Pro dobře zaostřené adipocyty, které se příliš nepřekrývají, funguje tento způsob získání výsledného průměru velmi dobře. Ovšem pokud je například část snímku trochu rozostřena, CellProfiler rozpoznává vnitřní oblast adipocytů

menší proti zaostřeným adipocytům stejné velikosti. Po přičtení pixelů podle rovnice jsou pak tyto rozostřené adipocyty falešně menší. Popsaný problém byl nakonec vyřešen pomocí dalšího programu, který vznikl opět ve spolupráci s Ing. Jonášem Šerých. Tento program dokáže původně detekovaný vnitřní průměr roztáhnout až k okrajům na základě porovnávání obrazové intenzity okraje (povrchu) adipocytu a okolního prostoru (Obrázek 9). I zde však byla nutná následná manuální kontrola.

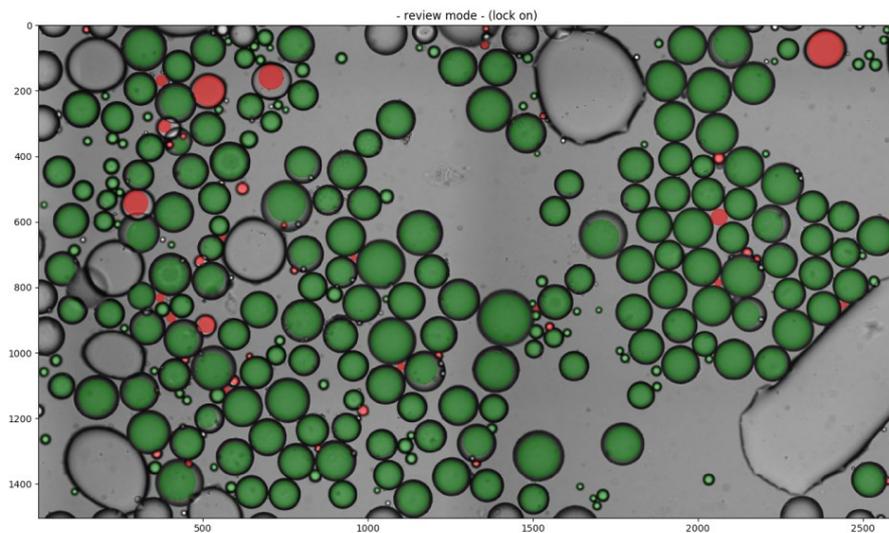


Obrázek 6: Snímek adipocytů pořízený konfokálním mikroskopem (objektiv Leica HC PL Fluotar 10x 0,3 DRY)



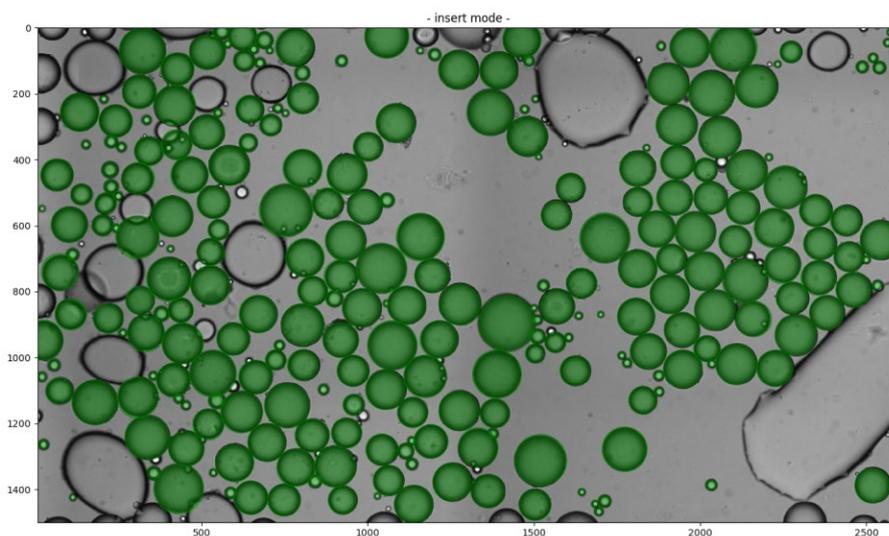
Obrázek 7: Zobrazení rozpoznávaných objektů v programu vytvořeném pro analýzu velikosti adipocytů

Program vytváří interaktivní propojení snímku pořízeného konfokálním mikroskopem s výstupem ze softwaru CellProfiler; modrá kolečka představují všechny objekty rozpoznané softwarem CellProfiler.



Obrázek 8: Zobrazení identifikace objektů v programu vytvořeném pro analýzu velikosti adipocytů

Zelená kolečka představují adipocyty, červená kolečka kapénky a jiné artefakty.



Obrázek 9: Zobrazení identifikovaných adipocytů s finální velikostí průměru

Program na základě porovnávání obrazové intenzity povrchu adipocytu a okolního prostoru roztahuje původně detekovaný vnitřní průměr až k okrajům adipocytu.

4.4.3 Expresse metabolických genů v adipocytech

Izolace RNA z adipocytů

Postup izolace RNA z adipocytů je obdobný jako u izolace RNA z TT. Bylo upraveno pouze několik kroků v protokolu a byl použit jiný komerční izolační set „*RNeasy Lipid Tissue Mini Kit*“ (QIAGEN, Německo). Práce byla opět prováděna v digestoři a byly použity špičky s filtrem.

Vzorek s adipocyty se nejdříve nechal roztát, a až poté k němu byl přidán 1 ml lyzačního činidla. Místo homogenizace vrtákem byl vzorek pouze důkladně promíchán na vortexu po dobu 1 minuty. Stejně jako u TT následovala inkubace, přidání chloroformu, další inkubace a nakonec centrifugace 15 minut při 12 000 G. Opět byla odebrána horní vodná fáze obsahující RNA a k ní byl přidán 70 % ethanol v poměru 1 : 1 (vodná fáze : ethanol). Všechny další kroky byly shodné s izolací RNA z TT kromě rozdílu v pufru, kdy místo RWT byl použit pufr RW1. Roztok s ethanolem byl aplikován na kolonku, poté jednou promyt pufr RW1 a dvakrát pufr RPE. RNA byla eluována vodou a poté byla změřena její koncentrace a čistota. Izolovaná RNA byla uchovávána v -80 °C.

Reverzní transkripce

Pro reverzní transkripci RNA z adipocytů byla použita komerční souprava „*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*“ (Applied Biosystems, USA). Vzhledem k relativně nízké výtěžnosti RNA při izolaci RNA z adipocytů bylo přepsáno 300, 200, 150 nebo 100 ng RNA podle koncentrace jednotlivých vzorků. RNA byla nejdříve naředěna na danou koncentraci do celkového objemu 6 µl. Poté byla odstraněna genomická DNA pomocí DNasy stejně jako u výše popsané reverzní transkripce RNA z TT (přidány 4 µl DNasy směsi, inkubace 15 minut mimo led, přidán 1 µl EDTA, termocykler 10 minut 65 °C). Po inaktivaci DNasy bylo k vzorkům přidáno 9 µl směsi pro reverzní transkriptasu (složení viz Tabulka 5) a zkumavky byly umístěny do termocykleru. Program pro reverzní transkripci se skládal z 10 minut při teplotě 25 °C (vazba hexamerů na RNA), 2 hodin při 37 °C (syntéza cDNA) a 5 minut při 85 °C (denaturace reverzní transkriptázy). Nakonec byly vzorky cDNA naředěny na koncentraci 10 a 2 ng/µl a uskladněny v -80 °C.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci (na jednu reakci)

Komponenta	objem (μl)
RT pufr	2
dH ₂ O	3,2
100 mM dNTP mix	0,8
náhodné hexamery	2
MultiScribe reverzní transkriptasa (50 U/μl)	1

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (označovaná také jako *Real-time PCR*) je metoda umožňující detekci a kvantifikaci specifických úseků DNA. Stejně jako u klasické PCR dochází k amplifikaci zkoumaného úseku, která je však detekována pomocí fluorescence již v průběhu reakce. V této diplomové práci byly použity komerční sondy „*TaqMan Gene Expression Assays*“ (Applied Biosystems, USA). Obsahují „*forward*“ a „*reverse*“ primery ohraničující daný úsek DNA. Mezi ně se váže sonda, která má na jednom konci reportérový fluorofor a na druhém molekulu zhášedla. Pokud jsou fluorofor a zhášedla blízko u sebe, dochází k blokování emise fluorescence. Při syntéze komplementárního vlákna DNA dochází k postupnému odbourávání sondy díky 5' exonukleasové aktivitě polymerasy. Fluorofor je tak uvolněn od molekuly zhášedla a emituje světlo, které je na konci každého cyklu detekováno. Výsledkem qPCR jsou hodnoty „*cycle threshold*“ (C_t) pro každý analyzovaný vzorek. Tato hodnota odpovídá době, kdy došlo k nárůstu fluorescence nad práh pozadí. Čím nižší je C_t , tím více je daný gen exprimován.

V rámci této práce byla zkoumána exprese 9 metabolických genů v izolovaných adipocytech (Tabulka 7). Nejdříve byla připravena pro každý gen reakční směs obsahující danou sondu, „*TaqMan Fast Advanced Master Mix*“ (Applied Biosystems, USA) a redestilovanou vodu (složení viz Tabulka 6). Reakční směsi byly udržovány na ledu a chráněny před světlem. Poté bylo do 96-jamkové destičky přidáno 2,5 μl cDNA o koncentraci 10 nebo 2 ng/μl. K cDNA bylo následně přidáno 10 μl příslušné reakční směsi. qPCR byla provedena na přístroji ABI7500 Real-Time PCR System. Program zahrnoval fázi počáteční denaturace (95 °C, 20 s) a následovalo 40 cyklů, během kterých se střídala fáze denaturace vzniklých dvouvláknových produktů (95 °C, 3 s) a syntézy nových komplementárních vláken (60 °C, 30 s). Vzorky byly měřeny v duplikátech a výsledné hodnoty C_t byly zprůměrovány. Pro normalizaci dat byla u každého vzorku změřena exprese referenčních genů PPIA a TBP. Z hodnot C_t referenčních genů byl vytvořen geometrický průměr, který byl následně odečten od všech analyzovaných genů (ΔC_t). Pro statistickou analýzu byla exprese genů vyjádřena

jako $2^{-\Delta Ct}$ a pro grafické znázornění byla exprese vztažena k průměru kontrolní (netréované) skupiny a vyjádřena tedy jako $\Delta\Delta C_t$.

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro qPCR (na jednu reakci)

Komponenta	objem (μ l)
TaqMan sonda	0,625
TaqMan Fast Advanced Master Mix	6,25
dH ₂ O	3,125

Tabulka 7: Seznam použitých sond (TaqMan Gene Expression Assays) pro analýzu genové exprese v izolovaných adipocytech

Zkratka genu	Název genu	ID sondy
ADIPOQ	<i>Adiponectin</i>	Hs00605917_m1
CIDEA	<i>cell death-inducing DFFA-like effector a</i>	Hs00154455_m1
CPT1A	<i>carnitine palmitoyltransferase 1A</i>	Hs00912671_m1
FAS	<i>fatty acid synthase</i>	Hs01005622_m1
HSL	<i>hormone sensitive lipase</i>	Hs00943404_m1
PGC1 α	<i>PPARγ coactivator 1 alpha</i>	Hs01016719_m1
PPIA	<i>peptidylprolyl isomerase A</i>	Hs04194521_s1
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>	Hs00427620_m1
UCP1	<i>uncoupling protein 1</i>	Hs00222453_m1

4.5 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení dat a grafické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism verze 6,03 (GraphPad Software, USA). Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm standardní chyba průměru (SEM). Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. Normalita dat byla posuzována na základě Shapiro-Wilkova testu. Pro porovnání distribuce velikosti adipocytů a sekrece glycerolu v explantech byla použita dvoucestná ANOVA s Holm-Sidak post-hoc testem. Zbylá data byla vyhodnocena pomocí dvouvýběrového Studentova t-tesu, popřípadě neparametrickým Mann-Whitney testem. Vybrané výsledky genové exprese a analýzy krevního séra byly korelovány s parametry fyzické zdatnosti, metabolického zdraví a s distribucí velikosti adipocytů pomocí Spearmanova korelačního testu.

4.6 Materiál

4.6.1 Chemikálie

BSA	Sigma-Aldrich, USA
BSA – bez mastných kyselin a endotoxinu	Sigma-Aldrich, USA
DPBS	Sigma-Aldrich, USA
EDTA.....	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol.....	Penta, ČR
Hepes.....	Sigma-Aldrich, USA
Chloroform.....	Sigma-Aldrich, USA
Isoproterenol hydrochlorid.....	Sigma-Aldrich, USA
Kolagenasa	Serva, Německo
Krebs-Ringer bikarbonátový pufr.....	Sigma-Aldrich, USA
Methylenová modř	Loba Feinchemie, Rakousko
PBS.....	Lonza, Švýcarsko

4.6.2 Přístroje a materiál

96-jamkové destičky pro spektrofotometrické analýzy	Greiner Bio-One, Rakousko
96-jamkové destičky pro PCR	Applied Biosystems, USA
Abi7500 Real-Time PCR System.....	Applied Biosystems, USA
Analytická váha	Sartorius, Německo
Automatické pipety (rozsah 0,2 – 300 µl)	Biohit, Finsko
Dako pero	Dako Denmark A/S, Dánsko
Centrifuga 5804 R	Eppendorf, Německo
Centrifuga MiniSpin Plus.....	Eppendorf, Německo
Digestoř	Erlab, USA
Homogenizátor Ultra Turrax T25	IKA, Německo
Chirurgické nástroje.....	Heiko Wild, Německo
Konfokální mikroskop TCS SP5	Leica Microsystems, Německo
Kulatá krycí sklíčka (13mm).....	Nalge Nunc, USA
Multikanálová pipeta (rozsah 30 – 300 µl)	Eppendorf, Německo
Pipetboy	Gilson, USA
Pipety (rozsah 0,2 – 1000 µl).....	Eppendorf, Německo
Podložní sklíčka	Knittel, Německo
Sítka (210 µm).....	NeoLab, Německo

Spektrofotometr Versa max tunable microplate reader..... Molecular Devices, USA
Spektrofotometr NanoDrop 1000..... Thermo Fischer Scientific, USA
Termoblok QBD2 Grant, UK
Termocykler 2720..... Applied Biosystems, USA
Vodní lázeň s třepačkou SW22..... Julabo, Německo
Vortex..... IKA, Německo

5. Výsledky

5.1 Biochemické a antropometrické parametry

Prvním cílem této diplomové práce bylo zhodnotit vliv pravidelné pohybové aktivity na biochemické a antropometrické parametry u seniorek. Výsledky klinických vyšetření jsou shrnuty v Tabulce 8. Ženy byly rozděleny do dvou skupin na základě testů fyzické zdatnosti. Rozdíl v trénovanosti mezi skupinami dokládá signifikantně zvýšená maximální spotřeba kyslíku při zátěži ($VO_2\max$) a signifikantně vyšší počet opakování vybraných cviků SFT (Test sed-vztyk a Test flexe v lokti) u trénované skupiny proti netrénované.

Do studie byly zařazeny seniorky ve věku od 60 do 80 let. Ačkoli byla snaha o sestavení skupin se stejným věkovým průměrem, výsledné skupiny se lišily v průměru o 3 roky ($72,3 \pm 0,9$ let u netrénovaných žen a $69,3 \pm 0,7$ let u žen trénovaných). Lze však předpokládat, že tento rozdíl nebude mít významný vliv na fyziologické funkce organismu.

Dalším měřeným parametrem byla tělesná konstituce, která byla posuzována na základě BMI (*body mass index*), obvodu pasu, hmotnosti a množství tukové a beztukové hmoty. Hodnoty BMI se u obou skupin pohybovaly na pomezí normální váhy a nadváhy. Ženy s hodnotami BMI většími než 30 byly vyřazeny. Skupiny se mezi sebou významně nelišily v BMI ani v obvodu pasu. Průměrné hodnoty tohoto parametru jsou u obou skupin lehce zvýšené proti doporučovaným hodnotám (obvod pasu žen < 80 cm; Web. 4). Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pozorován ve váze a množství tukové hmoty. Trénované seniorky vážily méně a měly nižší podíl tuku z celkové hmotnosti ve srovnání s netrénovanými seniorkami.

Pro zhodnocení inzulínové senzitivity byla změřena koncentrace inzulínu a glukózy v krevní plazmě odebrané nalačno a z těchto hodnot byl následně vypočítán HOMA IR. Všechny tři parametry byly signifikantně sniženy u trénované skupiny, což vypovídá o lepší inzulínové senzitivě trénovaných seniorek ve srovnání s netrénovanými. Tyto výsledky potvrzují i data získaná z hyperinzulinového euglykemického clampu. U trénovaných seniorek byla naměřena signifikantně vyšší spotřeba glukózy (M_{kg}) během clampu, což naznačuje zlepšenou inzulínovou senzitivitu.

Tabulka 8: Antropometrická a biochemická data u netrénovaných a trénovaných senierek

	Netrénovaná skupina (n=27)	Trénovaná skupina (n=27)
věk (roky)	72,3 ± 0,9	69,3 ± 0,7**
hmotnost (kg)	67,6 ± 1,1	63,4 ± 1,4*
BMI (kg.m⁻²)	25,5 ± 0,4	24,7 ± 0,5
tuková hmota (%)	35,7 ± 0,7	32,4 ± 1,0**
beztuková hmota (kg)	43,3 ± 0,5	42,6 ± 0,8
obvod pasu (cm)	83,9 ± 1,2	80,7 ± 1,5
glykémie (mmol.l⁻¹)	5,7 ± 0,1	5,4 ± 0,1*
inzulín (mU.l⁻¹)	6,4 ± 0,6	4,4 ± 0,5*
HOMA IR	1,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1**
M_{kg} (mg.kg⁻¹.min⁻¹)	5,4 ± 0,4	6,8 ± 0,4*
VO₂max (ml.kg⁻¹.min⁻¹)	17,0 ± 0,5	26,4 ± 1,0***
Test sed-vztyk (počet opakování)	16 ± 1	19 ± 1*
Test flexe v lokti (počet opakování)	19 ± 1	21 ± 1*

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM.

(* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; Studentův t-test / Mann-Whitney test)

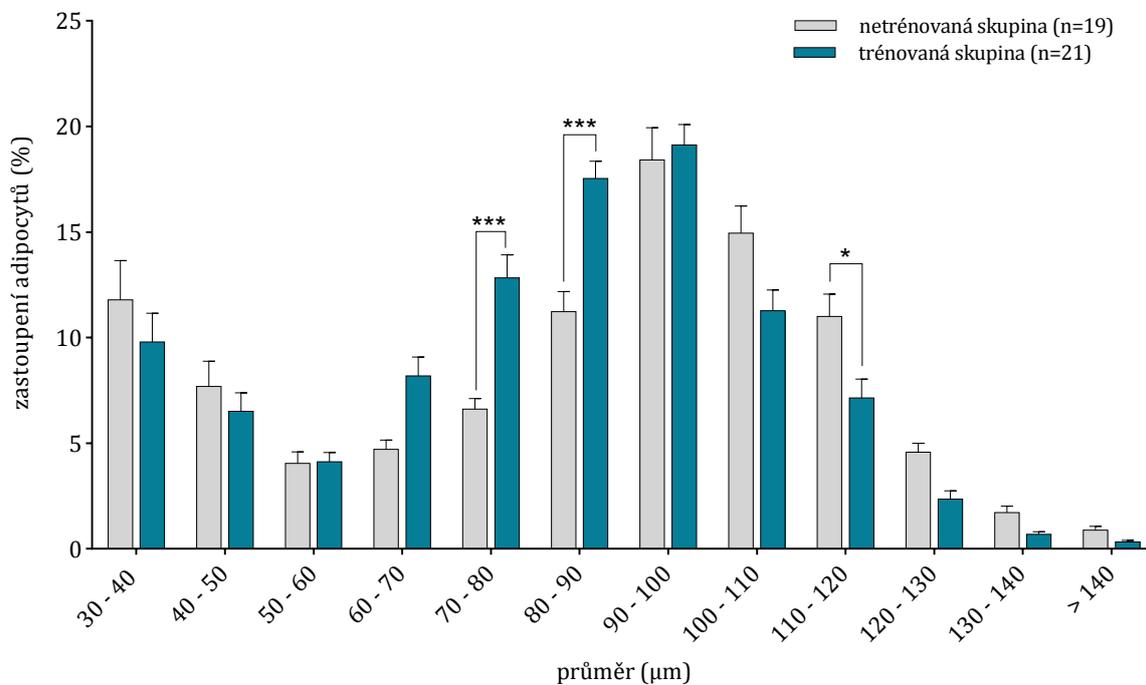
5.2 Distribuce velikosti adipocytů

Velikost adipocytů byla analyzována v řadě studií zaměřených na dysfunkci TT u obézních jedinců. Na základě těchto prací bylo prokázáno, že velikost adipocytů koreluje s některými parametry metabolického zdraví, jako je například inzulínová senzitivita (Andersson et al., 2014). Avšak jen velmi málo je známo o velikosti adipocytů u seniorů a o možných souvislostech mezi velikostí (distribucí) adipocytů a pohybovou aktivitou ve stáří. Proto jedním z dalších cílů této práce bylo popsat distribuci adipocytů u žen ve věku od 60 do 80 let a zjistit, zda je tato distribuce velikosti adipocytů ovlivňována pravidelnou pohybovou aktivitou.

Distribuce velikosti adipocytů byla z technických důvodů stanovena u podskupiny 19 netrénovaných a 21 trénovaných senierek, a následně byly tyto skupiny porovnány mezi sebou (menší počet subjektů v jednotlivých skupinách je dán nedostatkem TT pro tuto analýzu u některých žen). Pro každý subjekt byly nasnímány a vyhodnoceny 3 obrázky adipocytů izolovaných ze subkutánní TT (v průměru 500 adipocytů na jednom obrázku). Ze získaných dat bylo vytvořeno procentuální zastoupení adipocytů ve 12 různých skupinách definovaných dle průměru adipocytu (skupiny od 30 do 140 μm s rozpětím po 10 μm; poslední skupina byla definována průměrem větším než 140 μm) (Graf 1).

Trénovaná skupina měla na rozdíl od netréované signifikantně vyšší procentuální zastoupení adipocytů ve skupinách s průměrem 70 – 80 μm a 80 – 90 μm . Větší podíl adipocytů ve skupině s průměrem 60 – 70 μm u trénovaných senierek byl na hranici signifikance ($p = 0,08$). Větší adipocyty byly naopak zastoupeny více u netréovaných žen, konkrétně byl pozorován statisticky významný rozdíl ve skupině s průměrem 110 – 120 μm a ve skupině s průměrem 100 – 110 μm byl rozdíl na hranici signifikance ($p = 0,05$).

Kromě distribuce adipocytů podle jejich velikosti byla stanovena také průměrná velikost adipocytu pro netrévanou a trénovanou skupinu. Tento parametr se mezi skupinami významně nelišil. Průměrná velikost adipocytu u netréované skupiny byla $65,1 \pm 3,7 \mu\text{m}$ a $64,6 \pm 2,4 \mu\text{m}$ u trénovaných senierek.



Graf 1: Distribuce velikosti adipocytů izolovaných z abdominální podkožní TT u netrévaných a trénovaných senierek

Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM.

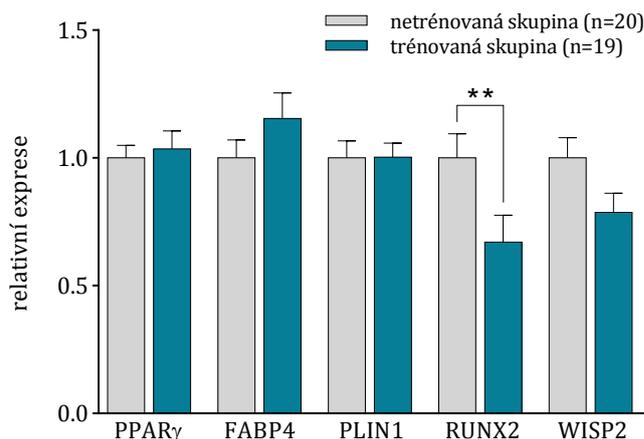
(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; dvoucestná ANOVA)

5.3 Genová exprese v tukové tkáni

Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda pravidelná pohybová aktivita ovlivňuje expresi genů souvisejících s energetickým metabolismem, adipogenezí a sekreční aktivitou tukové tkáně u seniorů. Ze vzorků subkutánní TT odebrané jehlovou biopsií byla izolována mRNA, poté byla provedena reverzní transkripce a vzniklé molekuly cDNA byly preamplifikovány pro následnou analýzu na „Fluidigm chipu“. Tato metoda umožnila změřit relativní expresi 94 genů ve všech vzorcích cDNA (respektive u podskupiny 20 netrénovaných a 19 trénovaných seniorek) současně, z čehož je v této diplomové práci prezentována exprese 36 genů ve skupinách funkčně spolu souvisejících.

a) Adipogeneze

Efekt pravidelné pohybové aktivity na adipogenezi byl studován na základě exprese genu pro hlavní proadipogenní transkripční faktor (PPAR γ), dvou genů kódujících negativní regulátory adipogeneze (RUNX2, WISP2) a dvou genů kódujících proteiny typické pro maturované adipocyty (FABP4, PLIN1) (Urs et al., 2004). Získané výsledky relativní exprese těchto genů v TT jsou znázorněny v Grafu 2. Efekt pohybové aktivity byl pozorován na expresi genů inhibujících adipogenezi – trénované seniorky měly signifikantně nižší expresi genu RUNX2 a snížená exprese genu WISP2 u trénovaných žen proti netrénovaným byla na hranici signifikance ($p = 0,05$). Ostatní analyzované geny se mezi skupinami výrazně nelišily.

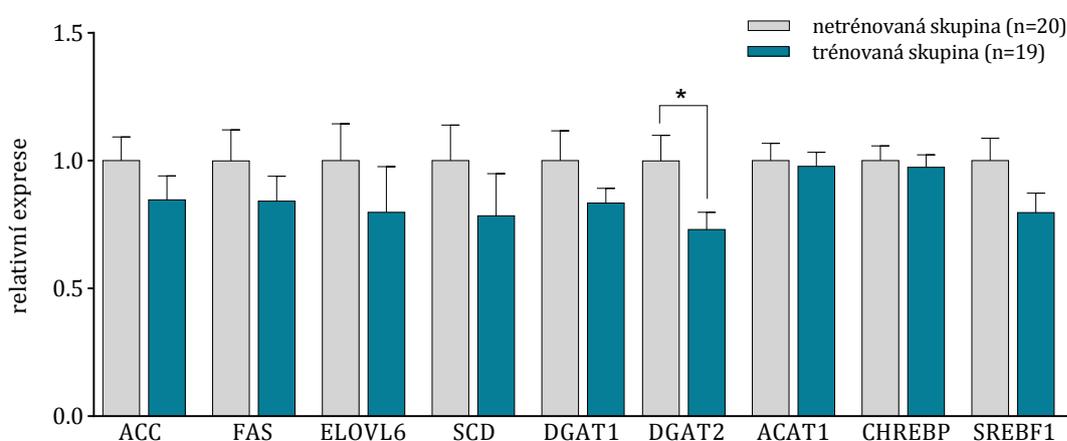


Graf 2: Relativní mRNA exprese genů v TT u netrénovaných a trénovaných seniorek – Adipogeneze

Data jsou vyjádřena jako průměr ($\Delta\Delta C_t$) \pm SEM. Normalizace byla provedena vztahením hladiny exprese jednotlivých genů ke geometrickému průměru referenčních genů RPS13 a TBP. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney test)

b) Lipogeneze

Expresse genů souvisejících s lipogenezí v tukové tkáni byla analyzována na úrovni syntézy MK (ACC, FAS, ELOVL6, SCD), TAG (DGAT1, DGAT2) a syntézy isoprenoidů (ACAT1). Dále byla stanovena také exprese dvou genů pro transkripční faktory regulující lipogenezi (CHREBP, SREBF1). V grafickém znázornění výsledků (Graf 3) je vidět určitý trend snížené exprese většiny analyzovaných genů u trénované skupiny. Nicméně pouze DGAT2 je signifikantně méně exprimován u trénovaných senierek ve srovnání s netrévanými. Na hranici signifikance je u trénované skupiny snížená exprese SREBF1 ($p = 0,08$) a ELOVL6 ($p = 0,09$).



Graf 3: Relativní mRNA exprese genů v TT u netrévaných a trénovaných senierek – Lipogeneze

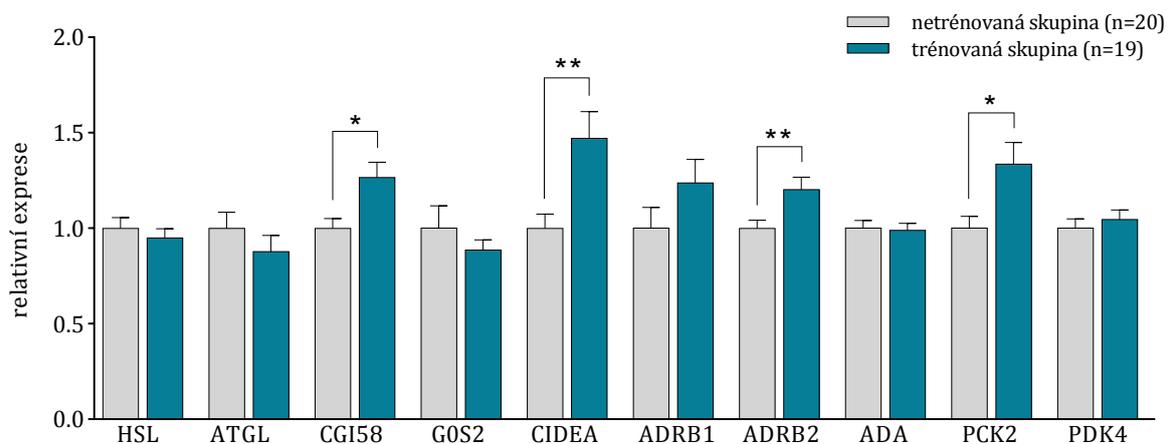
Data jsou vyjádřena jako průměr ($\Delta\Delta C_t$) \pm SEM. Normalizace byla provedena vztahením hladiny exprese jednotlivých genů ke geometrickému průměru referenčních genů RPS13 a TBP. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney test)

c) Lipolýza a glyceroneogeneze

Efekty pravidelné pohybové aktivity na lipolýzu byly analyzovány na základě měření genové exprese dvou lipas (HSL, ATGL), dvou regulátorů ATGL (CGI58, G0S2), regulátoru lipolýzy (CIDEA), exprese adrenergních receptorů (ADRA2A, ADRB1, ADRB2) a enzymu adenosindeaminasy (ADA) (Graf 4). Nebyl pozorován žádný významný efekt pravidelné pohybové aktivity na expresi genů HSL a ATGL, ovšem trénované seniorky měly signifikantně vyšší expresi genu CGI58, který patří mezi aktivátory ATGL. Protein kódovaný genem G0S2 je naopak negativní regulátor ATGL, jeho exprese se však mezi skupinami nelišila. Další regulátor lipolýzy je protein asociovaný s lipidovou kapénkou CIDEA. I přestože zatím nebyl objasněn mechanismus této regulace, v několika publikacích je uváděn

jeho inhibiční účinek na bazální lipolýzu. V této práci byla zjištěna signifikantně zvýšená exprese genu CIDEA u trénovaných senierek ve srovnání s netrénovanými. Hormonální regulace lipolýzy je zprostředkována především adrenergními receptory (viz kapitola 2.1.2). Trénované seniorky měly signifikantně zvýšenou expresi genu ADRB2, exprese ADRB1 se mezi skupinami významně nelišila. Expresi genu ADRA2A se z technických důvodů nepodařilo změřit (pravděpodobně nefunkční sonda). Statisticky významný rozdíl nebyl pozorován ani v expresi genu kódujícího enzym adenosindeaminasu, která degraduje lipolytický inhibitor adenosin.

Dostupnost glycerol-3-fosfátu významně ovlivňuje míru reesterifikace, která je úzce spojena s lipolýzou v adipocytech. V této práci byla sledována exprese dvou genů stimulujících glyceroneogenezi (PCK2, PDK4). Potenciální efekt pravidelné pohybové aktivity na glyceroneogenezi byl pozorován na úrovni zvýšené exprese genu PCK2 u trénované skupiny. PCK2 katalyzuje počáteční krok glyceroneogeneze a je zároveň jejím limitním krokem. PDK4 naproti tomu zabraňuje využití pyruvátu k syntéze acetyl-CoA a činí tak pyruvát dostupný pro glyceroneogenezi. Exprese PDK4 se mezi skupinami nelišila.



Graf 4: Relativní mRNA exprese genů v TT u netrénovaných a trénovaných senierek – Lipolýza a glyceroneogeneze

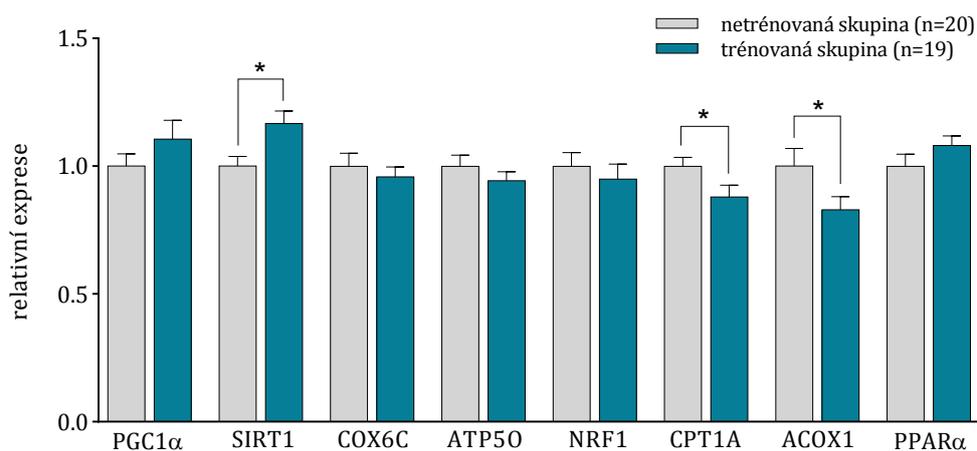
Data jsou vyjádřena jako průměr ($\Delta\Delta C_t$) \pm SEM. Normalizace byla provedena vztahením hladiny exprese jednotlivých genů ke geometrickému průměru referenčních genů RPS13 a TBP. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney test)

d) Mitochondriální biogeneze a metabolismus

Vliv pravidelné pohybové aktivity na mitochondriální biogenezi byl zkoumán na základě analýzy genové exprese hlavního regulátoru mitochondriální biogeneze PGC1 α a exprese genu kódujícího deacetylasy SIRT1, která aktivuje PGC1 α . Exprese PGC1 α se mezi

skupinami významně nelišila, avšak exprese SIRT1 byla signifikantně zvýšená u trénovaných seniorek, jak je vidět v Grafu 5. PGC1 α i SIRT1 jsou spojovány s procesem hnědnutí adipocytů. V této souvislosti byla analyzována také exprese hlavního markeru hnědých a běžových adipocytů – UCP1. Expresi tohoto genu se však nepodařilo stanovit, protože naměřené hodnoty C_t byly u obou skupin příliš vysoké (tedy exprese byla pod detekčním limitem metody).

Dále byl zkoumán vliv pravidelné pohybové aktivity na mitochondriální metabolické dráhy – konkrétně byla sledována exprese genů respiračního řetězce (COX6C), oxidativní fosforylace (ATP50) a jejich regulátoru (NRF1). Stanovena byla také exprese genů souvisejících s β -oxidací – transportér MK do mitochondriální matrix (CPT1A), enzym katalyzující první reakci β -oxidace MK (ACOX1) a regulátor lipidového metabolismu (PPAR α). U trénovaných seniorek byla zjištěna snížená exprese genů CPT1A a ACOX1 ve srovnání s netrénovanými, což nasvědčuje efektu pravidelné pohybové aktivity na β -oxidaci. Exprese ostatních metabolických genů se mezi skupinami nelišila.



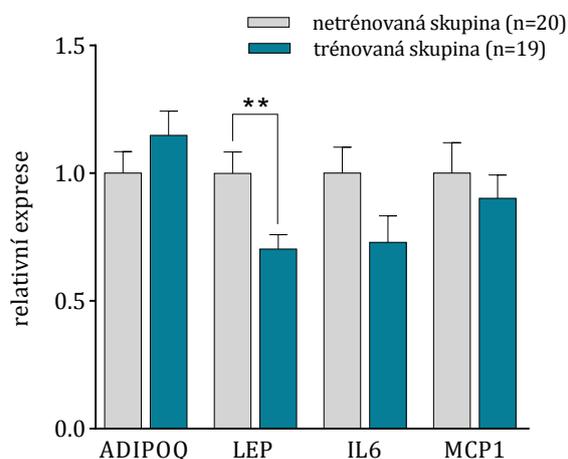
Graf 5: Relativní mRNA exprese genů v TT u netrénovaných a trénovaných seniorek – Mitochondriální biogeneze a metabolismus

Data jsou vyjádřena jako průměr ($\Delta\Delta C_t$) \pm SEM. Normalizace byla provedena vztahením hladiny exprese jednotlivých genů ke geometrickému průměru referenčních genů RPS13 a TBP. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney test)

e) Adipokiny a cytokiny

Sekreční funkce TT u seniorů byla v této práci analyzována pomocí genové exprese dvou důležitých adipokínů leptinu (LEP) a adiponektinu (ADIPOQ) (Graf 6). Vzhledem k tomu, že dysfunkční TT přispívá k zánětu nízkého stupně, byla sledována také exprese genů kódujících prozánětlivý mediátor IL6 a chemokin MCP1. Statisticky významný rozdíl

byl pozorován pouze v expresi genu LEP, jehož exprese byla signifikantně snižena u trénovaných senierek ve srovnání s netréňovanými. U trénovaných žen bylo zaznamenáno také snížení exprese genů IL6 a MCP1, avšak tyto rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné, stejně jako mírné zvýšení exprese ADIPOQ.



Graf 6: Relativní mRNA exprese genů v TT u netréňovaných a trénovaných senierek – Adipokiny a cytokiny

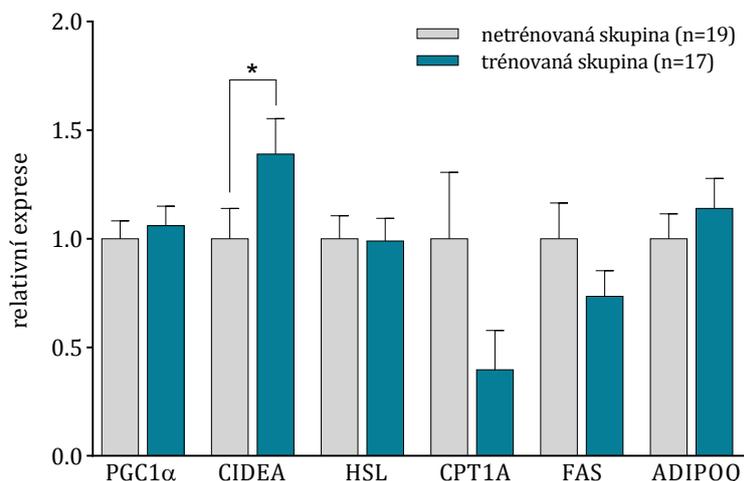
Data jsou vyjádřena jako průměr ($\Delta\Delta C_t$) \pm SEM. Normalizace byla provedena vztahením hladiny exprese jednotlivých genů ke geometrickému průměru referenčních genů RPS13 a TBP. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney test)

5.4 Genová exprese v izolovaných adipocytech

Vzhledem k tomu, že v tukové tkáni se vyskytují kromě adipocytů i jiné buněčné typy (imunitní buňky, nervové buňky, endoteliální buňky a další), neodpovídá genová exprese měřená ve vzorcích tukové tkáně pouze expresi adipocytů. Z tohoto důvodu bylo dalším cílem této práce srovnat expresi genů analyzovaných v TT s jejich expresí v izolovaných adipocytech a zjistit, zda budou pozorovány stejné efekty pravidelné pohybové aktivity na expresi genů v TT a v izolovaných adipocytech. Genová exprese v TT byla stanovena u 20 netréňovaných a 19 trénovaných senierek. Z tukové tkáně těchto žen byla provedena izolace adipocytů, avšak u 3 subjektů se následně nepodařilo získat dostatečné množství RNA. Genová exprese v izolovaných adipocytech byla tedy stanovena u podskupiny 19 netréňovaných a 17 trénovaných senierek.

Pro porovnání genové exprese v TT a v izolovaných adipocytech bylo vybráno těchto 7 genů: HSL, CPT1A, FAS, ADIPOQ, PGC1 α , CIDEA a UCP1 (Graf 7). Jako referenční geny byly zvoleny PPIA a TBP. Bylo zjištěno, že vlivem pravidelné pohybové aktivity byla signifikantně zvýšená exprese genu CIDEA v izolovaných adipocytech u trénovaných senierek proti netréňovaným. Stejný efekt PPA na expresi tohoto genu byl pozorován i v TT. Exprese genů

HSL, FAS, ADIPOQ a PGC1 α se mezi skupinami trénovaných a netrénovaných senierek nelišila ani v TT ani v izolovaných adipocytech. U genu CPT1A nebyl nalezen statisticky významný pokles v izolovaných adipocytech, zatímco jeho exprese v tukové tkáni byla signifikantně nižší u trénovaných žen. Exprese genu UCP1 v izolovaných adipocytech se stejně jako v TT nepodařila stanovit kvůli příliš nízké expresi tohoto genu.



Graf 7: Relativní mRNA exprese vybraných genů v adipocytech izolovaných z abdominální podkožní TT u netrénovaných a trénovaných senierek

Data jsou vyjádřena jako průměr ($\Delta\Delta C_t$) \pm SEM. Normalizace byla provedena vztahením hladiny exprese jednotlivých genů ke geometrickému průměru referenčních genů PPIA a TBP. (* $p < 0,05$; Mann-Whitney test)

5.5 Bazální a stimulovaná lipolýza

Efekt pravidelné pohybové aktivity na lipolýzu u seniorů byl kromě exprese lipolytických genů zkoumán i na úrovni sekrece metabolitů. V krevním séru získaném z krve odebrané ráno nalačno byla stanovena koncentrace glycerolu a volných mastných kyselin jakožto produkty lipolýzy. (Z technických důvodů se nepodařilo stanovit koncentrace těchto metabolitů u 2 netrénovaných a 2 trénovaných senierek.) Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 9. Trénované seniorky měly na rozdíl od netrénovaných signifikantně nižší hladinu volných mastných kyselin. Koncentrace glycerolu v séru se mezi skupinami nelišila.

Tabulka 9: Sérové hladiny NEFA a glycerolu u netréovaných a trénovaných senierek

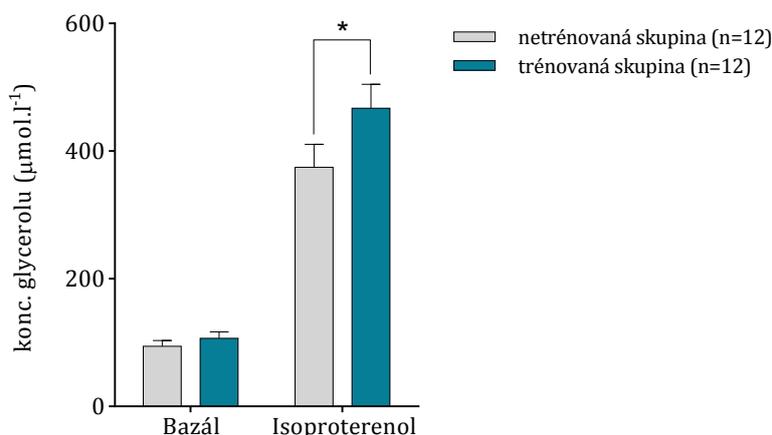
	Netréovaná skupina	Trénovaná skupina
NEFA (mmol.l⁻¹)	0,74 ± 0,06	0,59 ± 0,03*
glycerol (μmol.l⁻¹)	55,2 ± 4,5	51,9 ± 6,0

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM.

NEFA – netréovaná sk. n = 25, trénovaná sk. n = 25 (* p < 0,05; Studentův t-test)

glycerol – netréovaná sk. n = 24, trénovaná sk. n = 24 (* p < 0,05; Mann-Whitney test)

Dále byly u podskupiny 12 netréovaných a 12 trénovaných senierek připraveny 4 explanty TT, ve kterých byla měřena bazální lipolytická odpověď a lipolytická odpověď při adrenergní stimulaci. Analyzována byla tedy míra sekrece glycerolu po čtyřhodinové inkubaci v bazálním médiu nebo v médiu s isoproterenolem (hormonálně stimulovaná lipolýza). Trénované seniorky měly signifikantně vyšší koncentraci glycerolu v médiu s isoproterenolem, zatímco koncentrace glycerolu v bazálním médiu se mezi skupinami nelišila (Graf 8).



Graf 8: Sekrece glycerolu v explantech TT za bazálních podmínek a po stimulaci isoproterenolem u netréovaných a trénovaných senierek

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM.

(* p < 0,05; dvoucestná ANOVA)

5.6 Korelace

Na závěr byly získané výsledky (genová exprese v TT a v adipocytech, lipolytická aktivita stanovena pomocí koncentrace NEFA a glycerolu v krevním séru a v médiích z explantů TT) korelovány s parametry fyzické zdatnosti ($VO_2\max$), inzulínovou senzitivitou (HOMA IR, M_{kg}) a s distribucí velikosti adipocytů. V Tabulce 10 a v Tabulce 11 je prezentován výběr korelací mezi parametry, které se lišily mezi trénovanou a netrénovanou skupinou.

Benefiční efekt pravidelné pohybové aktivity u metabolického zdraví seniorů podporuje zjištěná pozitivní korelace mezi mírou trénovanosti (definovanou jako $VO_2\max$) a inzulínovou senzitivitou stanovenou metodou hyperinzulinemického euglykemického clampu (M_{kg}). Zároveň byla pozorována negativní korelace $VO_2\max$ s inzulínovou rezistencí (HOMA IR) a s koncentrací NEFA v krevním séru (na hranici signifikance). Zajímavé je, že s fyzickou zdatností pozitivně korelují adipocyty s průměrem 70 – 80 μm a 80 – 90 μm , zatímco hypertrofické adipocyty (120 – 130 μm a 130 – 140 μm) vykazují opačný vztah k $VO_2\max$. Adipocyty s průměrem 70 – 80 μm jsou navíc asociovány pozitivně s M_{kg} a adipocyty s průměrem 130 – 140 μm naopak negativně. Korelace jednotlivých genů budou blíže diskutovány v následující kapitole.

Tabulka 10: Korelace parametrů fyzické zdatnosti a inzulínové senzitivity s vybranými geny a klinickými parametry

	$VO_2\max$		HOMA-IR		M_{kg}	
	R	p	R	p	R	p
$VO_2\max$			-0,348	0,011	0,393	0,004
HOMA-IR	-0,348	0,011			-0,517	<0,001
M_{kg}	0,393	0,004	-0,517	<0,001		
NEFA v krevním séru	-0,268	0,069	0,410	0,004	-0,628	<0,001
DGAT2	-0,140	0,403	0,091	0,580	0,011	0,946
ELOVL6	-0,146	0,411	-0,113	0,517	0,067	0,701
SREBF1	-0,093	0,578	-0,117	0,477	0,233	0,154
RUNX2	-0,470	0,003	0,281	0,083	-0,434	0,006
WISP2	-0,350	0,031	0,317	0,049	-0,238	0,144
CGI58	0,266	0,106	-0,256	0,116	0,063	0,705
ADRB2	0,470	0,003	-0,383	0,016	-0,013	0,938
PCK2	0,307	0,061	-0,344	0,032	0,358	0,025
CIDEA	0,313	0,063	-0,315	0,058	0,297	0,075
CIDEA (adipocyty)	0,419	0,011	-0,229	0,179	0,380	0,022
SIRT1	0,411	0,010	-0,320	0,047	0,293	0,070
ACOX1	-0,076	0,649	0,223	0,173	-0,207	0,206
CPT1A	-0,233	0,159	0,327	0,042	-0,505	0,001
LEP	-0,286	0,082	0,399	0,012	-0,448	0,004

R = Spearmanův korelační koeficient, tučně vyznačena statistická signifikance ($p < 0,05$)

Tabulka 11: Korelace procentuálního zastoupení adipocytů ve skupinách 70 - 80, 80 - 90, 120 - 130, 130 - 140 μm s vybranými geny a klinickými parametry

	Adipocyty 70 - 80 μm		Adipocyty 80 - 90 μm		Adipocyty 120 - 130 μm		Adipocyty 130 - 140 μm	
	R	p	R	p	R	p	R	p
VO ₂ max	0,553	<0,001	0,544	<0,001	-0,296	0,068	-0,426	0,007
HOMA-IR	-0,239	0,138	-0,226	0,161	0,231	0,151	0,150	0,356
M _{kg}	0,447	0,004	0,264	0,100	-0,289	0,071	-0,315	0,048
NEFA v krevním séru	-0,430	0,011	-0,321	0,064	0,178	0,314	0,311	0,073
DGAT2	-0,321	0,083	-0,289	0,121	0,243	0,196	0,345	0,062
ELOVL6	-0,234	0,231	-0,249	0,201	0,232	0,235	0,157	0,424
SREBF1	-0,258	0,168	-0,286	0,125	0,203	0,282	0,263	0,161
RUNX2	-0,435	0,016	-0,384	0,036	0,174	0,358	0,257	0,171
WISP2	-0,171	0,366	-0,288	0,123	0,054	0,777	0,174	0,358
CGI58	0,225	0,232	0,264	0,159	-0,174	0,357	-0,176	0,351
ADRB2	0,109	0,567	0,176	0,351	-0,202	0,285	-0,109	0,567
PCK2	0,417	0,022	0,261	0,164	-0,407	0,025	-0,301	0,106
CIDEA	0,527	0,004	0,354	0,064	-0,534	0,003	-0,543	0,003
CIDEA (adipocyty)	0,436	0,023	0,426	0,027	-0,285	0,149	-0,471	0,013
SIRT1	0,478	0,008	0,422	0,020	-0,528	0,003	-0,397	0,030
ACOX1	-0,354	0,055	-0,302	0,104	0,330	0,075	0,347	0,061
CPT1A	-0,447	0,013	-0,404	0,027	0,288	0,123	0,352	0,057
LEP	-0,552	0,002	-0,583	0,001	0,705	< 0,001	0,571	0,001

R = Spearmanův korelační koeficient, tučně vyznačena statistická signifikance ($p < 0,05$)

6. Diskuze

V této diplomové práci jsme se zabývali efektem pravidelné pohybové aktivity na tukovou tkáň u seniorů a zkoumali jsme, zda tyto změny v charakteristikách TT souvisí s obecně známými benefičními účinky pohybové aktivity na inzulínovou senzitivitu. Analyzovali jsme krevní séra a podkožní TT získanou pomocí jehlové biopsie z abdominální oblasti u 27 dlouhodobě trénovaných a 27 netrénovaných žen ve věku od 60 do 80 let. V krevním séru byly změřeny biochemické parametry a vzorky TT byly použity pro analýzu genové exprese a pro stanovení lipolytické aktivity v explantech tukové tkáně za bazálních a stimulovaných podmínek. Z TT byly dále izolovány maturované adipocyty, u nichž byla následně analyzována distribuce velikosti adipocytů a exprese několika vybraných genů.

6.1 Biochemické a antropometrické parametry

Ženy byly rozděleny do skupin na základě zátěžových testů a terénních testů zdatnosti. Trénované seniorky měly signifikantně vyšší maximální spotřebu kyslíku při zátěži a zároveň dosahovaly lepších výsledků v testech fyzické zdatnosti, zahrnující „Test sed-vztyk“ a „Test flexe v lokti“. Obdobné efekty jsou popisovány v řadě studií; například Todde a kol. uvádějí, že po tříměsíční cvičební intervenci došlo u seniorů k výraznému zlepšení fyzické zdatnosti, kterou testovali pomocí 6 testů (včetně námi použitých testů „Test sed-vztyk“ a „Test flexe v lokti“) (Todde et al., 2016).

Jak lze předpokládat, pravidelná pohybová aktivita měla pozitivní efekt na snížení množství TT. Trénované seniorky měly proti netrénovaným nižší celkovou hmotnost a nižší procentuální zastoupení tuku. Podobně pozorovali Steele a kol. u seniorů po šestiměsíčním cvičebním tréninku signifikantní pokles procentuálního zastoupení i absolutního množství tukové hmoty, a to bez současné změny v BMI (Steele et al., 2017). Nelze tedy vyloučit, že některé výsledky efektů pohybové aktivity v této práci jsou částečně ovlivněny rozdílnou adipozitou v obou skupinách.

U trénovaných seniorek byla také zjištěna lepší inzulínová senzitivita, a to jak na úrovni výsledků získaných z hyperinzulinového euglykemického clampu, tak i na úrovni indexu HOMA IR vypočítaného z hladin glukózy a inzulínu v krvi. Pozitivní vliv dlouhodobé cvičební intervence na inzulínovou senzitivitu u seniorů byl pozorován i v jiných studiích (Ko et al., 2016, Mason et al., 2011), v nichž zlepšení inzulínové senzitivity po cvičební intervenci souviselo především s váhovým úbytkem, respektive se snížením množství tukové hmoty subjektů.

Shrnutí: V souladu s publikovanými studiemi měly trénované seniorky méně tukové hmoty a lepší fyzickou zdatnost, která pozitivně korelovala s inzulínovou senzitivitou. Lze předpokládat, že pravidelná pohybová aktivita u seniorů zlepšuje inzulínovou senzitivitu především změnou tělesné kompozice, zejména pak redukcí tukové hmoty.

6.2 Distribuce velikosti adipocytů

V rámci studia tukové tkáně byla v řadě publikací zkoumána velikost adipocytů. Bylo zjištěno, že při obezitě mohou vznikat hypertrofické adipocyty, a že tyto zvětšené buňky sekretují větší množství leptinu a prozánětlivých mediátorů (IL6, TNF α) a jsou spojovány s inzulínovou rezistencí či cukrovkou 2. typu (Skurk et al., 2007). Později bylo zjištěno, že velikost adipocytů pozitivně koreluje s inzulínovou rezistencí a výskytem cukrovky 2. typu i u lidí s normální váhou (Acosta et al., 2016).

Stanovení distribuce velikosti adipocytů (procentuální zastoupení adipocytů ve 12 různých skupinách definovaných dle průměru adipocytu) u trénovaných a netrénovaných senierek ukázalo, že trénované seniorky měly větší procentuální zastoupení adipocytů ve skupinách s průměrem 70 – 80 μm a 80 – 90 μm a naopak měly méně větších adipocytů (110 – 120 μm). Obdobný vliv pravidelné pohybové aktivity na distribuci velikosti adipocytů byl pozorován u potkanů, a to jak u obézních zvířat (Giles et al., 2016), tak u potkanů s normální váhou (Miyazaki et al., 2010). U lidí jsou naproti tomu výsledky odlišné. Stinkens a kol. uvádějí, že po dvanáctitýdenní cvičební intervenci nedošlo ke změně distribuce velikosti podkožních adipocytů u obézních mužů s průměrným věkem 58 let (Stinkens et al., 2018). Obdobné výsledky publikovali i Van Pelt a kol., kteří zjistili podobnou distribuci velikosti adipocytů mezi skupinou pravidelně cvičících a necvičících lidí s nadváhou či obezitou (Van Pelt et al., 2017). Naproti tomu ve studii z roku 2006 se uvádí, že u obézních žen s průměrným věkem 58 let došlo po pětíměsíční cvičební a dietní intervenci k signifikantnímu poklesu velikosti adipocytů, přičemž samotná dietní intervence tento efekt nevyvolávala (You et al., 2006). Rozdílné výsledky těchto studií mohou být ovlivněny typem a délkou cvičební intervence, pohlavím subjektů, ale také odlišným způsobem analýzy velikosti adipocytů.

V naší práci jsme dále zkoumali, zda změna distribuce velikosti adipocytů souvisí s lepší inzulínovou senzitivitou, a zjistili jsme, že M_{kg} pozitivně koreluje s adipocyty s průměrem 70 – 80 μm a naopak negativně s hypertrofickými adipocyty s průměrem 130 – 140 μm . Tyto výsledky jsou v souladu s výše zmiňovanou studií (Acosta et al., 2016). Kuda a kol. se zabývali konceptem tzv. „zdravého adipocytu“, který představuje metabolický fenotyp

adipocytů spojený s lokálními i systémovými benefičními účinky, například na zánětlivý stav, ektopické ukládání tuku či inzulínovou senzitivitu. A zároveň předpokládají, že „zdravé adipocyty“ mají spíše menší velikost (Kuda et al., 2018). Negativní korelace mezi velikostí adipocytů a inzulínovou senzitivitou nalezená v této diplomové práci je v souladu s touto hypotézou.

Shrnutí: V současné době zatím nebyly publikovány žádné studie zabývající se vlivem pravidelné pohybové aktivity na velikost adipocytů u zdravých neobézních seniorů, a v tomto ohledu jsou tyto výsledky zcela nové. Pozorovali jsme, že trénované seniorky měly posunutou distribuci velikosti adipocytů směrem k menším adipocytům a že tento trend pozitivně koreluje s inzulínovou senzitivitou. Domníváme se tedy, že pohybová aktivita snižuje velikost adipocytů, a tím podporuje zdravý metabolický fenotyp adipocytů.

6.3 Genová exprese v tukové tkáni a v izolovaných adipocytech

a) Adipogeneze a lipogeneze

Stárnutí je asociováno se sníženou schopností preadipocytů replikovat se a dozrávat ve zralé adipocyty (Caso et al., 2013). V preadipocytech izolovaných z TT starých lidí byla zjištěna snížená exprese transkripčního faktoru PPAR γ ve srovnání s preadipocyty mladých lidí (Schipper et al., 2008). V této práci nebyl pozorován efekt pravidelné pohybové aktivity na expresi genu pro hlavní adipogenní faktor PPAR γ ani na geny typické pro maturované adipocyty FABP4 a PLIN1. Ruschke a kol. naopak uvádějí, že exprese PPAR γ v podkožní tukové tkáni lidí po čtyřtýdenní cvičební intervenci signifikantně stoupla, a to jak u skupiny lidí s normální glukózovou tolerancí, tak u lidí s poškozenou glukózovou tolerancí nebo u pacientů s cukrovkou 2. typu (Ruschke et al., 2010). Možným vysvětlením těchto rozdílných výsledků může být nižší věk subjektů v této publikované studii ve srovnání s naší prací zaměřenou na seniory. Dalším odlišným parametrem je pohlaví, neboť naší studie se účastnily pouze ženy, zatímco Ruschke a kol. měli ve své studii obě pohlaví.

Rozdíl mezi trénovanou a netrénovanou skupinou v této práci byl pozorován pouze na úrovni exprese genů kódující negativní regulátory adipogeneze. Trénované seniorky měly signifikantně nižší expresi genu RUNX2 a snížená exprese genu WISP2 byla na hranici signifikance ($p = 0,05$). Exprese genu RUNX2 navíc negativně korelovala s inzulínovou senzitivitou a s adipocyty s průměrem 70 – 80 μm a 80 – 90 μm a naopak pozitivně s HOMA IR. Jak již bylo zmíněno, mezi diferenciací adipocytů a osteocytů z MSC existuje vzájemná kontrola, které se účastní RUNX2 a WISP2. Tyto proteiny podporují osteogenní

linii a zároveň inhibují adipogenezi. V tomto ohledu by jejich snížená exprese mohla naznačovat zlepšenou adipogenezi TT u trénovaných žen.

Expresie lipogenních genů studovaných v této práci vykazovala mírné snížení u trénovaných seniorek ve srovnání s netrénovanými, avšak statisticky významný rozdíl mezi skupinami byl pouze u genu DGAT2. Na hranici signifikance byla snížená exprese genů ELOVL6 ($p = 0,09$) a SREBF1 ($p = 0,08$). Zajímavé je, že exprese těchto genů nekorelovala s $VO_2\max$ a nebyla pozorována ani souvislost s inzulínovou senzitivitou. Domníváme se tedy, že rozdílná exprese těchto genů mezi skupinami zřejmě nebude dána přímo mírou trénovanosti seniorek. Spíše by mohla pohybová aktivita snižovat lipogenezi redukcí tukové hmoty. Tento efekt byl pozorován v nedávné studii, ve které lidé s nadváhou či obezitou podstoupili třítydenní cvičební intervenci a kalorickou restrikcí (Walhin et al., 2016). Autoři zde uvádějí pokles celkové hmotnosti i množství tukové hmoty a zároveň pozorovali snížení exprese genů účastnících se *de novo* lipogeneze (SREBF1 a FAS) v podkožní TT. Nicméně bude třeba provést další studie pro lepší pochopení efektu pravidelné pohybové aktivity na lipogenezi v TT.

Shrnutí: Trénované seniorky měly nižší genovou expresi inhibitorů adipogeneze RUNX2 a WISP2, což by mohl být potenciální způsob, kterým pohybová aktivita zlepšuje míru adipogeneze u seniorů. Na základě negativních korelací RUNX2 s inzulínovou senzitivitou a velikostí adipocytů se domníváme, že podíl menších adipocytů u trénovaných seniorek by mohl souviset s touto zvýšenou adipogenezí. U trénované skupiny jsme dále zjistili sníženou expresi několika genů účastnících se lipogeneze, avšak pouze rozdíl v expresi DGAT2 byl signifikantní. Vzhledem k tomu, že exprese lipogenních genů nekorelovala s $VO_2\max$, usuzujeme, že pravidelná pohybová aktivita nemá přímý efekt na expresi těchto genů a neprokázali jsme ani souvislost exprese lipogenních genů s velikostí adipocytů nebo s inzulínovou senzitivitou.

b) Lipolýza a glyceroneogeneze

Ve stáří byla pozorována zhoršená lipolytická odpověď na hormonální signalizaci zprostředkovanou katecholaminy, která je aktivována například při hladovění či fyzické aktivitě (Lonnqvist et al., 1990). Již dříve bylo na úrovni sekrece glycerolu adipocyty ukázáno, že pohybová aktivita zlepšuje u obézních mužů lipolytickou odpověď na isoproterenol, což je nespecifický agonista β -adrenergických receptorů (Stich et al., 1999). My jsme v naší studii pozorovali u trénovaných seniorek zvýšenou expresi genu CGI58, který působí jako aktivátor ATGL při hormonální stimulaci, a zároveň i vyšší expresi genu kódujícího β -2 adrenergní receptor (ADRB2). Navýšení proteinů CGI58 a ADRB2 v TT by

mohlo být jedním ze způsobů, kterým pravidelná pohybová aktivita zlepšuje lipolytickou odpověď na hormonální stimulaci. V souladu s našimi výsledky z genové exprese bylo objeveno u potkanů po osmitýdenním tréninku zvýšené množství proteinu CGI58 v epididimální TT (Ramos et al., 2016). Ačkoli v této studii pozorovali autoři také zvýšenou expresi proteinu ATGL u trénovaných potkanů, my jsme nezaznamenali žádný signifikantní rozdíl v genové expresi ATGL mezi skupinami, stejně jako se nelišila exprese genu HSL, G0S2, ADRB1 a ADA.

U obézních jedinců bývá stejně jako u seniorů popisována zhoršená lipolytická odpověď na hormonální stimulaci. Obézní lidé mají však často zvýšenou i bazální lipolýzu (Morigny et al., 2016), která u seniorů nebyla prokázána (Lonnqvist et al., 1990). Potenciální inhibiční efekt na bazální lipolýzu může mít protein CIDEA, který je asociován s lipidovou kapénkou a pravděpodobně reguluje lipolýzu v TT. Bylo prokázáno, že exprese CIDEA je výrazně snižena u obézních lidí ve srovnání s lidmi s normální váhou a že exprese CIDEA negativně koreluje s bazální lipolýzou, velikostí adipocytů a s inzulínovou rezistencí (HOMA IR) (Nordstrom et al., 2005). Trénované seniorky v této práci mají zvýšenou expresi genu CIDEA v TT, což naznačuje potenciální inhibiční efekt pravidelné pohybové aktivity na míru bazální lipolýzy. Zvýšená exprese genu CIDEA v epididimální TT byla pozorována také u potkanů po osmitýdenním cvičebním tréninku (Rocha-Rodrigues et al., 2016). Vzhledem k prokázané odlišné lokalizaci CIDEA u potkanů a lidí (u potkanů je CIDEA výhradně exprimována v běžových a hnědých adipocytech), však nelze tyto výsledky získané na potkanech příliš srovnávat s našimi výsledky. U lidí zatím nebyl zkoumán efekt pohybové aktivity na expresi CIDEA v TT. V naší studii se míra bazální lipolýzy stanovená na základě sekrece glycerolu explanty TT u trénovaných a netrénovaných seniorek nelišila, avšak hladina NEFA v krevním séru byla snižena u trénovaných žen, což by mohlo naznačovat sníženou míru bazální lipolýzy v TT. Exprese CIDEA v TT navíc pozitivně korelovala s inzulínovou senzitivitou a adipocyty s průměrem 70 – 80 μm a 80 – 90 μm a naopak negativně korelovala s hypertrofickými adipocyty. Tedy menší adipocyty obsahující zřejmě menší lipidové kapénky mají nižší bazální lipolýzu, což souvisí i s vyšším obsahem/expresí CIDEA. Je však třeba vzít v úvahu, že vzhledem k výrazně snížené expresi genu CIDEA u obézních lidí mohou být naše výsledky závislé na rozdílném procentuálním zastoupení tukové hmoty mezi trénovanou a netrénovanou skupinou seniorek.

Současně s lipolýzou probíhá v adipocytech také reesterifikace MK, a tento cyklus pomáhá regulovat hladinu MK v cirkulaci. Rychlost reesterifikace MK je dána především dostupností glycerol-3-fosfátu, na jehož tvorbě se v rámci glyceroneogeneze podílí enzymy

PCK a PDK4. Na myších modelech bylo zjištěno, že ve stáří dochází ke zhoršené reesterifikaci MK, která je asociována se sníženým množstvím enzymu PCK1 v epididimální TT (Mennes et al., 2014). Podobně jako zvýšená genová exprese PCK2 u trénovaných senierek v této práci byla pozorována zvýšená mRNA exprese PCK1 v subkutánní tukové tkáni u trénovaných mladých mužů ve srovnání s netréňovanými (Bertholdt et al., 2018). V této studii autoři uvádějí taktéž zvýšenou expresi genu PDK4 u trénovaných mužů, což jsme v této práci nepotvrdili. Rozdíl v efektu pravidelné pohybové aktivity na expresi PDK4 mezi touto a naší studií může být dán odlišným pohlavím a věkem subjektů.

Shrnutí: Trénované seniorky měly vyšší expresi genů CGI58, ADRB2 a PCK2 v TT ve srovnání s netréňovanými seniorkami. Tyto výsledky naznačují, že pravidelná pohybová aktivita může zlepšovat lipolytickou odpověď na hormonální stimulaci pomocí zvýšené exprese adrenergního receptoru (ADRB2) a aktivátoru ATGL (CGI58) a pravděpodobně zvyšuje glyceroneogenezi skrze zvýšenou expresi PCK2. Glyceroneogeneze prostřednictvím dostupnosti glycerol-3-fosfátu stimuluje reesterifikaci MK. Exprese PCK2 navíc pozitivně korelovala s inzulínovou senzitivitou a negativně s procentuálním zastoupením hypertrofických adipocytů, což by bylo v souladu s konceptem „zdravého adipocytu“, ve kterém se předpokládá zvýšené cyklování TAG a MK. Stejná souvislost s inzulínovou senzitivitou a velikostí adipocytů byla zjištěna také u exprese genu CIDEA, která byla signifikantně vyšší u trénované skupiny. Interpretace tohoto výsledku je nicméně obtížná, protože nejsou ještě zcela prozkoumány účinky tohoto proteinu. V literatuře je popisován jeho inhibiční efekt u bazální lipolýzy. Zároveň je pravděpodobné, že exprese tohoto genu je ovlivněna rozdílným množstvím tukové hmoty mezi trénovanou a netréňovanou skupinou.

c) Mitochondriální biogeneze a metabolismus

Na myších modelech bylo ukázáno, že pravidelná pohybová aktivita zvyšuje mitochondriální biogenezi a stimuluje aktivitu enzymů respiračního řetězce a oxidativní fosforylace (Stanford et al., 2015). V této diplomové práci byla analyzována exprese genu PGC1 α , který kóduje hlavní marker mitochondriální biogeneze, a exprese genu SIRT1, který je aktivátorem PGC1 α . Na rozdíl od výsledků pozorovaných u myší (Lehning et al., 2019) se exprese PGC1 α nelišila mezi trénovanými a netréňovanými seniorkami. Podobně nebyl efekt pravidelné pohybové aktivity na expresi PGC1 α v podkožní TT pozorován ani u zdravých mladých mužů (Alvehus et al., 2014), což poukazuje na odlišné působení fyzické aktivity na expresi tohoto genu u lidí a myší.

K mitochondriální biogenezi u lidí by mohla přispívat zvýšená genová exprese SIRT1, kterou jsme pozorovali u trénovaných senierek. Stejně jako v této práci, došlo u obézních

jedinců po roční cvičební intervenci ke zvýšení mRNA exprese SIRT1 v podkožní TT (Rappou et al., 2016), ačkoli v jiné práci byla u mladých mužů po osmítýdenní cvičební intervenci mRNA exprese SIRT1 snížena (Alvehus et al., 2014). Navíc genová exprese SIRT1 je u obézních lidí snížena ve srovnání s hubenými (Rappou et al., 2016), stejně jako je tomu u starých lidí ve srovnání s mladými (Yuan et al., 2016). Zdá se tedy pravděpodobné, že pravidelná pohybová aktivita nezvyšuje genovou expresi SIRT1, ale spíše působí proti jejímu poklesu, který je typický u seniorů a obézních lidí. Exprese genu SIRT1 v TT je pozitivně asociována s inzulinovou senzitivitou, a naopak negativně koreluje s množstvím hypertrofických adipocytů.

V rámci experimentů s mezenchymálními kmenovými buňkami izolovanými z lidské TT byl popsán také pozitivní efekt SIRT1 na formování běžových adipocytů (Khanh et al., 2018). V této souvislosti jsme provedli analýzu genové exprese UCP1 v TT seniorek, avšak exprese tohoto genu byla u obou skupin příliš nízká pro detekci pomocí qPCR. Fakt, že pravidelná pohybová aktivita nezvyšuje hnědnutí adipocytů u lidí, je v souladu s nejnovějšími publikacemi zabývajícími se touto problematikou (Dinas et al., 2017, Nakhuda et al., 2016, Tsiloulis et al., 2018).

Mezi hlavní funkce mitochondrií patří tvorba ATP v rámci respiračního řetězce a oxidativní fosforylace. V této práci nebyl mezi trénovanými a netrénovanými seniorkami zjištěn žádný rozdíl v genové expresi podjednotky IV. komplexu respiračního řetězce (COX6C), podjednotky ATPsyntázy (ATP50) ani jejich regulátoru NRF1. V souladu s tím jsou výsledky studie, ve které nebyl pozorován žádný efekt tříměsíční cvičební intervence na množství proteinů respiračního řetězce a oxidativní fosforylace v TT u obézních mužů (Stinkens et al., 2018). Avšak u zdravých mužů s normální váhou byl prokázán signifikantní nárůst exprese genů a proteinů respiračního řetězce a oxidativní fosforylace (včetně COX6C a ATP50) v TT po šestiměsíční cvičební intervenci (Bertholdt et al., 2018, Ronn et al., 2014). Tyto odlišné výsledky naznačují, že u obézních lidí a seniorů, kteří mají dysfunkční TT, nezvyšuje pravidelná pohybová aktivita kapacitu pro respirační řetězec a oxidativní fosforylaci, respektive ne na úrovni genové a proteinové exprese enzymových komplexů účastnících se těchto metabolických drah.

Změna β -oxidace MK je další parametr, který může být ovlivněn pohybovou aktivitou. Efekt pohybové aktivity u β -oxidace MK byl zkoumán hlavně v kosterní svalovině, ve které bylo pozorováno i po krátkodobém tréninku zvýšení β -oxidace MK. K tomuto efektu přispívá kromě zvýšené mitochondriální biogeneze také navýšení počtu transportérů MK přes plazmatickou (CD36) a mitochondriální membránu (CPT1) v kosterní svalovině (Tunstall et

al., 2002, Yoshida et al., 2013). V tukové tkáni jsme proti předpokladu zjistili sníženou expresi genů ACOX1 a CPT1A u trénovaných seniorek ve srovnání s netrénovanými. Zároveň exprese těchto genů nekorelovala s $VO_2\text{max}$ a není tedy zřejmě přímo ovlivněna fyzickou zdatností. Efekt pohybové aktivity na β -oxidaci MK v podkožní TT nebyl pozorován ani u lidí s nadváhou (Larsen et al., 2015). Genová exprese ACOX1 a CPT1A pozitivně korelovala s velikostí adipocytů, což naznačuje, že β -oxidaci jako zdroj energie využívají více velké adipocyty. Negativní korelace exprese CPT1A s inzulínovou senzitivitou, zdá se, potvrzuje tento trend – tedy že nižší transport a využití MK v metabolismu adipocytu je pravděpodobně celotělově benefiční.

Shrnutí: Trénované seniorky měly zvýšenou expresi genu SIRT1, která by mohla vést ke zvýšené mitochondriální biogenezi a stimulaci hnědnutí adipocytů. Další analyzované geny související s těmito drahami však tyto efekty na genové úrovni nepotvrzují. Naopak snížená exprese genů pro β -oxidaci naznačuje spíše sníženou aktivitu této metabolické dráhy. V této práci byla zkoumána pouze genová exprese, avšak pokud mají adipocyty u seniorů reálně sníženou β -oxidaci MK a pokud je tento stav asociovaný s lepší inzulínovou senzitivitou, mohlo by to znamenat, že „zdravé adipocyty“ používají jako zdroj energie přednostně glukózu a MK spíše poskytují ostatním tkáním. Nicméně pozorované snížení exprese genů β -oxidace MK v této práci zřejmě není přímo ovlivněno mírou trénovanosti seniorek, ale spíše množstvím TT. Souvislost mezi zdravým fenotypem adipocytů a metabolickými drahami produkujícími ATP, bude nutno potvrdit v dalších analýzách na úrovni exprese proteinů či metabolické aktivity těchto drah.

d) Adipokiny a cytokiny

V souvislosti s regulací metabolismu byla také zkoumána exprese sekretovaných adipokinů v TT. Trénované seniorky měly signifikantně sníženou mRNA expresi leptinu, která ovšem nebyla asociována s fyzickou zdatností ($VO_2\text{max}$). Dále bylo zjištěno, že genová exprese leptinu pozitivně koreluje s velikostí adipocytů a negativně s inzulínovou senzitivitou. Tyto výsledky jsou v souladu s mnoha publikovanými pracemi ukazujícími souvislost mezi hladinami leptinu a množstvím tukové tkáně, velikostí adipocytů a inzulínovou senzitivitou (Considine et al., 1996, Lopez-Jaramillo et al., 2014, Skurk et al., 2007). Podobné výsledky byly ukázány také na studii s trénovanými a netrénovanými potkany, ve které se mRNA exprese leptinu v epididimální a inguinální TT signifikantně nelišila mezi oběma skupinami, avšak byla zjištěna pozitivní korelace mezi velikostí adipocytů a mRNA expresí leptinu (Miyazaki et al., 2010). U starších lidí s lehkou obezitou bylo ukázáno, že mRNA exprese leptinu v podkožní TT je asociována s váhovým úbytkem a

že samotná cvičební intervence nevede ke snížení exprese leptinu (Campbell et al., 2013). Zároveň nebyl v této studii pozorován vliv pohybové aktivity ani na genovou expresi adiponektinu a prozánětlivých mediátorů IL6 a MCP1, což je v souladu s našimi výsledky.

Shrnutí: Trénované seniorky měly sníženou mRNA expresi leptinu, která ovšem nekorelovala s $VO_2\max$. Podobně jako u publikovaných prací se domníváme, že námi pozorovaný rozdíl mezi skupinami je dán spíše nižším procentuálním zastoupením tukové hmoty u trénovaných seniorek, než mírou jejich trénovanosti. Potvrdili jsme však, že genová exprese leptinu v TT pozitivně koreluje s velikostí adipocytů a s inzulinovou rezistencí. Genová exprese adiponektinu a prozánětlivých mediátorů IL6 a MCP1 v TT nebyla ovlivněna mírou pohybové aktivity nebo množstvím TT.

e) Genová exprese v izolovaných adipocytech

Jelikož tuková tkáň obsahuje více buněčných typů, neodráží exprese v celé tkáni pouze změny v metabolismu adipocytů. Proto byla provedena analýza genové exprese také v izolovaných adipocytech. Bylo vybráno 7 genů, jejichž relativní exprese v adipocytech byla porovnána s jejich relativní expresí v TT. U všech analyzovaných genů byl pozorován podobný efekt pohybové aktivity na jejich expresi jako v TT, pouze u genu CPT1A rozdíl v izolovaných adipocytech mezi trénovanými a netrénovanými ženami nebyl signifikantní. Tento rozdíl v signifikanci u exprese CPT1A v TT a izolovaných adipocytech je zřejmě dán velkými odchylkami u jednotlivých subjektů.

Shrnutí: V této diplomové práci jsme potvrdili, že výsledky z analýzy genové exprese v tukové tkáni odpovídají výsledkům získaným z izolovaných adipocytů, respektive jsme nenašli významný rozdíl v relativní expresi genů FAS, HSL, CIDEA, PGC1 α , UCP1, CPT1A a ADIPOQ ve vzorcích tukové tkáně a izolovaných adipocytů.

6.4 Bazální a stimulovaná lipolýza

Efekt pravidelné pohybové aktivity na lipolýzu u seniorů jsme studovali kromě genové exprese také na základě koncentrace lipolytických metabolitů (NEFA, glycerol) v krevním séru a v mediu kondiciovaném explanty TT. Koncentrace hlavního markeru lipolýzy glycerolu v krevním séru se mezi trénovanou a netrénovanou skupinou nelišila. Stejný výsledek uvádějí i Lange a kol., kteří studovali efekt dvanáctitýdenní cvičební intervence na lipolýzu u seniorek (Lange et al., 2001). V této studii autoři nepozorovali ani efekt cvičební intervence na koncentraci NEFA v krvi. Trénované seniorky v naší práci měly naproti tomu sníženou hladinu NEFA v krevním séru. Benefiční účinek snížené koncentrace NEFA

v krevním séru podporuje její negativní korelace s inzulínovou senzitivitou a s adipocyty s průměrem 70 – 80 μm . Jelikož sérové hladiny NEFA odrážejí spíše jejich celotělový obrat, nelze z tohoto výsledku určit, zda jde o efekt lipolýzy. Nelze však ani vyloučit, že jistá míra snížené bazální lipolýzy může hrát roli v těchto snížených hladinách NEFA u trénovaných žen.

Hladina glycerolu v médiích kondiciovaných explanty TT se mezi trénovanou a netrénovanou skupinou nelišila. Avšak při indukci lipolýzy isoproterenolem byl pozorován větší nárůst koncentrace glycerolu u trénovaných seniorek. Zvýšená lipolytická odpověď na isoproterenol byla ukázána také u obézních mužů po dvanáctitýdenním aerobním tréninku (Stich et al., 1999). Tyto výsledky získané na explantech TT jsou v souladu s výsledky získanými v rámci genové exprese, ve které jsme zjistili vyšší expresi genů souvisejících s hormonálně stimulovanou lipolýzou (CGI58, ADRB2).

Shrnutí: Pravidelná pohybová aktivita zlepšuje u seniorek lipolytickou odpověď na hormonální stimulaci, a to jak na úrovni genové exprese, tak na úrovni sekrece glycerolu explanty TT. Bazální lipolýza naproti tomu není jednoznačně ovlivněna mírou trénovanosti.

7. Závěr

Dlouhodobě trénované seniorky měly ve srovnání s netrénovanými lepší fyzickou zdatnost, která pozitivně korelovala s inzulínovou senzitivitou. Zároveň vykazovaly trénované seniorky nižší procentuální zastoupení tukové hmoty, což je zřejmě jeden z mechanismů, kterým pravidelná pohybová aktivita zlepšuje inzulínovou senzitivitu.

Dále byl prokázán efekt pravidelné pohybové aktivity na distribuci velikosti adipocytů. Trénované seniorky měly ve srovnání s netrénovanými více menších adipocytů a naopak méně hypertrofických adipocytů. Tento posun v distribuci velikosti adipocytů byl také asociován s lepší inzulínovou senzitivitou.

V tukové tkáni seniorek byla stanovena exprese 36 genů, z nichž se 10 genů signifikantně lišilo mezi skupinami. Konkrétně byla u trénovaných seniorek ve srovnání s netrénovanými zjištěna zvýšená exprese genů CGI58, ADRB2, CIDEA, PCK2, SIRT1 a snížená exprese genů RUNX2, DGAT2, CPT1A, ACOX1, LEP. Tyto výsledky naznačují, že pravidelná pohybová aktivita ovlivňuje expresi genů ve směru adipogeneze na úkor osteogeneze a moduluje geny související s lipolýzou a glyceroneogenezí. Dále pohybová aktivita snižuje geny spojené s β -oxidací MK a lipogenezí a ovlivňuje expresi adipokinů sekretovaných TT.

U vybraných genů byla stanovena exprese v izolovaných adipocytech a tyto výsledky potvrdily, že genová exprese v TT odpovídá především expresi v adipocytech.

Na úrovni sekrece glycerolu explanty TT byla pozorována vyšší lipolytická odpověď na stimulaci isoproterenolem u trénovaných seniorek, což potvrzuje výsledky získané na úrovni genové exprese (CGI58, ADRB2).

Expresí genů účastnících se lipogeneze, β -oxidace MK a genová exprese leptinu nekorelovala s $VO_2\max$, a není tedy zřejmě primárně asociována s mírou trénovanosti a spíše souvisí s rozdílným množstvím tukové tkáně mezi skupinami. Většina změn v genové expresi pozorovaných mezi skupinami byla asociována s lepší inzulínovou senzitivitou a s posunem distribuce velikosti adipocytů směrem k menším adipocytům, ovšem i tyto výsledky mohou být závislé na rozdílném procentuálním zastoupení tukové hmoty mezi trénovanými a netrénovanými seniorkami.

8. Seznam použité literatury

- ACOSTA, J. R., DOUAGI, I., ANDERSSON, D. P., BACKDAHL, J., RYDEN, M., ARNER, P. & LAURENCIKIENE, J. 2016. Increased fat cell size: a major phenotype of subcutaneous white adipose tissue in non-obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 59, 560-70.
- ALTAREJOS, J. Y. & MONTMINY, M. 2011. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 141-51.
- ALVEHUS, M., BOMAN, N., SODERLUND, K., SVENSSON, M. B. & BUREN, J. 2014. Metabolic adaptations in skeletal muscle, adipose tissue, and whole-body oxidative capacity in response to resistance training. *Eur J Appl Physiol*, 114, 1463-71.
- ANDERSSON, D. P., ERIKSSON HOGGING, D., THORELL, A., TOFT, E., QVISTH, V., NASLUND, E., THORNE, A., WIREN, M., LOFGREN, P., HOFFSTEDT, J., DAHLMAN, I., MEJHERT, N., RYDEN, M., ARNER, E. & ARNER, P. 2014. Changes in subcutaneous fat cell volume and insulin sensitivity after weight loss. *Diabetes Care*, 37, 1831-6.
- ARNER, P., ARNER, E., HAMMARSTEDT, A. & SMITH, U. 2011. Genetic predisposition for Type 2 diabetes, but not for overweight/obesity, is associated with a restricted adipogenesis. *PLoS One*, 6, e18284.
- ARNER, P. & LANGIN, D. 2014. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 255-62.
- BAE, J. Y. 2018. Aerobic Exercise Increases Meteorin-Like Protein in Muscle and Adipose Tissue of Chronic High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Biomed Res Int*, 2018, 6283932.
- BAI, Y. & SUN, Q. 2015. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obes Rev*, 16, 127-36.
- BANERJI, M. A., BUCKLEY, M. C., CHAIKEN, R. L., GORDON, D., LEOVITZ, H. E. & KRAL, J. G. 1995. Liver fat, serum triglycerides and visceral adipose tissue in insulin-sensitive and insulin-resistant black men with NIDDM. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 19, 846-50.
- BERTHOLDT, L., GUDIENSEN, A., STANKIEWICZ, T., VILLESSEN, I., TYBIRK, J., VAN HALL, G., BANGSBO, J., PLOMGAARD, P. & PILEGAARD, H. 2018. Impact of training state on fasting-induced regulation of adipose tissue metabolism in humans. *J Appl Physiol (1985)*, 124, 729-740.
- BOENGLER, K., KOSIOL, M., MAYR, M., SCHULZ, R. & ROHRBACH, S. 2017. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 8, 349-369.
- BONZON-KULICHENKO, E., MOLTO, E., PINTADO, C., FERNANDEZ, A., ARRIBAS, C., SCHWUDKE, D., GALLARDO, N., SHEVCHENKO, A. & ANDRES, A. 2018. Changes in Visceral Adipose Tissue Plasma Membrane Lipid Composition in Old Rats Are Associated With Adipocyte Hypertrophy With Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 73, 1139-1146.
- BRAIDY, N., GUILLEMIN, G. J., MANSOUR, H., CHAN-LING, T., POLJAK, A. & GRANT, R. 2011. Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One*, 6, e19194.
- BROCHU-GAUDREAU, K., REHFELDT, C., BLOUIN, R., BORDIGNON, V., MURPHY, B. D. & PALIN, M. F. 2010. Adiponectin action from head to toe. *Endocrine*, 37, 11-32.
- 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, 2272-9.

- CAMPBELL, K. L., FOSTER-SCHUBERT, K. E., MAKAR, K. W., KRATZ, M., HAGMAN, D., SCHUR, E. A., HABERMANN, N., HORTON, M., ABBENHARDT, C., KUAN, L. Y., XIAO, L., DAVISON, J., MORGAN, M., WANG, C. Y., DUGGAN, C., MCTIERNAN, A. & ULRICH, C. M. 2013. Gene expression changes in adipose tissue with diet- and/or exercise-induced weight loss. *Cancer Prev Res (Phila)*, 6, 217-31.
- 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, E1063-9.
- CARPENTER, A. E., JONES, T. R., LAMPRECHT, M. R., CLARKE, C., KANG, I. H., FRIMAN, O., GUERTIN, D. A., CHANG, J. H., LINDQUIST, R. A., MOFFAT, J., GOLLAND, P. & SABATINI, D. M. 2006. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol*, 7, R100.
- CASO, G., MCNURLAN, M. A., MILEVA, I., ZEMLYAK, A., MYNARCIK, D. C. & GELATO, M. C. 2013. Peripheral fat loss and decline in adipogenesis in older humans. *Metabolism*, 62, 337-40.
- CINTI, S., MITCHELL, G., BARBATELLI, G., MURANO, I., CERESI, E., FALIOIA, 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, 2347-55.
- COLEMAN, R. A. & LEE, D. P. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*, 43, 134-76.
- CONSIDINE, R. V., SINHA, M. K., HEIMAN, M. L., KRIAUCIUNAS, A., STEPHENS, T. W., NYCE, M. R., OHANNESIAN, J. P., MARCO, C. C., MCKEE, L. J., BAUER, T. L. & ET AL. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334, 292-5.
- COPPACK, S. W. 2001. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, 60, 349-56.
- CRUJEIRAS, A. B., CARREIRA, M. C., CABIA, B., ANDRADE, S., AMIL, M. & CASANUEVA, F. F. 2015. Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sci*, 140, 57-63.
- DE GLISEZINSKI, I., CRAMPES, F., HARANT, I., BERLAN, M., HEJNOVA, J., LANGIN, D., RIVIERE, D. & STICH, V. 1998. Endurance training changes in lipolytic responsiveness of obese adipose tissue. *Am J Physiol*, 275, E951-6.
- DE MEYTS, P., FEINGOLD, K. R., ANAWALT, B., BOYCE, A., CHROUSOS, G., DUNGAN, K., GROSSMAN, A., HERSHMAN, J. M., KALTSAS, G., KOCH, C., KOPP, P., KORBONITS, M., MCLACHLAN, R., MORLEY, J. E., NEW, M., PERREAULT, L., PURNELL, J., REBAR, R., SINGER, F., TRENCE, D. L., VINIK, A. & WILSON, D. P. 2000. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. *Endotext*. South Dartmouth (MA), 27, 2000-2016
- DENINO, W. F., TCHERNOF, A., DIONNE, I. J., TOTH, M. J., ADES, P. A., SITES, C. K. & POEHLMAN, E. T. 2001. Contribution of abdominal adiposity to age-related differences in insulin sensitivity and plasma lipids in healthy nonobese women. *Diabetes Care*, 24, 925-32.
- DINAS, P. C., VALENTE, A., GRANZOTTO, M., ROSSATO, M., VETTOR, R., ZACHAROPOULOU, A., CARRILLO, A. E., DAVIES, N. A., GKIATA, P., JAMURTAS, A. Z., KOUTEDAKIS, Y., METSIOS, G. S. & FLOURIS, A. D. 2017. Browning formation markers of subcutaneous adipose tissue in relation to resting energy expenditure, physical activity and diet in humans. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 31.
- ESCOS, M., LATORRE, P., HIDALGO, J., HURTADO-GUERRERO, R., CARRODEGUAS, J. A. & LOPEZ-BUESA, P. 2016. Kinetic and functional properties of human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Biophys Rep*, 7, 124-129.

- GAO, G., CHEN, F. J., ZHOU, L., SU, L., XU, D., XU, L. & LI, P. 2017. Control of lipid droplet fusion and growth by CIDE family proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1862, 1197-1204.
- GILES, E. D., STEIG, A. J., JACKMAN, M. R., HIGGINS, J. A., JOHNSON, G. C., LINDSTROM, R. C. & MACLEAN, P. S. 2016. Exercise Decreases Lipogenic Gene Expression in Adipose Tissue and Alters Adipocyte Cellularity during Weight Regain After Weight Loss. *Front Physiol*, 7, 32.
- GOOSSENS, G. H. & BLAAK, E. E. 2015. Adipose tissue dysfunction and impaired metabolic health in human obesity: a matter of oxygen? *Front Endocrinol (Lausanne)*, 6, 55.
- GRUNBERG, J. R., ELVIN, J., PAUL, A., HEDJAZIFAR, S., HAMMARSTEDT, A. & SMITH, U. 2018. CCN5/WISP2 and metabolic diseases. *J Cell Commun Signal*, 12, 309-318.
- HEATON, J. M. 1972. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat*, 112, 35-9.
- CHEN, H. C., SMITH, S. J., LADHA, Z., JENSEN, D. R., FERREIRA, L. D., PULAWA, L. K., MCGUIRE, J. G., PITAS, R. E., ECKEL, R. H. & FARESE, R. V. 2002. Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 1049-1055.
- IBRAHIM, M. M. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*, 11, 11-8.
- IMAI, S. & GUARENTE, L. 2014. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol*, 24, 464-71.
- JAMES, A. W. 2013. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 684736.
- JOHANSSON, S. M., LINDGREN, E., YANG, J. N., HERLING, A. W. & FREDHOLM, B. B. 2008. Adenosine A1 receptors regulate lipolysis and lipogenesis in mouse adipose tissue-interactions with insulin. *Eur J Pharmacol*, 597, 92-101.
- KAJIMURA, S., SPIEGELMAN, B. M. & SEALE, P. 2015. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab*, 22, 546-59.
- KANG, D., KIM, S. H. & HAMASAKI, N. 2007. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*, 7, 39-44.
- KARAGIANNIDES, I., TCHKONIA, T., DOBSON, D. E., STEPPAN, C. M., CUMMINS, P., CHAN, G., SALVATORI, K., HADZOPOULOU-CLADARAS, M. & KIRKLAND, J. L. 2001. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280, R1772-80.
- KHANH, V. C., ZULKIFLI, A. F., TOKUNAGA, C., YAMASHITA, T., HIRAMATSU, Y. & OHNEDA, O. 2018. Aging impairs beige adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells via the reduced expression of Sirtuin 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 500, 682-690.
- KIM, J. H., LIU, X., WANG, J., CHEN, X., ZHANG, H., KIM, S. H., CUI, J., LI, R., ZHANG, W., KONG, Y., ZHANG, J., SHUI, W., LAMPLLOT, J., ROGERS, M. R., ZHAO, C., WANG, N., RAJAN, P., TOMAL, J., STATZ, J., WU, N., LUU, H. H., HAYDON, R. C. & HE, T. C. 2013. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 5, 13-31.
- KO, G., DAVIDSON, L. E., BRENNAN, A. M., LAM, M. & ROSS, R. 2016. Abdominal Adiposity, Not Cardiorespiratory Fitness, Mediates the Exercise-Induced Change in Insulin Sensitivity in Older Adults. *PLoS One*, 11, e0167734.
- KUDA, O., ROSSMEISL, M. & KOPECKY, J. 2018. Omega-3 fatty acids and adipose tissue biology. *Mol Aspects Med*, 64, 147-160.

- KUK, J. L., SAUNDERS, T. J., DAVIDSON, L. E. & ROSS, R. 2009. Age-related changes in total and regional fat distribution. *Ageing Res Rev*, 8, 339-48.
- KUMARI, M., HEEREN, J. & SCHEJA, L. 2018. Regulation of immunometabolism in adipose tissue. *Semin Immunopathol*, 40, 189-202.
- KWOK, K. H., LAM, K. S. & XU, A. 2016. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med*, 48, e215.
- LAAKSONEN, D. E., NISKANEN, L., NYSSONEN, K., PUNNONEN, K., TUOMAINEN, T. P., VALKONEN, V. P., SALONEN, R. & SALONEN, J. T. 2004. C-reactive protein and the development of the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetologia*, 47, 1403-10.
- LAFONTAN, M. & LANGIN, D. 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*, 48, 275-97.
- LAMPIDONIS, A. D., ROGDAKIS, E., VOUTSINAS, G. E. & STRAVOPODIS, D. J. 2011. The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis. *Gene*, 477, 1-11.
- LAMPRECHT, M. R., SABATINI, D. M. & CARPENTER, A. E. 2007. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques*, 42, 71-5.
- LANGE, K. H., LORENTSEN, J., ISAKSSON, F., JUUL, A., RASMUSSEN, M. H., CHRISTENSEN, N. J., BULOW, J. & KJAER, M. 2001. Endurance training and GH administration in elderly women: effects on abdominal adipose tissue lipolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, E886-97.
- LARSEN, S., DANIELSEN, J. H., SONDERGARD, S. D., SOGAARD, D., VIGELSOE, A., DYBBOE, R., SKAABY, S., DELA, F. & HELGE, J. W. 2015. The effect of high-intensity training on mitochondrial fat oxidation in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Scand J Med Sci Sports*, 25, e59-69.
- LEHNIG, A. C., DEWAL, R. S., BAER, L. A., KITCHING, K. M., MUNOZ, V. R., ARTS, P. J., SINDELDECKER, D. A., MAY, F. J., LAURITZEN, H., GOODYEAR, L. J. & STANFORD, K. I. 2019. Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. *iScience*, 11, 425-439.
- LENTZ, T. L. 1971. *Cell fine structure: An atlas of drawings of whole-cell structure*, Saunders.
- LI, M., BAI, Y., JIANFEI, C., XIAODONG, X., YUANYUAN, D. & JING, Z. 2014. Effects of different exercise intensity on PPARgamma and relative index in adolescent obesity rats. *Wei Sheng Yan Jiu*, 43, 732-7.
- LONNQVIST, F., NYBERG, B., WAHRENBERG, H. & ARNER, P. 1990. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue of the elderly. *J Clin Invest*, 85, 1614-21.
- LOPEZ-JARAMILLO, P., GOMEZ-ARBELAEZ, D., LOPEZ-LOPEZ, J., LOPEZ-LOPEZ, C., MARTINEZ-ORTEGA, J., GOMEZ-RODRIGUEZ, A. & TRIANA-CUBILLOS, S. 2014. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 18, 37-45.
- LUMENG, C. N., LIU, J., GELETKA, L., DELANEY, C., DELPROPOSTO, J., DESAI, A., OATMEN, K., MARTINEZ-SANTIBANEZ, G., JULIUS, A., GARG, S. & YUNG, R. L. 2011. Aging is associated with an increase in T cells and inflammatory macrophages in visceral adipose tissue. *J Immunol*, 187, 6208-16.
- LUOH, S. M., DI MARCO, F., LEVIN, N., ARMANINI, M., XIE, M. H., NELSON, C., BENNETT, G. L., WILLIAMS, M., SPENCER, S. A., GURNEY, A. & DE SAUVAGE, F. J. 1997. Cloning and characterization of a human leptin receptor using a biologically active leptin immunoadhesin. *J Mol Endocrinol*, 18, 77-85.

- MASON, C., FOSTER-SCHUBERT, K. E., IMAYAMA, I., KONG, A., XIAO, L., BAIN, C., CAMPBELL, K. L., WANG, C. Y., DUGGAN, C. R., ULRICH, C. M., ALFANO, C. M., BLACKBURN, G. L. & MCTIERNAN, A. 2011. Dietary weight loss and exercise effects on insulin resistance in postmenopausal women. *Am J Prev Med*, 41, 366-75.
- MENNES, E., DUNGAN, C. M., FRENO-CUMBO, S., WILLIAMSON, D. L. & WRIGHT, D. C. 2014. Aging-associated reductions in lipolytic and mitochondrial proteins in mouse adipose tissue are not rescued by metformin treatment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69, 1060-8.
- MINOKOSHI, Y., KIM, Y. B., PERONI, O. D., FRYER, L. G., MULLER, C., CARLING, D. & KAHN, B. B. 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415, 339-43.
- MIYAZAKI, S., IZAWA, T., OGASAWARA, J. E., SAKURAI, T., NOMURA, S., KIZAKI, T., OHNO, H. & KOMABAYASHI, T. 2010. Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. *Life Sci*, 86, 691-8.
- MONTEIRO-JUNIOR, R. S., DE TARSO MACIEL-PINHEIRO, P., DA MATTA MELLO PORTUGAL, E., DA SILVA FIGUEIREDO, L. F., TERRA, R., CARNEIRO, L. S. F., RODRIGUES, V. D., NASCIMENTO, O. J. M., DESLANDES, A. C. & LAKS, J. 2018. Effect of Exercise on Inflammatory Profile of Older Persons: Systematic Review and Meta-Analyses. *J Phys Act Health*, 15, 64-71.
- MORIGNY, P., HOUSSIER, M., MOUISEL, E. & LANGIN, D. 2016. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*, 125, 259-66.
- MOSETI, D., REGASSA, A. & KIM, W. K. 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci*, 17, E124.
- NAKHUDA, A., JOSSE, A. R., GBURCIK, V., CROSSLAND, H., RAYMOND, F., METAIRON, S., GOOD, L., ATHERTON, P. J., PHILLIPS, S. M. & TIMMONS, J. A. 2016. Biomarkers of browning of white adipose tissue and their regulation during exercise- and diet-induced weight loss. *Am J Clin Nutr*, 104, 557-65.
- NICKLAS, B. J., HSU, F. C., BRINKLEY, T. J., CHURCH, T., GOODPASTER, B. H., KRITCHEVSKY, S. B. & PAHOR, M. 2008. Exercise training and plasma C-reactive protein and interleukin-6 in elderly people. *J Am Geriatr Soc*, 56, 2045-52.
- NOGALSKA, A., SUCAJTYS-SZULC, E. & SWIERCZYNSKI, J. 2005. Leptin decreases lipogenic enzyme gene expression through modification of SREBP-1c gene expression in white adipose tissue of aging rats. *Metabolism*, 54, 1041-7.
- NORDSTROM, E. A., RYDEN, M., BACKLUND, E. C., DAHLMAN, I., KAAMAN, M., BLOMQVIST, L., CANNON, B., NEDERGAARD, J. & ARNER, P. 2005. A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity. *Diabetes*, 54, 1726-34.
- 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, 27565-74.
- PAN, D. A., LILLIOJA, S., KRIKETOS, A. D., MILNER, M. R., BAUR, L. A., BOGARDUS, C., JENKINS, A. B. & STORLIEN, L. H. 1997. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*, 46, 983-8.
- PILOLLA, K. D. 2018. TARGETING ABDOMINAL OBESITY THROUGH THE DIET: What Does the Evidence Say? *ACSM's Health & Fitness Journal*, 22, 21-28.
- PROENCA, A. R., SERTIE, R. A., OLIVEIRA, A. C., CAMPANA, A. B., CAMINHOTTO, R. O., CHIMIN, P. & LIMA, F. B. 2014. New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res*, 47, 192-205.

- RAGUSO, C. A., KYLE, U., KOSSOVSKY, M. P., ROYNETTE, C., PAOLONI-GIACOBINO, A., HANS, D., GENTON, L. & PICHARD, C. 2006. A 3-year longitudinal study on body composition changes in the elderly: role of physical exercise. *Clin Nutr*, 25, 573-80.
- RAMOS, S. V., TURNBULL, P. C. & MACPHERSON, R. E. 2016. Adipose tissue depot specific differences of PLIN protein content in endurance trained rats. *Adipocyte*, 5, 212-23.
- RAPPOU, E., JUKARAINEN, S., RINNANKOSKI-TUIKKA, R., KAYE, S., HEINONEN, S., HAKKARAINEN, A., LUNDBOM, J., LUNDBOM, N., SAUNAVAARA, V., RISSANEN, A., VIRTANEN, K. A., PIRINEN, E. & PIETILAINEN, K. H. 2016. Weight Loss Is Associated With Increased NAD(+)/SIRT1 Expression But Reduced PARP Activity in White Adipose Tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, 101, 1263-73.
- RIDKER, P. M., RIFAI, N., STAMPFER, M. J. & HENNEKENS, C. H. 2000. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 101, 1767-72.
- ROCHA-RODRIGUES, S., RODRIGUEZ, A., GOUVEIA, A. M., GONCALVES, I. O., BECERRIL, S., RAMIREZ, B., BELEZA, J., FRUHBECK, G., ASCENSAO, A. & MAGALHAES, J. 2016. Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. *Life Sci*, 165, 100-108.
- ROMIJN, J. A., KLEIN, S., COYLE, E. F., SIDOSSIS, L. S. & WOLFE, R. R. 1993. Strenuous endurance training increases lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling at rest. *J Appl Physiol (1985)*, 75, 108-13.
- RONN, T., VOLKOV, P., TORNBERG, A., ELGZYRI, T., HANSSON, O., ERIKSSON, K. F., GROOP, L. & LING, C. 2014. Extensive changes in the transcriptional profile of human adipose tissue including genes involved in oxidative phosphorylation after a 6-month exercise intervention. *Acta Physiol (Oxf)*, 211, 188-200.
- ROSEN, E. D. & SPIEGELMAN, B. M. 2014. What we talk about when we talk about fat. *Cell*, 156, 20-44.
- RUSCHKE, K., FISHBEIN, L., DIETRICH, A., KLOTING, N., TONJES, A., OBERBACH, A., FASSHAUER, M., JENKNER, J., SCHON, M. R., STUMVOLL, M., BLUHER, M. & MANTZOROS, C. S. 2010. Gene expression of PPARgamma and PGC-1alpha in human omental and subcutaneous adipose tissues is related to insulin resistance markers and mediates beneficial effects of physical training. *Eur J Endocrinol*, 162, 515-23.
- SAELY, C. H., GEIGER, K. & DREXEL, H. 2012. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*, 58, 15-23.
- SCARPULLA, R. C. 2011. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 1269-78.
- SHIN, W., OKAMATSU-OGURA, Y., MACHIDA, K., TSUBOTA, A., NIO-KOBAYASHI, J. & KIMURA, K. 2017. Impaired adrenergic agonist-dependent beige adipocyte induction in aged mice. *Obesity (Silver Spring)*, 25, 417-423.
- SCHIPPER, B. M., MARRA, K. G., ZHANG, W., DONNENBERG, A. D. & RUBIN, J. P. 2008. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*, 60, 538-44.
- SKURK, T., ALBERTI-HUBER, C., HERDER, C. & HAUNER, H. 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 1023-33.
- SONG, Z., XIAOLI, A. M. & YANG, F. 2018. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients*, 10, E1383.

- STANFORD, K. I., MIDDELBEEK, R. J. & GOODYEAR, L. J. 2015. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. *Diabetes*, 64, 2361-8.
- STEELE, J., RAUBOLD, K., KEMMLER, W., FISHER, J., GENTIL, P. & GIESSING, J. 2017. The Effects of 6 Months of Progressive High Effort Resistance Training Methods upon Strength, Body Composition, Function, and Wellbeing of Elderly Adults. *Biomed Res Int*, 2017, 2541090.
- STICH, V., DE GLISEZINSKI, I., GALITZKY, J., HEJNOVA, J., CRAMPES, F., RIVIERE, D. & BERLAN, M. 1999. Endurance training increases the beta-adrenergic lipolytic response in subcutaneous adipose tissue in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23, 374-81.
- STINKENS, R., BROUWERS, B., JOCKEN, J. W., BLAAK, E. E., TEUNISSEN-BEEKMAN, K. F., HESSELINK, M. K., VAN BAAK, M. A., SCHRAUWEN, P. & GOOSSENS, G. H. 2018. Exercise training-induced effects on the abdominal subcutaneous adipose tissue phenotype in humans with obesity. *J Appl Physiol (1985)*, 125, 1585-1593.
- STONE, S. J., MYERS, H. M., WATKINS, S. M., BROWN, B. E., FEINGOLD, K. R., ELIAS, P. M. & FARESE, R. V., JR. 2004. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem*, 279, 11767-76.
- STRASSER, B., KEINRAD, M., HABER, P. & SCHOBERSBERGER, W. 2009. Efficacy of systematic endurance and resistance training on muscle strength and endurance performance in elderly adults a randomized controlled trial. *Wien Klin Wochenschr*, 121, 757-64.
- TANIGUCHI, H., TANISAWA, K., SUN, X., KUBO, T. & HIGUCHI, M. 2016. Endurance Exercise Reduces Hepatic Fat Content and Serum Fibroblast Growth Factor 21 Levels in Elderly Men. *J Clin Endocrinol Metab*, 101, 191-8.
- TCHKONIA, T., MORBECK, D. E., VON ZGLINICKI, T., VAN DEURSEN, J., LUSTGARTEN, J., SCRABLE, H., KHOSLA, S., JENSEN, M. D. & KIRKLAND, J. L. 2010. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*, 9, 667-84.
- TODDE, F., MELIS, F., MURA, R., PAU, M., FOIS, F., MAGNANI, S., IBBA, G., CRISAFULLI, A. & TOCCO, F. 2016. A 12-Week Vigorous Exercise Protocol in a Healthy Group of Persons over 65: Study of Physical Function by means of the Senior Fitness Test. *Biomed Res Int*, 2016, 7639842.
- TONTONOZ, P., HU, E., GRAVES, R. A., BUDAVARI, A. I. & SPIEGELMAN, B. M. 1994. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, 8, 1224-34.
- 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, 351-7.
- TSILOULIS, T., CAREY, A. L., BAYLISS, J., CANNY, B., MEEEX, R. C. R. & WATT, M. J. 2018. No evidence of white adipocyte browning after endurance exercise training in obese men. *Int J Obes (Lond)*, 42, 721-727.
- TUNSTALL, R. J., MEHAN, K. A., WADLEY, G. D., COLLIER, G. R., BONEN, A., HARGREAVES, M. & CAMERON-SMITH, D. 2002. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E66-72.
- URS, S., SMITH, C., CAMPBELL, B., SAXTON, A. M., TAYLOR, J., ZHANG, B., SNODDY, J., JONES VOY, B. & MOUSTAID-MOUSSA, N. 2004. Gene expression profiling in human preadipocytes and adipocytes by microarray analysis. *J Nutr*, 134, 762-70.
- VAN GEMERT, W. A., MONNINKHOF, E. M., MAY, A. M., PEETERS, P. H. & SCHUIT, A. J. 2015. Effect of exercise on insulin sensitivity in healthy postmenopausal women: the SHAPE study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24, 81-7.
- VAN HALL, G., STEENSBERG, A., SACCHETTI, M., FISCHER, C., KELLER, C., SCHJERLING, P., HISCOCK, N., MOLLER, K., SALTIN, B., FEBBRAIO, M. A. & PEDERSEN, B. K. 2003.

- Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 3005-10.
- VAN PELT, D. W., GUTH, L. M. & HOROWITZ, J. F. 2017. Aerobic exercise elevates markers of angiogenesis and macrophage IL-6 gene expression in the subcutaneous adipose tissue of overweight-to-obese adults. *J Appl Physiol (1985)*, 123, 1150-1159.
- VOET, D. & VOETOVÁ, J. G. 1995. *Biochemie*, Victoria Publishing.
- WALHIN, J. P., DIXON, N. C., BETTS, J. A. & THOMPSON, D. 2016. The impact of exercise intensity on whole body and adipose tissue metabolism during energy restriction in sedentary overweight men and postmenopausal women. *Physiol Rep*, 4, e13026.
- WANG, Z. W., PAN, W. T., LEE, Y., KAKUMA, T., ZHOU, Y. T. & UNGER, R. H. 2001. The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. *FASEB J*, 15, 108-114.
- WOLFE, R. R., KLEIN, S., CARRARO, F. & WEBER, J. M. 1990. Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *Am J Physiol*, 258, E382-9.
- WULSTER-RADCLIFFE, M. C., AJUWON, K. M., WANG, J., CHRISTIAN, J. A. & SPURLOCK, M. E. 2004. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 316, 924-9.
- XU, L., ZHOU, L. & LI, P. 2012. CIDE proteins and lipid metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 1094-8.
- XU, M., TCHKONIA, T., DING, H., OGRONNIK, M., LUBBERS, E. R., PIRTSKHALAVA, T., WHITE, T. A., JOHNSON, K. O., STOUT, M. B., MEZERA, V., GIORGADZE, N., JENSEN, M. D., LEBRASSEUR, N. K. & KIRKLAND, J. L. 2015. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E6301-10.
- YAMAUCHI, T., KAMON, J., ITO, Y., TSUCHIDA, A., YOKOMIZO, T., KITA, S., SUGIYAMA, T., MIYAGISHI, M., HARA, K., TSUNODA, M., MURAKAMI, K., OHTEKI, T., UCHIDA, S., TAKEKAWA, S., WAKI, H., TSUNO, N. H., SHIBATA, Y., TERAUCHI, Y., FROGUEL, P., TOBE, K., KOYASU, S., TAIRA, K., KITAMURA, T., SHIMIZU, T., NAGAI, R. & KADOWAKI, T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423, 762-9.
- YANG, X., LU, X., LOMBES, M., RHA, G. B., CHI, Y. I., GUERIN, T. M., SMART, E. J. & LIU, J. 2010. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab*, 11, 194-205.
- YOSHIDA, Y., JAIN, S. S., MCFARLAN, J. T., SNOOK, L. A., CHABOWSKI, A. & BONEN, A. 2013. Exercise- and training-induced upregulation of skeletal muscle fatty acid oxidation are not solely dependent on mitochondrial machinery and biogenesis. *J Physiol*, 591, 4415-26.
- YOU, T., MURPHY, K. M., LYLES, M. F., DEMONS, J. L., LENCHIK, L. & NICKLAS, B. J. 2006. Addition of aerobic exercise to dietary weight loss preferentially reduces abdominal adipocyte size. *Int J Obes (Lond)*, 30, 1211-6.
- YUAN, Y., CRUZAT, V. F., NEWSHOLME, P., CHENG, J., CHEN, Y. & LU, Y. 2016. Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis. *Mech Ageing Dev*, 155, 10-21.
- ZHANG, X., YANG, M., LIN, L., CHEN, P., MA, K. T., ZHOU, C. Y. & AO, Y. F. 2006. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose-derived stem cells in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Int*, 79, 169-78.
- ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-32.

ZHENG, C., YANG, Q., CAO, J., XIE, N., LIU, K., SHOU, P., QIAN, F., WANG, Y. & SHI, Y. 2016. Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell Death Dis*, 7, e2167.

ZHU, Y., ALVARES, K., HUANG, Q., RAO, M. S. & REDDY, J. K. 1993. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem*, 268, 26817-20.

ZURIAGA, M. A., FUSTER, J. J., GOKCE, N. & WALSH, K. 2017. Humans and Mice Display Opposing Patterns of "Browning" Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Front Cardiovasc Med*, 4, 27.

Elektronické zdroje:

Web. 1

https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Population_structure_and_ageing#The_share_of_elderly_people_continues_to_increase

Web. 2

<https://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&init=1&language=en&pcode=tps00028&plugin=1>

Web. 3

<http://www.dnbm.univr.it/documenti/OccorrenzaIns/matdid/matdid182478.pdf>

Web. 4

<http://www.szu.cz/ehes-antropometricka-mereni>