

Karlova Univerzita v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Akademie věd České republiky

Fyziologický ústav



Autoreferát dizertační práce

**Zlepšení metabolických komplikací spojených
s obezitou podáváním *n*-3 PUFA a oleuropeinu:
význam tukové tkáně**

Michaela Svobodová

Praha 2015

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR

Autor: Michaela Svobodová

Školitel: RNDr. Pavel Flachs, Ph.D.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

ZKRATKY.....	4
ABSTRAKT.....	5
1 ÚVOD.....	8
1.1 Bílá tuková tkáň, obesita a metabolický syndrom.....	8
1.2. Adiponektin.....	9
1.3 Transkripční faktor PPAR γ	10
1.4 AMP-aktivovaná proteinová kináza.....	10
1.5 Příznivé účinky <i>n</i> -3 PUFA.....	11
1.6 Thiazolidinediony.....	12
1.7 Oleuropein.....	12
1.8 Kalorická restrikce.....	13
<u>2</u> METODY.....	14
<u>3</u> CÍLE	14
4 VÝSLEDKY.....	16
Publikace A.....	16
Publikace B.....	17
Publikace C.....	19
5 DISKUSE.....	20
6 ZÁVĚR.....	25
7 REFERENCE.....	26

Použité zkratky

15d-PGJ ₂	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - prostaglandin J ₂
AA	kyselina arachidonová
AMPK	AMP–aktivovaná proteinová kináza
CHF	dieta s vysokým obsahem kukuřičného oleje
CHF+CR	CHF dieta v kombinaci s 10% kalorickou restrikcí
CHF+F	CHF dieta suplementovaná rybím koncentrátem
CHF+F+CR	CHF+F dieta v kombinaci s 10% kalorickou restrikcí
CHF+F+TZD	CHF+F dieta suplementovaná thiazolidinediony
CHF+TZD	CHF dieta suplementovaná thiazolidinediony
CR	calorie restriction
DHA	kyselina docosaehaenová (22:6 <i>n</i> -3)
EPA	kyselina eicosapentaenová (20:5 <i>n</i> -3)
FA	mastná kyselina
GLUT4	glukózový transportér 4
HMW	vysokomolekulární hmotnost
IL	interleukin
NEFA	volné mastné kyseliny
PGC-1 α	peroxizomální proliferací aktivovaný receptor gamma koaktivátor 1 α
PPAR	peroxizomální proliferací aktivovaný receptor
PUFA	polynenasycená mastná kyselina
SCD-1	stearoyl koenzym A desaturáza-1
SREBP1	protein vážící se na sterol-regulující element 1
TG	triacylglycerol
TZD	thiazolidinediony
WAT	bílá tuková tkáň

Abstrakt

Téměř miliarda a půl dospělých na celém světě trpí nadváhou nebo obezitou (WHO, 2008). Onemocnění spojená s obezitou, jako diabetes 2. typu, dyslipidemie či další nemoci, se při souběžném výskytu alespoň dvou z nich označují za „metabolický syndrom“, vedou velmi často ke kardiovaskulárním chorobám a globálně jsou považovány za jeden z nejpálčivějších zdravotních problémů.

Komplexní etiologie těchto onemocnění zahrnuje jak genetické, tak i environmentální faktory, jež se různým způsobem projevují v nárůstu onemocnění u jednotlivých pacientů. Léčba metabolického syndromu vyžaduje strategie, které kombinují různé farmakologické přístupy s odlišnými účinky. Kromě nich je ovšem třeba změnit i životní styl. Změna životního stylu, podpořená vyšší fyzickou aktivitou, nižším celkovým energetickým příjmem a kladením důrazu na nutriční složení potravy, je přitom sama o sobě nejlepší prevencí metabolického syndromu.

U polynenasycených mastných kyselin (FA) s dlouhým řetězcem řady *n*-3 PUFA z mořských ryb, zejména eikosapentaenové (EPA; 20:5 *n*-3) a dokosahexaenové (DHA ; 22:6 *n*-3) kyseliny, bylo prokázáno, že působí jako přírodní hypolipidemika, brání rozvoji inzulínové rezistence a hrají tak klíčovou roli v patofyziologii metabolického syndromu. Navazující studie prokázaly inverzní vztah mezi citlivostí na inzulín a stupněm nasycení přijímaných lipidů. Studie na imbredních kmenech myší, u kterých byla dieta s vysokým obsahem tuku indukována obezita (C57BL/6J), poskytují důležité poznatky o jejich vlivu na savčí tkáň a umožňují nám testovat potenciální

terapeutické postupy. Dále nám dovolují rozšířit naše studie o možné terapeutické využití kombinací *n-3* PUFA s antidiabetiky používané v klinické praxi.

n-3 PUFA snižují chronický zánět, který vzniká při obezitě v bílé tukové tkáni. Ten se vyznačuje tím, že při něm dochází ke změně sekrece adipokinů, které přispívají k rozvoji inzulínové rezistence. Adipocyty a infiltrující imunitní buňky (především makrofágy) přispívají ke změně sekrečních vlastností bílé tukové tkáně při obezitě, což vede k výrazným změnám ve struktuře buněk a složení tkáně. Protizánětlivé účinky *n-3* PUFA pravděpodobně závisí na tvorbě jejich metabolitů, a to jak v adipocytech tak i makrofázích a jiných imunitních buňkách. Tyto lipidové mediátory, jako jsou prostaglandiny, resolvinu a protektiny, pocházejí buď z cílené enzymatické syntézy, nebo z neenzymatických oxidačních reakcí. Mohou pak působit jako ligandy pro receptory na povrchu buněk, nebo mohou ovlivňovat signální proteiny, včetně transkripčních faktorů PPARy a NF-κB atd.

Syntéza EPA a DHA v lidském těle probíhá velice neefektivně z esenciální α - linolenové kyseliny (ALA, 18:3 *n-3*). Vzhledem k nízké spotřebě mořských ryb, různé odborné společnosti na celém světě doporučují zvýšení příjmu EPA + DHA na 0,5-1,0 gram/den, čehož je možné dosáhnout konzumací dvou jídel tučných mořských ryb týdně, nebo prostřednictvím výživových doplňků (omega 3). Především u pacientů s *Diabetes mellitus* druhého typu se doporučuje zvýšit příjem *n-3* PUFA.

Působení na transkripční faktor PPARy se děje i prostřednictvím anti-diabetických léčiv z rodiny thiazolidinedionu (TZD), které aktivují tento

jaderný receptor a zvyšují tak inzulínovou citlivost zvýšením lipidové absorpce a mitochondriální β -oxidace v bílé tukové tkáni. K aktivaci mitochondriální biogeneze a β -oxidace v bílé tukové tkáni dochází jak působením TZD, tak i působením *n-3* PUFA. Děje se tak přes důležité jaderné transkripční faktory PPAR α / γ a PPAR γ koaktivátory, PGC-1 α a β .

Fytofarmakata ze skupiny polyfenoly, jako například nejznámější resveratrol z vinných hroznů či katechiny ze zeleného čaje, ovlivňují celou řadu biochemických reakcí. Resveratrol má kromě jiných pozitivních účinků na organismus příznivý účinek na celkový obsah tělesného tuku a na ukládání bílé tukové tkáně u myši. Oleuropein, polyfenol extrahovaný z listů nebo plodů olivovníku, je jednou z mnoha složek olivového oleje. Polyfenolům je připisován i příznivý vliv na tukovou tkáň. Je známo, že mají vliv již na diferenciaci tzv. pre-adipocytů do vyvrálých tukových buněk. Důležitým jaderným transkripčním faktorem, který řídí diferenciaci a lipidový metabolismus v adipocytech je PPAR γ .

Podkladem pro tuto disertační práci jsou tři publikované články (označené dále v textu jako A, B a C). Všechny tři práce se věnují problematice bílé tukové tkáně. V těchto pracích jsme ukázali, že bílá tuková tkáň je metabolicky i strukturně flexibilní orgán a *n-3* PUFA, rostlinné polyphenoly, kalorická restrikce a TZD mají významnou úlohu v její biologii.

Tato disertační práce ukazuje, že EPA a DHA hrají důležitou roli v lipidové a glukózové homeostázy. Obohacení potravy o *n-3* PUFA, zvláště pak v kombinaci s antidiabetickými léčivy ze skupiny glitazonů (především pioglitazonem) nebo kalorickou restrikcí, by se mohlo stát

důležitou součástí léčby a prevence onemocnění, která jsou spojená s obezitou.

Obecným cílem našeho výzkumu je napomoci léčbě obezity a souvisejících onemocnění podáváním *n-3* PUFA mastných kyselin mořského původu v kombinaci s dalšími nefarmakologickými přístupy, zejména mírnou kalorickou restrikcí nebo užíváním rostlinných derivátů.

1. Úvod

1.1 Bílá tuková tkáň, obesita a metabolický syndrom

Bílá tuková tkáň (WAT – White Adipose Tissue) je důležitá pro ukládání metabolické energie. Nadměrné hromadění bílého tukové tkáně je základem obezity, což představuje stále větší zdravotní problém. Obezita vede k různým chronickým onemocněním, včetně diabetu typu 2, dyslipidemie, a kardiovaskulárních onemocnění, společně označována jako metabolický syndrom. Inzulínová rezistence je klíčovou poruchou v patogenezi metabolického syndromu, která může být detekována mnoho let před klinickým nástupem onemocnění. Za normálních okolností, je inzulín sekretován z pankreatických β – buněk a působí přes specifické receptory v cílových tkáních, tedy ve svalové a tukové tkáni a v játrech, které regulují metabolické reakce (inzulín zvyšuje syntézu glykogenu, a navozuje lipogenesi), a způsobuje transport transportérů glukózy použitím GLUT- 4 do nitra buňky (hypoglykemický účinek). Mezi sekrecí a působení inzulínu byl

pozorován inverzní vztah, který má hyperbolický průběh. To znamená, že zvýšení sekrece inzulínu je spojeno se snížením citlivosti na inzulín, a naopak.

Hypertrofické tukové buňky zvyšují uvolňování mastných kyselin (FA), následně rostoucí akumulaci lipidů v periferních tkáních (tzv. lipotoxicita). Hypertrofované adipocyty jsou rezistentní inzulínu, což má za následek nižší vychytávání triacylglycerolů (TG) z plazmy a vyšší uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně. Kromě uvolňování mastných kyselin, tuková tkáň produkuje hormony - tzv. adipokiny jako je leptin, adiponektin, tumor nekrotizující faktor α (TNF α), interleukin-6 (IL-6) a visfatin. Tyto hormony modulují citlivost jiných tkání na inzulín a mohou se účastnit v indukci systémové inzulínové rezistence (27). Prostřednictvím sekrece adipokinů se tuková tkáň podílí na regulaci energetické bilance organismu, tělesné teploty, imunitní odpovědi, srážení krve, funkci štítné žlázy a reprodukčních funkcí (5).

1.2 Adiponektin

Adiponektin je protein produkovaný především zralými adipocyty. Hladiny adiponektinu v plazmě a tukové tkáni u obézních jedinců ve srovnání s hubenými jednotlivci jsou sníženy. Adiponektin významně reguluje metabolismus sacharidů a lipidů, zvyšuje oxidaci mastných kyselin ve svalech, snižuje plazmatické hladiny glukózy, triacylglycerolů a volných mastných kyselin.

1.3 Transkripční factor PPAR γ

Klíčovou roli v procesu diferenciacie hrají transkripční faktory PPARs a C / EBP (CCAAT / enhancer-vázající protein) (2). Transkripční faktor PPAR γ je klíčový regulátor diferenciacie adipocytů, což bylo prokázáno *in vitro*, i *in vivo* (17).

PPAR γ ovlivňuje ukládání mastných kyselin v tukové tkáni. S C / EBP transkripčním faktorem je PPAR γ součástí programu diferenciacie adipocytů, který indukuje zrání pre-adipocytů do tukových buněk. Většina PPAR γ cílových genů v tukové tkáni jsou přímo zapojeny do lipogeneze, včetně lipoproteinové lipázy (LPL), adipocytárního proteinu vázajícího mastné kyseliny (A-FABP nebo AP2), acyl-CoA syntázy mastných kyselin a transportního proteinu (FATP) (26). Protein PPAR γ existuje ve dvou izoformách, které jsou kódovány stejného genem s využitím odlišných promotorů. PPAR γ 2 se liší od PPAR γ 1 přítomností úseku aminokyselinových zbytků 30 aminokyselin na N-konci, což vede k vyšší transkripční aktivitě ve srovnání s PPAR γ 1 (23,25). PPAR γ 1 je hojně exprimován v tukové tkáni, tlustém střevě, hematopoetických buněk, a v menší míře v ledvinách, játrech, svalech, pankreatu a tenkém střevě. PPAR γ 2 je za fyziologických podmínek omezen na bílou a hnědou tukovou tkáň (24).

1.4 AMP-aktivovaná proteinová kináza

AMPK je klíčovým regulátorem buněčné a celotělové energetické homeostázy, ovlivňujícím klíčové dráhy energetického metabolismu.

Podílí se na akutní regulaci glukózového i lipidového metabolismu přímou stimulací aktivit enzymů a řídí expresi genů zapojených do energetického metabolismu především v játrech a kosterním svalu, ale také v tukové tkáni (16). Vychytávání glukózy, jakož i oxidace mastných kyselin je stimulována AMPK. Naproti tomu lipogeneze, syntéza cholesterolu a glukoneogeneze jsou inhibovány AMPK. AMPK funguje jako heterotrimerický komplex sestávající z katalytické (α) a regulačních (β a γ) podjednotek. *n-3* PUFA aktivují AMPK a hrají tak důležitou úlohu při regulaci lipidů a metabolismu glukózy (20). Adipokiny, jako adiponektin a leptin jsou také silnými aktivátory AMPK (8).

1.5 Příznivé účinky *n-3* PUFA

Olej z mořských ryb, převážně polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem docosahexaenová kyselina (DHA; 22:6*n-3*), eikosapentaenová kyselina (EPA; 20:5*n-3*) a dokosapentaenová kyselina (DPA, 22:5*n-3*) působí jako přírodní hypolipidemikum a anti-inflamační agens a zlepšují různé faktory metabolického syndromu (5, 6, 13).

Příjem *n-3* PUFA je spojen s řadou buněčných odpovědí, včetně změn v genové expresi a složení mastných kyselin v membránových fosfolipidech, které by mohly ovlivnit syntézu eikosanoidů a propustnost biologických membrán (12). *n-3* PUFA v souvislosti s obezitou a s její související inzulinovou rezistencí, bylo prokázáno několik potenciálních mechanismů:

- a) omezení lipotoxicity ve tkáni citlivé na inzulin
- b) eliminace zánětlivé reakce v obézní tukové tkáni
- c) benefiční změny v sekreci hormonů tukovou tkání hlavně adiponektinu
- d) vznik biologicky aktivních lipidových mediátorů, jmenovitě resolvinů a protektinů
- e) aktivace AMPK

1.6 Thiazolidinediony

Thiazolidinediony (TZDs), nejznámější jsou rosiglitazon a pioglitazon, byly do nedávna mezi preferovanými farmakologickými léčivy používanými pro diabetické pacienty při inzulinové rezistenci.

Dva hlavní intracelulární mechanismy, do kterých jsou TZD zapojeny: (i) přímá vazba TZD na jaderný transkripční faktor PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ), který je důležitý při aktivaci adipocytární diferenciaci v tukové tkáni; (ii) rychlá stimulace AMP-kinázy v játrech, svazech a jiných tkáních (11).

Nicméně v souvislosti s používáním léčiv TZD jsou spojovány i vedlejší účinky a to oedema a přibývání na váze (21), zvýšené riziko srdečního selhání (15) a ubývání kostní hmoty (10).

1.7 Oleuropein

Olivový olej je zdrojem alespoň 30 fenolických sloučenin, zejména extra panenský olivový olej obsahuje značné množství fenolických látek, například hydroxytyrosol a oleuropein.

In vitro oleuropein snižuje expresi PPAR γ , inhibuje adipogenesi a zvyšuje osteoblastogenesi v kmenových buňkách odvozených z kostní dřevě (19). Oleuropein u 3T3-L1 buněk způsobuje inhibici diferenciaci do adipocytů a hromadění lipidů a tím reguluje velikost tukových buněk (4).

1.8 Kalorická restrikce

Kalorická restrikce (CR) je nezbytnou součástí při léčbě obezity a přidružených onemocnění (18).

Kalorické restrikce vzájemně interaguje s AMPK, senzorem energetické homeostázy (viz. 1.4) (22). Kromě toho, kalorická restrikce indukuje mitochondriální biogenezi v různých tkáních (7), s relativně silným účinkem v tukové tkáni (9, 14). Indukce mitochondrií zahrnuje transkripční faktory PPAR α / γ a PPAR γ koaktivátoru, PGC-1 α (7, 14).

2. METODY

Práce se zvířaty a příprava diet

Glukózová homeostáze

Práce s myší buněčnou linií 3T3-L1

Izolace, pěstování primárních pre-adipocytů/adipocytů

Testy na viabilitu tkáňových kultur -Trypan Blue assay a WST-1 assay

Oil red-O barvení

Reporter-gene assay

Izolace RNA

Kvantitativní PCR v reálném čase

Izolace primárních hepatocytů

Pěstování primárních izolovaných hepatocytů

Ex- vivo analýza oxidace mastných kyselin v izolovaných primárních hepatocytech

Statistická analýza

3. CÍLE

Obecným cílem této studie je zlepšit strategii pro léčbu a prevenci obezity pomocí *n*-3 mastných kyselin z mořských ryb v kombinaci s dalšími přírodními přísadami, a to mírné omezení kalorií nebo polyfenolů rostlinného původu. Modelem pro tuto práci nám byly myši k dietou indukované obezitě a *in vitro* buněčná linie 3T3-L1.

Specifické cíle:

1. Zjistit, zda kombinační podání pioglitazonu s *n*-3 PUFA vyvolává aditivní příznivé účinky u myší s dietou indukovanou obezitou a inzulínovou rezistencí. Hlavním cílem experimentu bylo charakterizovat účinky na tělesnou hmotnost, stejně jako metabolickou flexibilitu a glukózovou homeostázu, včetně základních mechanismů a též zapojení adiponektinu - jednoho z hlavních adipokinů.
2. Popsat základní mechanismy účinku v případě kombinovaného podání *n*-3 PUFA s 10% kalorickou restrikcí v prevenci obezity a souvisejících onemocnění u myší s dietou indukovanou obezitou a inzulínovou rezistencí. Zvláštní důraz byl kladen na charakteristiku zapojení bílé tukové tkáně v celotělové reakci na kombinované léčby.
3. Charakterizovat molekulární mechanismus působení oleuropeinu, polyfenolu získaného z olivových listů, na různých modelech *in vitro*.

4. Výsledky - publikace

Publikace A

Unmasking differential effects of rosiglitazone and pioglitazone in the combination treatment with *n*-3 fatty acids in mice fed a high-fat diet. Kus V¹, Flachs P, Kuda O, Bardova K, Janovska P, Svobodova M, Jilkova ZM, Rossmeisl M, Wang-Sattler R, Yu Z, Illig T, Kopecky J.

Mastné kyseliny z mořských ryb, tj dokosahexaenové a kyseliny eikosapentaenové (EPA a DHA – *n*-3 PUFA), působí jako hypolipidemika, ale nevylepšují glykémie u pacientů s diabetem. Thiazolidindiony (TZDs), jako je rosiglitazon a pioglitazon, tj specifické aktivátory PPAR γ zvyšují citlivost celého těla na inzulín. Naše studie ukázaly, že kombinovaná léčba za použití *n*-3 PUFA koncentrátu (DHA / EPA) a rosiglitazonu měla aditivní příznivé účinky na dyslipidemii a poruchu glukózové tolerance (IGT) u obézních myší. Cílem další studie proto bylo blíže studovat působení mechanismu TZDs, a to v kombinaci s rosiglitazonem nebo pioglitazonem.

Samci myší C57BL/6J byly krmeny dietou s vysokým obsahe tuku. Diety: *n*-3 PUFA nahrazovala 15% lipidů z potravy, rosiglitazon (10 mg / kg stravy), nebo pioglitazon (50 mg / kg), nebo kombinace obou *n*-3 PUFA s rosiglitazonem nebo pioglitazonem. Bylo analyzováno tělesná hmotnost, adipozita, metabolické markery a adiponektin v plazmě, akumulace triacylglycerolu v játrech a svalch. Test intraperitoneální tolerance glukózy byl použit pro charakterizaci změny glukózové homeostáze. Metabolická flexibilita byla testována mezi dvěma nutričními stavy – na lačno a tzv.re-fed stavu (opětovném nakrmení).

Naše studie ukázala, že kombinační dieta *n-3* PUFA s TZD působí příznivě a to v prevenci obezity, dyslipidemie a IGT, zatímco dochází ke snížení hromadění triacylglycerolu v játrech a zvýšené produkci adiponektinu. Léčba také zlepšila metabolickou flexibilitu. Jak rosiglitazon tak pioglitazon by mohly být použity v kombinaci s *n-3* PUFA jako doplňkové terapie a neutralizovat dyslipidemii a rezistenci na inzulín. Kombinovaná léčba může snížit požadavky na dávky a tím i výskyt nežádoucích vedlejších účinků léčby thiazolidindionů.

Publikace B

Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and *n-3* fatty acids. *Flachs P, Rühl R, Hensler M,*

Janovska P, Zouhar P, Kus V, Macek Jilkova Z, Papp E, Kuda O, Svobodova M, Rossmesl M, Tsenov G, Mohamed-Ali V, Kopecky J.

Kalorické restriktce (CR) je nezbytnou součástí při léčbě obezity a přidružených onemocnění. Polynenasycené mastné kyseliny s *n-3* dlouhým řetězcem (*n-3* PUFA) působí jako přírodní hypolipidemika, snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění, a mohou být nápomocni při rozvoji obezity a inzulínové rezistence. Naším cílem bylo charakterizovat účinnost a základní mechanismy kombinační léčby s *n-3* PUFA a mírnou CR v prevenci obezity a souvisejících onemocnění u myší.

Samci myšího kmene C57BL / 6J byli krmeni vysokotukovou dietou (CHF) po dobu 2 týdnů a potom byli náhodně rozděleni do skupin, které byly krmeny po dobu 5 týdnů nebo 15 týdnů dietami: (i) CHF (vysokotuková dieta) ad libitum; (ii), CHF +F, kde je nahrazeno 15% lipidů z potravy *n-3* PUFA, ad libitum; (iii) CHF + CR, CHF snížení stravy

o 10% ve srovnání s ad libitum myší krmných CHF; a (iv) cHF + F + CR.

Ve srovnání s cHF dietou, kombinovaná léčba (cHF + F + CR) neefektivněji snížila přírůstek tělesné hmotnosti a to hmotnosti jak epididymálního tak i subkutánního depa bílé tukové tkáně, přičemž ale také došlo ke zlepšení citlivosti na inzulín (index HOMA) a glukózovou toleranci (OGTT). Ektopická akumulace lipidů v játrech a kosterním svalstvu se také výrazně snížila při kombinované léčbě. Infiltrace WAT makrofágy, což ukazuje na chronický tzv. low-grade zánět, byla významně snížena též při kombinované léčbě cHF + F + CR. Právě kombinace CR a *n-3* PUFA aditivně indukuje konverzi *n-3* PUFA na protizánětlivé lipidové mediátory v epididymálním tukovém depu. Například hladiny 15-deoxy-prostaglandinu J2 a neuroprotectin D1 byly zvýšeny 6,6-krát a 35-krát při léčení cHF + F + CR ve srovnání s myší CHF. Kromě toho, genová exprese ukázala, synergickou aktivaci PPAR α / PGC-1 A signálních drah při léčbě cHF + F + CR v epididymálním depu WAT, ale ne v játrech, svalech nebo hnědém tuku. Výše uvedené účinky kombinované léčby jsou v korelaci s rychlostí oxidace palmitátu a mitochondriální respirační kapacity WAT. To znamená, že maximální rychlost oxidace palmitátu měřena v epididymálním depu WAT ex vivo byla 2-krát vyšší u myší na cHF + F + CR dietě ve srovnání s CHF skupinou (60.01 ± 8.04 vs. 24.73 ± 5.67 pmol O₂/s/mg DNA; $p = 0.012$).

Ukázali jsme, že *n-3* PUFA mohou rozšířit protizánětlivé a metabolické účinky CR prostřednictvím indukce mitochondriální biogeneze a oxidace mastných kyselin ve WAT, zatímco indukují tvorbu protizánětlivých lipidových mediátorů. Tato studie odhaluje nový mechanismus účinku kalorické restrikce na modulaci zánětu.

Publikace C

Oleuropein as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Svobodova M, Andreadou I, Skaltsounis AL, Kopecky J, Flachs P.

Oleuropein je hlavní fenolická sloučenina nalezená v olivových listech a olivovém oleji. Vykazuje četné pozitivní účinky a to antioxidantní, protizánětlivé, anti-aterogenní či protirakovinné. Kromě toho, oleuropein potlačuje diferenciaci adipocytů *in vitro*. Naším cílem bylo charakterizovat molekulární mechanismy anti-adipogenních účinků oleuropeinu.

Byly použity 3T3-L1 buněčná linie a myší primární kultury pre - adipocytů z epididymálního a subkutánního tuku. Diferenciační médium přítomné v průběhu první 48 hodin obsahovalo 10% FCS, 2 μ M dexamethason a 100 nM BRL a 5 μ g / ml inzulin, který se přidává pro všechny časy diferenciaci. Po 2 dnech diferenciaci bylo médium nahrazeno DMEM obsahujícím 10% FCS a 5 μ g / ml inzulinu.

Životaschopnost buněk / proliferace byla analyzována pomocí trypanové modři a WST-1 testu, a tukové kapénky byly barveny Oil Red O barvením. Genové exprese byla analyzována qRT-PCR. Genové reportérové assaye pro PPAR α , PPAR δ / β a PPAR (GeneBLazer, Invitrogen, USA) byly použity ke studiu přímých účinků na transkripční aktivitu transkripčních receptorů z rodiny PPAR.

Výsledky: Oleuropein v závislosti na dávce (10-400 μ m) inhibuje diferenciaci adipocytů v obou experimentálních modelech a potlačil genové exprese PPAR γ , C / EBP1 α , SREBP-1C a FAS. PPAR α a PPAR δ / β aktivity nebyly ovlivněny oleuropeinem (10-200 μ m). Naproti tomu,

PPARy transkripční aktivita byla snížena v důsledku účinků oleuropeinu (> 100 μm).

Oleuropein potlačuje jak preadipocytární proliferaci tak diferenciaci adipocytů *in vitro*. Navíc naše údaje naznačují, že oleuropein vykazuje anti-adipogenní účinek prostřednictvím přímé inhibice PPARy aktivity.

5. Diskuse

Naše experimenty na myších dietou indukované obezitě naznačují, že kombinace *n-3* PUFA a TZD může mít příznivé aditivní účinky při léčbě glukózové intolerance a dyslipidemie u pacientů s diabetem. Jak jsme pozorovali u myší, tak pouze rosiglitazon ale ne pioglitazon v kombinaci s *n-3* PUFA zabránil nárůstu tělesného tuku v korelaci s indukci β -oxidace mastných kyselin. Nicméně, dokonce i v nepřítomnosti jakéhokoliv vlivu na tělesné hmotnosti v kombinaci s anti-diabetickými léky, kombinovaná léčba vykazuje silnější účinek pioglitazonu na glukózovou homeostázu, triglyceridémii a jaterní steatózu, v závislosti pravděpodobně na indukci adiponektinu. Dalším významným účinkem kombinací diety obou TZD s *n-3* PUFA je silné snížení celkové hladiny cholesterolu v plazmě.

Dieta CR s *n-3* PUFA rozšiřuje anti-obezitní strategii a současně vylepšuje metabolismus lipidů a glukózovou homeostázu. Tyto účinky se pravděpodobně odrážejí v synergické indukci mitochondriální oxidaci FA ve WAT, spojené s potlačením nízkého stupně zánětu této tkáně. Synergická indukce specifických protizánětlivých lipidových mediátorů, a to 15d-PGJ2 (z *n-6* PUFA metabolite) a PD1 (z *n-3* PUFA

metabolite), mohou být základem jak protizánětlivé, tak metabolické kombinované léčby ve WAT. Další výzkum strategie a přístupu zacílený na bílou tukovou tkáň a kombinaci dvou vzájemně se doplňujících přístupů, tj. dieta s *n-3* PUFA a mírná kalorická restrikce, mohou být důležité pro prevenci a léčbu metabolického syndromu.

Oleuropein potlačuje diferenciaci adipocytů prostřednictvím inhibice genové exprese, tak i proteinovou aktivitu PPAR γ . Jak bylo také nedávno odhaleno v klinické studii (3), doplněk stravy z olivového listí z řad polyfenolů, a to především oleuropein, může být použit jako součást nových terapeutických strategií pro prevenci a léčení obezity a inzulínové rezistence. Ale v kombinaci s anti-diabetickými léky, v důsledku potlačení transkripčního faktoru PPAR γ , není vhodným kandidátem.

Table 1: Summary of effects on growth characteristics and metabolic features of mice

		<i>n-3</i> PUFA + TZDs (vs. cHF diet)	<i>n-3</i> PUFA + CR (vs. cHF diet)
Energy balance	Body weight gain	decreased*	decreased*
	Food intake	no effect	no effect
Glucose homeostasis	GTT (total AUC)	decreased	decreased
	Fasting glucose	decreased	decreased*
	HOMA-index	decreased	decreased*

	Metabolic flexibility (INCA)	improved	improved*
Plasma (random fed)	NEFA	decreased*	no data
	TAG	decreased*	decreased*
	Cholesterol	decreased	no data
	Glucose	no data	no chase
	Adiponectin	increased (PIO)*, increased (ROSI)	increased*
	Leptin	decreased	decreased*
	Insulin	decreased*	Decreased
WAT Subcutaneous WAT	Total mass	decreased*	decreased*
	Adipocytes size	decreased*	decreased
	Insulin sensitivity	increased*	Increased
	Infammation (CLS)**	decreased	decreased
Epididymal WAT	Total mass	decreased	decreased*
	Insulin sensitivity	increased*	increased*
	Adipocytes size	decreased	decreased*
	Infammation (CLS)**	decreased	decreased*
Liver	Weight	decreased (PIO)*, no effect (ROSI)	decreased*
	Insulin sensitivity	increased	increased*
	Tissue lipid content	decreased (PIO)*, no change (ROSI)	decreased*

Muscle (gastrocnemius)	Weight	no effect	no effect
	Insulin sensitivity	increased	increased*
	Tissue lipid content	no effect	decreased ***
	Glycogen content	increased*	no data

* Additive effect of the combination treatment; **Number of CLS per 100 adipocytes; *** after 15 weeks of the treatment; *Abbreviations:* AUC, total area under the curve; cHF, corn oil based high fat diet; CLS, crown like structure; GTT, glucose tolerance test; INCA, indirect calorimetry, N.D. not determined.

Table 2: Gene expression

WAT		<i>n-3</i> PUFA + TZDs (vs. cHF diet)	<i>n-3</i> PUFA + CR (vs. cHF diet)
Subcutaneous WAT	Fatty acid synthesis: SCD1, FAS	no effect	no effect
	Fatty acid oxidation: CPT-1, PPARα	no data	increased*
	Mitochondrial biogenesis: PGC-1α	no data	no effect
	Glyceroneogenesis: PEPCK, PDK4	increase	increase
Epididymal WAT	Fatty acid synthesis: SCD1, FAS	no effect	increased*
	Fatty acid oxidation: CPT-1, PPARα	no effect	no effect

	Mitochondrial biogenesis: PGC-1a	increased	big increased*
	Glyceroneogenesis: PEPCK, PDK4	increased	increased*
Liver	Glucose metabolism: PDK4	no effect	no effect
	Fatty acid sytnetsis: SCD1, FAS	FAS decreased, SCD1 increased	decreased*
	Fatty acid oxidation: CPT-1, PPARα	increased	no effect
	Mitochondrial biogenesis: PGC-1a	decreased*	no effect
Muscle (gastrocnemius)	Glucose metabolism: PDK4	no effect	no effect
	Fatty acid sytnetsis: SCD1	no effect	no effect
	Fatty acid oxidation: CPT-1	increased	no effect

CPT-1, Carnitine palmitoyltransferase I, PDK4, Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4, PEPCK, Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PGC-1 α , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PPAR α , Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, SCD1, Stearoyl-CoA desaturase

6. Závěry

1. Kombinační dieta *n-3* PUFA s rosiglitazonem nebo s pioglitazonem odhalila rozdílné efekty u těchto dvou anti-diabetických léčiv rodiny TZD. Pouze kombinace *n-3* PUFA + rosiglitazone snižovala hmotnostní přírůstek. Obě kombinace vykazovaly aditivní stimulační efekt na sekreci adiponektinu z bílé tukové tkáně a zvyšují glukózovou homeostázy. Pouze kombinační dieta *n-3* PUFA s pioglitazonem eliminovala jaterní steatózu a vykazovala zlepšení inzulínové rezistence u obezních myší.
2. Kombinované působení mírné kalorické restrikce a *n-3* PUFA aktivuje katabolismus lipidů a zlepšuje glukózovou homeostázy. Tyto efekty reflektují synergickou indukci mitochondriální oxidaci mastných kyselin specificky v abdominální bílé tukové tkáni a snížení chronického zánětu organismu.
3. Oleuropein *in vitro* vykazuje anti-adipogenní efekt prostřednictvím inhibice jak genové exprese, tak i aktivity PPAR γ .

7. Reference

1. **Cannon B and Nedergaard J.** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359, 2004.
2. **Cho MC, Lee K, Paik SG, and Yoon DY.** Peroxisome Proliferators-Activated Receptor (PPAR) Modulators and Metabolic Disorders. *PPAR Res* 2008: 679137, 2008.
3. **de Bock M, Derraik JG, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, Hofman PL, and Cutfield WS.** Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS One* 8: e57622, 2013.
4. **Drira R, Chen S, and Sakamoto K.** Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *LIFE Sci* 89: 708-716, 2011.
5. **Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, and Kopecky J.** Cellular and molecular effects of *n*-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci (Lond)* 116: 1-16, 2009.
6. **Flachs P, Rossmeisl M, and Kopecky J.** The effect of *n*-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol Res* 63 Suppl 1: S93-118, 2014.
7. **Flachs P, Rühl R, Hensler M, Janovska P, Zouhar P, Kus V, Macek Jiljkova Z, Papp E, Kuda O, Svobodova M, Rossmeisl M, Tsenov G, Mohamed-Ali V, and Kopecky J.** Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and *n*-3 fatty acids. *Diabetologia* 54: 2626-2638, 2011.

8. **Hardie DG.** AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 4: S7-12, 2008.
9. **Higami Y, Pugh TD, Page GP, Allison DB, Prolla TA, and Weindruch R.** Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J* 18: 415-417, 2004.
10. **Lazarenko OP, Rzonca SO, Hogue WR, Swain FL, Suva LJ, and Lecka-Czernik B.** Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone. *Endocrinology* 148: 2669-2680, 2007.
11. **LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, and Tomas E.** Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E175-181, 2006.
12. **Lombardo YB and Chicco AG.** Effects of dietary polyunsaturated *n*-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem* 17: 1-13, 2006.
13. **Mozaffarian D, Lemaitre RN, King IB, Song X, Huang H, Sacks FM, Rimm EB, Wang M, and Siscovick DS.** Plasma phospholipid long-chain ω -3 fatty acids and total and cause-specific mortality in older adults: a cohort study. *Ann Intern Med* 158: 515-525, 2013.
14. **Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, and Carruba MO.** Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-317, 2005.
15. **Nissen SE and Wolski K.** Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 356: 2457-2471, 2007.

16. **Oakhill JS, Scott JW, and Kemp BE.** Structure and function of AMP-activated protein kinase. *Acta Physiol (Oxf)* 196: 3-14, 2009.
17. **Rosen ED and Spiegelman BM.** Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 145-171, 2000.
18. **Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, Smith SR, Ryan DH, Anton SD, McManus K, Champagne CM, Bishop LM, Laranjo N, Leboff MS, Rood JC, de Jonge L, Greenway FL, Loria CM, Obarzanek E, and Williamson DA.** Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med* 360: 859-873, 2009.
19. **Santiago-Mora R, Casado-Díaz A, De Castro MD, and Quesada-Gómez JM.** Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int* 22: 675-684, 2011.
20. **Suchankova G, Tekle M, Saha AK, Ruderman NB, Clarke SD, and Gettys TW.** Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 851-858, 2005.
21. **Yang X and Smith U.** Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? *Diabetologia* 50: 1127-1139, 2007.
22. **Zhang BB, Zhou G, and Li C.** AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 9: 407-416, 2009.
23. **Zhu, Y., C. Qi, J. R. Korenberg, X. N. Chen, D. Noya, M. S. Rao, and J. K. Reddy,** 1995, Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene:

alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 92, p. 7921-5.

24. **Vidal-Puig, A. J., R. V. Considine, M. Jimenez-Liñan, A. Werman, W. J. Pories, J. F. Caro, and J. S. Flier**, 1997, Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids: J Clin Invest, v. 99, p. 2416-22.
25. **Werman, A., A. Hollenberg, G. Solanes, C. Bjorbaek, A. J. Vidal-Puig, and J. S. Flier**, 1997, Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin: J Biol Chem, v. 272, p. 20230-5.
26. **Memon, R. A., L. H. Tecott, K. Nonogaki, A. Beigneux, A. H. Moser, C. Grunfeld, and K. R. Feingold**, 2000, Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice: Endocrinology, v. 141, p. 4021-31.
27. **Tilg, H., and A. R. Moschen**, 2006, Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity: Nat Rev Immunol, v. 6, p. 772-83.