

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Fyziologie



## **Charakteristika vlivu obezogenní diety na tuková depa u myší kmene C57BL/6J**

Characterization of obesogenic diet effect on adipose depots in mice C57BL/6J

Diplomová práce

**Mirka Matějková**

Praha 2013

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Kristina Bardová

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Oddělení biologie tukové tkáně

Prohlašuji, že jsem uvedenou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Kristiny Bardové ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky za použití dále uvedených literárních pramenů.

V Praze dne.....

Mirka Matějková

Děkuji svojí školitelce Mgr. Kristině Bardové za odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Janu Kopeckému, DrSc., vedoucímu oddělení Biologie tukové tkáně Fyziologického ústavu AV ČR, a všem ostatním členům laboratoře za užitečné rady a odbornou pomoc v laboratoři. Ing. Petře Janovské děkuji za stanovení inzulínu v rámci mé diplomové práce. V neposlední řadě děkuji své rodině, která mi po dobu studia poskytla pevné zázemí.

## **Abstrakt**

Obezita je úzce spojena s rozvojem inzulinové rezistence, ektopickým ukládáním tuku v játrech a svalech, jaterní steatózou a diabetem 2. typu. Tuková tkáň obézních jedinců produkuje zvýšené množství adipokinů, které se podílejí na vzniku inzulinové rezistence, a zároveň do tukové tkáně infiltrují makrofágy způsobující mírný chronický zánět. Benefiční účinky na úroveň zánětu v tkáni a na metabolismus lipidů a cukrů v organismu mají n-3 polynenasycené mastné kyseliny (n3-PUFA).

Výzkum negativních důsledků obezity a možnost zlepšení těchto dopadů probíhá i na laboratorních zvířatech. Vlivem podávání diet s vysokým podílem tuku je u nich indukována obezita a dále jsou definovány dopady obezity na metabolismus. Ve své diplomové práci jsem zkoumala vliv různých vysokotukových diet a diety obsahující n-3 polynenasycené mastné kyseliny na homogenitu tukových dep z hlediska velikosti buněk a množství zánětu v tukové tkáni. Dále jsem pozorovala rozvoj obezity v čase v závislosti na délce podávání vysokotukové diety.

**Metody:** Intraperitoneální glukózový toleranční test (IPGTT), orální glukózový toleranční test (OGTT), stanovení množství lipidových metabolitů v plazmě, stanovení triacylglycerolů v játrech a tukové tkáni, stanovení množství DNA v jaterní a tukové tkáni, histologické stanovení velikosti adipocytů, imunohistochemické stanovení množství infiltrovaných makrofágů v tukové tkáni, barvení tukových kapének v histologických řezech jaterní tkáně.

**Výsledky:** U myší kmene C57BL/6J dieta s přidavkem n-3 PUFA ve srovnání s kontrolní vysokotukovou dietou snižovala tělesnou hmotnost, hmotnost tukových dep a jater. Dieta s n3-PUFA také u myší snižovala hladinu inzulinu, triacylglycerolů, cholesterolu i volných mastných kyselin v plazmě. Na úrovni množství triacylglycerolů a DNA v tkáni jsem prokázala uniformitu tukových dep u obou použitých diet.

Dále jsem definovala účinek diety s vysokým obsahem tuků a sacharózy na rozvoj adipozity jednotlivých tukových dep a rozvoj jaterní steatózy. Neprokovála jsem korelaci mezi velikostí buněk a vývojem zánětu v GON, DL ani MEZ depu. Prokovála jsem uniformitu tukových dep na úrovni velikosti adipocytů a také na úrovni infiltrace makrofágů do tukové tkáně.

**Klíčová slova:** obezita, anatomické uložení tuku, zánět, inzulinová rezistence

## **Abstract**

Obesity is closely related to insulin resistance development, ectopic fat accumulation in the liver and skeletal muscles, liver steatosis and type 2 diabetes mellitus. Adipose tissue of obese subjects produces increased quantity of adipokines, which are involved in development of insulin resistance, and in the same time macrophages causing low-grade inflammation are infiltrating into adipose tissue. Long-chain polyunsaturated fatty acids of the n-3 series have beneficial effects on adipose tissue inflammation and lipid and carbohydrate metabolic pathways in organism.

There is lot of research ongoing on laboratory animals on negative consequences of obesity and possible improvement. Obesity is induced by diet with high fat content and the consequences are evaluated. I have analysed the influence of different high fat diets and a diet with long-chain polyunsaturated fatty acids of the n-3 series on homogeneity of adipose depots in the cell size and the level of inflammation. I observed gradual development of obesity due to administration of high fat diet to laboratory animals.

**Methods:** Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), oral glucose tolerance test (OGTT), assessment of lipid metabolites in blood, assessment of triacylglycerols in the liver and in the adipose tissue, assessment of DNA in the liver and in the adipose tissues, adipocyte size and inflammatory status of adipose tissue, assessment of liver histology

**Results:** I proved beneficial effects of high fat diet including n3-PUFAs on body weight of mice of the C57BL/6J strain, weight of adipose depots and weight of liver. The diet with n-3 PUFAs reduced level of insulin, triglycerides, cholesterol and free fatty acids in the plasma. I proved the uniformity in the amount of DNA and triglycerides in the adipose depots.

In the second experiment I defined effect of diet containing high amount of fat and sucrose on development of adiposity in the adipose depots and the development of liver steatosis. I have not proved correlation between adipocyte size and inflammatory status of gonadal, dorsolumbal and mesenteric adipose depots. I have proved uniformity of adipocyte size and inflammatory status in the adipose depots.

**Key words:** obesity, anatomical deposition of adipose depots, inflammation, insulin resistance

## Obsah

Seznam zkratk	9
1. Úvod	12
2. Literární přehled	14
1. Tuková tkáň	14
1.1. Typy tukové tkáně a jejich funkce	15
1.1.1. Bílá tuková tkáň	15
1.1.2. Hnědá tuková tkáň	17
1.2. Bílá tuková tkáň jako endokrinní orgán	17
1.2.1. Leptin	18
1.2.2. Resistin	19
1.2.3. Adiponektin	19
1.2.5. TNF- $\alpha$	20
1.2.6. Interleukin-6	21
2. Metabolizmus	22
2.1. Mitochondriální metabolizmus	22
2.2. Metabolizmus lipidů	23
2.2.1. Syntéza mastných kyselin	26
2.2.2. Oxidace mastných kyselin	26
2.2.3. Lipolýza	27
3. Inzulínová rezistence	29
3.1. Působení inzulínu a jeho sekrece	30
3.2. Tkáňově specifická inzulínová rezistence	31

3.2.1. Inzulínová rezistence v kosterním svalu.....	31
3.2.2. Inzulínová rezistence tukové tkáně .....	32
3.2.3. Inzulínová rezistence jater .....	33
3.3. Nemoci spojené s inzulínovou rezistencí .....	33
4. Zánět .....	34
4.1. Makrofágy a zánět tukové tkáně.....	34
3. Cíle diplomové práce .....	36
4. Metody .....	37
4.1. Práce s pokusnými zvířaty.....	37
4.2. Glukózový toleranční test (GTT).....	40
4.2.1. IPGTT.....	40
4.2.2. OGTT .....	41
4.2.3. Stanovení inzulínu v krevní plazmě .....	41
4.3. Stanovení obsahu lipidů ve tkáních a v plazmě.....	42
4.3.1. Stanovení TAG, CH a FFA v plazmě .....	43
4.3.2. Stanovení TAG v játrech .....	44
4.3.3. Stanovení TAG v tukových depech .....	44
4.4. Měření koncentrace DNA .....	45
4.5. Stanovení velikosti adipocytů.....	47
4.5.1. Barvení preparátů hematoxylinem a eosinem pro světelnou mikroskopii .....	47
4.5.2. Morfometrické stanovení velikosti adipocytů .....	48
4.6. Imunohistochemické barvení makrofágů ve vzorku.....	49
4.7. Barvení lipidů v kryořezech jaterní tkáně .....	51
4.8. Statistické vyhodnocení výsledků.....	52
5. Výsledky .....	53
5.1. Pokus č.1: .....	53

5.2. Pokus č. 2 .....	63
6. Diskuze .....	76
6.1. Pokus č. 1 .....	76
6.2. Pokus č. 2 .....	78
7. Závěr .....	81
8. Reference .....	82



## Seznam zkratek

ABC	avidin-biotin komplex
ACC	acetyl-CoA-karboxyláza z anglického “adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol
ADD1/SREBP	regulatory element- binding protein-1c”
AdipoR 1,2	adiponektinový receptor 1,2
ADP	adenosindifosfát
AMPK	5’adenosin-monofosfátem aktivovaná proteinkináza
ATP	adenosintrifosfát
ATGL	adipocytární lipáza triacylglycerolů
BMI	index tělesné hmotnosti (z anglického „body mass index“)
C/EBP	CCAAT-zesilující vazebný protein
cAMP	cyklický 5’adenosin-monofosfát
CETP	cholesterol-ester přenašečový protein
CLS	struktura podobná koruně (z anglického “crown like structure”)
CTP-1, 2	karnitin palmitoyl transferáza 1, 2
DAB	3,3-diaminobenzidin tetrachlorid
DAG	diacylglycerol
DL	dorzolubální tukové depo
DRP1	dynaminu podobný protein 1
ER	endoplazmatické retikulum
FADH2	redukovaný flavin adenin dinukleotid
FAS	syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)
FBG	glykémie nalačno (fasting blood glucose)
FBI	inzulín nalačno (fasting blood insulin)
FFA	volná mastná kyselina (free fatty acid)
FIS1	štěpící protein 1 (z anglického fission protein 1)
GLP-1	glukagonu podobný protein 1
GLUT 2,4	glukózový přenašeč 2, 4 (Glucose Transporter 2, 4)
GON	gonadální tukové depo
GTT	glukózový toleranční test
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (z anglického high-density lipoprotein)

HFD	dieta s vysokým podílem tuku (z anglického high fat diet)
HFD+F	HFD dieta obohacená koncentrátem z rybího oleje (High Fat Diet+ Fish)
HOMA-IR	Homestatický model pro určení inzulínové rezistence (z anglického Homeostasis Model of Assessment- Insulin Resistance)
HSD	dieta s vysokým obsahem sacharózy (High sucrose diet)
HSL	hormon senzitivní lipáza (z anglického Hormone-sensitive lipase)
CH	cholesterol
CHE	cholesterylester
IDL	lipoprotein se střední hustotou (z anglického Intermediate-density lipoprotein)
IL 1 - 10	interleukin 1 - 10
IPGTT	intraperitoneální glukózový toleranční test
IR	inzulínová rezistence
LCAT	lecitin-cholesterolacyltransferáza
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (z anglického Low density lipoprotein)
LFD	nízkotuková dieta (z anglického Low Fat Diet)
LPL	lipoproteinlipáza (z anglického Lipoprotein lipase)
M1, 2	makrofág typu 1, 2
MAG	monoacylglycerol
MEZ	Mezenterické tukové depo
MFN1, 2	mitofusin 1, 2
MGC	mnohjaderná gigantická buňka (z anglického Multinucleate Giant Cell)
MS	metabolický syndrom
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NF- $\kappa$ B	z anglického nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OGTT	orální glukózový toleranční test
OPA1	z anglického opticatrophy 1
PBS	fosfátový pufr
PKA	proteinkináza A
PL	fosfolipid
PPAR- $\alpha, \gamma$	jaderné receptory aktivované proliferátory peroxizómů (z anglického Peroxisome Proliferator Activated Receptor - $\alpha, \gamma$ )
REML	resistinu podobné molekuly $\alpha$ a $\beta$
SH2	z anglického Src Homology 2

SOCS-3	z anglického suppressor of cytokine signaling 3
T2DM	diabetes mellitus 2. typu (z anglického Type 2 Diabetes Mellitus)
TAG	triacylglycerol
TNF $\alpha$	nádory nekrotizující faktor $\alpha$
UCP	odpřahující protein (z anglického Uncoupling Protein)
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou (z anglického Very low-density lipoprotein)

# 1. Úvod

Obezita je stav, kdy energetické zásoby v tukové tkáni převyšují fyziologické možnosti uskladňování a poškozují zdraví. Obezitou trpí značná část dnešní populace. Vyskytuje se nejen u střední a starší generace, ale projevuje se již i u školáků ba dokonce předškoláků. Obezita je vnímána jako celosvětový problém. Řadí se k nejčastějším onemocněním jak v České republice, tak i ve všech průmyslově vyspělých zemích světa. Ve zdravotnictví a ekonomice zaujímá významné místo, protože náklady na léčbu obezity a s ní spojenými komplikacemi významně přispívají k finančním nákladům zdravotnictví.

Obezita je komplexní onemocnění způsobené interakcí genetických faktorů a faktorů prostředí. Vznik obezity je z velké části podmíněn změnami životního stylu, které se projevují výraznou převahou energetického příjmu nad energetickým výdejem, což je dáno sníženou fyzickou aktivitou a nadměrnou konzumací kaloricky bohaté stravy.

Typickým rysem je hromadění tuku v organismu. Lipidy a jejich metabolity se ukládají v tukové tkáni, ale mohou se ukládat i ektopicky, tzn. i v dalších orgánech jako jsou játra, slinivka nebo sval. Obezita může přispět k rozvoji jaterní steatózy. Jaterní buňka (hepatocyt) je schopna ukládat zásobní látky, včetně lipidů. Při zvýšeném obratu mastných kyselin v organismu a překročení úložné kapacity lipidů v tukové tkáni, dochází k ektopickému uložení lipidových částic do jater, což vede k poškození a narušení jejich funkce a vzniku jaterní steatózy.

Obezita může být úzce spojena s dalšími metabolickými poruchami, které se souhrnně nazývají metabolický syndrom. Metabolický syndrom je rizikovým faktorem aterosklerózy, která může vést k infarktu myokardu či mozkové mrtvici. Za patofyziologický podklad metabolického syndromu bývá považována inzulínová rezistence doprovázena morbidním ektopickým ukládáním lipidů, a viscerální obezita.

Inzulínová rezistence se projevuje sníženou schopností tkáně využívat glukózu skrze inzulínovou signální dráhu. Pro zajištění glukózové homeostázy se organismus v první fázi snaží kompenzovat tento děj zvýšením sekrece inzulínu. Ovšem zvýšená koncentrace inzulínu nestačí dlouhodobě zajišťovat jeho účinek a snížené působení inzulínu vede k zvýšené glukoneogenezi a glykogenolýze v játrech a ke sníženému vychytávání glukózy ve svalové a tukové tkáni. Dlouhodobá hyperglykémie vede k poškození slinivky břišní a snížené sekreci inzulínu. Následkem je vznik diabetu 2. typu.

Stejně jako pro porozumění a objasnění vzniku dalších patofyziologických abnormalit, poruch a nemocí, tak i při studiu obezity hrají významnou roli nejrůznější modelové

organismy. V praxi se výzkumy provádí na laboratorních hlodavcích, nejčastěji na potkanech (*Rattus norvegicus*) a myších (*Mus musculus*). Pro experimentální studie bylo vyšlechtěno široké spektrum myších linií (kmenů), které se liší náchylností či odolností vůči obezitě. Například námi používaný kmen C57BL/6J je vysoce náchylný k obezitě vyvolané dietou s vysokým podílem tuku (HFD). Cílem studií na kmenech s odlišným genetickým pozadím je získání výsledků a dat, které by bylo možné využít v klinické praxi pro léčbu obezity a s ní související poruchy metabolismu.

## 2. Literární přehled

### 1. Tuková tkáň

Tuková tkáň je specializovaný typ vaziva, ve kterém jsou nejhojněji zastoupeny tukové buňky (adipocyty). Adipocyty pocházejí z mezenchymálních kmenových buněk, které se nejprve přemění na adipoblasty, buňky s relativně velkým jádrem a minimálním množstvím lipidů. Adipoblasty prolifерují a jsou přítomny celý život. Jejich diferenciací vznikají preadipocyty, jež na závěr zrají v adipocyty. Preadipocyty ani adipocyty neprolifерují a vyznačují se přítomností intracelulárních tukových kapének (Löffler and Hauner 1987). Tuková tkáň obsahuje zralé adipocyty a stromavaskulární frakci, která zahrnuje preadipocyty, endoteliální buňky, fibroblasty, nervová zakončení a buňky imunitního systému (Hauner, et al. 1989).

Zrání adipocytů a s tím spojené změny v metabolismu těchto buněk jsou řízeny řadou transkripčních faktorů. Mezi nejvýznamnější transkripční faktory regulující metabolismus tukové tkáně patří jaderné receptory z rodiny PPAR (peroxisome proliferator activated receptor), jejichž aktivita je řízena vazbou ligandů – mastných kyselin a jejich metabolitů. Důležitým transkripčním faktorem je PPAR- $\gamma$ , který mimo jiné reguluje expresi genů zapojených do adipogeneze. Na PPAR- $\gamma$  se váží látky užívané jako antidiabetika, thiazolidindiony (glitazony) (Greenberg and Obin, 2006). Dalším důležitým faktorem je PPAR- $\alpha$ , který kontroluje lipidový metabolismus a homeostázi krevní glukózy v játrech, svalech a dalších tkáních (Lefebvre et al., 2006). PPAR- $\alpha$  se mimo jiné významně podílí na expresy genů kódujících enzymy, umožňujících transport mastných kyselin přes mitochondriální membránu a  $\beta$ -oxidaci (Kersten et al., 2000). V diferenciaci adipocytů a indukci lipogenních enzymů hrají důležitou roli transkripční faktory z rodiny C/EBP a ADD1/SREBP (Horton et al., 2002), jejichž inhibice může vést k nedostatečnému rozvoji tukové tkáně (Morrison and Farmer, 2000).

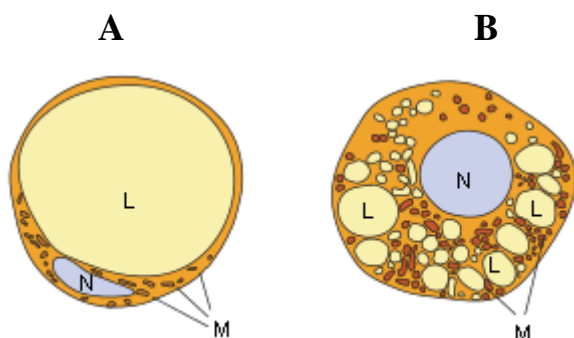
Tuková tkáň je u lidí vyvinuta již před porodem a během života mění své rozložení (Shimokata et al., 1989), zatímco u myší se tvoří až po porodu. Rozdíly v rozložení a množství tuku můžeme pozorovat u mužů i žen. U mužů tuková tkáň představuje 15-20 % tělesné hmotnosti, u žen 20-25 %. Obecně rozlišujeme mužský typ postavy (androidní, typ jablko), kde je tuk uložen převážně v oblasti břicha a v pase a ženský typ postavy (gynoidní,

typ hruška), kde je tuk uložen nejvíce v oblasti hýždí a stehen (Ross et al., 1994). Toto rozdělení postav není striktně dané pohlavím. Rizikovým faktorem je viscerální obezita mužů i žen, která souvisí s vyšším rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění a diabetu (Ravussin and Amisth, 2002).

Tato tkáň hraje zásadní roli v regulaci homeostáze lipidů. Po jídle při kalorickém dostatku vstřebává a ukládá lipidy a během hladovění zajišťuje potřebnou energii pro fungování organismu. Pokud ovšem dojde k překročení puffovací kapacity tukové tkáně, začnou se lipidy ukládat mimo tuto tkáň. Uložení velkého množství lipidů mimo tukovou tkáň (ektopické ukládání tuku) může vést k apoptóze buněk či dysfunkci celé postižené tkáně (Ravussin and Amisth, 2002).

### 1.1. Typy tukové tkáně a jejich funkce

V organismu je tuková tkáň z pohledu fyziologie a morfologie rozdělena na dva typy - bílou a hnědou tukovou tkáň (Hollenberg et al., 1970).



Obr.1: Adipocyt bílé (A) a hnědé tukové tkáně (B), N - jádro, L - tuková kapénka, M - mitochondrie. Převzato a upraveno (Villarroya et al., 2005).

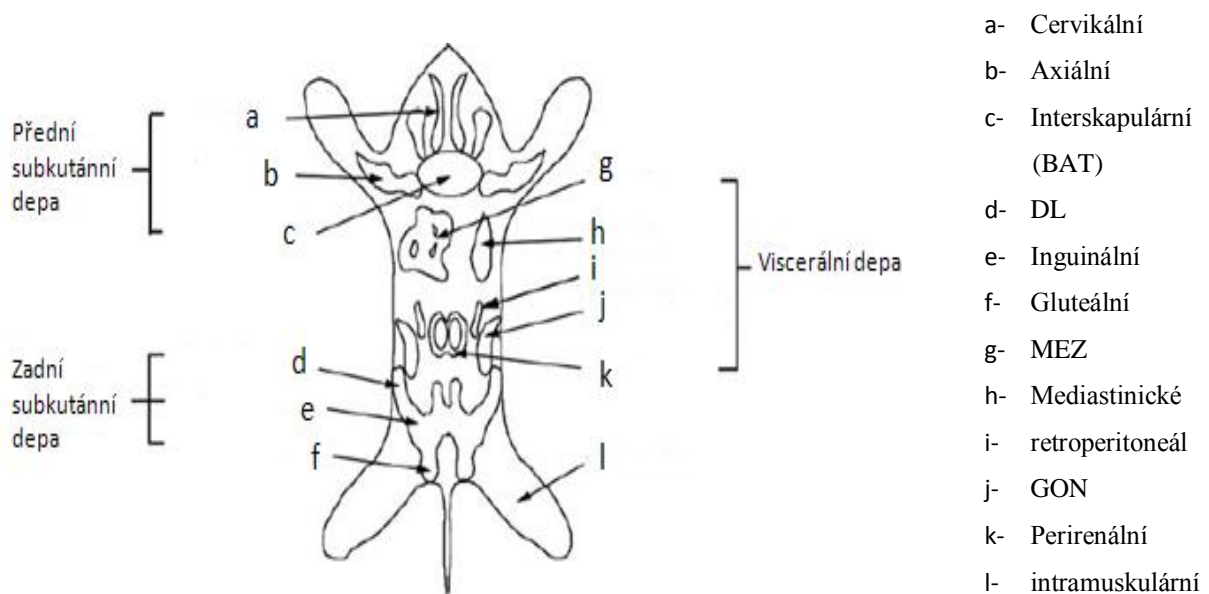
#### 1.1.1. Bílá tuková tkáň

Název této tkáně se odvíjí od makroskopického zbarvení zmiňovaného typu tkáně. Můžeme nalézt širokou škálu zbarvení - od bílé až po tmavě žlutou (dáno složením potravy). Žluté zbarvení je způsobeno množstvím karotenoidů rozpuštěných v adipocytech.

Adipocyt bílé tukové tkáně je buňka s centrálně uloženou kapénkou, která obsahuje převážně triacylglyceroly (TAG) a zaujímá až 90 % objemu buňky (Cinti, 2012). Centrální tuková kapka tlačí jádro, buněčné orgány a cytoplazmu k plazmatické membráně. Adipocyt je uniloculární buňka, v níž je centrální kapénka částečně obalena perilipinem. Průměr adipocytů je obvykle 50- 150  $\mu\text{m}$ .

Bílá tuková tkáň se obvykle v závislosti na lokalizaci a také podle metabolické aktivity u lidí dělí na viscerální (útrobní) a subkutánní (podkožní). Viscerální tuk obklopuje vnitřní orgány a zahrnuje omentální (u žaludku a pobříšnice), mezenterické (u střev), retroperitoneální (obklopující ledviny), gonadální (obklopující pohlavní orgány) a perikardiální (u srdce) tukové depa. Viscerální tuková depa jsou metabolicky aktivnější a mohou představovat vyšší riziko vývoje kardiovaskulárních onemocnění a T2DM. Bylo pozorováno, že zastoupení viscerální tukové tkáně oproti subkutánní tukové tkáni pozitivně koreluje s rozvojem inzulínové rezistence (Bjorndal et al., 2010).

Tuková depa u myši jsou také rozdělena na viscerální a subkutánní tuk. Konkrétní rozdělení tukových dep je zakresleno na obr. 2 viz níže. V této práci jsem na myších zkoumala tři tuková depa: depo gonadální (GON), které obaluje vnitřní pohlavní orgány v břišní dutině, depo dorzolumbální (DL), které se nachází v dolní části zad a přechází k tříselné uzlině a tukové depo mezenterické (MEZ), které obklopuje střeva (obr. 2).



Obr. 2: Tuková depa u myši, převzato a upraveno (Steel et al., 2005).

Zatímco játra a svaly zajišťují spíše pohotovostní energii ve formě glykogenových zásob, bílá tuková tkáň je místem tvorby zásob uložených ve formě triacylglycerolů. K uskladnění lipidů z krevního řečiště dochází po jídle (v kalorickém nadbytku), a během hladovění (po vyčerpání glykogenových zásob) jsou mastné kyseliny opět uvolněny zpět do



krve a transportovány k patřičným tkáním. Tímto způsobem ovlivňuje tuková tkáň hladiny mastných kyselin v krvi (Voet, 1994).

### **1.1.2. Hnědá tuková tkáň**

Na rozdíl od bílé tukové tkáně, hnědá tuková tkáň obsahuje velké množství tukových kapének (multilokulární) a mitochondrií, což se odráží na výsledném hnědém zbarvení tkáně (dáno přítomností mitochondriálních cytochromů). Hnědá tuková tkáň je bohatě prokrvená a všechny multilokulární buňky jsou opatřeny vlastním nervovým zakončením sympatiku (Cannon and Nedergaard, 2004).

Hnědá tuková tkáň existuje u savců, kde funguje především jako termogenní orgán (Aldridge and Street, 1968), protože energii uvolněnou např. oxidativním štěpením mastných kyselin a glukózy nevyužívá pro syntézu ATP, ale rovnou na tvorbu tepla. Termogeneze hnědého tuku je aktivována při nízké teplotě nebo při nadměrném příjmu potravy (Cannon and Nedergaard, 2004). Tento děj je indukován noradrenalinem uvolněným z nervových zakončení sympatiku na adipocytech. Noradrenalin se váže na  $\beta$  adrenergní receptor, tím dochází k aktivaci HSL, která uvolňuje mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou transportovány do mitochondrií, kde jsou oxidovány. Protony, které jsou transportovány ven z mitochondrie (do mezimembránového prostoru), tvoří protonový gradient, který je zkratován odpřahujícím proteinem 1 (UCP1), což vede k navrácení protonů do mitochondrie a tvorbě tepla (Cannon and Nedergaard, 2004).

Hnědá tuková tkáň je nejvíce zastoupena u novorozenců a malých savců, u nichž kompenzuje tepelné ztráty v důsledku vysokého poměru mezi plochou a hmotností těla. Konkrétně je lokalizována mezi krčními svaly, v podkoží mezi lopatkami, v hrudní dutině (okolo thymu a aorty) a perirenálně. U člověka dochází během života k výrazné redukci této tkáně a začíná mnohonásobně převažovat bílá tuková tkáň (Cannon and Nedergaard, 2004).

## **1.2. Bílá tuková tkáň jako endokrinní orgán**

Na tukovou tkáň bylo donedávna nahlíženo pouze jako na orgán specializovaný pro uložení energie, tepelnou izolaci a mechanickou ochranu. V roce 1994 se objevem leptinu výrazně změnil pohled na tukovou tkáň. Zjistilo se, že tuková tkáň produkuje a secernuje do

oběhu látky hormonální povahy (adipokiny) (Polák et al., 2006), které ovlivňují metabolismus organismu a funkci ostatních tkání. Tím se stává tuková tkáň aktivním endokrinním orgánem.

Dnes je známo více jak 100 adipokinů produkovaných tukovou tkání. Některé z nich mohou být dle působení rozděleny na protizánětlivé a prozánětlivé působky (Greenberg and Obin, 2006).

### **1.2.1. Leptin**

Jak bylo zmíněno výše, leptin je prvním objeveným adipokinem (Zhang et al., 1994). Leptin je anorexigenní hormon, který reguluje ukládání tukových zásob. Ovlivňuje chuť k jídlu a skrze aktivaci sympatiku i energetický výdej. Leptin zvyšuje  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin v hepatocytech, svalech a dalších tkáních, čímž je chrání před nadbytečnou akumulací TAG a jejich metabolitů (Shimabukuro et al., 1997). V těchto tkáních leptin působí antagonisticky na PPAR- $\alpha$ , což vede ke stimulaci  $\beta$ -oxidace (Lefebvre et al., 2006). Bylo pozorováno, že při zvýšeném kalorickém příjmu dochází v bílé tukové tkáni ke specifickému blokování působení leptinu a stimulaci PPAR- $\gamma$  (viz kapitola 1., Tuková tkáň) (Wang et al., 2005). Tento protein působí protektivně proti snížení citlivosti tkání k inzulínu. Leptin je produkován tukovou tkání a jeho sekrece pozitivně koreluje s velikostí adipocytů, množstvím tukové tkáně a koncentrací inzulínu v organismu. Tento hormon působí na hypothalamická centra v mozku, skrze která reguluje příjem potravy a energetický obrát organismu. Kromě značného významu při regulaci příjmu potravy leptin ovlivňuje i periferní tkáně v organismu. Zjistilo se, že tento hormon figuruje v imunitním systému, angiogenezi a regulaci krevního tlaku (Shek et al., 1998). Váže se na specifické receptory (leptinové receptory) na povrchu buněk. Pokud signalizace neprobíhá správně, z důvodu nedostatku leptinu nebo rezistenci na receptoru, nepřenesou se signál do hypothalamických center a nedojde k utlumení chuti k jídlu ani k energetickému výdeji, což se výsledně podílí na vzniku obezity. U obézních pacientů jsou pozorovány vysoké hladiny tohoto proteinu doprovázené leptinovou rezistencí (Münzberg et al., 2004; Münzberg et al., 2005). Tento stav je charakterizován jako leptinová rezistence. Při leptinové rezistenci byla pozorována snížená citlivost leptinových receptorů pro leptin, obdobně jako u diabetu mellitu II. typu a citlivosti receptorů na inzulín, ovšem molekulární mechanismy jsou odlišné.

### 1.2.2. Resistin

Resistin je signální polypeptid, který je produkován převážně zralými adipocyty u myši, v makrofázích u lidí a také v menší míře i ve svalu, slezině, hypothalamu, gastrointestinální soustavě a slinivce (Banerjee et al., 2004). Bylo zjištěno, že existují i molekuly podobné resistinu tzv. resistin like molecules  $\alpha$  a  $\beta$  (REML), které mají obdobné vlastnosti, ovšem liší se v biologických funkcích (Ukkola, 2002). Resistin je stimulován zánětlivými cytokiny (IL-1, IL-6, IL-12 a TNF $\alpha$ ) a potlačuje transport glukózy do buněk.

Jeho fyziologický význam není doposud zcela znám. Zdá se, že působí při adaptaci organismu během hladovění (Steppan et al., 2001). Myši s vyřazeným genem pro resistin, vykazovaly nízké hladiny glykémie v hladovém stavu. Tento stav je zřejmě důsledkem zhoršené glukoneogeneze v játrech, což patrně vysvětluje snížené exprese genů pro glukóza-6-fosfatázu a fosfoenolpyruvát karboxykinázu oproti kontrolním myším (Banerjee et al., 2004). Bylo pozorováno, že resistin potlačuje aktivaci AMPK v játrech a svalech a stimuluje expresi genu pro SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling 3), který se váže k receptorům s tyrosin-kinázovou aktivitou a tím inhibuje různé signalizační dráhy jako je např. signalizace leptinu a inzulínu (Galic et al., 2010).

Resistin byl objeven v roce 2001 jako další protein, který se podílí na vzniku inzulínové rezistence. Zjistilo se, že podávání antidiabetických látek (thiazolidindionů) snižovalo expresi genu pro resistin i sekreci proteinu a následně došlo ke zlepšení citlivosti buněk k inzulínu. Také imunoneutralizace pomocí protilátky anti-resistin immunoglobulin- $\gamma$  omezila hyperglykémii a snížila inzulínovou rezistenci (Steppan et al., 2001). Naopak podávání resistinu *in vivo* vedlo k zhoršení glukózové tolerance a k inzulínové rezistenci beze změny hladiny inzulínu. Zvýšené sérové hladiny pozorujeme u dietou indukované obezity stejně jako u pacientů s obezitou nebo diabetem 2. typu (Steppan et al., 2001).

### 1.2.3. Adiponektin

Adiponektin byl poprvé v roce 1995 izolován z myších adipocytů. Adiponektin byl objeven několika laboratořemi nezávisle na sobě, proto získal různá pojmenování (Acrp30, AdipoQ, apM1, gelatin binding protein 28). Dohodlo se používat název adiponektin (Turer et al., 2012). Velikost adiponektinu je 30 kDa a může se nacházet v multimerní podobě. Zásadní zjištění bylo, že sekrece tohoto proteinu je zvýšena inzulínem (Scherer et al., 1995, Fruebis et al., 2001). Tento protein působí skrze adiponektinový receptor 1 (AdipoR1) a adiponektinový

receptor 2 (AdipoR2) (Yamauchi et al., 2003). Zmíněné receptory jsou lokalizovány na cytoplasmatické membráně a mají 7 transmembránových domén, obdobně jako receptory spřažené s G proteiny, ovšem liší se ve funkci a polaritě konců (Yamauchi et al., 2011). AdipoR1 je exprimován téměř ve všech tkáních a vykazuje vysokou afinitu ke globulárnímu fragmentu C-terminální domény adiponektinu, zatímco AdipoR2 je typický pro kosterní sval a jaterní tkáň a vykazuje střední afinitu ke globulárnímu fragmentu i k celé molekule adiponektinu (Okazaki et al., 2002). Adiponektin je tvořen především tukovou tkání štíhlých jedinců, ale v malém množství se může tvořit i v dalších tkáních, jako jsou kosti, kde se předpokládá, že pozitivně působí na kostní denzitu (Berner et al., 2004). Jeho produkce je stimulována agonisty PPAR- $\gamma$ . Experimenty prokázaly, že krevní koncentrace adiponektinu negativně koreluje se množstvím tuku v organismu, inzulinovou rezistencí a je obvykle snížena u pacientů s obezitou a diabetem (Hotta et al., 2000). Adiponektin působí v dílčích tkáních odlišně. V srdeční svalovině působí proti hypertrofii myokardu, a proto by se mohl uplatnit při léčbě hypertrofické kardiomyopatie u pacientů s T2DM a obezitou (Shibata et al., 2004). Dále se adiponektin podílí na potlačení vzniku a vývoji aterosklerózy, protože inhibuje přeměnu makrofágů v pěnové buňky (Yamauchi et al., 2003). V hypothalamu (v nucleu arcuatu) stimuluje příjem potravy a potlačuje energetický výdej (Kadowaki et al., 2008). V pankreatu působí protektivně na  $\beta$  buňky a stimuluje jejich funkci. Adiponektin má anti-apoptotický charakter, který je dán aktivací ceramidázy, což vede ke snížení hladin intracelulárních ceramidů a zvýšení anti-apoptotických metabolitů - sfingosin 1 fosfátů (Holland et al., 2011). Adiponektin se podílí na modulaci glukózového a lipidového metabolismu. Zlepšuje citlivost svalové tkáně k inzulinu, protože zvyšuje oxidaci mastných kyselin, což vede k redukci množství triglyceridů (Havel et al., 2002, Fruebis et al., 2001). V játrech snižuje produkci glukózy a rovněž zvyšuje oxidaci mastných kyselin a jejich metabolismus (Greenberg and Obin, 2006).

### **1.2.5. TNF- $\alpha$**

Nádor nekrotizující faktor - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je nejznámějším prozánětlivým adipokinem. Je to faktor uvolňovaný tukovou tkání, u kterého se předpokládalo, že úzce souvisí s obezitou, zánětem a diabetem (Hotamisligil et al., 1993). Bylo pozorováno, že hladiny tohoto proteinu pozitivně koreluje s BMI, množstvím tuku v těle a s hladinami inzulinu a negativně koreluje s aktivitou LPL (Park et al., 2005, Hotamisligil et al., 1997). TNF- $\alpha$  je produkován různými

typy buněk, jako jsou např. buňky imunitního systému, astrocyty a kardiomyocyty a u obézních lidí i adipocyty.

Tento protein je syntetizován jako pro-hormon, tzv. membránový protein typu II (membránový TNF- $\alpha$ ) a následně sestřížen do finální podoby (solubilní TNF- $\alpha$ ). Solubilní TNF- $\alpha$  je aktivní forma, která je zřejmě zodpovědná za většinu účinků (Kriegler et al., 1988), a která se váže na 2 typy receptorů- TNFR1 a TNFR2. Zdá se, že se signalizace přes TNFR1 podílí na apoptóze, diferenciaci a proliferaci buněk. Zatímco působení skrze TNFR2 je lokalizované především v imunitních buňkách jako např. buňky v thymu nebo T-buňky, kde se podílí na jejich proliferaci. Bylo pozorováno, že množství těchto receptorů je zvýšené během otravy krve, rakoviny, autoimunitních onemocnění, chřipky, leukémie a obezity (Hotamisligil et al., 1997). TNF- $\alpha$  se podílí na vývoji aterosklerózy, selhání srdce a pankreatitidy. Existuje mnoho důkazů, že TNF- $\alpha$  hraje důležitou roli v patogenezi inzulínové rezistence (Palladino et al., 2003). *In vivo* imunoneutralizace TNF- $\alpha$  u obézních diabetických zvířat vedla ke zvýšení inzulínové senzitivity (Moller DE, 2000). Také TNF- $\alpha$  deficientní myši vykazovaly nižší hladiny mastných kyselin (FFA) a TAG a byly v porovnání s kontrolami chráněny proti inzulínové rezistenci podmíněné obezitou (Hotamisligil et al., 1996).

### 1.2.6. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) je prozánětlivý cytokin produkovaný adipocyty a makrofágy, který může spustit akutní fázi zánětu. Při zánětlivých reakcích moduluje metabolismus cukrů a tuků, čímž zajišťuje energii potřebnou pro buňky imunitního systému. IL-6 redukuje aktivitu lipoproteinové lipázy (LPL), což vede k nižšímu uskladnění TAG do tukové tkáně (Mohamed-Ali et al., 1997). IL-6 zvyšuje jak bazální, tak i inzulínem stimulovaný transport glukózy do buněk díky zvýšené translokaci GLUT4 na buněčnou membránu (Carey et al., 2006). Ve studii (Kahn et al., 2005) bylo zjištěno, že IL-6 se podílí na modulaci glukózového a lipidového metabolismu pomocí AMPK, která fosforyluje (inhibuje) aktivitu ACC, což vede ke snížení malonyl-CoA, inhibici CTP-1 a zvýšení oxidace mastných kyselin (Kahn et al., 2005).

Při patologických stavech jako např. u pacientů s T2DM byly měřeny zvýšené plazmatické hladiny tohoto proteinu a zjistilo se, že IL-6 pozitivně koreluje s BMI a plazmatickými koncentracemi mastných kyselin (Park et al., 2005). Na myších modelech bylo

ukázáno, že se IL-6 podílí na vzniku inzulínové rezistence, tím, že stimuluje expresi SOCS-3 obdobně jako resistin (viz výše) (Galic et al., 2010).

## **2. Metabolismus**

Každý živý organismus je z termodynamického pohledu otevřený systém. Pro veškeré životní funkce potřebuje přísun hmoty a energie z okolí. Organismy, využívající energii ve formě organických redukovaných látek z potravy, řadíme mezi heterotrofy. Heterotrofové získávají oxidací živin a následnou syntézou univerzální přenašeč energie, konkrétně molekuly adenosintrifosfátu (ATP) tvořené vysokoenergetickými vazbami. Při štěpení těchto vazeb (hydrolytické či pyrofosfátové štěpení) se uvolňuje energie potřebná pro veškeré endergonické reakce typické pro syntetické (anabolické) procesy. Pokud je zásoba ATP poměrně malá, může být podpořena reakcí ADP s kreatinfosfátem, kdy dochází k defosforylaci kreatinu a tvorbě ATP (Trojan et al., 2003). Naopak při rozkladných (katabolických) procesech dochází k uvolnění energie využitě v dalších reakcích (spřažené reakce) nebo se energie využije pro syntézu ATP. Sacharidy a lipidy jsou organické látky vstupující do katabolických reakcí. Za aerobních podmínek jsou sacharidy a lipidy metabolizovány na společný meziprodukt acetyl-koenzym A (acetyl-CoA). Tento děj je zajištěn u sacharidů glykolýzou probíhající v cytosolu buňky, u lipidů dochází ke štěpení primárně v peroxizomech a následně v mitochondriální matrix procesem  $\beta$ -oxidace (Voet, 1994).

### **2.1. Mitochondriální metabolismus**

Mitochondrie jsou hlavním kompartmentem buňky zajišťujícím energetický metabolismus a podílejí se na uskladnění vápenatých kationtů. Probíhají zde procesy jako jsou např. oxidační fosforylace spojená se syntézou a produkcí ATP, Krebsův cyklus a  $\beta$ -oxidace mastných kyselin.

Předpokládá se, že mitochondrie hrají významnou roli ve vývoji inzulínové rezistence (viz kapitola 4) a T2DM, protože v těchto patologických stavech byl pozorován nižší počet mitochondrií a zvýšená koncentrace TAG ve svalu (Petersen et al., 2004).

V mitochondriích dochází k přenosu redukovaných elektronů na NADH a FADH<sub>2</sub>, které vznikají při metabolizování acetyl-CoA v Krebsově cyklu, přes komplexy dýchacího řetězce na vnitřní mitochondriální membráně. Tento děj probíhá za spotřeby kyslíku. V membráně fungují 4 komplexy tvořící respirační řetězec, na který navazuje pátý komplex (FoF1 ATPáza) zajišťující oxidační fosforylaci. Předávání elektronů jde ve směru

vzrůstajícího redoxního potenciálu (-400mV až 800 mV) až na konečný akceptor, kterým je za aerobních podmínek kyslík, za vzniku vody. Během přenášení elektronů přes komplexy je uvolněna část energie, která je použita pro transport vodíkových protonů (H<sup>+</sup>) přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru. Protože je vnitřní mitochondriální membrána pro protony nepropustná, vzniká na obou stranách membrány rozdílná koncentrace protonů a rozdílné napětí (dáno nábojem) souhrnně označované jako protonový gradient. Tato energie, nazývána také jako proton-motivní síla je využita na syntézu ATP tím, že nechává procházet protony přes ATP syntházu do matrix mitochondrie za tvorby ATP.

Ne vždy dochází k tvorbě ATP. Napětí na membráně je možné „zkratovat“ pomocí odpráhujících proteinů (UCP) a tím uvolnit energii ve formě tepla, jak bylo zmíněno výše v kapitole hnědé tukové tkáně. Dodnes bylo popsáno několik typů potenciálních odpráhovačů v závislosti na místě tkáňového působení viz tabulka č. 1.

protein	Tkáň	Buněčný typ
UCP1	Hnědá a bílá tuková tkáň	Adipocyt
UCP2	Slezina, plíce, žaludek, bílá tuková tkáň, pankreas	Makrofág, adipocyt, preadipocyt, β buňky
UCP3	Kosterní a srdeční sval, hnědá tuková tkáň	Myocyt, adipocyt
UCP4	Mozek	
UCP5	Mozek a další tkáně	

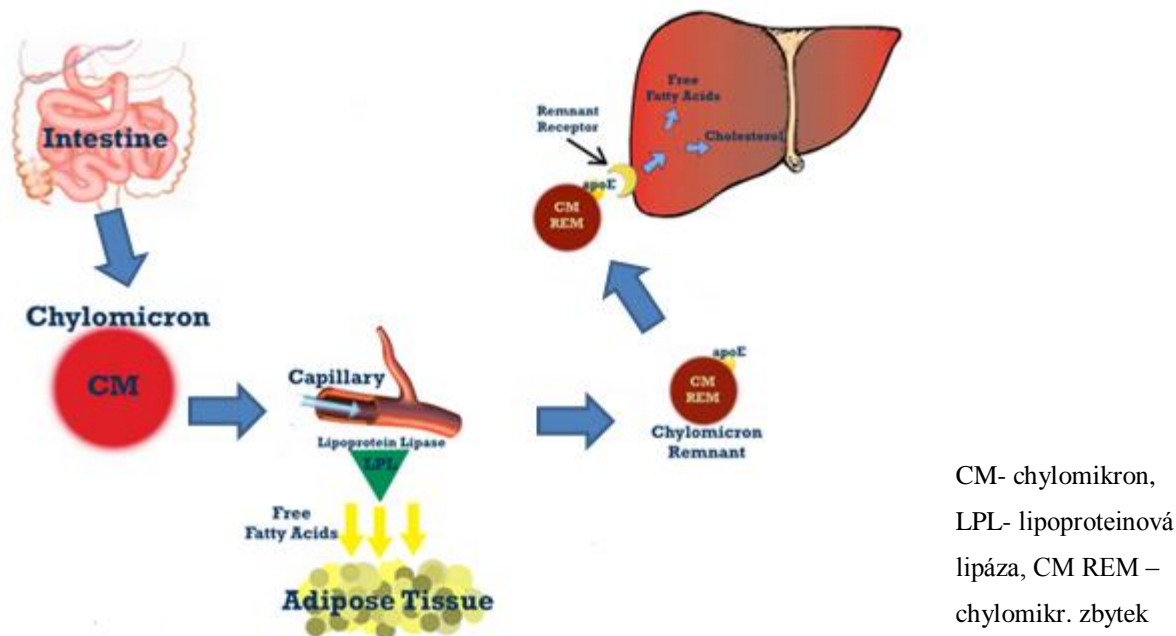
Tab. č. 1: Typy UCP a jejich lokalizace ve tkáni

## 2.2. Metabolismus lipidů

Lipidy jsou látky rozpustné v organických rozpouštědlech. V lidském těle zajišťují elektrickou a tepelnou izolaci, mechanickou ochranu a regulaci metabolických pochodů. Největší zastoupení lipidů v potravě tvoří triacylglyceroly (TAG), triestery mastných kyselin a glycerolu, které spolu s cholesterylestery (CHE) tvoří jádro lipoproteinových částic (především VLDL, LDL), chylomikronů a centrální tukové kapénky adipocytů.

Po jídle se TAG dostávají do organismu přes tenké střevo (*duodenum*). V tenkém střevě jsou tyto TAG za pomoci žlučových kyselin a pankreatických lipáz, štěpicích esterovou

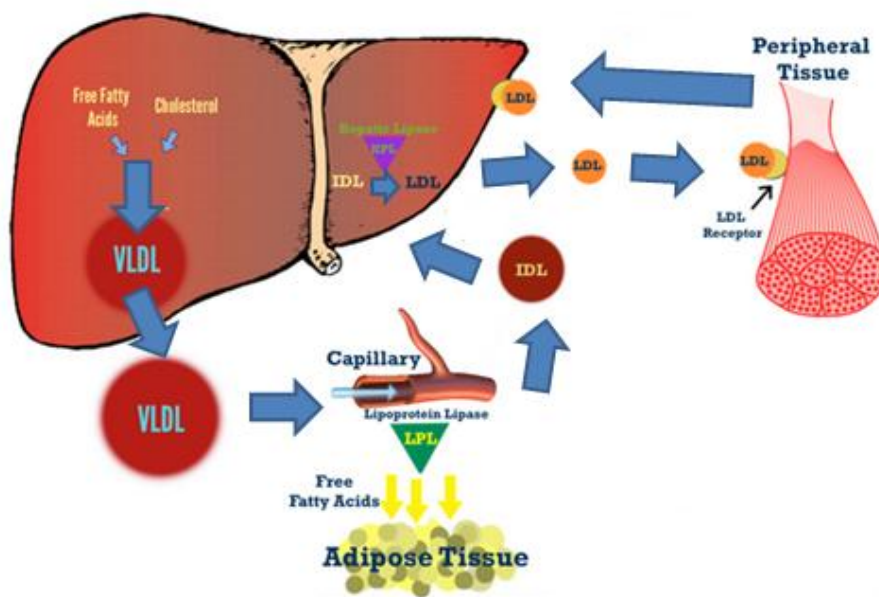
vazbu, rozloženy na diacylglyceroly (DAG), monoacylglyceroly (MAG) a směs volných mastných kyselin (FFA). Veškeré produkty jsou následně transportovány přes střevní epitel. Ve střevní buňce jsou FFA, MAG, DAG reesterifikovány na TAG. V této fázi TAG spolu s CHE tvoří jádro chylomikronu obaleného vnější vrstvou tvořenou cholesterolem (CH), fosfolipidy (PL), apolipoproteiny a enzymy. Takto sestavené komplexy obsahující značné množství TAG slouží jako zdroj FFA pro tkáň (především svaly a myokard) a pro tvorbu energetických zásob (tuková tkáň). Chylomikrony putují přes lymfatický systém do krevního řečiště a do jater. V krvi jsou hydrolyzovány lipoproteinovou lipasou (LPL) vázanou na krevní endotel cévní stěny, která odštěpuje FFA a glycerol (Vilella et al., 1993). Uvolněné FFA jsou ve tkáních oxidovány a využity jako zdroj energie v době hladovění, nebo působením inzulínu neesterifikovány za tvorby TAG a uskladněny jako energetické zásoby v tukové tkáni. Glycerol je z krevního řečiště vychytáván játry a následně použit v glykolýze či glukoneogenezi nebo přeměněn na glycerol-3-fosfát, který je dopraven do tukové tkáň a využit pro reesterifikaci. Chylomikrony ochuzené o TAG (chylomikronová remnanta), putují do jater, kde skrze receptorem zprostředkovanou endocytózu dopravují FFA a CH do jater. Touto exogenní cestou (z potravy přes střevní epitel) se dostávají do těla TAG, FFA a cholesterol a další (viz níže Obr. 3).



Obr. 3: Exogenní transport TAG, CH, FFA do těla. Převzato a upraveno podle <http://geekymedics.com>



V játrech jsou FFA a cholesterol (z exogenní dráhy nebo nově syntetizované) reesterifikovány za tvorby lipoproteinů (VLDL) a uvolněny do krve. Cirkulující VLDL jsou stejně jako chylomikrony zdrojem TAG pro periferní tkáň. Dále postupně vznikají IDL částice, které jsou v játrech pomocí jaterní lipázy (HPL) přeměněny na LDL částice. LDL částice jsou zdrojem cholesterolu pro periferní tkáň, kde vazbou k LDL receptoru uvolňují cholesterol. Přebytečné LDL částice mohou skrze svůj receptor vracet cholesterol zpět do jater. Touto endogenní cestou jsou transportovány TAG a cholesterol na periferii (Trojan et al., 2003).



Obr. 4: Endogenní transport lipidových částic v organismu. Převzato a upraveno podle <http://geekymedics.com>

HDL částice vznikají v hepatocytech a částečně i enterocytech jako nascentní HDL, které obsahují fosfolipidy a proteiny. Tyto nascentní HDL částice přijímají z buněčných membrán periferních tkání a povrchových struktur jiných krevních lipoproteinů volný cholesterol, který je v částici esterifikován pomocí lecitin-cholesterolacyltransferázy (LCAT) za tvorby cholesterylesterů (CHE). Nahromaděné CHE tvoří jádro HDL částice. Část cirkulujících HDL částic s cholesterolem může být transportována do jater, odkud je tento cholesterol vylučován žlučí (Trojan et al., 2003). Další množství HDL částic může vstupovat do procesu známého jako reverzní transport cholesterolu z periferních částí do jater. V tomto procesu dochází k výměně cholesterolu za TAG mezi HDL a VLDL částicemi, kdy HDL inkorporuje TAG, které jsou následně v játrech hydrolyzovány. Přenos cholesterolu z HDL na VLDL zajišťuje protein zvaný CETP (cholesterol ester transfer protein). Tímto způsobem se

dostává cholesterol z buněčných membrán od HDL do VLDL přeměněné na IDL či LDL do jater.

### 2.2.1. Syntéza mastných kyselin

Organismus nezískává mastné kyseliny pouze z potravy, je schopný nasyntetizovat mastné kyseliny *de novo*. Syntéza probíhá v cytosolu buňky, kdy karboxylací acetyl-CoA vzniká malonyl-CoA. Tuto reakci katalyzuje enzym acetyl-CoA karboxyláza (ACC), který je regulován adenosin monofosfát proteinovou kinázou (AMPK). Z malonyl-CoA dochází sledem několika enzymatických reakcí katalyzovaných syntázou mastných kyselin (FAS) k tvorbě palmitátu. Následně je z palmitátu za pomoci elongáz a desaturáz tvořena řada mastných kyselin (Voet 1994).

Lipogeneze je proces zajišťující tvorbu energetických zásob. Zahrnuje syntézu mastných kyselin a jejich esterifikaci s glycerolem za vzniku TAG. Lipogeneze je současně regulovaná inzulínem, který stimuluje aktivitu lipogenních enzymů, a glukagonem, který působí protichůdně. Po jídle dochází působením inzulínu k ukládání energetických zásob do tukové tkáně. V této tkáni inzulín inhibuje působení HSL, čímž utlumí lipolýzu spolu se sekrecí mastných kyselin a stimuluje *de novo* syntézu mastných kyselin a lipogenezi. V regulaci lipogeneze hrají významnou roli transkripční faktory (viz kapitola 1) z rodiny SREBP a nukleární faktor PPAR- $\gamma$  stimuluje transkripci lipogenních enzymů. Bylo pozorováno, že polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) mimo jiné potlačují expresi SREBP (Horton et al., 2002) a snižují transkripci genů pro FAS a ACC a stimuluje transkripci genů pro enzymy zapojené do  $\beta$ -oxidace (Yahagi et al., 1999).

Při dlouhodobé zvýšené kalorické nabídce může dojít k překročení úložné kapacity tukové tkáně a následnému toxickému působení FFA v organismu, které může vést k rozvoji inzulínové rezistence. V tomto stavu, kdy inzulín nepůsobí efektivně, nedochází k potlačení funkce HSL, což může vést k nekontrolovatelné lipolýze a zvýšené sekreci mastných kyselin do cirkulace. Důsledkem jsou mnohem vyšší hladiny FFA v krvi, což se významně podílí na rozvoji IR a T2DM (Bell et al., 2008).

### 2.2.2. Oxidace mastných kyselin

K rozkladu mastných kyselin dochází procesem  $\beta$ -oxidace, který probíhá primárně v matrix mitochondrií a v peroxizomech. Oxidace je v obou kompartmentech buňky po

chemické stránce stejná, liší se pouze v enzymech. Peroxizomální enzymy pracují především s dlouhými řetězci mastných kyselin (obvykle FFA s 22 uhlíky a více). Jejich úlohou je zkrácení mastné kyseliny před vstupem do mitochondrií.

Před konkrétním štěpením mastné kyseliny musí být kyselina aktivována enzymem acyl-CoA syntetázou, kdy je acylová skupina mastné kyseliny navázána na molekulu koenzymu A za vzniku acyl-CoA. K tomuto kroku dochází v cytoplazmě za spotřeby ATP.

Přenos mastné kyseliny do matrix mitochondrie zajišťuje systém zvaný acyl-CoA karnitinový přenašeč spolu s translokázou. Na acyl-CoA je pomocí karnitin-palmitoyl-transferázy I (CPTI) přenesen karnitin za vzniku acyl-karnitinu a CoA. Acyl-karnitin je následně pomocí translokázy přenesen přes vnitřní mitochondriální membránu, kde karnitin-palmitoyl-transferáza II (CPTII) přenáší acyl z acyl-karnitinu zpět na CoA. Vzniklý acyl-CoA v matrix mitochondrie vstupuje do procesu  $\beta$ -oxidace.  $\beta$ -oxidace je sled 4 reakcí, kdy v první reakci dochází k dehydrogenaci katalyzovanou acyl-CoA dehydrogenázou, v dalším kroku je vzniklý produkt hydratován za působení enzymu enoyl-CoA. V třetí reakci dochází opět k dehydrogenaci pomocí  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy. V poslední reakci je produkt štěpen acyl-CoA acetyltransferázou. Výsledným metabolitem je acetyl-CoA, který je dále metabolizován v citrátovém cyklu (Voet 1994).

### 2.2.3. Lipolýza

Lipolýza je důležitý mechanismus, při kterém dochází k uvolnění energie uskladněné v tukových kapénkách. Konkrétně jde o štěpení (hydrolýzu) esterových vazeb TAG za vzniku FFA a glycerolu. Na lipolýze se podílejí různé proteiny jako např. perilipin, hormon senzitivní lipáza (HSL) a lipáza triacylglycerolů (ATGL). Tento děj zabezpečuje energetické nároky organismu u energeticky náročných stavů, jako je např. hladovění, stres, fyzická aktivita a nemoc. Štěpení TAG zajišťují lipázy, především HSL (Fredrikson et al., 1981), která z diacylglycerolu a triacylglycerolu odštěpuje mastnou kyselinu. HSL je regulována fosforylací a defosforylací. Při hladu, stresu nebo fyzické aktivitě, dochází k aktivaci sympatiku a vazbě katecholaminu na  $\beta$ -adrenergní receptor, který přenesení signál na trimerní G protein, který aktivuje adenylátcyklázu a tvorbu cAMP, které aktivuje cAMP-dependentní protein kináza (PKA) (Huttunen et al., 1970). Dojde k fosforylaci perilipinu, povrchovému proteinu tukové kapénky chránícímu kapénku před působením lipáz během bazálního stavu (Tansey et al., 2001). Fosforylovaný perilipin změní konformaci a usnadní přístup HSL a tedy

i lipolýze (Schimmel et al., 1980). Aktivaci HSL zprostředkovává sympatikus, glukagon, katecholaminy, kortizol, růstový hormon a hormony štítné žlázy (Vaughan et al., 1964). Naopak inhibici zajišťuje parasympatikus a inzulín (Holm 2003).

Původně se myslelo, že HSL je jediná lipáza zajišťující katabolismus uskladněných lipidů. Nicméně se zjistilo, že myši s deficiencí HSL vykazovaly lipázovou aktivitu v tukové tkáni a byly v porovnání s kontrolami štíhlejší (Haemmerle et al., 2003). Tento výsledek poukazyval na to, že HSL kooperuje i s dalšími neidentifikovanými lipázami. O rok později byl popsán nový protein, dnes známý jako „adipose triglyceride lipase“ (ATGL), který štěpí triacylglyceroly a vykazuje tak lipázovou aktivitu (Villena et al., 2004). Také bylo prokázáno, že ATGL hraje důležitou roli v degradaci tukových částic jak v adipocytech, tak i v ostatních buněčných typech (Smirnová et al., 2006).

### **2.3. Metabolismus ve svalu**

Kosterní svaly patří mezi významně metabolicky aktivní tkáně. Jsou tvořeny třemi typy svalových vláken lišících se funkčními, histochemickými a morfologickými vlastnostmi.

Součástí svalové tkáně jsou také lipidy, které mohou být uloženy v myocytech (intramyocelulární) a v tukových buňkách mezi svalovými vlákny (extramyocelulární).

Kosterní sval slouží jako zásobárna glykogenu v těle. Glykogen je v této tkáni efektivně štěpen na glukóza-6-fosfát, který může být aerobně nebo anaerobně zpracován za vzniku laktátu, který je transportován do jater, kde je v procesu glukoneogeneze přeměněn na glukózu. Kooperace mezi svaly a játry se tak v procesu Coriho cyklu významně podílí na udržování glykemické homeostáze.

Oproti játrům nebo ledvinám nejsou svaly glukoneogenním orgánem, protože nemají glukóza-6-fosfatázu, enzym defosforylující glukózu, a fosfoenolpyruvát karboxykinázu, enzym přeměňující oxalacetát na fosfoenolpyruvát, a proto nemohou svaly exportovat glukózu do krve.

Během hladovění jsou nízké hladiny inzulínu, proto je snížen i transport glukózy do svalových buněk přes GLUT4. V tomto stavu využívá sval energii z mastných kyselin. Tuková tkáň vlivem hormon senzitivní lipázy (HSL) uvolňuje mastné kyseliny a cirkulaci je transportuje ke svalům, kde stoupá jejich oxidace. Důležitou roli v lipidovém metabolismu ve svalu hraje lipoproteinová lipáza (LPL), jejíž aktivita během hypoinzulinémie ve svalu stoupá a v tukové tkáni klesá, což je dáno působením adrenalinu v jednotlivých tkáních (Cryer et al., 1976).

Po jídle glukóza stimuluje v  $\beta$ - buňkách pankreatu uvolňování inzulínu, který zajišťuje transport glukózy do svalových buněk a s tím spojené metabolické procesy jako např. glykolýzu a tvorbu a uložení glykogenu. Oxidace mastných kyselin je inzulínem inhibována (Campbell et al., 2006).

#### **2.4. Metabolismus v játrech**

Játra jsou centrálním metabolickým orgánem, který díky své poloze čerpá živiny portální žilou přímo z gastrointestinálního traktu. Játra se významně podílejí na udržování glykémie a lipidového metabolismu. Jsou také významnou zásobárnou glykogenu a zajišťují energetické substráty pro mozek, svaly a další tkáně (Trojan et al., 2003). Oproti myocytům a adipocytům vstupuje glukóza do jater skrze glukózový přenašeč GLUT2, který nemusí být aktivován inzulínem (Pilkis and Granner, 1992). Játra také přeměňují v procesu zvaném Coriho cyklus laktát vyplavený svalovou tkání při anaerobní práci na glukózu. Dále zajišťují tvorbu a odbourávání TAG, lipoproteinů a cholesterolu (Voet, 1994).

Po jídle je glukóza působením inzulínu transportována do jater, kde může být uložena jako zásobní glykogen nebo metabolizována na acetyl-CoA, který je meziproduktem při syntéze mastných kyselin, fosfolipidů a cholesterolu. V játrech probíhá pomocí glycerolkinázy přeměna glycerolu na glycerol-3-fosfát, který může být reesterifikován mastnými kyselinami za tvorby TAG, které mohou být uvolněny z jater v podobě VLDL částic a mohou energeticky zásobovat periferní tkáně (Voet, 1994).

Během hladovění dochází vlivem glukagonu ke štěpení glykogenu (glykogenolýze) a vyplavení glukózy z jater do oběhu. Pokud hladovění přetrvává, dochází ke glukoneogenezi, tvorbě glukózy z necukerných složek, jako jsou např. aminokyseliny, glycerol nebo laktát. Během tohoto stavu také dochází k lipolýze a  $\beta$ - oxidaci. Živočichové nemohou přetvářet mastné kyseliny na glukózu, ale jsou schopni je přeměnit v játrech na ketolátky (acetoacetát, aceton). Ketolátky slouží jako zdroj energie pro svaly a mozek v případě, že jsou vyčerpány látky zajišťující tvorbu glukózy (Voet 1994).

### **3. Inzulínová rezistence**

Inzulínová rezistence (IR) je charakterizována jako stav snížené citlivosti periferních tkání k fyziologickým hladinám cirkulujícího inzulínu v plazmě a neschopností inzulínu

potlačit produkci glukózy v játrech. Jedná se o stav, kdy normální hladiny inzulínu v plazmě vyvolávají nižší biologickou odpověď organismu. Při neúčinné nebo snížené inzulínové signalizaci nejsou buňky například schopny účinně vstřebávat glukózu a následně jí metabolizovat. Tato porucha je nejprve kompenzována zvýšenou sekrecí inzulínu z  $\beta$ - buněk (Reaven, 1988). I přes zvýšenou sekreci inzulínu začíná krevní glukóza stoupat, protože jsou tkáně rezistentní k inzulínu. V okamžiku, kdy  $\beta$ -buňky nejsou schopny ani maximálně zvýšenou sekrecí inzulínu normalizovat vzrůstající hladinu glukózy, nastává stav glukózové intolerance. Pokud tento stav přetrvává, dochází kvůli toxickému účinku glukózy k apoptóze  $\beta$ -buněk a tedy úbytku inzulínu a následnému rozvoji T2DM (Butler et al., 2003).

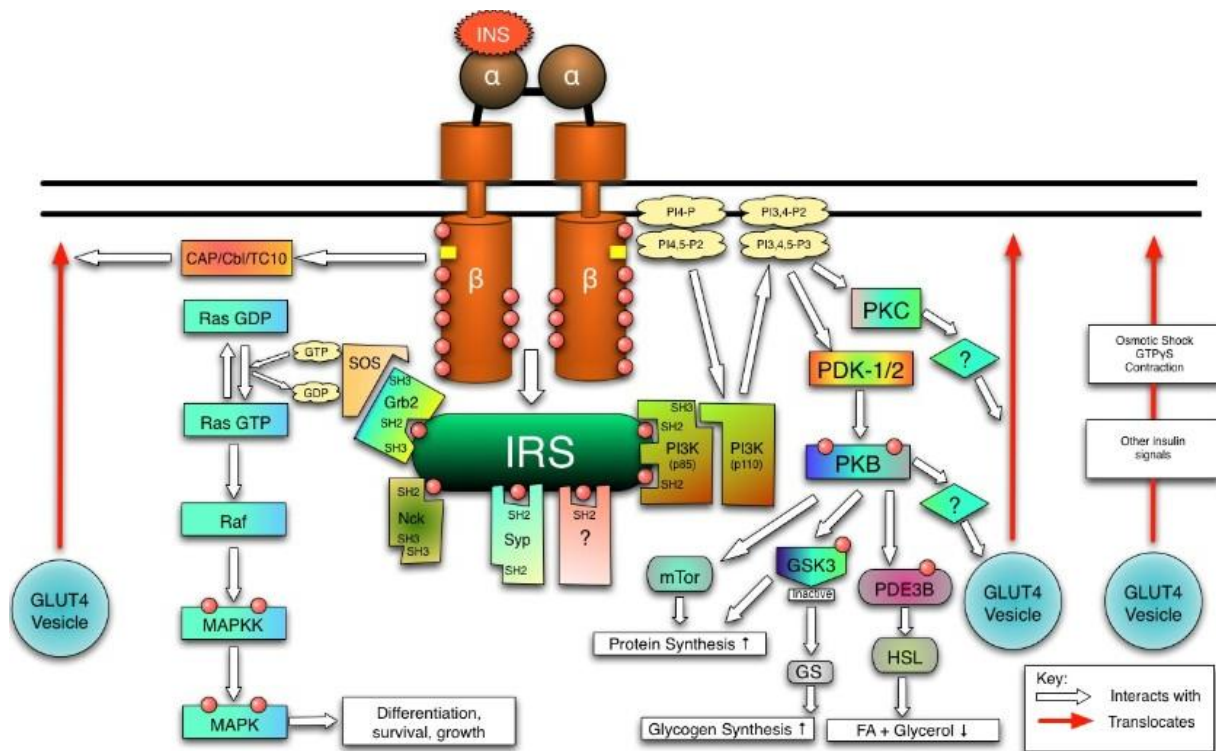
### **3.1. Působení inzulínu a jeho sekrece**

Inzulín a glukagon jsou hlavní hormony zajišťující stálou hladinu glukózy v krvi (glykémii). Inzulín je produkován  $\beta$ -buňkami pankreatu a secernován do krve. Inzulín reguluje metabolismus glukózy a lipidů. Je to zásadní protein, který reguluje velké množství procesů v buňce. V systém stavu kromě dalších zajišťuje např. příjem glukózy do buněk na periferii, jako jsou např. hepatocyty, myocyty a adipocyty. Inzulín stimuluje syntézu a ukládání TAG v tukové tkáni (Campbell et al., 2006), stimuluje syntézu glykogenu a jeho následné ukládání v játrech a svalech a inhibuje lipolýzu a glukoneogenezi v játrech. Inzulínová signalizace probíhá skrze inzulínové receptory na plazmatických membránách cílových buněk.

Sekrece inzulínu je regulována hladinou krevní glukózy v pankreatu, která je do buněk přenášena skrze GLUT2. V buňce vstupuje glukóza do glykolýzy, procesu, který přeměňuje glukózu na pyruvát. V prvním kroku glykolýzy je glukóza fosforylována enzymem glukokinázou (v játrech hexokinázou) na glukóza-6-fosfát (Iynedjian, 1993). Tento děj je zásadním regulačním místem, který určuje rychlost metabolismu glukózy v  $\beta$ -buňce. Následně je glukóza přeměněna na pyruvát, který vstupuje do Krebsova cyklu. Produkty získané z Krebsova cyklu jsou transportovány do mitochondrií, kde jsou metabolizovány za vzniku ATP. Pokud převažují vyšší hladiny ATP nad ADP, dojde k uzavření draselných kanálů a depolarizaci membrány, která otevře vápenaté kanály. Vápenaté kationty aktivují transport sekrečních granulí s inzulínem na povrch membrány (MacDonald et al., 2005).

Inzulínový receptor je tvořený dvěma extracelulárními alfa podjednotkami a dvěma transmembránovými  $\beta$  - podjednotkami s intracelulární částí, která má tyrosin kinázovou aktivitu. Po vazbě inzulínu k alfa podjednotce dojde ke konformační změně a přenesení

signálu na  $\beta$ - podjednotku s následnou aktivací její kinázové aktivity. Aktivovaný inzulínový receptor má vazebné místo pro substrát inzulínového receptoru 1 (IRS-1), po jehož navázání dojde k fosforylaci jeho tyrosinových zbytků. Na fosforylovaný IRS-1 se mohou vázat proteiny s vazebnou SH2 (Src Homology 2) doménou, které následně aktivují signální kaskády jako např. fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K), která je počátkem drah zajišťujících regulaci mnoha fyziologických procesů, například translokaci GLUT4 na plazmatickou membránu, syntézu glykogenu a proteinů, nebo tvorbu TAG (viz obr. 5) (Saltiel and Kahn, 2001). Další dráha inzulínové signalizace vede přes mitogen aktivovanou protein kinázovou dráhu (MAPK) a podílí se na regulaci růstu a diferenciaci buňky. IRS-1 může být kromě tyrosinových zbytků také fosforylován na serinových zbytcích, což ovšem vede k inhibici inzulínové signalizace a rozvoji inzulínové rezistence (Gual et al., 2004).



Obr. 5: Převzato a upraveno podle [http://www.staff.ncl.ac.uk/n.j.morris/gifs/inzulín\\_signalling.jpg](http://www.staff.ncl.ac.uk/n.j.morris/gifs/inzulín_signalling.jpg)

## 3.2. Tkáňově specifická inzulínová rezistence

### 3.2.1. Inzulínová rezistence v kosterním svalu

Svaly jsou jednou ze zásadních tkání využívajících glukózu. Při správné inzulínové signalizaci je do myocytů transportováno přibližně 70 % krevní glukózy (Shulman et al., 1990). Přenos glukózy probíhá skrze glukózové přenašeče GLUT4. Malá množství GLUT4

jsou lokalizována na plazmatické membráně permanentně, ale většina přenašečů je uložena ve váčcích a po přijetí inzulínového signálu je transportována na povrch membrány. V absenci inzulínu jsou GLUT4 endocytovány zpět do zásobních váčků, odkud mohou být působením inzulínu opět transportovány na povrch buňky (Sato et al., 1993).

Během hladovění nebo při stavech, kdy je potřeba snížit využívání glukózy v periferních tkáních a směřovat jí primárně do mozku, dochází v organismu ke krátkodobé IR. Tento děj je zajištěn prostřednictvím Randlova cyklu, kdy dochází k redukcí aktivity hexokinázy, a kdy zvýšená nabídka mastných kyselin vede k jejich preferování jako metabolického substrátu a tedy i k zvýšení  $\beta$  oxidace (Randle 1998).

Pokud tento stav dlouhodobě přetrvává, dochází k nárůstu hladin acetyl-CoA a citrátu, který blokuje pyruvát dehydrogenázu. Právě snížená aktivita hexokinázy a pyruvát dehydrogenázy jsou limitujícím krokem v oxidaci glukózy. Pokud se glukóza začne hromadit v buňce, dojde k inhibici transportu GLUT4 a tedy i přenosu glukózy do buňky a zvýšení hladin v krvi. Vzroste  $\beta$  oxidace mastných kyselin, ale ne Krebsův cyklus s oxidační fosforylací a začnou se hromadit metabolity mastných kyselin a dojde k stresovým reakcím v mitochondrii (Lafontan 2008, D'Alessandro et al., 2006).

### **3.2.2. Inzulínová rezistence tukové tkáně**

Tuková tkáň je důležitým orgánem, který po jídle zajišťuje odstranění mastných kyselin z cirkulace a jejich následné uložení ve formě TAG, jak bylo popsáno v kapitole 2.2. Pokud ovšem dochází k dlouhodobé nabídce energetických zdrojů, dochází k vzniku hypertrofických adipocytů, zvýšení tělesné hmotnosti a vzniku obezity. Hypertrofické adipocyty produkují větší množství prozánětlivých cytokinů (viz kapitola 1.2) a vykazují sníženou citlivost k inzulínu. Inzulín nedokáže efektivně inhibovat lipolýzu v sytém stavu, což vede k trvalému zvýšení hladin cirkulujících volných mastných kyselin v plazmě.

V určitém stádiu je kapacita tukové tkáně přetížena a není schopna normalizovat přebytek energie a ukládat jí ve formě TAG. Proto dochází k ektopickému ukládání TAG do tkání jako je sval, játra, pankreas. Nedostatečná pufrovací kapacita tukové tkáně a ukládání tuku mimo tukovou tkáň doprovází inzulínovou rezistenci ve výše zmíněných periferních orgánech (Boden and Shulman, 2002).

Rezistence tukové tkáně k inzulínu je jednou z příčin, které vedou k systémové rezistenci k inzulínu a k metabolickému syndromu. Oproti svalu, který využívá 70 % glukózy z krve, je do adipocytů transportováno velmi málo glukózy. Na rozvoji systémové IR se proto



tuková tkáň podílí spíše endokrinním působením látek produkovaných touto tkání. Konkrétně jde o souhru proteinů popsanych v kapitole Tuková tkáň jako endokrinní orgán.

### 3.2.3. Inzulínová rezistence jater

Působením inzulínu dochází ke zvýšení koncentrace malonyl-CoA, což je prekurzor syntézy *de novo* mastných kyselin a také inhibitor CPT1. Potlačení funkce CPT1 vede k inhibici  $\beta$  oxidace a hromadění mastných kyselin, které jsou přeměrovány do ER, kde jsou akumulovány ve formě TAG, DAG a ceramidů. Nadměrné ukládání lipidů v játrech způsobuje jaterní steatózu a také aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který v játrech stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů podílejících se na aktivaci stresem indukovaných kináz (Boden et al., 2005). Akumulace nadměrného množství lipidů v ER působí jako stresový faktor, který aktivuje serinové kinázy fosforylující inzulínový receptor, což vede k poškození inzulínové signalizace. Výsledkem je nedostatečná inhibice glykogenolýzy a deregulace glukoneogeneze, díky níž dochází ke zvýšené glykémii v lačném stavu a hyperglykémii v sytém stavu (Lafontan 2008).

### 3.3. Nemoci spojené s inzulínovou rezistencí

Inzulínová rezistence je spojena s řadou onemocnění. Úzce souvisí s obezitou a je patologickým podkladem T2DM, který je jednou ze složek metabolického syndromu (MS).

MS se někdy nazývá také jako syndrom IR, mnohočetný metabolický syndrom X, Reavenův syndrom či Kaplanův „ smrtící kvartet“ (Pelikánová, 2004). V roce 2005 mezinárodní diabetologická federace definovala MS jako onemocnění, které vyžaduje přítomnost centrální obezity (obvod pasu u mužů nad 94 cm, u žen nad 80 cm) a minimálně přítomnost 2 faktorů z níže jmenovaných (Alberti et al., 2005; Grundy et al., 2004):

- hypertriacylglycerolémie (hladina TG v plazmě > než 150mg/dl, tedy 1,7mmol/l)
- nižší HDL cholesterol (< než 40 mg/dl, tedy 1,03mmol/l u mužů a 50 mg/dl, tedy 1,29 mmol/l u žen)
- hypertenze (systolický tlak  $\geq$  130, resp. 80 mm Hg, nebo léčba již diagnostikované hypertenze)
- hyperglykémie (glykémie na lačno  $\geq$  100 mg/dl, tedy 5,6 mmol/l, nebo již diagnostikovaný T2DM)

## **4. Záněť**

Tuková tkáň je důležitým endokrinním orgánem, který sekretuje velké množství bioaktivních látek, jenž jsou zapojeny jak do fyziologických, tak i patofyziologických procesů, jak bylo popsáno v kapitole 1.2. Pokud nejsou uvolňované pro a protizánětlivé látky ve fyziologické rovnováze, mohou vést k různým onemocněním mimo jiné i k IR. Bylo pozorováno, že infiltrace makrofágů do tukové tkáně se podílí na vzniku chronického zánětu a také pozitivně koreluje se vzrůstající hmotností organismu (Weisberg et al., 2003) a inzulínovou rezistencí (Lumeng et al., 2007).

Předpokládá se, že cytokiny produkované těmito makrofágy a hypertrofické adipocyty jsou patofyziologickým podkladem inzulínové rezistence a následně T2DM (Hotamisling, 2006, Lumeng et al., 2007).

Chronický záněť vzniká jako odpověď organismu na tkáňový stres nebo špatnou funkci dané tkáně. Tuková tkáň prochází během rozvoje chronického zánětu procesem morfologických změn nazývaných souhrnně „remodelace tukové tkáně“. Nejprve dochází k masivnímu nárůstu tukových buněk (hypertrofii), který je následován infiltrací imunitních buněk, angiogenezí, zvýšenou produkcí extracelulární matrix a poté nárůstem populace malých buněk, které jsou schopny ukládat lipidy z cirkulace. Bylo pozorováno, že množství nově vzniklým malých adipocytů koreluje s citlivostí k inzulínu (Strissel et al., 2007)

### **4.1. Makrofágy a záněť tukové tkáně**

Aktivované makrofágy uvolňují řadu cytokinů, které skrze různé signalizační dráhy fosforylují HSL a povrchové proteiny tukových kapének jako např. perilipin, což výsledně vede k lipolýze. Ve studii bylo u obézních žen měřeno zastoupení makrofágů v tukových depech a bylo zjištěno, že ve viscerálním tuku je větší počet makrofágů než v subkutánním tuku, z čehož je možné soudit, že viscerální tuk může hrát významnější roli v inzulínové rezistenci (Cai et al., 2005; Lumeng et al., 2007). Dále bylo pozorováno, že u morbidně obézních pacientů infiltrace makrofágů do tukové tkáně souvisela s jaterními zánětlivými fibroidními lézemi (Cancello et al., 2006). Spojitost mezi aktivovanými makrofágy a poškozením jater byla pozorována ve studii Cai et al., 2005. V této studii předpokládali, že u obézních jedinců makrofágy pronikají do viscerální tukové tkáně a zvyšují uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin, které putují do jater a vedou k jaterní steatóze a dalšímu

poškození jater. Také cytokiny uvolňované makrofágy jsou transportovány portálním systémem do jater, kde se spolu se zánětlivými faktory podílejí na zvýšení apoptózy a následném rozvoji fibrózy jater (Cai et al., 2005).

Makrofágy mohou tvořit přechodné spektrum, do kterého patří M1 a M2 makrofágy. V závislosti na hypertrofii adipocytů a s tím související produkcí prozánětlivých cytokinů jako např. IL-4 a IL-13 a dalších doposud necharakterizovaných, podstupují infiltrované makrofágy proces polarizace (Lumeng et al., 2007). V tomto procesu dochází k přeměně makrofágů M2 na M1. Makrofágy M2 jsou známé jako „alternativně aktivované“. Nalezneme je v normální tukové tkáni, kde se podílejí na hojícím procesu (Lumeng et al., 2007). M1 jsou naopak typické pro hypertrofickou tukovou tkáň, kde secernují především prozánětlivé cytokiny jako je např. TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 a další, čímž se podílejí na vzniku inzulínové rezistence (Lumeng et al., 2007). Zásadní roli ve vývoji zánětu v tukové tkáni ovšem hraje poměr mezi M1 a M2. Bylo pozorováno, že u obézních pacientů jsou více zastoupeny M1 a méně M2 (Sato et al., 2010; Lumeng et al., 2007).

Makrofágy v obézní tukové tkáni obklopují mrtvý adipocyt a tvoří strukturu podobnou koruně tzv. crown-like structure (CLS). V souvislosti s tvorbou CLS mohou makrofágy také fúzovat a tvořit gigantické mnohojaderné buňky tzv. multinucleate giant cells (MGC), které jsou hlavním markerem chronického zánětu tukové tkáně (Lumeng et al., 2007).

Mechanismus vzniku zánětu tukové tkáně není doposud zcela jasný. Vědci se domnívají, že důležitou roli v rozvoji zánětu a změn s tím spojených hraje extracelulární matrix, respektive kolagen typu VI. Kolagenová vlákna jsou složky extracelulární matrix, která omezují hypertrofii adipocytů, což vede k indukci stresové reakce a tvorbě zánětu. Pokud je ovšem kolagen zastoupen v menší míře, může docházet k velkému nárůstu objemu buněk a hypertrofii tkáně bez tvorby zánětu a zhoršené inzulínové citlivosti (Khan et al., 2009).

### 3. Cíle diplomové práce

Tato diplomová práce byla vypracována ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i. na oddělení Biologie tukové tkáně. Jedním z hlavních výzkumných témat oddělení je studium obezity indukované dietou s vysokým obsahem tuků a studium benefičních účinků n-3 polynenasycených mastných kyselin v prevenci a léčbě metabolického syndromu na experimentálním modelu dietou indukované obezity u myši kmene C57BL/6J.

Cílem této práce bylo:

#### **1. Porovnat působení diety s vysokým obsahem tuků (HFD) a HFD diety s přidavkem n3-PUFA (HFD+F) na:**

- hmotnost pokusných zvířat a hmotnost jednotlivých orgánů
- glukózovou homeostázu
- hladiny lipidových metabolitů v plazmě
- množství TAG v játrech (ověření histologickými metodami)
- homogenitu tukových dep (biochemická stanovení)

#### **2. Porovnat působení diety s vysokým obsahem tuků a cukrů (HSD) a diety s nízkým obsahem tuků (LFD) ve více časových bodech na:**

- hmotnost pokusných zvířat a hmotnost jednotlivých orgánů
- glukózovou homeostázu
- hladiny lipidových metabolitů v plazmě
- homogenitu tukových dep (histochemické stanovení velikosti adipocytů, imunohistochemické barvení a vyhodnocení úrovně zánětu v tukové tkáni)

## 4. Metody

### 4.1. Práce s pokusnými zvířaty

Pokusy byly prováděny na myších samcích kmene C57BL/6J, což je laboratorní kmen náchylný k rozvoji obezity (Surwit et al., 1995).

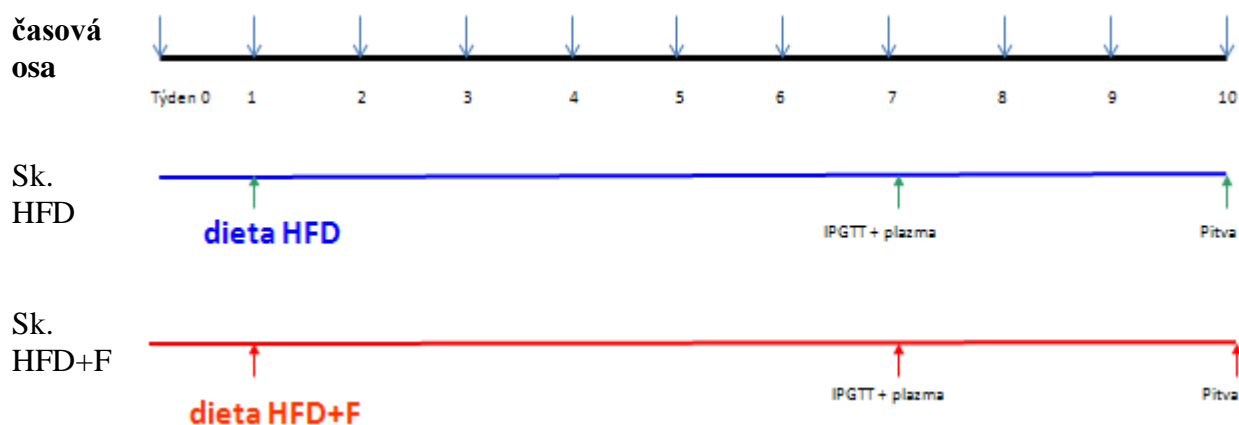
Zvířata byla chována v místnosti s 12-ti hodinovým umělým světelným režimem při stálé teplotě 22 °C. Myši byly před zahájením pokusu rozděleny do klece a chovány po jedné. Během pokusu měla zvířata volný přístup k pitné vodě a byla krmena specifickými dietami: Před zahájením pokusu byly myši krmeny standardní laboratorní dietou (Ssniff EF R/M-H control diet, Německo). V prvním experimentu byla jako kontrolní dieta použita dieta s vysokým obsahem tuků (HFD) (přesné složení diety viz Kuda et al., 2009), kde je lipidová složka tvořena kukuřičným olejem obsahujícím především n-6 nenasycené mastné kyseliny a cukerná složka tvořená škrobem. Další dietou byla experimentální dieta HFD+F odvozená z HFD, kde bylo 15 % tuků nahrazeno koncentrátem n-3 polynenasycených mastných kyselin původem z mořských ryb (preparát EPAX 1050TG, EPAX AS, Lysaker, Norsko, 10% EPA, 50% DHA).

V druhém experimentu byla použita semisyntetická dieta s vysokým obsahem tuků HSD (E15742-34, Ssniff, Německo), kde je tuková složka tvořena vepřovým sádlem, které obsahuje zejména nasycené mastné kyseliny. Cukerná složka této diety je tvořena z velké části jednoduchými cukry a to sacharózou a dextrózou a v malém množství škrobem. K dietě HSD byla použita jako kontrolní dieta Bioclaims s nízkým obsahem tuků (LFD; Research Diets Services, Nizozemí; přesné složení diety viz Hoevenaars et al., 2012).

Energetické složky v dietě (hmotnostní %)	HSD	LFD	HFD	HFD+F	STD
Tuky	34 %	4,3 %	35,2 %	35,2 %	3,4 %
% koncentrát EPAX 1050*	0 %	0 %	0 %	15 %	0 %
Škrob	2,2 %	38,7%	19 %	19 %	
Sacharóza	22,4 %	10 %	5%	5%	
Proteiny	24,1 %	22,0 %	20,5 %	20,5 %	19,3
Energetická hodnota (kJ/g)	21,4	16,2	22,8	22,8	16,3

Tab. č. 2: Složení experimentálních diet, \* koncentrát EPAX 1050 obsahuje 50 % DHA, 10 % EPA, 4 mg/g  $\alpha$ -tokoferolu

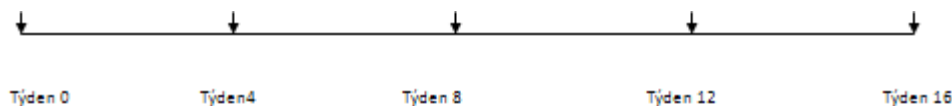
V prvním pokusu byly myši nasazeny nejprve na standardní laboratorní dietu a ve stáří 4 měsíců začaly být krmeny experimentálními dietami HFD a HFD+F. Jednou týdně byla zvířata vážena a byla jim měřena spotřeba potravy. Dvakrát týdně jim byla měněna voda a třikrát týdně doplňována dieta. Po sedmi týdnech na experimentálních dietách byla zvířata vystavena intraperitoneálnímu glukózovému tolerančnímu testu (IPGTT). Pokus byl ukončen v 10. týdnu experimentu (obr. 6). Při pitvě byla odebrána krevní plazma, játra, GON a DL depo. Krevní plazma byla uchována při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ , ostatní vzorky byly zamraženy v tekutém dusíku a uchovány při  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Obr. 6: Schéma průběhu prvního pokusu

V druhém pokusu byly myši nejprve krmeny standardní laboratorní dietou a ve věku 5 měsíců (v čase 0 týdnů) byly nasazeny na HSD a LFD dietu a rozděleny do skupin. Zvířata byla vážena a krmena obdobně jako v prvním pokusu. Celý pokus trval 16 týdnů. V čase 0, 4, 8, 12 a 16 týdnů byly jednotlivé skupiny usmrceny (obr. 7).

časová osa:

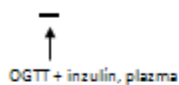


skupiny

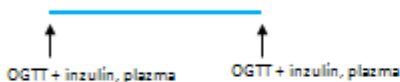
HSD:

dieta HSD

sk. 0T



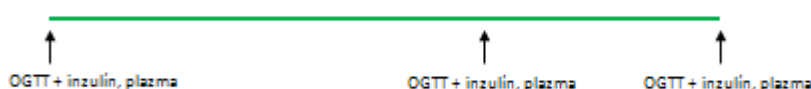
sk. 4T



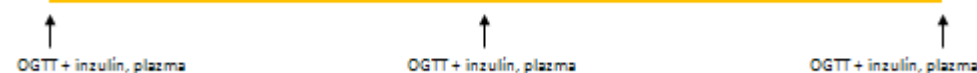
sk. 8T



sk. 12T



sk. 16T



skupina

LFD:

dieta LFD

sk. 16LFD



Obr. 7: Schéma průběhu druhého pokusu

Myši byly usmrceny cervikální dislokací v éterové narkóze. Z krční tepny jim byla odebrána krev, která byla vložena do 1,5 ml mikrozkušavky s 5  $\mu$ l 0,5M EDTA. Mikrozkušavky s odebranou krví byly centrifugovány při 4°C při 5320 g po dobu 10 minut. Získaná plazma byla uchována při teplotě -20°C. Během pitvy byly odebrány vzorky jater a tukové tkáně, konkrétně z GON, MEZ a DL depa. Při pitvě v 16. týdnu bylo GON a DL tukové depo rozděleno na 3 části (A, B, C). Jednotlivé části tkáně byly fixovány v 20 ml 10% formaldehydu (Penta, ČR). Vzorky tukové tkáně určené pro histologickou analýzu byly dehydratovány vzestupnou řadou etanolu, zality do parafínu a nařezány na řezy o tloušťce 5  $\mu$ m na pracovišti Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol. Ostatní odebrané tkáně byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80°C.

## **4.2. Glukózový toleranční test (GTT)**

Glukózovým tolerančním testem stanovujeme míru glukózové tolerance. Dle způsobu podávání glukózy rozdělujeme GTT na intraperitoneální (IPGTT) a orální (OGTT). Při IPGTT je glukóza injektována do peritonea, zatímco při OGTT je glukóza aplikována gaváží do žaludku. Orální podání glukózy vyvolá na rozdíl od intraperitoneálního podání sekreci inkretinů jako např. GLP-1 (glukagon like protein 1) a GIP (gastric inhibitory polypeptide), hormonů produkovaných zažívacím traktem po příjmu potravy. Produkce těchto proteinů vede k posílení sekrece inzulínu z  $\beta$ -buněk zvýšením jejich senzitivity ke glukóze. Proto i hladiny uvolňovaného inzulínu bývají vyšší při OGTT v porovnání s IPGTT (Holz, 2004).

### **4.2.1. IPGTT**

Přístroje:

Glukometr One Touch Ultra (Lifescan, USA)

Materiál:

Box pro imobilizaci zvířete

Chirurgické nůžky

Tampony

Injekční stříkačky s jehlou

Testovací proužky One Touch Ultra (Lifescan, USA)

Filtr (pór 0,45  $\mu$ m, Schleicher & Schuell, Německo)

Zásobní roztoky:

10% D-glukóza (Sigma, USA) ve vodě, sterilizována filtrací, skladována v -20 °C

Postup:

Myši byly 15 hodin před provedením pokusu zváženy a byla jim odebrána potrava. Po nočním hladovění byly myši zváženy a byla jim z ocasní žíly pomocí kalibrovaného glukometru změřena bazální hladina glukózy v plazmě (čas 0 minut) a odebrán vzorek krve pro stanovení hladiny inzulínu. Poté jim byl injekcí do intraperitonea podán roztok 10% D-glukózy v množství 1 mg glukózy na gram tělesné hmotnosti. V čase 15, 30, 60, 120 a 180



minut po podání glukózy do peritonea byla myším měřena hladina krevní glukózy ze vzorku krve z ocasu.

Ze získaných hodnot hmotností myši byl stanoven úbytek váhy po odstavení od potravy. Z naměřených hodnot glykémie byla sestavena glykemická křivka pro jednotlivé myši. Zmiňovaná křivka informuje o rychlosti vstřebání glukózy z peritonea a normální nebo narušené schopnosti inzulínu regulovat zvýšenou hladinu glukózy v krvi. Početně byl stanoven obsah plochy pod křivkou (totální AUC), který informuje o utilizaci glukózy v krvi. O stavu inzulínové rezistence nepřímo vypovídá inkrementální AUC, kterou lze vypočítat po odečtení bazální glukózy od všech hodnot glykémie.

#### **4.2.2. OGTT**

Při OGTT byly použity shodné přístroje a materiál jako při metodě IPGTT kromě injekční stříkačky, která nebyla opatřena jehlou, ale intragastrickou sondou. Myším byl orálně podán roztok 30% vodný roztok D-glukózy.

Postup:

Postup měření OGTT byl shodný s postupem IPGTT. Před podáním roztoku glukózy byla stanovena bazální hladina glukózy v plazmě (v čase 0 minut). Významný rozdíl byl v aplikaci množství a koncentraci glukózy. Myším bylo intragastrickou sondou aplikováno 0,5 ml 30% D-glukózy ve vodě (300 mg/ml), což odpovídá 150 mg glukózy na zvíře. Obdobně jako při IPGTT byla myším měřena hladina krevní glukózy a před aplikací glukózy a 30 minut po podání glukózy. V těchto časových bodech byla myším odebrána krev pro stanovení plazmatické hladiny inzulínu. Získané hodnoty byly zpracovány jako v IPGTT.

#### **4.2.3. Stanovení inzulínu v krevní plazmě**

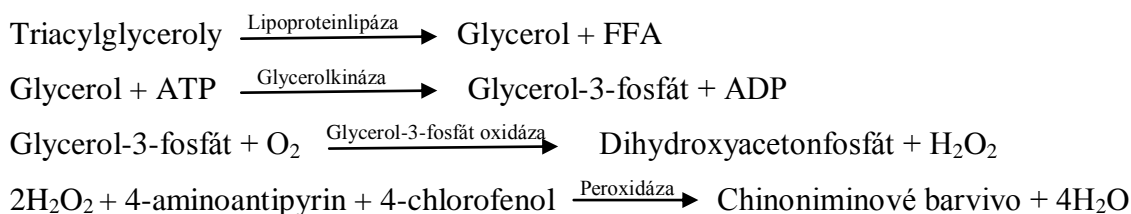
Koncentrace inzulínu v plazmě byla stanovena metodou RIA. Principem této metody je navázání specifické protilátky k molekule inzulínu. Nejprve reagoval vzorek plazmy o neznámé koncentraci inzulínu s primární protilátkou, poté byl přidán radioaktivně značený inzulín o známé koncentraci. Značený a neznačený inzulín kompetovaly o vazbu k protilátce. Následně byly nenavázané molekuly značeného inzulínu odstraněny a byla měřena radioaktivita jednotlivých vzorků. Čím více bylo neznačeného inzulínu v krevní plazmě, tím

menší množství značeného inzulínu se mohlo navázat k protilátce a tím byla naměřena menší aktivita.

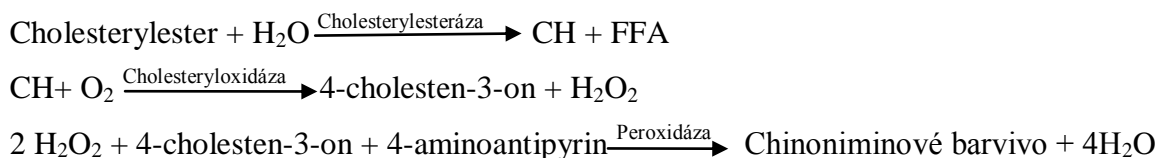
### 4.3. Stanovení obsahu lipidů ve tkáních a v plazmě

V plazmě jsme stanovili koncentraci TAG, CH a FFA. Koncentrace jednotlivých metabolitů byly měřeny jako absorbance barviva vzniklého sledem enzymatických reakcí (viz níže). Získaná hodnota absorbance byla přepočítána pomocí vzorce viz níže na množství stanovovaného metabolitu. Barvivo vzniklo pomocí enzymatických reakcí v reakčním činidle s metabolitem.

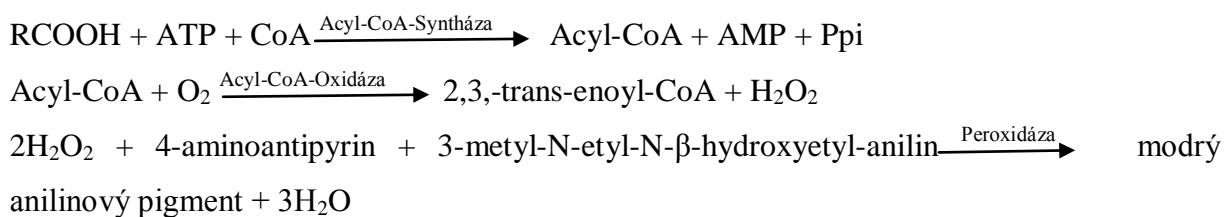
Princip metody stanovení TAG: (níže postup a.)



Princip metody stanovení CH: (níže postup b.)



Princip metody stanovení FFA: (níže postup c.)



Přístroje:

Termoblok (Penta, ČR)

Třepačka (IKA, Německo)

Spektrofotometr Sunrise basic Tecan (Tecan, Švýcarsko)

Materiál:

96-ti jamková destička (Nunc, Dánsko)

Zásobní roztoky:

65% etanol (Penta, ČR)

3M KOH (Penta, ČR)

Triacylglycerol liquid 250 S (Biolatest)

Cholesterol liquid 250 S (Biolatest)

#### 4.3.1. Stanovení TAG, CH a FFA v plazmě

Na 96-ti jamkovou destičku jsme aplikovali 3  $\mu$ l standardu, vzorku nebo čistého vzorku podle tabulky 3 níže. Jako čistý vzorek pro odečtení pozadí reakce (blank) jsme použili redestilovanou vodu. Do každé jamky jsme přidali 300  $\mu$ l reakčního činidla specifického pro jednotlivé stanovení- TAG, CH, FFA. Destičku jsme nechali inkubovat 10 minut při teplotě 37°C. Z důvodu citlivosti reakčního činidla na světlo jsme destičku se vzorky chránili před světlem. Jednotlivá množství vzorků, vody, standardu a reakčního činidla jsme pipetovali dle návodu přiloženého u daného kitu.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8
A	blank	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek
B	blank	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek
C	standard	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek
D	standard	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek
E	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	blank
F	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	blank
G	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	standard
H	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	vzorek	standard

Tab. č. 3: Aplikace blanků, vzorků a standardů na 96-ti jamkovou destičku

**Stanovení TAG (postup a)** - v reakční směsi byly 3  $\mu$ l vzorku a 300  $\mu$ l reakčního činidla s následnou inkubací 10 minut při 37°C.

**Stanovení CH (postup b)** - v reakční směsi byly 3  $\mu$ l vzorku a 300  $\mu$ l reakčního činidla s následnou inkubací 10 minut při 37°C.

**Stanovení FFA (postup c)** - v reakční směsi byly 2  $\mu\text{l}$  vzorku a 86  $\mu\text{l}$  reakčního činidla A s následnou inkubací 10 minut při 37°C. Dále bylo přidáno 43  $\mu\text{l}$  reakčního činidla B a inkubováno 10 min při 37°C.

**Vyhodnocení** - absorbanci barviva ve vzorku jsme měřili na spektrofotometru Sunrise basic (Tecan, Švýcarsko). Absorbance pro určení množství TAG a CH byla měřena při vlnové délce 500 nm. Absorbance pro určení koncentrace FFA byla měřena při vlnové délce 546 nm. Koncentrace metabolitu ve vzorku ( $C_{vz}$ ) byla vypočítána pomocí průměrné absorbance standardních vzorků. Od naměřené absorbance vzorků (A) byla odečtena průměrná absorbance čistého vzorku (blanku)(Abl). Od naměřené absorbance standardů (B) byla odečtena absorbance blanku. Dále byly vypočítány jednotlivé koncentrace metabolitů pomocí průměrné absorbance standardního vzorku ( $A_s$ ) a známému množství (dáno kitem) TAG, CH a FFA ( $C_s$ ).

$$A - Abl = Avz$$

$$B - Abl = As$$

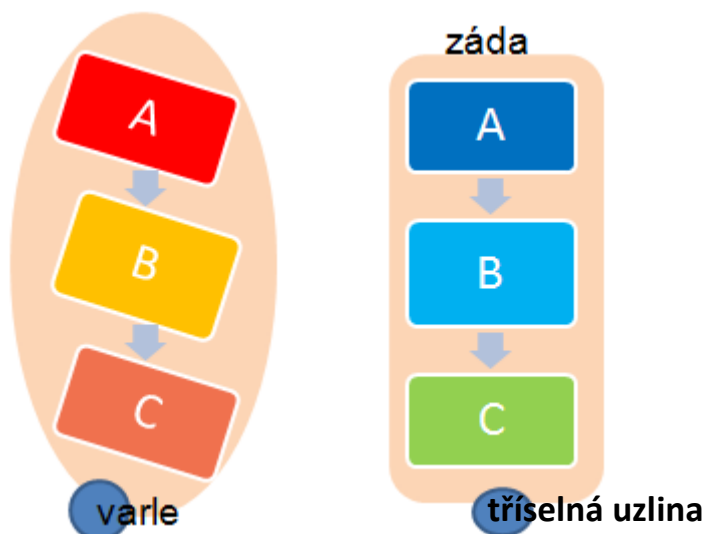
$$C_s \times Avz / A_s = Cvz$$

#### **4.3.2. Stanovení TAG v játrech**

Obsah TAG byl stanoven v 50 mg vzorku jaterní tkáně. Ke tkáni bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  3M KOH (Penta, ČR) rozpuštěného v 65% etanolu (Penta, ČR). Vzorky byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 70°C. 50  $\mu\text{l}$  supernatantu bylo 10 x naředěno redestilovanou vodou. Následující postup pro stanovení TAG pomocí reakčního činidla byl shodný s postupem stanovení TAG v plazmě viz 4.3.1.(a).

#### **4.3.3. Stanovení TAG v tukových depech**

Během pitvy bylo odebráno GON a DL tukové depo (obr. 2 tuková depa). Jednotlivá tuková depa byla rozdělena na tři části - A, B, C (viz obr. 8). Odebrané části tuku byly extrahovány metodou popsanou v kapitole 4.3.2. Vzniklý supernatant byl naředěn 200 x redestilovanou vodou. Stanovení TAG, CH a FFA bylo provedeno stejnou metodou jako v bodě 4.3.1. (a, b, c).



Obr. 8. Rozdělení GON (A) a DL (B) depa na jednotlivé zpracované části (A, B, C)

#### 4.4. Měření koncentrace DNA

Hoechst 33258 je fluorescenční barvivo, které se přednostně váže do AT bohatých oblastí DNA (Lat tet al., 1976). Pomocí UV záření může být toto barvivo excitováno při vlnové délce 356 nm a následně emitovat světlo při 458 nm. Tato barvicí technika spolu s fluorimetrickým měřením umožňují kvantifikovat obsah DNA ve vzorku (Labarca et al., 1980).

Přístroje:

- Termoblok (Penta, ČR)
- Třepačka MS3 digital (IKA, Německo)
- Fotometr eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Fluorimetr Tecan (Tecan, Švýcarsko)

Zásobní roztoky:

- Mix Proteinázy K: 500mM TRIS (trishydroxymethylaminometan, Sigma, USA)
- 100mM EDTA (Serva, Německo)
- Redestilovaná voda
- 10% SDS (Invitrogen, USA)

Proteináza K (20 mg/ml, Merck, Německo)

Pufir NaCl-NaPi-EDTA (pH 7,4): 2mM EDTA (Serva, Německo)

2M NaCl (Merck, Německo)

0,05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (Lachema, ČR)

Standard DNA (0,1 mg/ml), izolát DNA z telecího brzlíku (Sigma, USA)

Hoechst ( bis-benzimid H33258, 1 mg/ml, Serva, Německo)

Mix Proteinázy K byl přidán ke vzorku tkáně dle následující tabulky:

(mg) tkáně	(μl) Mixu Prot. K
0 – 25 mg	100 μl
25 – 30 mg	150 μl
30 – 35 mg	200 μl
35 – 40 mg	250 μl
> 40 mg	300 μl

Tab. č. 4: Množství Mixu Proteinázy K pro množství tkáně

Vzorky jaterní tkáně byly nastříhány pomocí nůžek. Ke každému vzorku bylo aplikováno příslušné množství Mixu Proteinázy K (viz tab. č. 4). Reakční směs byla inkubována 12 hodin při teplotě 56°C. V průběhu celého měření byly vzorky chráněny před světlem.

Po inkubaci a zchladnutí vzorků bylo do čistých zkumavek aplikováno v dubletech příslušné množství pufru, standardu, Hoechstovo barvivo a vzorky tkáně podle tab. č. 5. Jako standard byl použit izolát DNA z telecího brzlíku, jehož koncentrace DNA byla změřena na fotometru.

	Pufir (μl)	Standard/vzorek (μl)	Hoechstovo barvivo (μl)	(μg) DNA
Standard 1	1000	0	500	blank
Standard 2	990	10	500	1 mg
Standard 3	980	20	500	2 mg

Standard 4	970	30	500	3 mg
Standard 5	960	40	500	4 mg
Standard 6	940	60	500	6 mg
Standard 7	920	80	500	8 mg
Standard 8	880	120	500	12 mg
Vzorek X	980	20	500	?

Tab. č. 5: Smíchání jednotlivých množství pufru, standardu nebo vzorku a Hoechstova barviva pro aplikaci na 96-ti jamkovou destičku

Jednotlivé vzorky byly inkubovány 3,5 hodiny při pokojové teplotě. Na 96-ti jamkovou destičku bylo aplikováno 200  $\mu$ l standardů i vzorků. Pomocí fluorimetru (Tecan, Švýcarsko) byla změřena intenzita vyzářeného světla jednotlivých vzorků a standardů. Z hodnot naměřených u standardů byla sestavena kalibrační křivka, podle níž byla vypočítána koncentrace DNA v jednotlivých vzorcích.

#### ***4.5. Stanovení velikosti adipocytů***

##### **4.5.1. Barvení preparátů hematoxylinem a eosinem pro světelnou mikroskopii**

Jednotlivé části vzorku tkáně je těžké ve světelném mikroskopu rozeznat, protože mají podobnou optickou lomivost. Pro zvýraznění částí fixované tkáně na podložním sklíčku je proto nutné vzorky obarvit. Základní barvicí technikou v histologii je barvení hematoxylin-eosinem. Hematoxylin je bazické barvivo, které zvýrazňuje buněčné jádro modro-fialově. Eosin je acidické barvivo, které barví cytoplazmu růžově.

Zásobní roztoky:

Xylen (Penta, ČR)

100% etanol (Penta, ČR)

96% etanol (Penta, ČR)

75% etanol (Penta, ČR)

50% etanol (Penta, ČR)

Hematoxylin (Dako Mayer's Hematoxylin (Lillie's modification), Dako, Německo)

Eosin (Eosin Yellowish Solution, Sigma, USA)

Montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium, Sigma, USA)

Při pitvě byly odebrány vzorky jater, GON, MEZ a DL tukového depa. Jednotlivé vzorky určené pro histologickou analýzu byly připraveny na pracovišti Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol. Na tomto pracovišti byly vzorky fixovány, dehydratovány, projasněny xylenem, zality do roztaveného parafinu a následně nařezány na podložní skla na řezy tlusté 5  $\mu\text{m}$ .

Podložní skla se vzorky byla deparafinována a hydratována pomocí sestupné alkoholové řady. Inkubace byly provedeny od xylenů až po inkubaci v 50% etanolu po dobu uvedenou v tabulce (viz níže). Následně byly vzorky 2x promyty v pitné vodě. Deparafinované vzorky byly promyty a následně inkubovány 1 minutu s roztokem hematoxylinu, promyty a následně inkubovány 30 sekund s roztokem eosinu. Obarvené vzorky byly promyty a dehydratovány pomocí vzestupné alkoholové řady (50% etanol  $\rightarrow$  xylén). Pomocí montovacího média byly ze vzorků vytvořeny trvalé preparáty.

S e s t u p n á  ř a d a	↓	Roztok	Doba inkubace	↑	V z e s t u p n á  ř a d a
		Xylen	15 minut		
		Xylen	15 minut		
		100% etanol	10 minut		
		100% etanol	10 minut		
		96% etanol	10 minut		
		96% etanol	10 minut		
		75% etanol	10 minut		
		50% etanol	10 minut		

Tab. č. 6: Doba inkubace v roztocích tvořících sestupnou/ vzestupnou alkoholovou řadu

#### 4.5.2. Morfometrické stanovení velikosti adipocytů

Hematoxylinem a eosinem obarvené vzorky byly snímány světelným mikroskopem Olympus AX70 (Olympus, Tokyo, Japonsko), objektivem 10x a kamerou DP 70 (Olympus, Tokyo, Japonsko). Jednotlivé snímky byly morfometricky analyzovány pomocí obrazového programu NIS-Elements AR 3.0 (Laboratory Imaging, ČR). Morfometrická data byla založena na stanovení počtu a velikosti buněk osmi různých míst ve vzorku. Ze vzorku bylo vyhotoveno osm snímků a v každém snímku bylo náhodně vyhodnoceno 100 buněk. Celkem



se tedy velikost adipocytů vypočítala z velikosti 800 buněk. Stanovení je relativní, protože řez tkání neprotíná buňku v místě maximálního průměru a dochází tak ke zkreslení velikosti buněk v tkáni. Důsledkem tohoto faktu byly dělány i další metody pro stanovení velikosti buněk (dále v textu).

#### **4.6. Imunohistochemické barvení makrofágů ve vzorku**

Imunohistochemickými metodami detekujeme antigen – specifickou molekulu nebo její část, kterou chceme vizualizovat. Tato metoda je založená na tvorbě vazby mezi antigenem a protilátkou. Antigen lze ve tkáni lokalizovat buď přímo, nebo nepřímo (Kiernan, 2008).

Jedním ze způsobů nepřímé detekce je metoda založená na vazbě neznačené primární protilátky, na kterou se následně váže značená sekundární protilátka. Typickým značením sekundární protilátky je vazba enzymu zvaného křenová peroxidáza, který reaguje s 3,3-diaminobenzidin tetrachloridem (DAB). Výsledkem této reakce je hnědé zbarvení na vzorku (Graham et al., 1966).

Pokud je množství molekul antigenu ve tkáni nízké, můžeme signál zesílit pomocí aplikace nepřímé imunohistochemické metody spolu s tvorbou avidin-biotin komplexu (ABC metoda). Tato metoda je založená na téměř irreverzibilní vysokoafinní vazbě mezi avidinem a vitamínem biotinem (Guesdon et al., 1979). Avidin je glykoprotein vaječného bílku, který obsahuje čtyři vazebná místa pro biotin. Na avidin je navázána křenová peroxidáza (Hsu et al., 1981), která je zásadní pro zesílení signálu. Na zbylá volná vazebná místa jsou navázány biotinylované (biotinem značené) sekundární protilátky. Aktuálně jsou používány velice citlivé detekční soupravy (ABC kit), které patří k nejcitlivějším metodám pro detekování antigenu. Peroxidáza nám svojí enzymatickou aktivitou naznačuje místa v preparátu, kde došlo k specifické vazbě mezi antigenem a primární protilátkou a následně biotinylovanou sekundární protilátkou. Místa, kde je navázána peroxidáza, reagují s DAB, který je přeměněn na nerozpustné hnědé barvivo viditelné ve světelném mikroskopu.

Materiál:

Třepačka (WT12, Biometra, Německo)

Inkubační box

Zásobní roztoky:

Xylen (Penta, ČR)

100% etanol (Penta, ČR)

96% etanol (Penta, ČR)

75% etanol (Penta, ČR)

50% etanol (Penta, ČR)

Hematoxylin (Dako Mayer's Hematoxylin (Lillie's modification), Dako, Německo)

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Penta, ČR)

Normální koňské sérum ( Vector, USA)

Monoklonální primární protilátka anti-Mac-2/galectin-3 (Cedarlane Laboratories, USA)

Biotinylovaná sekundární protilátka (Horse Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L))

ABC kit (Vector, USA)

DAB tablety (3,3-diaminobenzidin tetrachlorid, Sigma, USA)

Montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium, Sigma, USA)

Pufir PBS (pH= 7,4): NaCl (Merck, Německo)

KCl (Sigma, USA)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lachema, ČR)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, USA)

Pro pozitivní kontrolu byly použity vzorky tkáně se značným množstvím makrofágů, kde v předchozích pokusech proběhla reakce s primární protilátkou. Stejně vzorky tkáně byly použity pro negativní kontrolu bez inkubace s primární protilátkou, ovšem s dalším postupem shodným pro detekci makrofágů ve vzorcích.

Vzorky byly deparafinovány sestupnou alkoholovou řadou stejným postupem jako v kapitole 3.5.1. Vzorky byly promyty v pitné vodě a za stálého míchání inkubovány 30 min s 1% peroxidem v metanolu, aby byla zablokována funkce endogenní peroxidázy. Následně byly vzorky 2x promývány 15 min v roztoku PBS. Vzorky byly inkubovány 30 min s roztokem koňského séra ředěním 1:50 pro zablokování nespecifických vazeb primární a sekundární protilátky v boxu se zvýšenou vzdušnou vlhkostí. Následně byly vzorky přes noc inkubovány ve zmíněném boxu při teplotě 4°C s monoklonální primární protilátkou proti makrofágům, která byla naředěna 1:3000 v PBS.

Po inkubaci byly vzorky 2x promyty roztokem PBS po dobu 15 min. Následně byly vzorky v boxu inkubovány s biotinylovanou sekundární protilátkou v ředění 1:200 po dobu 30 min. Nenavázaná sekundární protilátka byla odstraněna promytím roztokem PBS. Pro zviditelnění navázané primární a sekundární protilátky byly vzorky v boxu inkubovány 30 min s reakčním činidlem ABC (Vector, USA). Vzorky byly promyty v PBS. Jednotlivé vzorky byly bez přístupu světla inkubovány 3 min s roztokem, který obsahoval DAB připravený dle protokolu výrobce a následně promyty vodou. DAB vykazuje karcinogenní účinky, proto veškerá práce s tímto činidlem byla prováděna v digestoři za použití ochranných pomůcek. Všechny odpady byly zpracovány jako nebezpečný odpad. Obarvené vzorky byly promyty pitnou vodou a inkubovány 1 min s hematoxylinem. Následně byly vzorky dehydratovány skrze vzestupnou alkoholovou řadu od 50% etanolu po xylen. Z dehydratovaných vzorků byly pomocí montovacího média připraveny trvalé preparáty.

Trvalé preparáty byly snímány světelným mikroskopem Olympus AX70 (Olympus, Tokyo, Japonsko), objektivem 10x a kamerou DP 70 (Olympus, Tokyo, Japonsko). Ze vzorku bylo vyhotoveno šest snímků. Jednotlivé snímky byly analyzovány stejným programem, jako při vyhodnocení velikosti buněk. Množství zánětu bylo stanoveno jako celkový počet buněk na snímku vztažený na počet mrtvých buněk.

#### **4.7. Barvení lipidů v kryořezech jaterní tkáně**

Přístroje: Kryotom Leica cm 1850 (Leica Biosystems, ČR)

Zásobní roztoky:

10% formalin (Penta, ČR)

50% etanol (Penta, ČR)

Olejová červeň - nasycený roztok olejové červeně (Fluka, USA) v 70% etanolu

Hematoxylin (Dako Mayer's Hematoxylin (Lillie's modification), Dako, Německo)

Vodorozpustné montovací médium (Serotec, USA)

Zmražené vzorky jaterní tkáně byly řezány na kryotomu Leica cm 1850 při -20°C a tloušťce 8 µm. Nařezané kryořezy jaterní tkáně byly pro zvýraznění neutrálních lipidů barveny olejovou červení (Oil-Red-O). Vzorky jaterní tkáně byly inkubovány 45 min s 10% formalinem, následně 10 min s 50% etanolem, 15 min s roztokem obsahujícím olejovou

červeň (Oil-Red-O) a následně 10 min s 50% etanolem. Po skončení inkubací byly vzorky promyty destilovanou vodou. Pro zvýraznění buněčných jader byly vzorky inkubovány 1 min s hematoxylinem a poté omyty vodou. Jednotlivé vzorky byly montovány vodorozpustným médiem.

#### ***4.8. Statistické vyhodnocení výsledků***

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Sigma Stat 3.1 (Systat Software, USA). Za předpokladu normálního rozložení dat byl použit t-test, jednocestná ANOVA, dvoucestná ANOVA s Holm-Sidak post-hoc testem. Hladina statistické významnosti byla stanovena na  $p < 0,05$ . Výsledné hodnoty jsou uváděny jako výběrové průměry a variability jsou vyjádřeny jako střední chyby výběrového průměru (SE).

## 5. Výsledky

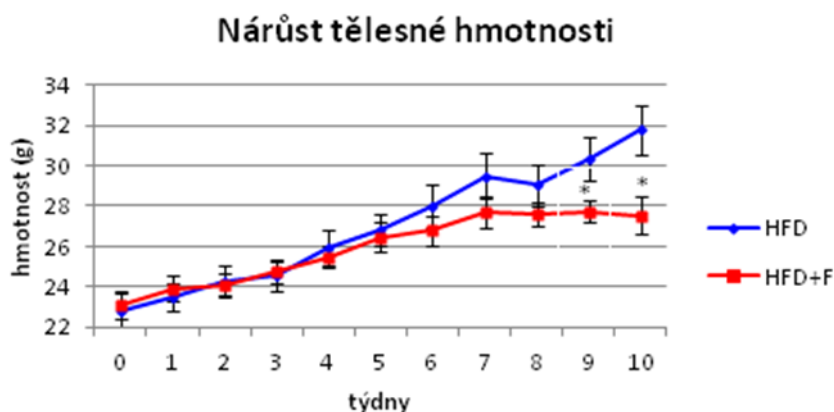
### 5.1. Pokus č.1:

#### Porovnání vlivu HFD a HFD+F na energetický metabolismus

V tomto pokusu byly porovnávány dvě skupiny myši ( $n=6$ ), které byly *ad libitum* krmeny rozdílnými dietami způsobující obezitu - dietou HFD a dietou HFD+F (viz kapitola 3.1.). Obezita a s ní související metabolické dysfunkce u myši byly vyvolány podáváním experimentálních diet po dobu 9-ti týdnů. V 7. týdnu byl pokusným zvířatům proveden intraperitoneální glukózový toleranční test. V 10. týdnu byly myši usmrceny a byly jim odebrány jednotlivé vzorky tkání a krevní plazmy pro další zpracování.

#### Nárůst tělesné hmotnosti a spotřeba krmiva

Během celého pokusu byly myši váženy a byla stanovována spotřeba potravy. Týden před započítáním pokusu (v grafu 1 bod 0) byly myši rozděleny do klecí po jedné.



Graf 1: Průběh nárůstu tělesné hmotnosti během pokusu, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .

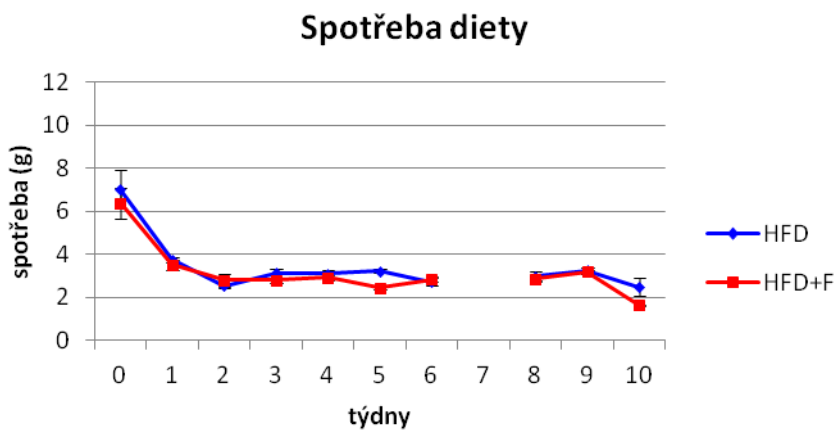
V grafu 1 můžeme pozorovat kontinuální nárůst tělesné hmotnosti obou skupin. Mírný pokles hmotnosti je vidět v 8. týdnu, což je důsledkem IPGTT provedeného v 7. týdnu. Následný nárůst hmotnosti poukazuje na překonání stresové situace a dostatečné zotavení. Od počátku pokusu do 9. týdne vážily skupiny myši obdobně. Od 9. týdne začala signifikantně přibývat na hmotnosti skupina HFD. Na konci pokusu byl pozorován signifikantní rozdíl v průměrné hmotnosti mezi skupinami (graf 1) ( $p = 0,020$ ). Nárůst hmotnosti v čase od 1. do

9. týdne byl vyjádřen jako absolutní váhový přírůstek (graf 2). Absolutní váhový přírůstek vykazoval signifikantní rozdíl ( $p = 0,041$ ).



Graf 2: Absolutní váhový přírůstek od 1. do 9. týdnu pokusu, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .

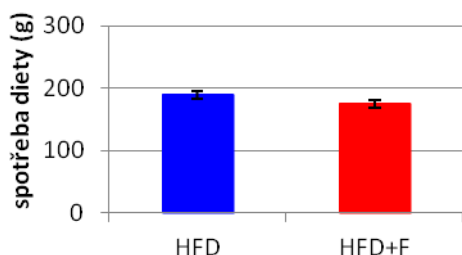
Během pokusu nebyl signifikantní rozdíl v příjmu diety mezi oběma skupinami myši (graf 3). V 0. týdnu pokusu byly myši rozděleny do klecí po jedné a krmeny standardní dietou, proto byla u nich pozorována vyšší spotřeba diety. Kvůli provedení IPGTT v 7. týdnu pokusu chybí v tomto časovém bodě v grafu 3 hodnoty spotřeby diety.



Graf 3: Průběh spotřeby diety během pokusu, HFD a HFD+F (4.1.).

Také kumulativní spotřeba diety (od 1. do 9. týdne) nevykazovala statisticky významný rozdíl ( $p = 0,239$ ) (graf 4).

### Kumulativní spotřeba diety



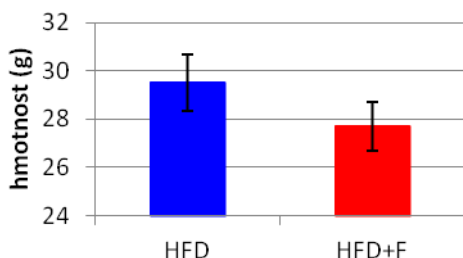
Graf 4: Kumulativní spotřeba diety, HFD a HFD+F (4.1.).

**Shrnutí:** Přesto, že se průměrná spotřeba diety během celého pokusu mezi skupinami nelišila, měly myši krmené dietou HFD na konci pokusu signifikantně vyšší hmotnost, než myši krmené dietou HFD+F.

### Měření míry glukózové tolerance pomocí IPGTT

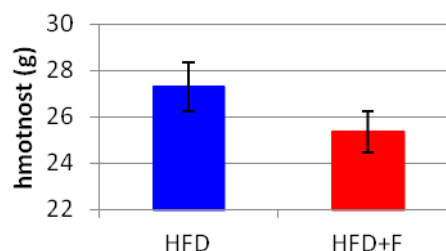
Myši krmené rozdílnými dietami byly podrobeny testu IPGTT. Mezi skupinami nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v průměrné hmotnosti myší v postprandiálním stavu ( $p = 0,051$ ) (graf 6) ani v lačném stavu ( $p = 0,056$ ) (graf 7). S těmito fakty souvisejí i další výsledky, jmenovitě bazální hladina glukózy ( $p = 0,116$ ) (graf 8) a úbytek hmotnosti myší po lačnění ( $p = 0,864$ ) (graf 9) nevykazovaly signifikantní rozdíly. Přes tato fakta byl pozorován signifikantní rozdíl v hodnotách inkrementální plochy pod křivkou ( $p = 0,043$ ) (graf 10), ale žádný rozdíl v hodnotách totální hladiny pod křivkou ( $p = 0,866$ ) (graf 11). V průběhu glykemické křivky byl pozorován signifikantní rozdíl v 60. minutě po podání glukózy ( $p = 0,011$ ) (graf 12).

### Hmotnost v postprandiálním stavu



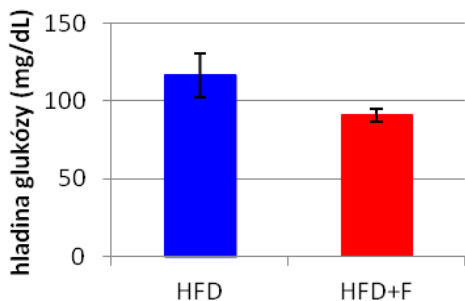
Graf 6: Průměrná hmotnost myší v postprandiálním stavu, HFD a HFD+F (4.1.).

### Hmotnost v lačném stavu



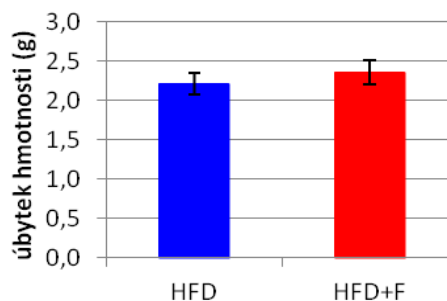
Graf 7: Průměrná hmotnost myší v lačném stavu před IPGTT, HFD a HFD+F (4.1.).

### Bazální hladina glukózy



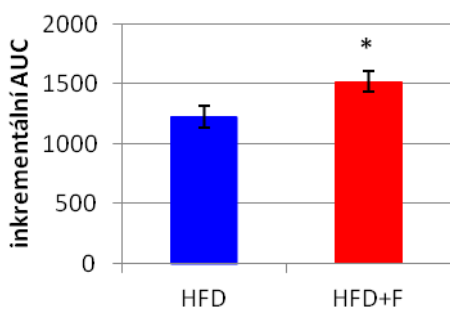
Graf 8: Bazální hladina glukózy (FBG), HFD a HFD+F (4.1.).

### Úbytek hmotnosti



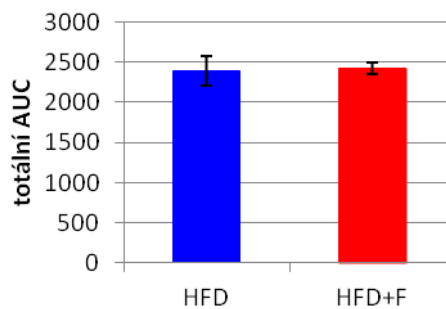
Graf 9: Úbytek hmotnosti myši po lačnění, HFD a HFD+F (4.1.).

### Inkrementální AUC



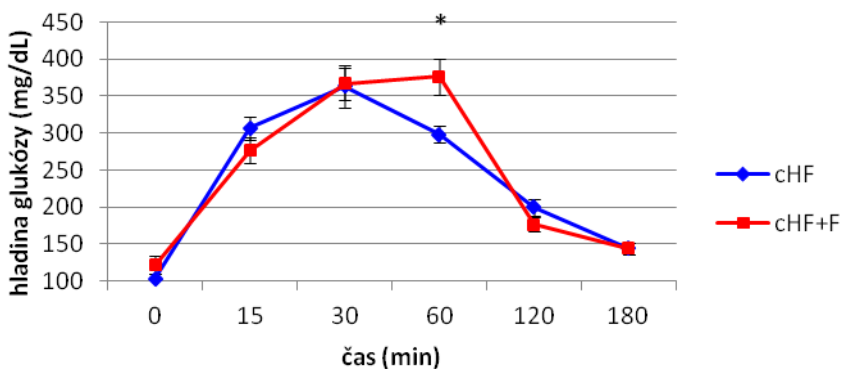
Graf 10: Inkrementální plocha pod křivkou, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .

### Totální AUC



Graf 11: Totální plocha pod křivkou, HFD a HFD+F (4.1.).

### Glykemická křivka



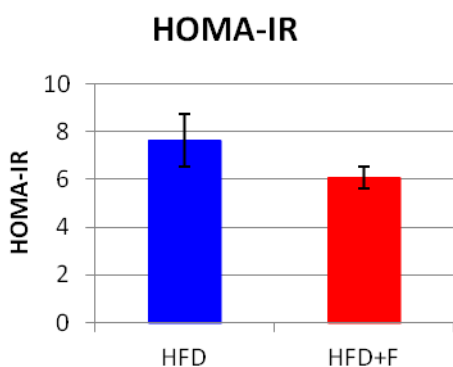
Graf 12: Glykemická křivka, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .



Technicky nejméně náročný způsob, jakým stanovit míru inzulínové rezistence (IR), je použití HOMA-IR indexu (Homeostasis Model of Assessment- Insulin Resistance). Tato výpočetní metoda v sobě zahrnuje hodnotu bazální glukózy FBG (Fasting Blood Glucose) a hladinu inzulínu v krvi v lačném stavu FBI (Fasting Blood Insulin).

$$\text{HOMA-IR} = \text{FBG (mmol/l)} \times \text{FBI (mU/l)} / 22,5$$

Při porovnávání průměrné hladiny inzulínu v plazmě v lačném stavu u obou skupin ani u HOMA-IR indexu ( $p = 0,123$ ) nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (graf 13).

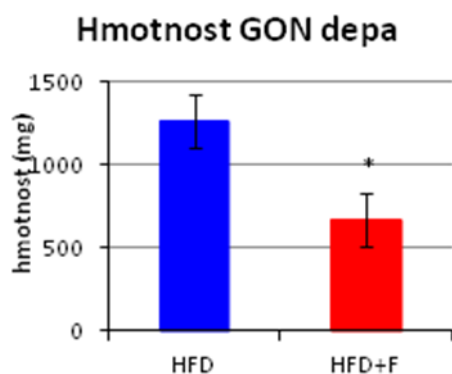


Graf 13: Hodnoty HOMA-IR indexu, HFD a HFD+F (4.1.).

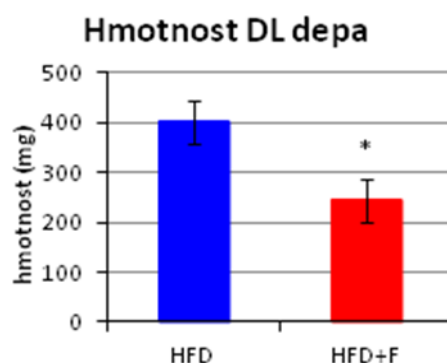
**Shrnutí:** U obou skupin myši nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v hmotnosti před provedením IPGTT, ani nebyla prokázána zhoršená glukózová tolerance pomocí stanovení HOMA-IR indexu.

### Analýza vzorků tkáně

Během pitvy byly odebrány a zváženy jednotlivé tkáně důležité pro zkoumání metabolismu v organismu. Signifikantní rozdíl mezi skupinami byl pozorován u průměrné hmotnosti GON depa ( $p = 0,015$ ) (graf 14) a obdobně také u DL depa ( $p = 0,017$ ) (graf 15). Je zřejmé, že myši krmené HFD mají více uloženého tuku v jednotlivých depech v porovnání se skupinou HFD+F.

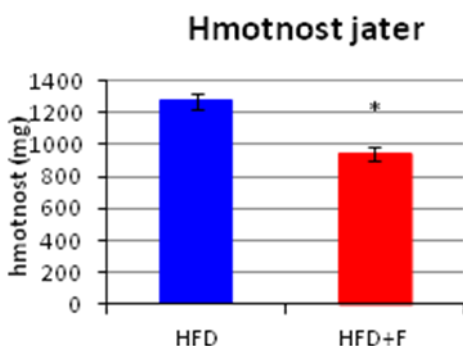


Graf 14: Hmotnost GON tukového depa, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .



Graf 15: Hmotnost DL tukového depa, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .

Před pitvou vykazovaly myši na rozdílných dietách signifikantní rozdíly v průměrné celkové hmotnosti organismu ( $p = 0,020$ ) (graf 1). S touto skutečností souvisí i další parametry analyzovaných orgánů. Statisticky významný rozdíl byl také zaznamenán mezi skupinami v průměrné hmotnosti jater ( $p = 0,007$ ) (graf 16). Nárůst hmotnosti jater může být odrazem ektopického ukládání tuku. Uložení tuku do jater může omezit a poškodit jejich funkci.



Graf 16: Hmotnost jater, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .

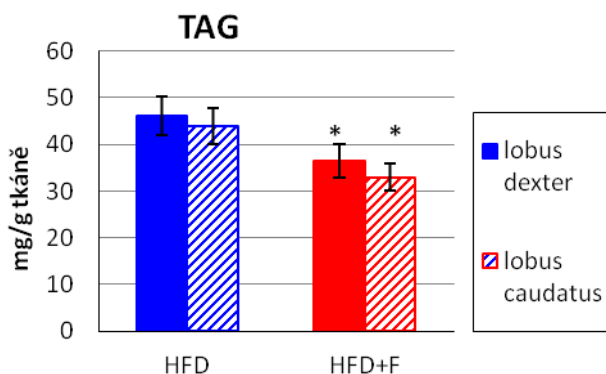
**Shrnutí:** U myši krmených dietou HFD byla pozorována signifikantně vyšší hmotnost jater a GON a DL tukových dep.

### Stanovení lipidických složek v játrech, plazmě a bílé tukové tkáni

#### Stanovení TAG v jaterních lalocích

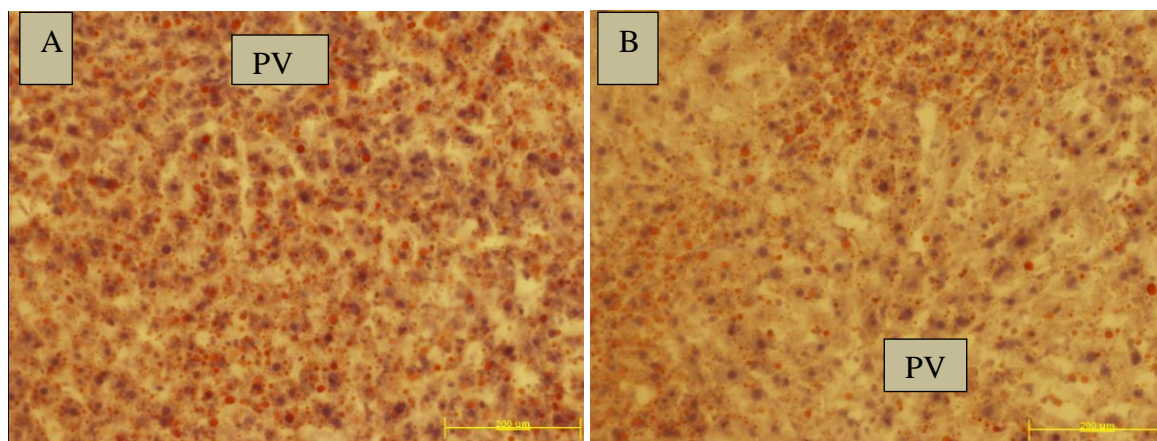
Při pitvě byly odebrány vzorky ze dvou laloků jater - velký lalok (lobus dexter) a lalok u žlučníku (lobus caudatus). V obou lalocích byl stanoven obsah TAG v mg tkáně. Myši ze

skupiny HFD měly signifikantně vyšší obsah TAG v obou lalocích v porovnání se skupinou HFD+F ( $p = 0,008$ ). Odebrané laloky jater se ve skupině nelišily ( $p = 0,615$ ). Myši krmené dietou HFD měly těžší játra s větším ektopickým uložením TAG v jednotlivých lalokách.



Graf 17: Obsah TAG v miligramu tkáně jaterních laloků (lobus dexter, lobus caudatus) HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ , \* signifikantní vůči kontrolní skupině (HFD).

Z jater byly odebrány vzorky pro přípravu kryořezů. Kryořezy byly barvené olejovou červení, která barví neutrální lipidy. Obr 9. představuje kryořezy jaterní tkáně u myši na dietě HFD (A) a HFD+F (B). Na obrázku A je vidět větší množství červeně obarvených tukových kapének, než na obrázku B. Tento fakt podporuje předchozí výsledky, že myši ze skupiny HFD mají játra s větším ektopickým uložením TAG ve tkáni, než myši ze skupiny HFD+F.

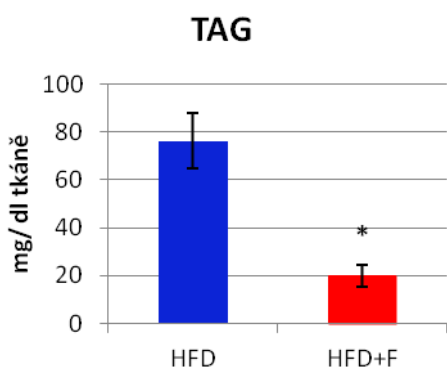


Obr 9. Kryořezy jaterní tkáně barvené Oil-Red-O, zvětšeno 20x, (A) HFD; (B) HFD+F (4.1.); PV- portální vena

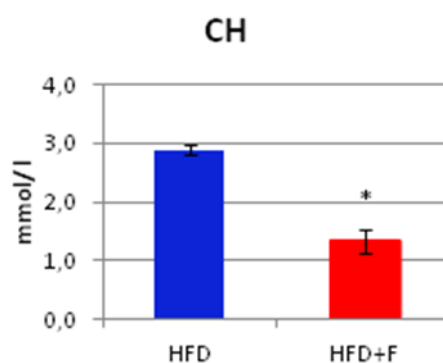
### Stanovení TAG, CH, FFA v plazmě

Na začátku pitvy byla myším podstřížením krční tepny odebrána krev. Myši jsou noční živočichové a přijímají potravu převážně během noci a minimálně během dne. Pro snížení vlivu přijaté potraviny na hladiny lipidových složek v plazmě, probíhala pitva během dopoledních hodin.

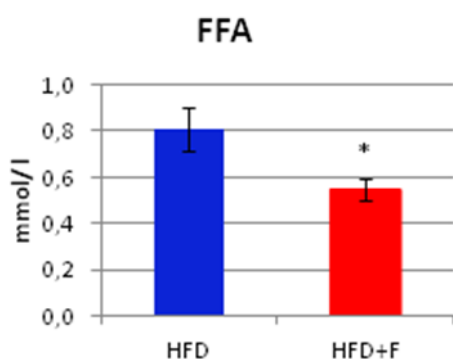
V plazmě byly stanoveny koncentrace TAG, CH, FFA u myši krmených odlišnými dietami. Z naměřených hodnot jsme konstatovali, že myši krmené HFD měly signifikantně vyšší koncentraci TAG ( $p = 0,002$ ) (graf 19), CH ( $p = 0,002$ ) (graf 20) a FFA ( $p = 0,029$ ) (graf 21) v porovnání se skupinou HFD+F.



Graf 19: Koncentrace TAG v plazmě, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .



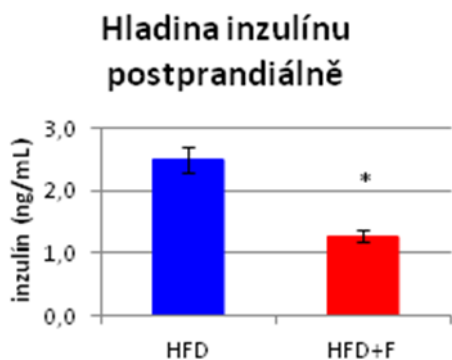
Graf 20: Koncentrace CH v plazmě, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .



Graf 21: Koncentrace FFA v plazmě, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .

### Stanovení inzulínu v krevní plazmě

Při pitvě a tedy v postprandiálním stavu měly myši krmené HFD v porovnání se skupinou na HFD+F téměř dvojnásobnou průměrnou koncentraci inzulínu v krevní plazmě (graf 22) se signifikantním rozdílem ( $p < 0,001$ ). Z toho vyplývá, že myši na HFD mají vyšší inzulínovou rezistenci, protože pro udržení hladiny krevní glukózy musí uvolnit do krevního oběhu více inzulínu než myši krmené HFD+F.

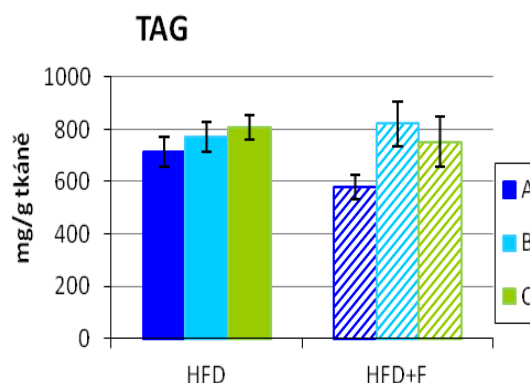
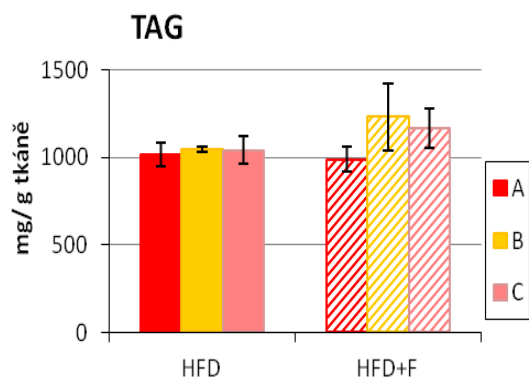


Graf 22: Hladina inzulínu v postprandiálním stavu, HFD a HFD+F (4.1.), \* $p < 0,05$ .

**Shrnutí:** U myši krměných dietou HFD byla pozorována signifikantně vyšší hladina inzulínu v krevní plazmě, což vypovídá o vyšší inzulínové rezistenci.

### Stanovení TAG v DL a GON depu bílé tukové tkáně

DL a GON tuková depa byla při pitvě rozdělena na 3 části (A, B, C) (viz výše obr. 8), ve kterých byly stanoveny hladiny TAG v gramu tkáně. Během velkého ředění vzorku tkáně (200x), vznikly nadhodnocené hodnoty množství TAG v tkáni. V GON depu nebyl pozorován signifikantní rozdíl v množství TAG v jednotlivých částech depa ( $p = 0,415$ ) ani mezi skupinami ( $p = 0,28$ ) (graf 23). Ve srovnání GON depa s DL depem, byly naměřeny nižší hladiny TAG v DL depu na gram tkáně. Tento výsledek poukazuje na vyšší schopnost uložení TAG do GON tukové tkáně ve srovnání s DL tukovou tkání. V DL depu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi množstvím TAG v částech depa ( $p = 0,064$ ) ani v závislosti na dietě ( $p = 0,412$ ) (graf 24). Nicméně je vidět trend mezi částí A a ostatními částmi tukového depa, který by mohl naznačit přítomnost dalších buněk než adipocytů, ovšem rozdíl není statisticky významný.



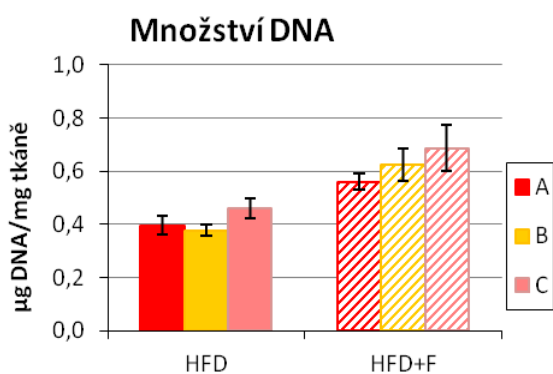
Graf 23: Koncentrace TAG v gramu GON tukové tkáně, HFD a HFD+F (4.1.), rozdělení depa dle obr. 4

Graf 24: Koncentrace TAG v gramu DL tukové tkáně, HFD a HFD+F (4.1.), rozdělení depa dle obr. 4

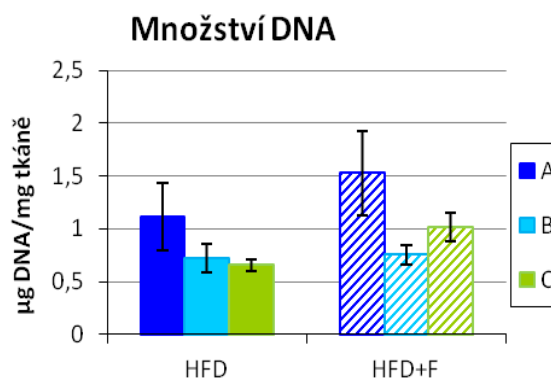
**Shrnutí:** Velké množství tuku v jaterní tkáni a také signifikantně zvýšené hladiny lipidových složek v plazmě u skupiny krmené HFD poukazují na nežádoucí metabolické změny.

### Stanovení množství DNA v DL a GON depu bílé tukové tkáně

Podobně jako při stanovení TAG v částech GON a DL tukového depa, bylo stanoveno i množství DNA v mg tkáně. Čím více jsou adipocyty hypertrofické, tím obsahují menší množství DNA v mg tkáně. V jednotlivých částech (A,B,C) GON tukové tkáně nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v množství DNA ( $p = 0,162$ ), ovšem byl pozorován signifikantní rozdíl v množství DNA mezi skupinami krmenými rozdílnými dietami ( $p < 0,001$ ) (graf 25). V DL depu nebyl pozorován signifikantní rozdíl v množství DNA mezi skupinami ( $p = 0,144$ ), ovšem byl pozorován signifikantní rozdíl mezi jednotlivými částmi tukového depa ( $p = 0,03$ ) (graf 26).



Graf 25: Koncentrace DNA v miligramu GON tukové tkáně, HFD a HFD+F (4.1.), rozdělení depa dle obr. 4



Graf 26: Koncentrace DNA v miligramu DL tukové tkáně, HFD a HFD+F (4.1.), rozdělení depa dle obr. 4

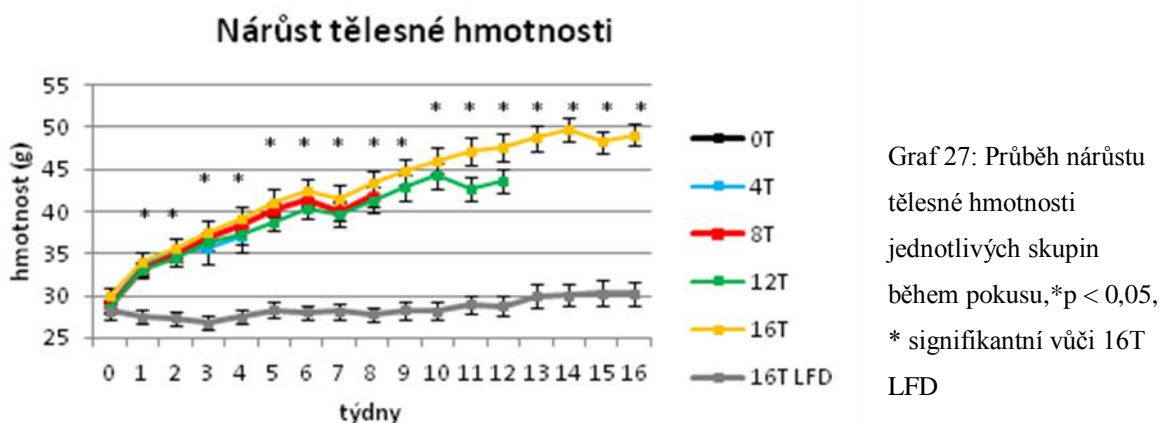
**Shrnutí:** Myši krmené HFD+F v porovnání se skupinou krmenou HFD měly větší množství DNA, což by mohlo znamenat, že mají menší adipocyty v GON depu. Je možné, že DL depo by mohlo být nehomogenní a mohlo by být osídleno i dalšími typy buněk.

## 5.2. Pokus č. 2

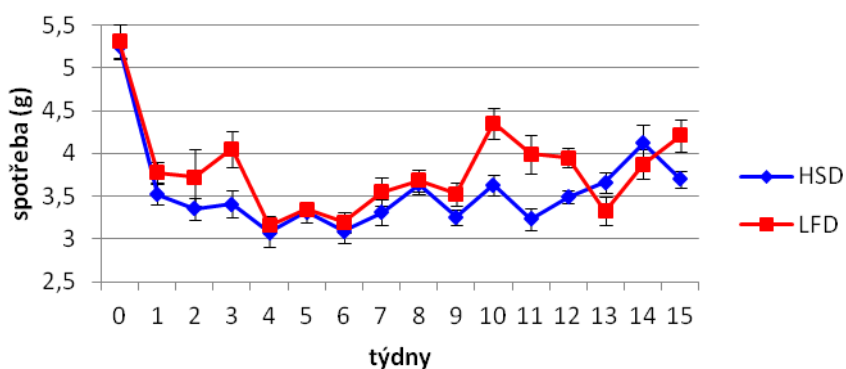
V druhém pokuse bylo celkem šest skupin myší (n = 8 pro každou skupinu). Obezita a s ní související metabolické poškození organismu byly indukovány u pěti skupin myší podáváním experimentální semisyntetické diety HSD. Kontrolní skupina myší byla krmena dietou LFD. Během pokusu byl skupinám proveden OGTT v určitých časových bodech viz schéma níže. Samotný pokus trval 16 týdnů. Jednotlivé skupiny myší byly usmrceny v časech 0, 4, 8, 12 a 16 týdnů.

### Nárůst tělesné hmotnosti a spotřeba krmiva (kalorický příjem)

Obdobně jako v prvním pokusu, byly myši i v druhém pokusu váženy a byla jim měřena spotřeba diety. Graf 27 reflektuje průměrný nárůst hmotnosti skupin krmených HSD a skupiny myší krmených LFD. V grafu je vidět mírné kolísání hmotnosti jednotlivých skupin v závislosti na stresu a opětovném zotavení po OGTT. Spotřeba diety je vidět v grafu 28, kde byly pro přehlednost výsledků spotřeby diety jednotlivých skupin opět průměrovány. Kolísání spotřeby je dáno vlivem OGTT na jednotlivé skupiny.



### Spotřeba diety



Graf 28: Průměrná spotřeba diety během celého pokusu, skupiny HSD a skupina LFD (4.1.)

**Shrnutí:** Myši ze všech skupin měly na gramy podobný příjem potravy, nicméně myši na HSD měly díky vyššímu kalorickému obsahu příjem vyšší příjem energie, a proto měly signifikantně vyšší hmotnost, než myši krmené LFD.

### Měření míry glukózové tolerance pomocí OGTT

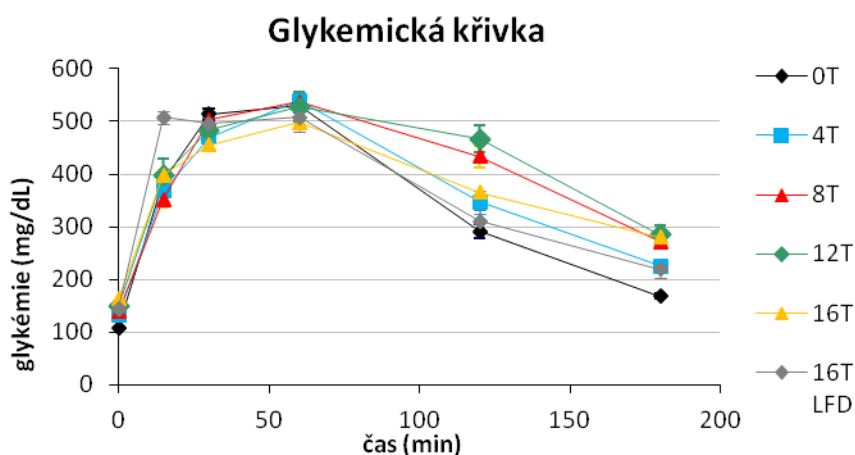
OGTT podstoupily myši krmené HSD v různých časových intervalech dle tabulky č. 7.

Skupina	Začátek pokusu	4. týden pokusu	8. týden pokusu	12. týden pokusu	16. týden pokusu
0T	OGTT				
4T	OGTT	OGTT			
8T	OGTT		OGTT		
12T	OGTT		OGTT	OGTT	
16T	OGTT		OGTT		OGTT
16T LFD	OGTT		OGTT		OGTT

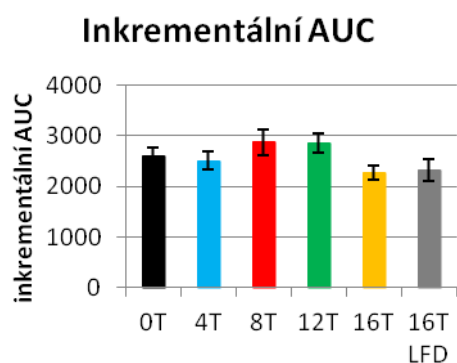
Tab. č. 7: Časové body, kdy jednotlivé skupiny myši podstoupily OGTT

Pro přehlednost jednotlivých výsledků v grafech byly hodnoty všech skupin průměrovány v daném časovém bodě u všech skupin krmených dietou HSD. Graf 29 zobrazuje průběh glykemické křivky. Grafy 30 a 31 zobrazují inkrementální a totální AUC.

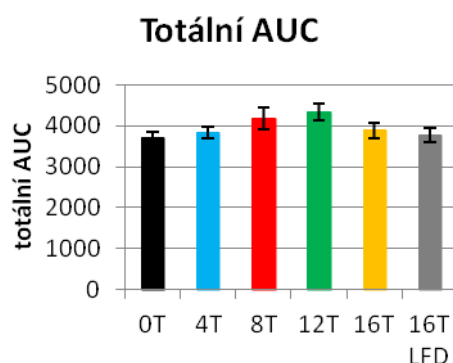




Graf 29: Glykemická křivka jednotlivých skupin myši (4.1.)

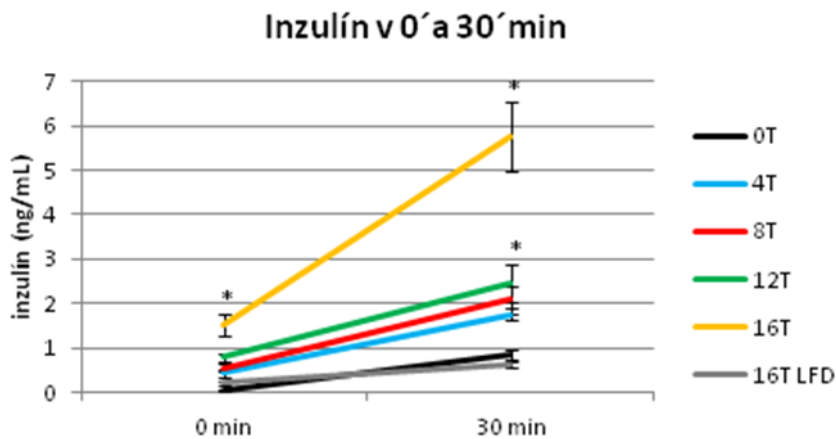


Graf 30: Inkrementální plocha pod křivkou u jednotlivých skupin myši (4.1.)

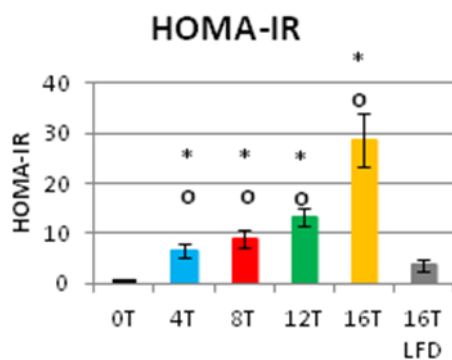


Graf 31: Totální plocha pod křivkou u jednotlivých skupin myši (4.1.)

Během OGTT před podáním glukózy (čas 0) a 30 minut po podání glukózy (čas 30) byly odebrány vzorky krve pro stanovení koncentrace inzulínu v plazmě (graf 32). V grafu je vidět signifikantní rozdíl u skupiny 16T oproti skupině 16T LFD v časových bodech 0 i 30 minut. U skupin 4T, 8 a 12T je vidět statisticky významný rozdíl v porovnání se skupinou 16T LFD pouze ve 30. minutě ( $p < 0,001$ ). Z hodnot získaných během OGTT byl vypočítán HOMA-IR index (graf 33), kde je vidět postupný rozvoj inzulínové rezistence u myši krmených dietou HSD. Signifikantní rozdíl je vidět u skupin 4T, 8T, 12T a 16T v porovnání se skupinou 0T i 16T LFD ( $p < 0,001$ ).



Graf 32: Plazmatická koncentrace inzulínu v 0´ a 30´ minutě po podání glukózy jednotlivých skupin myší (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD.

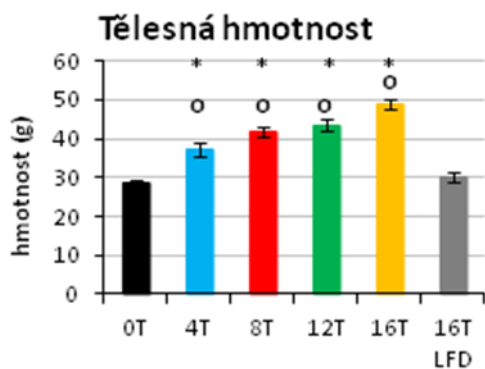


Graf 33: HOMA-IR index u jednotlivých skupin myší (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.

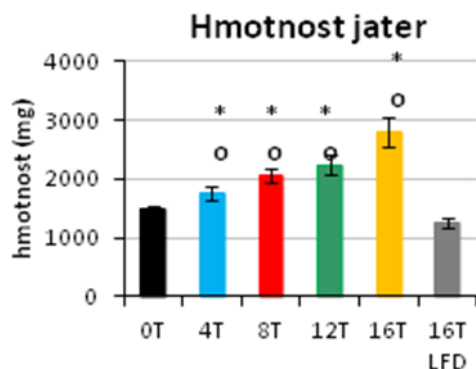
**Shrnutí:** Zhoršená glukózová tolerance byla pozorována do 12. týdne pokusu, poté došlo ke zlepšení. Ze stanovení inzulínu v krevní plazmě a hodnot HOMA-IR indexu je možné vidět postupný rozvoj inzulínové rezistence.

### Analýza vzorků tkáně

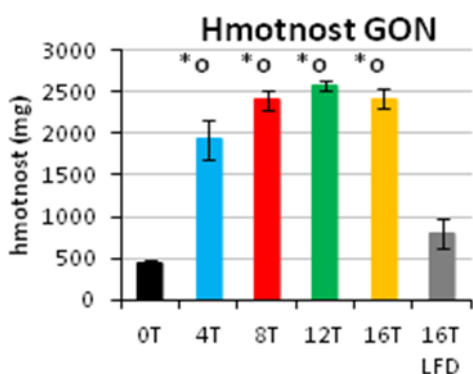
Při pitvách byly odebrány a zváženy jednotlivé tkáně vypovídající o metabolickém stavu organismu, obdobně jako v prvním pokusu. V grafech 34, 35, 36, 37, 38 jsou zobrazeny narůstající hmotnosti daných tkání u jednotlivých skupin.



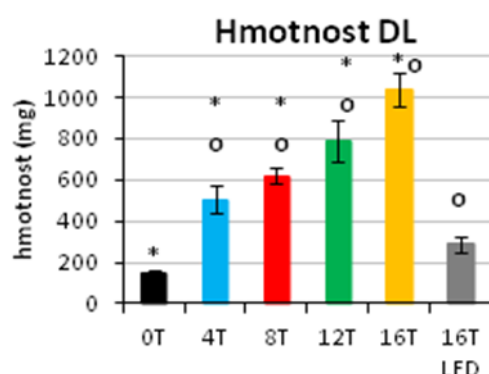
Graf 34: Hmotnost myši před pitvou u jednotlivých skupin (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.



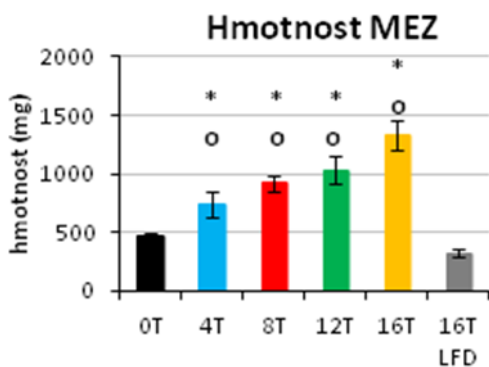
Graf 35: Hmotnost jaterní tkáně u jednotlivých skupin myši (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.



Graf 36: Hmotnost GON tukového depa u jednotlivých skupin myši (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.



Graf 37: Hmotnost DL tukového depa u jednotlivých skupin myši (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.



Graf 38: Hmotnost MEZ tukového depa u jednotlivých skupin myši (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.

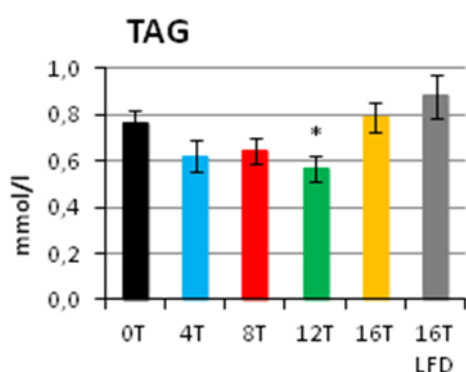
**Shrnutí:** V závislosti na délce podávání experimentální HSD diety je vidět postupný nárůst hmotnosti celého organismu, jater a tukových dep.

## Stanovení lipidových metabolitů v plazmě a játrech

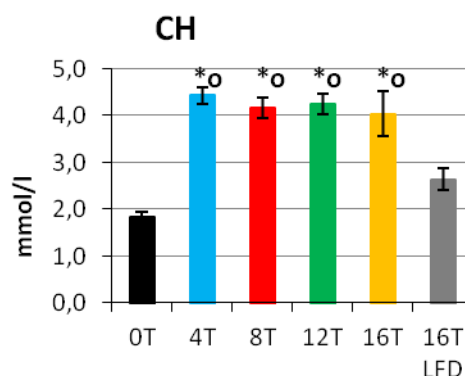
### Stanovení TAG, CHOL, FFA v plazmě

Na začátku pitvy byla myším podstřížením krční tepny odebrána krev obdobně jako v prvním pokusu.

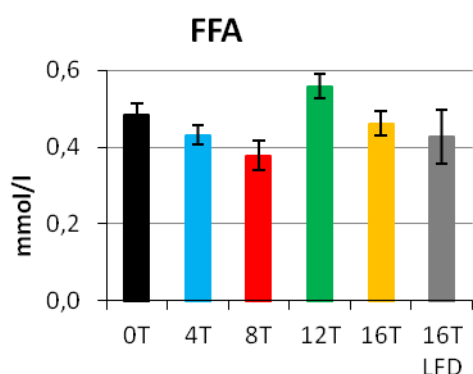
V plazmě byly stanoveny hladiny TAG, CHOL, FFA u myší krmených odlišnými dietami v závislosti na době přijímané diety. Výsledky zobrazené v jednotlivých grafech neprokazují korelaci mezi délkou přijímané diety a složením diety. V grafu 40 je vidět signifikantní rozdíl v plazmatických hladinách CH mezi skupinami krmenými dietou HSD a skupinou krmenou dietou LFD, což je zřejmě dáno složením diety HSD, která obsahuje cholesterol. Hladiny FFA pravděpodobně odrážejí aktuální nutriční stav myší před pitvou (graf 41).



Graf 39: Koncentrace TAG v plazmě u jednotlivých skupin myší (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD



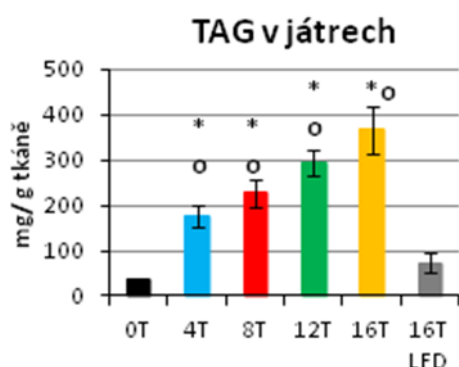
Graf 40: Koncentrace CH v plazmě u jednotlivých skupin myší (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.



Graf 41: Koncentrace FFA v plazmě u jednotlivých skupin myši (4.1.).

### Stanovení obsahu TAG v játrech

Při pitvě byl odebrán vzorek z velkého laloku jaterní tkáně, kde byl stanoven obsah TAG v gramu tkáně. V grafu 42 je vidět kontinuální nárůst obsahu TAG v játrech v závislosti na délce přijímání HSD diety. Tento graf odráží rozvoj jaterní steatózy v čase. Je prokazatelné, že myši krmené dietou HSD mají více TAG v játrech, než myši krmené LFD



Graf 42: Koncentrace TAG v gramu jaterní tkáně u jednotlivých skupin myši (4.1.), \*o  $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči OT.

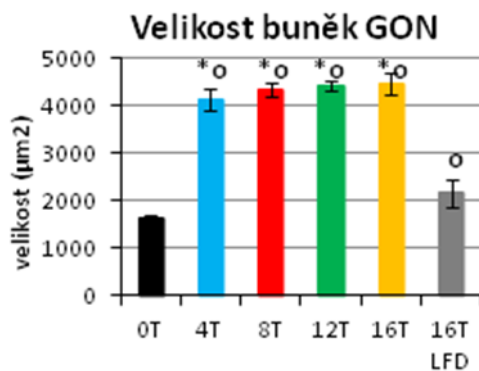
**Shrnutí:** Koncentrace lipidických složek v plazmě vypovídá o aktuálním nutričním stavu zvířete a také odpovídá složení podávané experimentální diety. TAG v játrech odrážejí obezogenní charakter HSD diety a informují o postupném rozvoji jaterní steatózy.

### Stanovení velikosti adipocytů v bílé tukové tkáni

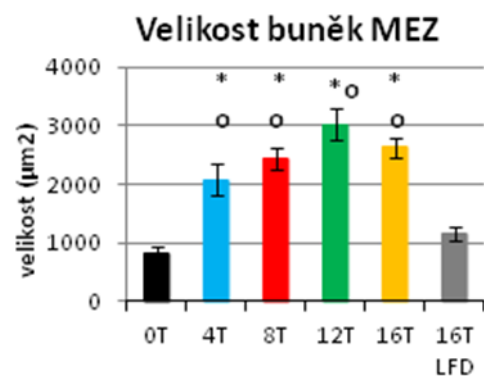
Při pitvě bylo odebráno GON, DL a MEZ tukové depo. V těchto depech byly analyzovány velikosti adipocytů. Z vyhodnocených snímků GON tukové tkáně byl pozorován

statisticky významný rozdíl u skupin krmených po dobu 4 až 16 týdnů dietou HSD oproti skupině krmené dietou LFD (graf 43) ( $p < 0,001$ ). V grafu je vidět masivní nárůst velikosti adipocytů již ve 4. týdnu experimentu. Je patrné, že ve 4. týdnu experimentu byla z velké části naplněna kapacita GON tukového depa, protože v dalším průběhu pokusu nebyl pozorován signifikantní rozdíl ve velikosti adipocytů mezi skupinami krmenými dietou HSD od 4. týdne do konce pokusu.

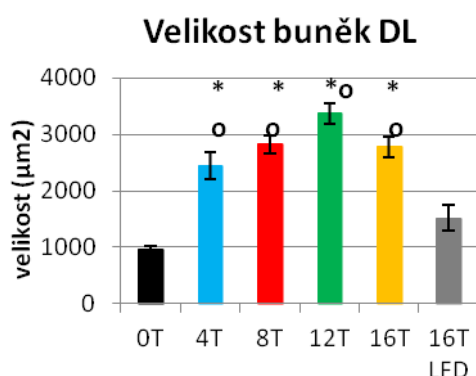
V MEZ tukovém depu byl pozorován signifikantní rozdíl mezi skupinami krmenými 4 až 16 týdnů dietou HSD a skupinou krmenou LFD (graf 44) ( $p < 0,001$ ). Obdobné výsledky jako v MEZ tukovém depu byly pozorovány i v podkožním DL tukovém depu (graf 45) ( $p < 0,001$ ).



Graf 43: Velikost adipocytů v GON tukové tkáni u jednotlivých skupin myší (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.



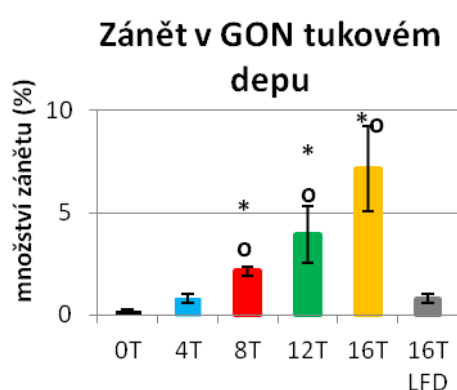
Graf 44: Velikost adipocytů v MEZ tukové tkáni u jednotlivých skupin myší (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.



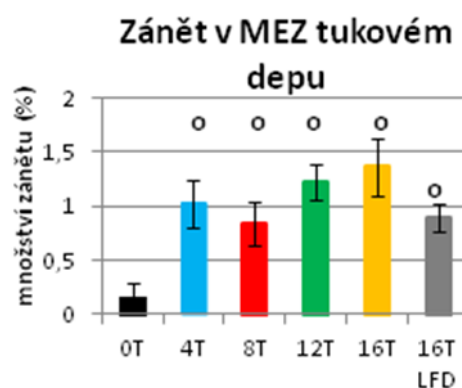
Graf 45: Velikost adipocytů v DL tukové tkáni u jednotlivých skupin myší (4.1.), \* $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.

## Detekce makrofágů v bílé tukové tkáni

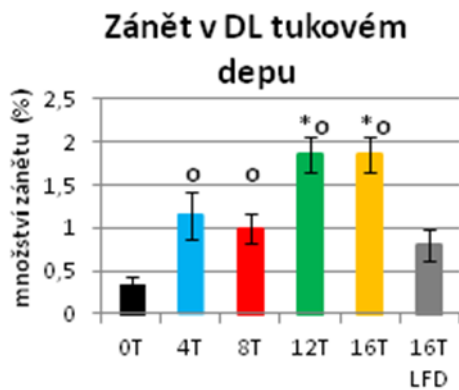
V GON, DL a MEZ tukovém depu bylo pomocí imunohistochemické metody stanoveno množství makrofágů ve zmíněných tukových depech. Umírající tukové buňky obklopené makrofágy byly počítány jako počet „CLS“ (viz. kapitola Makrofágy a zánět tukové tkáně ) na 100 živých tukových buněk. Signifikantní rozdíl mezi skupinami krmenými dietou HSD v porovnání s kontrolní skupinou krmenou LFD a v porovnání se skupinou 0T byl pozorován v GON tukové tkáni od 8. týdne pokusu ( $p < 0,001$ ) (graf 46). V MEZ tukovém depu byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi skupinami myši porovnávanými se skupinou 0T (graf 47). U DL tukového depa byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi HSD skupinami a skupinou LFD ve 12. a 16. týdnu pokusu a v porovnání se skupinou 0T byl pozorován od 8. týdne pokusu ( $p < 0,001$ ) (graf 48). Jednotlivé korelace mezi množstvím zánětu a velikostí adipocytů (graf 49, 50, 51), korelace mezi hmotností depa a velikostí adipocytů (graf 52,53,54) a korelace mezi tělesnou hmotností myši a velikostí adipocytů v jednotlivých depech (graf 55,56,57) jsou vyobrazeny níže. V grafu 52 je vidět korelace mezi hmotností GON tukového depa a velikostí buněk ve zmíněném depu. V ostatních grafech nebyly korelace prokázány.



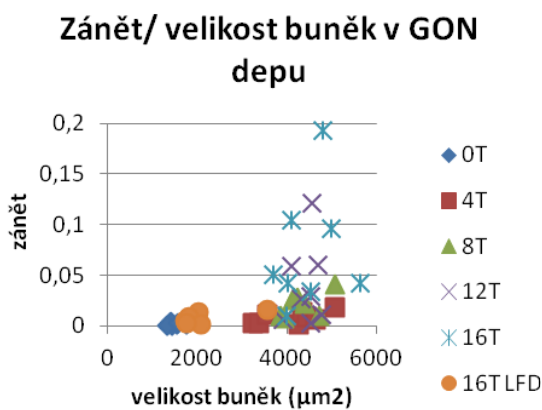
Graf 46: Míra zánětu v GON tukové tkáni u jednotlivých skupin myši (4.1.), \*o  $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.



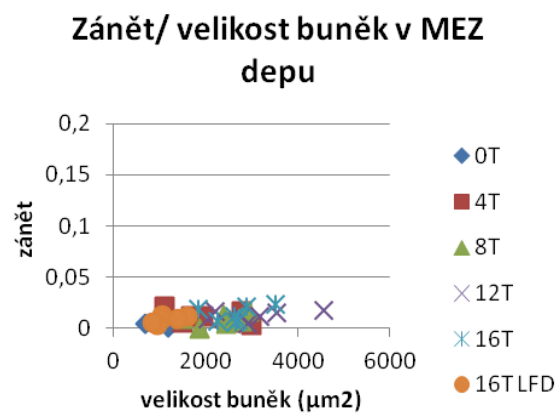
Graf 47: Míra zánětu v MEZ tukové tkáni u jednotlivých skupin myši (4.1.).



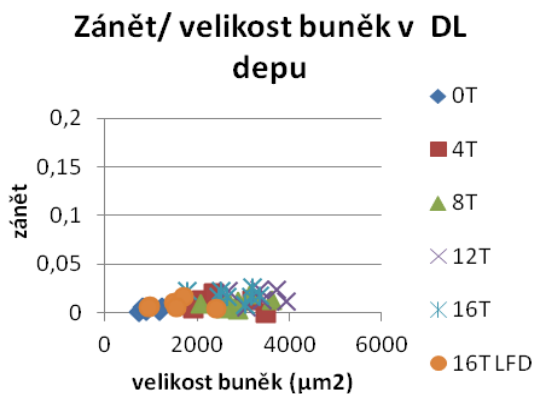
Graf 48: Míra zánětu v DL tukové tkáni u jednotlivých skupin myši (4.1.), \*o  $p < 0,001$ , \* signifikantní vůči 16T LFD, o signifikantní vůči 0T.



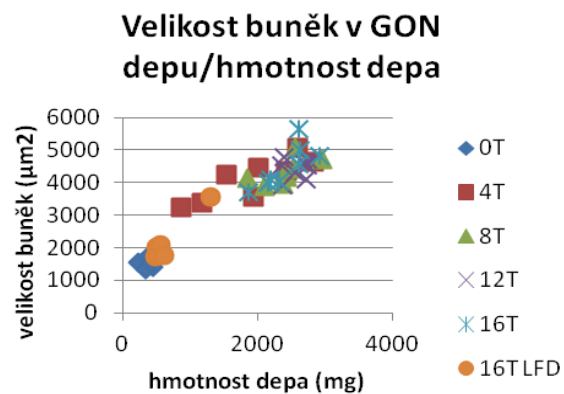
Graf 49: Korelace mezi počtem mrtvých buněk na 100 živých buněk (zánět) a velikostí buněk v GON depu u jednotlivých skupin myši (4.1.).  $R^2 = 0,1985$



Graf 50: Korelace mezi počtem mrtvých buněk na 100 živých buněk (zánět) a velikostí buněk v MEZ depu u jednotlivých skupin myši (4.1.).  $R^2 = 0,2343$

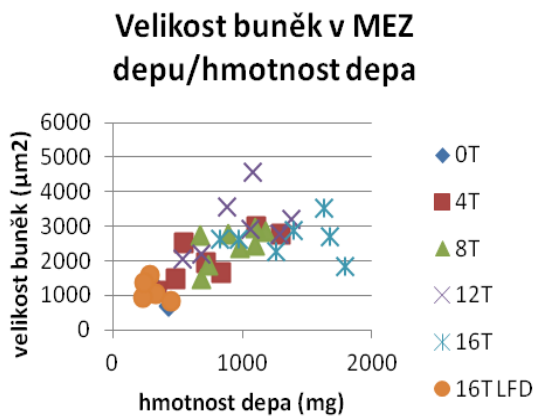


Graf 51: Korelace mezi počtem mrtvých buněk na 100 živých buněk (zánět) a velikostí buněk v DL depu u jednotlivých skupin myši (4.1.).  $R^2 = 0,2282$

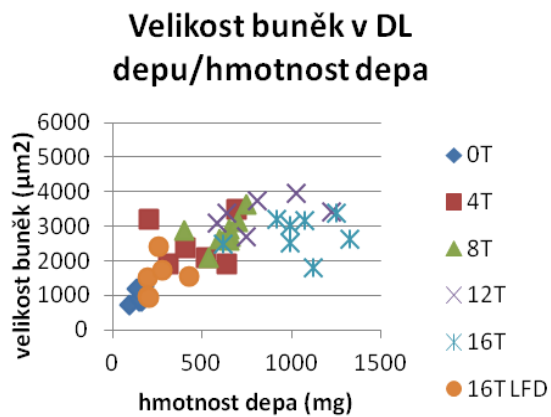


Graf 52: Korelace mezi velikostí buněk a hmotností GON tukového depu u jednotlivých skupin myši (4.1.).  $R^2 = 0,9007$

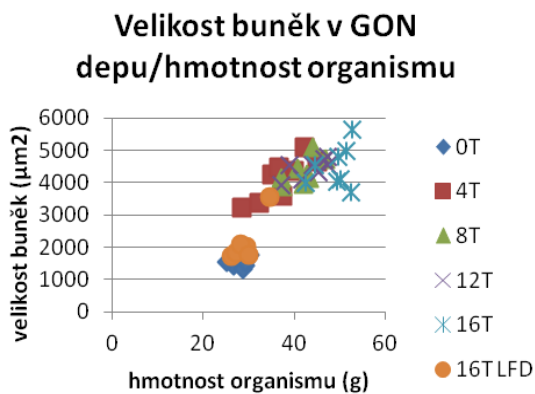




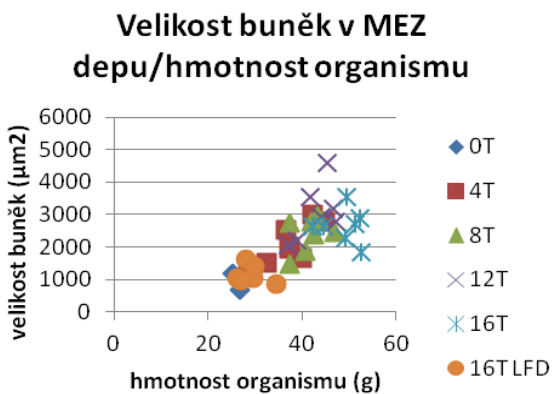
Graf 53: Korelace mezi velikostí buněk a hmotnostmi MEZ tukového depa u jednotlivých skupin myši (4.1.).  $R^2 = 0,4976$



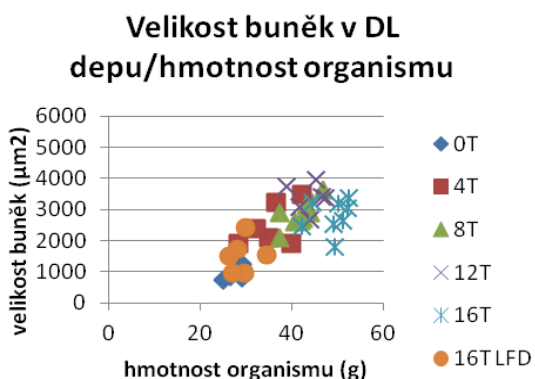
Graf 54: Korelace mezi velikostí buněk a hmotnostmi DL tukového depa u jednotlivých skupin myši (4.1.).  $R^2 = 0,4995$



Graf 55: Korelace mezi velikostí buněk v GON depu a hmotnostmi organismu u jednotlivých skupin myši (4.1.).  $R^2 = 0,7454$



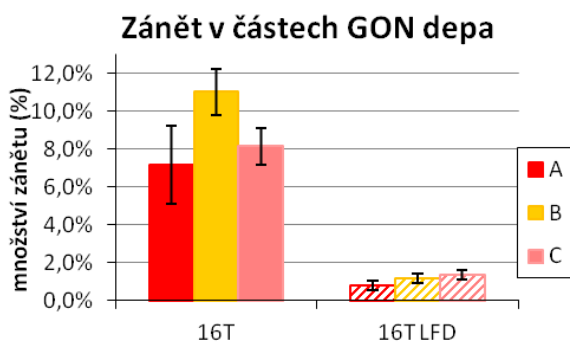
Graf 55: Korelace mezi velikostí buněk v MEZ depu a hmotnostmi organismu u jednotlivých skupin myši (4.1.).  $R^2 = 0,607$



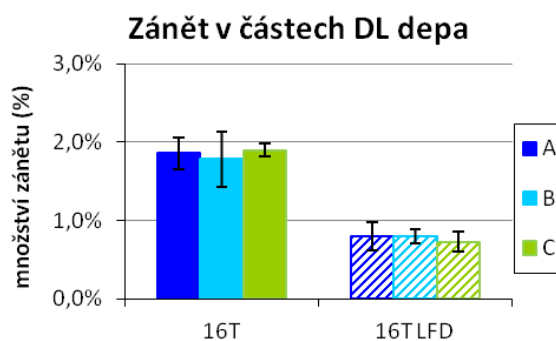
Graf 57: Korelace mezi velikostí buněk v DL depu a hmotností organismu u jednotlivých skupin myší (4.1.).  $R^2 = 0,5943$

### Homogenita GON a DL tukového depa

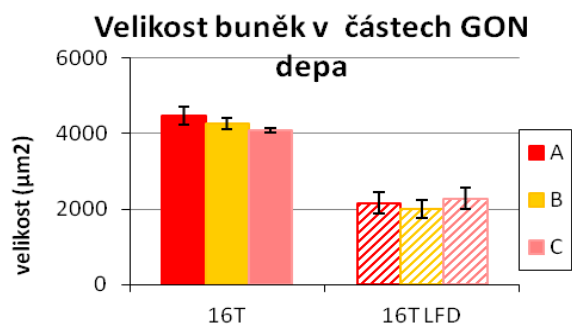
Na konci pokusu, tedy v 16. týdnu, byla GON a DL tuková depa u myších krmných HSD a myších krmných LFD rozdělena na 3 části – A, B, C (viz obr. 8). Jednotlivé části byly analyzovány z hlediska velikosti adipocytů a množství zánětu. V GON tukovém depu nebyl v množství zánětu pozorován statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými částmi depa ( $p = 0,23$ ), ale významný rozdíl byl pozorován mezi skupinami na experimentálních dietách ( $p < 0,001$ ) (graf 58). V DL tukovém depu nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v množství zánětu mezi jednotlivými částmi depa ( $p = 0,165$ ), ovšem byl pozorován stejně jako u GON depa mezi skupinami ( $p < 0,001$ ) (graf 59). Shodné výsledky jako v množství zánětu byly pozorovány i ve velikosti adipocytů v jednotlivých částech GON a DL tukového depa (graf 60, 61).



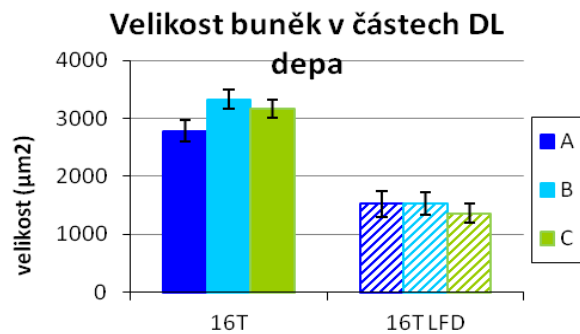
Graf 58: Množství zánětu v částech GON tukového depa



Graf 59: Množství zánětu v částech DL tukového depa



Graf 60: Velikost adipocytů v částech GON tukového depa



Graf 61: Velikost adipocytů v částech DL tukového depa

**Shrnutí:** Tuková depa plní zásadní funkci úložného orgánu v organismu. Zdá se, že je nejprve plněno GON tukové depa, následně DL tukové depa a výsledně MEZ tukové depa. Z hlediska velikosti buněk a množství zánětu jsou GON a DL tuková depa uniformní.

## 6. Diskuze

### 6.1. Pokus č. 1

Cílem prvního pokusu bylo charakterizovat vliv vysokotukové diety HFD a od ní odvozené diety HFD+F na hmotnost pokusných zvířat a hmotnost jednotlivých orgánů, na glukózovou homeostázu, na hladiny lipidových metabolitů v plazmě, na množství TAG v játrech a na homogenitu tukových dep.

V prvním pokuse byla používána dieta HFD s vysokým obsahem tuku, která je v naší laboratoři obvyklou dietou užívanou pro rozvoj obezity. HFD je z velké části tvořena n-6 nenasyčenými mastnými kyselinami, které jsou hojně zastoupeny v kukuřičném oleji. Cukerná složka je v této dietě zajištěna zejména složitými sacharidy, konkrétně škrobem. Další dieta užívaná v tomto pokusu byla odvozená od HFD a to dieta HFD+F, kde bylo 15 % tuku nahrazeno koncentrátem EPAX 1050TG (Lysaker, Norsko), který obsahuje n-3 polynenasycené mastné kyseliny (n-3 PUFA) jako jsou mimo jiné kyselina dokosaheptaenová (DHA, 22:6 n-3) a kyselina eikosapentaenová (EPA, 20:5 n-3).

#### **Konzumace HFD+F působí benefičně**

V souladu s literaturou (Flachs et al., 2009; Kopecký et al., 2009) jsme v prvním pokuse pozorovali benefiční účinky n3-PUFA na celkový metabolismus lipidů i cukrů. Přesto, že se obě skupiny ve spotřebě diety nelišily a to ani v kumulativní spotřebě diety, vážily myši ze skupiny HFD+F oproti myším ze skupiny HFD na konci pokusu signifikantně méně. Také hmotnost GON a DL tukového depa a hmotnost jater byly významně nižší u skupiny HFD+F v porovnání s HFD. Dle množství DNA v mg tkáně bylo odhadnuto množství buněk v tukové tkáni, což nepřímo odráží velikost adipocytů. V souladu s literaturou (Ruzickova et al., 2004) jsme u skupiny HFD+F pozorovali větší množství DNA a tedy i pravděpodobně menší velikost adipocytů, což je dáno účinkem n-3 PUFA, které se podílejí na potlačení syntézy lipidů a stimulaci  $\beta$ -oxidace v adipocytech. Skupina HFD+F měla v porovnání se skupinou HFD játra s menším množstvím tuku. Tento výsledek byl podpořen i snímky z histologických řezů jater, kde bylo vidět menší množství tukových kapének u skupiny HFD+F. Tento výsledek je ve shodě s literaturou vysvětlující tento fakt působením n-3 PUFA na snížení lipogeneze v játrech a také na nižší uvolňování lipidových metabolitů do cirkulace. V souladu s literaturou (Flachs et al., 2006) jsme pozorovali benefiční účinky n3-PUFA na plazmatické

hladiny TAG, CH a NEFA. Myši krmené HFD+F měly signifikantně nižší lipidické složky v plazmě v porovnání se skupinou myší krmenou HFD.

V literatuře (Medrikova et al., 2011) se uvádí, že konzumace diety HFD vykazuje pohlavní rozdíly u myší. Z této studie vyplývá, že samice mají větší kapacitu tukové tkáně ukládat lipidy v závislosti na dlouhodobém podávání obezogenní diety. Samice měly oproti samcům větší adipocyty v GON i DL tukové tkáni s menším množstvím zánětu a také méně ukládaly tuk do jater (Medrikova et al., 2011). V porovnání výsledků z našeho pokusu s výsledky z Medrikova et al. 2011 jsme pozorovali menší tělesnou hmotnost u samců, menší množství DNA v mg tukové tkáně a menší množství lipidových složek v plazmě i TAG v játrech. Lepší metabolický stav samců v našem pokusu byl patrně dán kratší délkou podávání obezogenní diety.

HOMA-IR index je metoda nepřímo informující o funkci  $\beta$  buněk a stavu inzulínové rezistence, která byla poprvé popsána v roce 1985. Zohledňuje vztah mezi glukózou a inzulínem v bazálním stavu. Tato metoda odráží propojení mezi jaterní produkcí glukózy a sekrecí inzulínu z  $\beta$  buněk. HOMA-IR index je standardně používán u lidí a v posledním desetiletí se začíná aplikovat i na laboratorní zvířata. Zatímco u lidí je tato metoda standardizovaná, u zvířat je HOMA-IR index založen pouze na předpokladu, že hladina krevní glukózy a inzulínu v lačném stavu odpovídá stavu bazálních podmínek. Ovšem lačný stav u zvířat není stejný jako lačný stav u lidí. Vhodnost aplikování HOMA-IR u zvířat je diskutabilní kvůli interpretaci a validaci získaných výsledků. Nicméně je tato metoda levná a lehce aplikovatelná, proto je dostačující u pokusů, kde je určení inzulínové senzitivity druhotným zájmem (Muniappa et al., 2008).

V 7. týdnu pokusu jsme provedli IPGTT, kde jsme nepozorovali žádný rozdíl v glukózové toleranci a ani na úrovni HOMA-IR indexu. Signifikantní rozdíl v hladině inzulínu v krevní plazmě jsme pozorovali při pitvě v 10. týdnu pokusu, což je pravděpodobně způsobeno délkou konzumace diety. Je tedy zřejmé, že benefiční účinky n3-PUFA jsou statisticky signifikantní po určité době podávání.

### **Uniformita GON a DL tukového depa**

V GON a DL tukovém depu jsme zkoumali uniformitu celého depa z hlediska nepřímého stanovení velikosti buněk a to stanovením množství TAG a DNA. Z výsledků je patrné, že GON tukové depo je uniformní. U množství TAG i DNA vztažených na gram tkáně

jsme ani v DL depu nepozorovali statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými částmi tukového depa. Je vidět trend, že část A by mohla kromě adipocytů obsahovat i jiné buňky. Možným vysvětlením tohoto výsledku může být i metodická chyba při odběru tkáně.

## **6.2. Pokus č. 2**

Cílem druhého pokusu bylo charakterizovat vliv diety HSD s vysokým obsahem tuku a diety LFD s nízkým obsahem tuku u myši na hmotnost pokusných zvířat a hmotnost jednotlivých orgánů, na glukózovou homeostázu, na hladiny lipidových metabolitů v plazmě a na homogenitu tukových dep.

Tuková složka testované obezogení diety HSD je tvořena hlavně vepřovým sádlem, ve kterém jsou obsaženy nasycené mastné kyseliny jako např. kyselina palmitová a kyselina stearová. Cukerná složka je tvořena zejména jednoduchým sacharidem a to sacharózou, která je složena z glukózy a fruktózy. Experimentální HSD dieta byla vybrána do pokusu kvůli silnému lipogennímu účinku nasycených mastných kyselin. Z literatury (Sampath et al., 2007) je známo, že kyselina stearová je hlavním substrátem pro enzym SCD1 (stearoyl-CoA desaturáza). SCD1 katalyzuje vznik dvojně vazby mezi 9. a 10. uhlíkem mastné kyseliny. Účinkem tohoto enzymu dochází k přeměně kyseliny stearové na kyselinu olejovou, kyseliny palmitové na palmitoleát. Zvýšený obsah nasycených mastných kyselin v HSD dietě tak vede k zvýšené tvorbě kyseliny olejové. V literatuře se hovoří o kyselině olejové jako o regulátoru lipogenních genů, i když donedávna bylo toto působení připisováno nasyceným mastným kyselinám (Sampath et al., 2007). Kyselina olejová indukuje transkripční faktor SREBP-1c, který se podílí na stimulaci lipogenních enzymů (Horton et al., 2002). Tato kyselina je hlavním substrátem pro syntézu TAG a CHE, čímž se významně podílí na vzniku obezity a s ní spojenými poruchami (Sampath et al., 2007).

### **Vliv HSD diety na indukci zánětu**

V souladu s výše uvedenými informacemi, jsme pro pozorování rozvoje obezity a s ní spojenými metabolickými dysfunkcemi zvolili HSD dietu. Zkoumali jsme vliv této diety na rozvoj adipozity a homogenitu tukových dep z hlediska velikosti buněk tukové tkáně a množství zánětu. V literatuře (Cinti et al., 2005) se uvádí, že při nárůstu adipocytů a vzniku obezity je tuková tkáň infiltrována makrofágy tvořící zánět. Buňky jsou schopny v závislosti na své plasticitě a kapacitě kumulovat TAG. V určité fázi, kdy buňka nemůže zvětšit svoji

velikost, odumře a je nahrazena malými adipocyty, které jsou znovu schopny plnit funkci úložiště. Uvádí se, že množství zánětu v tukové tkáni se odvíjí od velikosti adipocytů (Strissel et al, 2007; Weisberg et al., 2003). Velikost adipocytů je specifická pro jednotlivá depa. Murano et al., 2008 uvádí, že GON tukové depo je metabolicky aktivnější než DL tukové depo, a že adipocyty odumírají a jsou osidlovány makrofágy primárně v GON tuku. V souladu s těmito fakty, jsme v našem pokusu pozorovali, že v GON depu velikost adipocytů pozitivně korelovala s hmotností daného depa. Neočekávaně veliký nárůst adipocytů jsme pozorovali již ve 4. týdnu pokusu. Tento fakt mohl být způsoben vyšším obsahem tukové složky v dietě HSD v porovnání s dietou užívanou v pokuse Strissel et al., 2007. V GON tuku jsme v porovnání s DL depem pozorovali větší velikost adipocytů, což je v souladu s výsledky z publikace (Strissel et al., 2007). Strissel et al., 2007 také uvádí, že adipocyty hypertrofují do 12. týdne, poté jsou nahrazeny novými malými buňkami, což je v souladu s našimi výsledky. Dále pozoruje, že až 90 % objemu tkáně tvoří umírající adipocyty obklopené makrofágy v GON tukové tkáni v 16. týdnu na experimentální dietě. V našem pokusu jsme pozorovali maximální množství zánětu také v 16. týdnu, ovšem pozorovali jsme pouze 10% zastoupení umírajících adipocytů v tuku. Tvzení, že velikost adipocytů koreluje s množstvím zánětu (Cinti et al., 2005) jsme nepotvrdili, obdobně jako Strissel et al. V našem experimentu jsme pozorovali, že nejprve došlo k masivnímu nárůstu buněk, který byl doprovázen mírnou infiltrací makrofágů v GON depu a minimální infiltrací v DL a MEZ depu. Posléze se velikost adipocytů již nezvětšovala, ale úroveň zánětu neustále vzrůstala. Obdobné výsledky jsme pozorovali i v MEZ depu, ovšem interpretaci výsledků nemůžeme porovnat s literaturou, protože v současné době není MEZ tukové depo běžně analyzováno.

Z výsledkové části je patrné, že je nejprve TAG plněno GON tukové depo, dále DL tukové depo a následně MEZ tukové depo.

### **Uniformita GON a DL tukového depa**

V GON a DL tukovém depu jsme zkoumali v 16. týdnu uniformitu celého depa z hlediska velikosti buněk a množství zánětu u skupiny myší krmnou dietou HSD a skupiny krmnou dietou LFD. Z výsledků je patrné, že GON i DL tukové depo je z hlediska velikosti buněk a množství zánětu uniformní.

U MEZ tukového depa jsme uniformitu nezkoumali. MEZ tukové depo je uloženo podél střeva a jediný kus této tkáně, který lze histologicky zpracovat, není dostatečně veliký pro analýzu více částí a tedy na pozorování uniformity tukového depa.

### **Rozvoj inzulinové rezistence vlivem diety HSD**

V souladu s literaturou, jsme důsledkem podávání diety HSD pozorovali u myši inzulinovou rezistenci (Buettner et al., 2006). Pozorovali jsme, že hladina inzulinu v lačném stavu se zvyšovala v závislosti na době podávání diety HSD, což vypovídá o přítomnosti inzulinové rezistence a její kompenzaci. Všechny skupiny krmené dietou HSD vykazovaly v porovnání s kontrolní skupinou krmenou dietou LFD signifikantní rozdíl v hladině inzulinu v 30. minutě po podání glukózy. Pomocí HOMA-IR indexu jsme kvantifikovali míru inzulinové rezistence a v závislosti na čase tak zachytili rozvoj tohoto patologického stavu.



## 7. Závěr

V prvním pokuse jsme prokázali benefiční účinky n-3 PUFA na hmotnost tukových dep u myši kmene C57BL/6J krmených dietou s vysokým obsahem tuků. Přestože jsme na IPGTT provedeném v 7. týdnu konzumace diety neprokázali rozdíl v glukózové toleranci, v 10. týdnu jsme při pitvě pozorovali, že vysokotuková dieta s obsahem n-3 PUFA snižovala hladinu inzulínu, TAG, CH i FFA v plazmě. Na úrovni množství TAG a DNA v tkáni jsme prokázali uniformitu tukových dep.

V druhém pokuse jsme definovali účinek diety s vysokým obsahem tuků a sacharózy na rozvoj adipozity u jednotlivých tukových dep. Vývoj velikosti adipocytů oproti předpokladu nekoreloval s vývojem zánětu v GON, DL ani MEZ depu. Prokázali jsme uniformitu tukových dep na úrovni velikosti adipocytů a tkáňového zánětu. Dieta HSD indukovala také inzulínovou rezistenci, zvyšovala množství cholesterolu v plazmě, pravděpodobně díky přítomnosti cholesterolu v dietě, a indukovala jaterní steatózu.

## 8. Reference

- Alberti K George MM , Paul Zimmet, Jonathan Shaw, The metabolic syndrome - a new worldwide definition, *The Lancet*, 366, 1059–1062 (2005).
- Aldridge W. N., B. W. Street, Mitochondria from Brown Adipose Tissue, *Biochem. J.*, 107, 315–317 (1968).
- Banerjee, Ronadip R., Rangwala, Shamina M., Shapiro, Jennifer S., Rich, A. Sophie, Rhoades, Ben, Qi, Yong, Wang, Juan, Rajala, Michael W., Poci, Alessandro, Scherer, Phillip E., Stepan, Claire M., Ahima, Rexford S., Obici, Silvana, Rossetti, Luciano, Lazar, Mitchell A., Regulation of Fasted Blood Glucose by Resistin, *Science*, 303, 1195–1198 (2004).
- Bell Ming, Hong Wang, Hui Chen, John C. McLenithan, Da-Wei Gong, Rong-Zee Yang, Daozhan Yu, Susan K. Fried, Michael J. Quon, Constantine Londos, and Carole Sztalryd, Consequences of Lipid Droplet Coat Protein Downregulation in Liver Cells: Abnormal Lipid Droplet Metabolism and Induction of Insulin Resistance, *Diabetes*, 57, 2037–2045 (2008).
- Bénédicte Prunet-Marcassus, Béatrice Cousin, David Caton, Mireille André, Luc Pénicaud, Louis Casteilla, From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences, *Experimental Cell Research*, 312, 727–736 (2006).
- Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE., *Bone*, 35, 842–849 (2004).
- Bjørndal Bodil, Lena Burri, Vidar Staalesen, Jon Skorve, and Rolf K. Berge, Different Adipose Depots: Their Role in the Development of Metabolic Syndrome and Mitochondrial Response to Hypolipidemic Agents, *Journal of Obesity*, 2011, 1–15 (2010).
- Boden G., G. I. Shulman, Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction, *European Journal of Clinical Investigation*, 32, 14–23 (2002).
- Boden Guenther, Pengxiang She, Maria Mozzoli, Peter Cheung, Kiranmai Gumireddy,
- Butler Alexandra E., Juliette Janson, Susan Bonner-Weir, Robert Ritzel, Robert A. Rizza, and Peter C. Butler, Cell Deficit and Increased Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes, *Diabetes*, 52, 102–110 (2003).
- Campbell P. J. , M. G. Carlson, J. O. Hill, and N. Nurjhan, Regulation of free fatty acid metabolism by insulin in humans: role of lipolysis and reesterification, *Endo*, 263, E1063–E1069 (2006).

Cancello Raffaella, Joan Tordjman, Christine Poitou, Gae Guilhem, Jean Luc Bouillot, Danielle Hugol, Christiane Coussieu, Arnaud Basdevant, Avner Bar Hen, Pierre Bedossa, Michele Guerre-Millo, and Karine Clement, Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity, *Diabetes*, 55, 1554–1561 (2006).

Cannon Barbara and Jan Nedergaard, Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance, *Physiol Rev*, 84, 277–359, (2004).

Cinti Saverio, Grant Mitchell, Giorgio Barbatelli, Incoronata Murano, Enzo Ceresi, Emanuela Faloi, Shupe Wang, Melanie Fortier, Andrew S. Greenberg, and Martin S. Obin, Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans, *Journal of Lipid Research*, 46, 2347–2355 (2005).

Cinti Saverio, The adipose organ at a glance, *Disease Models & Mechanisms*, 5, 588–594 (2012).

Cryer A, Riley SE, Williams ER, Robinson DS, Effect of nutritional status on rat adipose tissue, muscle and post-heparin plasma clearing factor lipase activities: their relationship to triglyceride fatty acid uptake by fat-cells and to plasma insulin concentrations, *Clin Sci Mol Med.*, 50, 213–221 (1976).

D'Alessandro Mari'a E., Adriana G. Chicco, Yolanda B. Lombardo, A long-term sucrose-rich diet increases diacylglycerol content and membrane nPKC expression and alters glucose metabolism in skeletal muscle of rats, *Nutrition Research*, 26, 289–296 (2006).

Flachs P., V. Mohamed-Ali, O. Horakova, M. Rossmeisl, M. J. Hosseinzadeh-Attar, M. Hensler . J. Ruzickova, J. Kopecky, Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet, *Diabetologia*, 49, 394–397 (2006).

Flachs P., M. Rossmeisl, M. Bryhn and J. Kopecky, Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism, *Clinical Science*, 116, 1–16 (2009).

Fredrikson Gudrun, Peter Strilfors, Nils Osten Nilsson, and Per Belfrage, Hormone-sensitive Lipase of Rat Adipose Tissue, *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 6311–6320 (1981).

Fruebis Joachim, Tsu-Shuen Tsao, Sandrine Javorschi, Dana Ebbets-Reed, Mary Ruth S. Erickson, Frances T. Yen, Bernard E. Bihain, and Harvey F. Lodish, Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice, *PNAS*, 98, 2005–2010 (2001).

Galic Sandra, Jon S. Oakhill, Gregory R. Steinberg, Adipose tissue as an endocrine organ, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316, 129–139 (2010).

Gokhan S. Hotamisligil, Pascal Peraldi, Adriane Budavari, Ramsey Ellis, Morris F. White, Bruse M. Spiegelman, IRS-1 Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- $\alpha$  and Obesity-Induced Insulin Resistance, *Science*, 271, 665–668 (1996).

Graham Richard C.JR., Morris J. Karnovsky, The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 14, 291–302 (1966).

Greenberg Andrew S and Martin S Obin, Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism, *Am J Clin Nutr*, 83, 461S–5S (2006).

Grundey Scott M., MD, PhD; H. Bryan Brewer, Jr, MD; James I. Cleeman, MD, Sidney C. Smith, Jr, MD; Claude Lenfant, MD, Definition of Metabolic Syndrome, Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition, *Circulation*, 109, 433–438 (2004).

Gual Philippe, Yannick Le Marchand-Brustel, Jean-François Tanti, Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation, *Biochimie*, 87, 99–109 (2005).

Guesdon Jean-Luc, Therese Ternynck and Stratis Avrameas, The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 27, 1131–1139 (1979).

Haemmerle G, Zimmermann R, Zechner R, Letting lipids go: hormone-sensitive lipase, *Curr Opin Lipidol*, 14, 289–297 (2003).

Hauner Hans, Gero Entenmann, Martin Wabitsch, Danielle Gaillard, Gerard Ailhaud, Raymond Negrel, and Ernst Friedrich Pfeiffer, Promoting, Effect of Glucocorticoids on the Differentiation of Human Adipocyte Precursor Cells Cultured in a Chemically Defined Medium, *J. Clin. Invest.*, 84, 1663–1670 (1989).

Havel, Peter J., Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin, *Current Opinion in Lipidology*, 13, 51–59 (2002).

Hoevenaars Femke P. M., Evert M. van Schothorst, Olga Horakova, Anja Voigt, Martin Rossmeisl, Catalina Pico, Antoni Caimari, Jan Kopecky, Susanne Klaus, Jaap Keijer, BIOCLAIMS standard diet (BIOsd): a reference diet for nutritional physiology, *Genes Nutr*, 7, 399–404 (2012)

Hollenberg C. H., A. Angel, and G. Steiner, The metabolism of white and brown adipose tissue, *C.M.A. Journal*, 103, 843–849 (1970).

Holm C., Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis, *Biochemical Society Transactions*, 31, 1120–1124 (2003).

Holz G., New Insights Concerning the Glucose-dependent Insulin Secretagogue Action of Glucagon-like Peptide-1 in Pancreatic  $\beta$ -Cells, *Horm Metab Res.*, 36, 787–794 (2004).

Horton Jay D., Joseph L. Goldstein, Michael S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver, *J. Clin. Invest.*, 109, 1125–1131 (2002).

Hotamisligil Gökhan S., Narinder S. Shargill and Bruce M. Spiegelman, Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance, *New Series*, 259, 87–91 (1993).

Hotamisligil Gokhan S., Peter Arner, Richard L. Atkinson, and Bruce M. Spiegelman, Differential Regulation of the p80 Tumor Necrosis Factor Receptor in Human Obesity and Insulin Resistance, *Daibetes*, 46, 451–455 (1997).

Hotta Kikuko, Tohru Funahashi, Yukio Arita, Masahiko Takahashi, Morihiko Matsuda, Yoshihisa Okamoto, Hiromi Iwahashi, Hiroshi Kuriyama, Noriyuki Ouchi, Kazuhisa Maeda, Makoto Nishida, Shinji Kihara, Naohiko Sakai, Tadahisa Nakajima, Kyoichi Hasegawa, Masahiro Muraguchi, Yasukazu Ohmoto, Tadashi Nakamura, Shizuya Yamashita, Toshiaki Hanafusa and Yuji Matsuzawa, Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, 1595–1599 (2000).

Hsu Su-Ming, L. Raine and H. Fanger, Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Technique: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29, 577–580 (1981).

Huttunen Jussi K., Daniel Steinberg, and Steven E. Mayer, ATP-Dependent and Cyclic AMP-Dependent Activation of Rat Adipose Tissue Lipase by Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67, 290–295 (1970).

Iynedjian P B , Mammalian glucokinase and its gene, *Biochem J.*, 293, 1–13 (1993).

Jeffrey E. Pessin and Alan R. Saltiel, Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance, *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 165–169 (2000).

Junqueira L. Carlos, José Carneiro, Robert O. Kelley, *Základy histologie* (sedmé vydání), ISBN 80-85787-37-7, 193–195 (1997).

Kadowaki Takashi, Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS, *FEBS Letters*, 582, 74–80 (2008).

Kahn Richard, John Buse, Ele Ferrannini, Michael Stern, The Metabolic Syndrome: Time for a Critical Appraisal, *Diabetes Care*, 28, 2289–2304 (2005).

Kersten Sander, Béatrice Desvergne & Walter Wahli, Roles of PPARs in health and disease, *Nature*, 405, 421–424, 2000

Khan Tayeba, Eric S. Muise, Puneeth Iyengar, Zhao V. Wang, Manisha Chandalia, Nicola Abate, Bei B. Zhang, Paolo Bonaldo, Streamson Chua, and Philipp E. Scherer, Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI, *Molecular and Cellular Biology*, 29, 1575–1591 (2009).

Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD, A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF, *Cell*, 53, 45–53 (1988).

Kopecky Jan, Martin Rossmeisl, Pavel Flachs, Ondrej Kuda, Petr Brauner, Zuzana Jilkova, Barbora Stankova, Eva Tvrzicka and Morten Bryhn, n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function, *Proceeding of the Nutrition Society*, 68, 361–369 (2009).

Labarca Cesar, Kenneth Paigen, A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure, *Analytical Biochemistry*, 102, 344–352 (1980).

Lafontan M. Advances in adipose tissue metabolism, *International Journal of Obesity*, 32, S39–S51 (2008).

Latt Samuel A. , Huntington F. Willard, Park S. Gerald, BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication in human lymphocytes with supernumerary or structurally abnormal X chromosomes, *Chromosoma*, 57, 135–153 (1976).

Lefebvre Philippe, Giulia Chinetti, Jean-Charles Fruchart, and Bart Staels, Sorting out the roles of PPAR in energy metabolism and vascular homeostasis, *J. Clin. Invest.*, 116, 571–580 (2006).

Löffler, G., Hauner, H., Adipose tissue development: the role of precursor cells and adipogenic factors. Part II: The regulation of the adipogenic conversion by hormones and serum factors, *Klin Wochenschr.*, 65, 812–817 (1987).

Lumeng Carey N., Jennifer L. Bodzin, and Alan R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization, *J. Clin. Invest*, 117, 175–184 (2007).

MacDonald Patrick E, Jamie W Joseph and Patrik Rorsman, Glucose-sensing mechanisms in pancreatic b-cells, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360, 2211–2225 (2005).

Medrikova D, ZM Jilkova, K Bardova, P Janovska, M Rossmeisl and J Kopecky, Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control, *International Journal of Obesity*, 36, 262–272 (2012).

Mohamed-Ali V., S. Goodrick, A. Rawesh, D. R. Katz, J. M. Miles, J. S. Yudkin, S. Klein, and S. W. Coppack, Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , in Vivo, *JCE & M*, 82, 4196–4200 (1997).

Moller David E., Potential Role of TNF- $\alpha$  in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes, *TEM*, 11, 212–217 (2000).

Munniyappa Ranganath, Sihoon Lee, Hui Chen, and Michael J. Quon, Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E15–E26 (2008).

Murano I., G. Barbatelli, V. Parisani, C. Latini, G. Muzzinigo, M. Castellucci, and S. Cinti, Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice, *Journal of Lipid Research*, 49, 1562–1568(2008).

Münzberg H., M. Björnholm, S. H. Bates, M. G. Myers Jr, Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 642–652 (2005).

Münzberg Heike, Jeffrey S. Flier, AND Christian Bjorbeck, Region-Specific Leptin Resistance within the Hypothalamus of Diet-Induced Obese Mice, *Endocrinology*, 145, 4880–4889 (2004).

Okazaki, M. Furuno, T. Kasukawa, J. Adachi, H. Bono, S. Kondo, I. Nikaido, N. Osato, R. Saito, H. Suzuki, I. Yamanaka, H. Kiyosawa a další, Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs, *Nature*, 420, 563–573 (2002).

Palladino Michael A., Frances Rena Bahjat, Emmanuel A. Theodorakis and Lyle L.Moldawer, Anti-TNF $\alpha$  therapies: The next generation, *Nature Reviews, Drug Discovery*, 2, 736–746 (2003).

Park HS, Park JY, Yu R, Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- $\alpha$  and IL-6, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 69, 29–35 (2005).

Petersen Kitt Falk, M.D., Sylvie Dufour, Ph.D., Douglas Befroy, Ph.D., Rina Garcia, B.A., and Gerald I. Shulman, M.D., Ph.D., Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes, *N Engl J Med*, 350, 664–71 (2004).

Pilkis SJ, Granner DK, Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis, *Annu Rev Physiol.*, 54, 885–909 (1992).

Polák Jan, MUDr. Eva Klimčáková, Mgr. Michaela Kováčiková, Ing. Michaela Vítková, Ph.D., MUDr. Magda Bajzová, MUDr. Jindřiška Hejnová, doc. MUDr. Vladimír Štich, Ph.D., Endokrinní funkce tukové tkáně v etiopatogenezi inzulínové rezistence, *Interní Med.*, 10, 443–446 (2006).

Randle Philip J.,Regulatory Interactions between Lipids and Carbohydrates: The Glucose Fatty Acid Cycle After 35 Years, *Diabetes Metab. Rev.*, 14, 263–283 (1998)

Ravussin Eric and Steven R. Smith, Increased Fat Intake, Impaired Fat Oxidation, and Failure of Fat Cell Proliferation Result in Ectopic Fat Storage, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes Mellitus, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 967, 363–378 (2002).

Reaven Gerald M., Role of Insulin Resistance in Human Disease, *Diabetes*, 37, 1595–1607 (1988).

Ross Robert, Kimberley D Shaw, John Rissanen, Yves Martel, Jacques de Guise, and Leonard Avruch, Sex differences in lean and adipose tissue distribution by magnetic resonance imaging: anthropometric relationships, *Am J Clin Nutr*, 59, 1277–1285 (1994).

Ruzickova Jana, Martin Rossmeisl, Tomas Prazak, Pavel Flachs, Jana Sponarova, Marek Vecka, Eva Tvrzicka, Morten Bryhn, Jan Kopecky, Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue, *Lipids*, 39, 1177–1185 (2004).

Saltiel Alan R. & C. Ronald Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, 414, 799– 806 (2001).

Sampath, H., Miyazaki, M., Dobrzyn, A. & Ntambi, J.M. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J. Biol. Chem*, 282, 2483-2493 (2007).

Satoh Noriko, Akira Shimatsu, Akihiro Himeno, Yousuke Sasaki, Hajime Yamakage, Kazunori Yamada, Takayoshi Suganami, Yoshihiro Ogawa, Unbalanced M1/M2 Phenotype of Peripheral Blood Monocytes in Obese Diabetic Patients, *Diabetes Care*, 33, e7 (2010).

Satoh Shinobu, Harua Nishimura, Avril E. Clark, Izabela J. Kozkan, Susan J. Vannucci, Ian A. Sirnpson, Michael J. Quonll, Samuel W. Cushman, and Geoffrey D. Holmann, Use of Bismannose Photolabel to Elucidate Insulin-regulated GLUT4 Subcellular Trafficking Kinetics in Rat Adipose Cells, Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action, *The Journal of Biological Chemistry*, 268 , 17820–17829 (1993).

Shek Eugene W, Michael W. Brands, John E. Hall, Chronic Leptin Infusion Increases Arterial Pressure, *American Heart Association*, 31, 409–414 (1998).

Shibata Rei Noriyuki Ouchi, Masahiro Ito, Shinji Kihara, Ichiro Shiojima, David R Pimentel, Masahiro Kumada, Kaori Sato, Stephan Schiekofer, Koji Ohashi, Tohru Funahashi, Wilson S Colucci, and Kenneth Walsh, Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart, *Nat Med.*, 10, 1384–1389 (2004)

Shimabukuro Michio, Kazunori Koyama, Guoxun Chen, May-Yun Wang, Falguni Trieu, Young Lee, Christopher B. Newgard, and RogerH. Unger, Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4637–4641 (1997).

Shimokata H, Tobin JD, Muller DC, Elahi D, Coon PJ, Andres R., Studies in the distribution of body fat: I. Effects of age, sex, and obesity, *International Journal of Obesity*, 13, 455-464 (1989).



Scherer Philipp E., Suzanne Williams, Michael Fogliano, Giulia Baldini, and Harvey F. Lodish, A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 26746–26749 (1995).

Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MK, Schrauwen P, Kooi ME., Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle, *Obesity*, 14, 357–67 (2006).

Smirnova Elena, Elysa B. Goldberg, Kira S. Makarova, Lin Lin, WilliamJ. Brown & Catherine L. Jackson, ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells, *EMBO reports*, 7, 106–113 (2006).

Steel Jennifer H, Roger White and Malcolm G Parker, Role of the RIP140 corepressor in ovulation and adipose biology, *Journal of Endocrinology*, 185, 1–9 (2005).

Steppan Claire M., Shannon T. Bailey, Savitha Bhat, Elizabeth J. Brown, Ronadip R. Banerjee, Christopher M. Wright, Hiralben R. Patel, Rexford S. Ahima & Mitchell A. Lazar, The hormone resistin links obesity to diabetes, *Nature*, 409, 307–312 (2001).

Strissel Katherine J., Zlatina Stancheva, Hideaki Miyoshi, James W. Perfield, II, Jason DeFuria, Zoe Jick, Andrew S. Greenberg, and Martin S. Obin, Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications, *Diabetes*, 56, 2910–2918 (2007).

Tansey J. T., C. Sztalryd, J. Gruia-Gray, D. L. Roush, J. V. Zee, O. Gavrilova, M. L. Reitman, C.-X. Deng, C. Li, A. R. Kimmel, and C. Londos, Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity, *PNAS*, 98, 6494–6499 (2001).

Turer A. T. , P. E. Scherer, Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications, *Diabetologia*, 55, 2319–2326 (2012).

Ukkola Olavi, Resistin – a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander, *European Journal of Endocrinology*, 147, 571–574 (2002).

Vaughan Martha, Jacob E. Berger, and Daniel Steinberg, Hormone-sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue, *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 401–409 (1964).

Vilella Elisabet , Jorge Joven, Mar Fernsindez, Senen Vilad, John D. Brunzell, Thomas Olivecrona, and Gunilla Bengtsson-Olivecrona, Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich Lipoproteins, *Journal of Lipid Research*, 34, 1555–19564 (1993)

Villarroya Francesc, Pere Domingo and Marta Giralt, Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity, *Trend in Pharmacological Sciences*, 26, 88–93 (2005).

Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS, Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis, *J Biol Chem*, 279, 47066–47075 (2004).

Voet, D. and Voetová, J. G. *Biochemie*. Victoria Publishing, 1994.

Wang May-yun, Lelio Orci, Mariella Ravazzola, and Roger H. Unger, Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: Implications for treatment of human obesity, *PNAS*, 102, 18011–18016 (2005).

Weisberg Stuart P., Daniel McCann, Manisha Desai, Michael Rosenbaum, Rudolph L. Leibel, and Anthony W. Ferrante, Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J. Clin. Invest.*, 112, 1796–1808 (2003).

Yahagi Naoya, Hitoshi Shimano, Alyssa H. Hasty, Michiyo Amemiya-Kudo, Hiroaki Okazaki, Yoshiaki Tamura, Yoko Iizuka, Futoshi Shionoiri, Ken Ohashi, Jun-ichi Osuga, Kenji Harada, Takanari Gotoda, Ryoza Nagai, Shun Ishibashi, and Nobuhiro Yamada, A Crucial Role of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 in the Regulation of Lipogenic Gene Expression by Polyunsaturated Fatty Acids, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 50, 35840–35844 (1999).

Yamauchi Toshimasa, Junji Kamon, Yusuke Ito, Atsushi Tsuchida, Takehiko Yokomizo, Shunbun Kita, Takuya Sugiyama, Makoto Miyagishi, Kazuo Hara, Masaki Tsunoda, Koji Murakami, Toshiaki Ohteki, Shoko Uchida, Sato Takekawa, Hironori Waki, Nelson H. Tsuno, Yoichi Shibata, Yasuo Terauchi, Philippe Froguel, Kazuyuki Tobe, Shigeo Koyasu, Kazunari Taira, Toshio Kitamura, Takao Shimizu, Ryoza Nagai & Takashi Kadowaki, Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature*, 423, 762–769 (2003).

Zhang Yiying, Ricardo Proenca, Margherita Maffei, Marisa Barone, Lori Leopold & Jeffrey M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature*, 372, 425–432 (1994).

<http://geekymedics.com/2010/11/11/cholesterol-metabolism/>

[http://www.staff.ncl.ac.uk/n.j.morris/gifs/insulin\\_signalling.jpg](http://www.staff.ncl.ac.uk/n.j.morris/gifs/insulin_signalling.jpg)