

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů a člověka



Bc. Karolína Sed'ová

**Utilizace energetických substrátů v bílé a hnědé tukové tkáni při  
metabolickém syndromu**

**Utilization of energetic substrates in white and brown adipose tissue  
during metabolic syndrome**

Vedoucí práce: Ing. Vojtěch Škop, PhD

Institut klinické a experimentální medicíny

Centrum experimentální medicíny

Praha 2017

**Prohlášení:**

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

V Praze, 2. 5. 2017

Podpis

## **Poděkování**

Velmi děkuji svému školiteli, Ing. Vojtěchu Škopovi, PhD., za cenné rady, trpělivost a velkou ochotu po celou dobu práce pod jeho dohledem. Děkuji laboratoři patofyziologie diabetu - Centra experimentální medicíny, paní Ing. Ludmile Kazdové, CSc. A a paní RNDr. Haně Malínské, Ph.D. za vlídné přijetí a možnosti pracovat v laboratoři pod jejich vedením. Dále bych poděkovala Mgr. Davidu Přikrylovi za cenné rady a pomoc při sepisování diplomové práce a potkanům, které jsme pro tento projekt využili.

## 1 Abstrakt

Hnědá tuková tkáň je unikátní termoregulační orgán, její funkcí je přeměňovat energii ve formě protonového gradientu na energii tepelnou a zároveň snižovat efektivitu metabolismu. Její funkce se zdá být nadějí v léčbě metabolického syndromu a komplikací s ním spojených. Efekt hnědé tukové tkáně v léčbě MS však stále není objasněn a proto jsme chirurgicky odstranili tuto tkáň u potkanů, kteří trpí metabolickým syndromem, abychom objasnili důsledky extirpace na parametry metabolického syndromu.

V této práci jsme sledovali aktivitu interskapulární tukové tkáně na parametry metabolického syndromu. Srovnávali jsme parametry mezi kmeny HHTg potkanů a kontrolním kmenem potkanů Wistar a pozorovali jsme nižší hmotnost potkanů kmene HHTg přes projevy ostatních parametrů metabolického syndromu, jako je dyslipidémie, inzulinová rezistence tukové tkáně, vyšší hodnoty NEMK v krvi. Zjistili jsme, že tito potkani mají významně vyšší aktivitu iBAT, jak v inkorporaci palmitátu do lipidů, tak ve spalování lipidů ve formě  $\text{CO}_2$  a zejména v nižším věku. Tato zjištění nás vedla k hypotéze, že iBAT by mohla mít zásadní vliv na parametry MS u neobézních potkanů.

Extirpací iBAT u mladých potkanů, ani u potkanů v pokročilejším věku však neměla zásadní vliv na metabolismus ani na hmotnost. Dokonce došlo ke zlepšení některých parametrů, např. snížení koncentrace rezistinu v krvi.

Příčina toho, že u potkanů kmene HHTg nedochází k obezitě proto stále není objasněna. Je možné, že došlo ke kompenzacím v rámci zvýšení aktivity ostatních depotů hnědé tukové tkáně.

## **Abstract**

Brown adipose tissue is a unique thermoregulatory organ, its function is to convert energy in the form of a proton gradient to thermal energy while reducing the metabolic efficiency. Its function seems to be a hope in the treatment of metabolic syndrome and complications associated with it. However, the effect of brown adipose tissue in MS treatment is still unclear and therefore we have surgically removed this tissue in rats suffering from metabolic syndrome to clarify the effects of extirpation on metabolic syndrome parameters.

In this work, we monitored the activity of interscapular brown adipose tissue on parameters of metabolic syndrome. We compared the parameters between the strains of HHTg rats and the control strain of Wistar rats and we observed a lower weight of HHTg rats over the other metabolic syndrome parameters such as dyslipidemia, insulin resistance of adipose tissue, higher NEMK values in the blood. We have found that these rats have significantly higher iBAT activity, both in the incorporation of palmitate into lipids and in the burning of lipids in the form of CO<sub>2</sub> and especially at lower age. These findings led us to the hypothesis that iBAT could have a major effect on MS parameters in non-obese rats.

However, iBAT extirpation in young rats, or in rats at an advanced age, did not have a major effect on metabolism or on weight. There has even been some improvement in some parameters, such as a decrease in blood resistin levels.

The cause of obesity in rats of the HHTg strain is therefore still unclear. It is possible that there was compensation for increasing the activity of other deposits of brown adipose tissue.

**Klíčová slova**

Obezita, hnědá tuková tkáň, triacylyceroly, metabolický syndrom, inzulinová rezistence, diabetes mellitus, extirpace

## 2 Obsah

1	Abstrakt.....	4
	Abstract.....	5
	Klíčová slova.....	6
2	Obsah.....	7
3	Seznam zkratk.....	9
4	Úvod.....	11
5	Teoretická část.....	12
5.1	Metabolické dysfunkce.....	12
5.1.1	Metabolický syndrom.....	12
5.1.2	Obezita.....	13
5.1.3	Diabetes mellitus II. typu.....	14
5.2	Tkáňový metabolismus.....	16
5.2.1	Kosterní sval.....	16
5.2.2	Játra.....	16
5.3	Tuková tkáň.....	19
5.3.1	Metabolismus tukové tkáně.....	19
5.3.2	Sekreční funkce tukové tkáně.....	20
5.3.3	Patofyziologický stav tukové tkáně.....	23
5.3.4	Typy tukové tkáně.....	24
5.3.5	Anatomické umístění tukové tkáně.....	27
5.4	Hnědá tuková tkáň.....	30
5.4.1	Mechanismus termogeneze.....	30
5.4.2	Aktivita odpráhuujícího proteinu.....	31
5.4.3	Hnědá tuková tkáň u člověka.....	33
5.4.4	Věk a hnědá tuková tkáň.....	34
5.4.5	Ablace hnědé tukové tkáně a její důsledky.....	34
6	Experimentální část.....	36
6.1	Cíle diplomové práce.....	36
6.1.1	Vliv extirpace interskapulární hnědé tukové tkáně u hereditárně hypertriacylglycerolemických potkanů.....	36
6.1.2	Vliv extirpace interskapulární hnědé tukové tkáně v závislosti na věku.....	36
6.1.3	Rozdíly metabolických důsledků extirpace interskapulární hnědé tukové tkáně mezi kmeny.....	36

6.2	Metody.....	37
6.2.1	Potkani.....	37
6.2.2	Operace.....	39
6.2.3	Orální lipidový toleranční test.....	40
6.2.4	Měření koncentrace sérových biochemických parametrů .....	41
6.2.5	Inkorporace palmitátu v hnědé tukové tkáni do lipidů nebo do CO2 .....	50
6.2.6	Lipolýza v tukové tkáni.....	51
6.2.7	Obsah bílkovin v tukové tkáni .....	52
6.2.8	Koncentrace adipokinů v séru .....	53
6.2.9	Vyhodnocení výsledků .....	54
7	Výsledky .....	55
7.1	Aktivita hnědé tukové tkáně na parametry metabolického syndromu u kmene HHTg a Wistar v závislosti na věku.....	55
7.1.1	Vliv kmene a věku na hmotnost.....	55
7.1.2	Sérové biochemické parametry .....	57
7.1.3	Ektopické ukládání tuku .....	58
7.1.4	Inkorporace glukózy v bránici.....	60
7.1.5	Inkorporace glukózy do lipidů v epididymální tukové tkáni.....	62
7.1.6	Obsah bílkovin v hnědé tukové tkáni.....	63
7.1.7	Vliv extirpace iBAT na parametry metabolického syndromu .....	64
7.1.8	Vliv extirpace iBAT na tělesnou hmotnost a relativní hmotnost orgánů.....	64
7.1.9	Orální lipidový toleranční test.....	65
7.1.10	Vliv extirpace iBAT na sérové biochemické parametry .....	66
7.1.11	Koncentrace adipokinů v séru.....	67
7.1.12	Vliv extirpace iBAT na ektopické ukládání tuku .....	69
7.1.13	Obsah bílkovin ve vybraných ložiscích tukové tkáně .....	70
7.1.14	Lipogeneze v epididymální tukové tkáni .....	71
7.1.15	Lipolýza v epididymální tukové tkáni .....	73
7.1.16	Vliv extirpace iBAT na inkorporaci glukózy ve svalu (bránici).....	76
8	Diskuze .....	78
9	Závěr .....	82
10	Reference .....	83



### 3 Seznam zkratek

$\alpha$ MSH	$\alpha$ -melanocyty stimulující hormon
AgRP	agouti příbuzný peptid
AHA/NHLBI	Americká asociace pro srdce / Národní ústav pro srdce, plíce a krev
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP aktivovaná protein kináza
Apo	apolipoprotein
BgAT	běžová tuková tkáň
BMI	index tělesné hmotnosti
BMP7	kostní morfologický protein 7
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CEPT	cholesterol ester tranferní protein
CRP	C reaktivní protein
DIO	dietou indukovaná obezita
DM	diabetes mellitus
G3P	glycerol-3-fosfát
GLUT	glukózový transportér
HLD	lipoprotein o vysoké hustotě
HSL	hormon senzitivní lipáza
ICAM	nitrobuněčná adhezivní molekula
IDF	mezinárodní diabetická federace
IDL	lipoprotein o střední hustotě
IL	interleukin
IR	inzulinová rezistence
IRS	substrát inzulínového receptoru
JAK	Janusovy kinázy
LCAT	lecitin cholesterol acyl-transferáza
LDL	lipoprotein o nízké hustotě

LERP	receptor pro leptin
LPL	lipoproteinová lipáza
MGL	monoacylglycerol lipáza
MS	metabolický syndrom
Myf5	myogenní faktor 5
NEMK (=FFAs)	neesterifikované mastné kyseliny (volné mastné kyseliny)
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
NPY	neuropeptid Y
PET/CT	pozitronová emisní tomografie / počítačová tomografie
PGC-1 $\alpha$	gamma koaktivátor-1 $\alpha$ aktivovaný proliferátory peroxisomů
PK	proteinkináza
POMC	propiomelanokortinové buňky
PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxisomů
PRDM16	transkripční regulátor zajišťující diferenciaci hnědého adipocytu 16
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
ROS	reaktivní kyslíkové částice
SNS	sympatický nervový systém
STAT	převodník signálu a aktivátor transkripce
T2DM	diabetes mellitus 2. typu
TAG	triacylglyceroly
TNF	tumor nekrotizující faktor
UCP	odpřahující protein
VCAM	adhezivní molekula buněk cévního endotelu
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě
WAT	bílá tuková tkáň
WHO	světová zdravotnická organizace

## 4 Úvod

V posledních desetiletích, se prevalence obezity v některých zemích extrémně zvýšila, zejména v USA a Velké Británii (Kopelman, 2000). Obezita je jedním z hlavních faktorů, které přispívají k rozvoji inzulínové rezistence, zejména výskyt břišní (viscerální) obezity (Björntorp, 1991; Kuryszko et al., 2016). Dříve se předpokládalo, že tuková tkáň je inertní a plní funkci pouze energetických rezerv a tepelného izolátoru. Nejen že tato tkáň dokáže expandovat v rámci akumulace triacylglycerů, ale je to dynamicky metabolicky aktivní endokrinní orgán, který produkuje mnoho hormonů a tukových cytokinů – adipokinů a má významnou imunitní funkci (Coelho et al., 2013).

Kromě bílé tukové tkáně, která má při obezitě negativní vliv na metabolismus (zejména pak viscerální tuková tkáň) byla u člověka detekována i hnědá tuková tkáň (BAT) a to nejen u novorozenců, jak se předpokládalo dříve, ale i u dospělého člověka lze nalézt aktivní ložiska této tkáně. BAT je unikátní termoregulační orgán vyskytující se pouze u savců, její funkcí je přeměňovat přijatou energii na produkci tepla a zároveň snižovat efektivitu metabolismu, díky spalování MK. Schopnost BAT spalovat tuk by mohla být využita v léčbě problému obezity a diabetu mellitu 2. typu (Roman et al., 2015).

Významnost této tkáně lze ověřit nejlépe jejím vyjmutím. To je však obtížné, jelikož BAT se rozkládá ve více oblastech těla a v poměrně malých ložiscích. Přesto, interskapulární část představuje největší ložisko BAT u potkana a dalších malých savců, a proto vyjmutím této části dosáhneme významné ablace. Otázkou je, zda nedojde k určitým kompenzacím, jako například opětovný nárůst vyjmuté tkáně (Cannon and Nedergaard, 2004), nárůst jiných ložisek BAT, či zvýšení exprese UCP1 v bílé tukové tkáni a hnědnutí. Rozhodli jsme se proto ověřit významnost, která je této tkáni přisuzována a posoudit vliv ablace interskapulární hnědé tukové tkáně na parametry metabolického syndromu.

## 5 Teoretická část

### 5.1 Metabolické dysfunkce

V této kapitole jsou popsány hlavní metabolické poruchy postihující energetický metabolismus, zejména lipidový a sacharidový.

#### 5.1.1 Metabolický syndrom

Pojem „metabolický syndrom“ byl zaveden roku 1988 profesorem Reavenem (Lam and LeRoith, 2000), jedná se o komplex poruch, které se vzájemně podněcují a souvisí s poruchou glukózového metabolismu. MS zvyšuje riziko vzniku aterosklerózy (Kim et al., 2017).

Celkově je k metabolickému syndromu přiřazováno více než padesát příznaků, přestože původně bylo Reavenem popsáno šest. Jedná se zejména o společný výskyt obezity, hypertenze, dyslipidémie a poruchy glukózového metabolismu (Alberti et al., 2009). Výčet některých z nich je uveden v tabulce 1.

Tab. 1: vybrané složky MS

porucha rekreace inzulinu	adhezivní molekuly
hypertenze	proinzulin
hyperglykemie	vyšší homocystein
hypertriacylglycerolemie	vyšší TNF $\alpha$
vysoké LDL	vyšší fibrinogen
nízké HDL	vyšší endotelin
fetální malnutrice	vyšší feritin
břišní obezita	relativně nižší leptin
systémový zánět	ateroskleróza
oxidativní stres	neuropatie
výskyt schizofrenie	výskyt depresí

V posledních dvaceti letech bylo vytvořeno několik definic MS, všechny byly založené na přítomnosti inzulinové rezistence. V roce 2009 došlo k harmonizaci dosavadních definic MS. Aktuální definice podle Diabetes Federation (IDF) a American Heart

Association/National Heart, Lung, and Blood Institute (AHA/NHLBI) zahrnuje pět kritérií, přičemž přítomnost tří z nich svědčí pro diagnózu MS (Alberti et al., 2009). Obvod pasu je hodnocen specificky dle příslušnosti k etnické skupině. Kritéria jsou uvedena v tabulce 2.

Tab. 2 Kritéria metabolického syndromu

abdominální obezita, kdy hodnoty obvodu pasu musí překročit hranici 102 cm u mužů a 88 cm u žen (hranice je odlišná pro některá etnika)
triacylglyceroly (TAG) $\geq 1,7 \text{ mmol.l}^{-1}$ nebo hypolipidemická léčba
hypertenze (TK) $\geq 130/\geq 85 \text{ mmHg}$ nebo antihypertenzní léčba
HDL cholesterol (HDL-C) $< 1,3 \text{ mmol.l}^{-1}$ u žen a $< 1,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ u mužů
glykémie na lačno $\geq 5,6 \text{ mmol.l}^{-1}$ nebo T2DM

### 5.1.2 Obezita

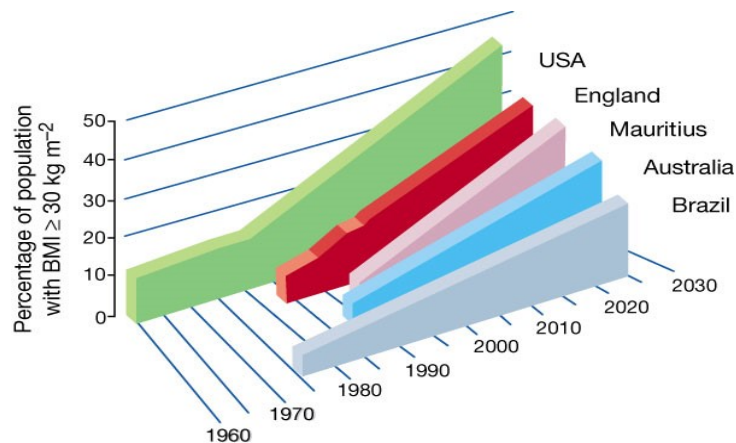
Obezita je definovaná jako nadměrné ukládání tuku vzhledem k ostatním tkáním, není tedy definována pouhou tělesnou hmotností, ale relativním množstvím tukové tkáně vzhledem k ostatním tkáním v těle. Obezita je multifaktoriální onemocnění, které zapříčiňují zejména genetické, environmentální a psychologické faktory, které ovlivňují příjem i výdej energie. Obezita je důsledkem právě dysbalance mezi příjmem a výdejem energie (Kopelman, 2000).

Diagnostika obezity je dle Světové zdravotnické organizace (WHO) definovaná indexem tělesné hmotnosti (BMI) vyšším než 30, dále se v klinické praxi obezita určuje obvodem pasu a poměrem pasu a boků, sílou kožní řasy a bioimpedancí (Kopelman, 2000). Bioimpedanci metoda je založena na slabém elektrickém proudění které prochází tělem, jelikož proud prochází snadněji tekutinou než tukem, přístroj dokáže určit procento tuku v těle, vody a další parametry. K této metodě jsou zapotřebí speciální přístroje s elektrodami (Kyle et al., 2004).

Obezita je jedním z hlavních faktorů, které přispívají k rozvoji IR, zejména výskyt břišní (viscerální) obezity. Právě viscerální typ obezity (androidní typ) je na rozdíl od gynoidního typu spojen s negativním vlivem na citlivost k inzulinu a s dalšími složkami

MS, jelikož je viscerální tuková tkáň metabolicky aktivní (Björntorp, 1991; Kuryszko et al., 2016).

V posledních desetiletích, se prevalence obezity v některých zemích extrémně zvýšila, zejména v USA a Velké Británii (obr. 1) (Kopelman, 2000).



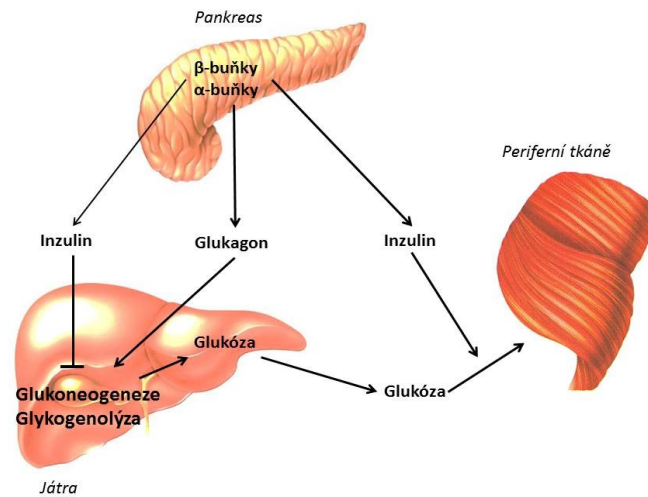
**Obr. 1:** Časový průběh prevalence obezity ve vybraných státech  
Prevalence obezity od roku 1960 do roku 2030. Dle předpokladů bude mít nejvyšší procento obezity v populaci USA, s menším odstupem další země v čele s Velkou Británií.

### 5.1.3 Diabetes mellitus II. typu

Diabetes mellitus II. typu (T2DM) je heterogenní metabolická porucha charakterizovaná hyperglykemií, způsobenou rezistencí tkání k inzulinu a neadekvátní kompenzační sekrecí inzulinu (Ovalle and Azziz, 2002). Kromě hyperglykemie T2DM provází i hyperinzulinémie. Bylo prokázáno, že inzulinovou rezistenci zahrnuje modifikace substrátu inzulinového receptoru (IRS), který zprostředkovává přenos signálu. IRS interaguje s regulační podjednotkou fosfatidylinositol kinázy, která reguluje protein-kinázu B (PKB) a protein-kinázu C (PKC). PKB a PKC regulují translokaci glukózových transportérů GLUT 4 z cytoplazmy do membrány (Fang et al., 2016). Při inzulinové rezistenci je translokace GLUT 4 redukována.

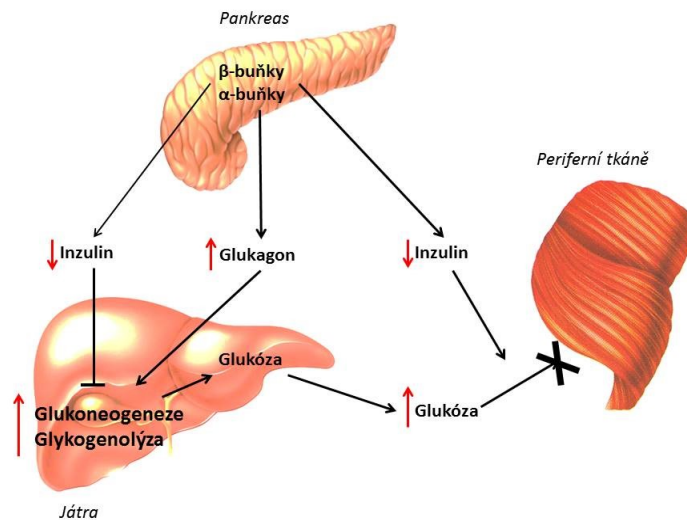
Inzulin u zdravých jedinců inhibuje glukoneogenezi a glykogenolýzu a aktivuje glykogenosyntézu (Obr. 2). U jedinců s T2DM však díky relativnímu deficitu inzulinu působí glukagon, který má antagonistický efekt. Stimuluje glukoneogenezi a glykogenolýzu, čímž zvyšuje glykémii (Obr. 3).

Problémem T2DM je zvýšená hladina NEMK v cirkulaci. Relativní nadbytek glukagonu zvyšuje v adipocytech lipolytické štěpení triacylglycerolů (TAG) na glycerol a mastné kyseliny (MK) a ty jsou cirkulací transportovány do jater (Musil J., 1994). Zvýšené množství mastných kyselin (MK) v důsledku zhoršené oxidace MK může navíc interferovat s inzulínovou signalizací (Fang et al., 2016).



**Obr.2:** Účinek inzulínu za fyziologických podmínek

Po jídle pankreatické β buňky uvolní inzulín, který v játrech inhibuje glukoneogenezi a glykogenolýzu. Naopak podněcuje syntézu glykogenu. V periferních tkáních inzulín zvyšuje příjem glukózy do buněk. Při půstu, glukagon sekretovaný α buňkami, podněcuje glukoneogenezi a glykogenolýzu. Tím zvyšuje sníženou hladinu glukózy v krvi. Ilustrace orgánů převzaty z media.gettyimages.com, kearneywellness.org, skolajecna.cz



**Obr.3:** Účinek inzulínu při diabetu

Při diabetu je účinek inzulínu snížen, díky jeho relativnímu nedostatku. To zvyšuje účinek glukagonu a ten podněcuje glykogenolýzu a glukoneogenezi v játrech. Snižuje příjem glukózy v periferních tkáních a zvyšuje glykemii.

ilustrace orgánů převzaty z media.gettyimages.com, kearneywellness.org, skolajecna.cz

## **5.2 Tkáňový metabolismus**

V této kapitole je popsána svalová, jaterní a tuková tkáň, jejich funkce a integrace v glukózovém a lipidovém metabolismu ve fyziologickém i patofyziologickém stavu.

### **5.2.1 Kosterní sval**

Svalová tkáň obsahuje lipidy a zároveň je největším rezervoárem glykogenu v těle. Glykogen je přeměňován na glukóza-6-fosfát, který je anaerobně odbouráván na laktát a ten přechází krví do jater.

Pro sval je glukóza energetickým zdrojem v klidu anebo při krátkodobém výkonu. MK jsou energetickým zdrojem po několikahodinovém hladovění anebo při dlouhodobé svalové námaze. Pokud se však jedná o námahu s nízkou intenzitou, MK jsou zdrojem energie po celou dobu. Toto "přepínání" zajišťuje AMP aktivovaná protein kináza (AMPK) (Klaus et al., 2012; Zhang et al., 1994).

Pokud poklesne hladina inzulínu v krvi, poklesne i transport glukózy do svalových buněk, přes inzulín-dependentní přenašeč GLUT4. Dojde k mobilizaci MK a jejich transport do svalu, kde probíhá jejich oxidace. Po jídle inzulín stimuluje využití glukózy glykogenezi.

### **Změny v metabolismu při metabolickém syndromu**

Při diabetu a IR se z tukové tkáně vyplavují NEMK a ty inhibují vstup glukózy do svalových buněk a v jaterních buňkách stimuluje glukoneogenezi. Sníží se oxidace MK ve svalu, což může být jednou z příčin vzniku obezity. Svalové buňky přednostně využívají glukózu a MK ukládají ve formě triacylglycerolů (Hainer V., et al., 2004).

Inzulínová rezistence má za následek nejen poruchu metabolismu lipidů a sacharidů, ale negativně postihuje i metabolismus bílkovin. Dochází ke snížení rychlosti proteosyntézy, jelikož inzulín ještě spolu s fyzickou aktivitou a aminokyselinami jsou hlavní faktory stimulační syntézu bílkovin (Svačina Š., et al., 2010). Snížení proteosyntézy vede k úbytku svalové tkáně a její postupnou náhradou za tukovou tkáň a snížení fyzické výkonnosti.

### **5.2.2 Játra**

Játra jsou hlavním metabolickým orgánem, kromě mnoha jiných funkcí jsou především regulátorem sacharidového a lipidového metabolismu. Produkují glukózu, metabolizují laktát tvořený ve svalech, syntetizují a odbourávají triacylglyceroly, cholesterol a lipoproteiny.



## Postprandiální stav

Vstup glukózy do hepatocytů je volný, nezávislý na inzulínu. Glukóza je zabudována do glykogenu, anebo přeměňována na acetyl-CoA, který je nezbytný pro syntézu mastných kyselin, nebo cholesterolu. Acetyl-CoA je centrální molekulou v sacharidovém i lipidovém metabolismu. Vzniká převážně dekarboxilací pyruvátu při utilizaci glukózy a  $\beta$ -oxidací mastných kyselin.

Po vstřebání tuku ve střevě jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem skrze portální žílu transportovány přímo do jater. Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem játra přijímají z chylomikronů nebo z komplexů mastné kyseliny vázané na albumin. Chylomikrony jsou skládány v enterocytech v procesu vstřebávání tuků (Koolman J., Roehm K. H. 2005).

Chylomikrony obsahují apolipoprotein B (ApoB), význam chylomikronů spočívá v dodávce MK z potravy adipocytům a svalovým buňkám. Chylomikrony nejsou standardně přítomny v krevní plazmě po dvanácti hodinách lačnění. Jsou ihned hydrolyzovány při vstupu do krevního kapilárního řečiště působením endotelové lipoproteinové lipasy (LPL) za vzniku chylomikronových zbytků (remnants). Chylomikronové zbytky obsahující ApoB jsou vychytávány svými receptory v játrech.

V játrech probíhá syntéza lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL), jejich syntéza je vyšší u obézních jedinců a je inhibována vychytáváním chylomikronových zbytků. VLDL putují do periferních tkání, především pak do tukové tkáně. Působením lipoproteinové lipázy (LPL) umístěné na membráně endotelových kapilár se za účasti apoC-II jako kofaktoru, hydrolyzují triacylglyceroly nesené částicemi VLDL, aby byly k dispozici v příslušných buňkách jako zdroj energie nebo pro uložení ve formě zásobních triacylglycerolů.

Apolipoproteiny ApoE a ApoC jsou přenášeny na lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL), ApoB zůstává na VLDL zbytcích a hydrolýzou vzniká z VLDL lipoprotein o nízké hustotě (LDL).

LDL je hlavním přenašečem cholesterolu v krvi, obsahuje ApoB. Největší část LDL pochází z transformace VLDL, ale některé jsou syntetizovány přímo. Buňky, které vyžadují cholesterol, vážou LDL specifickým receptorem a částici LDL endocytují pomocí clathrinu. Volný cholesterol v buňce inhibuje klíčový enzym pro syntézu cholesterolu v buňce *de novo* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktáza). Část LDL, která není

využita buňkami se metabolizuje v játrech a uvolněný cholesterol je vyloučen žlučí, nebo je recyklován pro tvorbu dalších lipoproteinů.

HDL je syntetizován v hepatocytech a enterocytech. Do krve se dostává ve formě prekursoru tzv. nascentního HDL, které jsou tvořeny dvojvrstvou fosfolipidů a Apo A I, Apo A II, Apo C a Apo E a mají diskoidní tvar. Tyto nascentní HDL jsou akceptory neesterifikovaného cholesterolu, který pochází z buněčných membrán různých tkání nebo z povrchových struktur jiných krevních lipoproteinů. Na povrchu HDL je cholesterol esterifikován působením enzymu lecitin cholesterol-acyltransferázy (LCAT). Akumulací cholesterolu mění HDL svůj diskoidní tvar na sférický. HDL interagují s lipoproteiny bohatými na TAG, mají specifický enzym, cholesterol ester transferní protein (CEPT). Tento enzym se účastní výměny cholesterol-esterů za TAG z HDL na VLDL (nebo chylomikrony) a tímto způsobem částice přechází na remnantní. V játrech jsou HDL obohaceny o TAG hydrolyzovány pomocí jaterní triacylglycerolové lipázy (ATGL) (Koolman J., Roehm K. H. 2005; Průša J. et al. 2004; Gaudet et al., 2017).

### **Stav hladovění**

Při hladovění, glukagon v játrech stimuluje uvolňování glukózy do krve. Glukóza je uvolňovaná prostřednictvím glykogenolýzy, po delší době pomocí glukoneogeneze. Glukoneogeneze využívá k tvorbě glukózy meziprodukty ze svalové tkáně (laktát, aminokyseliny) a tukové tkáně (glycerol), dochází k uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně a jejich oxidaci. Pokud hladovění trvá déle, vyčerpá se zásoba oxalacetátu a tím se zastaví syntéza glukózy. Oxidace mastných kyselin však přetrvává a nadbytečný acetyl-CoA je přeměňován na ketolátky, jako např. acetoacetát nebo aceton. Ketolátky jsou pak energetickým substrátem pro mozek a svaly.

### **Stav při obezitě**

Problémem obezity je zejména přítomnost viscerální tukové tkáně. Viscerální tuk je s játry spojen portální žílou. Supresivní efekt inzulínu na HSL, která uvolňuje MK z viscerální tukové tkáně je při IR zhoršen, což způsobuje zvýšené uvolňování MK z viscerální tukové tkáně portální žílou přímo do jater, kde dochází k akumulaci TAG a zvýší se vyplavování VLDL (Milić et al., 2014).

Glukóza absorbovaná ze střeva je do jater také transportována portální žílou. V hepatocytech TAG snižují inzulínem indukovaný příjem glukózy (Milić et al., 2014), glukóza je přeměňována pouze na fruktóza-6-fosfát, který může být přeměňován na

hexoaminy (Cooksey and McClain, 2011). Hexoaminy snižují glykogenolýzu a stimulují lipogenezi (Hainer V., et al., 2004). Vzniká negativně synergický efekt volných mastných kyselin a glukózy v rozvoji T2DM (Cooksey and McClain, 2011). Kvůli relativnímu nedostatku glukózy v buňkách je také aktivovaná glukoneogeneze.

Kromě mastných kyselin se z tukové tkáně vyplavuje též leptin, který játra chrání před přílišnou akumulací triacylglycerolů (Unger et al., 1999). Leptin suprimuje aktivitu enzymu stearyl-CoA desaturázy, která reguluje syntézu mononenasycených MK. Leptin také nepřímo aktivuje Kupfferovy buňky, čímž indukuje zánět (Milić et al., 2014).

Leptin suprimuje glykogenolýzu, u zdravých jedinců leptin aktivuje glukoneogenezi, ale u obézních jedinců glukoneogenezi naopak snižuje, čímž zabraňuje nadměrné produkci glukózy. Snižování glukoneogeneze je dosaženo potlačením exprese genu pro glukóza-6-fosfatázu a fosfoenolpyruvát-karboxykinázu (Pocai et al., 2005).

### **5.3 Tuková tkáň**

Dříve se předpokládalo, že tuková tkáň je inertní a plní funkci pouze energetických rezerv a tepelného izolátoru. Nejen že tato tkáň díky hypertrofii a hyperplázii dokáže expandovat v rámci akumulace triacylglycerolů, ale je to dynamicky metabolicky aktivní endokrinní orgán, který produkuje mnoho hormonů a tukových cytokinů – adipokinů (Coelho et al., 2013).

Tukové buňky, adipocyty jsou ukotveny v síti kolagenových vláken. Kromě adipocytů jsou ve tkáni přítomné cévy a v jejich blízkosti stromavaskulární buňky, fibroblasty, leukocyty, makrofágy, preadipocyty a další. Makrofágové se spolu s adipocyty podílejí na sekreční funkci nejvyšší mírou.

V závislosti na lokalitě po těle se tuková tkáň různí fenotypem, kapacitou, aktivitou imunitních buněk nebo sekreční funkcí (Coelho et al., 2013).

#### **5.3.1 Metabolismus tukové tkáně**

Tuková tkáň je mezenchymálního původu a tukové buňky (adipocyty) se diferencují z pre-adipocytů v závislosti na pohlaví, věku a vnějších podmínkách. Akumulace tukových buněk je determinována rovnováhou mezi lipogenezí a lipolýzou (Kersten, 2001). Metabolické vlastnosti tukové tkáně se liší zejména v závislosti na převažujícím typu adipocytu, které se jsou určeny podle typu tukové tkáně (bílá, béžová, hnědá). Tyto tkáně se navíc různí v anatomickém uložení v těle.

Lipogeneze zahrnuje proces syntézy mastných kyselin a následné syntézy triacylglycerolů, což probíhá v tukové tkáni i v játrech. V tukové tkáni je lipogeneze stimulována vysokosacharidovou dietou vedoucí k vysokým postprandiálním hodnotám triacylglycerolů v krvi a je inhibována polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA) a hladověním (Bartelt et al., 2011; Jump et al., 1994; Kersten, 2001). Hlavním regulátorem ukládání tuku je lipoproteinová lipáza (LPL), která hydrolyzuje TAG vázané na VLDL v krvi a tak inicijuje vstup MK do tukové tkáně. V adipocitu jsou MK esterifikovány s glycerol-3-fosfátem (G3P) na TAG (Hainer V 2004).

S hladověním a popř. přejídáním souvisí také hormony, které se částečně podílejí na stimulaci (inzulin) nebo inhibici (leptin) lipogeneze. Glukóza je substrátem pro lipogenezi, napomáhá skrze stimulaci uvolňování inzulinu a inhibuje uvolňování glukagonu z pankreatu (Kersten, 2001).

Lipolýza zahrnuje hydrolyzu triacylglycerolů v tukové tkáni. Během půstu nebo delšího fyzického výkonu jsou triacylglyceroly štěpeny, aby poskytly mastné kyseliny jako zdroj energie pro další tkáně. Až polovina MK je však v procesu reesterifikace zabudována zpět do TAG. Reesterifikace probíhá v adipocytech i hepatocytech a je závislá na koncentraci glycerol-3-fosfátu, který slouží jako kostra pro navázání MK. G3P je získáván z procesů glykolýzy, nebo glukoneogeneze.

Hydrolyzu esterových vazeb TAG zprostředkovávají tři enzymy, hormon senzitivní lipáza (HSL), monoacylglycerol lipáza (MGL) a triacylglycerolová lipáza (ATGL). HSL je inhibována inzulinem a stimulována glukagonem a adrenalinem (Coelho et al., 2013; Laclaustra et al., 2007). Po hydrolyze TAG glycerol putuje do jater, kde je využit pro glukoneogenezi a uvolněné mastné kyseliny jsou navázány na albumin a cirkulací putují do jater a k dalším tkáním kde jsou oxidovány (Coelho et al., 2013).

### **5.3.2 Sekreční funkce tukové tkáně**

Bílá tuková tkáň představuje největší endokrinní tkáň v těle. Kromě mastných kyselin, které regulují metabolismus, produkuje mnoho adipokinů, růstových faktorů, enzymů a proteinů. Také exprimuje řadu genů kódujících receptory pro tyto faktory. Skrze tyto faktory tuková tkáň reguluje mnoho procesů v celém těle, jako je příjem potravy, energetická homeostáza, imunita nebo krevní tlak (Coelho et al., 2013; Costa and Duarte, 2006).

Oproti subkutánní tukové tkáni, má viscerální tuková tkáň vyšší sekreční aktivitu. Mezi nejzastoupenější cytokiny patří interleukin 6 (IL-6), inhibitor aktivátoru-1

plazminogenu (PAI-1), tumor nekrotizující faktor (TNF), rezistin a visfatin (Kuryszko et al., 2016). Tyto adipokiny jsou spjaty se vznikem aterogeneze, vysokého krevního tlaku a citlivosti k inzulinu, zejména díky přímému spojení s játry prostřednictvím portální žíly. Mohou způsobovat i steatózu jater, zvýšením C reaktivního proteinu (CRP) (Kuryszko et al., 2016), jelikož viscerální tuková tkáň produkuje prozánětlivé cytokiny a indukuje zánět v játrech. Zánět v játrech aktivuje Kupfflerovy buňky které se podílí na fibrotizaci tkáně a následné steatóze.

V subkutánní tukové tkáni je naopak vyšší koncentrace leptinu a adiponektinu (Kershaw and Flier, 2004).

### 5.3.2.1 Leptin

Leptin byl vůbec prvním objeveným adipokinem v roce 1994 (Zhang et al., 1994), jeho název je odvozen z řeckého *leptos*, štíhlý. Leptin je 16 kDa velký polypeptid, produkt *ob* genu produkovaný adipocyty (adipokin), který signalizuje hypotalamickým centřům v mozku skrze své receptory (LERPs) o energetickém stavu organismu (Pan et al., 2014). Receptor leptinu patří do rodiny cytokinových s tyrozin-kinázovou aktivitou, kterou sprostředkovávají Janusovy kinázy (JAK). Navázáním leptinu dojde k dimerizaci receptoru a fosforylaci proteinů STAT, které se translokují do jádra, kde fungují jako transkripční faktory a regulují expresi (Pan et al., 2014)

Tato signalizace hypotalamickým neuronům zahrnuje zvýšenou expresi orexigeního peptidu  $\alpha$ -melanocyty stimulující hormon ( $\alpha$ -MSH), který je odvozen od propiomelanokortinových (POMC) buněk a snižuje chuť k jídlu. Dále zahrnuje sníženou expresi neuropeptidu Y (NPY) a agouti příbuzného peptidu (AgRP), které chuť k jídlu naopak stimulují (Kuryszko et al., 2016; Pan et al., 2014).

Infuze leptinu stimuluje aktivitu sympatického nervového systému (SNS), inervaci BAT, oxidaci MK a zvýšení srdeční činnosti, což může být mechanismus, kterým se organismus skrze leptin snaží kompenzovat nadměrný příjem energie (Pandit et al., 2017).

Leptin proto slouží jako „indikátor“ dostatku energetických rezerv v těle, sekrece leptinu koreluje s množstvím tukové tkáně, se zvýšením energetického výdeje a klesá při hladovění (Kershaw and Flier, 2004; Kuryszko et al., 2016; Pandit et al., 2017)

Kromě regulace energetické homeostázy, leptin ovlivňuje také reprodukci, imunitu, kardiovaskulární systém, nebo stav kostí (Pan et al., 2014). Je známo, že jeho uvolňování

je regulováno v rámci rytmu denní doby, v noci je sekrece nižší než přes den (Sinha et al., 1996).

Absence leptinu, popřípadě defekt jeho receptoru způsobuje masivní obezitu u člověka i zvířat. (Kershaw and Flier, 2004).

#### **5.3.2.2 Adiponektin**

Adiponektin je hormon sekretovaný adipocyty, velký 30 kDa. Tento hormon se vyskytuje v několika izoformách (Gil-Campos et al., 2004).

Receptory pro adiponektin jsou transmembránové a nacházejí se hojně ve svalu, játrech a pankreatu. Aktivací receptoru dochází k zvýšení aktivity AMP kinázy (AMPK) a transkripčního faktoru PPAR $\alpha$  a jejich prostřednictvím dochází k zvýšení oxidace MK a příjmu glukózy. Adiponektin také reguluje fosforylaci inzulinového receptu (Gil-Campos et al., 2004) Tato zjištění naznačují, že adiponektin má antidiabetogenní efekt, zlepšuje citlivost tkání k inzulinu a redukuje glukoneogenezi (Kershaw and Flier, 2004).

Adiponektin má také protizánětlivý a antiaterogenní efekty, jelikož může v endotelu cév suprimovat aktivaci nukleárního faktoru- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), který se účastní v procesu zánětu. Tento proces je aktivován skrze TNF- $\alpha$  a cAMP, dochází k blokaci inhibitorů adenylcyklázy a proteinkinázy A, čímž zabraňuje rozvoji endoteliálního zánětu (Gil-Campos et al., 2004)

Sekrece tohoto hormonu se zvyšuje se snižováním váhy a snižuje při obezitě (Kuryszko et al., 2016), také je stimulována inzulinem a inhibována TNF a IL-6. Navíc adiponektin stimuluje produkci oxidu dusnatého (NO) v endoteliálních buňkách a tak stimuluje angiogenezi (Kershaw and Flier, 2004; Gil-Campos et al., 2004).

#### **5.3.2.3 Rezistin**

Regulační peptid objevený roku 2001, velký zhruba 12,5 kDa. Rezistin je secernovaný adipocytami a imunokompetentními buňkami. Hladina rezistinu je zvýšena u obézních jedinců a je možné, že rezistin by mohl indukovat rozvoj inzulinovou rezistencí (Lazar, 2007). Bylo zjištěno, že stimulace makrofágů prozánětlivými cytokiny vede k výraznému zvýšení produkce rezistinu během infekce a zánětu (Coelho et al., 2013).

Rezistin zhoršuje stimulační efekt inzulinu na transport glukózy buněk (Kershaw and Flier, 2004) jelikož zhoršuje aktivitu AMPK v játrech a svalech, čímž zabraňuje inhibici glukoneogeneze a citlivosti tkání k inzulinu (Lazar, 2007).

V cévách rezistin zvyšuje expresi adhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 a stimuluje sekreci prozánětlivých cytokinů makrofágů, což poukazuje proaterogenní efekt rezistinu. Ne všechny studie se však na těchto efektech shodují (Lazar, 2007).

#### **5.3.2.4 Visfatin**

Visfatin je hormon produkováný viscerálními adipocyty, makrofágy a v malé míře i subkutánní bílou tukovou tkání (sWAT). Stimuluje sekreci inzulínu a také zvyšuje senzitivitu buněk k inzulínu. Také má prozánětlivou funkci. Jeho vlastností je indukce aktivace leukocytů a stimulace produkce IL-6 a TNF- $\alpha$  (Coelho et al., 2013; Kuryszko et al., 2016).

#### **5.3.2.5 Tumor nekrotizující faktor $\alpha$**

TNF- $\alpha$ , který je vyplavován z hypertrofovaných adipocytů a makrofágů snižuje citlivost tkání k inzulínu. TNF- $\alpha$  se účastní v patogenezi obezity a inzulínové rezistence. Exprese TNF- $\alpha$  je zvýšena u obézních jedinců a pozitivně koreluje s inzulínovou rezistencí (Kershaw and Flier, 2004).

### **5.3.3 Patofyziologický stav tukové tkáně**

Při obezitě dochází primárně ke zbytnění bílé tukové tkáně a následně k inhibici vlivu inzulínu v této tkáni. Tuková tkáň se zvětšuje mechanismem hypertrofie a hyperplázie adipocytů. Hypertrofie je způsobená excesivním ukládáním TAG v adipocytech a hyperplázii způsobuje proliferace a následná diferenciaci pre-adipocytů (Jo et al., 2010). Právě inzulínorezistence tukové tkáně je jednou z hlavních příčin systémové rezistence k inzulínu. Děje se tak právě kvůli sekrečním funkcím této tkáně, z hypertrofované tkáně jsou ve vyšší míře vyplavovány volné mastné kyseliny, adipokiny a prozánětlivé cytokiny.

Jelikož kolagenová vlákna IV. typu, která se nachází v extracelulární matrix omezující růst adipocytů, jsou přetěžována hypertrofovanými buňkami, dochází ke stresové reakci a zánětu. V důsledku toho je tuková tkáň infiltrována makrofágy typu M1 (prozánětlivý typ makrofágů), které secernují prozánětlivé cytokiny (TNF- $\alpha$ , IL-6). Pokud se však v tkáni nachází méně kolagenových vláken, hypertrofie nemusí být spojená se zánětem (Khan et al., 2009).

Dále příčinou poklesu tvorby G3P dochází k poklesu reesterifikace MK a ty jsou ve vyšší míře vyplavovány z adipocytů. G3P je získáván z glukózy, které je v tukové tkáni kvůli IR nedostatek.

V důsledku inhibičních vlivů na inzulinový signál je narušená aktivace LPL, snižuje se extrakce MK z krve a tudíž je inhibovaná lipogeneze. V důsledku toho narůstá hladina volných mastných kyselin v cirkulaci a ty zamezují utilizaci glukózy v dalších tkáních (Cahová et al., 2007).

Současně vzrůstá lipolytický efekt katecholaminů ve viscerální tukové tkáni a tím se zvýší transport MK přímo do jater. Mastné kyseliny jsou sestavovány do TAG a ve formě VLDL jsou vyplavovány do krve, což vede k rozvoji dyslipidémie (Laclaustra et al., 2007). V podkožní tukové tkáni je naopak lipolytický efekt katecholaminů potlačován vlivem zhoršené aktivity  $\beta_2$  adrenoreceptorů (Schumann et al., 2017).

Studie dokazují, že operativní vyjmutí viscerální tukové tkáně u zvířecích modelů diety indukované obezity (DIO), může obnovit funkci inzulinu, jenž je spojená zejména se sníženou expresí prozánětlivých cytokinů (Pitombo et al., 2006). Došlo také ke snížení glykemie a zvýšení hladiny adiponektinu, téměř ke shodným hodnotám jako u kontrolních zvířat.

Tato zjištění naznačují, že viscerální tuková tkáň a její sekreční aktivita vede k výraznému zhoršení inzulinové signalizace, což vede k systémové rezistenci k inzulinu.

#### **5.3.4 Typy tukové tkáně**

Rozlišujeme dva základní typy tukové tkáně, bílou (WAT) a hnědou (BAT). Bílá tuková tkáň obsahuje zejména univakuolární adipocyty a slouží hlavně jako zásoba TAG, zatímco hnědá tuková tkáň obsahuje zejména multivakuolární adipocyty s četnými mitochondriemi obsahujícími UCP1. BAT je specializovaná k produkci energie ve formě tepla.

I bílá tuková tkáň obsahuje i buňky, které exprimují velké množství UCP1 a mají tendenci stávat se multivakuolárními vlivem chladové expozice, nebo buněčnými drahami zvyšujícími intracelulární cAMP (Cousin et al., 1992; Wu et al., 2012). Tyto specializované adipocyty nazýváme béžovými.

Tuková tkáň se zakládá již v perinatálním období. Hnědá tuková tkáň se diferencuje již před porodem, jelikož její funkce je chránit novorozeně před chladem. Zatímco utváření bílé tukové tkáně je započato krátce po narození (Park et al., 2014).

##### **5.3.4.1 Rozvoj a diferenciacie tukových buněk**

WAT i BAT mají společný původ v mezodermu (stejně jako myocyty). Ale bílá a hnědá tuková buňka pocházejí z rozdílných linií mezenchymálních kmenových buněk (Giralt and Villarroya, 2013). BAT adipocyty mají společnou linii kmenových buněk spolu se



svalovými (Saely et al., 2012). Ačkoliv bílé a hnědé adipocyty pocházejí z rozdílných buněčných linií (adipogenní a myogenní), jejich diferenciaci zahrnuje sdílení společných transkripčních kaskád (Park et al., 2014).

### **Hnědé adipocyty**

V roce 2006 bylo prokázáno, že svalové buňky a buňky hnědé tukové tkáně mají společný původ (Atit et al., 2006). O rok později bylo objeveno, že tyto buňky nesou znak myogenního faktoru 5 (Myf5), který je, jak se předpokládá, myogenním regulačním faktorem pro buňky svalu a hnědého tuku (Timmons et al., 2007).

Buňky hnědého tuku obsahují transkripční regulátor PRDM16, který zajistí, že se prekurzor hnědého adipocytu nesoucí Myf5 diferencuje právě na hnědý adipocyt a ne ve svalovou buňku. PRDM16 aktivuje transkripční faktor PPAR- $\gamma$  (Seale et al., 2008) a také receptor gamma koaktivátor-1 $\alpha$  aktivovaný proliferátory peroxisomů (PGC-1 $\alpha$ ) (Park et al., 2014). Pokud buněčný prekurzor ztratí tento transkripční regulátor, diferencuje se v myocyt. A naopak pokud myoblast exprimuje PRDM16, indukuje tak jeho diferenciaci v adipocyt (Saely et al., 2012).

Diferenciaci je také regulována prostřednictvím kostního morfogenetického proteinu 7 (BMP7), jelikož indukuje expresi výše zmíněného transkripčního regulátoru PRDM16 a také UCP1 (Saely et al., 2012).

Jako další klíčový transkripční aktivátor exprese UCP1 a termogenního procesu je považován CCAAT/enhancer vazebný protein  $\beta$  (C/EBP- $\beta$ ) (Park et al., 2014).

Kromě hnědých adipocytů, které jsou Myf5 pozitivní existují ještě hnědé adipocyty které jsou Myf5 negativní. Tyto hnědé adipocyty se nacházejí rozptýlené v bílé tukové tkáni a pochází tak z jiné prekurzorové linie. Pravděpodobně pochází z aktivace dormantních prekurzorových buněk (Saely et al., 2012) (obr.7).

### **Bílé adipocyty**

Inciální fáze adipogeneze bílých adipocytů zahrnuje proliferaci preadipocytů. Preadipocyty jsou vyvinuty z adipoblastů a adipoplasty vznikají z multipotentních mezenchymálních kmenových buněk (Park et al., 2014). Adipocyty se rozvíjí z preadipocytů prostřednictvím mnohonásobných cyklů mitózy, dokud nenarostou do dostatečné velikosti a poté znovu vstoupí do buněčného cyklu. Podstoupí tzv. mitotickou klonální expanzi, dokud nedosáhnou metabolických vlastností zralých adipocytů a

nejsou schopny skladovat TAG (Park et al., 2014). Zralé adipocyty už nemají schopnost se dále dělit. Mezi důležité transkripční faktory diferenciaci C/EBPs a sice C/EBP- $\beta$  a C/EBP- $\delta$ .

Vazba C/EBP- $\beta$  umožňuje preadipocytům znovu spustit buněčný cyklus, tudíž je nepostradatelným prvkem v mitotické klonální expanzi. C/EBP- $\beta$  a C/EBP- $\delta$  jsou navzájem redundantní. V případě dvojitého knockoutu genů obou proteinů dojde ke snížené schopnosti tukové tkáně akumulovat TAG (Tanaka et al., 1997). Vazba C/EBP- $\beta$  navíc zvyšuje hladiny C/EBP- $\alpha$  a PPAR- $\gamma$ , které se navzájem pozitivně ovlivňují a to je důležité pro nabývání a zrání adipocytů (Park et al., 2014). V diferenciaci bílých adipocytů se dále uplatňují BMP, stejně jako u diferenciaci hnědých adipocytů (obr.4).

### **Běžové adipocyty – hnědnutí**

Dokonce i v plně diferencované tukové tkáni, může docházet k transformacím. Bílá tuková tkáň má totiž schopnost „přepnout“ mezi skladováním energie a jejím spalováním. Tak může tato tkáň změnit buněčnou charakteristiku, co se týče morfologie, exprese genů, nebo aktivity mitochondrií (Park et al., 2014).

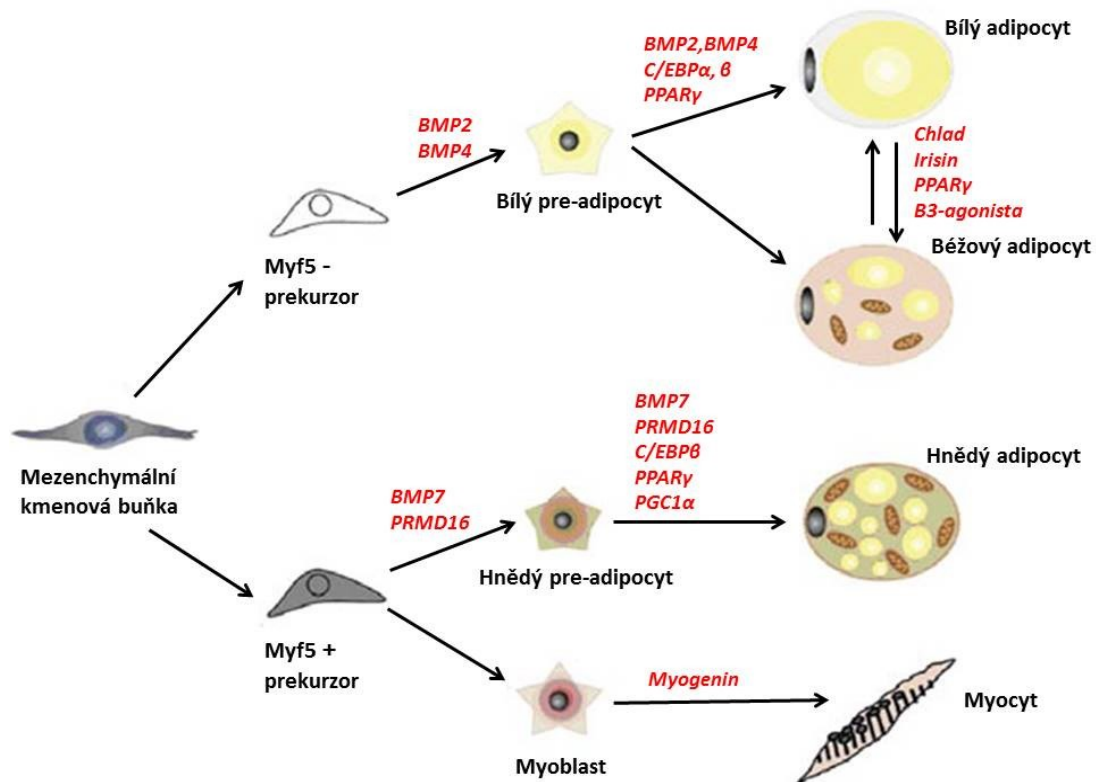
Této transformace jsou schopné specializované běžové buňky, nacházející se v bílé tukové tkáni. Tyto běžové tukové buňky jsou odvozeny od prekursorů jiné buňčné linie, než jsou buňky BAT a mají blíže k linii buněk WAT (Petrovic et al., 2010a).

Běžové buňky mají fenotyp jako WAT buňky a při běžných podmínkách také obsahují velké vakuoly skladující tuk a mají nízkou expresi UCP1. Avšak při určitých stimulech, jako je například expozice chladu, nebo stimulace prostřednictvím  $\beta$ 3-adrenergických aktivátorů, se tyto adipocyty transformují v buňky s charakteristikou hnědých adipocytů, včetně malých vakuol a exprese UCP1 (Barbatelli et al., 2010; Himms-Hagen et al., 2000).

Pravděpodobně běžové tukové buňky mohou regulovat adaptivní termogenezi proti chladu v bílé tukové tkáni, jelikož primární funkce BAT je netřesová termogeneze (Park et al., 2014). Diferenciaci běžových tukových buněk při chladové expozici proběhne během jednoho týdne (Rosenwald et al., 2013).

Termogenní aktivita je regulována prostřednictvím sympatického nervového systému. Katecholaminy aktivují  $\beta$ -adrenergické receptory, které jsou spřažené s G-proteiny, zvýší hladiny intracelulárního cAMP a tento signál vede k expresi genu pro UCP1 (Park et al., 2014). Kromě katecholaminů se v procesu hnědnutí uplatňuje také PPAR- $\gamma$ , nebo irisin

(Petrovic et al., 2010b; Wu et al., 2012). Irisin je faktor hormonálního charakteru, jenž konvertuje bílý tuk na hnědý. Tento hormon je sekretován z myocytů, v průběhu cvičení. (Boström et al., 2012) ( obr. 4).



**Obr.4:** Diferenciace adipocytů

Bílý i hnědý adipocyt jsou odvozeny ze stejné mezenchymální buňky. Prekurzor Myf5+ je indukován k transformaci v hnědý adipocyt skze BMP7, PPARγ a C/EBPs ve spolupráci s PGC1α PRMD16. Bílé adipocyty mohou být transformovány v béžové vlivem vystavení chladu, βadrenergní aktivací a PPARagonistou, nebo irisinem.

Převzato z: *Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells*, Park et al., 2014

### 5.3.5 Anatomické umístění tukové tkáně

Bílá tuková tkáň je rozptýlena po celém těle, ale v základu se rozlišuje dle výskytu v subkutánní (sWAT) a viscerální (vWAT) lokalitě.

Viscerální tuková tkáň se nachází v interperitoneálním prostoru, obklopuje orgány a chrání je před nárazy. V závislosti na konkrétní lokaci, dělíme vWAT na mezenterickou, retriperitoneální, epididymální (perigonadální) a omentální (obr. 5). Mezenterická tuková tkáň tvoří podporu střev, párová epididymální tkáň je připojena k vaječnům žen

(samic) anebo k varlatům mužů (samců). Párová retroperitoneální tkáň se nachází podél dorzální stěny břicha a omentální tkáň se nachází kolem žaludku a sleziny a rozšiřuje se do ventrální oblasti břicha.

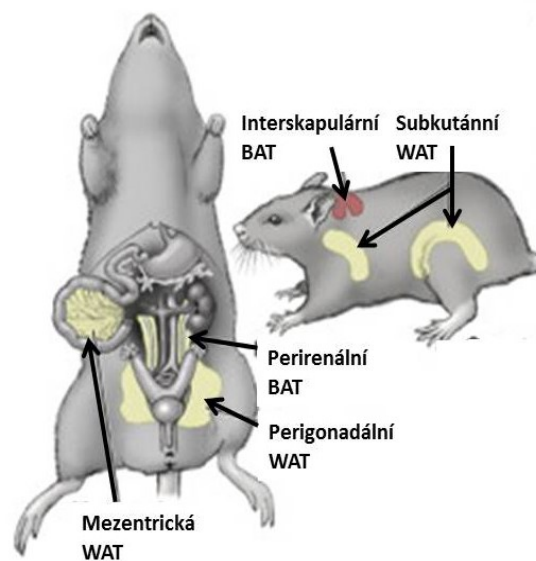
Subkutánní tkáň izoluje tělo od teploty okolí a nachází se pod kůží celého těla a také je rozptýlená mezi kosterním svalstvem. Hnědá tuková tkáň je u potkanů primárně distribuovaná mezi lopatkami (interskapulární), v podpaží (axilární), podél páteře (paravertebrální) a kolem ledvin (perirenální). Právě proto, že interskapulární BAT tvoří převážnou část celkové hnědé tukové tkáně v těle, lze ji jednoduše vyjmout.

Již v roce 1972 J.M. Heaton detekoval přítomnost hnědé tukové tkáně u dospělého člověka (Heaton, 1972). I přes tento objev se považovala přítomnost BAT u dospělého člověka za zanedbatelnou a zřejmě nezajímavou po mnoho let.

Později, za pomoci pozitronové emisní tomografie a výpočetní tomografie (PET, CT) se podařilo potvrdit a zaznamenat přesný výskyt BAT u dospělého otužilého člověka (obr. 6).

Oblasti výskytu BAT se nacházejí především v blízkosti klíčních kostí (suprakilavikulární), okolo aorty (paraaortální), na krku (cervikální), v oblasti akromioklavikulárního kloubu, dále pak na hrudníku či na břiše (Lans et al., 2014; Lean, 1989).

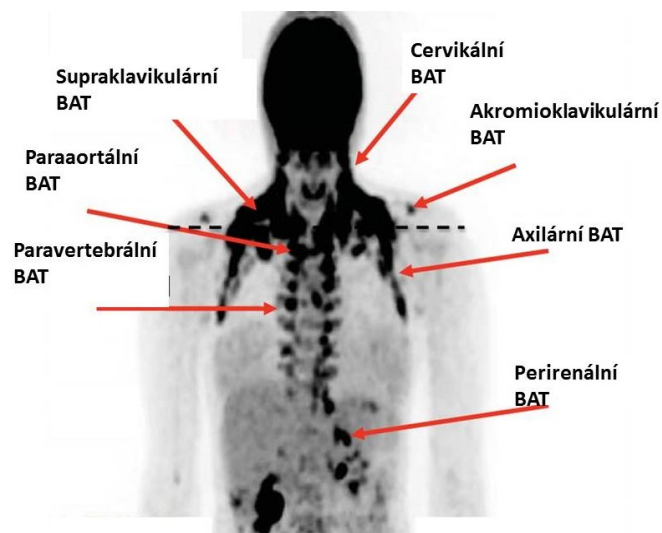
Běžová tuková tkáň (BgAT) se nachází v subkutánní bílé tukové tkáni, zvláště pak v oblasti třísel (Wu et al., 2012). Dále se nachází v krční oblasti, stejně jako BAT. Rozdíl je však v tom, že BgAT se nachází v subkutánní tukové tkáni, kdežto BAT se nachází hlouběji (Cypess et al., 2013).



**Obr.5** Anatomie tukové tkáně u potkana:

Hlavními lokalitami hnědé tukové tkáně u potkana je oblast mezi lopatkami (interskapulární) a oblast okolo ledvin (perirenální). Oblastmi výskytu bílé tukové tkáně je kromě podkoží zejména v dutině břišní kolem střev (mezenterická) a v oblasti gonád (perigonadální/epididymální)

Převzato z: *Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots*, Tchkoia et al., 2013



**Obr.6** Anatomie hnědé tukové tkáně u člověka:

Snímek z pozitronové elektromagnetické tomografie (PET) dokazuje přítomnost hnědé tukové tkáně u dospělého otužilého člověka. Hlavní lokality výskytu hnědé tukové tkáně jsou v oblasti krku, klíčních kosti a podél páteře. V menší míře pak i v oblasti ledvin.

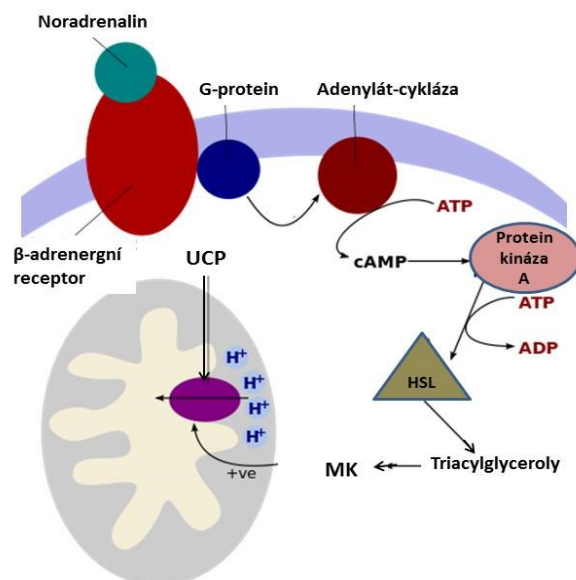
Převzato z: *Coldactivated brown adipose tissue in human adults: methodological issues*, Lans et al., 2014

## 5.4 Hnědá tuková tkáň

BAT je unikátní termoregulační orgán vyskytující se pouze u savců. Funkcí hnědé tukové tkáně je přeměňovat přijatou energii na produkci tepla a zároveň snižovat efektivitu metabolismu, díky spalování MK. Schopnost BAT spalovat tuk by mohla být využita v léčbě problému obezity a T2DM (Roman et al., 2015). Za unikátní funkci tohoto orgánu je zodpovědný UCP1. Jelikož je hnědá tuková tkáň vysoce vaskularizována a inervována, aktivita každého jednotlivého adipocytu je regulována samostatným nervovým vláknem a je také závislá na dodávce kyslíku a lipidů pomocí kapiláry obklopující každou buňku (Cannon and Nedergaard, 2004; Roman et al., 2015). Produkované teplo opouští tukovou tkáň pomocí krevního oběhu. Kromě samotných adipocytů se v tkáni nachází zejména endoteliální buňky kapilár, intersticiální buňky a preadipocyty.

### 5.4.1 Mechanismus termogeneze

Pokud je organismus vystaven chladu, hypotalamus začne uvolňovat noradrenalin (NE) ve tkáni skrze aktivaci sympatického nervového systému (SNS) (Roman et al., 2015). Noradrenalin je neurotransmiterem na sympatických vegetativních vláknech, řadí se mezi katecholaminy. V adipocytu NE aktivuje všechny tři adrenergní receptory ( $\beta$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ). Nejpodstatnější je však aktivace  $\beta 3$  receptoru, jelikož tyto receptory se nacházejí výlučně v tukové tkáni (Cannon and Nedergaard, 2004). Kromě stimulace termogeneze, NE také hraje důležitou roli v diferenciaci a proliferaci hnědých adipocytů (Wang et al., 2011). navíc reguluje expresi genu pro UCP a chrání adipocyty před apoptózou (Cannon and Nedergaard, 2004). Adrenergní receptor je transmembránový, spřažený s G proteiny. Jeho aktivací se v adipocytu stimuluje adenylát-cykláza, která zvyšuje hladinu intracelulárního cyklického AMP (cAMP). Cyklické AMP aktivuje cAMP-dependentní protein kinázu A (cAMP-PKA). PKA fosforyluje perilipin, což je protein, který za normálních okolností chrání TAG před účinkem HSL (Cannon and Nedergaard, 2004), tím stimuluje HSL a je zahájena lipolýza přítomných TAG. V mitochondrii tyto mastné kyseliny podstoupí  $\beta$ -oxidaci a aktivují respirační řetězec. Přítomnost UCP1 však způsobí odprážení membránového potenciálu, takže protony prochází zpět do matrix mitochondrie současně za tvorby tepla, namísto tvorby ATP (obr. 7) (Roman et al., 2015).



**Obr. 7:** Mechanismus termogeneze

Noradrenalin se naváže na adrenergní receptor sprážený s G-proteiny. Podjednotka G-proteinu aktivuje adenylát-cyklázu a ta syntetizuje cAMP. cAMP aktivuje PKA a ta stimuluje HSL. Tím se aktivuje lipolýza TAG a odštěpené MK z TAG jsou v mitochondriích oxidovány. Oxidace MK je zdrojem energie pro respirační řetězec. Gradient protonů je však díky přítomnosti UCP přerušen a tak uniká teplo, místo syntézy ATP.

Obrázek převzat z Wikimedia Commons

Jelikož je aktivní hnědá tuková tkáň bohatá na mitochondrie a jako zdroj energie využívá právě mastné kyseliny, spaluje velké množství TAG a předpokládá se, že by mohla ovlivňovat tělesnou váhu a redukovat obezitu. Bylo zjištěno, že zvýšená produkce UCP1 u hlodavců snížila obezitu a zvýšila senzitivitu tkání k inzulinu (Kozak and Anunciado-Koza, 2008).

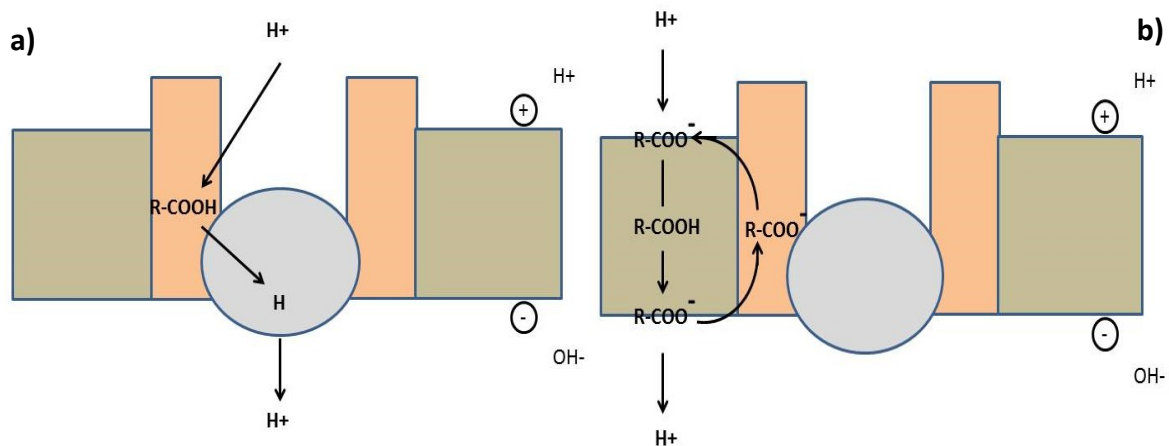
Pokud jsou zvířata chovaná v chladu, jejich příjem potravy může být až čtyřnásobně vyšší, ve srovnání s normální teplotou, aby byl pokryt čtyřnásobně vyšší metabolismus. U zvířat, která jsou otužilá a mají aktivní BAT, prakticky veškerý tento nadměrný příjem spálí právě hnědá tuková tkáň (Cannon and Nedergaard, 2004).

#### 5.4.2 Aktivita odpřahujícího proteinu

Aktivace UCP spočívá v přítomnosti MK. Existují dva mechanismy odpřažení fosforylace (Ricquier and Bouillaud, 2000). První, navržený Klingenbergem, předpokládá transport protonů skrze UCP, zatímco MK pouze poskytují potřebné volné karboxy-skupiny, které zefektivňují celý proces (Klingenberg, 1999).

Druhý model, navržený Garlidem, zahrnuje cyklování MK v membráně a UCP umožňuje transport aniontové formy mastné kyseliny (Garlid et al., 1998). Mnohá pozorování však naznačují, že pro transport protonů není nezbytná přítomnost mastných kyseliny a

v určité míře probíhá i za jejich nepřítomnosti. Přítomnost mastných kyselin však napomáhá přenosu protonů přes UCP (Obr. 8) (Ricquier and Bouillaud, 2000).



**Obr.8:** Modely mechanismu transportu protonů přes UCP1

a) model představuje transport protonů za přítomnosti mastných kyselin. Karboxy skupina mastné skupiny se účastní transportu protonů a umožňuje zlepšit transport.

b) model představuje transportní cyklus mastných kyselin. Karboxy-skupina mastné kyseliny je v oblasti vysoké koncentrace protonů (mezimembránový prostor) protonována což umožní mastné kyselině volně difundovat skrze membránu. Na druhé straně membrány (matrix) je mastná kyselina deprotonována vlivem nízké koncentrace protonů (Ricquier and Bouillaud, 2000).

Takto zajištěná disipace energie ve formě tepla a zvýšená oxidace substrátů může být důležitá pro udržování energetické rovnováhy a regulaci tělesné váhy (Ricquier and Bouillaud, 2000). Aktivita UCP stoupá, při expozici organismu chladu, jak je uvedeno výše, při probouzení zvířat z hibernace, nebo u dětí po porodu.

#### 5.4.2.1 Typy odpřahujících proteinů

Do roku 1997 se předpokládalo, že existuje pouze jeden typ odpřahujícího proteinu. Od té doby bylo objeveno celkem pět odpřahujících proteinů, označovaných UCP1 – UCP5. Tyto proteiny se liší ve funkci podle lokality výskytu (Hainer V., et al., 2004).

Také se tyto proteiny liší, co se týče podobnosti s UCP1. UCP2 a UCP3 jsou homologní s UCP1 více než 50 % (Ricquier and Bouillaud, 2000). UCP4 a UCP5 mají pouze 30% homologii s UCP1 (Cioffi et al., 2009).

UCP1 se nachází nejen v hnědé tukové tkáni, ale dle nedávných objevů také v běžových buňkách (Busiello et al., 2015).



UCP2 se nachází v mnoha tkáních, často ale pouze v určitých buněčných liniích, nebo v určitém období. Například se nachází ve slezině, pankreatu či plicích, ale hlavně v makrofázích nacházejících se v těchto orgánech (Cioffi et al., 2009; Ricquier and Bouillaud, 2000). Také je exprimován v játrech plodu, ne však v játrech zdravého dospělého jedince. Tam ho lze najít opět, pokud se zde vyskytují makrofágy (Hodný et al., 1998), jeho funkce zřejmě nebude tak přínosná pro termogenezi a regulaci váhy jako UCP1, jelikož byl detekován i ve tkáních ryb a rostlin, u kterých se nevyskytuje termogeneze (Brand and Esteves, 2005).

UCP3 se vyskytuje především v kosterních svalech a srdci (Boss et al., 1997). Má klíčovou regulační úlohu v oxidaci mastných kyselin a v prevenci poškození kyslíkovými radikály (ROS) (Cioffi et al., 2009).

Funkce UCP2 a UCP3 zdá se být hlavně v regulaci oxidace mastných kyselin. V případě nadbytku mastných kyselin v mitochondriích, UCP exportují MK z mitochondriální matrix do cytosolu. Jedná se o ochranný mechanismus před poškozením mitochondriálních proteinů a DNA anionty MK nebo peroxidy (Brand and Esteves, 2005; Echtay, 2007). Mastné kyseliny jsou konvertovány na MK-AcylCoA pro oxidaci, pokud přísun MK převyšuje schopnost oxidace, mohou se MK akumulovat a působit toxicky. (Echtay, 2007).

Funkce UCP4 a UCP5 nejsou zcela jasné a jsou předmětem výzkumu. Předpokládá se, že jejich hlavní role spočívá v neuroprotekcí (Cioffi et al., 2009).

UCP4 nacházející se v mozku, může ovlivňovat vápníkovou homeostázu. UCP5 je téměř homologní s mozkovým mitochondriálním přenašečovým proteinem (BMCP1). Rozdíl mezi nimi spočívá pouze v jedné aminokyselině (Cioffi et al., 2009). UCP5 se nachází především v kůře, hypotalamu, amygdale a hipokampu. (Sanchis et al., 1998). Mimo mozek se také v nižší míře nachází v ledvinách, srdci, plicích a dalších orgánech. Funkce UCP5 není zatím zcela známá, ale zřejmě ovlivňují produkci kyslíkových radikálů (Echtay, 2007).

### **5.4.3 Hnědá tuková tkáň u člověka**

Jak bylo zmíněno výše, dříve se předpokládalo, že BAT se u člověka vyskytuje maximálně do dvou let věku. Dnes již víme, že je tomu jinak. U novorozenců se zřejmě dokonce vyskytují dva typy BAT. První je klasická interskapulární BAT, jenž chrání novorozence před náhlou změnou teploty a druhá je běžová, vyskytující se ve viscerální tukové tkáni (Giralt and Villarroya, 2013).

I dospělý člověk disponuje aktivní BAT za určitých podmínek. Pomocí moderních zobrazovacích metod (PET/CT, magnetická rezonance) byla u lidí po expozici chladu detekována aktivní BAT v určitých lokacích (obr. 6). Výskyt a aktivita této tkáně však negativně koreluje se vzrůstajícím věkem a hmotností člověka.

BAT, která se vyskytuje u dospělého člověka, však není stejná jako interskapulární BAT, která se nachází po narození a v raném věku dítěte. Bylo prokázáno, že vlivem adrenergní stimulace jsou bílé adipocyty schopné transdiferenciace v béžové adipocyty, neboli zhnědnou (Frontini et al., 2013). Tyto adipocyty se také nazývají „brite“ (=brown in white).

Čím je člověk aktivnější a štíhlejší, tím více oblastí aktivní BAT u něj lze nalézt (Lidell and Enerbäck, 2010). Nebylo však zatím zjištěno, že by člověk vlastnil klasickou interskapulární BAT, tak jako se vyskytuje u malých savců.

#### **5.4.4 Věk a hnědá tuková tkáň**

S přibývajícím věkem spojena s inaktivací a atrofií BAT. Se sníženou aktivitou BAT může být také spojená rezistence tkáně k účinku katecholaminů (Blondin and Carpentier, 2016). Tato rezistence může způsobit i sníženou expresi  $\beta$ -adrenergních receptorů. (Blondin and Carpentier, 2016).

Jaké jsou přesné příčiny, však zatím není známo a v této oblasti probíhá další výzkum. V našem experimentu jsme se rozhodli také zahrnout věk, jako podstatný parametr v efektivitě metabolismu ve vztahu k hnědé tukové tkáni.

#### **5.4.5 Ablace hnědé tukové tkáně a její důsledky**

Významnost hnědé tukové tkáně lze ověřit nejlépe jejím vyjmutím. To je však obtížné, jelikož BAT se rozkládá ve více oblastech těla a v poměrně malých ložiscích. Přesto, interskapulární část představuje největší ložisko BAT u potkana a dalších malých savců, a proto vyjmutím této části dosáhneme významné ablace. Otázkou je, zda-li nedojde k určitým kompenzacím, jako například opětovný nárůst vyjmuté tkáně (Cannon and Nedergaard, 2004), nárůst jiných ložisek BAT, či zvýšení exprese UCP1 v bílé tukové tkáni a hnědnutí.

V pokusu z roku 1984, kdy byla štíhlým a obézním potkanům vyjmuta interskapulární BAT, bylo pozorováno, že extirpace neměla vliv na nárůst váhy, či příjem potravy, pokud byli potkani chováni při normální teplotě (Stern et al., 1984). Štíhlí potkani plně vykompenzovali vyjmutí nárůstem další hnědé tukové tkáně. U obézních myší došlo ke

kompenzaci pouze zvýšením exprese genu pro UCP1. Obézní potkani, kteří však byli chováni v teplotě 10°C měli příbytek na váze, oproti kontrole. Což podporuje hypotézu, že redukce funkční BAT přispívá k rozvoji tukové tkáně a obezitě.

V jiné studii z roku 1989 byla potkanům odebrána interkapulární, skapulární a cervikální BAT (Rothwell and Stock, 1989). Pár dní po extirpaci, byla potkanům podána infuze NE. Termogenní odpověď byla u operovaných o 30% nižší než u kontrol, ale dva týdny poté, tento rozdíl zmizel. Po šestnácti dnech se sice nevyskytla regenerace vyjmuté tkáně, ale došlo ke kompletní kompenzaci zbylými ložisky BAT.

V nedávné studii kdy byla opět vyjmutá interskapulární BAT, bylo prokázáno, že do určité doby po operaci dochází k dysbalanci glykemie. Dva týdny po operaci však už tento efekt ablace nebyl pozorován. Díky změření exprese UCP1 v subkutánní WAT, bylo prokázáno, že nastala kompenzace v rámci vyšší exprese UCP1 oproti kontrole (Dumortier et al., 2017).

Vzhledem k těmto studiím jsme se rozhodli zaměřit se na důsledky extirpace iBAT u neobézních potkanů, u kterých jsou projeveny všechny ostatní parametry MS. Předpokládali jsme, že iBAT by mohla mít významný vliv na spalování lipidů u tohoto potkaního modelu MS. Rozhodli jsme se srovnat tyto důsledky mezi věkovými skupinami a přihlídnout k možným kompenzačním mechanismům s časovým odstupem od extirpace.

## **6 Experimentální část**

### **6.1 Cíle diplomové práce**

#### **6.1.1 Vliv extirpace interskapulární hnědé tukové tkáně u hereditárně hypertriacylglycerolemických potkanů**

BAT se přisuzuje velký potenciál v léčbě obezity a MS, ale stále není zcela jasné, jak je schopna ovlivnit obezitu a poruchy asociované s MS. Rozhodli jsme se HHTg potkanům vyjmout iBAT a sledovat rozdíly ve hmotnosti, inzulinové senzitivitě, sekreci hormonů a v sérových parametrech. Rozhodli jsme se také přihlídnout k možnosti aktivity kompenzačních mechanismů, a proto jsme údaje získávali první a třetí týden po operaci.

#### **6.1.2 Vliv extirpace interskapulární hnědé tukové tkáně v závislosti na věku**

Jelikož je známo, že ložiska i aktivita BAT se s věkem snižuje, rozhodli jsme se vztáhnout důsledky operace na věk potkanů a to konkrétně dvě věkové skupiny.

#### **6.1.3 Rozdíly metabolických důsledků extirpace interskapulární hnědé tukové tkáně mezi kmeny**

Kromě věku, aktivita iBAT se může různit i v závislosti na kmenu potkana. Kmen Wistar jsme zde použili jako kontrolní vůči kmenu HHTg, který byl předmětem tohoto experimentu.

## 6.2 Metody

V této části jsou popsány kmeny potkanů, jež jsme pro experiment použili, uspořádání experimentů a laboratorní analytické metody.

### 6.2.1 Potkani

Pro tuto práci jsme využili dva kmeny potkanů, HHTg kmen a Wistar. Pro experiment srovnání aktivity BAT mezi kmeny jsme použili 20 potkanů kmene HHTg, 10 potkanů ve věku 2 měsíce a 10 potkanů ve věku 12 měsíců. Dále jsme použili 12 potkanů kmene Wistar, 8 potkanů ve věku 2 měsíce a 4 potkany ve věku 12 měsíců.

Pro experiment extirpace jsme použili dvě věkové skupiny potkanů. Starší skupinu ve věku 18 měsíců, celkem 24 potkanů ve skupině, 8 kontrolních, 16 operovaných. Mladší skupinu potkanů ve věku 5 týdnů, celkem 16 potkanů ve skupině, 6 kontrolních, 10 operovaných. Všichni potkani byli samice, v klecích byli chováni ve skupinách, v běžném cirkadiánním rytmu. Potrava byla podávána *ad libitum*.

#### 6.2.1.1 Kmen hereditárně hypertriacylglycerolemických potkanů

Jak již název napovídá, tento kmen má geneticky fixovanou zvýšenou hladinu triacylglycerolů v krvi. Je to inbrední kmen, u něhož se vyskytují symptomy metabolického syndromu. Kmen HHTg byl vyšlechtěn byl z kmene Wistar, křížení bylo prováděno po deset generací na základě zvýšené hladiny TAG v séru vlivem vysokosacharóзовé diety. Hypertriglyceridémie po patnácti generacích dosáhla hodnoty 5,8 mmol/l oproti kontrole, která dosahovala hodnoty cca 1,3 mmol/l (Vrána and Kazdová, 1990).

Tito potkani mají oproti kontrolám vyšší lipogenezi v játrech, vyšší hodnoty NEMK v plazmě. Vyšší hladina NEMK způsobuje zvýšený výdej VLDL, zhoršuje utilizaci glukózy v periférii a snižuje inzulinem inhibiční vliv na jaterní glukoneogenezi, jak je zmíněno výše. U kmene HHTg je dále vyšší glykemie a inzulinemie oproti kontrolám. Citlivost k inzulínu je také zhoršená (Vrána et al., 1993). Dále mají zvýšený systolický i diastolický krevní tlak a až o 50% vyšší koncentraci kyseliny močové v plazmě (Klimes et al., 1995).



Obr.9: Samice potkana kmene HHTg, věk 12 měsíců

Tento kmen je proto ideální pro sledování vývoje, mechanismů anebo farmakologické léčby inzulinové rezistence a metabolického syndromu.

#### **6.2.1.2 Kmen potkanů Wistar**

Tento kmen byl jako první vyšlechtěný v roce 1906. Potkani tohoto kmene jsou outbrední, poměrně dlouhověcí, ale náchylní k tvorbě nádorů. Jedná se o univerzální výchozí kmen, ze kterého byla vyšlechtěna více než polovina současných kmenů laboratorních potkanů (Mgr. Petra Hyklová, Laboratorní potkani a jejich adopce, czkp.cz [online], 2017). My jsme použili tento kmen od firmy Velaz jako kontrolní k našemu kmeni HHTg.

## 6.2.2 Operace

Operace zahrnovala vyjmutí interskapulární hnědé tukové tukové tkáně. Jedná se o poměrně nenáročnou operaci, kterou potkani absolvovali bez komplikací a do hodiny po vyoperování se probrali. Nejdříve jsme operovali skupinu starších potkanů, proběhla v červnu 2016 a skupinu mladších potkanů jsme operovali v srpnu 2016.

### Materiál a chemikálie

- Stříkačka, objem 5ml, krátké jehly, šicí jehly, chirurgická nit
- Narketan (Ketaminum 100 mg, Merial, Francie)
- Xylazin (Xylalzinum 20 mg, Bioveta, Česká republika)
- Betadine (Povidonium iodinum 100mg v 1 ml vodného roztoku, EGIS PHARMACEUTICALS, Maďarsko)
- oční gel
- Enrogal (Enrofloxacinum 100 mg)
- Ketofen 10% (Ketoprofenum 100 mg) – Merial, Francie
- Oční nůžky, rovné pinzety, zahnuté pinzety, peany

### Postup

Šicí jehly jsme vložili do petriho misky vydezinfikovali pomocí betadinu.

Pro narkózu potkanů jsme použili kombinaci Narketanu a Xylazinu v poměru 4:1, v množství 100 µl na 300 g živé váhy. Narkózu jsme injikovali na dvakrát, do svalů levé a pravé zadní nohy.

Uspaného potkana jsme na zádech omyli mýdlem a vodou a v okolí lopatek vyholili břitvou. Potkana jsme poté položili na břicho do fyziologické pozice, s nohama i ocasem pod tělem, vytáhli jazyk a oči jsme natřeli očním gelem, aby nevyschly.

Po pár minutách od injikování narkózy jsme vyzkoušeli hloubku narkózy, pomocí stisknutí nohy pinzetou a dotykem vousků prsty. Pokud potkan nijak nereagoval, zahájili jsme operaci.

Mezi lopatkami jsme provedli nástřih o délce ~ 2 cm. Pod kůží se nacházelo tukové ložisko bílé tukové tkáně a uvnitř se nacházela hnědá tuková tkáň. Mladší potkani téměř žádnou bílou tukovou tkáň neměli. Také v poměru k tělu měli větší množství iBAT.

Ránu jsme si otevřeli pomocí malého peanu a tukové těleso jsme pomocí nůžek a pinzety opatrně vyjmuli. U mladších zvířat bylo třeba kraniální část tukového tělesa podvázat, aby vyjmutí nekrvácelo. U starších to nebylo třeba, rána téměř nekrvácela.

Po vyjmutí tkáně jsme ránu vymyli fyziologickým roztokem, vyčistili dezinfekcí (Betadin), osušili a kůži zašili pomocí ploché zahnuté jehly, jednotlivými stehy ukončenými chirurgickým uzlem. Zašitou ránu jsme opět ošetřili dezinfekcí a potkana jsme umístili do pooperační přepravky, vystlané buničinou, aby potkani neprochladli.

U kontrolní skupiny potkanů „sham“ nebylo nic vyjmuté, pouze jsme jim nastříhli kůži a ihned ji zašili, stejným postupem jako u předchozí skupiny.

Po operaci jsme potkanům injikovali do okolí rány ketofen v množství 100 µl na 300 g hmotnosti.

Zhruba hodinu od ukončení operace se potkani začali posupně probouzet, všichni se jeví aktivní. Do vody jsme jim aplikovali Enrogal, což je veterinární antibiotikum v množství 250 µl/ 0,5 l vody.

### 6.2.3 Orální lipidový toleranční test

Po operaci jsme potkany podrobili orálnímu lipidovému tolerančnímu testu (OLTT) pro posouzení absorpce tuků z cirkulace a důsledku odstranění iBAT na metabolismu tuků. Srovnávali jsme dvě skupiny kmene HHTg, první skupina byla po extirpaci iBAT, druhá skupina byla kontrolní, tzv „sham“. Noc před provedením testu byla potkanům odebrána potrava.

Předpokládali jsme, že absence iBAT první skupiny zhorší absorpci tuků z cirkulace oproti kontrolní skupině.

### Materiál a chemikálie

- Stříkačka 5 ml, nerezová krmící gaváž ve dvou velikostech, řepkový olej
- Odběrová komůrka,
- Fyziologický roztok (0,9% roztok NaCl)
- Stolní centrifuga (Heraeus)
- Spektrofotometr (Beckman Coulter)
- Komerční souprava na měření TAG v séru (Erba Lachema s.r.o., Česká republika)



**Obr.10** Nerezová krmící gaváž ve dvou velikostech.  
Zdroj: AnimaLab.eu



## **Postup**

Potkany jsme postupně umístili do odběrové komůrky a z nastřižené špičky ocásku jsme odebrali pár kapek krve do mikrozskumavky. Ocásek jsme poté otřeli buničinou navlhčenou fyziologickým roztokem. Po prvním odběru jsme provedli „sondáž“, potkanům jsme aplikovali pomocí stříkačky a gaváže do žaludku řepkový olej. Starším potkanům jsme aplikovali 3 ml, mladším potkanům jsme aplikovali 1,5 ml.

Hodinu po aplikaci oleje jsme provedli druhý odběr krve z ocásku stejným způsobem jako první odběr a takto jsme pokračovali až k šestému, poslednímu odběru.

Po odběrech jsme vzorky krve stočili ve stolní centrifuze a odebrali 10  $\mu$ l séra do kyvety z každého vzorku. Na sérum jsme poté aplikovali 1ml komerčního reagens na detekci TAG. Roztok jsme nechali 20 min. reagovat a poté jsme změřili ve spektrofotometru, kterým jsme změřili absorbanci při vlnové délce 420 nm. Absorbanci jsme poté přepočítali na koncentraci TAG v séru.

### **6.2.4 Měření koncentrace sérových biochemických parametrů**

#### **6.2.4.1 Koncentrace glukózy v séru**

##### **Materiál a chemikálie**

- glukometr s testačními proužky (ACCU-CHEK Performa, Německo)

##### **Postup**

Glykemii jsme zjišťovali při vykrvení potkanů. Testační proužek jsme vložili do glukometru a nabrali kapku krve, glukometr elektrochemickou metodou změřil koncentraci glukózy v  $\text{mmol.l}^{-1}$ .

#### **6.2.4.2 Koncentrace inzulinu v séru**

##### **Materiál a chemikálie**

- komerční souprava k detekci inzulinu ELISA (Merckodia, Švédsko) - destička s navázanou 1. protilátkou, 2. protilátka, pufr s enzymem (peroxidázou), promývací pufr, chromogenní substrát, stop roztok
- promývačka (BioTek)
- Inkubátor (Microtec)
- Spektrofotometr na destičky (BioTek – Epoch)

## **Postup**

Na připravenou destičku s navázanou primární protilátkou jsme napipetovali 10  $\mu$ l séra, destilované vody jako blanc a standarty. Sekundární protilátku jsme 10 x naředili pufrém s enzymem peroxidázou. Napipetovali jsme 100  $\mu$ l připraveného činidla sekundární protilátky s navázaným enzymem na destičku a vložili ji do inkubátoru na 2 hodiny při 25°C a třepání 700 RPM.

Namíchali jsme si promývací pufr, 1 l destilované vody a 50 ml komerčního koncentrovaného pufru.

Po inkubaci jsme vložili destičku do promývačky s připraveným promývacím pufrém a nechali 6x promýt od nenavázané sekundární protilátky.

Po promytí jsme přidali do destičky 200  $\mu$ l chromogenního substrátu, který vlivem peroxidázové reakce zmodral. Destičku jsme opět vložili na 30 min. do inkubátoru, po inkubaci jsme zastavili reakci pomocí 100  $\mu$ l stop roztoku. Destičku jsme vložili do spektrofotometru, který změřil absorbance při 450 nm a přepočítal na koncentrace.

### **6.2.4.3 Koncentrace triacylglycerolů v séru**

#### **Materiál a chemikálie**

- Centrifuga (Thermo SCIENTIFIC Megafuge)
- Spektrofotometr (Beckman Coulter)
- Komerční souprava na měření TAG v séru (Erba Lachema s.r.o.) - reagens 1, reagens 2

#### **Postup**

Po vykrvení jsme vzorky krve ve zkumavkách stočili v centrifuze a odebrali 10  $\mu$ l séra do kyvety z každého vzorku. Jako standartu jsme použili 10  $\mu$ l reagens 2. Na vzorky jsme poté aplikovali 1 ml komerčního reagens 1 na detekci TAG. Roztok jsme nechali 20 min. reagovat a poté jsme změřili ve spektrofotometru, kterým jsme změřili absorbanci při vlnové délce 420 nm. Absorbanci jsme poté přepočítali na koncentraci TAG v séru.

#### 6.2.4.4 Koncentrace cholesterolu v séru

##### Materiál a chemikálie

- Centrifuga (Thermo SCIENTIFIC Megafuge)
- Spektrofotometr (Beckman Coulter)
- Komerční souprava na měření TAG v séru (Erba Lachema s.r.o.) - reagens 1, reagens 2

##### Postup

Metoda měření koncentrace cholesterolu ze séra je stejná jako měření TAG ze séra, jediný rozdíl je v použití komerční detekční soupravy, která je určena k měření CHOL.

#### 6.2.4.5 Koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin v séru

##### Materiál a chemikálie

- Souprava pro detekci NEMK (ROCHE, Švýcarsko) – roztok A, roztok B, stop roztok
- Vortex
- Spektrofotometr (Beckman Coulter)

##### Postup

Do zkumavky jsme napipetovali 25  $\mu$ l séra a 500  $\mu$ l roztoku A, každý vzorek jsme zamíchali na vortexu. Poté jsme přidali 25  $\mu$ l stop roztoku, zamíchali na vortexu a změřili absorbanci při 546 nm (hodnota A1). Ke vzorkům jsme přidali 25  $\mu$ l roztoku B, zamíchali na vortexu a 15 min. a po té změřili absorbanci při 546 nm (hodnota A2).

Jako blanc jsme použili 25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O namísto séra, postup byl stejný jako se vzorky.

K přepočtu na koncentraci mmol/l jsme použili vzorec:

$$C = \frac{V * \Delta A}{\epsilon * v * d}$$

*V..... celkový konečný objem*

*v.....objem vzorku*

*d.....délka průchodu paprsku*

*$\epsilon$ .....absorbční koeficient*

*$\Delta A$ ...A2 - A1*

#### 6.2.4.6 Koncentrace glycerolu v séru

##### Materiál a chemikálie

- Souprava pro detekci glycerolu v séru (Randox, Velká Británie) – R1a pufr, R1b činidlo, CAL standarda
- Inkubátor (Microtec, Švýcarsko)
- Spektrofotometr na destičky (BioTek – Epoch)
- Destička

##### Postup

Do destičky jsme napipetovali 20  $\mu$ l séra z každého vzorku, jako blanc jsme použili destilovanou vodu. Dále jsme napipetovali 20  $\mu$ l standardy a 40  $\mu$ l standardy. Dále jsme smíchali 15 ml R1a se 100 ml R1b. Do všech jamiček jsme napipetovali 200  $\mu$ l připraveného roztoku a vložili do inkubátoru na 10 min. při 37°C. Poté jsme vložili destičku do spektrofotometru, ten nám změřil absorbance a přepočítal je na koncentrace.

#### 6.2.4.7 Koncentrace triacylglycerolů v játrech a ve svalu

Postup detekce TAG v játrech a svalu je stejný, pouze homogenizace svalů byla ruční pomocí nůžek, k homogenizaci jater jsme použili ponorný homogenizátor.

#### Materiál a chemikálie

- komerční detekční souprava pro TAG (Erba Lachema s.r.o.) - činidlo pro detekci TAG (č.1), standarda (č.2)
- methanol, chloroform, dihydrogenfosforečnan draselný, izopropylalkohol, destilovaná voda
- ponorný homogenizér (Glas-Col)
- Vortex
- Spektrofotometr (Beckman Coulter)
- Ruční homogenizátor

#### Postup

Játra jsme zhomogenizovali pomocí ponorného homogenizátoru a přelili do zkumavky (sval jsme homogenizovali ručně pomocí nůžek). Na vzorek jsme poté aplikovali 5 ml methanolu a 10 ml chloroformu a dřevěným míchátkem rozmíchali. Zkumavky jsme překryli parafilmem a vložili do lednice přes noc. Druhý den jsme ke vzorkům přidali 6 ml 2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , tím se nám vytvořila vodná a tuková fáze. Vzorky jsme opět nechali v lednici přes noc. Třetí den jsme odsáli tukovou fázi a z vodné fáze jsme pomocí pipetmanu odebrali 1 ml do čistých zkumavek. Zkumavky s vodnou fází jsme vložili do hrnce se stojánkem a vroucí vodou a nechali po dobu 20 min. odpařovat v digestoři.

Do odpařené pelety jsme poté přidali 100  $\mu\text{l}$  izopropanolu, rozpustili ji a promíchali na vortexu. Z každého vzorku jsme odebrali 10  $\mu\text{l}$  do kyvety. Na blanc jsme použili izopropanol, na standartu jsme použili roztok č. 2 z komerční detekční soupravy. Na všechny vzorky jsme aplikovali 1 ml komerčního detekčního činidla č. 1 a všechny vzorky jsme promíchali ruční míchátkem. Vzorky jsme vložili do spektrofotometru, který změřil absorbanci při 546 nm, kterou jsme následně přepočítali na koncentraci v mmol/l dle vzorce:

$$(A_{\text{vzorek}}/A_{\text{standarta}}) * C_{\text{standarta}}$$

a přepočítali jsme na hmotnost jater a svalů.

#### 6.2.4.8 Koncentrace cholesterolu v játrech

##### Materiál a chemikálie

- komerční detekční souprava pro CHOL (BIOLATEST<sup>®</sup>) - činidlo pro detekci CHOL R1, standarda R2
- methanol, chloroform, dihydrogenfosforečnan draselný, izopropylalkohol, destilovaná voda
- ponorný homogenizátor (Glas-Col)
- Vortex
- Spektrofotometr (Beckman Coulter)
- Ruční homogenizátor

##### Postup

Postup detekce cholesterolu je téměř stejný jako pro detekci TAG uvedený výše. Rozdíl je v tom, že po oddělení vodné a tukové fáze odebíráme 200 µl z vodné fáze do zkumavky na odpaření.

Po odpaření vodné fáze do pelety přidáme 1 ml komerčního detekčního činidla R1 a promíchali na vortexu. Vzorokly jsme poté přelili do kyvet, jako blanc jsme použili pouze činidlo R1 a jako standartu jsme použili 10 µl činidla R2. Kyvety jsme dali přeměřit do spektrofotometru při 420 nm a absorbanci jsme poté přepočítali na koncentrace podle hmotnosti jater.

Výpočet jsme provedli dle vzorce:

$$M_{mol} = \frac{\Delta A_{sam} - \Delta A_{blanc}}{\Delta A_{cal} - \Delta A_{blanc}} * C_{cal}$$

*Sam....vzorek*

*Cal.....standarda*

#### 6.2.4.9 Inkorporace glukózy do glykogenu a CO<sub>2</sub> v bránici

##### Materiál a chemikálie

- Zkumavky typu „temelínky“, inkubační zkumavky, gumové zátky,
- Inkubační lázeň (Verkon)
- pH metr
- Scintilační detektor
- Bomba s pneumoxidem
- Bikarbonátový pufr (KRB):
  - 100 ml 0,9% NaCl
  - 4 ml 1,15% KCl
  - 1,5 ml 0,11 M CaCl<sub>2</sub>
  - 1 ml 2,11% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 1 ml 3,82% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
  - 21 ml 1,3% NaHCO<sub>3</sub> (1,3 g NaHCO<sub>3</sub> do 100 ml H<sub>2</sub>O, sycený CO<sub>2</sub>)

Připravený roztok jsme sytili 10 min. směsí plynu obsahujícího 5 % CO<sub>2</sub> (pneumoxidem). Poté jsme přidali 90 mg <sup>14</sup>C-U-glukózy a 250 mg albuminu a pomocí HCl a pH metru jsme upravili pH na 7,4.

- Methanol, chloform, glykogen (Sigma-Aldrich), scintilační roztok (Rotiszint, 2%) dihydrogenfosforečnan draselný, 30% hydroxid draselný, inzulin

##### Postup

###### a) Stanovení glykogenu

Do jedné části pufru jsme přidali 25 µl inzulinu/100 ml pufru, druhou část pufru jsme ponechali bez stimulantu. Do temelínek jsme napipetovali 5 ml KRB pufru, přidali bránici a vzduch nad vzorkem jsme sytili pneumoxidem po dobu 1 min. Temelínku jsme poté neprodyšně uzavřeli gumovou zátkou a vložili do vodních lázní, za pomalého třepání, kde se inkubovala po do 2 hodiny při 37°C. Po inkubaci jsme bránici vyjmuli, opláchli ve vodě a vložili do zkumavky, přidali 5 ml methanolu a 10 ml chloroformu, zkumavky uzavřeli a nechali v chladu do druhého dne. Druhý den jsme přidali 6 ml 2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a opět nechali v chladu do druhého dne. Další den jsme odsáli oddělenou vrchní vrstvu roztoku. Bránici jsme vyjmuli a nechali do dalšího dne volně vysušit.

K vysušené bránici jsme přidali 1 ml roztoku 30% KOH s 1% roztokem glykogenu. Dále jsme v tomto roztoku bránici vařili po dobu 2,5 hodiny, dokud se vše nerozvaří. Poté jsme přidali 2,5 ml 96% ethanolu, promíchali na vortexu a nechali 2 hodiny odležet v lednici, zakryté parafilmem. Poté jsme vzorky stočili v centrifuze, supernatant jsme slili. Sediment jsme rozpustili 0,5 ml H<sub>2</sub>O, promíchali na vortexu a odebrali 0,2 ml do zkumavek. Přidali jsme 8 ml scintilačního roztoku Rotiszintu a dali měřit do scintilátoru. Jako standartu jsme použili 1 ml roztoku KRB, smíchaný s 9 ml H<sub>2</sub>O. Odebrali jsme 0,1 ml do zkumavek a přidali 10 ml scintilačního roztoku Rotiszintu.

Výpočet jsme provedli dle vzorce:

$$\text{Imp./g} = \frac{\text{impulz} * 5000}{\text{mg navážky}}$$

$$\text{nmol G./g/2 hod.} = \frac{\frac{\text{imp.}}{\text{g}} * 20}{\text{standarda}}$$

#### b) stanovení CO<sub>2</sub>

Do temelínek jsme napipetovali 5 ml inkubačního media KRB, přidali bránici a prostor nad temelínkou sytili pneumoxidem po dobu 1 min. Temelínku jsme neprodyšně uzavřeli a inkubovali ve vodních lázních po dobu 2 hodiny. Po inkubaci jsme vyjmuli sval a do skleněné temelínky jsme vložili kalíšek, ve kterém byl proužek filtračního papíru, na který jsme aplikovali 0,2 ml Hyaminu a do temelínky s pufrem jsme přidali 0,5 ml 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hyamin je hydroxid a CO<sub>2</sub> se v zásaditém prostředí rozpouští na uhličitán. Přidáním kyseliny se uhličitán vytěsňuje z pufru. Celou temelínku jsme uzavřeli a dali inkubovat do vodních lázní po dobu 45 min. Poté jsme vyjmuli kalíšek s filtračním papírem a vložili ho do zkumavky, ve které jsme měli připraven scintilační roztok Rotiszint a vložili do scintilátoru k přeměření.

Výpočet jsme provedli dle vzorce:

$$\text{imp./g} = \frac{\text{impulz}}{\text{mg navážky}} * 1000$$

$$\text{nmol gl. / g / 2 hod.} = \frac{\frac{\text{imp}}{\text{g}} * 20}{\text{standarda}}$$



#### 6.2.4.10 Lipogeneze v tukové tkáni

##### Materiál a chemikálie

- Inkubační zkumavky, zátky
- Inkubační lázeň (Verkon)
- pH metr (inoLab)
- Vortex
- Scintilační detektor
- bomba s pneumoxidem
- Digestoř
- Bikarbonátový pufr (KRB):
  - 100 ml 0,9% NaCl
  - 4 ml 1,15% KCl
  - 1,5 ml 0,11 M CaCl<sub>2</sub>
  - 1 ml 2,11% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 1 ml 3,82% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
  - 21 ml 1,3% NaHCO<sub>3</sub> (1,3 g NaHCO<sub>3</sub> do 100 ml H<sub>2</sub>O, syčený CO<sub>2</sub>)

Připravený roztok jsme sytili směsí plynu obsahujícího 5 % CO<sub>2</sub> (pneumoxidem). Poté jsme přidali 90 mg <sup>14</sup>C-U-glukózy a 250 mg albuminu a pomocí HCl a pH metru jsme upravili pH na 7,4.

- Methanol, chloform, glykogen (Sigma-Aldrich), Rotiszint, 2% dihydrogenfosforečnan draselný, 30% hydroxid draselný, inzulin, BSA albumin fetálního bovinního séra

##### Postup

Do jedné části pufru jsme přidali 25 µl inzulinu/100 ml pufru, druhou část pufru jsme ponechali bez stimulantu. Do zkumavek s 3 ml inkubačního pufru jsme vložili tukovou tkáň a vzduch nad vzorkem jsme prosytili pneumoxidem po dobu 1 minuty. Nádobku jsme poté neprodyšně uzavřeli gumovou zátkou a inkubovali ve vodní lázni po dobu 2 hodiny, při 37°C, za mírného třepání. Po inkubaci jsme tkáň vyjmuli a vložili do zkumavek, ve kterých bylo 5 ml methanolu a přidali jsme 10 ml chloroformu. Zkumavky jsme nechali odležet do druhého dne v chladu. Další den jsme ke vzorkům přidali 6 ml 2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a nechali v chladu do dalšího dne. Následující den jsme odsáli horní vrstvu

tekutiny a ze spodní vrstvy (chloroformové) jsme odebrali 3 ml do nových zkumavek a nechali odpařit v digestoři. Po odpařenní jsme přidali 10ml scintilačního roztoku Rotiszint a dali jsme přeměřit do scintilátoru.

Na standardu jsme použili 1 ml pufru a 10 ml H<sub>2</sub>O.

Výpočet jsme provedli dle vzorce:

$$\text{imp./g} = \frac{\text{impulz}}{\text{mg navážky}} * 3300$$
$$\text{nmol gl. / g / 2 hod.} = \frac{\frac{\text{imp}}{\text{g}} * 20}{\text{standarda}}$$

### **6.2.5 Inkorporace palmitátu v hnědé tukové tkáni do lipidů nebo do CO<sub>2</sub>**

Inkorporaci palmitátu do lipidů jsme měřili stejnou metodou, jak je popsána v kapitole 7.2.8., s tím rozdílem, že jsme místo radioaktivně značené <sup>14</sup>C-U-glukózy použili <sup>14</sup>C-U-palmitát a jako stimulant jsme použili inzulin 25 µl/100 ml pufru.

Inkorporace palmitátu do CO<sub>2</sub> byla provedena stejnou metodou jako je popsána v kapitole 7.2.7. b).

## 6.2.6 Lipolýza v tukové tkáni

### Materiál a chemikálie

- Inkubační lázeň (Verkon)
- pH metr (inoLab)
- Vortex
- Scintilační detektor
- Bomba s pneumoxidem
- Digestoř
- Fosfátový pufr (KRF):
  - 100 ml 0,9% NaCl
  - 4 ml 1,15% KCl
  - 1,5 ml 0,11 M CaCl<sub>2</sub>
  - 1 ml 0,154M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,06 g / 50 ml)
  - 1 ml 0,154M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1,91 g / 50 ml)
  - 10,9 ml 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (17,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O + 1N HCl do 1000 ml H<sub>2</sub>O)

Ke 100 ml pufru jsme přidali 3 g albuminu a pomocí 0,1N NaOH a pH metru jsme upravili pH na 7,4.

- Methanol, chloform, glykogen (Sigma-Aldrich), Rotiszint, 2% dihydrogenfosforečnan draselný, 30% hydroxid draselný
- Adrenalin, BSA albumin fetálního bovinního séra

### Postup

Do části pufru jsme napipetovali 250 µl adrenalinu/100 ml pufru, druhou část pufru jsme ponechali bez stimulantu. Do zkumavek jsme napipetovali 3 ml pufru a vložili tukovou tkáň. Zkumavky jsme poté vložili do vodní lázně a nechali inkubovat po dobu 2 hodiny při 37°C a mírném třepání. Po inkubaci jsme odebrali 1,5 ml media do mikrozkušavek. Poté jsme stanovovali NEMK a glycerol dle protokolu, které jsou uvedeny na str. 42 a 43.

Koncentraci NEMK jsme vypočítali dle vzorce:

$$\mu\text{mol/g} = \frac{c \cdot 3000}{\text{navážka (mg)}}$$

## 6.2.7 Obsah bílkovin v tukové tkáni

### Materiál a chemikálie

- skleněné trychtýře, filtrační papíry
- Digestoř
- Spektrofotometr (Beckman Coulter)
- Roztok A – 1N NaOH
- Roztok B – 0,5% roztok síranu měďnatého v 1% vinanu sodnodraselném
- Roztok C – 2% roztok Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bezvodý v 0,1N NaOH
- Roztok D – 50 ml roztoku C + 1 ml roztoku B
- Roztok E – Folinovo agens + H<sub>2</sub>O v poměru 1:1,2
- Roztok tyrozinu – 100 mg tyrozinu ve 100ml 0,1N HCL

### Postup

Vzorky zvážené tukové tkáně jsme vložili do zkumavky a spolu s 10 ml NaOH dali rozvařit do digestoře. Po rozvaření a vychladnutí jsme dali vzorky přefiltrovat do čistých zkumavek přes dva filtrační papíry umístěnými ve trychtýři. Na blanc jsme použili 0,5 ml 1N NaOH.

Dále jsme použili 2 standarty, 1. standarta vznikla smícháním 100 µl tyrozinového roztoku a 9,9 ml 1N NaOH, 2. standarta vznikla smícháním 200 µl tyrosinového roztoku a 9,8 ml 1N NaOH. Obě standarty jsme promíchali na vortexu.

Z filtrátů, blancu i standart jsme odebrali 0,5 ml do čisté zkumavky, přidali jsme 2,5 ml roztoku D, protřepali jsme a nechali 10 minut odležet. Po odležení jsme přidali 0,5 ml roztoku E, opět jsme protřepali a nechali odležet 30 minut.

Všechny zkumavky jsme poté přelili do kyvet a přeměřili ve spektrofotometru při 690 nm.

Výpočet obsahu bílkovin v procentech jsme provedli dle vzorce:

$$\text{Extinkce vzorku/standarta } \cdot 2 \cdot 120 / \text{navážka vzorku}$$

## 6.2.8 Koncentrace adipokinů v séru

Měřili jsme koncentrace leptinu, adiponektinu a rezistinu v séru, pomocí komerčních souprav Uscn ELISA.

### Materiál a chemikálie

- Komerční souprava ELISA (Uscn, Čína) – destička s navázanou protilátkou, standardní ředící roztok, standardní roztok, ředící činidlo A, ředící činidlo B, koncentrovaný promývací roztok, činidlo A, činidlo B, roztok substrátu, stop roztok
- Vortex
- Inkubátor (Microtec)
- Promývačka na destičky (BioTek)
- Spektrofotometr pro destičky (BioTek – Epoch)

### Postup

Jako první jsme připravili standardní roztok – tabletu jsme naředili v 1ml standardního ředidla abychom docílili koncentrace 20 µg/ml. Připravili jsme si 8 mikrozkušavek do kterých jsme napipetovali 0,5 ml standardního ředidla. Do první mikrozkušavky jsme napipetovali k ředidlu 0,5 ml standardního roztoku a promíchali. Z první mikrozkušavky jsme odebrali 0,5 ml naředěného roztoku a napipetovali do druhé mikrozkušavky, v tomto ředění jsme pokračovali do 7. mikrozkušavky, 8. mikrozkušavku jsme nechali pouze se standardním ředícím roztokem.

Dále jsme připravili ředidlo A a B, naředili jsme je s destilovanou vodou v poměru 1:1 do 12ml. Ředidlo A a činidlo A jsme smíchali v poměru 1:1, stejně tak ředidlo a činidlo B. Dále jsme naředili 20 ml promývacího roztoku do 580 ml destilované vody.

Do destičky s navázanou protilátkou jsme napipetovali 100 µl blancu, standardy postupně dle ředění a vzorky. Destičku jsme dali inkubovat na 2 hodiny při 37°C do inkubátoru. Po inkubaci jsme obsah destičky vylili a důkladně vyklepli. Dále jsme přidali 100 µl roztoku A a destičku opět vložili do inkubátoru na 1 hodinu při 37°C. Destičku jsme poté vložili do promývačky a 3x promyli, po promytí opět vyklepli. Do destičky jsme napipetovali roztok B a vložili do inkubátoru na 30 min. při 37°C. Po inkubaci jsme 5x promyli v promývačce. Přidali jsme 100 µl roztoku substrátu a vložili do inkubátoru

na 20 min., během inkubace roztok zmodral. Poté jsme napipetovali 50  $\mu$ l stop roztoku, který zežloutl. Ihned po zastavení reakce jsme destičku vložili do spektrofotometru na destičky, který nám zěřil absorbance i koncentrace.

#### **6.2.9 Vyhodnocení výsledků**

Výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  standardní odchylka průměru (SEM), v grafech jsou odchylky vyznačeny pomocí svislých chybových úseček. Významnost rozdílů mezi skupinami byla vyhodnocena pomocí T testu, statistická významnost byla stanovena na  $p < 0,05$ .

## 7 Výsledky

V této části budou uvedeny výsledky dvou experimentů. V prvním experimentu jsou popsány výsledky pokusu, kdy jsme sledovali aktivitu iBAT mezi kmeny HHTG a kontrolním kmenem Wistar, v závislosti na věku. Vzhledem k výsledkům z prvního experimentu, jsme navázali druhým experimentem, kde jsme sledovali vliv extrirpace iBAT na parametry metabolického syndromu u kmene HHTG, v závislosti na věku.

### 7.1 Aktivita hnědé tukové tkáně na parametry metabolického syndromu u kmene HHTg a Wistar v závislosti na věku

V tomto experimentu jsme porovnávali dva kmeny potkanů, HHTg a Wistar. V každém kmenu jsme porovnávali dvě věkové skupiny, konkrétně potkany ve věku 2 měsíce a 12 měsíců. Sledovali jsme hmotnost tkáni, sérové parametry, ektopické ukládání tuku, inkorporaci glukózy v bránici, inkorporaci palmitové kyseliny v hnědé tukové tkáni, obsah bílkovin v hnědé tukové tkáni, obsah bílkovin v epididymální tukové tkáni a lipogenezi v epididymální tukové tkáni.

#### 7.1.1 Vliv kmene a věku na hmotnost

Srovnávali jsme celkovou hmotnost a relativní hmotnost epididymální tukové tkáně (ETT), hnědé tukové tkáně (BAT) a jater v poměru 1 g tkáně/100g tělesné váhy (t.v.) mezi kmeny HHTG a Wistar a věkem 2 měsíce a 12 měsíců.

Kmen HHTg měl nižší celkovou hmotnost ve srovnání s kmenem Wistar v obou věkových skupinách, potkani ve věku 12 měsíců měli hmotnost oproti kmenu Wistar signifikantně nižší o 35 % (tab.3).

Relativní hmotnost ETT u kmene HHTg ve věku 2 měsíce byla hmotnost ETT o 35 % nižší oproti kmenu Wistar. U starších skupin potkanů nebyli významné rozdíly mezi kmeny.

Hmotnost BAT byla signifikantně vyšší u mladších skupin obou kmenů. U kmene HHTg ve věku 2 měsíce hmotnost nižší o ~ 20 % oproti kmenu Wistar. Ve věku 12 měsíců však hmotnost BAT byla vyšší u kmene HHTg oproti kmenu Wistar o ~ 33 % (graf 1).

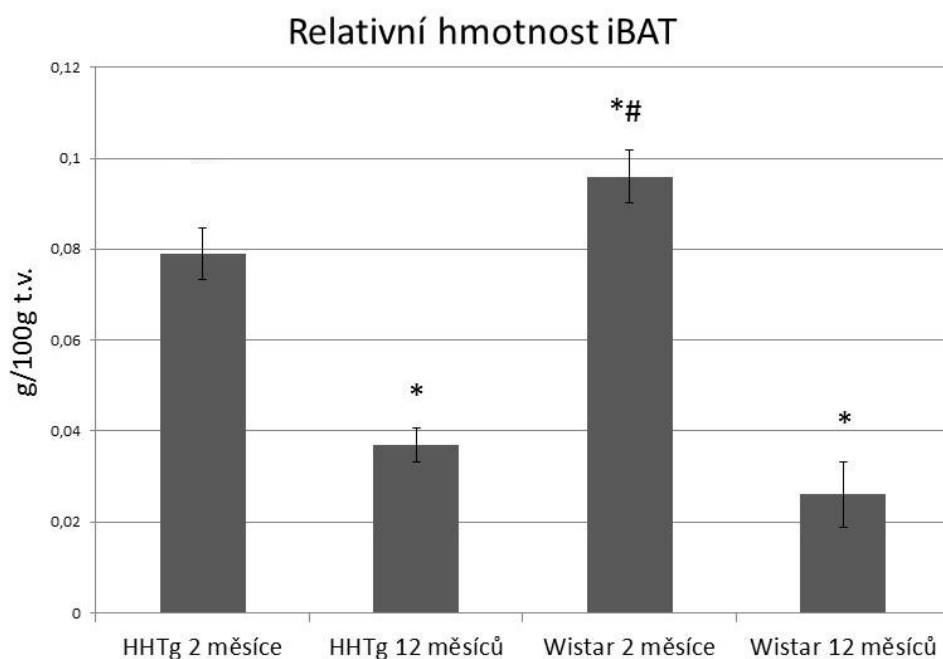
Hmotnost jater se u mladších skupin obou kmenů významně nelišila, u věkových skupin 12 měsíců měli potkani kmene HHTg nižší hmotnost jater oproti kmenu Wistar o ~ 25 % (tab. 3).

**Tab.3:** Rozdíly kmene a věku v absolutní a relativní hmotnost.

parametr	HHTG		Wistar	
	2 měsíce	12 měsíců	2 měsíce	12 měsíců
celková hmotnost (g)	145 ± 6,23	539 ± 14,75 *#	177 ± 2,47 *#	831 ± 42,71 *#
ETT (g/100g ž.v.)	0,4 ± 0,02	2,385 ± 0,04 *	0,653 ± 0,05 *#	2,441 ± 0,35 *
játra (g/100g ž.v.)	5,149 ± 0,11	2,875 ± 0,09 *	5,419 ± 0,09	3,776 ± 0,54

Průměrné celkové hmotnosti měřených potkanů a relativní hmotnosti epididymální tukové tkáně a jater (g tkáně/ 100g živé váhy).

\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)



**Graf 1:** Relativní hmotnost iBAT mezi kmeny HHTg a Wistar. U obou kmenů byla hmotnost iBAT signifikantně vyšší ve věku 2 měsíce. Ve věku 12 měsíců mají potkani kmene HHTg vyšší relativní hmotnost iBAT oproti kmenu Wistar

\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)



### 7.1.2 Sérové biochemické parametry

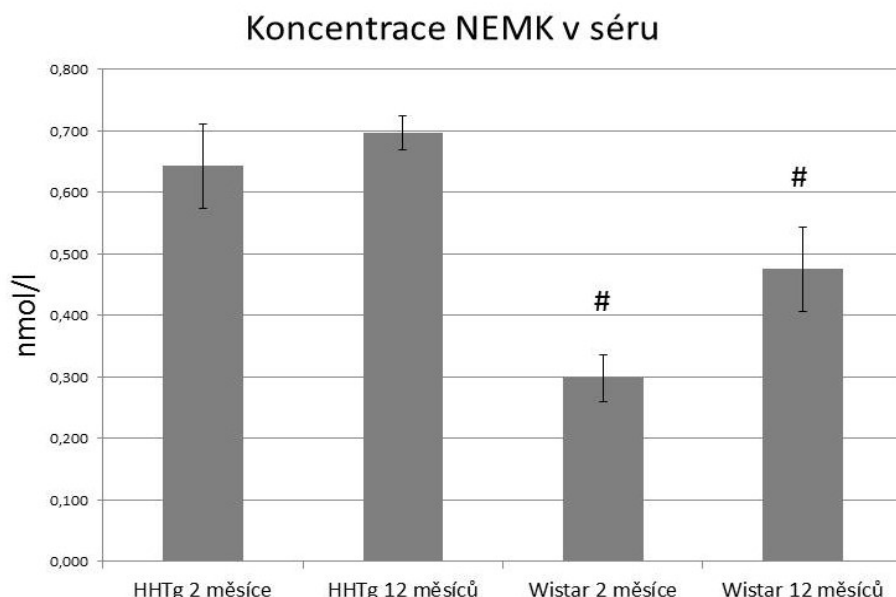
Srovnávali jsme koncentrace parametrů triacylglycerolu (TAG), cholesterolu (CHOL) a volných mastných kyselin (NEMK) v séru mezi kmeny HHTg a Wistar a věkem 2 měsíce a 12 měsíců. Koncentrace TAG v séru byla u kmene HHTg vyšší u obou věkových skupin více než dvojnásobně. Ve věku 2 měsíce byla koncentrace TAG u kmene HHTg vyšší o ~ 160 % oproti kmenu Wistar (tab. 4). Koncentrace CHOL v séru byla nižší u kmene HHTg ve věku 12 měsíců oproti kmenu Wistar ~ 42 % (tab. 4). Koncentrace NEMK v séru byla u kmene HHTg vyšší v obou věkových skupinách, u věkové skupiny 2 měsíců byla u kmene HHTg vyšší o ~ 100 %, u věkové skupiny 12 měsíců byla vyšší o ~ 40 % u kmene HHTg oproti kmenu Wistar (graf 2).

**Tab 4:** Rozdíly kmene a věku v biochemických parametrech.

parametr	HHTg		Wistar	
	2 měsíce	12 měsíců	2 měsíce	12 měsíců
TAG (nmol/l)	3,183 ± 0,23	7,884 ± 1,2 *	1,219 ± 0,1 #	5,161 ± 1,4 *
CHOL (nmol/l)	2,042 ± 0,05	2,858 ± 0,21 *	2,121 ± 0,11	6,652 ± 1,33 *#

Parametry byly detekovány ze séra při vykrvení. Měřili jsme triacylglyceroly a celkový cholesterol.

\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)



**Graf 2:** Rozdíly hladiny volných mastných kyselin v séru mezi skupinami potkanů kmene HHTg a Wistar a mezi věkovými skupinami 2 měsíce a 12 měsíců.

\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)

### **7.1.3 Ektopické ukládání tuku**

Srovnávali jsme koncentrace parametrů TAG a CHOL v játrech a TAG ve svalu mezi kmeny HHTg a Wistar a věkem 2 měsíce a 12 měsíců.

Koncentrace TAG v játrech byla u kmene HHTg vyšší u obou věkových skupin, ve věku 12 měsíců byla u HHTg signifikantně vyšší o 100 % oproti kmenu Wistar (graf 3).

Koncentrace CHOL v játrech byla u obou věkových skupin HHTg nižší oproti kmenu Wistar, ve věku 12 měsíců byla u kmene HHTg hodnota nižší o ~ 42 % oproti kmenu Wistar (tab. 5).

Koncentrace TAG ve svalu byla u obou věkových skupin kmene HHTg nižší oproti kmenu Wistar. Ve věku 2 měsíců byla hodnota kmene HHTg nižší o ~ 75 % oproti kmenu Wistar, ve věku 12 měsíců byla hodnota nižší o ~ 88 % u kmene HHTg oproti kmenu Wistar (tab. 5).

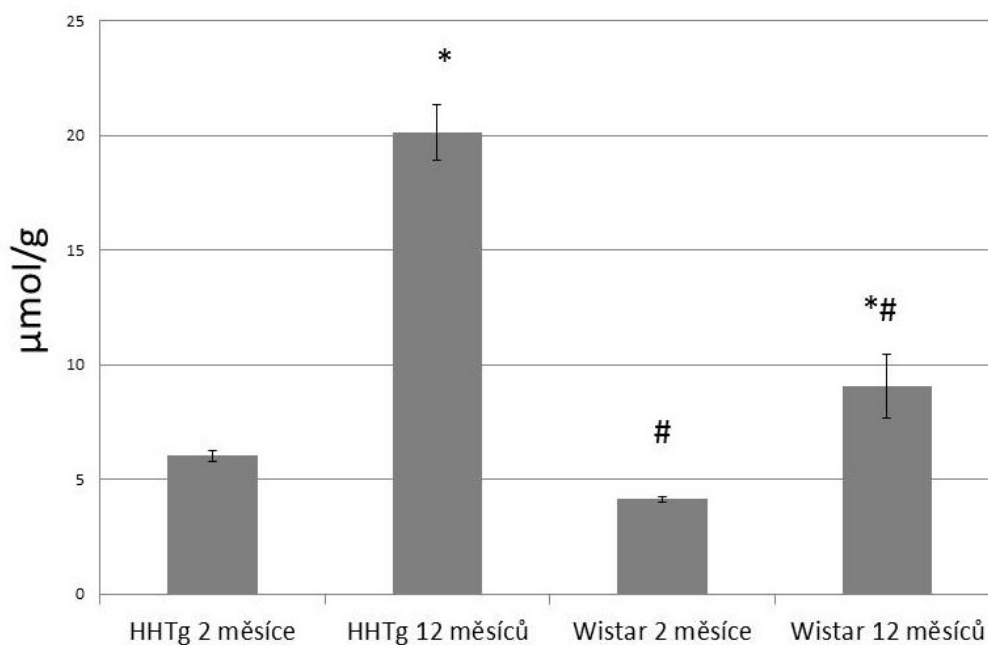
**Tab. 5:** Rozdíly kmene a věku v množství triacylglycerolů v játrech, svalu a srdci a cholesterolu v játrech.

parametr	HHTg		Wistar	
	2 měsíce	12 měsíců *	2 měsíce	12 měsíců *#
CHOL v játrech (μmol/g)	7,636 ± 0,17	6,945 ± 0,21 *	8,328 ± 0,34	9,358 ± 0,74 *#
TAG ve svalu (μmol/g)	0,603 ± 0,06	0,822 ± 0,11	2,603 ± 0,41 #	7,183 ± 1,35 *#

\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)

#### 7.1.4

#### Koncentrace TAG v játrech



**Graf 3:** Ektopické ukládání TAG v játrech mezi kmeny a věkovými skupinami.

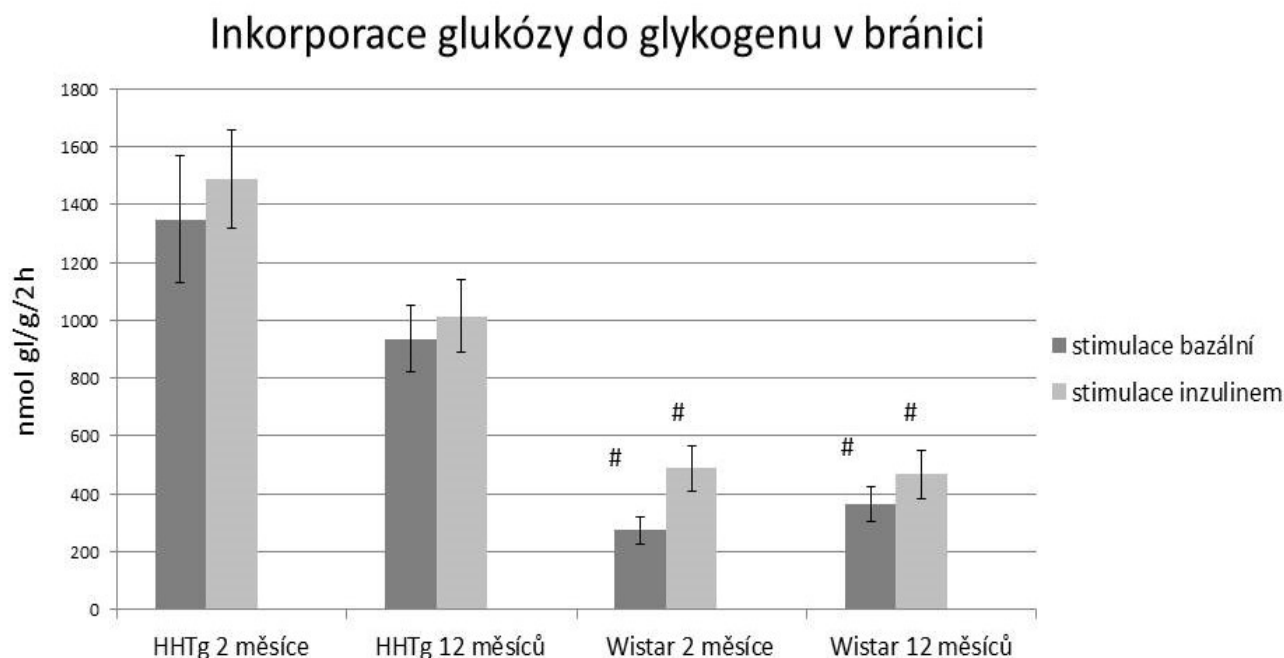
\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)

## Inkorporace glukózy v bránici

Měřili jsme schopnost bránice inkorporovat radioaktivně značenou  $^{14}\text{C}$ -U-glukózu do glykogenu v závislosti na stimulaci inzulinem, což nám ukazuje citlivost tkáně k inzulinu mezi kmeny HHTG a Wistar a věkem 2 měsíce a 12 měsíců.

Inkorporace glukózy do glykogenu byla vyšší u kmene HHTg oproti kmenu Wistar v obou věkových skupinách. Ve věku 2 měsíce byla bazální inkorporace glukózy do glykogenu dokonce o ~ 78 % vyšší u kmene HHTg oproti kmenu Wistar.

Stimulace inzulinem mírně zvýšila inkorporaci glukózy do glykogenu u všech skupin.



**Graf 4:** Rozdílly kmene a věku v inkorporaci glykogenu v bránici. Měřili jsme inkorporaci glukózy do glykogenu bazálně, nebo stimulací pomocí inzulinu. Glykogeneze u kmene HHTg byla signifikantně vyšší oproti kmenu Wistar.

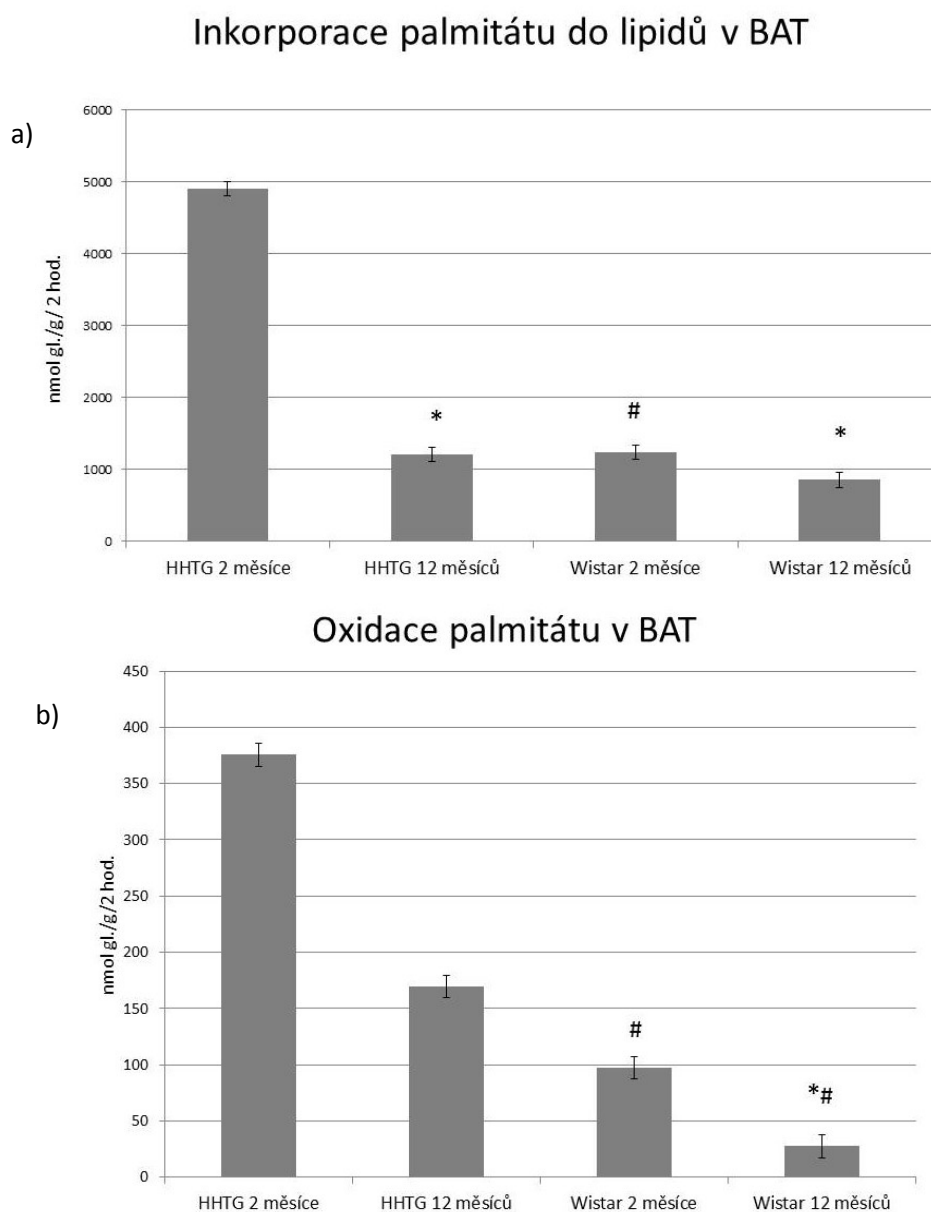
\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)

### 8.1.5. Inkorporace palmitátu v hnědé tukové tkáni

Měřili jsme schopnost BAT inkorporovat radioaktivně značený  $^{14}\text{C}$ -U-palmitát do lipidů anebo jeho oxidaci mezi kmeny HHTg a Wistar a věkem 2 měsíce a 12 měsíců.

Inkorporace palmitátu do lipidů byla u kmene HHTg signifikantně vyšší v obou věkových skupinách, ve věku 2 měsíce byla vyšší o ~ 400 % oproti kmenu Wistar.

Oxidace palmitátu byla u kmene HHTg také signifikantně vyšší v obou věkových skupinách oproti kmenu Wistar. Ve věku 2 měsíce byla oxidace palmitátu vyšší o ~ 400 % u kmene HHTg a ve věku 12 měsíců byla inkorporace vyšší o 300 % u kmene HHTg oproti kmenu Wistar (graf 5).



**Graf 5:** Srovnání ukládání a spalování lipidů v iBAT mezi HHTg a Wistar potkany. U všech skupin byla vyšší inkorporace palmitátu do lipidů (a) než do  $\text{CO}_2$  (b).

\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)

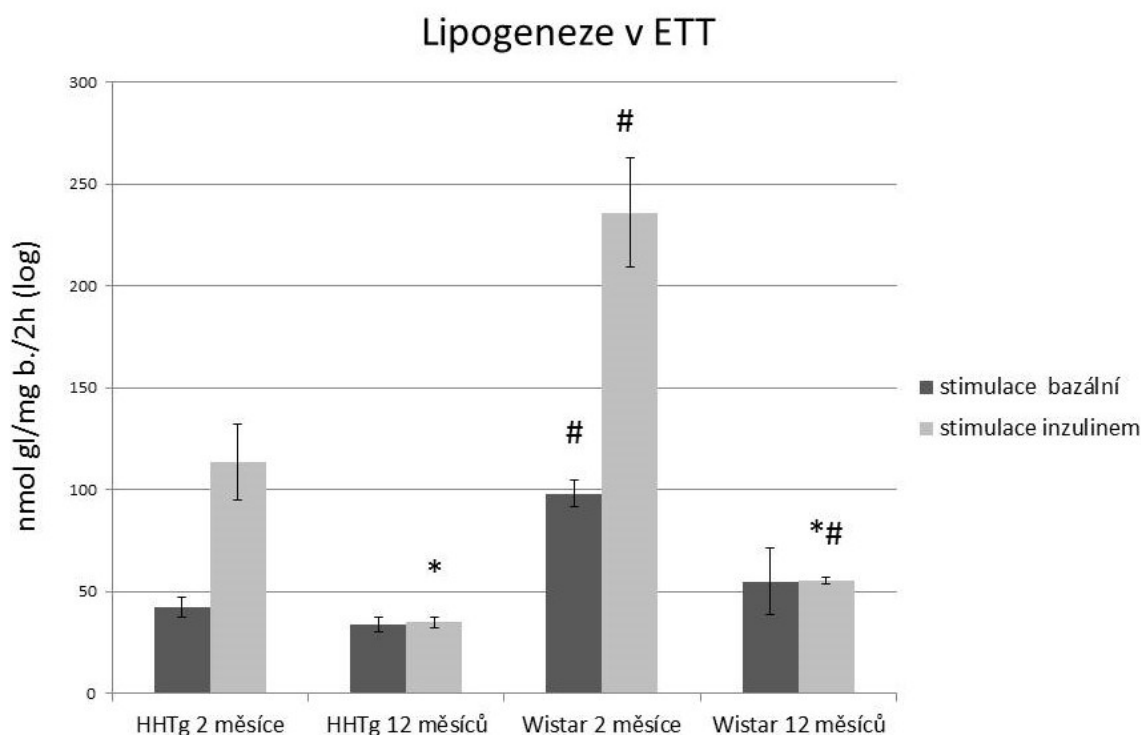
### 7.1.5 Inkorporace glukózy do lipidů v epididymální tukové tkáni

Měřili jsme schopnost ETT inkorporovat radioaktivně značenou  $^{14}\text{C}$ -U-glukózu do lipidů mezi kmeny HHTg a Wistar a věkem 2 měsíce a 12 měsíců. Dále jsme měřili vliv stimulace inzulinem na inkorporaci glukózy do ETT.

Bez stimulace inzulinem byla inkorporace glukózy do ETT nižší u kmene HHTg u obou věkových skupin. U skupiny kmene HHTg ve věku 2 měsíce byla inkorporace nižší o ~ 60 % oproti kmenu Wistar (graf 6).

V případě stimulace inzulinem byla inkorporace glukózy do lipidů také nižší u kmene HHTg oproti kmenu Wistar. Ve věku 2 měsíce byla inkorporace nižší o ~ 55 % u kmene HHTg oproti kmenu Wistar.

V ETT je znatelný efekt stimulace inzulinem ve věku 2 měsíce, což značí citlivost tkáně k inzulinu, ve věku 12 měsíců už není téměř rozdíl oproti bazálnímu stavu bez stimulace, což poukazuje na rezistenci tkáně inzulinu.



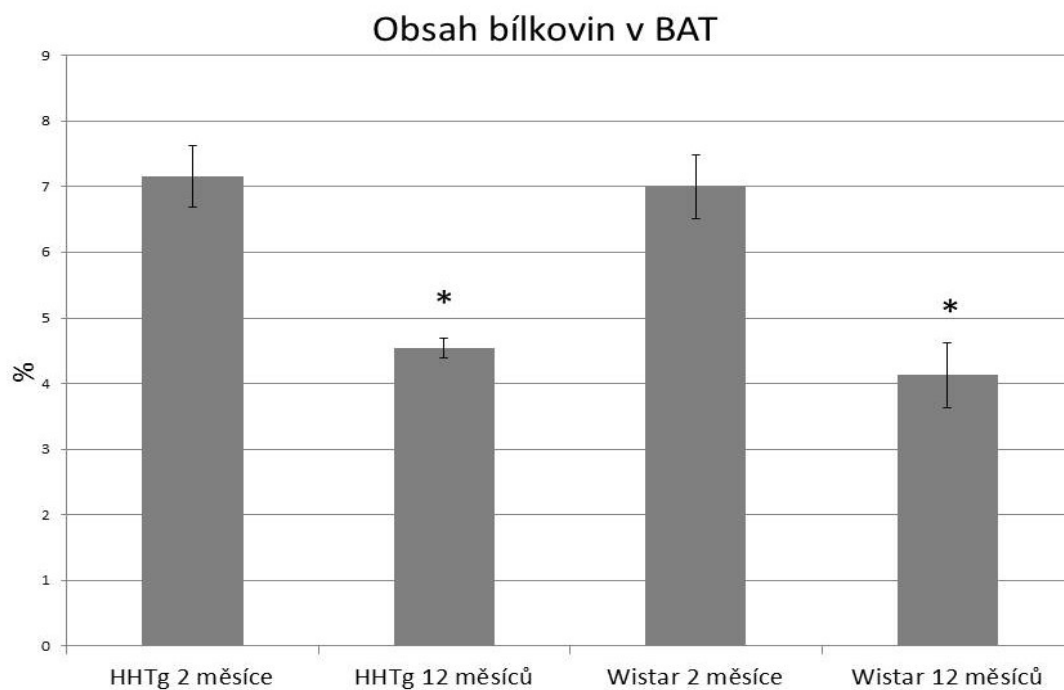
**Graf 6:** Rozdíly kmene a věku v inkorporaci glukózy do lipidů v epididymální tukové tkáni. Byla měřena bazálně, nebo stimulací pomocí inzulinu.

\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)

### 7.1.6 Obsah bílkovin v hnědě tukové tkáni

Měřili jsme obsah bílkovin v iBAT mezi kmeny HHTg a Wistar a věkem 2 měsíce a 12 měsíců, za účelem zjištění velikosti buněk. Velikost buněk tukové tkáně negativně koreluje s aktivitou, čím vyšší bílkovin tkáň obsahuje, tím menší buňky se v tkáni nachází a tím vyšší je aktivita tukové tkáně.

Obsah bílkovin v iBAT byl vyšší ve věku 2 měsíce oproti skupinám ve věku 12 měsíců u obou kmenů. Mezi kmeny nebyly žádné významné rozdíly, projevíly se ale věkové rozdíly. Mladší skupiny potkanů měli signifikantně vyšší obsah bílkovin oproti starším skupinám o ~ 57 % (graf 7).



**Graf 7:** Srovnání kmene a věku v procentuálním zastoupení bílkovin v hnědě tukové tkáni.

\*  $p < 0,05$  (věk), #  $p < 0,05$  (kmen)

### 7.1.7 Vliv extirpace iBAT na parametry metabolického syndromu

Vzhledem k výsledkům z prvního experimentu následoval experiment extirpace iBAT a její vliv na parametry MS. Srovnávali jsme dvě věkové skupiny potkanů kmene HHTg, konkrétně potkany staré 5 týdnů a 18 měsíců a také časový efekt extirpace. Data byla získávána první a třetí týden od extirpace. Sledovali jsme parametry hmotnosti, extrakci lipidů z krve, sérové biochemické parametry, koncentraci adipokinů v séru, ektopické ukládání lipidů, obsah bílkovin v tukové tkáni, lipogenezi a lipolýzu v epididymální tukové tkáni, inkorporaci palmitové kyseliny v hnědé tukové tkáni a inkorporaci glukózy v bránici.

### 7.1.8 Vliv extirpace iBAT na tělesnou hmotnost a relativní hmotnost orgánů

Srovnávali jsme celkovou hmotnost a relativní hmotnost epididymální tukové tkáně (ETT) a jater v poměru 1 g tkáně/100 g tělesné váhy (t.v.) mezi kontrolními skupinami a operovanými, ve vztahu k věku a časovému efektu operace.

Celková hmotnost a hmotnost ETT se napříč skupinami extirpovaných a kontrolních významně nelišila, pouze s věkem se hmotnost přiměřeně zvětšovala.

Hmotnost jater se mezi skupinami operovaných a kontrolních také nelišila, ovšem s věkem se hmotnost jater snížila téměř na polovinu.

**Tab. 6:** Vliv extirpace iBAT na celkovou hmotnost, relativní hmotnost ETT a jater ve vztahu k věku na hmotnost.

parametr	HHTG		Wistar	
	2 měsíce	12 měsíců	2 měsíce	12 měsíců
celková hmotnost (g)	145*#	539*#	177*#	831*#
ETT (g/100g žv)	0,4*#	2,385*	0,653*#	2,441*
BAT (g/100g žv)	0,079*#	0,037*	0,096*#	0,026*
játra (g/100g žv)	5,149*	2,875*	5,419	3,776

Vliv extirpace na absolutní celkovou hmotnost a na relativní hmotnosti epididymální tukové tkáně a jater (g tkáně/ 100g živé váhy).

\*  $p < 0,05$  (extirpace), #  $p < 0,05$  (doba), ž.v. = živé váhy

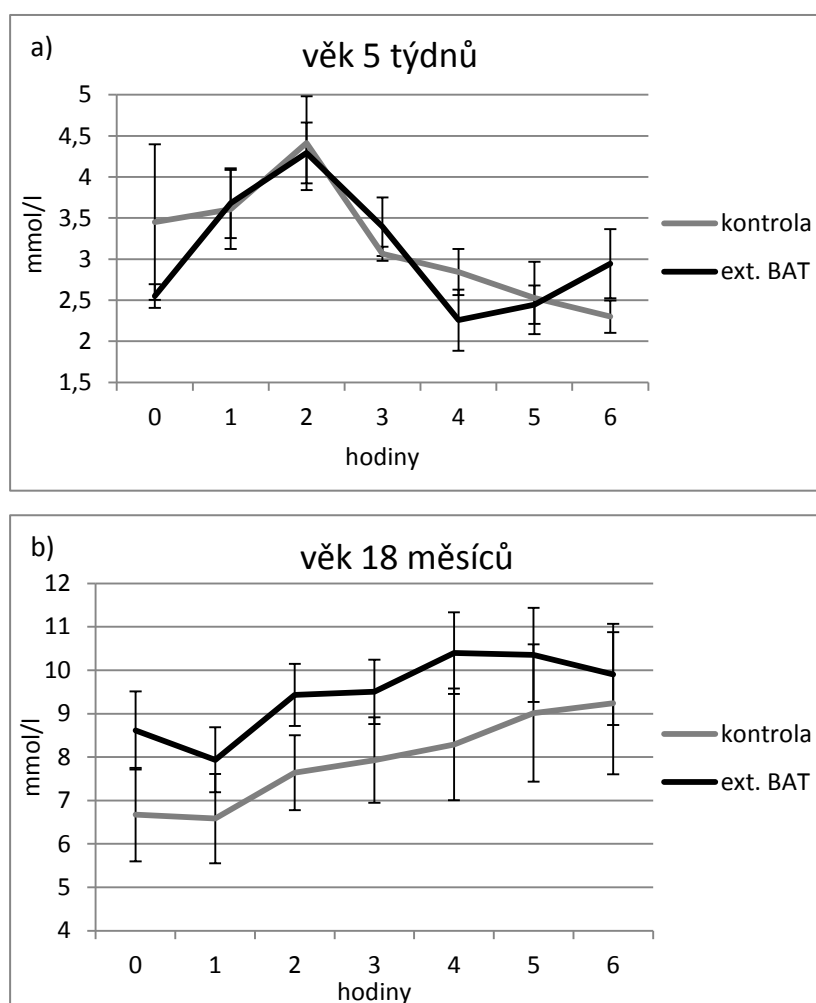


### 7.1.9 Orální lipidový toleranční test

Měřili jsme koncentraci TAG v séru v průběhu šesti hodin po aplikaci řepkového oleje (3 ml starším a 1,5 ml mladším) mezi kontrolními a operovanými skupinami, ve vztahu k věku a časovému efektu operace.

U skupiny potkanů starých 5 týdnů měli extirpovaní potkani bazálně nižší hodnotu TAG oproti kontrolní o ~ 30 % ale měli strmější nárůst hladiny TAG v průběhu prvních tří hodin. Pokles hladiny TAG byl shodný v obou skupinách, ale 6. hodinu po aplikaci byla hodnota TAG nižší u extirpovaných oproti kontrolním a poté se hladina dokonce zvýšila.

U skupiny potkanů starých 18 měsíců byla hodnota TAG v krvi již bazálně vyšší oproti potkanům starým 5 týdnů a po celou dobu odběrů se mírně zvyšovala. Hodnoty extirpovaných potkanů však byly vyšší oproti kontrolní skupině potkanů po celou dobu odběrů (graf 8).



**Graf 8:** Rozdíly v orálním lipidovém tolerančním testu potkanů kmene HHTG ve věku 5týdnů (a) a 18 měsíců (b), mezi operovanou a kontrolní skupinou. Časová osa znázorňující hodnoty TAG v séru odebírané každou hodinu. V čase 0 je bazální hodnota TAG v séru před aplikací oleje.

### 7.1.10 Vliv extirpace iBAT na sérové biochemické parametry

Srovnávali jsme koncentrace parametrů glukózy, inzulinu, triacylglycerolu (TAG), cholesterolu (CHOL), volných mastných kyselin (NEMK) a glycerolu v séru mezi kontrolními a operovanými skupinami, ve vztahu k věku a časovému efektu extirpace.

Parametry glukózy, TAG, CHOL a NEMK se nijak významně nelišily. Parametr koncentrace inzulinu byl u extirpovaných potkanů starých 5 týdnů vyšší oproti kontrole 7 dní po operaci, během času se však tento parametr srovnal na přibližnou hodnotu s kontrolní skupinou. U potkanů starých 18 měsíců byla koncentrace inzulinu 7 dní po extirpaci téměř shodná, ovšem 21 dní po operaci došlo k poklesu koncentrace inzulinu téměř na polovinu oproti kontrolní skupině (tab. 7).

Parametr koncentrace glycerolu byl u extirpovaných potkanů starých 5 týdnů snížený o ~ 40 % oproti kontrolní skupině 7 dní po operaci, ovšem 21 dní po extirpaci se tento rozdíl vyrovnal. U extirpovaných potkanů starých 18 měsíců byla koncentrace glycerolu také signifikantně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou, ovšem tento rozdíl přetrvával i 21 dní po operaci (tab. 7).

**Tab. 7:** Srovnání biochemických parametrů ve vztahu k extirpaci a věku potkanů.

věk 5 týdnů	7 dní po operaci		21 dní po operaci	
	kontrola	extirpace	kontrola	extirpace
Glukóza (mmol/l)	8,37 ± 0,05	8,26 ± 0,070	8,3 ± 0,15	8,22 ± 0,22
Inzulin (nmol/l)	0,085 ± 0,02	0,132 ± 0,02	0,172 ± 0,02	0,164 ± 0,02
TAG (mmol/l)	3,68 ± 0,23	2,63 ± 0,15 *	5,09 ± 0,36	4,1 ± 0,64
Cholesterol (mmol/l)	1,84 ± 0,01	1,66 ± 0,15 *	1,67 ± 0,36	1,75 ± 0,64
NEMK (mmol/l)	0,82 ± 0,05	0,61 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,35 ± 0,05 #
Glycerol (mmol/l)	104,62 ± 7,14	61,69 ± 5,41*	56,92 ± 6,0	56 ± 10,6

věk 18 měsíců	7 dní po operaci		21 dní po operaci	
	kontrola	extirpace	kontrola	extirpace
Glukóza (mmol/l)	8,55 ± 0,44	7,79 ± 0,13	7,83 ± 0,15	7,66 ± 0,21
Inzulin (nmol/l)	0,38 ± 0,09	0,36 ± 0,03	0,59 ± 0,11	0,36 ± 0,04
TAG (mmol/l)	7,12 ± 0,67	6,7 ± 0,62	7,94 ± 0,99	8,5 ± 0,70
Cholesterol (mmol/l)	2,42 ± 0,29	2,36 ± 0,11	2,19 ± 0,15	2,19 ± 0,14
NEMK (mmol/l)	0,75 ± 0,12	0,71 ± 0,06	1,07 ± 0,02	0,94 ± 0,07 #
Glycerol (mmol/l)	260,77 ± 30,1	170,87 ± 12,2 *	203,64 ± 17,6	160,29 ± 26,6

Parametry jsou naměřeny ze séra při vykrvení.

\*  $p < 0,05$  (extirpace), #  $p < 0,05$  (doba)

### 7.1.11 Koncentrace adipokinů v séru

Měřili jsme koncentrace adiponektinu, leptinu a rezistinu mezi kontrolními a extirpovanými skupinami, ve vztahu k věku a časovému efektu operace. Koncentrace adiponektinu se u potkanů starých 5 týdnů mírně snížila oproti kontrole, po 21 dnech od extirpace se však koncentrace adiponektinu oproti kontrole mírně zvýšila (tab.8).

Koncentrace leptinu byla vyšší u všech skupin potkanů starých 18 měsíců. Po extirpaci u potkanů starých 5 týdnů se koncentrace leptinu mírně zvýšila oproti kontrole, v průběhu času se však tento rozdíl zmenšil. U potkanů starých 18 měsíců byla koncentrace leptinu u extirpovaných mírně snižena (tab. 8).

Koncentrace rezistinu se u extirpovaných potkanů starých 5 týdnů významně snížila 21 dní po operaci o ~ 43 % oproti kontrolní skupině. U potkanů starých 18 měsíců však nedošlo k významným změnám v koncentraci rezistinu (graf 9).

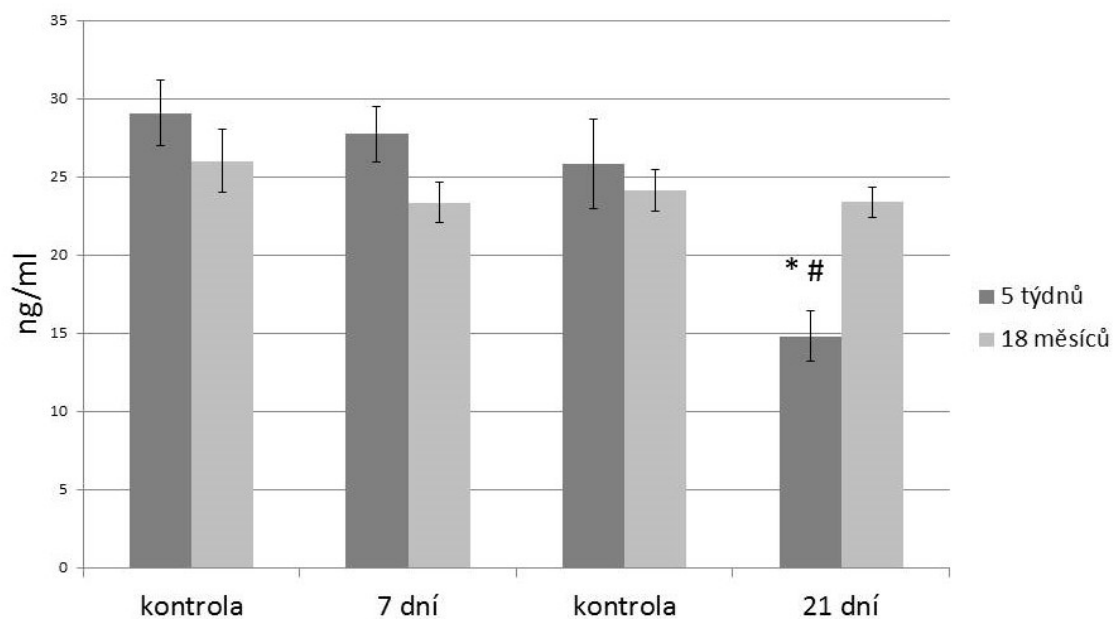
**Tab. 8:** Hodnoty hormonů v závislosti na extirpaci a věku.

	parametr	7 dní po operaci		21 dní po operaci	
		kontrola	extirpace	kontrola	extirpace
věk 5 týdnů	adiponektin (µg/ml)	10,67 ± 0,09	8,25 ± 1,63	10,2 ± 0,89	11,16 ± 0,67
	leptin (ng/ml)	0,46 ± 0,28	0,63 ± 0,19	0,42 ± 0,01	0,53 ± 0,19
věk 18 měsíců	adiponektin (µg/ml)	10,48 ± 0,57	11,51 ± 0,65	10,85 ± 0,77	11,39 ± 0,34
	leptin (ng/ml)	1,63 ± 0,21	1,4 ± 0,21	1,63 ± 0,29	1,38 ± 0,1

Hodnoty jsou detekované ze séra a naměřené metodou ELISA testu.

\*  $p < 0,05$  (extirpace), #  $p < 0,05$  (doba)

## Koncentrace rezistinu v séru



**Graf 9:** Koncentrace rezistinu v séru ve vztahu k extirpaci a věk. U potkanů starých 5 týdnů jsme pozorovali signifikantní pokles koncentrace rezistinu vzhledem ke kontrolní skupině i době od operace.

\*  $p < 0,05$  (extirpace), #  $p < 0,05$  (doba)

### 7.1.12 Vliv extirpace iBAT na ektopické ukládání tuku

Srovnávali jsme obsah parametrů TAG a CHOL v játrech, TAG ve svalu a v srdci mezi kontrolními a extirpovanými skupinami, ve vztahu k věku a časovému efektu operace (tab. 10).

Obsah TAG v játrech se u potkanů starých 5 týdnů první týden po extirpaci zvýšil o ~ 50 % oproti kontrole, ovšem v průběhu času se hodnoty vyrovnaly ve srovnání s kontrolní skupinou. U potkanů starých 18 měsíců se koncentrace TAG v játrech statisticky významně nelišila, nastal však mírný pokles u extirpovaných potnaků oproti kontrolám. Koncentrace CHOL v játrech se u potkanů starých 5 týdnů významně nelišila, u potkanů starých 18 měsíců se koncentrace CHOL u extirpovaných významně snížila 21 dní od extirpace.

Koncentrace TAG ve svalu se významně nelišila oproti kontrolním skupinám u potkanů starých 5 týdnů. U potkanů starých 18 měsíců se koncentrace TAG ve svalu po extirpaci snížila o ~ 33 % oproti kontrolní skupině, ale po 21 dnech se hodnoty s kontrolní skupinou vyrovnaly.

**Tab. 10:** Vliv extirpace a věku na ektopické ukládání TAG v játrech, svalu a srdci a cholesterolu v játrech.

	parametr	7 dní po operaci		21 dní po operaci	
		kontrola	extirpace	kontrola	extirpace
<b>věk 5-ti týdnů</b>	TAG v játrech (μmol/g)	5,068 ± 0,51	7,431 ± 2,08	6,19 ± 0,88	6,284 ± 0,74
	CHOL v játrech (μmol/g)	5,383 ± 0,73	5,77 ± 0,26	4,47 ± 0,42	5,053 ± 0,16
	TAG ve svalu (μmol/g)	1,767 ± 0,33	2,404 ± 0,36	4,156 ± 0,65	3,012 ± 0,81
	TAG v srdci (μmol/g)	1,648 ± 0,21	1,993 ± 0,08	2,188 ± 0,08	1,856 ± 0,21
<b>věk 18-ti měsíců</b>	TAG v játrech (μmol/g)	22,13 ± 3,27	19,75 ± 1,52	23,154 ± 1,57	20,72 ± 2,19
	CHOL v játrech (μmol/g)	9,06 ± 1,1	9,98 ± 0,71	7,068 ± 0,64	6,22 ± 0,45 #
	TAG ve svalu (μmol/g)	9,383 ± 2,19	6,29 ± 0,67	8,294 ± 3,97	8,63 ± 0,89
	TAG v srdci (μmol/g)	1,73 ± 0,08	1,36 ± 0,11	1,88 ± 0,21	1,109 ± 0,06 *

Dle tabulky nedošlo k žádným změnám ve srovnání s kontrolními skupinami, kromě hodnoty TAG v srdci, kdy došlo ke zvýšení koncentrace TAG u potkanů starých 18 měsíců, 21 dní od operace oproti kontrolní skupině.

\*  $p < 0,05$  (extirpace), #  $p < 0,05$  (doba)

### 7.1.13 Obsah bílkovin ve vybraných ložiscích tukové tkáně

Měřili jsme obsah bílkovin v podkožní tukové tkáni, epididymální t.t., hnědé t.t. a v tukové tkáni kolem ledvin mezi kontrolními a extirpovanými skupinami potkanů, ve vztahu k věku a časovému efektu operace, za účelem zjištění velikosti buněk. Velikost buněk tukové tkáně negativně koreluje s její aktivitou. Čím vyšší obsah bílkovin v tukové tkáni, tím menší jsou buňky a proto se dá předpokládat vyšší aktivita tukové tkáně (tab. 11).

Obsah bílkovin v podkožní t.k. u potkanů starých 5 týdnů byl 7 dní po extirpaci zvýšený o 30 % oproti kontrole, avšak 21 dní od operace se rozdíl oproti kontrole snížil. U potkanů starých 18 měsíců jsme nezaznamenali téměř žádný rozdíl v porovnání s kontrolami u podkožní tukové tkáně.

Obsah bílkovin v tukové tkáni kolem ledvin byl u extirpovaných potkanů starých 5 týdnů dokonce o ~ 15 % nižší oproti kontrole, u potkanů starých 18 měsíců byl obsah bílkovin téměř shodný s kontrolními skupinami.

Obsah bílkovin v epididymální tukové tkáni nebyl mezi kontrolami a extirpovanými potkany výrazně odlišný, u mladších potkanů však byl obsah bílkovin mírně vyšší.

Obsah bílkovin v BAT byl měřen pouze u kontrol. U mladších potkanů byl rozdíl v obsahu bílkovin signifikantně vyšší oproti starším skupinám potkanů.

**Tab. 11:** Obsah bílkovin v tukové tkáni v závislosti na extirpaci a věku.

		7 dní po operaci		21 dní po operaci	
		tuková tkáň	kontrola	extirpace	kontrola
<b>věk 5 týdnů</b>	podkožní (%)	2,077 ± 0,07	2,723 ± 0,1 *	2,05 ± 0,21	2,164 ± 0,2
	epididymální (%)	1,49 ± 0,09	1,9 ± 0,11	1,25 ± 0,04	1,109 ± 0,042
	BAT (%)	6,61 ± 0,32 #	N	N	N
	kolem ledvin (%)	7,159 ± 0,77	6,1 ± 0,54	6,28 ± 0,97	5,44 ± 0,36
<b>věk 18 měsíců</b>	podkožní (%)	1,126 ± 0,188	1,175 ± 0,08	1,001 ± 0,11	1,126 ± 0,13
	epididymální (%)	0,65 ± 0,041	0,64 ± 0,008	1,03 ± 0,056	0,9 ± 0,06
	BAT (%)	4,14 ± 0,05	N	4,75 ± 0,14	N
	kolem ledvin (%)	4,449 ± 0,82	4,146 ± 0,45	3,329 ± 0,33	3,817 ± 0,29

*Bílkoviny byly měřeny v podkožní tukové tkáni, kolem ledvin, v epididymální tukové tkáni a v hnědé tukové tkáni u ledvin.*

*\* p < 0,05 (extirpace), # p < 0,05 (doba), ≠ p < 0,05 (věk), N = neměřeno*

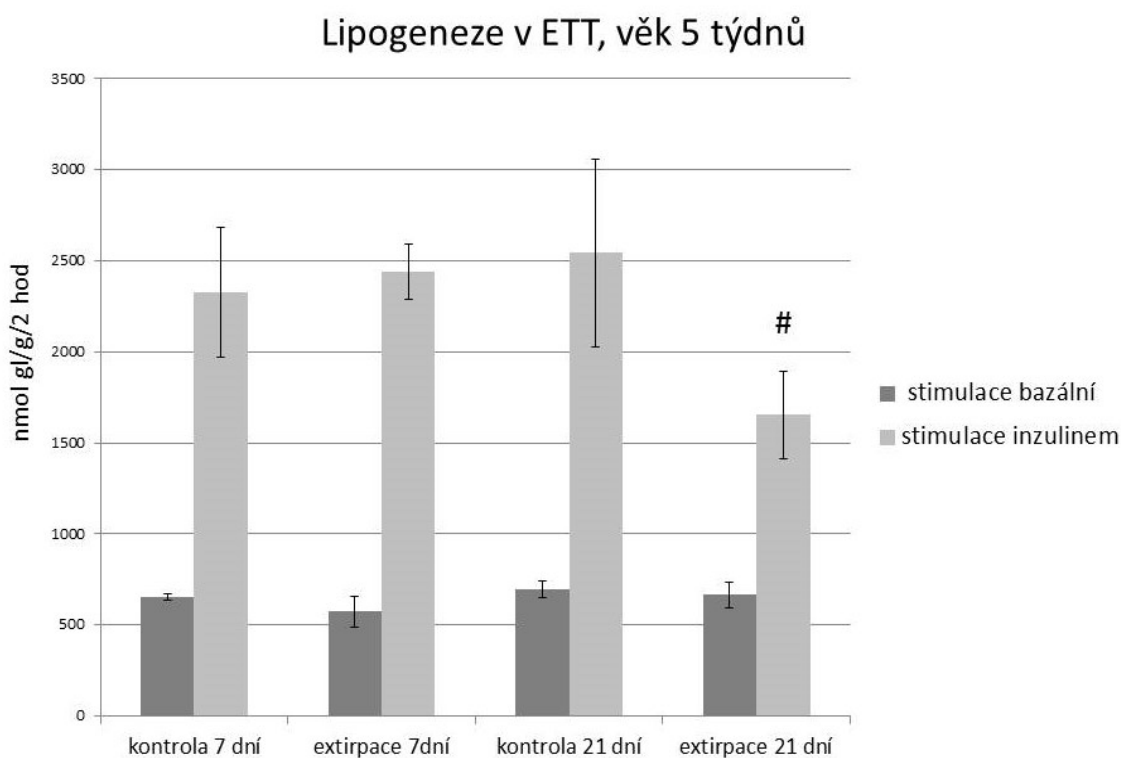
### 7.1.14 Lipogeneze v epididymální tukové tkáni

Měřili jsme schopnost ETT inkorporovat radioaktivně značenou  $^{14}\text{C}$ -U-glukózu do lipidů mezi kontrolními a operovanými skupinami, ve vztahu k věku a časovému efektu operace.

Bazální inkorporace glukózy do lipidů se s věkem signifikantně snížila, ovšem žádný významný rozdíl kontrolních skupin oproti operovaným jsme nezaznamenali.

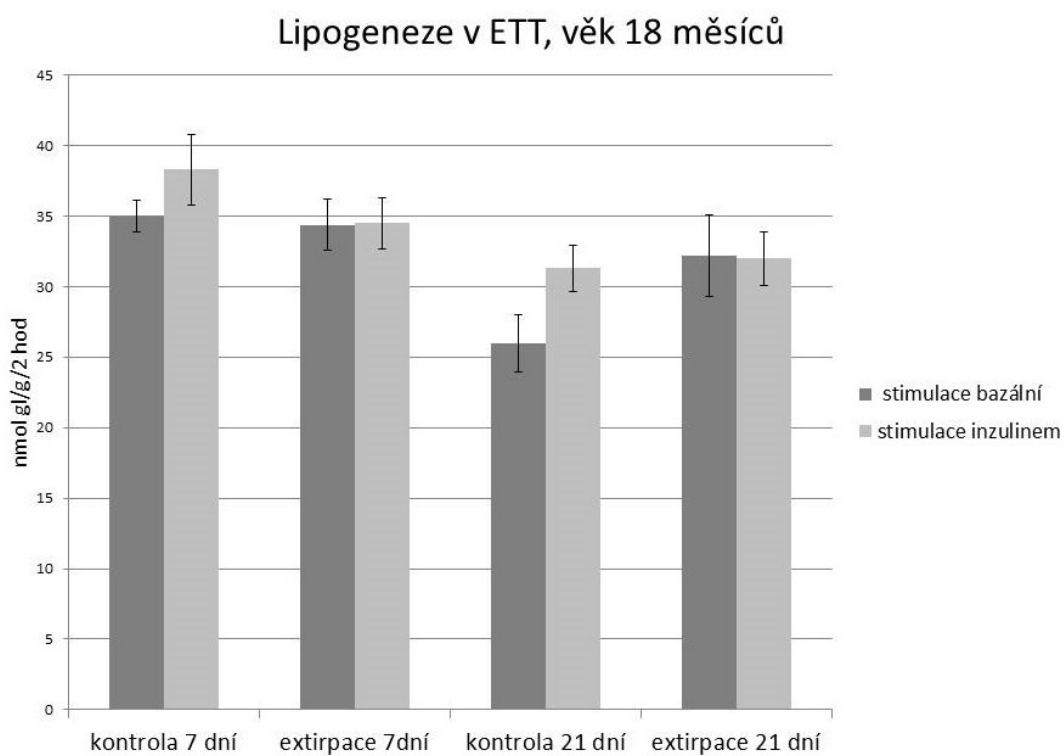
Inzulinem stimulovaná inkorporace do lipidů byla u potkanů starých 5 týdnů signifikantně vyšší až o  $\sim 300\%$  (graf 10), u potkanů starých 18 měsíců naopak stimulace inzulinem neměla téměř žádný efekt (graf 11).

U potkanů starých 5 týdnů však extirpace snížila inzulinem stimulovanou inkorporaci glukózy do lipidů oproti kontrolní skupině téměř o  $40\%$  (graf 10). U potkanů starých 18 měsíců jsme však nezaznamenali v inzulinem stimulované inkorporaci glukózy významný rozdíl mezi skupinami (graf 11).



**Graf 10:** Inkorporace glukózy v epididymální tukové tkáni u potkanů věku 5 týdnů. Lipogeneze byla měřena bazálně a stimulací pomocí inzulinu.

\*  $p < 0,05$  (extirpace), #  $p < 0,05$  (doba)



**Graf 11:** Inkorporace glukózy v epididymální tukové tkáni u potkanů věku 18 měsíců. Lipogeneze byla měřena bazálně a stimulací pomocí inzulínu.

\*  $p < 0,05$  (extirpace), #  $p < 0,05$  (doba)

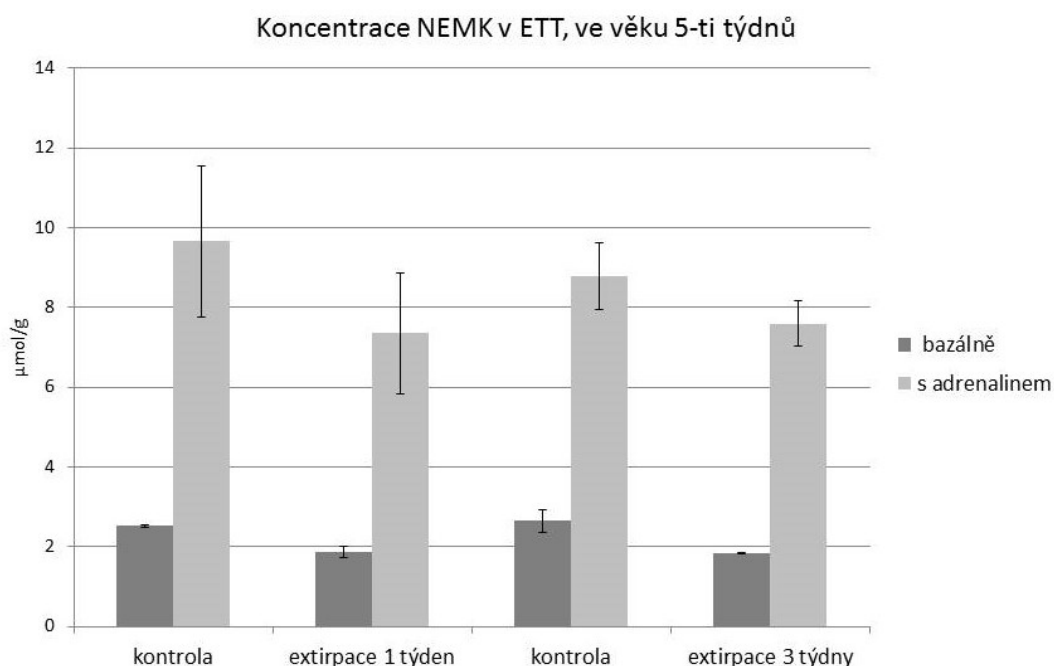


### 7.1.15 Lipolýza v epididymální tukové tkáni

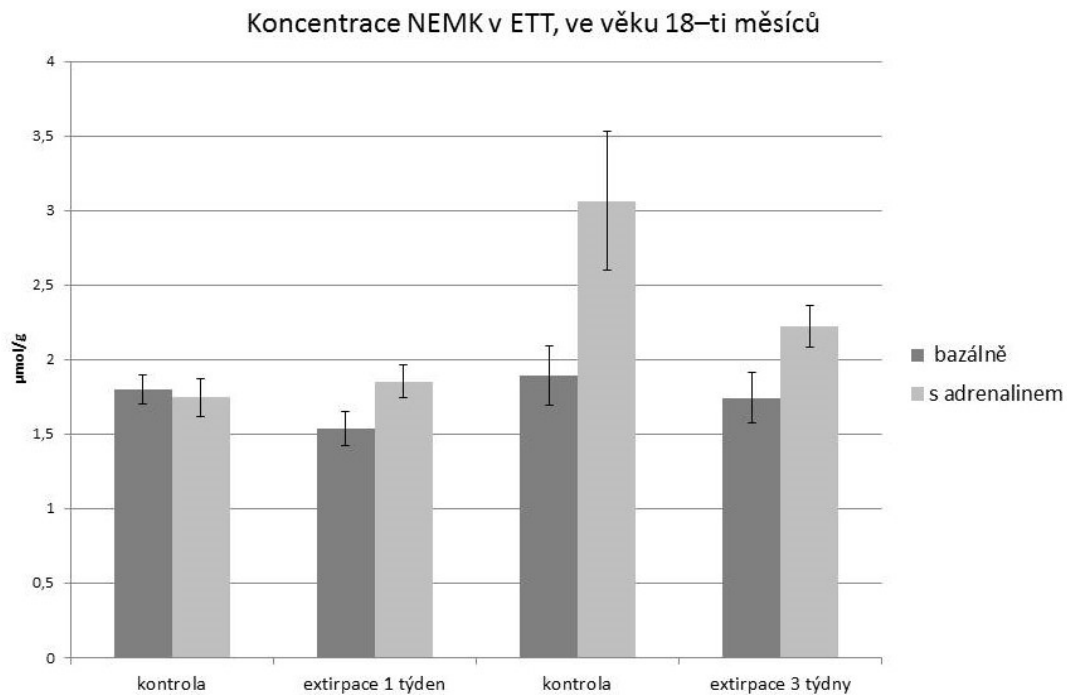
Srovnávali jsme míru lipogeneze v ETT mezi kontrolními a operovanými skupinami, ve vztahu k věku a časovému efektu operace. Měřili jsme koncentraci NEMK a glycerolu bazálně a po stimulaci adrenalinem.

Koncentrace NEMK byla bazálně mezi věkovými skupinami přibližně stejná. Při stimulaci adrenalinem se projevil statisticky významný rozdíl v produkci NEMK mezi věkovými skupinami. Mladší skupina potkanů měla signifikantně vyšší míru uvolňování NEMK oproti skupině potkanů starých 18 měsíců (graf 12, graf 13).

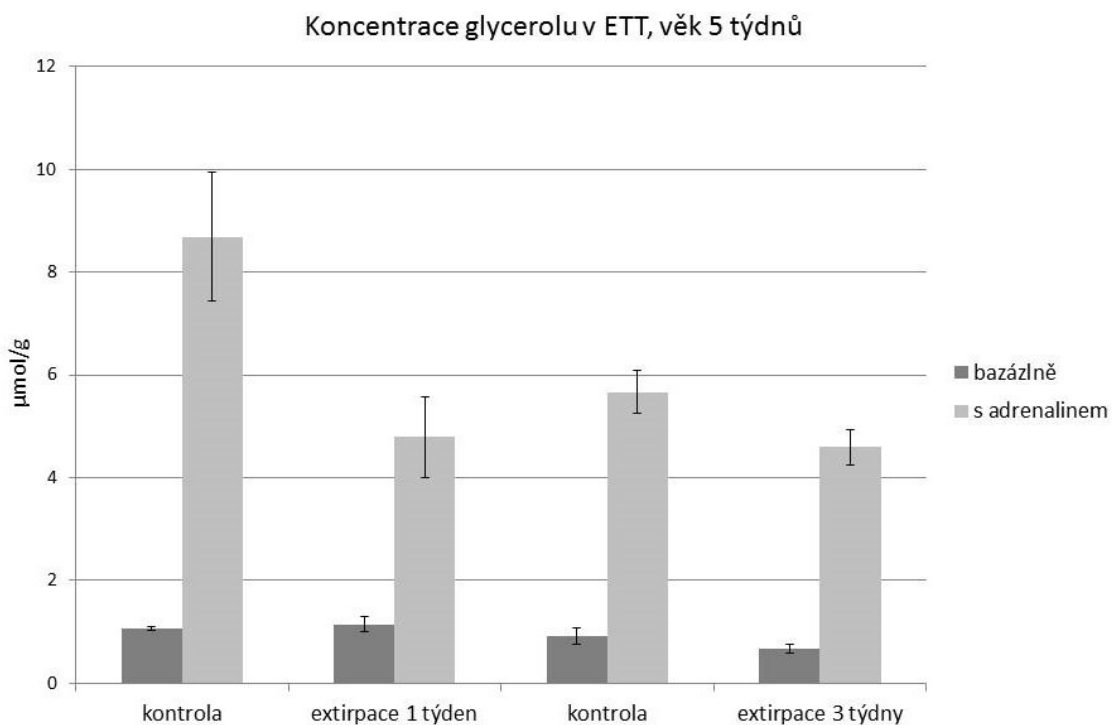
Koncentrace glycerolu bazálně byla mezi věkovými skupinami opět téměř shodná. Při stimulaci adrenalinem se projevil statisticky významný rozdíl mezi věkovými skupinami. Mladší skupina potkanů měla výrazně vyšší odpověď k inzulinu a produkce glycerolu byla signifikantně vyšší oproti starší skupině potkanů (graf 14, graf 15).



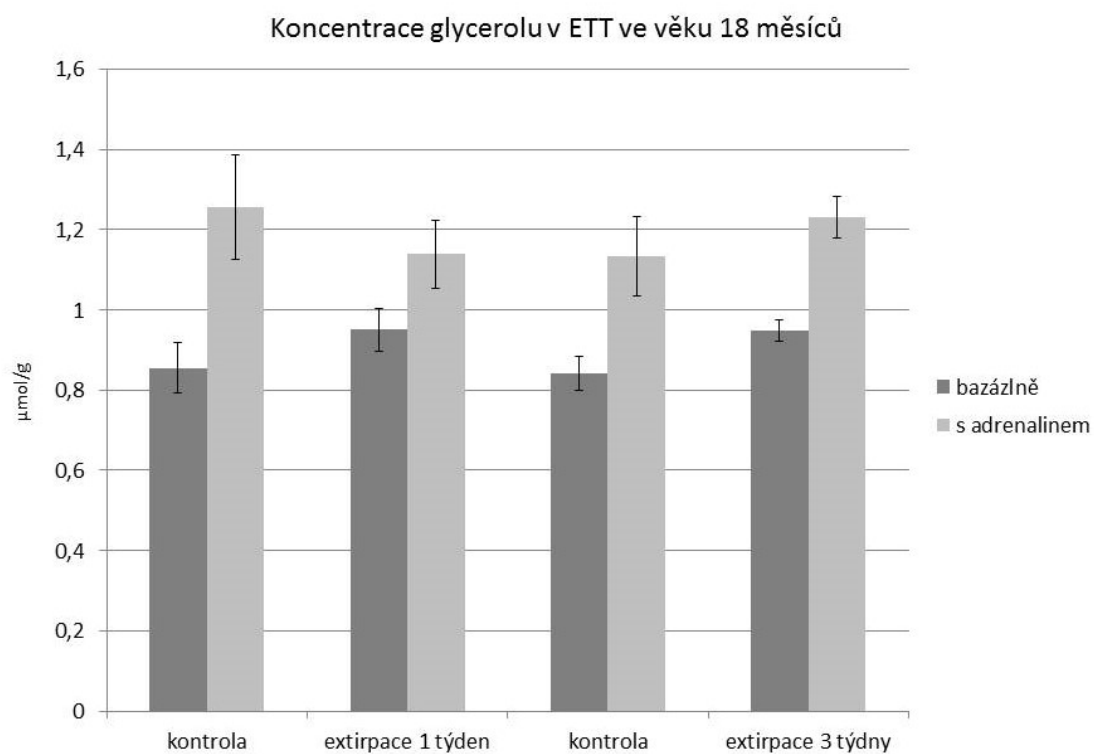
**Graf 12:** Rozdíly v koncentraci NEMK v ETT, ve věku 5-ti týdnů bazálně a při stimulaci adrenalinem, mezi extirpovanými a kontrolními skupinami.



**Graf 13:** Rozdíly v koncentraci NEMK v ETT ve věku 18-ti měsíců, bazálně a při stimulaci adrenalinem, mezi extirpovanými a kontrolními skupinami.



**Graf 14:** Rozdíly v koncentraci glycerolu v ETT, ve věku 5-ti týdnů bazálně a při stimulaci adrenalinem, mezi věkovými skupinami a mezi extirpovanými a kontrolními skupinami.



**Graf 15:** Rozdíly v koncentraci glycerolu v ETT, ve věku 18-ti týdnů bazálně a při stimulaci adrenalinem, mezi věkovými skupinami a mezi extirpovanými a kontrolními skupinami.

### 7.1.16 Vliv extirpace iBAT na inkorporaci glukózy ve svalu (bránici)

Měřili jsme schopnost bránice inkorporovat radioaktivně značenou  $^{14}\text{C}$ -U-glukózu do glykogenu a oxidaci v závislosti na stimulaci inzulinem, což nám ukazuje citlivost tkáni k inzulinu mezi kontrolními a operovanými skupinami, ve vztahu k věku a časovému efektu operace.

Inkorporace glukózy do glykogenu byla bazálně u mladších potkanů 21 dní od operace signifikantně vyšší oproti kontrole, u skupiny starších potkanů byla glykogeneze vyšší po 21 dnech od operace ve srovnání se skupinou potkanů 7 dní od operace, ale kontrolní skupina měla také vyšší hodnoty. Stimulace inzulinem měla efekt na vyšší inkorporaci glukózy do glykogenu u všech skupin. U starší skupiny potkanů byla 7 dní po operaci významně snížená glykogeneze stimulovaná inzulinem oproti kontrolní skupině o ~ 25 % a také 21 dní po operaci byla vyšší inkorporace oproti skupině 7 dní od operace, ovšem opět shodně s kontrolní skupinou (tab. 12).

V oxidaci glukózy nebyl pozorován efekt inzulinu v žádné skupině. U skupiny potkanů starých 5 týdnů 21 dní od operace poklesla oxidace glukózy do oproti skupinám 1 týden od operace, u extirpovaných potkanů, ale i u kontrolní skupiny.

U skupiny potkanů starých 18 měsíců 21 dní od operace bylo pozorováno mírné zvýšení oxidace glukózy, ale pouze u kontrolní skupiny a nebylo statisticky významné. (tab. 13).

**Tab. 12:** Vliv extirpace a věku na inkorporaci glukózy do glykogenu v bránici.

		7 dní po operaci		21 dní po operaci	
stimulace		kontrola	extirpace	kontrola	extirpace
věk 5-ti týdnů	bazální	2164,0 ± 234,5	1992,0 ± 197,3	1079,0 ± 159,7	1917 ± 252,5 *
	s inzulinem	3017,0 ± 306,7	2824,0 ± 235,7	2091,0 ± 262	2689,0 ± 342
věk 18-ti měsíců	bazální	1073,0 ± 135	889,0 ± 94,2	1631,0 ± 308,3	1380 ± 128,5 #
	s inzulinem	1855,0 ± 117	1405 ± 64,2 *	2451,0 ± 204,2	2210 ± 128,4 #

Inkorporaci jsme měřili bazálně a za stimulace inzulinem.

\*  $p < 0,05$  (extirpace), #  $p < 0,05$  (doba)

**Tab. 13:** Vliv extirpace a věku na inkorporaci glukózy do CO<sub>2</sub> v bránici.

	stimulace	7 dní po operaci		21 dní po operaci	
		kontrola	extirpace	kontrola	extirpace
<b>věk 5 týdnů</b>	bazální	290,39 ± 14,8	299,3 ± 14,5	214,82 ± 14,7	221,81 ± 12,1 #
	s inzulinem	294,33 ± 33,5	300,83 ± 17,8	214,5 ± 6,9	235,08 ± 24,9
<b>věk 18 měsíců</b>	bazální	97,95 ± 4,3	91,65 ± 5,5	123,77 ± 13,0	96,24 ± 12,4
	s inzulinem	100,59 ± 1,2	80,96 ± 4,0	124,51 ± 9,4	84,97 ± 13,5

Inkorporaci jsme měřili bazálně a za stimulace inzulinem.

\*  $p < 0,05$  (extirpace), #  $p < 0,05$  (doba)

## 8 Diskuze

Hnědá tuková tkáň je unikátní termoregulační orgán vyskytující se pouze u savců. Funkcí hnědé tukové tkáně je přeměňovat energii ve formě protonového gradientu na energii tepelnou a zároveň snižovat efektivitu metabolismu, spalováním MK. Díky této unikátní vlastnosti je v posledních letech hnědé tukové tkáni věnována značná pozornost, jelikož její funkce se zdá být nadějí v léčbě metabolického syndromu a komplikací s ním spojených (Roman et al., 2015).

Její efekt v léčbě MS však stále není objasněn a proto jsme chirurgicky odstranili tuto tkáň u potkanů, kteří trpí metabolickým syndromem, abychom objasnili důsledky extirpace na parametry metabolického syndromu.

Obezita je diagnostikována jen v 75% případů pacientů s metabolickým syndromem. Podobný jev je pozorován na laboratorním kmenu HHTg potkanů, kteří i přes odpovídající parametry MS (například hypertriacylglycerolémie nebo vyšší hodnoty NEMK v cirkulaci) (Vrána and Kazdová, 1990; Vrána et al., 1993) nevykazují znaky obezity. Zdá se proto, že právě tento kmen je nejvhodnější pro zkoumání vztahu obezity a metabolického syndromu. Jedině jsme podrobili extirpaci hnědé tukové tkáně a pozorovali jsme změny parametrů v čase a ve srovnání s kontrolními kmeny Wistar, ze kterých byli vyšlechtěni.

V první části experimentu jsme se proto zaměřili se na rozdílnou aktivitu hnědé tukové tkáně mezi kmeny potkanů HHTg a kontrolním Wistar ve vztahu k věku, jelikož je známo, že aktivita hnědé tukové tkáně se s věkem snižuje (Roman et al., 2015). V druhé části experimentu jsme se zaměřili na důsledky extirpace této tkáně, s předpokladem nárůstu hmotnosti HHTg potkanů a dalšími negativními efekty na parametry MS, s přihlédnutím k věku potkanů. Také jsme zahrnuli možnosti akutních pooperačních reakcí, nebo následných kompenzací, proto jsme na kontrolní skupině potkanů provedli operaci bez extirpace hnědé tukové tkáně a parametry srovnávali ve dvou časových obdobích od extirpace

### **HHTg vs. Wistar potkani**

HHTg potkani mají oproti kontrolnímu kmenu Wistar změněný metabolismus, například hypertriacylglycerolémii, vyšší hodnoty NEMK v cirkulaci, což je v souladu s literaturou (Vrána and Kazdová, 1990; Vrána et al., 1993). NEMK v cirkulaci vedou ke zhoršené utilizaci glukózy v periferních tkáních (Cahová et al., 2007).

Dále u kmene HHTg byla signifikantně vyšší koncentrace TAG séru i v játrech, což poukazuje na zvýšené ektopické ukládání lipidů a negativně koreluje s inzulinovou senzitivitou jaterní tkáně.

Ve svalech však k tomuto ektopickému ukládání TAG u potkanů kmene HHTg ve vyšší míře nedochází. Naměřili jsme signifikantně se vyšší glykogenezi, což odporuje předpokladům, že HHTg potkani mají sníženou senzitivitu k inzulinu ve svalu.

Zajímavým úkazem byla pozorovaná snížená lipogeneze v ETT u potkanů kmene HHTg, oproti kmenu Wistar, což naznačuje rezistenci tukové tkáně k inzulinu. Mohlo by se jednat o kompenzační mechanismus zabraňující nadměrné akumulaci TAG v tukové tkáni. Změřili jsme tedy lipogenezi v ETT bazálně i při stimulaci inzulinem a pozorovali jsme, že ve věku 12 měsíců skutečně dojde k rezistenci tkáně k inzulinu, ovšem u obou kmenů.

Potkani kmene Wistar mají vyšší celkovou hmotnost oproti HHTg potkanům a tento rozdíl se s věkem výrazně zvětšuje. Relativní hmotnost ETT byla dokonce signifikantně vyšší u kmene Wistar oproti kmenu HHTg ve věku 5 týdnů.

Potkani kmene HHTg netrpí zbytněním tukové tkáně. To nás vedlo k hypotéze, že HHTg potkani by mohli mít vyšší aktivitu tukové tkáně, která by mohla ovlivňovat jejich hmotnost i přes ostatní projevy MS.

Výsledky z měření aktivity iBAT nám ukázaly, že u potkanů kmene HHTg byla signifikantně vyšší inkorporace palmitátu do lipidů i spalování palmitátu ve formě CO<sub>2</sub>. Tyto výsledky podporují naši hypotézu, i přes to, že obsah bílkovin v iBAT mezi kmeny nebyl rozdílný.

Rozhodli jsme se proto v dalším experimentu extirpovat iBAT abychom mohli pozorovat důsledky její ablace a zjistit tak, zda má opravdu takový význam v ovlivnění parametrů MS, jak se jí přisuzuje a zda jsou potkani kmene HHTg neobézní díky aktivitě iBAT.

### **Extirpace interskapulární hnědé tukové tkáně**

Po extirpaci nedošlo k zásadním změnám v celkové hmotnosti, ani v relativní hmotnosti ETT, což odporuje naší hypotéze. Také na ektopické ukládání lipidů neměla extirpace žádný vliv. Předpokládali jsme, že BAT bude spalovat značné množství MK a její odstranění by mohlo způsobit přírůstek hmotnosti. V pokusu z roku 1984 (Stern et al., 1984) neměla extirpace vliv na změnu hmotnosti, pokud byli potkani chováni při standardní teplotě, pokud ovšem byli potkani chováni při 10°C, došlo k příbytku

hmotnosti, což podporuje hypotézu, že redukce chladem aktivované BAT přispívá k rozvoji obezity. Potkani v našich experimentech byli chováni při pokojové teplotě, což mohlo mít vliv na nízkou aktivitu BAT.

Dalším možným vysvětlením by mohla být inzulinová rezistence v tukové tkáni, kterou jsme pozorovali již v předchozím pokusu. Jedná se o ochranný mechanismus proti nadměrné akumulaci lipidů. U mladších potkanů, kteří podstoupili extirpaci, byla lipogeneze v ETT stimulovaná inzulinem významně snížena oproti kontrolní skupině, což naznačuje snížení inzulinové senzitivity. U starších potkanů byla pozorována rezistence k inzulinu u všech skupin a žádný vliv extirpace na změny v lipogenezi, což naznačuje vliv věku na aktivitu BAT.

Provedli jsme orální lipidový toleranční test, abychom zjistili, zda má absence BAT negativní vliv na extrakci tuků z cirkulace. U mladší skupiny potkanů jsme pozorovali bazálně nižší hodnotu TAG v séru, ale strmější nárůst hladiny oproti kontrolní skupině. Starší skupina potkanů ukazovala vyšší hodnoty TAG již bazálně, na lačno, ale také po celou dobu testu proti kontrolní skupině. Tyto výsledky sice nebyly statisticky významné, přesto ukazují na to, že extirpace BAT u starších potkanů způsobuje zhoršení utilizace absorbovaných tuků a významnost BAT jako akceptoru přijatých tuků.

Dalšími srovnávacími parametry byly sérové. Glukóza, TAG, CHOL a NEMK se nijak významně mezi skupinami nelišily. Parametr koncentrace glycerolu byl u extirpovaných potkanů starých 5 týdnů nejprve snížený oproti kontrolní skupině, ovšem 21 dní po operaci se tento rozdíl vyrovnal. U potkanů starých 18 měsíců byla koncentrace glycerolu také signifikantně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou. Nabízí se možnost, že BAT je významným producentem glycerolu, který exportuje do jater, jejím odstraněním by tedy mohlo dojít ke snížení koncentrace glycerolu.

Měřili jsme také lipolýzu v ETT abychom zjistili aktivitu lipolyticko-reesterifikačního cyklu a citlivosti ETT ke stimulaci inzulinem. Nepozorovali jsme však žádné rozdíly mezi skupinami, pozorovali jsme pouze věkový rozdíl v senzitivitě k adrenalinu. U mladší skupiny potkanů byla významně vyšší adrenalinem stimulovaná lipolýza, ovšem opět jsme nepozorovali rozdíly mezi extirpovanými a kontrolními skupinami.

Dále jsme změřili koncentrace adipokinů v séru, abychom zjistili zda došlo k nějakým změnám v sekreční aktivitě tukové tkáně. Koncentrace leptinu byla vyšší u všech skupin potkanů starých 18 měsíců, jelikož jeho hladina pozitivně koreluje s tukovou tkání v souladu s literaturou (Kershaw and Flier, 2004). Koncentrace rezistinu se u



extirpovaných potkanů starých 5 týdnů významně snížila 21 dní po operaci. Extirpace tedy nečekaně způsobila zlepšení jednoho z parametrů inzulínové rezistence.

Měřili jsme také míru glykogeneze v bránici a její senzitivitu k inzulínu. Senzitivita k inzulínu v bránici extirpace neovlivnila. U mladších potkanů došlo ke zvýšení glykogeneze s časovým odstupem od operace, ovšem k tomuto zvýšení došlo i u kontrolních skupin. U starších potkanů došlo po operaci k významnému snížení citlivosti k inzulínu oproti kontrolní skupině, ovšem s časovým odstupem došlo ke zvýšení citlivosti k inzulínu, shodně s kontrolní skupinou.

Nabízela se možnost, že potkani kompenzují ablaci iBAT hnědnutím bílých adipocytů. Změřili jsme proto obsah bílkovin v podkožní tukové tkáni, v ETT, v tkáni kolem ledvin a v hnědé tukové tkáni u kontrolních skupin. U mladší skupiny potkanů po extirpaci jsme pozorovali vyšší obsah bílkovin v podkožní tukové tkáni, ovšem časem jsme pozorovali regresi této změny. V ETT jsme pozorovali po extirpaci mírné zvýšení obsahu bílkovin, ale po třech týdnech došlo k regresi této hodnoty. Zdá se tedy, že u potkanů HHTg nedochází k žádné kompenzaci v jiných tukových tkáních.

Extirpací iBAT se nám hypotéza, že BAT má významný vliv na parametry metabolického syndromu, nepotvrdila. Dokonce došlo překvapivě ke zlepšení některých parametrů, což jsme nepředpokládali a pro tyto výsledky nemáme žádné podložené vysvětlení.

Naše experimenty byly založeny na extirpaci hnědé tukové tkáně, takto jsme však odebrali pouze většinu, zbylá část je roztroušena po těle potkanů a není možné ji chirurgicky vyjmout. Řešením tohoto problému by mohly být specifické inhibitory, například inhibitor UCP1.

V budoucnu by bylo zajímavé podívat se na problematiku více z hlediska molekulární biologie. Například pouhá sekvenace a srovnání alel UCP1 z různých kmenů by mohla objasnit odlišnost chování inbredního kmene HHTg od naší hypotézy.

## 9 Závěr

V této práci jsme sledovali aktivitu interskapulární tukové tkáně na parametry metabolického syndromu. Srovnávali jsme parametry mezi kmeny HHTg potkanů a kontrolním kmenem potkanů Wistar a pozorovali jsme nižší hmotnost potkanů kmene HHTg přes projevy ostatních parametrů metabolického syndromu, jako je dyslipidémie, inzulinová rezistence tukové tkáně, vyšší hodnoty NEMK v krvi.

Naše pozorování vlivu extirpace iBAT u potkanů kmene HHTg:

- Potkani kmene HHTg mají významně vyšší aktivitu iBAT, zejména lepší spalování lipidů.
- Extirpace iBAT neměla vliv na celkovou hmotnost ani na hmotnost orgánů.
- Extirpace neovlivnila významně inzulinovou senzitivitu ve svalu.
- Extirpací došlo ke snížení lipogeneze v ETT stimulované inzulinem.
- Extirpací došlo ke snížení koncentrace rezistinu v cirkulaci.
- Extirpací došlo ke snížení koncentrace glycerolu v cirkulaci.

Příčina toho, že u potkanů kmene HHTg nedochází k obezitě stále není objasněna. Je možné, že došlo ke kompenzacím v rámci zvýšení aktivity ostatních depotů hnědé tukové tkáně.

## 10 Reference

- Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.-C., James, W.P.T., Loria, C.M., Smith, S.C., et al. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* *120*, 1640–1645.
- Atit, R., Sgaier, S.K., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., Joyner, A.L., Niswander, L., and Conlon, R.A. (2006). Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev. Biol.* *296*, 164–176.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *298*, E1244–1253.
- Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., et al. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* *17*, 200–205.
- Björntorp, P. (1991). Adipose tissue distribution and function. *Int. J. Obes.* *15 Suppl 2*, 67–81.
- Blondin, D.P., and Carpentier, A.C. (2016). The role of BAT in cardiometabolic disorders and aging. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *30*, 497–513.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* *408*, 39–42.
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., et al. (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* *481*, 463–468.
- Brand, M.D., and Esteves, T.C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* *2*, 85–93.
- Busiello, R.A., Savarese, S., and Lombardi, A. (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front. Physiol.* *6*.
- Cahová, M., Vavřínková, H., and Kazdová, L. (2007). Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance. *Physiol. Res.* *56*, 1–15.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* *84*, 277–359.
- Cioffi, F., Senese, R., de Lange, P., Goglia, F., Lanni, A., and Lombardi, A. (2009). Uncoupling proteins: a complex journey to function discovery. *BioFactors Oxf. Engl.* *35*, 417–428.
- Coelho, M., Oliveira, T., and Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch. Med. Sci. AMS* *9*, 191.

- Cooksey, R.C., and McClain, D.A. (2011). Increased hexosamine pathway flux and high fat feeding are not additive in inducing insulin resistance: evidence for a shared pathway. *Amino Acids* 40, 841.
- Costa, J.V., and Duarte, J.S. (2006). [Adipose tissue and adipokines]. *Acta Med. Port.* 19, 251–256.
- Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J. Cell Sci.* 103 ( Pt 4), 931–942.
- Cypess, A.M., White, A.P., Vernochet, C., Schulz, T.J., Xue, R., Sass, C.A., Huang, T.L., Roberts-Toler, C., Weiner, L.S., Sze, C., et al. (2013). Anatomical Localization, Gene Expression Profiling, and Functional Characterization of Adult Human Neck Brown Fat. *Nat. Med.* 19, 635.
- Dumortier, O., Roger, E., Pisani, D.F., Casamento, V., Gautier, N., Lebrun, P., Johnston, H., Lopez, P., Amri, E.-Z., Jousse, C., et al. (2017). Age-Dependent Control of Energy Homeostasis by Brown Adipose Tissue in Progeny Subjected to Maternal Diet-Induced Fetal Programming. *Diabetes* 66, 627–639.
- Echtay, K.S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* 43, 1351–1371.
- Fang, P., Shi, M., Zhu, Y., Bo, P., and Zhang, Z. (2016). Type 2 diabetes mellitus as a disorder of galanin resistance. *Exp. Gerontol.* 73, 72–77.
- Frontini, A., Vitali, A., Perugini, J., Murano, I., Romiti, C., Ricquier, D., Guerrieri, M., and Cinti, S. (2013). White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 950–959.
- Garlid, K.D., Jabůrek, M., and Jezek, P. (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 438, 10–14.
- Gaudet, D., Drouin-Chartier, J.-P., and Couture, P. (2017). Lipid Metabolism and Emerging Targets for Lipid-Lowering Therapy. *Can. J. Cardiol.*
- Gil-Campos, M., Cañete, R.R., and Gil, A. (2004). Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 23, 963–974.
- Giralt, M., and Villarroya, F. (2013). White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology* 154, 2992–3000.
- Heaton, J.M. (1972). The distribution of brown adipose tissue in the human. *J. Anat.* 112, 35.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M.C., Ceresi, E., Barbatelli, G., and Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C670-681.
- Hodný, Z., Kolárová, P., Rossmeisl, M., Horáková, M., Nibbelink, M., Penicaud, L., Casteilla, L., and Kopecký, J. (1998). High expression of uncoupling protein 2 in foetal liver. *FEBS Lett.* 425, 185–190.
- Jo, J., Guo, J., Liu, T., Mullen, S., Hall, K.D., Cushman, S.W., and Periwai, V. (2010). Hypertrophy-driven adipocyte death overwhelms recruitment under prolonged weight gain. *Biophys. J.* 99, 3535–3544.
- Jump, D.B., Clarke, S.D., Thelen, A., and Liimatta, M. (1994). Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 35, 1076–1084.

- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 2548–2556.
- Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* *2*, 282–286.
- Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z.V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B.B., Bonaldo, P., Chua, S., and Scherer, P.E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 1575–1591.
- Kim, T.J., Shin, H.-Y., Chang, Y., Kang, M., Jee, J., Choi, Y.-H., Ahn, H.S., Ahn, S.H., Son, H.J., and Ryu, S. (2017). Metabolically healthy obesity and the risk for subclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis*.
- Klaus, S., Keipert, S., Rossmeisl, M., and Kopecky, J. (2012). Augmenting energy expenditure by mitochondrial uncoupling: a role of AMP-activated protein kinase. *Genes Nutr.* *7*, 369–386.
- Klimes, I., Vrána, A., Kunes, J., Seböková, E., Dobesová, Z., Stolba, P., and Zicha, J. (1995). Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension. *Blood Press.* *4*, 137–142.
- Klingenberg, M. (1999). Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *J. Bioenerg. Biomembr.* *31*, 419–430.
- Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* *404*, 635–643.
- Kozak, L.P., and Anunciado-Koza, R. (2008). UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int. J. Obes.* *2005* *32*, S32.
- Kuryszko, J., Sławuta, P., and Sapikowski, G. (2016). Secretory function of adipose tissue. *Pol. J. Vet. Sci.* *19*, 441–446.
- Kyle, U.G., Bosaeus, I., De Lorenzo, A.D., Deurenberg, P., Elia, M., Gómez, J.M., Heitmann, B.L., Kent-Smith, L., Melchior, J.-C., Pirlich, M., et al. (2004). Bioelectrical impedance analysis--part I: review of principles and methods. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* *23*, 1226–1243.
- Laclaustra, M., Corella, D., and Ordovas, J.M. (2007). Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* *17*, 125–139.
- Lam, D.W., and LeRoith, D. (2000). Metabolic Syndrome. In *Endotext*, L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.
- Lans, A.A.J.J. van der, Wierts, R., Vosselman, M.J., Schrauwen, P., Brans, B., and Lichtenbelt, W.D. van M. (2014). Cold-activated brown adipose tissue in human adults: methodological issues. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *307*, R103–R113.
- Lazar, M.A. (2007). Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* *39*, 710–716.
- Lean, M.E. (1989). Brown adipose tissue in humans. *Proc. Nutr. Soc.* *48*, 243–256.
- Lidell, M.E., and Enerbäck, S. (2010). Brown adipose tissue--a new role in humans? *Nat. Rev. Endocrinol.* *6*, 319–325.

- Milić, S., Lulić, D., and Štimac, D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J. Gastroenterol.* *20*, 9330–9337.
- Ovalle, F., and Azziz, R. (2002). Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil. Steril.* *77*, 1095–1105.
- Pan, H., Guo, J., and Su, Z. (2014). Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiol. Behav.* *130*, 157–169.
- Pandit, R., Beerens, S., and Adan, R.A. (2017). The role of leptin in energy expenditure: The hypothalamic perspective. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *ajpregu.00045.2016*.
- Park, A., Kim, W.K., and Bae, K.-H. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* *6*, 33.
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010a). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* *285*, 7153–7164.
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010b). Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *J. Biol. Chem.* *285*, 7153.
- Pitombo, C., Araújo, E.P., De Souza, C.T., Pareja, J.C., Geloneze, B., and Velloso, L.A. (2006). Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J. Endocrinol.* *191*, 699–706.
- Pocai, A., Morgan, K., Buettner, C., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., and Rossetti, L. (2005). Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Diabetes* *54*, 3182–3189.
- Ricquier, D., and Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* *345 Pt 2*, 161–179.
- Roman, S., Agil, A., Peran, M., Alvaro-Galve, E., Ruiz-Ojeda, F.J., Fernández-Vázquez, G., and Marchal, J.A. (2015). Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl. Res.* *165*, 464–479.
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T., and Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* *15*, 659–667.
- Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1989). Surgical removal of brown fat results in rapid and complete compensation by other depots. *Am. J. Physiol.* *257*, R253-258.
- Saely, C.H., Geiger, K., and Drexel, H. (2012). Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* *58*, 15–23.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Goubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Grégoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Lévi-Meyrueis, C., et al. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* *273*, 34611–34615.

- Schumann, U., Jenkinson, C.P., Alt, A., Zügel, M., Steinacker, J.M., and Flechtner-Mors, M. (2017). Sympathetic nervous system activity and anti-lipolytic response to iv-glucose load in subcutaneous adipose tissue of obese and obese type 2 diabetic subjects. *PLoS One* 12, e0173803.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967.
- Sinha, M.K., Ohannesian, J.P., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Magosin, S., Marco, C., and Caro, J.F. (1996). Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J. Clin. Invest.* 97, 1344–1347.
- Stern, J.S., Inokuchi, T., Castonguay, T.W., Wickler, S.J., and Horwitz, B.A. (1984). Scapular brown fat removal enhances development of adiposity in cold-exposed obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 247, R918-926.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432–7443.
- Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., et al. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4401–4406.
- Unger, R.H., Zhou, Y.T., and Orci, L. (1999). Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2327–2332.
- Vrána, A., and Kazdová, L. (1990). The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant. Proc.* 22, 2579.
- Vrána, A., Kazdová, L., Dobesová, Z., Kunes, J., Kren, V., Bílá, V., Stolba, P., and Klimes, I. (1993). Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains. Effects of dietary carbohydrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 683, 57–68.
- Wang, Q., Zhang, M., Ning, G., Gu, W., Su, T., Xu, M., Li, B., and Wang, W. (2011). Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PLoS One* 6, e21006.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366–376.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E1244-1253.

- Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., et al. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* *17*, 200–205.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* *408*, 39–42.
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., et al. (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* *481*, 463–468.
- Brand, M.D., and Esteves, T.C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* *2*, 85–93.
- Busiello, R.A., Savarese, S., and Lombardi, A. (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front. Physiol.* *6*.
- Cahová, M., Vavřínková, H., and Kazdová, L. (2007). Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance. *Physiol. Res.* *56*, 1–15.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* *84*, 277–359.
- Cioffi, F., Senese, R., de Lange, P., Goglia, F., Lanni, A., and Lombardi, A. (2009). Uncoupling proteins: a complex journey to function discovery. *BioFactors Oxf. Engl.* *35*, 417–428.
- Coelho, M., Oliveira, T., and Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch. Med. Sci. AMS* *9*, 191.
- Cooksey, R.C., and McClain, D.A. (2011). Increased hexosamine pathway flux and high fat feeding are not additive in inducing insulin resistance: evidence for a shared pathway. *Amino Acids* *40*, 841.
- Costa, J.V., and Duarte, J.S. (2006). [Adipose tissue and adipokines]. *Acta Med. Port.* *19*, 251–256.
- Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J. Cell Sci.* *103 (Pt 4)*, 931–942.
- Cypess, A.M., White, A.P., Vernochet, C., Schulz, T.J., Xue, R., Sass, C.A., Huang, T.L., Roberts-Toler, C., Weiner, L.S., Sze, C., et al. (2013). Anatomical Localization, Gene Expression Profiling, and Functional Characterization of Adult Human Neck Brown Fat. *Nat. Med.* *19*, 635.
- Etherton, T.D. (2000). The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. *J. Nutr.* *130*, 2623–2625.
- Frontini, A., Vitali, A., Perugini, J., Murano, I., Romiti, C., Ricquier, D., Guerrieri, M., and Cinti, S. (2013). White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*, 950–959.
- Garlid, K.D., Jabůrek, M., and Jezek, P. (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* *438*, 10–14.



- Giralt, M., and Villarroya, F. (2013). White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology* 154, 2992–3000.
- Hainer, V., a kol., *Základy klinické obezitologie*, Praha: Grada Publishing 2004: 119 – 141
- Hardie, D.G. (2008). AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int. J. Obes.* 2005 32 *Suppl 4*, S7-12.
- Hardie, D.G., Carling, D., and Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67, 821–855.
- Heaton, J.M. (1972). The distribution of brown adipose tissue in the human. *J. Anat.* 112, 35.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M.C., Ceresi, E., Barbatelli, G., and Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C670-681.
- Hodný, Z., Kolárová, P., Rossmeisl, M., Horáková, M., Nibbelink, M., Penicaud, L., Casteilla, L., and Kopecký, J. (1998). High expression of uncoupling protein 2 in foetal liver. *FEBS Lett.* 425, 185–190.
- Jump, D.B., Clarke, S.D., Thelen, A., and Liimatta, M. (1994). Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 35, 1076–1084.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556.
- Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2, 282–286.
- Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z.V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B.B., Bonaldo, P., Chua, S., and Scherer, P.E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1575–1591.
- Klaus, S., Keipert, S., Rossmeisl, M., and Kopecky, J. (2012a). Augmenting energy expenditure by mitochondrial uncoupling: a role of AMP-activated protein kinase. *Genes Nutr.* 7, 369–386.
- Klaus, S., Keipert, S., Rossmeisl, M., and Kopecky, J. (2012b). Augmenting energy expenditure by mitochondrial uncoupling: a role of AMP-activated protein kinase. *Genes Nutr.* 7, 369–386.
- Klingenberg, M. (1999). Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 419–430.
- Könner, A.C., Klöckener, T., and Brüning, J.C. (2009). Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol. Behav.* 97, 632–638.
- Koolman J., Roehm K. H., *Color atlas of biochemistry*, Thieme: 2005, 278 - 312
- Kopecky, J., Rossmeisl, M., Flachs, P., Kuda, O., Brauner, P., Jilkova, Z., Stankova, B., Tvrzicka, E., and Bryhn, M. (2009). n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proc. Nutr. Soc.* 68, 361–369.
- Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635–643.

- Kozak, L.P., and Anunciado-Koza, R. (2008). UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int. J. Obes.* 2005 32, S32.
- Kuryszko, J., Sławuta, P., and Sapikowski, G. (2016). Secretory function of adipose tissue. *Pol. J. Vet. Sci.* 19, 441–446.
- Laclaustra, M., Corella, D., and Ordovas, J.M. (2007). Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 17, 125–139.
- Lam, D.W., and LeRoith, D. (2000). Metabolic Syndrome. In *Endotext*, L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.
- Lans, A.A.J.J. van der, Wierds, R., Vosselman, M.J., Schrauwen, P., Brans, B., and Lichtenbelt, W.D. van M. (2014). Cold-activated brown adipose tissue in human adults: methodological issues. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R103–R113.
- Lean, M.E. (1989). Brown adipose tissue in humans. *Proc. Nutr. Soc.* 48, 243–256.
- Lidell, M.E., and Enerbäck, S. (2010). Brown adipose tissue--a new role in humans? *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 319–325.
- Lim, C.T., Kola, B., and Korbonits, M. (2010). AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 87–97.
- Park, A., Kim, W.K., and Bae, K.-H. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* 6, 33.
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010a). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 285, 7153–7164.
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010b). Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 285, 7153.
- Pitombo, C., Araújo, E.P., De Souza, C.T., Pareja, J.C., Geloneze, B., and Velloso, L.A. (2006). Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J. Endocrinol.* 191, 699–706.
- Průša J. et al., *Patobiochemie metabolických drah*, Praha: MASOPUST 2004
- Ricquier, D., and Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 161–179.
- Ricquier, D., and Kader, J.C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 577–583.

- Roman, S., Agil, A., Peran, M., Alvaro-Galue, E., Ruiz-Ojeda, F.J., Fernández-Vázquez, G., and Marchal, J.A. (2015). Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl. Res.* 165, 464–479.
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T., and Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* 15, 659–667.
- Ruderman, N.B., Xu, X.J., Nelson, L., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Lan, F., and Ido, Y. (2010). AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E751-760.
- Saely, C.H., Geiger, K., and Drexel, H. (2012). Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* 58, 15–23.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Grégoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Lévi-Meyrueis, C., et al. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 34611–34615.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967.
- Sinha, M.K., Ohannesian, J.P., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Magosin, S., Marco, C., and Caro, J.F. (1996). Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J. Clin. Invest.* 97, 1344–1347.
- Skulachev, V.P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 100–124.
- Svačina Š. et al., *Poruchy metabolismu a výživy*, Praha: Galén 2010: 218
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432–7443.
- Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., et al. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4401–4406.
- Um, J.-H., Park, S.-J., Kang, H., Yang, S., Foretz, M., McBurney, M.W., Kim, M.K., Viollet, B., and Chung, J.H. (2010). AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59, 554–563.
- Unger, R.H., Zhou, Y.T., and Orci, L. (1999). Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2327–2332.
- Wang, Q., Zhang, M., Ning, G., Gu, W., Su, T., Xu, M., Li, B., and Wang, W. (2011). Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PloS One* 6, e21006.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366–376.

Zhang, B.B., Zhou, G., and Li, C. (2009). AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 9, 407–416.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.



