

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Študijný program: Biológia
Študijný odbor: Fyziológia živočíchov



Bc. Blanka Špiláková

Regulácia lipolýzy a re-esterifikácie v bielom tukovom tkanive – možná úloha FGF21

Regulation of lipolysis and re-esterification in white adipose tissue – possible role of FGF21

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Petr Zouhar, Ph.D.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.
Oddelenie biológie tukového tkaniva

Praha 2019

Prehlásenie:

Prehlasujem, že predloženú diplomovú prácu som vypracovala samostatne pod vedením RNDr. Petra Zouhara, Ph.D. na Fyziologickom ústave AV ČR v.v.i. s použitím uvedenej literatúry. Ďalej prehlasujem, že som túto prácu ani žiadnu jej časť nepoužila k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe,

.....

Blanka Špiláková

Podakovanie:

V prvom rade sa chcem poďakovať svojmu školiteľovi RNDr. Petrovi Zouharovi, Ph.D. za obetavosť, trpezlivosť a odborné vedenie mojej diplomovej práce. Ďalej by som sa rada poďakovala všetkým kolegom z Oddelenia biológie tukového tkaniva FGÚ AV ČR, v.v.i. za poskytnutú pomoc, ochotu a priateľské prostredie. V neposlednom rade ďakujem mojej rodine a priateľom za podporu a pevné zázemie behom môjho štúdia.

Abstrakt

Fibroblastový rastový faktor 21 (FGF21) je unikátny peptidový hormón, ktorý je zapojený do regulácie glukózového a lipidového metabolizmu, a taktiež energetickej homeostázy. Výsledky z početných animálnych štúdií naznačujú, že FGF21 môže byť potenciálnym liečivom v boji proti obezite a diabetu mellitus druhého typu. Bolo pozorované, že FGF21 pôsobí proti rozvoju obezity (snáď vplyvom zvýšenia energetického výdaja prostredníctvom aktivácie termogenézy v hnedom a bielom tukovom tkanive). FGF21 zjavne taktiež inhibuje lipolýzu. Konkrétny mechanizmus pôsobenia FGF21 však nie je jednoznačne objasnený.

V našich experimentoch sme študovali antiobezogénne účinky FGF21 na modeli diétou indukovanej obezity u myší chovaných v termoneutrálnej teplote. Predpokladá sa, že tento model (oproti použitiu štandardnej laboratórnej teploty) približuje metabolický stav zvieratá k situácii u ľudí.

V priebehu krátkodobého (4- až 8-denného) pôsobenia sme pozorovali postupné znižovanie obsahu lipidov v tukovom tkanive a pečeni, čo bolo najmä zrejme pri kombinácii pôsobenia FGF21 s β_3 -adrenergnou stimuláciou. Potvrdili sme, že v niektorých depách tukového tkaniva FGF21 stimuluje tzv. hnednutie a taktiež inhibuje lipolýzu. Zistili sme, že účinok FGF21 na sekréciu mastných kyselín tukovým tkanivom nie je sprostredkovaný zmenami v miere re-esterifikácie mastných kyselín ale zmenami v lipolýze. Aj keď sme behom podávania FGF21 nezaznamenali zlepšenie glykemického profilu obezických myší v bazálnom stave, v kombinácii s β_3 -adrenergnou stimuláciou FGF21 synergicky znižovalo hladinu krvnej glukózy, čo môže rovnako súvisieť so zmenami v tukovom tkanive (najmä inhibíciou lipolýzy).

Naše výsledky tak podporujú teóriu o kľúčovej úlohe tukového tkaniva pre manifestáciu antiobezogénnych a antidiabetických účinkov FGF21.

Kľúčové slová

biele tukové tkanivo, obezita, metabolická flexibilita, β -adrenergná stimulácia, FGF21

Abstract

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is a unique peptide hormone involved in the energy homeostasis, as well as in the regulation of glucose and lipid metabolism. Numerous animal studies suggest that FGF21 may be used as a potential treatment for obesity and type 2 diabetes mellitus. It was found out, that FGF21 counteracts the development of obesity presumably by increasing energy expenditure through activation of thermogenesis in brown and white adipose tissue. FGF21 apparently also inhibits lipolysis. However, the specific mechanism of action of FGF21 is not clear.

In our experiments we studied the antiobesogenic effects of FGF21 on mice model of diet-induced obesity at thermoneutrality. It is assumed that this model approach (in contrast to housing mice at standard laboratory temperature) mimics closely the metabolic status of humans. During the 4- to 8-day FGF21 treatment we observed a gradual reduction of lipid content in the brown and white adipose tissue and liver, especially in combination with β_3 -adrenergic stimulation. We have confirmed that FGF21 inhibits lipolysis and also stimulates browning in certain adipose tissue depots. Furthermore, we have found that the effect of FGF21 on fatty acid secretion by adipose tissue is not mediated by changes in the fatty acid re-esterification rate, but rather by changes in lipolysis. Although we did not observe any beneficial effect of FGF21 on glycemic profile of obese mice in basal conditions, in combination with β_3 -adrenergic stimulation FGF21 synergistically reduced blood glucose levels, which may also be related to changes in adipose tissue (i.e. to inhibition of lipolysis).

Our results thus support the theory of the key role of adipose tissue for the manifestation of the antiobesogenic and antidiabetic effects of FGF21.

Key words

White adipose tissue, obesity, metabolic flexibility, β -adrenergic stimulation, FGF21

Obsah

1. Úvod	9
2. Tukové tkanivo	10
2.1 Všeobecné poznatky o tukovom tkanive	10
2.1.1 Biele tukové tkanivo a ukladanie lipidov	10
2.1.2 Hnedé tukové tkanivo a termogenéza	11
2.2 Metabolizmus lipidov v tukovom tkanive	14
2.2.1 Lipolýza	14
2.2.2 Oxidácia mastných kyselín	15
2.2.3 Re-esterifikácia mastných kyselín	16
2.2.4 <i>De novo</i> lipogenéza	18
3. Tukové tkanivo a metabolický syndróm	19
4. Fibroblastový rastový faktor 21 (FGF21)	20
4.1 Účinky FGF21 na jednotlivé orgány	21
5. Ciele práce	25
6. Materiál a metódy	26
6.1 <i>In vivo</i> experimenty	26
6.2 <i>In vitro</i> experimenty	29
6.3 Analýza génovej expresie	30
6.3.1 Izolácia RNA	30
6.3.2 Reverzná transkripcia	31
6.3.3 Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia	32
6.4 Stanovenie metabolitov z krvi	34
6.4.1 Stanovovanie triacylglycerolov v plazme	35
6.4.2 Stanovenie cholesterolu	35
6.4.3 Stanovenie ne-esterifikovaných mastných kyselín	36
6.4.4 Stanovenie inzulínu	37
6.4.5 Stanovenie lipogenézy a re-esterifikácie pomocou izotopov $^2\text{H}_2\text{O}$	37
6.4.5.1 Príprava vzoriek na stanovenie obohatenia TAG deutériom	38
6.4.5.2 Príprava vzoriek na stanovenie obohatenia plazmy $^2\text{H}_2\text{O}$	39

6.5 Stanovenie triacylglycerolov v tkanive	39
6.6 Štatistické vyhodnotenie	40
6.7 Zoznam použitých chemikálii	41
6.8 Zoznam použitých prístrojov	42
7. Výsledky.....	43
7.1 Príprava systému pre sledovanie lipolýzy v tkanivových kultúrach	43
7.2 Pôsobenie FGF21 <i>in vivo</i>	46
7.2.1 Časová závislosť účinkov FGF21	47
7.2.1.1 Všeobecné účinky FGF21.....	47
7.2.1.2 Vplyv FGF21 na krvné márkre	50
7.2.1.3 Vplyv FGF21 na génovú expresiu v jednotlivých tkanivách.....	52
7.2.2 In vivo časť, kombinácia účinkov CL316,243 a FGF21	56
7.2.2.1 Kombinácia účinkov FGF21 a adrenergnej simulácie	56
7.2.2.2 Vplyv CL a FGF21 na krvné márkre	58
7.2.2.3 Vplyv CL a FGF21 na génovú expresiu	60
7.2.2.4 Stanovenie lipolýzy a re-esterifikácie pomocou izotopu ² H ₂ O	64
8. Diskusia.....	66
8.1 Vplyv teploty na energetický metabolizmus	66
8.2 Časový priebeh účinkov FGF21.....	67
8.3 Kombinácia účinkov CL316,243 a FGF21	69
9. Záver.....	72
Zoznam použitej literatúry.....	73

Zoznam použitých skratiek

AGPAT	acylglycerolfosfát acyltransferáza
ATP	adenozíntrifosfát
ATGL	triacylglycerolová lipáza (<i>adipose triglyceride lipase</i>)
BAT	hnedé tukové tkanivo (<i>brown adipose tissue</i>)
B6	C57BL/6J BomTac (myši kmeň)
cDNA	komplementárna DNA
CL	β_3 -adrenergný agonista CL316,243
CoA	koenzým A
CTP1	karnitín-palmitoyltransferáza 1
DAG	diacylglycerol
DGAT1	diacylglycerol O-acetyltransferáza 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNL	<i>de novo</i> lipogenéza
EF-1 α	elongačný faktor 1 α
eEF2	eukaryotický elongačný faktor 2
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
ERK1, 2	extracelulárne regulovaná signálna kináza 1 a 2
FAME	metylester mastnej kyseliny (<i>fatty acid methyl ester</i>)
FAS	syntáza mastných kyselín (<i>fatty acid synthase</i>)
FGF21	fibroblastový rastový faktor 21 (<i>fibroblast growth factor 21</i>)
G3P	glycerol 3-fosfát
GLUT1	glukózový transportér 1
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HSL	hormón-senzitívna lipáza
LPL	lipoproteínová lipáza
MAGL	monoacylglycerolová lipáza
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
MYF5	myogénny faktor 5
NEFA	ne-esterifikovaná mastná kyselina (<i>non-esterified fatty acid</i>)
PBS	fyziológický roztok (<i>phosphate-buffered saline</i>)

PCR	polymerázová reťazová reakcia
PEPCK	fosfoenolpyruvát karboxykináza
PGC-1 α	peroxizómový proliferátorom aktivovaný receptor gamma koaktivátor 1- α (<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>)
PPAR	peroxizómový proliferátorom aktivovaný receptor α (<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PDK4	pyruvát dehydrogenázova kináza 4
RNA	ribonukleová kyselina
TAG	Triacylglycerol
UCP1	rozpojovací proteín 1 (<i>uncoupling protein 1</i>)
WAT	biele tukové tkanivo (<i>white adipose tissue</i>)

1. Úvod

Energetická homeostáza je regulovaný fyziologický proces, ktorý zahŕňa príjem a výdaj energie. Ak je táto rovnováha narušená, dochádza k významnému zdravotnému problému – obezite. Nadmerná hmotnosť je problémom hlavne kvôli tomu, že je asociovaná s celou radou ochorení, ako sú kardiovaskulárne ochorenia, diabetes mellitus druhého typu a ďalšie metabolické poruchy, ktoré sú súhrnne označované ako metabolický syndróm.

Obezita predstavuje problém pre stále zväčšujúcu sa populáciu ľudí. Preto sa neustále zvyšuje dopyt po nových liečivách bez vedľajších účinkov. Jedným zo sľubných terapeutík je aj fibroblastový rastový faktor 21 (FGF21), tento peptidový hormón je exprimovaný niekoľkými tkanivami (hlavne pečeňou) a pôsobí na viacero tkanív. V súlade s niekoľkými štúdiami na animálnych modeloch obezity a diabetu mellitus druhého typu možno povedať, že FGF21 ma priaznivý efekt na metabolizmus vrátane redukcie hmotnosti, poklesu akumulácie lipidov v organizme a zvýšenia inzulinovej senzitivity. Presný mechanizmus účinku FGF21 je však stále predmetom diskusie.

Táto práca poskytuje súhrn výsledkov ohľadom pôsobenia FGF21 na tukové tkanivo, ktoré boli získané najmä prostredníctvom experimentov na myších modeloch obezity, indukovanej vysoko-tukovou diétou. Experimenty prebiehali v termoneutrálnom prostredí, ktoré oproti štandardným podmienkam predstavuje lepší model ľudskej fyziológie (viď kapitola 2.1.2 Hnedé tukové tkanivo a termogenéza, odstavec č. 3). Sústredili sme sa pritom jednak na porovnanie rôznych dĺžok pôsobenia FGF21 (4 dni verzus 8 dní), jednak na účinky FGF21 v kontextu β -adrenergnej signalizácie. Najväčšiu pozornosť sme venovali účinkom FGF21 (poprípade FGF21 a β -adrenergného agonistu) na lipolýzu v bielom tukovom tkanive a termogénnu kapacitu hnedého tukového tkaniva. Oba tieto procesy majú totižto rozhodujúci význam pri rozvoji obezity a jej liečby.

2. Tukové tkanivo

2.1 Všeobecné poznatky o tukovom tkanive

Tukové tkanivo je voľné, fibrózne, spojivé tkanivo obsahujúce krvné kapiláry. Je zložené z viacerých typov buniek, hlavne z adipocytov, ktoré obsahujú jednu alebo viacero kvapiek triacylglycerolov (**TAG**). Ďalšou súčasťou je stromatálna vaskulárna frakcia tvorená preadipocytmi, fibroblastami, imunitnými bunkami (najmä makrofágami) a endoteliálnymi bunkami (Zwick et al., 2018).

V cicavcoch existujú dva hlavné druhy, ktoré sú histologicky, molekulárne a funkčne odlišné. Biele tukové tkanivo (*white adipose tissue* – **WAT**) a hnedé tukové tkanivo (*brown adipose tissue* – **BAT**).

2.1.1 Biele tukové tkanivo a ukladanie lipidov

WAT je zodpovedné hlavne za uchovávanie energie (ukladanie zásobných lipidov vo forme TAG – vid' ďalej), poskytuje tepelnú izoláciu a obaľuje orgány. Mastné kyseliny, ktoré tvoria TAG obsahujú viac energie na jednotku hmotnosti ako sacharidy (vid' kapitola 2.2.3 Re-esterifikácia mastných kyselín) a môžu byť skladované bez účasti vody (Rosen and Spiegelman, 2006), preto je ich ukladanie veľmi výhodné z hľadiska objemu.

Prostredníctvom sekrécie rady endokrinných molekúl sa podieľa na riadení hospodárenia s glukózou a systémového metabolizmu (Lidell et al., 2013). Jedným z proteínov, ktoré sú vylučované bielym tukovým tkanivom je hormón leptín. Je kritický pre udržanie energetickej bilancie, signalizuje do mozgu, konkrétne do hypotalamu a potláča príjem potravy (Halaas et al., 1995). Ďalším je adiponektín, jeho nízke hladiny súvisia s rozvojom inzulínovej rezistencie a aterosklerózy (Scherer et al., 1995). Biele tukové tkanivo vylučuje okrem iného aj radu cytokínov, ktoré hrajú úlohu v zápalových procesoch (Trayhurn and Beattie, 2001).

Podľa uloženia a cievneho zásobenia môžeme rozlíšiť dva druhy bieleho tukového tkaniva, ktoré majú aj čiastočne odlišnú funkciu a morfológiu. Subkutánne (podkožné) depo u myši je heterogénne, obsahuje zrelé unilokulárne adipocyty, medzi ktoré sú vmedzerené multilokulárne adipocyty. Unilokulárny adipocyt obsahuje jednu veľkú tukovú kvapôčku, málo cytoplazmy a sploštené jadrá umiestnené na okraji bunky, zatiaľ čo multilokulárne adipocyty obsahujú viacero malých tukových kvapiek. Viscerálne (abdominálne) depá sú homogénnejšie a obsahujú prevažne veľké unilokulárne adipocyty (Tchkonina et al.,

2007). Podľa súčasných poznatkov sa usudzuje, že zvýšené ukladanie subkutánneho tuku môže chrániť pred určitými prvkami metabolickej dysfunkcie. Naopak viscerálny tuk zvyšuje riziko diabetu mellitus druhého typu, hyperlipidémie, atď. (Grauer et al., 1984). Jedným z vysvetlení môže byť fakt, že množstvo multilokulárnych adipocytov, ktoré obsahujú subkutánne depá môžu určitým spôsobom chrániť pred metabolickými poruchami (Snijder et al., 2003). Taktiež subkutánne depá majú zvýšenú rýchlosť lipolýzy, re-esterifikácie a tvorbu nových adipocytov. Významným faktorom je rozdiel v cievnom zásobení. Z viscerálneho tuku je totiž krv odvádzaná portálnym systémom priamo do pečene. Pochody vo viscerálnom tuku tak majú bezprostredný dopad na zmeny v tomto orgáne, napr. hromadenie mastných kyselín pochádzajúcich z lipolýzy (Salans et al., 1973; Shi and Clegg, 2009). V našich experimentoch sme ako príklad subkutánneho tukového tkaniva používali dorzolumbálne depo a ako príklad viscerálneho gonadálne depo.

2.1.2 Hnedé tukové tkanivo a termogenéza

Druhým hlavným typom tukového tkaniva je BAT, ktoré sa podieľa na netriaškovej termogenéze. BAT obsahuje veľký počet multilokulárnych adipocytov. Farba BAT je ovplyvnená veľkým počtom mitochondrií, ktoré obsahujú špecializovaný rozpojovací proteín 1 (**UCP1**) a podieľajú sa na disipácii energie vo forme tepla (Aquila et al., 1985). UCP1 je transmembránový proteín, ktorý sa nachádza na vnútornej mitochondriálnej membráne. Znižuje protónový gradient generovaný v oxidatívnej fosforylácii. Gradient je znižovaný zvýšením permeability vnútornej mitochondriálnej membrány, takže protóny, ktoré boli pumpované do intermembránového priestoru, sa vracajú do mitochondriálnej matrix. UCP1 rozpojuje respiráciu od fosforylácie adenosíntrifosfátu (**ATP**), takže dochádza k produkcii tepla, teda k termogenéze a nie k tvorbe ATP (Cannon and Nedergaard, 2004; Puigserver et al., 1998).

U ľudí je BAT funkčné hlavne v novorodeneckom období. Aj keď sa dlhú dobu myslelo, že hnedé adipocyty sa nenachádzajú u dospelých ľudí, súčasné poznatky naznačujú, že aj dospelí jedinci majú adipocyty s charakteristikami adipocytov BAT (Garruti and Ricquier, 1992). Objavujú sa po termogénnych stimuloch na miestach, ktoré anatomicky zodpovedajú WAT. Iba mierne vystavenie chladu u ľudí (14 – 17 °C) na krátky čas (1 – 2 hodiny) postačuje na stimuláciu termogénnej aktivity v BAT, zvýšenie príjmu glukózy v BAT sprevádzaného zvýšenou oxidáciou mastných kyselín a zvýšeným výdajom energie (Yoneshiro et al., 2013). Podobne aj chladová expozícia u myší (týždeň v 4 °C) spôsobuje prechod z niektorých depotov WAT na tukové tkanivo, ktoré je podobné hnedému (Hamann et al., 1996). Na BAT

môže prejsť hlavne anteriórne subkutánne depo a retroperitoneálne depo, ktoré patrí pod viscerálne tukové depo (Shan et al., 2013). Chladová stimulácia aktivuje sympatický nervový systém, následne dochádza k uvoľneniu katecholamínov, ktoré sa viažu na β_3 -adrenergne receptory (LeBlanc et al., 1975). Proces prechodu sa nazýva hnednutie bieleho tukového tkaniva a hnedé adipocyty, ktoré sa objavujú v bielom tukovom tkanive sa nazývajú béžové adipocyty. Béžové boli nazvané preto, pretože predstavujú akýsi prechod medzi bielymi a hnedými adipocytmi, používa sa aj termín brite (brown in white). S hnedým tukovým tkanivom majú spoločné to, že sú multilokulárne, majú zvýšenú expresiu UCP1 a taktiež majú viac aktívny mitochondriálny respiračný reťazec (Sharp et al., 2012), (viď **Obr. č. 1**). Ich tvorba a udržiavanie predstavuje potenciálny nástroj v boji s obezitou (Giralt and Villarroya, 2013; Green et al., 2017; Lidell et al., 2013). U myši aktivujú termogenézu v BAT aj β_3 -adrenergny agonisti. Práve stimulácia β_3 -receptorov spôsobuje lipolýzu a hnednutie vo WAT a termogenézu v BAT, čo zvyšuje energetický výdaj a zlepšuje glukózovú toleranciu. Celkovo zvyšuje rýchlosť metabolizmu. Jedným zo špecifických β_3 -adrenergnych agonistov je CL316243 (skrátene **CL**). Ďalšie účinky ako, zníženie množstva tukového tkaniva sú závislé na teplote prostredia. Akútne termogenéza vyžaduje UCP1, ale pri chronickom pôsobení prispievajú mechanizmy nezávislé od UCP1 (Granneman et al., 2003). Súčasné štúdie ukazujú, že aj u ľudí β_3 -adrenergny agonisti fungujú podobne, teda stimulujú termogenézu v BAT a majú potenciál liečiť metabolické ochorenia (Cypess et al., 2015).

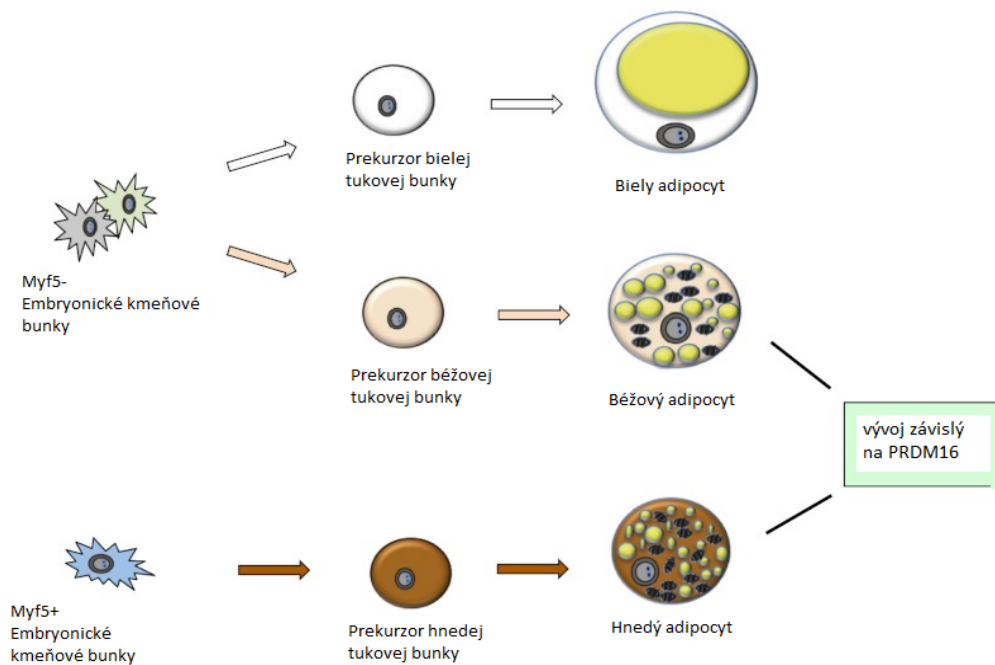
BAT má väčší význam v menších cicavcoch, pretože menšie zvieratá majú väčší pomer povrchu tela k jeho objemu, trpia väčšími tepelnými stratami a musia vynaložiť viac energie, aby udržali stálu teplotu tela. Majú preto rýchlejší metabolizmus a taktiež vyššie teplotné rozmedzie tzv. termoneutralnej zóny. Termoneutrálna je taká teplota, pri ktorej bazálny metabolizmus zvieratá úplne stačí na udržanie telesnej teploty a nie je potreba žiadnej dodatočnej termogenézy. U normálnej laboratórnej myši sa táto teplota pohybuje okolo cca 30 °C, zatiaľ čo u ľahko oblečeného človeka zodpovedá klasickej izbovej teplote (tá je nám preto najpríjemnejšia) (Maloney et al., 2014). V termoneutralnom prostredí sú nároky na termogenézu a teda aj tonus sympatika a aktivita BAT minimálna (Boon et al., 2013). Práve štúdium myši v termoneutralite môže predstavovať lepší model ľudskej fyziológie pre výskum liečby obezity (Speakman and Keijer, 2014).

Tukové tkanivo vzniká v procese adipogenézy, kedy adipocytové prekursorové bunky diferencujú do zrelého tukového tkaniva. Preadipocyty sú prevažne mezenchýmového pôvodu. Predpokladá sa, že hnedé adipocyty pochádzajú z myogénnej bunkovej línie, ktorá exprimuje proteín myogénneho faktora 5 (**Myf5+**), zatiaľ čo biele adipocyty (Timmons et al., 2007), rovnako ako aj béžové adipocyty (Long et al., 2014), vznikajú z nemyogénnych bunkových línií (**Myf5-**). U cicavcov tukové tkanivo vzniká počas prena-

tálneho vývoja, no adipocyty sú nepretržite tvorené až do dospelosti. V prípade pozitívnej energetickej bilancie môžu dospelé adipocyty expandovať z 2 – 3 % až na 60 – 70 % celkovej telesnej hmotnosti (Spalding et al., 2008).

Rozoznávame dva druhy nárastu tukového tkaniva, a to hypertrofiu a hyperpláziu. V prípade hypertrofie sú zvýšené požiadavky na uskladňovanie TAG, teda dochádza k zväčšovaniu adipocytov. Ak hypertrofia pretrváva dlhšiu dobu, a adipocyty už nie sú schopné ukladať ďalšie TAG, môže dôjsť k vzniku metabolického syndrómu a inzulínovej rezistencie (Muir et al., 2016). Hypertrofia taktiež podporuje vznik lokálneho zápalu (Henninger et al., 2014). Tukové tkanivo sa môže rozširovať aj vznikom nových adipocytov, tento proces nazývame hyperplázia, teda zväčšovanie počtu buniek. Novo vzniknuté malé adipocyty, ktoré môžu prijímať ďalšie TAG a tým chrániť ostatné orgány, môžu mať protektívny účinok pred dysreguláciami metabolizmu (de Souza et al., 2001).

Tukové tkanivo je teda veľmi dynamický orgán, schopný reagovať na množstvo podnetov. Hrá veľmi dôležitú úlohu vo viacerých biologických procesoch, v dôsledku toho jeho narušenie môže viesť k závažným ochoreniam, ako je metabolický syndróm, obezita, diabetes mellitus druhého typu, atď. (Berry et al., 2013).



Obrázok č. 1 Vývoj jednotlivých typov adipocytov.

Biele a béžové adipocyty pochádzajú z Myf5- embryonickej kmeňovej bunky, hnedé adipocyty pochádzajú z Myf5+ embryonickej kmeňovej bunky. PRDM16 je nevyhnutný pre vznik fenotypu hnedého tukového tkaniva. Upravené podľa (Wu et al., 2013).

2.2 Metabolizmus lipidov v tukovom tkanive

2.2.1 Lipolýza

Lipidové kvapôčky adipocytov sú zložené z TAG, ktoré sú v prípade potreby hydrolyzované na glycerol a mastné kyseliny. Proces štiepenia TAG sa nazýva lipolýza a je mediováný prostredníctvom niekoľkých enzýmov, triacylglycerolovej lipázy (**ATGL**), hormón-senzitívnej lipázy (**HSL**) a monoacylglycerolovej lipázy (**MAGL**). Rýchlosť lipolýzy je presne regulovaná pomocou biochemických a hormonálnych signálov v reakcii na nutričný stav a energetické potreby organizmu (Lass et al., 2006). Iniciálny krok lipolýzy je katalyzovaný ATGL, ktorá preferenčne hydrolyzuje TAG na diacylglyceroly (**DAG**). HSL je zodpovedná hlavne za hydrolyzu DAG na monoacylglyceroly, s nižšou efektivitou je schopná hydrolyzovať aj TAG na DAG. ATGL aj HSL sú najdôležitejšie enzýmy lipolýzy, oba limitujú rýchlosť lipolýzy a taktiež zdieľajú množstvo spoločných regulačných mechanizmov. Ich aktivita je indukovaná okrem iného aj β -adrenergickou stimuláciou, naopak inzulín je zodpovedný za inhibíciu lipolýzy (Schweiger et al., 2006). Preto je lipolýza utlmená po jedle, kedy je inzulín zvýšený a môže byť vyvolaná napr. hladovaním alebo vystavením nízkym teplotám, teda aktiváciou sympatického nervového systému (viď kapitola 2.1.2 Hnedé tukové tkanivo a termogenéza). Tým, že ATGL katalyzuje lipolýzu, má dôležitú úlohu aj v degradácii tukových kvapôčok. Nadmerná expresia ATGL spôsobuje výrazné zníženie veľkosti tukových kvapiek (Smirnova et al., 2006). Narozdiel od toho ATGL deficiencia u myši je spojená s výrazne zníženou lipolýzou, čo vedie k zvýšenému ektopickému ukladaniu tukov prakticky vo všetkých tkanivách tela, najmä vo vysoko oxidačných tkanivách, ako sú svaly, semenníky a tubulárny systém obličiek (Haemmerle et al., 2006). Podobne ATGL mutácie u ľudí sú spojené so systémovou akumuláciou TAG a srdcovou myopatiou (Tavian et al., 2012). Posledným krokom lipolýzy je štiepenie monoacylglycerolov. Ne-esterifikované mastné kyseliny (**NEFA**) vytvárané pri lipolýze môžu byť uvoľnené do cirkulácie, re-esterifikované späť na TAG alebo oxidované (viď kapitola 2.2.2 Oxidácia mastných kyselín). Glycerol je uvoľňovaný do obehu následne je transportovaný do pečene alebo obličiek, kde je konvertovaný na glycerol 3-fosfát (**G3P**) pomocou enzýmu glycerol kinázy. G3P z pečene je konvertovaný na dihydroxyacetón fosfát a následne na glyceraldehyd 3-fosfát, kedy sa opäť pripája ku glykolýze alebo glukoneogenetickej dráhe (Saponaro et al., 2015).

Lipolýza prebieha hlavne v tukovom tkanive. Farmakologicky môže byť lipolýza aktivovaná prostredníctvom viacerých stimulov, napríklad spomínanou látkou CL (viď kapitola 2.1.2 Hnedé tukové tkanivo a termogenéza). Ďalšou látkou, ktorá stimuluje lipolýzu je izoproterenol inak nazývaný aj izoprenalín, čo

je nešpecifický agonista β -adrenergických receptorov (Pinkney et al., 1998). Keďže β_3 -adrenergický agonisti aktivujú tukové tkanivo, možno ich považovať za potenciálny liek v boji proti obezite (Xiao et al., 2015).

Patologické zmeny v lipolýze môžu byť spojené s rozvojom obezity, napr. zvýšenie bazálnej lipolýzy môže prispievať k inzulínovej rezistencii, ako aj zhoršiť citlivosť na stimuláciu lipolýzy (Reynisdottir et al., 1995).

2.2.2 Oxidácia mastných kyselín

Mastné kyseliny majú v organizme viacero osudov. WAT slúži ako zdroj lipidov pre zbytok tela, preto je veľká časť mastných kyselín po lipolýze uvoľnená do cirkulácie a putuje do pečene, kde je následne spätne premenená na TAG, zbalená do lipoproteínových partikul a opäť expedovaná do krvného obehu. Keď teda meriame hladinu NEFA v plazme, získavame informáciu o činnosti WAT, zatiaľ čo plazmatická hladina TAG reflektuje najmä metabolizmus pečene.

Z lipoproteínových častíc sú mastné kyseliny v krvnom riečišti periférnych tkanív opäť uvoľňované činnosťou lipoproteínovej lipázy (**LPL**). Periférne orgány následne mastné kyseliny oxidujú (oxidácia mastných kyselín, β -oxidácia) teda využívajú ich ako jeden zo zdrojov energie (Rosen and Spiegelman, 2006).

β -oxidácia samozrejme v nepatrnej miere prebieha aj priamo vo WAT (Wang et al., 2003). Omnoho významnejšiu úlohu ale hrá v BAT. Mastné kyseliny z BAT nie sú uvoľňované do cirkulácie a v drvivej väčšine sú oxidované priamo v tkanive, čo poskytuje značné množstvo energie nevyhnutné pre netriaškovú termogénzu (viď kapitola 2.1.2 Hnedé tukové tkanivo a termogénza).

Ku kľúčovým regulačným enzýmom v procese oxidácie mastných kyselín patrí vo všetkých tkanivách acyl koenzým A (**CoA**) syntetáza a karnitín-palmitoyltransferáza 1 (**CPT1**). Acyl-CoA syntetáza vytvára thioesterovú väzbu medzi mastnou kyselinou a CoA a dáva tak vznik acyl-CoA, teda aktivovanej mastnej kyseliny (Ahmadian et al., 2009). CPT1 následne zodpovedá za translokáciu aktivovaných mastných kyselín do mitochondrií (Wolfgang et al., 2006). Expresia enzýmov zapojených do oxidácie mastných kyselín je významne ovplyvnená aktivitou peroxizómového proliferátorom aktivovaného receptoru α (**PPAR α**) (Dreyer et al., 1992). Transkripčný faktor PPARa je kľúčovým regulátorom lipidového metabolizmu. Je dôležitý pre vychytávanie, utilizáciu a katabolizmus mastných kyselín. Je schopný viazať lipidové signálne molekuly a transdukovať vhodný signál do levelu génovej expresie. Taktiež majú určitú úlohu v regulácii

zápalovej odpovede, ktorá je veľmi podstatná v prípade metabolického syndrómu a aterosklerózy (Varga et al., 2011).

2.2.3 Re-esterifikácia mastných kyselín

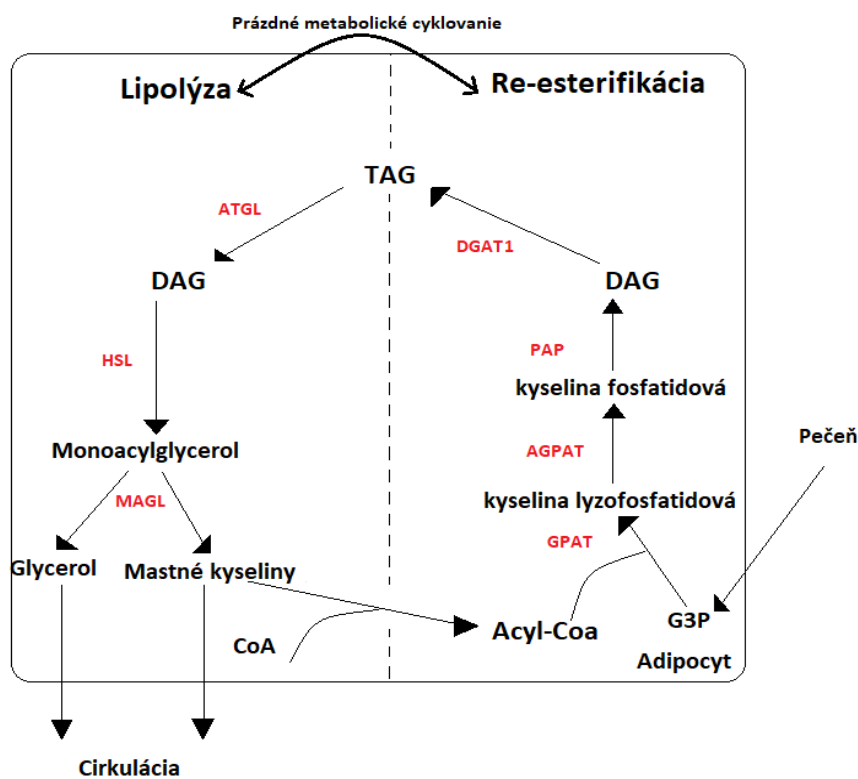
Vo WAT je zhruba polovica mastných kyselín po lipolýze premenená naspäť na TAG v procese re-esterifikácie. Práve re-esterifikácia je proces, ktorý citlivo reguluje množstvo uvoľnených mastných kyselín. Re-esterifikácia je opakujúca sa esterifikácia, pri ktorej sa pripájajú aktivované mastné kyseliny ku G3P a formujú tak TAG. Re-esterifikácia závisí na dostupnosti G3P. G3P môže byť v niektorých tkanivách pripravený fosforyláciou glycerolu enzýmom glycerol kinázou (Nye et al., 2008). Glycerol kináza je čiastočne aktívna v BAT (Festuccia et al., 2003), vo WAT však prakticky úplne chýba (Robinson and Newsholme, 1967). Preto glycerol uvoľnený pri lipolýze nemožno vo WAT priamo zužitkovať a je teda vylučovaný do cirkulácie. G3P je vo WAT nutné pripraviť v procese glyceroneogenézy. Ako zdroje pre syntézu G3P môžu slúžiť glukóza, pyruvát, niektoré aminokyseliny a pod.

Významnými regulačnými enzýmami zapojenými do premeny pyruvátu na G3P sú hlavne pyruvát dehydrogenázová kináza 4 (**PDK4**) a fosfoenolpyruvát karboxykináza (**PEPCK**) (Cadoudal et al., 2008; Leroyer et al., 2006). Overexpresia PEPCK v tukovom tkanive zvyšuje re-esterifikáciu mastných kyselín (Cadoudal et al., 2008), ďalej je spojená s hypertrofiou tukového tkaniva a nárastom hmotnosti. Zatiaľ čo farmakologická inhibícia PDK4 inhibuje zabudovávanie pyruvátu do TAG (Franckhauser et al., 2002). Ďalším dôležitým enzýmom zapojeným v re-esterifikácii je diacylglycerol O-acetyltransferáza 1 (**DGAT1**), ktorý v endoplazmickom retikule katalyzuje posledný krok re-esterifikácie, teda pripojenie posledného acyl-CoA k DAG za vzniku molekuly TAG (Chitraju et al., 2017).

Na kontrole esterifikácie sa podieľa aj niekoľko hormónov vrátane inzulínu, ktorý stimuluje syntézu lipidov (Dyck et al., 2001), zatiaľ čo glukagón ju inhibuje (Declercq et al., 1982). Farmakologicky možno re-esterifikáciu blokovať, napr. inhibítormi DGAT1, ako je látka A922500, ktorá účinne znižuje hladiny TAG v sére u hlodavcov (King et al., 2009).

V adipocytoch môže dochádzať k prázdnemu metabolickému cyklovaniu TAG a mastných kyselín (recyklácia mastných kyselín naspäť na TAG). K prázdnemu metabolickému cyklovaniu dochádza vtedy, keď dve metabolické dráhy prebiehajú súčasne v opačnom smere (viď **Obr. 2**). Tento cyklus dokáže regulovať hladiny voľných mastných kyselín v bunke a tým zabraňuje lipotoxicite (Braun et al., 2018). Lipotoxicita vzniká rýchlym uvoľňovaním NEFA pri lipolýze. Prázdne metabolické cyklovanie spolu s *de novo*

lipogenezou, ktorej sa venujem v nasledujúcej kapitole, predstavujú základné energiu spotrebúvajúce biochemické procesy v WAT, ktoré môžu byť spojené s rezistenciou na obezitu u myši (Flachs et al., 2017). Na esterifikáciu mastných kyselín za vzniku jednej molekuly TAG je potreba 7 až 9 molekúl ATP, podľa pôvodu G3P (Gauthier et al., 2008). Pre túto energetickú náročnosť sa o prázdnych cykloch lipolýzy a re-esterifikácie uvažovalo už pred objavom UCP1 ako o hlavnom mechanizme netriaškovej termogenézy v BAT. V súčasnosti sa podobné úvahy vracajú a niektoré skupiny uvažujú o re-esterifikácii ako o alternatívnom mechanizme netriaškovej termogenézy nezávislom na UCP1 (Schweizer et al., 2018). Je však nutné podotknúť, že v porovnaní s UCP1 je kapacita tohto mechanizmu, produkovať teplo zanedbateľná.

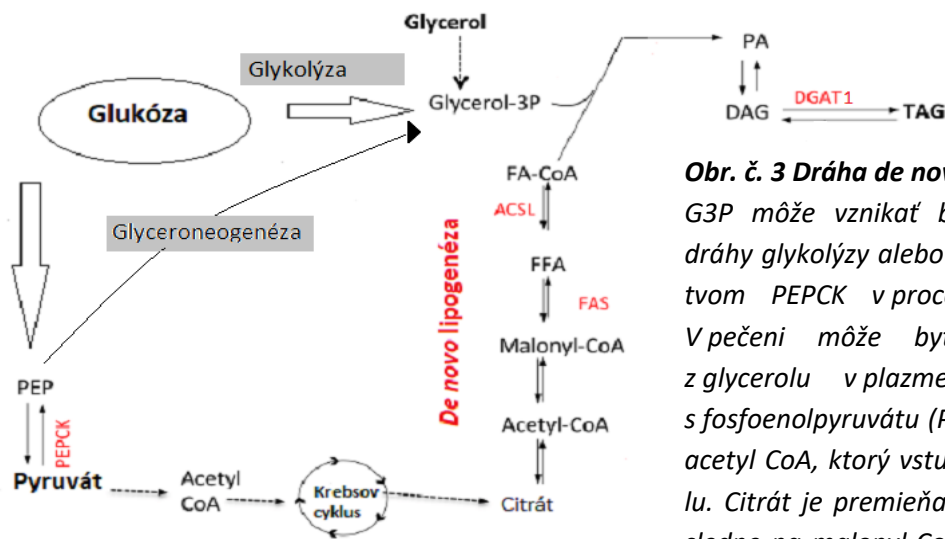


Obr. č. 2 Schematické znázornenie lipolýzy a re-esterifikácie

TAG sú hydrolyzované na glycerol a mastné kyseliny prostredníctvom triacylglycerolovej lipázy (ATGL), hormón-senzitívnej lipázy (HSL) a monoacylglycerolovej lipázy (MAGL). Glycerol je uvoľňovaný do cirkulácie. Mastné kyseliny sú buď uvoľňované do cirkulácie, alebo sú premenené naspäť na TAG v procese re-esterifikácie. G3P má viacero pôvodov (viď **Obr. 3**). Na vytvorenie TAG je okrem G3P potrebná aj aktivovaná mastná kyselina, teda acyl-CoA. Prostredníctvom glycerolfosfát acyltransferázy (GPAT) vzniká lyzofosfatidová kyselina, ktorá je acylglycerolfosfát acyltransferázou (AGPAT) premieňaná na kyselinu fosfatidovú. Pomocou fosforylázy kyseliny fosfatidovej (PAP) je kyselina fosfatidová konvertovaná na DAG. Nakoniec DGAT1 konvertuje DAG na TAG. Upravené podľa (Townsend et al., 2017).

2.2.4 De novo lipogenéza

TAG sú syntetizované esterifikáciou voľných mastných kyselín pochádzajúcich z potravy, lipolýzy alebo vzniknutých prostredníctvom *de novo* lipogenézy (DNL). DNL prebieha v cytoplazme v bunkách pečene, ale aj tukového tkaniva. Diéta s vysokým obsahom sacharidov DNL stimuluje, naopak hladovanie a polynenasýtené mastné kyseliny ju inhibujú. Po prijatí vysoko-sacharidovej stravy sa nadbytok sacharidov uloží do zásoby ako pečeneňový glykogén, zbytok sa premení na mastné kyseliny, ktoré sú následne zabudované do TAG (Hellerstein, 1999). Iniciálnym krokom v premene sacharidov na mastné kyseliny je premena pyruvátu z glykolýzy na acetyl-CoA v mitochondrii. Následne je acetyl-CoA nutné transportovať do cytozolu pomocou citrát shuttle aby mohol byť použitý na syntézu mastných kyselín. Iniciálnym krokom je premena acetyl-CoA na malonyl-CoA pomocou enzýmu acetyl-CoA karboxyláza v cytozole, ten sa začlení do reťazca mastných kyselín za vzniku palmitátu, prvej syntetizovanej mastnej kyseliny (vid' Obr. 3) (Flatt, 1970). V cicavčích a vtáčích organizmoch je pre DNL kľúčový enzýmový komplex syntáza mastných kyselín (FAS) (Smith, 1994). Ďalšie mastné kyseliny sa potom tvoria predlžovaním a desaturáciou tejto kyseliny. Príspevok DNL k celkovým zásobám lipidov v organizme je však relatívne malý (Saponaro et al., 2015).



Obr. č. 3 Dráha *de novo* lipogenézy

G3P môže vzniknúť buď ako medziprodukt dráhy glykolýzy alebo z pyruvátu prostredníctvom PEPCK v procese glyceroneogenézy. V pečeni môže byť G3P syntetizovaný z glycerolu v plazme. Pyruvát vznikajúci s fosfoenolpyruvátu (PEP) je konvertovaný na acetyl CoA, ktorý vstupuje do Krebsovho cyklu. Citrát je premieňaný na acetyl-CoA a následne na malonyl-CoA prostredníctvom acetyl-CoA karboxylázy.

Pre vznik voľných mastných kyselín je nevyhnutný enzýmový komplex FAS. Na syntézu TAG sú potrebné G3P a aktivované mastné kyseliny teda acyl-CoA. G3P a acyl-CoA sú acylované na kyselinu fosfatidovú. Po jej defosforylácii vznikajú diacylglyceroly (DAG). Enzým DGAT1 následne katalyzuje konverziu DAG na TAG. Upravené podľa (Saponaro et al., 2015).

3. Tukové tkanivo a metabolický syndróm

V súčasnej dobe sedavých zamestnaní, nedostatku pohybu a nadmerného príjmu energeticky bohatých potravín trápí obezita a nadváha čoraz viac ľudí. Obezita je charakterizovaná ako nadmerná akumulácia a ukladanie tuku v tele a často je spojená s metabolickým syndrómom (Grundy, 2015). Práve rovnováha medzi lipolýzou a re-esterifikáciou ovplyvňuje nárast tukového tkaniva (Campbell et al., 1992). Nadmerná hmotnosť je problémom hlavne kvôli súvisiacim ochoreniam ako je diabetes mellitus druhého typu, kardiovaskulárne ochorenia, nealkoholová steatóza pečene a nemožno opomenúť ani zvýšené riziko niektorých foriem rakoviny. Metabolický syndróm sa vyskytuje u 20 % až 40 % celosvetovej populácie dospelých. Tento syndróm zvyšuje riziko kardiovaskulárnych ochorení, jeho znaky sú abdominálna obezita, zvýšená hladina TAG, zvýšený apolipoproteín B, znížený lipoproteín s vysokou hustotou (HDL – high-density lipoproteín), zvýšený krvný tlak, zvýšené hladiny glukózy a prozápalové a protrombotické stavy (Grundy, 2008).

Existuje niekoľko teórií vzniku metabolického syndrómu a s ním spojenou obezitou. Jednou z nich je teória mastných kyselín, podľa tejto teórie veľkosť tukových zásob determinuje hladiny NEFA v plazme a následne aj množstvo ektopického tuku. Ektopický tuk sú TAG uložené v bunkách mimo tukového tkaniva, dôvodom môže byť prekročenie kapacity tukového tkaniva alebo nedostatok tukového tkaniva (Lettner and Roden, 2008). Nadbytok NEFA je považovaný za jeden zo spúšťačov metabolického syndrómu. Na tejto teórii je založený vznik obezity v hornej časti tela (Boden, 2008).

Aktívne metabolity, ktoré sú uvoľňované tukovým tkanivom sa nazývajú adipokíny. Patria medzi ne leptín, adiponektín, zápalové cytokíny, rezistín, visfatín, inhibítora aktivátora plazminogénu-1 (PAI-1) a angiotenzinogén. Pôsobenie adipokínov predstavuje ďalšiu teóriu vzniku metabolického syndrómu v súvislosti s obezitou. Niektoré z nich sú považované za metabolické rizikové faktory, teda zvyšujú riziko metabolického syndrómu (Lehr et al., 2012). Leptín (Heymsfield et al., 1999) a adiponektín (Yang et al., 2001) pôsobia hlavne protektívne, no mechanizmus nie je úplne jednoznačný (viď kapitola 2.1. Všeobecné poznatky o tukovom tkanive). Rizikovým faktorom je hlavne prozápalový stav, ku ktorému prispieva prebytok tukového tkaniva. Pri obezite dochádza k akumulácii makrofágov v tukovom tkanive (Weisberg et al., 2003). Cytokíny uvoľnené pri tomto procese sa uvoľňujú do obehu a môžu spôsobiť systémový zápal a/alebo rezistenciu na inzulín (Stephens and Pekala, 1992).

Spolu s obezitou dochádza k rozvoju inzulínovej rezistencie. Pri obezite je tukové tkanivo odolné voči účinkom inzulínu. Teda potlačeniu lipolýzy a akútnemu stimulačnému efektu inzulínu na LPL, ktorá je zapojená do ukladania tuku. Následne dochádza k prekročeniu kapacity adipocytov, a tie už nie sú

schopné ukladať ďalší tuk, a teda ani chrániť ostatné tkanivá pred tokom mastných kyselín. Zvýšené hladiny TAG a NEFA majú negatívny účinok na inzulínovú senzitivitu (Ellis et al., 2000). Inzulínová rezistencia neznamena iba zníženie reakcie tkanív na inzulín, ale ako bolo spomenuté, ovplyvňuje lipidový metabolizmus a je spojená s hypertenziou, endotelovou dysfunkciou a ďalšími nepriaznivými účinkami na fyziologické systémy (Brunzell and Hokanson, 1999).

No problémom nie je iba nadbytok tukového tkaniva, ale aj jeho nedostatok inak označovaný ako lipodystrofia. Takéto tukové tkanivo nie je schopné absorbovať prílev mastných kyselín po jedle, čo vedie k ektopickému ukladaniu tuku v pečeni a kostrových svaloch. Zdá sa, že práve tento ektopický tuk sa môže podieľať na silnej inzulínovej rezistencii, steatóze, diabetu mellitus druhého typu a zvýšených hladinách TAG (Huang-Doran et al., 2010; Joseph et al., 2014). Primerané množstvo tukového tkaniva môže chrániť pred metabolickým syndrómom tým, že poskytuje bezpečné úložisko pre lipidy z potravy. Vylučovaný leptín zároveň tlmí pocit hladu a pôsobí proti prejedaniu sa (Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995).

4. Fibroblastový rastový faktor 21 (FGF21)

Jedným z potenciálnych liekov pôsobiacich proti rozvoju obezity a metabolického syndrómu by mohol byť v súčasnosti intenzívne skúmaný fibroblastový rastový faktor 21 (**FGF21**) (Fisher and Maratos-Flier, 2016). FGF21 je peptidový hormón pôsobiaci ako metabolický regulátor, ktorý kontroluje glukózovú homeostázu, inzulínovú senzitivitu a ketogézu (Badman et al., 2007). Podávanie FGF21 obéznym hľadcom vedie k znižovaniu telesnej hmotnosti, pričom tento účinok nemožno vysvetliť zmenami v príjme potravy, ale skôr zvýšením energetického výdaja (Coskun et al., 2008).

FGF21 je členom širokej FGF rodiny, u ľudí obsahuje 22 faktorov, ktoré sa podieľajú na regulácii prežitia buniek, mitogéze, bunkovom raste, tkanivovej reparácii a raste nádorov (Ornitz and Itoh, 2001). V užšom delení patrí FGF21 do FGF endokrinnnej podrodiny, ktorej členovia neobsahujú domény viažuce heparín a sú preto uvoľňované do cirkulácie. Ľudský FGF21 je vysoko homológny s myším FGF21, avšak jeho nízka homológia s inými ľudskými FGF naznačuje, že FGF21 je štrukturálne jedinečný (Nishimura et al., 2000). Pri testovaní boli gény pre FGF21 identifikované u väčšiny stavovcov okrem kuracieho genómu (Wicker et al., 2005).

Miestom najväčšej produkcie FGF21 je pečeň, ktorá rozhodujúcim spôsobom ovplyvňuje hladiny FGF21 v plazme. Ale aj extrahepatálne tkanivá ako WAT, BAT a kostrové svaly exprimujú FGF21 (Badman

et al., 2007). V pečeni sú hladiny FGF21 zvýšené prostredníctvom PPAR α , ktorý je aktivovaný mastnými kyselinami počas hladovania alebo ketogénnym stravovaním. Tento cirkulujúci FGF21 zvyšuje energetický výdaj prostredníctvom termogénnej aktivácie tukového tkaniva (BonDurant et al., 2017). Ketogénna diéta má vysoký obsah tukov a nízky obsah sacharidov (Woodyatt, 1921). Je veľmi efektívna pri zhadzovaní hmotnosti, znižovaní rezistencie na inzulín, znižovaní koncentrácie triglyceridov v sére a zvyšovaní koncentrácií HDL-cholesterolu (Foster et al., 2003). Na rozdiel od toho chladová expozícia vedie k lokálnemu zvýšeniu FGF21 v tukovom tkanive, čo vedie k autorkinnej aktivácii bez akýchkoľvek zmien v systémových hladinách FGF21 (Fisher et al., 2012). Exogénny FGF21 vyvoláva v pečeni protizápalovú odpoveď v kontexte lipotoxického diéty (Markan et al., 2014).

Hladiny FGF21 sú vyššie pri obezite ako u ľudí, tak u hlodavcov, čo naznačuje že obezita je FGF21 rezistentný stav, kedy je odpoveď jednotlivých orgánov na exogénny FGF21 oslabená. Napriek tejto rezistencii má FGF21 preukázateľné antiobézne účinky u myši (Coskun et al., 2008; Veniant et al., 2015). Mechanizmus rezistencie je známy aj pri iných hormónoch ako je inzulín, leptín atď. no v prípade mechanizmu rezistencie na FGF21 je nutný ešte ďalší výskum (Fisher et al., 2010).

4.1 Účinky FGF21 na jednotlivé orgány

Interakcia FGF21 s jeho receptorom udáva tkanivovú špecifitu účinku. Na vyvolanie účinku je potrebná prítomnosť β Klotho, je to transmembránový proteín exprimovaný hlavne v pečeni, tukovom tkanive (BAT aj WAT) a pankrease, slúži ako priama transmembránová podjednotka FGF21 receptora a tvorí s ním komplex. β Klotho s FGF receptorom tvoria neaktívny komplex na povrchu buniek, ktorý sa aktivuje po väzbe FGF21. Táto aktivácia vedie k fosforylácii signalizačnej molekuly, FGF receptor substrátu 2, ako aj k následnej fosforylácii extracelulárne regulovanej signálnej kinázy 1 a 2 (**ERK1, 2**), (Kharitonov et al., 2008) (viď **Obr. č. 4**).

Účinky FGF21 na pečeň môžu byť sprostredkované priamo účinkom FGF21 na hepatocyty alebo prostredníctvom sekundárnych mediátorov odpovedajúcich na pečeneňový FGF21, buď prostredníctvom tukového tkaniva, alebo centrálnej nervovej sústavy (Hsuchou et al., 2007). V pečeni FGF21 stimuluje oxidáciu mastných kyselín, produkciu ketónových látok a inhibuje lipogénu (Coskun et al., 2008).

V tukovom tkanive FGF21 ovplyvňuje aj glukózový metabolizmus. Zistilo sa, že v bunkách 3T3-L1 by mohol FGF21 pôsobiť špecificky na zvýšenie príjmu glukózy prostredníctvom vyššej expresie glukózového transportéra-1 (**GLUT1**) (Kharitonov et al., 2005). Transport glukózy bol výrazne stimulovaný po akti-

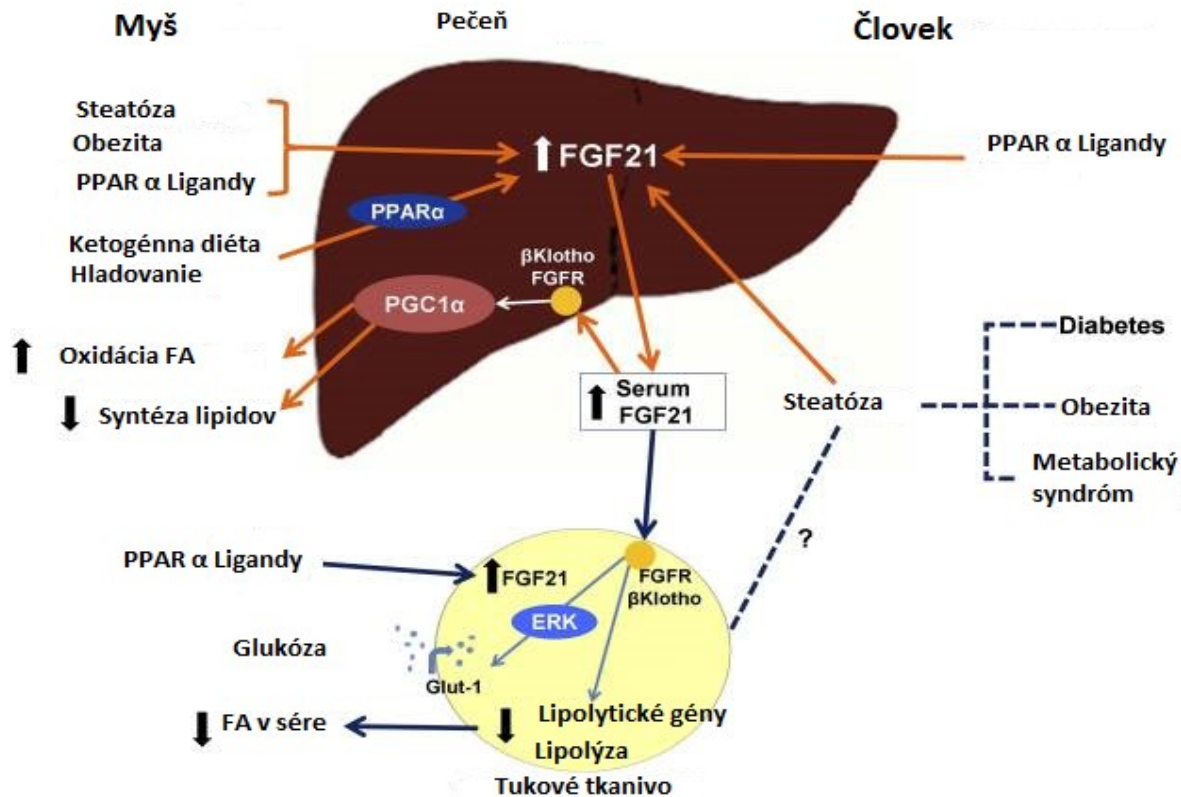
vácii dráhy PPAR γ a následne FGF21 (Moyers et al., 2007). Experimentálna aplikácia u diabetických myší znižuje hladiny glukózy a cirkulujúceho inzulínu v krvi (Coskun et al., 2008), čo naznačuje zvýšenie senzitivity k inzulínu.

FGF21 ovplyvňuje aj lipidový metabolizmus vo WAT. No názory na to, či FGF21 stimuluje alebo inhibuje lipolýzu, sa rozchádzajú. Pôvodné práce (Inagaki et al., 2007) ukazovali stimuláciu bazálnej lipolýzy na 3T3-L1 adipocytoch. Novšie práce (Arner et al., 2008) však pri použití rovnakých podmienok pozorovali skôr inhibíciu lipolýzy. Inhibíciu lipolýzy potvrdzuje aj práca, v ktorej je popísané, že jednorazová injekcia obéznym myšiam znížila level voľných mastných kyselín v plazme (Li et al., 2009). Ďalší experiment na FGF21 knockout myšiach naznačuje, že účinok FGF21 môže závisieť na metabolickom stave organizmu: endogénny FGF21 údajne stimuluje lipolýzu počas normálneho príjmu potravy a naopak inhibuje lipolýzu počas hladovania (Hotta et al., 2009). Práve počas hladovania dochádza k zvýšeniu hladín FGF21 v plazme vplyvom zvýšenej expresie pečeneového FGF21. Tento stav je preto možné prirovnať k aplikácii exogénneho FGF21. Okrem účinkov na lipolýzu FGF21 znižuje cholesterol a TAG v experimentoch na myšiach (Veniant et al., 2015) (Kharitonov et al., 2005) a opiciach (Kharitonov et al., 2007). Ďalšou dôležitou úlohou FGF21 je indukcia UCP1, a teda zvýšenie termogenézy v interskapulárnom BAT u myší. Do tohto procesu sa vedľa plazmatického FGF21 zapojuje aj parakriné pôsobenie FGF21, ktorý je produkováný priamo v tukovom tkanive. No tento účinok nie je obmedzený iba na BAT, chronická chladová expozícia zvýšila expresiu FGF21 aj v ďalších tukových depách, ktoré sú citlivé na chlad ako sú subkutánny a perirenálny tuk, kde FGF21 údajne ovplyvňuje adaptívnu termogenézu (Fisher et al., 2012). Zdá sa, že FGF21 podporuje hnednutie niektorých dep WAT (viď kapitola 2.1.2 Hnedé tukové tkanivo a termogenéza). Aj tento jav môže sprostredkovať metabolické efekty FGF21 a zvýšená termogenéza môže prispievať k zvýšenému energetickému výdaju, strate hmotnosti a glukózovej tolerancii (Wu et al., 2011). Súčasnejšie práce však prekvapivo ukázali, že FGF21 spôsobuje pokles hmotnosti aj u myší s nefunkčným UCP1 (Samms et al., 2015; Veniant et al., 2015), čo spochybňuje význam netriaškovej termogenézy pre účinky FGF21. V rozpore s predchádzajúcimi teóriami bolo taktiež ukázané, že FGF21 nie je nevyhnutný ani pre stimuláciu termogenézy (Keipert et al., 2017).

FGF21 tiež reguluje mitochondriálnu aktivitu a zvyšuje oxidatívnu kapacitu prostredníctvom adenosínmonofosfát-aktivovanej proteínkinázy (AMPK), sirtuínu 1 (SIRT1) a PPAR γ koaktivátoru 1 α (PGC-1 α) (Chau et al., 2010). Vplyv PGC-1 α na mitochondriálnu biogenézu je zapojený aj do adaptívnej termogenézy a metabolizmu glukózy a mastných kyselín (Herzig et al., 2001), PGC-1 α pôsobí ako koaktivátor PPARa pri transkripčnej kontrole mitochondriálnych génov, ktoré sa podieľajú na oxidácii mastných kyselín (Vega et al., 2000).

Okrem pečene a tukového tkaniva FGF21 pôsobí aj v centrálnej nervovej sústave. U myší po systematickej administrácii prechádza hematoencefalickou bariérou a ostáva intaktný (Hsuchou et al., 2007). U ľudí ho možno nájsť v cerebrospinálnej tekutine (Tan et al., 2011). Ukázalo sa, že FGF21 u myší ovplyvňuje cirkadiánnu periodicitu a fertilitu, čo môže byť priamy účinok v centrálnej nervovej sústave (Bookout et al., 2013). Centrálny účinok FGF21 môže zvýšiť energetický výdaj práve vďaka zvyšovaniu sympatickej aktivity (Owen et al., 2014). Nejasná ostáva úloha FGF21 v pankrease a v svalu (Fisher and Maratos-Flier, 2016).

Nádejne antiobézne účinky FGF21 u laboratórnych hlodavcov (Kharitonov et al., 2005; Samms et al., 2015; Veniant et al., 2015) odhalili potenciál pre liečbu obezity aj u ľudí. Spoločnosti preto vytvárajú varianty alebo analógy FGF21 použiteľné v humánnej medicíne, ktoré majú zvýšenú stabilitu a účinnosť oproti natívnemu FGF21 proteínu. Jedným z nich je aj LY2405319, ktorý sa testoval na randomizovaných, placebom kontrolovaných, dvojito zaslepených skúšobných testoch, na pacientoch s obezitou a diabetom mellitus druhého typu. Po 28 dňoch liečby pacienti znížili hmotnosť a zlepšil sa im lipidový profil v sére (Gaich et al., 2013). Ďalšie spoločnosti stabilizujú FGF21 prostredníctvom konjugácie s inými skupinami ako sú polyetylén glykol alebo imunoglobulíny, ktoré majú v animálnych modeloch za následok zlepšenie glukózovej tolerancie a redukciu telesnej hmotnosti (Xu et al., 2013).



Obr. č. 4 Účinky FGF21 u myší a ľudí

Po konzumácii ketogénnej stravy / po hladovaní dochádza u myší k vzostupu FGF21 koncentrácií v sére a v pečeni je to riadené prostredníctvom peroxizómového proliferátorom aktivovaného receptora α (PPAR α). Nárast koncentrácie FGF21 v pečeni u myší je tiež indukovaný steatózou pečene, obezitou a PPAR α ligandmi. FGF21 interaguje s receptorom FGF v prítomnosti transmembránového proteínu β Klotho v pečeni a tukovom tkanive. Táto interakcia vedie k PPAR γ coactivator protein-1 α (PGC1 α) dependentnej up-regulácii oxidácie mastných kyselín a zníženiu regulácie syntézy lipidov v pečeni. V tukových tkanivách vedie prítomnosť PPAR γ ligandov k produkcii FGF21. Krátkodobý účinok FGF21 má za následok zníženú expresiu lipolytických génov a následne vedie k nižším koncentráciám cirkulujúcich NEFA. FGF21-indukovaná fosforylácia extracelulárnej signálnej regulovanej kinázy-1 (ERK1) vedie k aktivácii GLUT1 a absorpcie glukózy v myších 3T3-L1 adipocytoch a primárnych ľudských adipocytoch. U ľudí je mechanismus obdobný a sérová koncentrácia FGF21 je vyššia pri diabete mellitus druhého typu, obezite, metabolickom syndróme a nealkoholovej steatóze pečene. Upravené podľa (Domouzoglou and Maratos-Flier, 2011).

5. Ciele práce

V úvode diplomovej práce som sa snažila objasniť metabolické deje v tukovom tkanive a popísať ako sú tieto procesy ovplyvnené FGF21. Ako už bolo spomínané, FGF21 predstavuje potenciálne liečivo na terapiu porúch metabolizmu ako obezita, diabetes mellitus druhého typu, atď. Účinok FGF21 bol demonštrovaný prostredníctvom animálnych a bunkových modelov za účelom dosiahnutia nasledujúcich cieľov, ktoré by mali pomôcť objasniť problematiku:

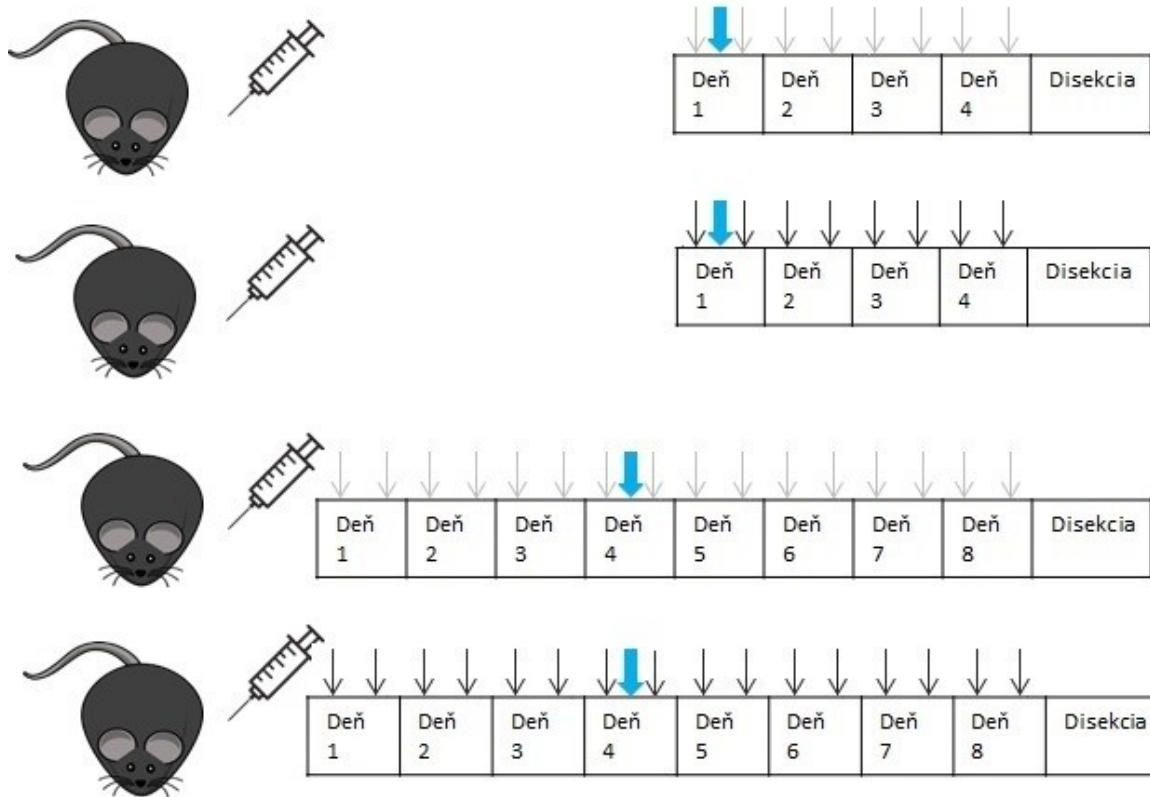
- 1. Optimalizovať protokol pre meranie lipolýzy v bunkových kultúrach.**
- 2. Charakterizovať efekt FGF21 v obéznych myšiach chovaných v termoneutrálnom prostredí, najmä časovú súslednosť metabolických zmien v jednotlivých orgánoch.**
- 3. Vysvetliť mechanizmus účinku FGF21 na produkciu ne-esterifikovaných mastných kyselín vo WAT (posúdiť možne zapojenie re-esterifikácie mastných kyselín).**
- 4. Charakterizovať vplyv FGF21 na hladinu krvnej glukózy a pravdepodobný mechanizmus ovplyvňovania tohoto parametru.**

6. Materiál a metódy

6.1 *In vivo* experimenty

V animálnom experimente bol použitý myší kmeň C57BL/6J BomTac (Taconic, Dánsko), (skrátene **B6**), náchylný k diétou indukovanej obezite a ďalším metabolickým komplikáciám (Black et al., 1998). 44 samcov B6 bolo po dovezení kŕmené štandardnou diétou (Ssniff Spezialdiäten, Nemecko), (13 MJ metabolizovateľnej energie / kg). Následne boli vo veku 6 týždňov umiestnené do termoneutrálnej teploty, čo v prípade myší predstavuje 30 °C. Na jednu klietku pripadali 4 samce. Kŕmené boli potom vysoko-tukovou diétou (Ssniff E15742 Spezialdiäten, Nemecko), (21,4 MJ metabolizovateľnej energie / kg, 60 % energie vo forme lipidov), ktorá zhoršuje inzulínovú senzitivitu a spôsobuje rozvoj obezity (Wang and Liao, 2012), pričom potravu a vodu mali k dispozícii neobmedzene. Počas celej doby experimentu mali 12 hodinový svetelný režim. Každý týždeň prebiehali kontroly hmotnosti a spotreby krmiva. Po dosiahnutí požadovanej hmotnosti (v našom prípade to bolo cca 40 g, ktoré boli dosiahnuté po cca 3 mesiacoch chovania na vysoko-tukovej diéte) boli myši separované, teda na jednu klietku pripadala 1 myš a zahájila sa farmakologická aplikácia.

Prebehli dva experimenty, experiment č.1 bol zameraný na sledovanie nástupu účinku FGF21. Po dobu 4 alebo 8 dní bolo dvakrát denne aplikované FGF21, (65 µl / myš, čo približne odpovedá 1,5 mg/kg telesnej hmotnosti) alebo rovnaký objem kontrolného roztoku (10mM fosfát, 2 % glycerol, 0,05 % Tween 80, pH 8,15) prostredníctvom subkutánnej injekcie do interskapulárnej zóny. Aplikácia prebiehala približne ráno o 9:00 a večer o 17:00. 4 dni pred usmrtením bol jednorazovo intraperitoneálne aplikovaný fyziologický roztok obsahujúci ťažkú vodu ($^2\text{H}_2\text{O}$) (1.7 ml / myš) a zároveň bolo 10 % pitnej vody nahradené $^2\text{H}_2\text{O}$ (viď **Obr. č. 5**).



Vysvetlivky:

- ↓ ↓ Kontrolný roztok, aplikácia ráno a večer
- ↓ $^2\text{H}_2\text{O}$, jednorázová aplikácia
- ↓ ↓ FGF 21, aplikácia ráno a večer

Obr. č. 5 Schematické znázornenie experimentu č. 1

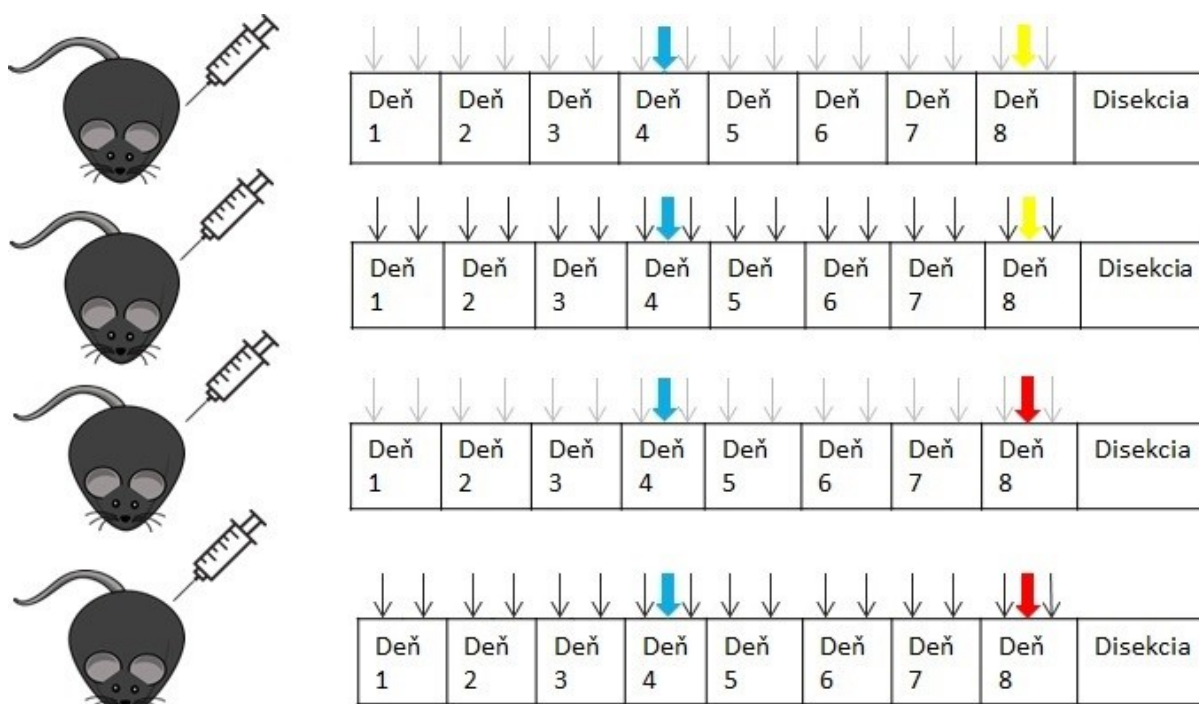
Pre podrobnosti vid' text.

Experiment č. 2 bol zameraný na sledovanie efektu FGF21 na lipolýzu stimulovanú β_3 -adrenergným agonistom CL316,243. Ako v experimente č. 1 bolo aplikované FGF21 alebo soľný roztok po dobu 8 dní. Tak isto ako pri predchádzajúcom experimente bola 4 dni pred usmrtením jednorazovo intraperitoneálne aplikovaná $^2\text{H}_2\text{O}$ (1.7 ml / myš) a zároveň bolo 10 % pitnej vody nahradené $^2\text{H}_2\text{O}$. Následne 1 deň pred usmrtením bol jednorazovo intraperitoneálne aplikovaný roztok CL (350 μl / myš, čo približne odpovedá 1 mg/kg telesné hmotnosti), alebo soľný roztok (vid' kapitola 2.2.1 Lipolýza), (vid' **Obr. č. 6**)

2 až 3 hodiny po administrácii CL alebo soľného roztoku bola meraná glukóza z chvostovej cievy.

Po ukončení aplikácie boli myši krátko anestetizované éterom a následne usmrtené podstrihnutím krčných ciev. Bola im odobratá krv a orgány ako pečeň, srdce, sval *musculus quadriceps*, interscapulárne BAT, dorzolumbálne WAT a gonadálne WAT. Opätovne bola stanovená glukóza. Následne boli jednotlivé orgány zvážené a bezprostredne zmrazené v kvapalnom dusíku a do spracovania uchovávané v -80 °C.

Na stanovenie glukózy sa používal glukometer Contour plus spolu s testovacími pásmi (Bayer, Nemecko). Princíp metódy spočíva v enzymatickej reakcii, pri ktorej sa glukóza z krvi oxiduje na testovacom pásmu na peroxid vodíka, ktorý je potom elektrolyticky rozkladaný na katióny vodíku a anióny kyslíku. Anióny kyslíku putujú ku kladnej elektróde, čo je glukometrom zaznamenané ako elektrický prúd. Veľkosť prúdu zodpovedá výslednej glykémii.



Vysvetlivky:

↓ ↓ Kontrolný roztok, aplikácia ráno a večer

↓ ↓ $^2\text{H}_2\text{O}$, jednorázová aplikácia

↓ ↓ FGF 21, aplikácia ráno a večer

↓ Soľný roztok, jednorázová aplikácia

↓ CL316,243

Obr. č. 6 Schematické znázornenie experimentu č. 2

Pre podrobnosti vid' text.

6.2 *In vitro* experimenty

V sprievodnom experimente na bunkových kultúrach bola použitá bunková línia 3T3-L1 (ATCC, USA), ktorá je odvodená z myších 3T3 buniek na základe schopnosti akumulovať lipidy. Diferencované 3T3-L1 bunky sú často používaným *in vitro* modelom na výskum bieleho tukového tkaniva. Z morfológického hľadiska sú to fibroblasty, ktoré pod vplyvom vhodných podmienok teda pro-diferenciačných látok diferencujú na zrelé adipocyty. Tieto bunky sú taktiež citlivé na lipogénne a lipolytické hormóny a látky ako adrenalín, izoproterenol a inzulín (Morrison and McGee, 2015) .

Pre zamedzenie kontaminácie sa s bunkami pracovalo v laminárnom boxe Steril VBH (Schoeller, Česká republika). Po rozmrazení bunky rástli v predpripravenom proliferačnom médiu (viď **Tab. č. 1** vľavo). Bunky boli umiestnené v CO₂ inkubačnom boxe (Schoeller, Česká republika) pri 10 % koncentrácii CO₂ a 37 °C do dosiahnutia konfluencie (zhruba 7 dní). Potom bolo na indukciu diferenciácie proliferačné médium vymenené za diferenciačné obohatené o dexametazón a BRL na 48 hodín (viď **Tab. č. 1** vstrede). Následne bolo médium vymenené za diferenciačné (viď **Tab. č. 1** vpravo) v ktorom bunky diferencovali 11 až 13 dní.

Vo vlastnom experimente boli bunky vystavené pôsobeniu rôznych koncentrácií CL316,243, izoproterenu, alebo A922500 v niekoľkých časových intervaloch (pre podrobnosti viď kapitola 7.1 Príprava systému na sledovanie lipolýzy v tkanivových kultúrach). Následne boli odobrané vzorky pre stanovenie NEFA (viď kapitola 6.4.3 Stanovenie ne-esterifikovaných mastných kyselín).

Proliferačné médium		Diferenciačné médium s BRL a dexametazónom		Diferenciačné médium	
90 ml	D-MEM (4,5 g/l glukóza)	90 ml	D-MEM (4,5 g/l glukóza)	90 ml	D-MEM (4,5 g/l glukóza)
10 ml	10 % teľacie sérum	10 ml	10 % fetálne bovinne sérum	10 ml	10 % fetálne bovinne sérum
100 µl	penicilín+streptomocín	100 µl	penicilín+streptomocín	100 µl	penicilín+streptomocín
		50 µl	1,66 mM inzulín	50 µl	1,66 mM inzulín
		200 µl	1 mM dexametazón		
		100 µl	100 µM BRL v dimetyl sulfoxide		

Tabuľka č. 1 Zloženie médií na bunkové kultúry (pre celkový objem 100 ml).

6.3 Analýza génovej expresie

6.3.1 Izolácia RNA

Na izoláciu ribonukleovej kyseliny (**RNA**) z rôznych tkanív bol použitý Trizol od firmy SIGMA-ALDRICH, USA. Toto činidlo je možné využiť k súčasnej izolácii RNA, deoxyribonukleovej kyseliny (**DNA**) a bielkovín. Postupovalo sa s menšími úpravami podľa inštrukcií výrobcu SIGMA-ALDRICH. Ak nebolo uvedené inak, všetky kroky prebiehali pri izbovej teplote. Na zamedzenie kontaminácie sa pracovalo na mieste určenom výhradne na izoláciu RNA. Pred izoláciou boli vzorky skladované v kvapalnom dusíku alebo pri teplote -80 °C.

Najskôr boli zmrazené vzorky zhomogenizované v 1 ml Trizolu (roztok obsahujúci guanidium thiokyanát a fenol) pomocou oscilačného mlynu MM400 (Retsch, Nemecko) a keramickej guličky (tukové tkanivo bolo homogenizované 3 min., pečeň 5 min.). Nasledovala centrifugácia vzoriek (centrifúga UNIVERSAL 320 (Hettich, Nemecko)), 10 min., 12000 g, 4 °C, ktorou sa odstránil prebytočný tuk (horná fáza) a nezhomogenizované zbytky (pelet). Odobraná číra medzifáza sa inkubovala pri izbovej teplote 5 min.

RNA bola od DNA a proteínovej medzifázy separovaná pridaním chloroformu (0,2 ml na 1 ml Trizolu), dôkladným pretrepaním a 10 min. inkubáciou. Oddelenie fáz bolo urýchlené ďalšou centrifugáciou (15 min., 14 000 g, 4 °C) a do novej 1,5 ml mikroskúmavky bola odobraná vrchná vodná fáza, ktorá obsahovala RNA (spodná fáza obsahuje DNA a medzifáza proteín).

Následne bola RNA precipitovaná pridaním izopropanolu (0,5 ml na 1 ml TRI reagentu). Po pretrepaní v ruke boli vzorky inkubované pri izbovej teplote 10 min., aby sa mohla RNA vyzrážať. Následnou centrifugáciou (10 min., 12000 g, 4 °C) RNA sedimentovala v podobe gelovitého peletu.

Pelet RNA bol premytý 75 % etanolom (1 ml na 1 ml TRI reagentu), bol vortexovaný (Scientific Industries, USA) a inkubovaný 5 min. Po centrifugácii (10 min., 12000 g, 4 °C) a odobratí supernatantu boli vzorky sušené vo vákuovej odparke (Hettich, Nemecko), (5 min., 40 °C). Na zmeranie koncentrácie RNA bol pelet rozpustený v autoklávovanej vode (15 min., 60 °C), množstvo vody záviselo od druhu tkaniva (tukové tkanivo v 11 µl, pečeň v 500 µl). Na spektrofotometri NanoDrop (NanoDrop, USA) sa zmerala koncentrácia a skontrolovala sa čistota vyzolovanej RNA. Koncentrácia RNA bola určená z merania veľkosti absorbančie v našom prípade pri vlnovej dĺžke 260 nm. Z pomerov absorbančie pri rôznych vlnových dĺžkach sa získala informácia o čistote RNA. Pomer absorbančie pri vlnovej dĺžke 260 a 280 nm hovoril o kontaminácii proteínmi a pomer absorbančie pri 260 a 230 nm zase o zbytkoch organických rozpúšťadiel. V oboch prípadoch sa doporučená hodnota pohybovala od 1,7 až 2. Je potrebné podotknúť, že nie

vždy sa nám podarilo dosiahnuť doporučenú hodnotu, no v súlade s dlhodobými skúsenosťami na oddelení boli hodnoty aj tak dostačujúce na meranie génovej expzie. Nariedená RNA o známej koncentrácii sa skladovala pri teplote -80 °C.

6.3.2 Reverzná transkripcia

Ďalším dôležitým krokom pri sledovaní génovej expzie je reverzná transkripcia, je to proces pri ktorom sa vyzolovaná RNA prepisuje do DNA. Aby sa zabránilo degradácii RNA, so vzorkami sa pracovalo na ľade. Vzorky sa nariedili na koncentráciu 500 ng/μl. Zmiešaním 1 μl zo všetkých vzoriek sa pripravila zmesná vzorka. Tá ďalej slúžila k príprave negatívnej kontroly (vzorky kde neprebehne reverzná transkripcia) a riediacej kalibračnej rady RNA. Následne bol v UV dekontaminačnom boxe pripravený MIX A, ten sa skladá z autoklávovanej vody a primeru Oligo T, ktorý páruje s adenínom na polyA konci messengerovej RNA (**mRNA**) a tak rozlišuje mRNA. Do nových 0,5 ml autoklávovaných mikroskúmaviiek umiestnených na chladiacej doštičke sa napipetovali vzorky (1 μg RNA na reakciu, teda 2 μl vzorky o koncentrácii 500 ng/μl) a príslušné množstvo MIXU A (viď **Tab. č. 2**). Spolu so vzorkami sa pripravila aj riediaci rada zmesnej vzorky o koncentrácii 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, a 0.01 ng/μl. Negatívna kontrola sa miesto MIXU A doplnila čistou vodou. Vzorky sa 5 min. inkubovali v termocykléri (Biometra, Nemecko), následne boli schladené. V medzičase sa v UV dekontaminačnom boxe pripravil MIX B, ktorý obsahuje 5x koncentrovaný buffer, dithiotreitol (DTT), ktorý rozvoľňuje sekundárnu štruktúru RNA, dNTP mix, teda nukleotidy na prepísanie do komplementárnej DNA (**cDNA**) a M-MLV enzým. Do mikroskúmaviiek v termocykléri sa pridalo vypočítané množstvo MIXU B (viď **Tab. č. 2**) a inkubovalo sa 50 min. pri teplote 37 °C, kedy reverzná transkriptáza syntetizuje komplementárne vlákno z mRNA templátu. Počas posledných 10 min. inkubácie teplota stúpala na 72 °C a následne rýchlo klesla na 4 °C. Po inkubovaní sa vzorky 20x nariedili na zriedenie reakčného pufu. Takto upravené vzorky sa skladovali pri teplote -20 °C.

	Objem na jednu vzorku [μ l]
vzorka RNA	2
MIX A (celkom)	10
oligo T primery	0,5
redestilovaná voda	9,5
MIX B (celkom)	8
5 x pufr	4
DTT	2
dNTP mix	1
M-MLV enzým	1

Tab. č. 2 Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu (pri koncentrácii RNA 500 ng/ μ l)

6.3.3 Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (**PCR**) slúži na meranie génovej expresie, funguje na princípe amplifikácie molekúl DNA. Na zabezpečenie stability DNA sa opätovne pracovalo na ľade a reakčná zmes sa pripravovala v UV dekontaminačnom boxe (Herolab, Nemecko). Reakčná zmes sa skladala z autoklávovej vody, 2x koncentrovaného kitu The LightCycler® 480 SYBR Green I Master a konkrétnych primerov 3' a 5'. Následne sa reakčná zmes a jednotlivé vzorky napipetovali na 96 jamkovú PCR doštičku (pre konkrétne objemy vid' **Tab. č. 3**), pričom celkový objem zmesi bol 10 μ l. Nasledovala vlastná reakcia v prístroji LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Švýcarsko). Analýza sa zahajuje iniciáciou, pričom sa reakčná zmes zahreje na 96 °C, kvôli aktivácii termostabilnej DNA polymerázy. Pri teplote 96 °C prebieha denaturácia a dvojvlákno DNA je disociované. Za poklesu teploty na cca 55 až 65 °C nastáva anelácia, primery nasadajú na komplementárne miesta na templátovej DNA. Za teploty na 72 °C sa následne syntetizuje nová DNA v smere 5' – 3' pomocou DNA polymerázy, ktorá nasadá na primery a vytvára nové vlákno DNA podľa templátovej DNA. Posledným krokom je denaturačná analýza a schladenie reakčnej zmesi na 4 °C (vid' **Tab. č. 4**). PCR produkty sa kvantifikovali prostredníctvom fluorescencie. Na dvojvláknovú DNA sa naviaže fluorescenčná sonda SYBR green, ktorá je súčasťou pufru. Následne sa na konci polymerizácie v každom cykle odčítava fluorescenčný signál emitovaný farbičkou SYBR green. Primery génov, ktorých expresia bola meraná, ukazuje **Tab. č. 5**. Každá vzorka bola meraná duplikátne a vo výsledku bol použitý priemer oboch hodnôt. Spolu so vzorkami bola zmeraná aj riediaci rada a negatívna kontrola pripravená v predchádzajúcom kroku (vid' kapitola 6.3.2 Reverzná transkripcia). Presné

množstvo PCR produktu bolo stanovené podľa kalibračnej krivky, ktorá bola vytvorená z expresie vzoriek riediacej rady. Expresia bola vyjadrená ako 2^{-Ct} , kde Ct označuje cyklus, v ktorom dosiahla krivka narastajúcej fluorescencie inflexného bodu.

Pre účely prezentácie výsledkov všetkých génov v jednom súhrnnom grafe boli dáta z génovej expresie prepočítané tak, aby priemer kontrolnej skupiny odpovedal hodnote 1. Následne boli dáta normalizované prostredníctvom geometrického priemeru, ktorý bol vypočítaný z expresie troch housekeeping génov elongačného faktoru 1 α (**EF-1 α**), β -aktinu a eukaryotického elongačného faktoru 2 (**eEF2**). Housekeeping gény sa podieľajú na udržiavaní základných funkcií buniek, preto sa očakáva, že ich expresia bude konštantná vo všetkých bunkách za rôznych podmienok (Nelson et al., 1999).

Zložka reakčnej zmesi	Objem na jednu vzorku [μ l]
2x koncentrovaný master mix kit	5
redestilovaná voda	3
5' primer	0,5
3' primer	0,5
vzorka cDNA (20x nariedená)	1
celkový objem	10

Tab. č. 3 Zloženie reakčnej zmesi pre qPCR reakciu

Fáza reakcie	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas trvania [s]
počiatočná denaturácia	95	300
amplifikácia		
Denaturácia	95	10
anelácia (nasadenie primerov)	60	20
Polymerizácia	72	20
denaturačná analýza		
Denaturácia	95	5
renaturácia	65	60
postupná denaturácia	98	-
Chladnutie	40	10

Tab. č. 4 Priebeh qPCR reakcie

Gén	Kód v GenBank	Sekvencia primeru	Dĺžka produktu [bp]	Teplota nasadenia [°C]
EF-1 α	13627	5' TGACAGCAAAAACGACCCACCAAT 5' GGGCCATCTTCCAGCTTCTTACCA	192	58,6
β -aktin	11461	5' GAACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT 5' ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	434	60,2
eEF2	13629	5' GAAACGCGCAGATGTCCAAAAGTC 5' GCCGGGCTGCAAGTCTAAGG	142	58,7
UCP1	22227	5' CACGGGGACCTACAATGCTTACAG 5' GGCCGTCGGTCCTTCCTT	337	57,7
ATGL	66853	5' GGCAATCAGCAGGCAGGGTCTTTA 5' GCCAACGCCACTCACATCTACG	248	60,6
DGAT1	13350	5' TGGCCAGGACAGGAGTATTTTTGA 5' CTCGGGCATCGTAGTTGAGCA	249	59,6
PGC-1 α	19017	5' CCC AAA GGA TGC GCT CTC GTT 5' TGC GGT GTC TGT AGT GGC TTG ATT	150	57,2
FAS	14102	5' TGG GTG TGG AAG TTC GTC AG 5' GTC GTG TCA GTA GCC GAG TC	130	60
PEPCK	18534	5' GGCAGCATGGGGTGTGTTGTAGGA 5' TTTGCCGAAGTTGTAGCCGAAGAAG	248	60,5
PPAR α	19013	5' TGCGCAGCTCGTACAGGTCATCAA 5' CCCCATTTCCGGTAGCAGGTAGTCTTA	286	60,6

Tab. č. 5 Zoznam použitých primerov

6.4 Stanovenie metabolitov z krvi

Z krvi sa získala krvná plazma, krv sa odoberala do mikroskúmaviek s 5 μ l 0,5 molárnou kyselinou etyléndiamíntetraoctovou (**EDTA**) (pH 8) chelatačným činidlom, ktoré zabraňuje hemokoagulácii. Následne sa vzorky centrifugovali (10 min., 4500 g, 4 °C). Po scentrifugovaní došlo k oddeleniu krvnej plazmy, ktorá sa nachádzala v hornej fáze, od krvných elementov. Horná fáza sa odobrala do nových mikroskúmaviek. Takto pripravené vzorky sa uchovávali niekoľko dní pri teplote -20 °C.

6.4.1 Stanovovanie triacylglycerolov v plazme

Na stanovenie TAG sa používal diagnostický kit TG 250 od firmy Erba Lachema a postupovalo sa podľa návodu na ich webových stránkach. Princípom metódy je štiepenie TAG prostredníctvom enzýmu LPL na glycerol a voľné mastné kyseliny. Následne je glycerol v prítomnosti enzýmu glycerolkinázy fosforylovaný na G3P. G3P je oxidovaný na dihydroxyacetonfosfát enzýmom glycerolfosfatoxidázou za produkcie peroxidu vodíka (H_2O_2). Reakciou H_2O_2 , 4-aminoantipyrínu a 4-chlorofenolu v prítomnosti enzýmu peroxidázy vzniká červené chinóniminové farbivo.

Po rozpípetovaní vzoriek na meraciu doštičku sa napipetovala negatívna kontrola aj roztok štandardu. Pridalo sa reakčné činidlo (zloženie vid' **Tab. č. 6**) a inkubovalo sa 10 min. pri 37 °C. V spektrofotometri sa pri vlnovej dĺžke 500 nm zmerala absorbanca vzoriek a štandardu oproti negatívnej kontrole.

reakčné činidlo		štandard	
Goodov pufor (pH 7,2)	50 mmol/l	Triacylglyceroly	2,26 mmol/l
4-Chlorofenol	4 mmol/l		
Mg ²⁺	15 mmol/l		
ATP	2 mmol/l		
glycerolkináza	≥ 6,7 μkat/l		
peroxidáza	≥ 33 μkat/l		
lipoproteínlipáza	≥ 33 μkat/l		
lipoproteínlipáza	≥ 33 μkat/l		
4-Aminoantipyrin	0,5 mmol/l		

Tab. č. 6 Zloženie reakčných činidiel v kite TG 250

6.4.2 Stanovenie cholesterolu

Na stanovenie cholesterolu sa používal diagnostický kit CHOL 250 od firmy Erba Lachema a postupovalo sa podľa návodu na ich webových stránkach. Princípom metódy je štiepenie esterov cholesterolu cholesterázou na cholesterol a mastné kyseliny. Následne je voľný cholesterol oxidovaný cholesteroloxidázou na 4-cholesten-3-on a H_2O_2 . V prítomnosti enzýmu peroxidázy potom reaguje peroxid vodíka s 4-aminoantipyrínom (4-AAP) a fenolom za vzniku chinóniminového farbiva.

Po rozpipetovaní vzoriek, roztoku štandardu a negatívnej kontroly sa pridalo reakčné činidlo (zloženie vid' **Tab. č. 7**) a inkubovalo 10 min. pri 37 °C. V spektrofotometri sa pri vlnovej dĺžke 500 nm zmerala absorbancia vzoriek a štandardu oproti negatívnej kontrole.

Reakčné činidlo		Štandard
Goodov pufor (pH 7,2)	50 mmol/l	cholesterol 5,18 mmol/l
fenol	5 mmol/l	
4-Aminoantipyrin	0,3 mmol/l	
cholesterolesteráza	≥ 3,33 μkat/l	
cholesteroloxidáza	≥ 0.83 μkat/l	
peroxidáza	≥ 50 μkat/l	

Tab. č. 7 Zloženie reakčných činidiel v kite **CHOL 250**

6.4.3 Stanovenie ne-esterifikovaných mastných kyselín

Na stanovenie NEFA sa používal kit NEFA HR (2) od firmy FUJIFILM Wako Diagnostics U.S.A., postupovalo sa podľa návodu na ich webových stránkach. Princípom metódy je acylácia koenzýmu A (CoA) mastnými kyselinami v prítomnosti acyl-CoA syntetázy. V ďalšej fáze je vytvorený acyl-CoA oxidovaný acyl-CoA oxidázou na H₂O₂. Následne H₂O₂ v prítomnosti peroxidázy mediuje vznik fialového konečného produktu, na základe ktorého určujeme fotometricky koncentráciu NEFA. Pripravil sa roztok R1 a R2 (zloženie vid' **Tab. č. 8**).

Po rozpipetovaní vzoriek na meraciu doštičku sa napipetoval aj roztok štandardu, ktorý funguje ako kalibrátor a negatívna kontrola. Pridalo sa reakčné činidlo R1, inkubovalo sa za stáleho trepania 10 min. pri 37 °C na trepačke PST-60 plus Biosan (Merci, Česká republika). Po ochladení na ľade sa pridalo reakčné činidlo R2, opäť sa 10 min. pri 37 °C inkubovalo na trepačke. V spektrofotometri sa pri vlnovej dĺžke 546 nm zmerala absorbancia vzoriek a štandardu oproti negatívnej kontrole.

roztok A	roztok B
Acyl-CoA syntetáza 0,53 U/ml	Acyl-CoA oxidáza 12 U/ml
Co A 0,31 mmol/l	peroxidáza 14 U/ml
ATP 4,3 mmol/l	3-metyl-N-etyl-N anilín 2,4 mmol/l
4-Aminoantipyrin 1,5 mmol/l	
askorbát oxidáza 2,6 U/ml	
sódium azid 0,062%	
fosfátový pufor (ph 7,0) 50mmol/l	
sódium azid 0,059%	

Tab. č. 8 Zloženie reakčných činidiel v kite NEFA HR (2)

6.4.4 Stanovenie inzulínu

Na stanovenie inzulínu sa používal Mercoxia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA kit od firmy Mercoxia a postupovalo sa podľa návodu na ich webových stránkach. Je to enzýmová imuno-analýza založená na sendvičovej technike, v ktorej sa používajú dve monoklonálne protilátky proti antigénu na molekulách inzulínu. Sendvičová technika funguje na princípe tvorby imunokomplexov, ktoré sa vytvoria po väzbe protilátky vo vzorkách a antigénu. Imunokomplexy sa detegujú pomocou konjugátu (bielkovina s naviazaným enzýmom). Vznikne tzv. „sendvič“, ktorý je tvorený antigénom, protilátkou a konjugátom. Množstvo naviazaných značených protilátok sa zviditeľní enzýmovou reakciou. Na meráciu doštičku sa napipetovali vzorky, roztok štandardu, ktorý funguje ako kalibrátor a negatívna kontrola. Pridal sa roztok s protilátkami. Inkubovalo sa 2 hodiny na trepačke pri izbovej teplote. Následne sa doštičky šesťkrát premyli. Pridal sa roztok tetrametylbenzidínu na vyvinutie reakcie a inkubovalo sa 15 min. pri izbovej teplote. Nakoniec sa pridal roztok, ktorý reakciu ukončuje a trepalo sa asi 5 sekúnd na trepačke. Na spektrofotometri sa zmerala absorbanca vzoriek pri 450nm.

6.4.5 Stanovenie lipogenézy a re-esterifikácie pomocou izotopov $^2\text{H}_2\text{O}$

Pomocou značenia TAG stabilným izotopom ($^2\text{H}_2$) je možné zmerať syntézu TAG a *de novo* lipogenézu (DNL). Pri obohatení telesnej tekutiny zvierateľa $^2\text{H}_2\text{O}$ sa ^2H zabudováva do novo vznikajúcich TAG. Myši

boli preto injikované koncentrátom $^2\text{H}_2\text{O}$ a navyše im bola podávaná 10 % $^2\text{H}_2\text{O}$ v pitnej vode (viď kapitola 6.1 *In vivo* experimenty). Behom disekcie odobrané vzorky pripravené pre 1) stanovenie obsahu ťažkej vody v krvnej plazme, 2) stanovenie obsahu deutéria v mastných kyselinách TAG z gonadálneho WAT (čo odráža obrat syntézy mastných kyselín v tkanive) a 3) stanovenie obsahu deutéria v glycerolovej časti TAG z gonadálneho WAT (čo odráža obrat glyceroneogenézy a re-esterifikácie mastných kyselín). Všetky pripravené vzorky boli analyzované prostredníctvom následnej dvojrozmernej plynovej chromatografie (GCxGC TOF), ktorá prebiehala prostredníctvom RNDr. Petra Žáčka, Ph.D. na pracovisku BIOCEV. Ďalej preto uvádzam iba postup prípravy vzoriek.

6.4.5.1 Príprava vzoriek na stanovenie obohatenia TAG deutériom

Spracovanie vzoriek sa skladalo z niekoľkých častí. Prvým krokom bola extrakcia, kedy sa k zmraznutému tkanivu v 2 ml mikroskúmavkách pridal fyziologický roztok (**PBS**), etyl acetát v pomere 1:2 a keramická guľička. PBS predstavuje vodnú fázu a etyl acetát organickú fázu. Vzorky sa zhomogenizovali v oscilačnom mlyne. Nasledovala sonikácia v sonikátore (Hielscher, Nemecko) a rotácia v miešačke Invitrogen HulaMixer (Thermo Fisher Scientific, USA). Tieto kroky bránili predčasnému oddeleniu dvoch fáz. Vzorky sa scentrifugovali (5 min., 10000 g, 4 °C). Na základe hydrofobicity prešli TAG do vrchnej organickej fázy, ktorá sa odobrala do novej sklenenej skúmavky. Vzorky sa vysušili vo vákuovom koncentrátore Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, USA), (40 min., 900 g, 35 °C).

Pre plynovú chromatografiu bolo potrebné pripraviť deriváty, ktoré bude možné ľahko previesť do plynnej fázy. Molekula TAG sa preto rozdelila na glycerolovú časť a deriváty mastných kyselín. Na rozpustenie sa pridal ku každej vzorke hexán s antioxidantom butylovaným hydroxytoluénom. Vzorky sa premiestnili do termostabilných skúmaviek so šrobovacími víčkami. Pridal sa CH_3ONa a vzorky sa zahrievali pri 70 – 80 °C, 20 min. Po vychladnutí sa pridala 3 molárna metanolická HCl, redestilovaná voda a hexán a vzorky sa dôkladne pretrepali. Vzorky sa scentrifugovali na rotore (10 min., 2500 g, 4 °C). Vzniknuté metylestery mastných kyselín (**FAME**) sú hydrofóbne, takže prešli do hornej organickej fázy ktorá sa odoberala. Spodná vodná fáza sa ponechávala. Vzorky sa vysušili vo vákuovom koncentrátore Speed Vac (40 min., 900 g, 35 °C). FAME sa opäť rozpustili v hexáne a do vyhodnotenia sa skladovali pri -20 °C.

Posledným krokom bola derivatizácia glycerolu, kedy sa používala spodná vodná fáza z predchádzajúceho kroku. Spodná fáza obsahujúca glycerol sa prefiltrovala cez 0,45 μm PVDF filter. A vzorky sa vysušili vo vákuovom koncentrátore Speed Vac (5 až 6 h., 60 °C) a ihneď po vytiahnutí sa za-

parafilmovali aby sa zamedzilo prístupu vzdušnej vlhkosti. Kvôli toxicite používaných činidiel sa používali ochranné prostriedky ako respirátor, ochranné okuliare, rukavice a pracovalo sa v digestore Merci (Merci, Česká republika). Vzorky sa rozpustili v pyridíne a premiestnili sa do uzatvárateľných skúmaviek, ihneď sa uzavreli. Následne sa pridal N, O-Bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid (**BSTFA**), opäť sa skúmavky ihneď uzavreli. BSTFA funguje ako donor trimetylsilu pri derivatizácii polárnych zlúčenín, napomáha chromatografickej analýze. Vzorky sa inkubovali v termobloku (Biometra, Nemecko) pri 60 °C, 20 min. a do vyhodnotenia sa skladovali pri -20 °C.

6.4.5.2 Príprava vzoriek na stanovenie obohatenia plazmy $^2\text{H}_2\text{O}$

Táto metóda sa používala na overenie množstva $^2\text{H}_2\text{O}$ v plazme. V princípe sa ^2H proporčne preniesie na ľahko splynovateľný acetón. V prvom kroku bola potrebná príprava štandardov 10 %, 5 % a 2,5 % $^2\text{H}_2\text{O}$ vo vode, na zhotovenie kalibračnej krivky. K 10 μl plazmy alebo štandardu sa pridal 10 M NaOH a 5 % roztok acetónu v acetonitrile, ktorý slúži na precipitáciu proteínov. Vzorky sa dobre uzavreli a sonikovali na rozbitie proteínových klastrov. Vzorky sa nechali inkubovať cez noc pri izbovej teplote. K vzorkám sa pridal hexán a Na_2SO_4 , následne sa vortexovali, sonikovali a centrifugovali (1 min., 5000 RCF, 4 °C). Vrchná hexánová fáza sa preniesla do sklenených vialok a starostlivo sa uzavrela. Vyhodnocovanie vzoriek opäť prebehlo prostredníctvom RNDr. Petra Žáčka, Ph.D. na pracovisku BIOCEV.

6.5 Stanovenie triacylglycerolov v tkanive

Na stanovenie TAG musí najskôr dôjsť k saponifikácii TAG z tkanív. K 50 mg tkaniva (pečene) sa pridal 150 μl KOH rozpusteného v 65 % etanole. Zaistené eppendorfky sa zohrievajú v termobloku pri 70 °C 2 h. Vzorky sa 10x riedili, svortexovali sa a stočili. Takto pripravené vzorky sa zmerali. Postupovalo sa rovnako ako v kapitole 6.4.1 Stanovenie triacylglycerolov v plazme.

6.6 Štatistické vyhodnotenie

Dáta boli štatisticky vyhodnocované prostredníctvom programu GraphPad Prism (GraphPad Software, USA). Hranica štatistickej významnosti bola stanovená na $p < 0,05$, pričom použité znaky a štatistické metódy sú vždy uvedené v legende obrázkov. Výsledky sú prezentované ako aritmetické priemery a variability sú vyjadrené ako stredné chyby priemerov. Hladina významnosti rozdielu je vyjadrená počtom hviezdíčiek alebo iných symbolov (viď **Tab. č. 9**).

Počet * alebo #	p-hodnota	Signifikancia
****	< 0.0001	extrémne významné
***	0.0001 až 0.001	extrémne významné
**	0.001 až 0.01	veľmi významné
*	0.01 až 0.05	významné

Tab. č. 9 Vysvetlenie symbolov hladiny významnosti použitých v grafoch

6.7 Zoznam použitých chemikálii

$^2\text{H}_2\text{O}$ (ťažká voda)	CortecNet, Francúzsko
5x pufor pre reverznú transkripciu	Invitrogen, Nemecko
acetón	Penta, Česká republika
acetonitril	Sigma Aldrich, USA
butylovaný hydroxytoluén (BHT)	Sigma Aldrich, USA
bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA)	Sigma Aldrich, USA
dithiotreitol (DTT)	Sigma Aldrich, USA
diagnostický kit TG 250	Erba Lachema, Česká republika
diagnostický kit CHOL 250	Erba Lachema, Česká republika
diagnostický kit NEFA HR (2)	FUJIFILM Wako Diagnostics U.S.A., USA
diagnostický kit Mercodia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA	Mercodia, Švédsko
dNTP	Invitrogen, Nemecko
EDTA	Serva, Nemecko
Etanol	Penta, Česká republika
etyl acetát	Sigma Aldrich, USA
HCl–kyselina chlorovodíková	Penta, Česká republika
Hexán	Sigma Aldrich, USA
Chloroform	Penta, Česká republika
Izopropanol	Serva, Nemecko
KOH–hydroxid draselný	Penta, Česká republika
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Nemecko
CH_3ONa –metoxid sodný	Sigma Aldrich, USA
Metanol	Penta, Česká republika
NaOH–hydroxid sodný	Penta, Česká republika
Na_2SO_4 –síran sodný	Sigma Aldrich, USA
oligoT	Generi Biotech, Česká republika
penicilin, streptomycin	Sigma Aldrich, USA
PBS	Sigma Aldrich, USA
PCR primery	Generi Biotech, Česká republika

pyridín	Sigma Aldrich, USA
Trizol	Sigma Aldrich, USA

6.8 Zoznam použitých prístrojov

automatické pipety (rozsah 0,2 – 1000 µl)	Gilson, Francúzsko
centrifúga Universal 320R	Hettich, Nemecko
CO ₂ inkubačný box	Schoeller, Česká republika
digestor	Merci, Česká republika
glukometer Contour plus	Bayer, Nemecko
HulaMixer	Thermo Fisher Scientific, USA
laminárny box Steril VBH	Schoeller, Česká republika
LightCycler® 480 RT PCR System	Roche, Nemecko
mini centrifuga	Labnet, USA
oscilačný mlyn MM400	Retsch, Nemecko
spektrofotometer NanoDrop	NanoDrop, USA
spektrofotometer Sunrise basic	Tecan, Švajčiarsko
špičky na pipety	Gilson, Francúzsko
termoblok	Biometra, Nemecko
termocyklér	Biometra, Nemecko
trepáčka PST-60 plus Biosan	Merci, Česká republika
sonikátor	Hielscher, Nemecko
UV dekontaminačný box	Herolab, Nemecko
váhy ADAM	ADAM eqp., Veľká Británia
vákuová odparka	Hettich, Nemecko
vákuový koncentrátor Speed Vac	Thermo Fisher Scientific, USA
vortex	Scientific Industries, USA

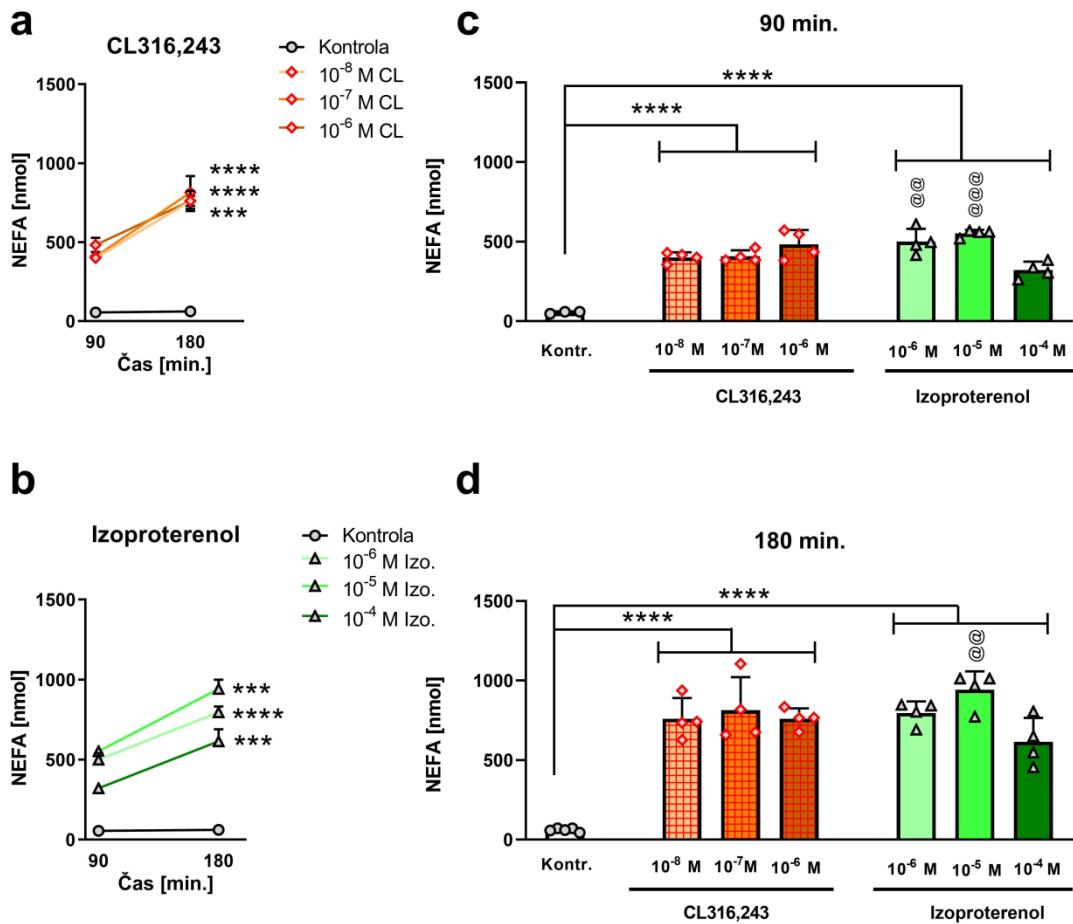
7. Výsledky

7.1 Príprava systému pre sledovanie lipolýzy v tkanivových kultúrach

Je známe, že FGF21 tlmí lipolýzu (Schlein et al., 2016), avšak *in vivo* boli pozorované aj pro-lipolytické účinky FGF21 (Inagaki et al., 2007). V modeli *in vivo* sú účinky FGF21 modulované pôsobením ďalších hormónov a orgánov, a je preto obtiažne určiť, či sú popisované účinky na lipolýzu priame alebo iba druhotné. Preto by naše oddelenie chcelo v budúcnosti skúmať priamo pôsobenie FGF21 v bunkových kultúrach. Prvou úlohou môjho diplomového projektu bolo optimalizovať podmienky pre meranie lipolýzy v bunkovej kultúre. K tomuto účelu sme použili bunkové kultúry 3T3-L1 diferencované do adipocytov (viď kapitola 6.2 *In vitro* experimenty). Ako marker lipolýzy sme brali uvoľňovanie NEFA. Pretože je hladina NEFA pri bazálnej, nestimulovanej lipolýze prakticky na úrovni detekčného limitu metódy (viď kontrola **Obr. č. 7**), nebolo by možné za týchto podmienok pozorovať prípadnú inhibíciu lipolýzy. Lipolýzu sme preto stimulovali rôznymi dávkami agonistov β -adrenergných receptorov buď β_3 -špecifickým CL316,243 (CL), alebo neselektívnym izoproterenolom.

Hladiny NEFA v médiu sme merali 90 a 180 min. po začiatku pôsobenia agonistov. Medzi týmito dvomi časovými bodmi došlo k hromadeniu NEFA (**Obr. č. 7. a, b**), čo dokazuje, že adipocyty boli po celú dobu experimentu v poriadku a schopné lipolýzy.

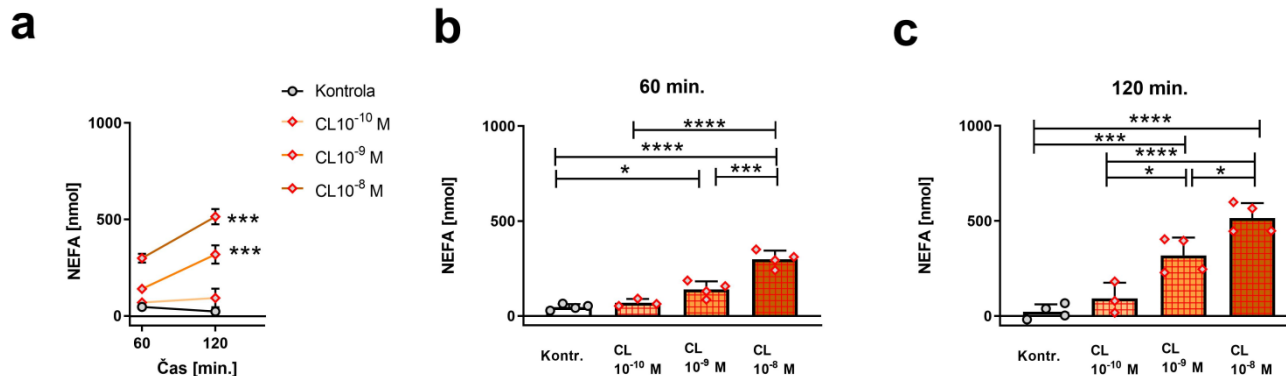
V porovnaní s nestimulovanou kontrolou bolo uvoľňovanie NEFA masívne zvýšené ako pôsobením CL, tak izoproterenu. V rozmedzí použitých koncentrácií sme však nepozorovali žiadnu koncentračnú závislosť tohto efektu (**Obr. č. 7. a, b**). (V prípade izoproterenu sme dokonca zaznamenali inhibičný účinok najvyššej dávky.) Dosiahli sme tak zjavne maximálnu mieru lipolýzy. Za týchto podmienok by nebolo možné pozorovať žiadnu ďalšiu stimuláciu lipolýzy.



Obr. č. 7 Stimulácia lipolýzy v bunkových kultúrach 3T3-L1. Množstvo NEFA uvoľnené do média behom experimentu: efekt samotného CL (a), efekt samotného izoproterenolu (b), množstvo NEFA po 90 min. (c) a po 180 min (d).

Štatistika: Jednocestná ANOVA (Analýza Variácie) s Tukeyho zrovnávacím testom (a, b). Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom (c, d). * znamená signifikanciu medzi 90 min. a 180 min. príslušnej koncentrácie CL alebo izoproterenolu (a, b), alebo signifikanciu oproti kontrolnej skupine CL alebo izoproterenolu v príslušnom čase (c, d) a @ znamená signifikanciu u izoproterenolu oproti najvyššej koncentrácii.

Aby sme dosiahli mierne zvýšenej hladiny lipolýzy, ktorú možno ako inhibovať, tak ďalej stimulovať, zopakovali sme experiment s nižšími koncentráciami CL. Pomocou odberov v dvoch časových bodoch sme opäť overili, že stimulované bunky sú schopné lipolýzy počas celého experimentu (Obr. č. 8. a). Za týchto podmienok sme boli schopní pozorovať koncentračnú závislosť stimulácie lipolýzy (Obr. č. 8. b, c). Takže tieto podmienky by mohli byť použiteľné aj pre meranie účinkov FGF21.

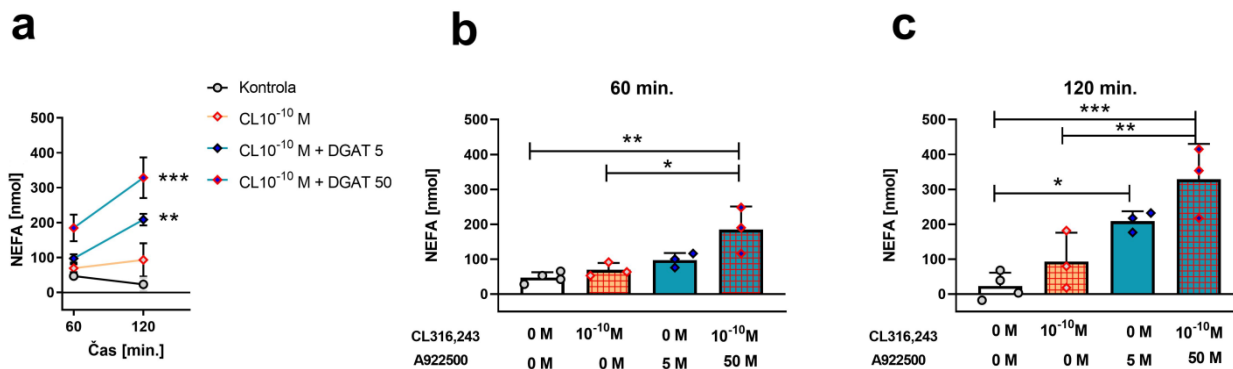


Obr. č. 8 Stimulácia lipolýzy v bunkových kultúrach 3T3-L1 nižšími koncentraciami CL. Množstvo NEFA uvoľnené do média behom experimentu s nižšími koncentraciami CL: znázornenie časového priebehu **(a)**, množstvo NEFA po 60 min. **(b)** a po 120 min. **(c)**.

Štatistika: Jednocestná ANOVA s Tukeyho zrovnávacím testom **(a, b)**. Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom **(c)**. * znamená signifikanciu medzi 90 min. a 180 min. príslušnej koncentrácie CL alebo signifikanciu oproti kontrolnej skupine CL v príslušnom čase.

V čase, kedy prebiehali tieto experimenty, sme však ešte nemali k dispozícii FGF21, ktoré náš industriálny partner dodal až pred zahájením animálnych experimentov. Preto sme využiteľnosť zvolených nízkych koncentrácií CL overovali v kombinácii s inými modulátormi lipolýzy, konkrétne s látkou A922500, ktorá funguje ako inhibítor DGAT1. Táto inhibícia re-esterifikácie by mala vyústiť v zvýšený výlev NEFA. Ako sa dalo očakávať, A922500 skutočne stimuloval uvoľňovanie NEFA, pričom tento efekt bol umocnený pridaním CL **(Obr. č. 9. a, b)** a pretrvával aj po 120 min. pôsobenia **(Obr. č. 9. c)**.

Protokol pre budúce skúmanie efektov FGF21 na adipocyty bol teda úspešne zavedený. Zároveň sme získali dáta ohľadom koncentračnej závislosti účinkov CL na lipolýzu, čo bolo užitočné pri plánovaní nadväzujúcich animálnych experimentov.

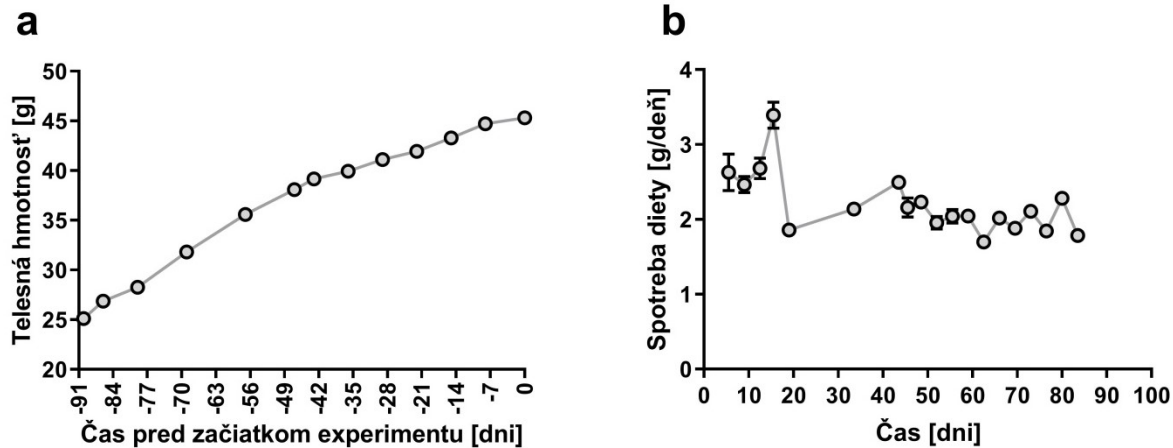


Obr. č. 9 Stimulácia lipolýzy v bunkových kultúrach 3T3-L1 prostredníctvom CL a A922500. Množstvo NEFA uvoľnené do média behom experimentu: znázornenie časového priebehu **(a)**, množstvo NEFA po 60 min. **(b)** a po 120 min. **(c)**.

Štatistika: Jednocestná ANOVA s Tukeyho zrovnávacím testom **(a, b)**. Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom **(c)**. * znamená signifikanciu medzi 90 min. a 180 min. príslušnej koncentrácie CL alebo A922500 alebo signifikanciu oproti kontrolnej skupine CL alebo A922500 v príslušnom čase.

7.2 Pôsobenie FGF21 *in vivo*

Účinky FGF21 sú v literatúre popisované najmä v súvislosti s obezitou. Preto sme pokusným zvieratám najskôr po dobu 3 mesiacov podávali diétu s vysokým obsahom tuku, čo viedlo k rozvoju obezity **(Obr. č. 10. a)**. Spotreba diéty sa po prvotných výkyvoch ustálila a držala sa v jednej rovine **(Obr. č. 10. b)**. Kvôli chovaniu myší v termoneutrálnom prostredí je aj neprekvapivo nízka spotreba (spotreba použitej diéty v štandardnej teplote sa obvykle pohybuje okolo 3 g / deň), keďže udržiavanie telesnej teploty nebolo energeticky náročné.



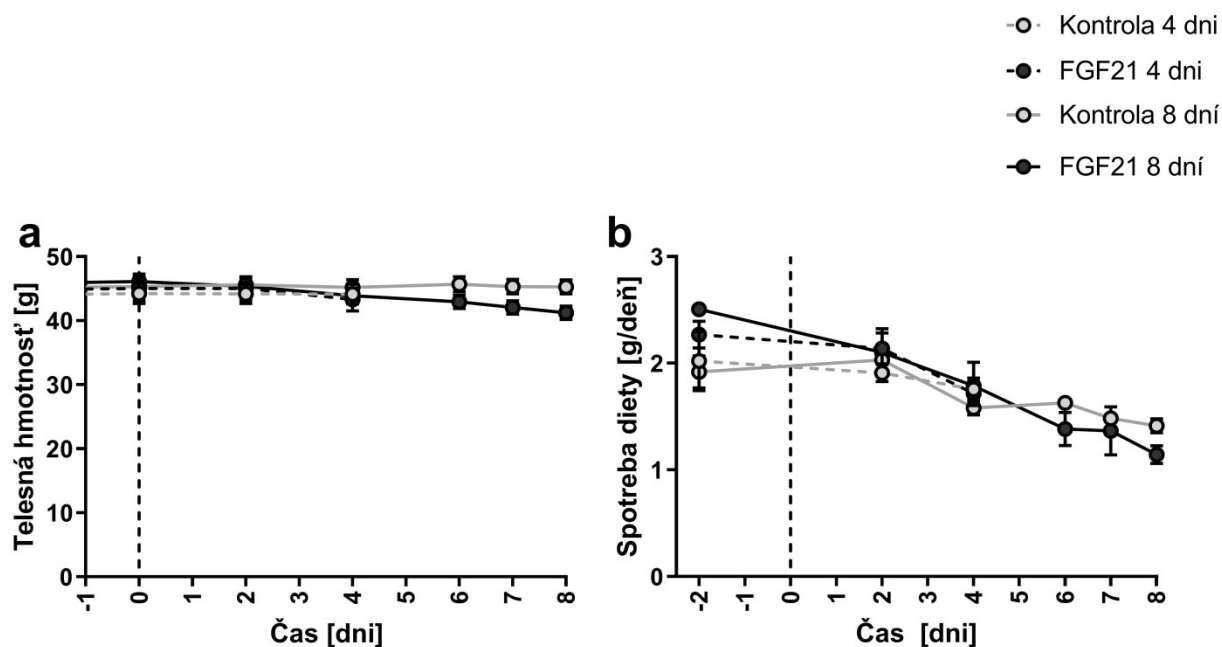
Obr. č. 10 Vývoj hmotnosti a spotreby zvierat pred zahájením vlastného experimentu. Prírastok hmotnosti (**a**). Spotreba diety (diéta s obsahom 21,4 MJ metabolizovateľnej energie / kg, 60 KJ % tuku) (**b**) (Myši boli v klietkach po 4, výsledná spotreba je prepočítaná na jednu myš.).

7.2.1 Časová závislosť účinkov FGF21

Prvý animálny experiment bol zameraný na sledovanie časového priebehu efektu FGF21. K tomuto účelu boli obézne myši na vysoko-tukovej diéte injikované po dobu 4 alebo 8 dní roztokom FGF21, alebo kontrolným roztokom. Nasledovalo zrovnanie stavu po 4 a po 8 dňoch aplikácie FGF21.

7.2.1.1 Všeobecné účinky FGF21

Štvordenné pôsobenie FGF21 nebolo dostatočné k tomu, aby sa prejavili zmeny hmotnosti oproti kontrolnej skupine (**Obr. č. 11. a** porovnaj kontrolu 4 dni a FGF21 4 dni – čiarkované čiary). Pri dlhšom pôsobení však myši injikované FGF21 vykazovali tendenciu k poklesu hmotnosti (**Obr. č. 11. a**). Ako u kontrolných zvierat, tak aj u zvierat injikovaných FGF21 sa prejavili tendencie k poklesu spotreby diét, čo je pravdepodobne výsledok stresu (**Obr. č. 11. b**).

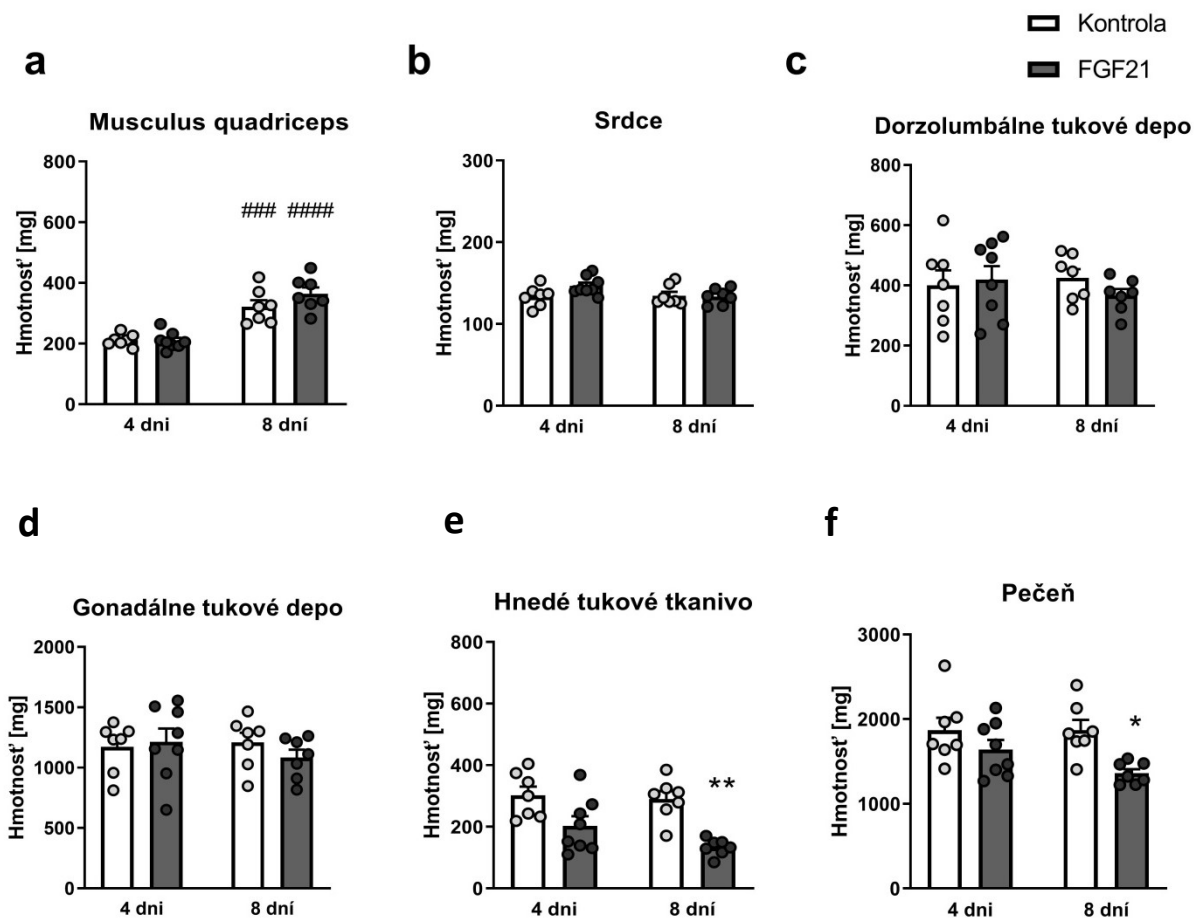


Obr. č. 11 Vývoj hmotnosti a spotreby zvierat počas samotného experimentu. Hmotnosť myší (**a**). Spotreba diéty (diéta s obsahom 21,4 MJ metabolizovateľnej energie / kg, 60 KJ % tuku) (**b**).

Štatistika: Dvojcenná RM ANOVA (Analýza Variácie s opakovaným meraním) s Tukeyho zrovnávacím testom, nie sú žiadne signifikancie.

Aby sme zistili, čo zodpovedá za pokles telesnej hmotnosti, zvážili sme jednotlivé orgány. Pokles telesnej hmotnosti nie je spôsobený účinkami FGF21 na svalové tkanivo (*m. quadriceps* – **Obr. č. 12. a** ani srdce – **Obr. č. 12. b**). (Prekvapivé signifikantné zvýšenie hmotnosti svalu *m. quadriceps* po 8 dňoch experimentu pozorujeme ako u FGF21, tak u kontroly, čo vylučuje efekt samotného FGF21.) V prípade všetkých tukových depotov pozorujeme tendenciu k zníženiu hmotnosti po 8 dňoch pôsobenia FGF21 (**Obr. č. 12. c, d, e**), ktorá je v prípade hnedého tukového tkaniva po 8 dňoch signifikantná (**Obr. č. 12. e**), FGF21 teda spôsobuje pokles množstva tukového tkaniva.

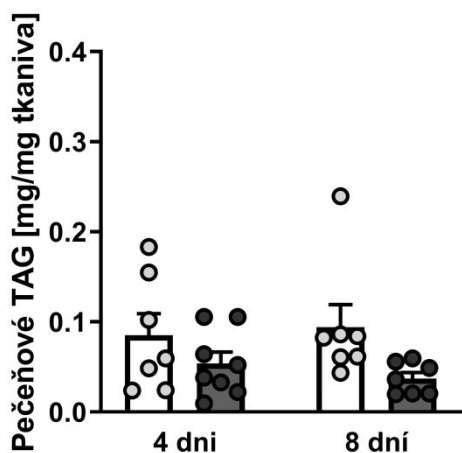
Osemdenná aplikácia FGF21 viedla k výraznej redukcii hmotnosti pečene (**Obr. č. 12. f**), čo koreluje so zníženým množstvom TAG v pečeni (**Obr. č. 13.**). Možno konštatovať, že pokles telesnej hmotnosti je spôsobený menšou akumuláciou tuku v organizme, teda ako znížením veľkosti tukových dep, tak poklesom obsahu tuku v pečeni.



Obr. č. 12 Hmotnosti orgánov po 4- a 8-dennom pôsobení FGF21.

Hmotnosti svalu (a), srdca (b), dorzolumbálneho (c) a gonadálneho WAT (d), BAT (e) a pečene (f).

Štatistika: Dvojcenná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt dĺžky experimentu (4 dni verus 8 dni).



Obr. č. 13 Množstvo TAG v pečeni

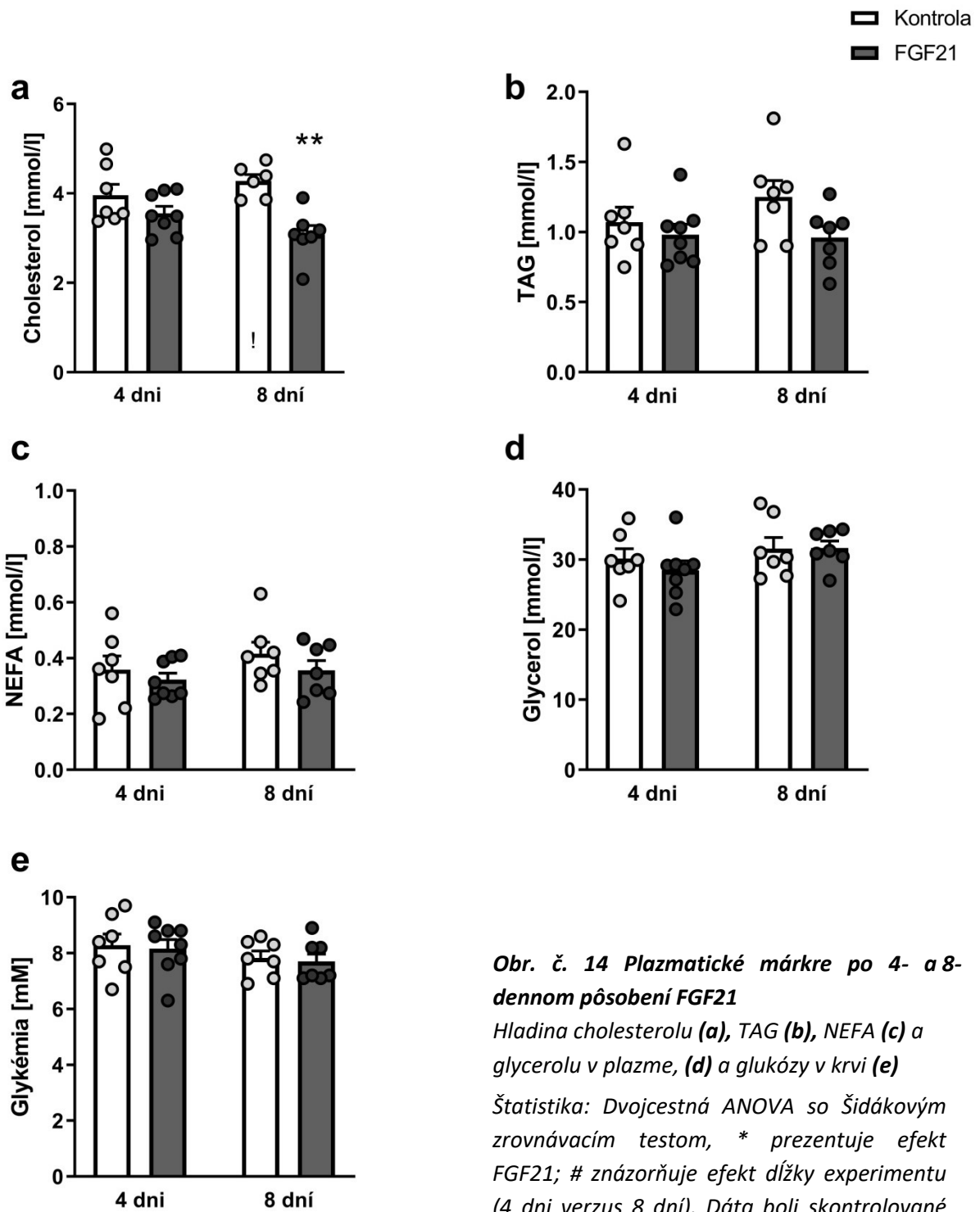
Štatistika: Dvojcenná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, nie sú žiadne signifikancie.

7.2.1.2 Vplyv FGF21 na krvné márkre

Vzhľadom k výrazným zmenám v hmotnosti pečene sme sa zamerali na skúmanie metabolitov, ktoré súvisia s metabolickými procesmi v pečeni. Osem denné podávanie FGF21 signifikantne znížilo hladiny cholesterolu v porovnaní s kontrolnou skupinou (**Obr. č. 14. a**). V prípade TAG bolo pozorované podobné zníženie po osemdennej aplikácii FGF21, avšak nedosiahlo significancie (**Obr. č. 14. b**). Predpokladáme, že náznak poklesu hladín TAG v plazme súvisí so sledovaným znížením množstva pečňových TAG (Porovnaj **Obr. č. 13.** a **Obr. č. 14. b**).

V súlade s nevýrazným účinkom FGF21 na hmotnosti tukových dep boli aj plazmatické hladiny produktov lipolýzy ovplyvnené FGF21 iba v minimálnej miere. Hladiny NEFA vykazovali určitú tendenciu k zníženiu, pôsobením FGF21 (**Obr. č. 14. c**), hladiny glycerolu však zostali nezmenené (**Obr. č. 14. d**).

FGF21 neovplyvňovalo hladiny glukózy (**Obr. č. 14. e**), aj keď v literatúre je pri dlhšom pôsobení FGF21 popisovaný pokles glykémie u obéznych myší (Cuevas-Ramos et al., 2009).



Obr. č. 14 Plazmatické márky po 4- a 8-dennom posobení FGF21

Hladina cholesterolu (a), TAG (b), NEFA (c) a glycerolu v plazme, (d) a glukózy v krvi (e)

Štatistika: Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt dlžky experimentu (4 dni verzus 8 dni). Dáta boli skontrolované pomocou Grubbovho testu na zistenie odlahlých hodnôt. Na základe toho bola vylúčená odlahlá hodnota (príslušná skupina (a) označená výkričníkom (!) v stlpci grafu).

7.2.1.3 Vplyv FGF21 na génovú expresiu v jednotlivých tkanivách

Na základe hodnôt krvných markerov nás v ďalšom kroku zaujímalo či sa korešpondujúce zmeny prejavia na úrovni génovej expresie v príslušných tkanivách. V pečeni, gonadálnom a dorzolumbálnom tukovom depe boli zmerané márkre najdôležitejších metabolických dráh a tie boli vyjadrené jednak ne-normalizované (**Obr. č. 15. a; č. 16. a; č. 17. a**), tak normalizované (**Obr. č. 15. d; č. 16. d; č. 17. d**) na geometrický priemer 3 housekeeping génov (**Obr. č. 15. b, c; č. 16. b, c; č. 17. b, c**).

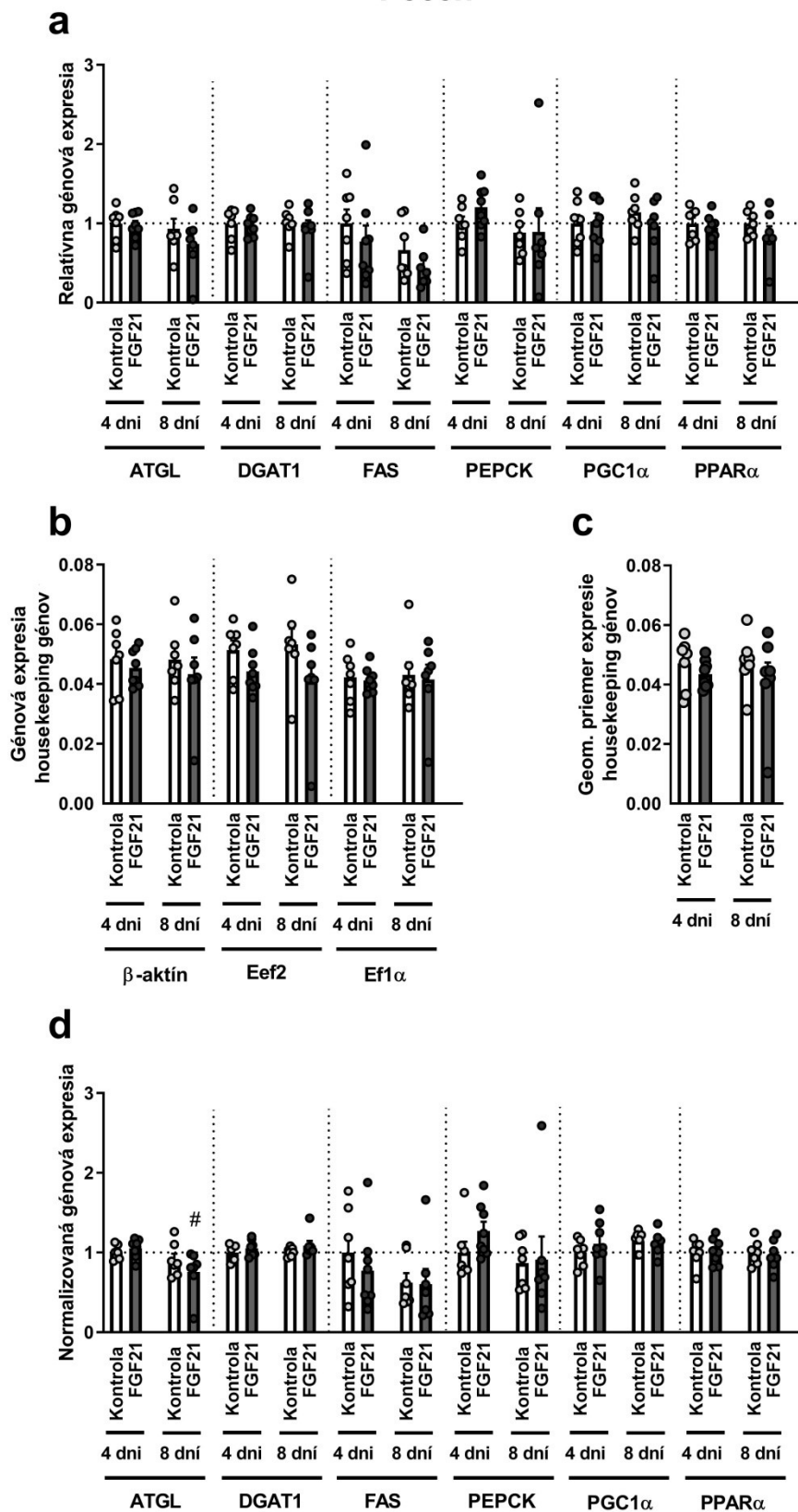
V pečeni nepozorujeme žiaden signifikantný efekt na génovú expresiu s výnimkou génu ATGL, ktorý katalyzuje prvý krok lipolýzy. 8-denné pôsobenie FGF21 tlmí expresiu ATGL (**Obr. č. 15. a, d**) (po normalizácii dát sa zmenší rozptyl hodnôt a diskutovaný rozdiel tak dosiahne signifikancie).

V gonadálnom tukovom depe FGF21 už po 4 dňoch znižuje expresiu génu FAS, čo zjavne indikuje pokles *de novo* lipogenézy. Po dlhšom pôsobení sa však tento rozdiel zmýva (**Obr. č. 16. a, d**).

V dorzolumbálnom tukovom depe narážame na problém s normalizáciou dát: teda tendenciou k zníženiu geometrického priemeru housekeeping génov (**Obr. č. 17. c**). Vinou toho sa u niektorých génov po normalizácii objaví artifiálne signifikantný nárast (gén PPAR α) (**Obr. č. 17. d**). FGF21 ovšem zjavne zvyšuje expresiu UCP1 (aj keď veľký rozptyl hodnôt znemožňuje dosiahnutie signifikancie), čo je v súlade s predpokladaným pôsobením FGF21 na hnednutie bieleho tukového tkaniva (Fisher et al., 2012).

FGF21 spôsobovalo iba minimálne zmeny na úrovni expresie génov. Aj napriek tomu dáta naznačujú, že FGF21 by mohol byť zapojený do hnednutia bieleho tukového tkaniva. Zdá sa tiež, že FGF21 spôsobuje celkovú inhibíciu lipidového metabolizmu, jeho účinky sú ako antilipolytické, tak antilipogénne.

Pečeň



Obr. č. 15 Génová expresia v pečeni po 4- a 8-dennom pôsobení FGF21.

a) Nenormalizovaná génová expresia (dáta boli prepočítané tak, aby priemer 4-dennej kontrolnej skupiny odpovedal hodnote 1).

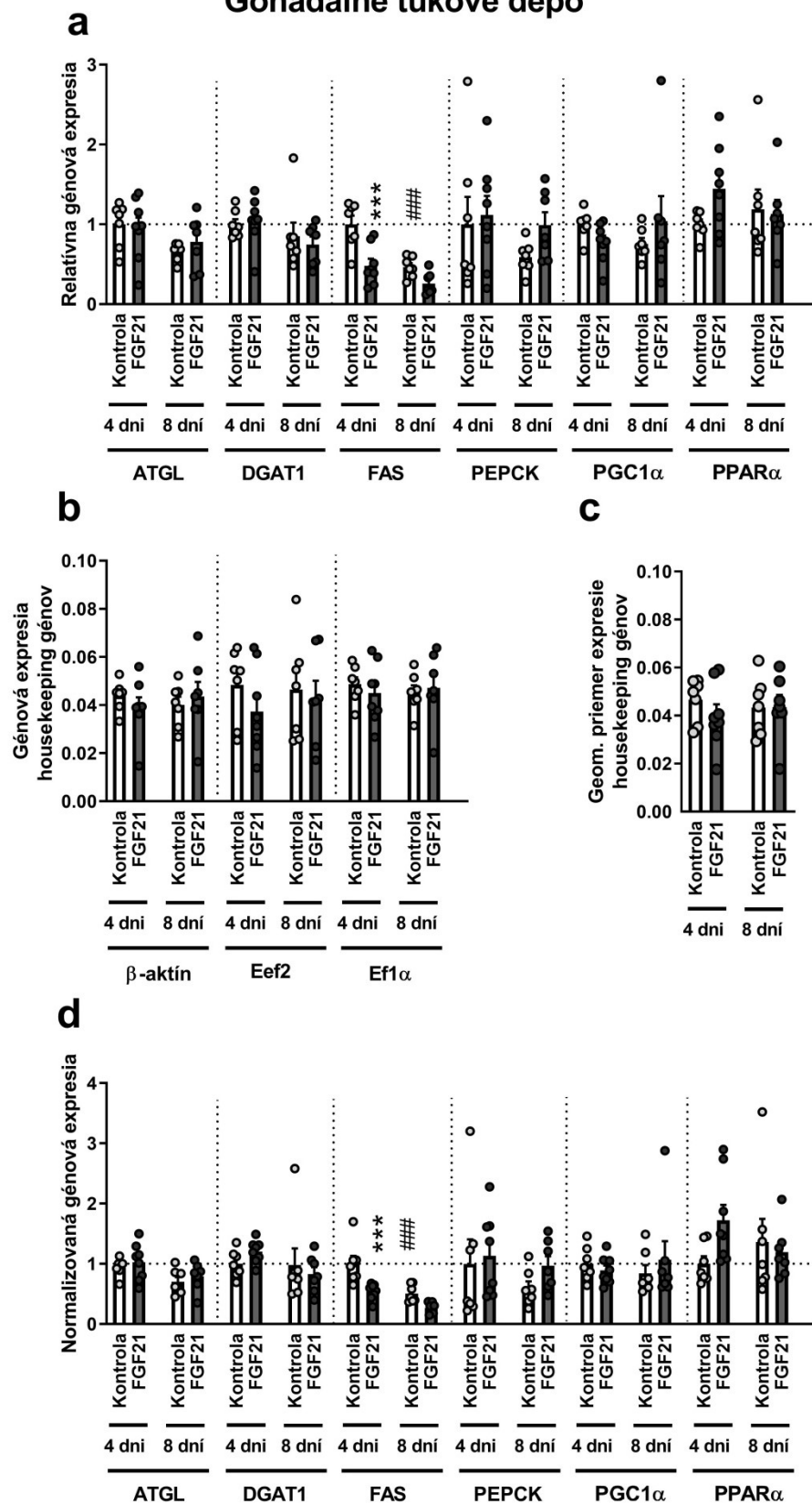
b) Génová expresia housekeeping génov.

c) Geometrický priemer housekeeping génov.

d) Génová expresia normalizovaná geometrickým priemerom housekeeping génov (dáta boli prepočítané, tak ako je popísané v bode a).

Štatistika jednotlivých génov: Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt dĺžky experimentu (4 dni verus 8 dni).

Gonadálne tukové depo



Obr. č. 16 Génová expresia v gonadálnom tukovom depe po 4- a 8-dennom pôsobení FGF21.

a) Nenormalizovaná génová expresia (dáta boli prepočítané tak, aby priemer 4-dennej kontrolnej skupiny odpovedal hodnote 1).

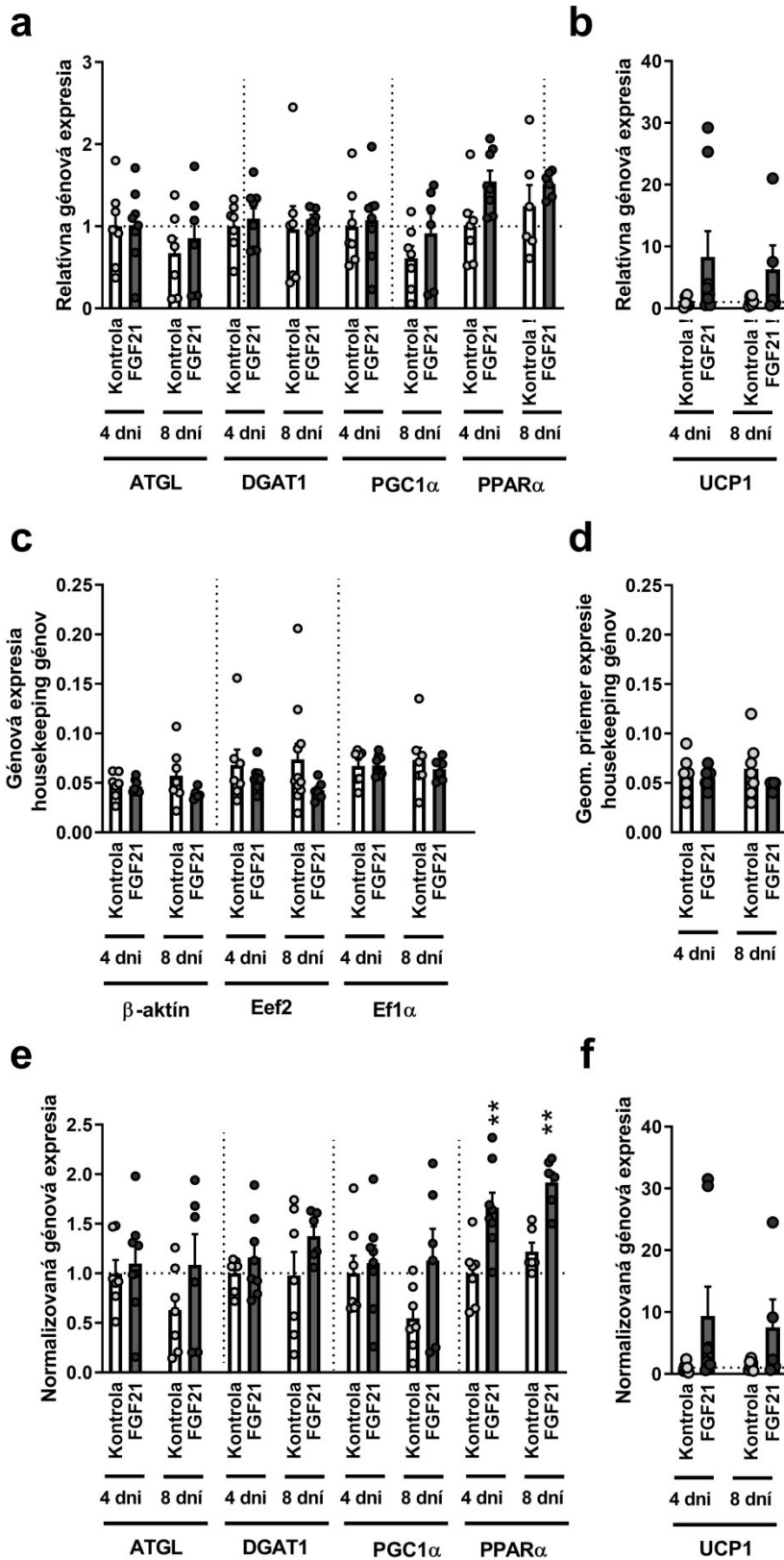
b) Génová expresia housekeeping génov.

c) Geometrický priemer housekeeping génov.

d) Génová expresia normalizovaná geometrickým priemerom housekeeping génov (dáta boli prepočítané tak, ako je popísané v bode a).

Štatistika jednotlivých génov: Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt dĺžky experimentu (4 dni verus 8 dni).

Dorzolumbálne tukové depo



Obr. č. 17 Génová expresia v gonadálnom tukovom depe po 4- a 8-dennom pôsobení FGF21.

a) Nenormalizovaná génová expresia (dáta boli prepočítané tak, aby priemer 4-dennej kontrolnej skupiny odpovedal hodnote 1).

b) Génová expresia housekeeping génov.

c) Geometrický priemer housekeeping génov.

d) Génová expresia normalizovaná geometrickým priemerom housekeeping génov (dáta boli prepočítané tak ako je popísané v bode a).

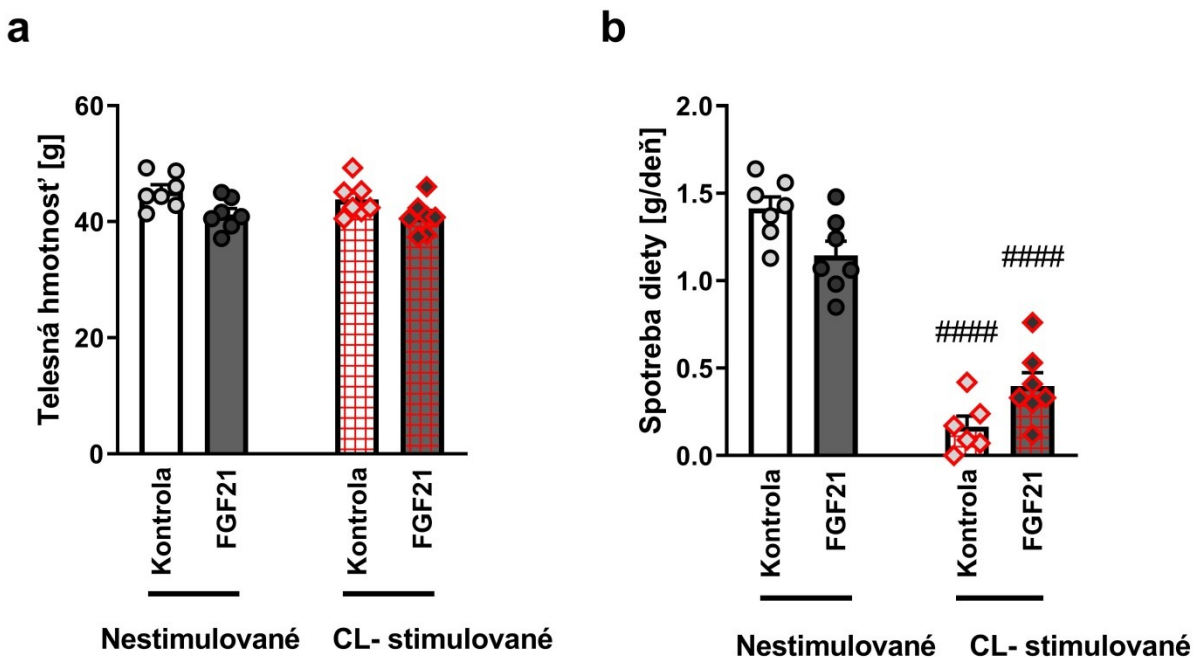
Štatistika jednotlivých génov: Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt dĺžky experimentu (4 dni verus 8 dni). Dáta boli skontrolované pomocou Grubbovho testu, na zistenie odľahlých hodnôt. Na základe toho boli vylúčené odľahlé hodnoty (príslušná skupina (**a**, **b**) je označená výkričníkom (!) v popise osy grafu).

7.2.2 In vivo časť, kombinácia účinkov CL316,243 a FGF21

Účinky samotného FGF21 neboli ani po 8 dňoch až tak výrazné, preto sme sa rozhodli skúmať pôsobenie FGF21 v kontexte β -adrenergnej stimulácie. Zvieratá vystavené po dobu 8 dní pôsobeniu FGF21 alebo kontrolného roztoku sme jednorazovo injikovali β_3 -adrenergným agonistom CL316,243 alebo soľným roztokom. Kontrolné skupiny (bez CL) sa tak prekrývajú s predchádzajúcim experimentom. Účinky FGF21 v týchto skupinách teda boli diskutované v predchádzajúcej kapitole. Tu sa zameriame na účinky CL samotného a v kombinácii s FGF21.

7.2.2.1 Kombinácia účinkov FGF21 a adrenergnej simulácie

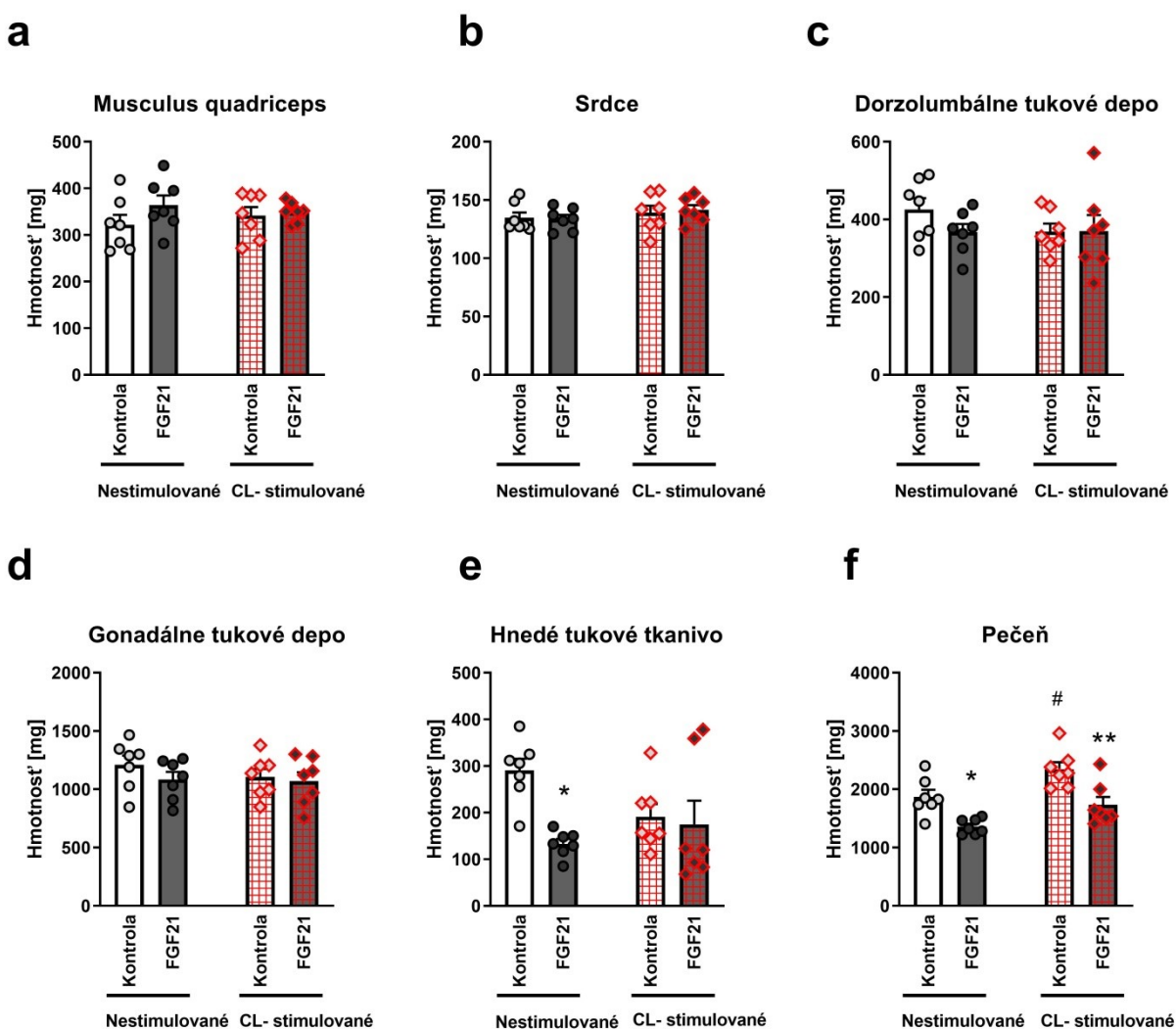
Aplikácia CL 24 hodín pred disekciou nemala žiadny vplyv na telesnú hmotnosť (**Obr. č. 18. a**). No po aplikácii CL sa dramaticky znižuje spotreba diéty ako u kontroly tak u FGF21 skupiny (**Obr. č. 18. b**), z toho možno usudzovať, že pri dlhšom pôsobení CL by klesala aj hmotnosť.



Obr. č. 18 Hmotnosti a spotreba diéty u zvierat. Telesná hmotnosť (**a**) a spotreba diéty (diéta s obsahom 21,4 MJ metabolizovateľnej energie / kg, 60 KJ % tuku) (**b**) po 8-dennej aplikácii FGF21 a po jednorazovej injekcii CL.

Štatistika: Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom. Účinok FGF21 nebol signifikantný; # znázorňuje efekt CL.

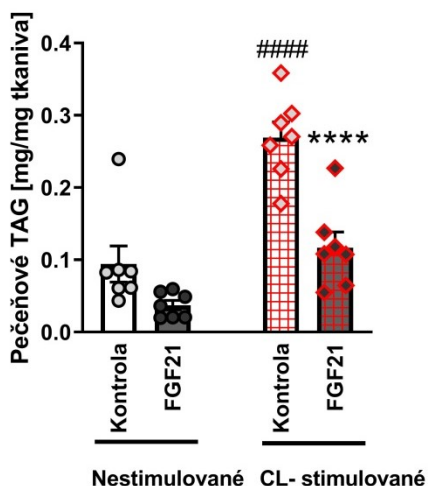
Tak ako v predchádzajúcom experimente aj v tomto prípade nás zaujímalo, ako sa vyvíjala hmotnosť jednotlivých orgánov po aplikácii CL. Zatiaľ čo neboli pozorované žiadne účinky CL na hmotnosť kostrového svalu (**Obr. č. 19. a**), srdca (**Obr. č. 19. b**), gonadálneho (**Obr. č. 19. d**), dorzolumbálneho (**Obr. č. 19. c**) ani hnedého tukového tkaniva (**Obr. č. 19. e**), CL výrazne zvyšovalo hmotnosť pečene (**Obr. č. 19. f**), čo súviselo so zvýšenou akumuláciou lipidov (**Obr. č. 20.**), zjavne uvoľnených pri lipolýze z bieleho tukového tkaniva. FGF21 tento nárast hmotnosti pečene tlmilo (**Obr. č. 19. f**), čo by bolo v súlade s antilipolytickým pôsobením FGF21.



Obr. č. 19 Hmotnosti orgánov po pôsobení CL a FGF21.

Hmotnosti svalu (**a**), srdca (**b**), dorzolumbálneho (**c**) a gonadálneho tukového depa (**d**), hnedého tuku (**e**) a pečene (**f**).

Štatistika: Dvojestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom. * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt CL.

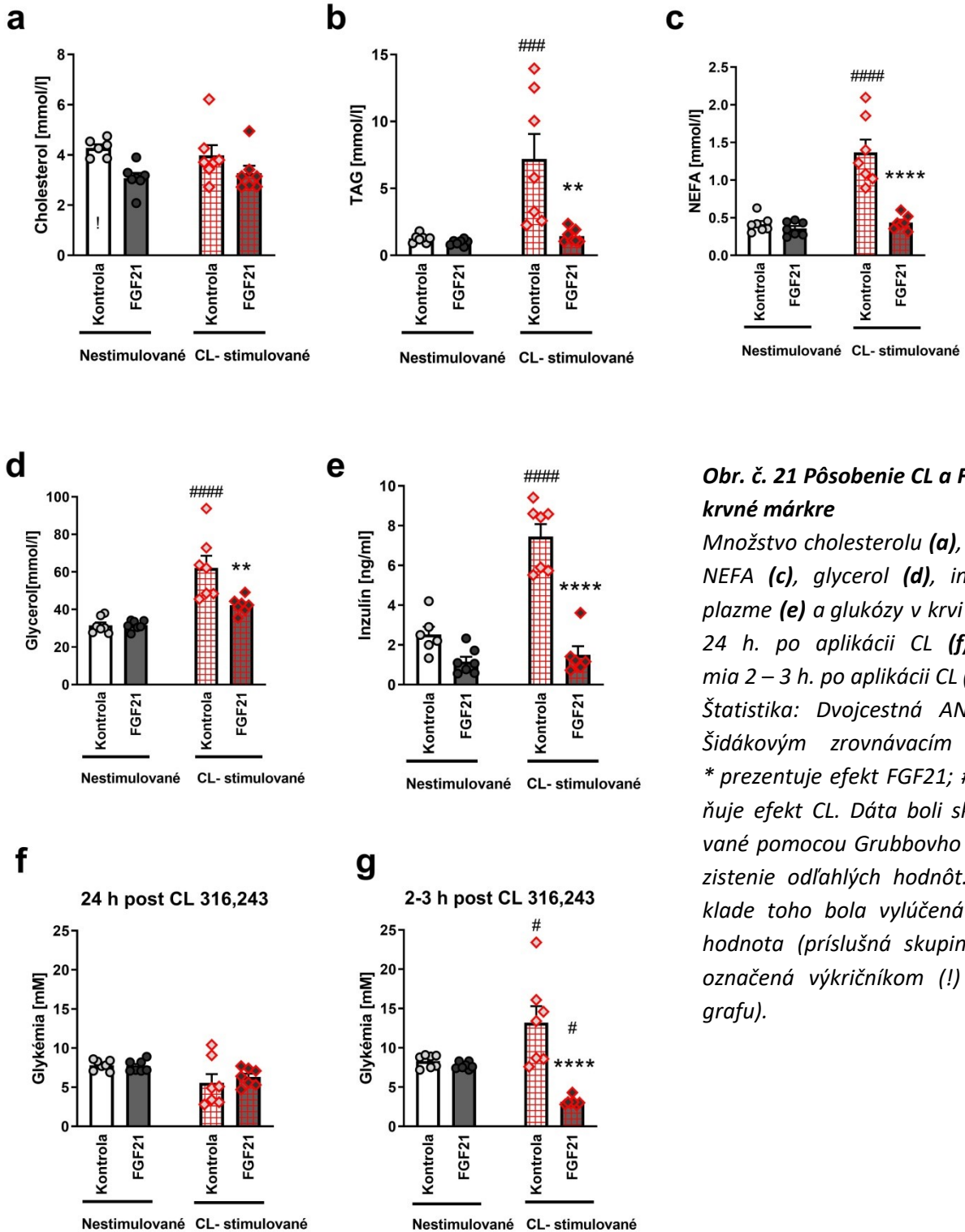


Obr. č. 20 Množstvo TAG v pečeni
 Štatistika: Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt CL.

7.2.2.2 Vplyv CL a FGF21 na krvné márkre

CL nemalo žiadny účinok na hladiny cholesterolu v plazme (**Obr. č. 21. a**). U kontrolných zvierat (bez FGF21) však bola 24 hodín po injekcii CL výrazne zvýšená hladina TAG v plazme (**Obr. č. 21. b**), ktorá tak opäť korelovala s obsahom TAG v pečeni (**Obr. č. 21. a**). Výrazný bol vplyv CL na lipolýzu v tukovom tkanive, čo sa prejavilo nárastom hladiny NEFA aj glycerolu v plazme (**Obr. č. 21. c, d**). Zvýšené hladiny NEFA po injekcii CL boli dávané do súvislosti s prechodným zvýšením hladiny inzulínu a poklesom glykémie (Grujic et al., 1997; MacPherson et al., 2014). Inzulín bol u kontrolných zvierat skutočne zvýšený 24 hodín po podaní CL (**Obr. č. 21. e**), avšak žiadna signifikantná zmena v glykémii nebola pozorovaná (**Obr. č. 21. f**). Naproti tomu 2 – 3 h. po injekcii CL bola prekvapivo glukóza dokonca zvýšená (**Obr. č. 21. g**). Z tohto časového bodu však nemáme k dispozícii vzorky pre stanovenie NEFA a inzulínu, takže detailnejší popis mechanizmu tohoto prechodného účinku bude predmetom až nadväzujúcich štúdií.

FGF21 pôsobilo v podstate proti vyššie popísaným účinkom CL: Blokovalo nárast TAG (**Obr. č. 21. b**), NEFA (**Obr. č. 21. c**), glycerolu (**Obr. č. 21. d**) aj inzulínu (**Obr. č. 21. e**). U zvierat po 8-dennom pôsobení FGF21 bol navyše pozorovaný výrazný pokles glykémie 2 – 3 hodiny po injekcii CL (**Obr. č. 21. g**). Je teda zrejmé, že FGF21 pôsobí antilipolyticky – protichodne k β -adrenergnej stimulácii. Kombinácia FGF21 a CL však prekvapivo synergisticky znižuje hladinu krvnej glukózy.



Obr. č. 21 Pôsobenie CL a FGF21 na krvné márkre

Množstvo cholesterolu (a), TAG (b), NEFA (c), glycerol (d), inzulínu v plazme (e) a glukózy v krvi meranej 24 h. po aplikácii CL (f), glykémia 2 – 3 h. po aplikácii CL (g).

Štatistika: Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt CL. Dáta boli skontrolované pomocou Grubbovho testu na zistenie odľahlých hodnôt. Na základe toho bola vylúčená odľahlá hodnota (príslušná skupina (a) je označená výkričníkom (!) v stĺpci grafu).

7.2.2.3 Vplyv CL a FGF21 na génovú expresiu

Na základe hodnôt krvných markerov nás opäť zaujímali rozdiely na úrovni génovej expresie. **Obr. č. 22 až 24** sumarizujú výsledky meraní génovej expresie v pečeni a tukovom tkanive analogicky k obrázkom **č. 15 až 17**.

Aj napriek tomu, že v pečeni sa nenachádzajú β_3 -adrenergné receptory a nie je teda ovplyvnená pôsobením CL priamo, 24 h po injekcii CL v nej bola pozorovaná zvýšená expresia ATGL (**Obr. č. 22. a**). To zjavne súvisí so všeobecným lipogénnym účinkom CL. FGF21 tento nárast opäť tlmilo.

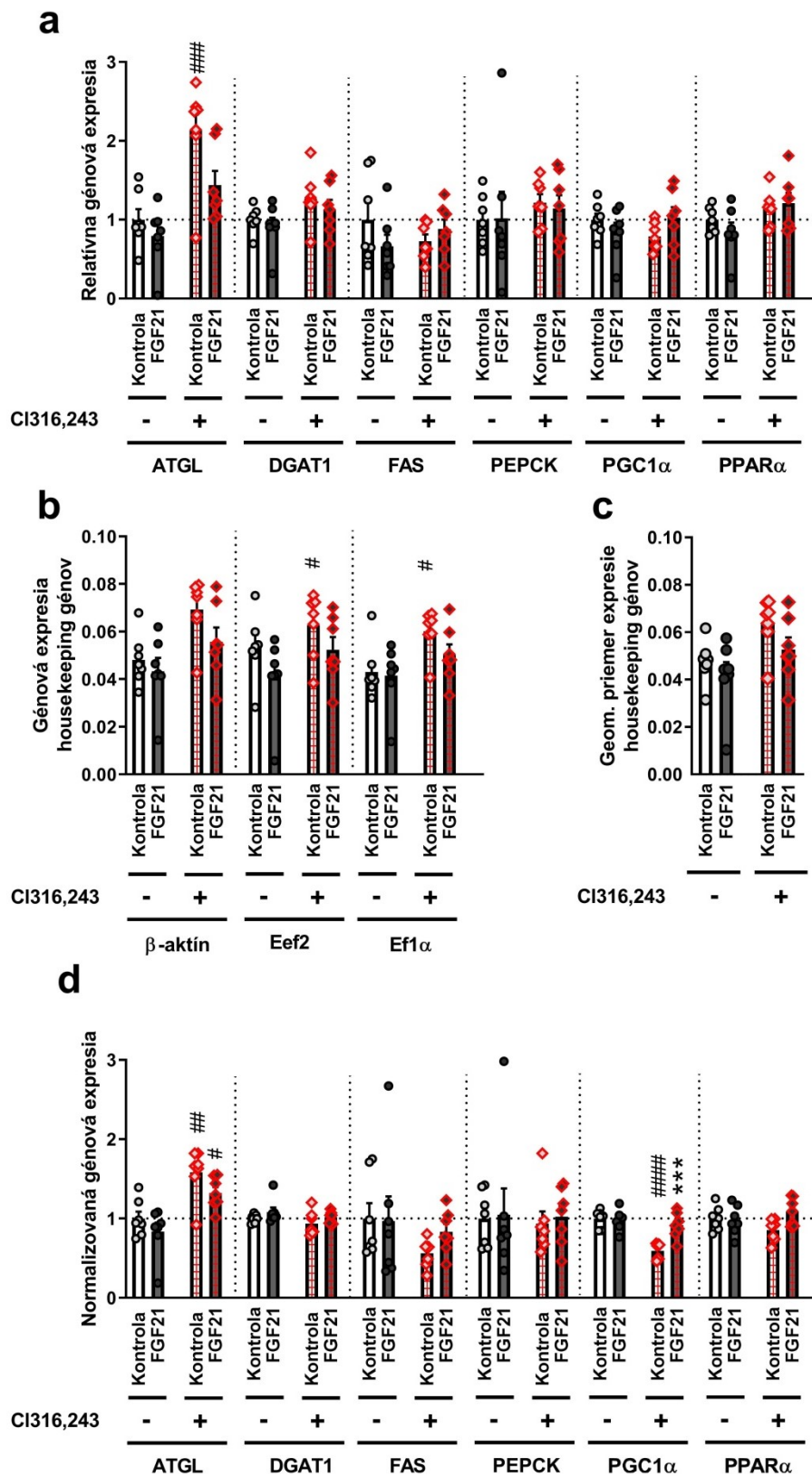
CL ovšem v pečeni signifikantne zvyšoval aj expresiu housekeeping génov Eef2 a Ef1 α , čo viedlo k signifikantnému nárastu geometrického priemeru týchto génov, ktorý bol použitý pri normalizácii. Z tohoto dôvodu vznikli pri normalizácii niektoré zjavne artificálne výsledky (pokles expresie PGC1 α (**Obr. č. 22. d**)).

V gonadálnom tukovom depe CL (totožne s FGF21) potlačuje expresiu FAS, čo odzrkadľuje zníženú lipogénu v tomto depe (**Obr. č. 23. a, Obr. č. 23. d**). Zároveň nepozorujeme efekt na ATGL, z čoho usudzujeme, že lipolýza je v tomto prípade regulovaná inak než na úrovni génovej expresie.

V dorzolumbálnom tukovom depe zvyšuje CL expresiu UCP1. Tento nárast je ešte zvýraznený kombináciou CL s FGF21 (**Obr. č. 24. b, Obr. č. 24. f**).

Skúmané podmienky teda zásadne neovplyvnili génovú expresiu v žiadnej zo študovaných tkanív. Najvýraznejším výsledkom je synergistická stimulácia hnednutia dorzolumbálneho tukového tkaniva.

Pečeň



Obr. č. 22 Génová expresia v pečeni po pôsobení CL a FGF21.

a) Nenormalizovaná génová expresia (dáta boli prepočítané tak, aby priemer 8-dennej kontrolnej skupiny odpovedal hodnote 1).

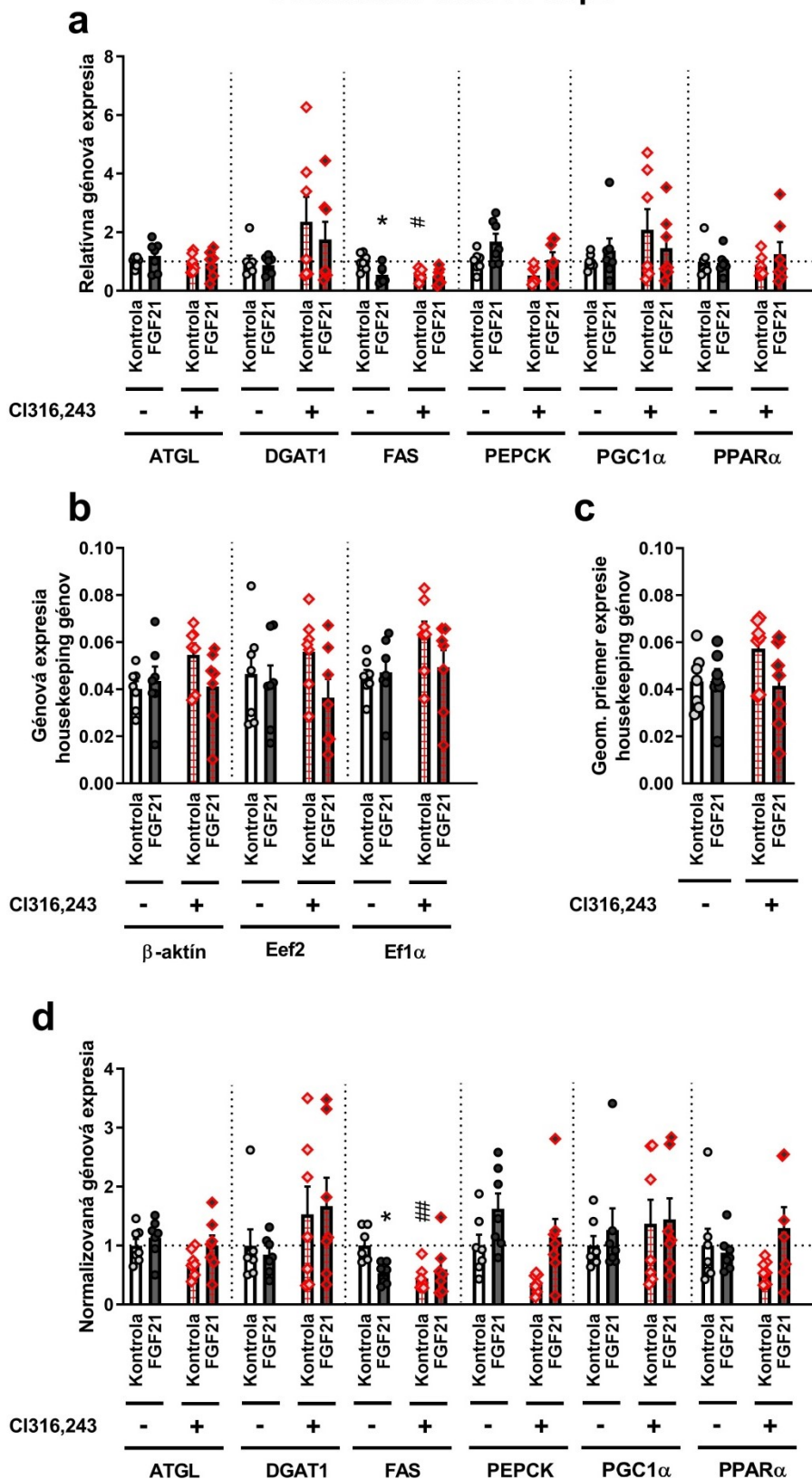
b) Génová expresia housekeeping génov.

c) Geometrický priemer housekeeping génov.

d) Génová expresia normalizovaná geometrickým priemerom housekeeping génov (dáta boli prepočítané tak, ako je popísané v bode a).

Štatistika jednotlivých génov: Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt CL.

Gonadálne tukové depo



Obr. č. 23 Génová expresia v gonadálnom tukovom depe po pôsobení CL a FGF21.

a) Nenormalizovaná génová expresia (dáta boli prepočítané tak, aby priemer 8-dennej kontrolnej skupiny odpovedal hodnote 1).

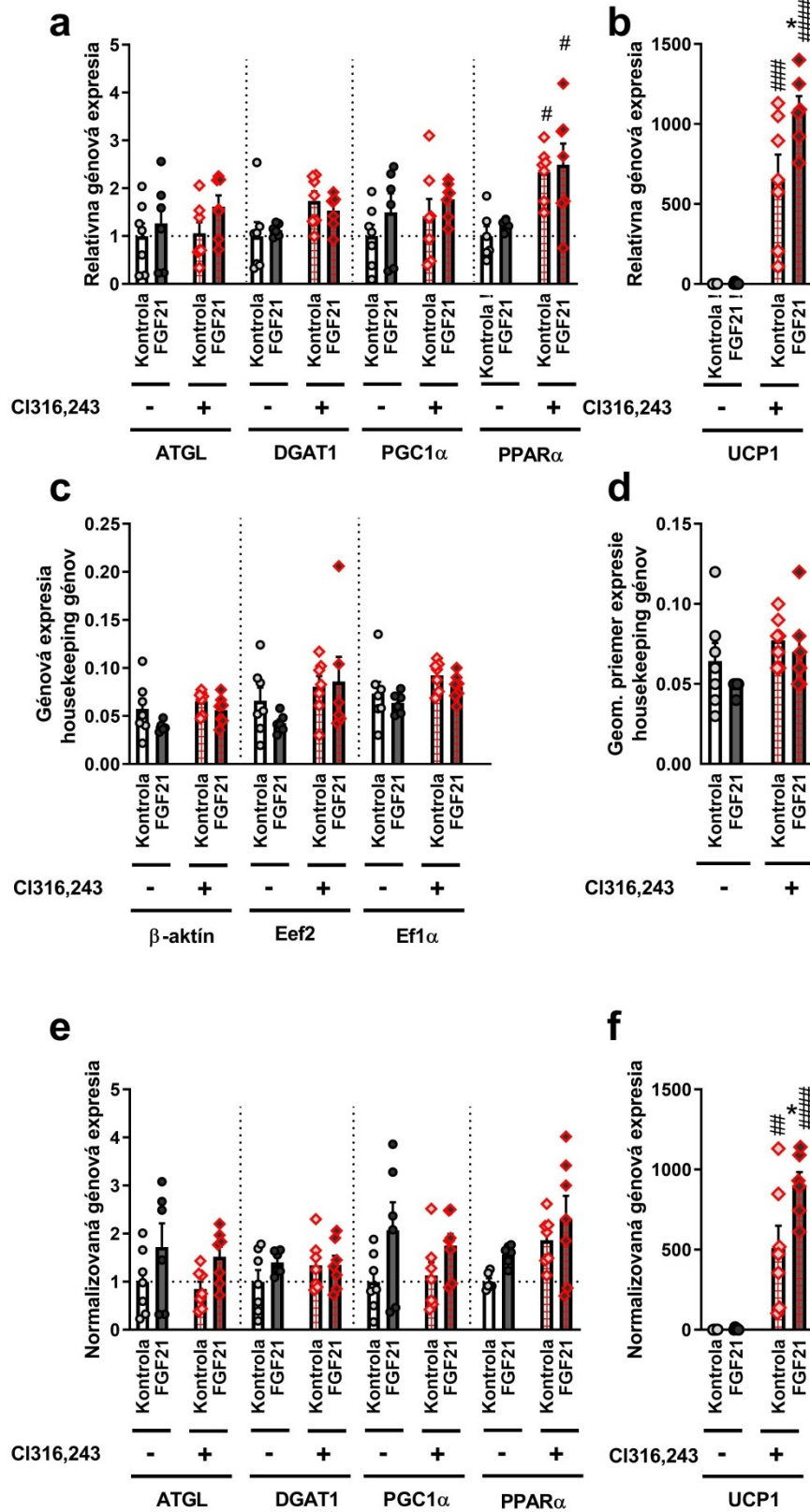
b) Génová expresia housekeeping génov.

c) Geometrický priemer housekeeping génov.

d) Génová expresia normalizovaná geometrickým priemerom housekeeping génov (dáta boli prepočítané, tak ako je popísané v bode a).

Štatistika jednotlivých génov: Dvojcestná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt CL.

Dorzolumbálne tukové depo



Obr. č. 24 Génová expresia v dorzolumbálnom tukovom depe po pôsobení CL a FGF21.

a) Nenormalizovaná génová expresia (dáta boli prepočítané tak, aby priemer 8-dennej kontrolnej skupiny odpovedal hodnote 1).

b) Génová expresia housekeeping génov.

c) Geometrický priemer housekeeping génov.

d) Génová expresia normalizovaná geometrickým priemerom housekeeping génov (dáta boli prepočítané tak ako je popísané v bode a).

Štatistika jednotlivých génov: Dvojcenná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt CL. Dáta boli skontrolované pomocou Grubovho testu, na zistenie odľahlých hodnôt. Na základe toho boli vylúčené odľahlé hodnoty (príslušná skupina (**a**, **b**) je označená výkričníkom (!) v popise osy grafu).

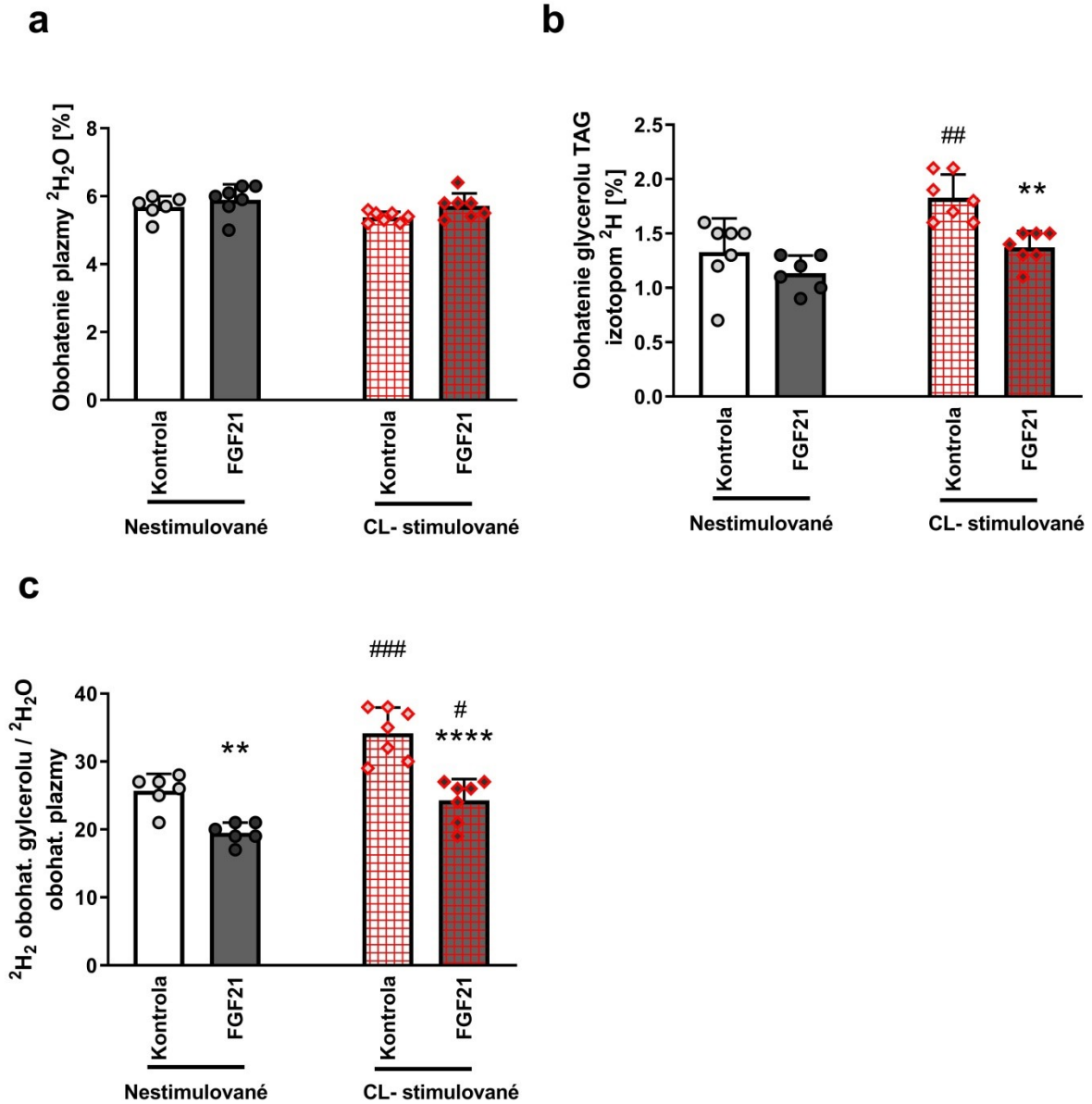
7.2.2.4 Stanovenie lipolýzy a re-esterifikácie pomocou izotopu $^2\text{H}_2\text{O}$

Napriek minimálnym zmenám v génovej expresii v tukovom tkanive, predchádzajúce meranie hladín lipidov v plazme naznačilo (v súlade s literatúrou (Schlein et al., 2016)), že FGF21 inhibuje sekréciu NEFA a glycerolu z tukového tkaniva. Sekrécia NEFA závisí ako na úrovni lipolýzy, tak na spätnej re-esterifikácii mastných kyselín. Účinok FGF21 na hladiny NEFA bol výraznejší než na glycerol (porovnaj **Obr. č. 14. c** a **Obr. č. 14. d**), čo nás viedlo k hypotéze, že FGF21 znižuje sekréciu NEFA prostredníctvom stimulácie ich re-esterifikácie. Aby sme mohli túto hypotézu testovať, použili sme značenie novo syntetizovaných TAG stabilným izotopom vodíka – deutérium ^2H . Telesná tekutina myší bola obohatená o $^2\text{H}_2\text{O}$ pomocou jednorazovej injekcie a následného príjmu pitnej vody s 10 % $^2\text{H}_2\text{O}$. Meranie $^2\text{H}_2\text{O}$ v plazme potvrdilo, že vo všetkých experimentálnych skupinách došlo k rovnomernému obohateniu krvi na cca 6 % (**Obr. č. 25. a**).

Následne sme izolovali TAG z gonadálneho a dorzolumbálneho tukového tkaniva a pečene, rozdelili ich na mastné kyseliny (presnejšie FAME), glycerol a následne analyzovali obsah ^2H v oboch častiach TAG molekuly pomocou plynovej chromatografie (viď kapitola č. 6.4.5 Stanovenie lipolýzy a re-esterifikácie pomocou izotopov $^2\text{H}_2\text{O}$). Zatiaľ čo do mastných kyselín sa ^2H dostáva pri procese *de novo* syntézy mastných kyselín, do glycerolu sa ^2H môže dostať pri glyceroneogenéze a následnej re-esterifikácii mastných kyselín.

Vo frakcii FAME zo žiadneho zo študovaných orgánov nebolo detegované žiadne navýšenie obohatenia ^2H oproti prírodnému zastúpeniu. Obrat syntézy mastných kyselín bol teda za skúmaných podmienok pod detekčným limitom tejto metódy. Oproti tomu v glycerolovej frakcii z gonadálneho tuku sme zaznamenali zvýšený podiel ^2H (aj keď dosť nízky, blízky detekčnému limitu), čo naznačuje, že re-esterifikácia v tomto tukovom depe skutočne prebieha v detekovateľnej miere. Podobne ako v prípade lipolýzy, CL taktiež zvyšovalo obrat re-esterifikácie (**Obr. č. 25. b, c** – zvýšené množstvo ^2H vo vzorkách stimulovaných CL oproti kontrolám), zatiaľ čo FGF21 re-esterifikáciu tlmilo. V rozpore s našou hypotézou teda zmeny v re-esterifikácii neurčujú výlev NEFA. Miera re-esterifikácie je tak v tomto prípade zjavne ovplyvňovaná druhotne zmenami v lipolýze.

Glycerolová frakcia z ostatných orgánov nebola skúmaná.



Obr. č. 25 Obohatenie $^2\text{H}_2\text{O}$ plazmy (a), glycerolu (b), normalizované $^2\text{H}_2$ obohatenie glycerolu (c). Štatistika: Dvojcenná ANOVA so Šidákovým zrovnávacím testom, * prezentuje efekt FGF21; # znázorňuje efekt CL.

8. Diskusia

Práca bola zameraná na sledovanie vplyvu exogénneho FGF21 na obezitu vyvolanú diétou v termoneutrálnom prostredí, ktoré predstavuje veľmi dobrý model pre štúdium obezity. Je známe, že FGF21 je zapojený do regulácie glukózového a lipidového metabolizmu, teda *in vivo* administrácia FGF21 zlepšuje inzulínovú senzitivitu, znižuje krvnú glukózu, znižuje obsah TAG v myších modeloch obezity a diabetu mellitus druhého typu (Coskun et al., 2008; Kharitononkov et al., 2005). V súlade s týmito prácami, naše dáta demonštrujú vplyv FGF21 na metabolické procesy, ktoré vedú k zlepšeniu obezity a inzulínovej rezistencie. Antiobézne účinky môžu byť spôsobené stimuláciou netriaškovej termogenézy prostredníctvom FGF21 (Coskun et al., 2008; Kharitononkov et al., 2005).

8.1 Vplyv teploty na energetický metabolizmus

Počas trojmesačnej prípravnej fázy spôsobilo podávanie vysoko-tukovej diéty a chovanie myší v termoneutralite naberanie hmotnosti, teda rozvoj obezity. Spotreba diéty bola v porovnaní so štandardnou teplotou relatívne nízka, keďže v termoneutralite stačí na udržiavanie telesnej teploty bazálny metabolizmus a nedochádza k prídavnej termogenéze, ako už ukázali predchádzajúce práce (Xiao et al., 2015). Bežná teplota pre chovanie myší je 22 °C, čo predstavuje pre myší chladový stres, dochádza pri tom k hndnutiu bieleho tukového tkaniva, zvyšuje sa expresia UCP1 (tieto zmeny sú ešte výraznejšie pri nižších teplotách), pričom sú zvýšené energetické nároky na udržiavanie telesnej teploty (Walden et al., 2012). Dlhodobé chovanie myší v termoneutralite (30 °C) minimalizuje produkciu tepla, vrátane inaktívácie hnedého tukového tkaniva a redukuje termogenézu sprostredkovanú UCP1 (Nedergaard and Cannon, 2014). Termoneutrálne prostredie u neoblečeného človeka sa pohybuje okolo 26 °C (Maloney et al., 2014). Práve štúdium myší v termoneutralite predstavuje lepší model ľudskej fyziológie a liečby obezity (Speakman and Keijer, 2014).

8.2 Časový priebeh účinkov FGF21

Po aplikácii FGF21 sa začali až v 5. dni prejavovať tendencie k poklesu hmotnosti, teda 4-denná aplikácia nebola dostatočná na pozorovanie účinkov FGF21 na hmotnosť myši a je nutná dlhšia aplikácia. Rovnaký antiobézny efekt FGF21 bol zaznamenaný v predchádzajúcich experimentoch pri subtermoneutálnych teplotách (Coskun et al., 2008). V súlade s literatúrou (Veniant et al., 2015) teda môžeme konštatovať, že teplota prostredia nemá priamy vplyv na antiobezogénny účinok FGF21. V oboch experimentoch používali rôzne veľké dávky FGF21, či už menšie (Coskun et al., 2008) alebo väčšie (Veniant et al., 2015) a zistili, že efekt narastá s dávkou.

V našom experimente sa nezávisle na podávaní FGF21 prejavila u všetkých skupín vrátane kontrolných tendencie k poklesu spotreby diéty, čo môže byť spôsobené stresom spojeným so separáciou myši alebo s každodenným injikovaním, pretože k poklesu došlo u všetkých skupín. V porovnaní s kontrolnou skupinou nemalo FGF21 na príjem potravy žiadny vplyv, čo je v súlade s literatúrou, ktorá taktiež uvádza, že FGF21 spotrebu potravy buď neovplyvňuje (Veniant et al., 2015), alebo dokonca zvyšuje (Coskun et al., 2008), pravdepodobne v súvislosti so zvýšeným energetickým výdajom.

Pokles hmotnosti bol zjavne primárne spôsobený redukciou obsahu lipidov v organizme, FGF21 neovplyvňovalo hmotnosť svalového tkaniva, ako sme očakávali na základe štúdia literatúry (Coskun et al., 2008), avšak v prípade oboch skúmaných bielych tukových dep sme pozorovali jasnú tendenciu k znižovaniu hmotnosti orgánu. V prípade BAT bola redukcia ešte výraznejšia, zjavne v súvislosti s predpokladanou aktiváciou UCP1 (Fisher et al., 2012) a spaľovaním veľkého množstva lipidov v tomto tkanive. Hmotnosť pečene bola po aplikácii FGF21 po 8 dňoch znížená v dôsledku zníženého obsahu TAG. Predpokladáme, že zmeny v pečeni reflektujú pokles hmotnosti tukového tkaniva, keďže masné kyseliny vznikajúce pri lipolýze v tukovom tkanive prúdia do pečene, kde sú re-esterifikované na TAG. Podobné výsledky boli pozorované skôr pri nižších teplotách (Coskun et al., 2008).

Pre signalizáciu FGF21 je nevyhnutný FGF receptor a kofaktor β Klotho, ktorý je selektívne exprimovaný v cieľových tkanivách FGF21, teda v pečeni a tukovom tkanive. Naopak jeho expresia nebola detegovaná v srdci a kostrovom svale (Xu et al., 2009). Výskum myši s deficienciou FGF21 špecificky v pečeni naznačil, že veľká časť efektov v pečeni je sekundárna, sprostredkovaná pôsobením FGF21 na iné tkanivo, napr. centrálny nervový systém (Owen et al., 2014). FGF21 je schopný prechádzať hematoencefalickou bariérou (Hsueh et al., 2007) a jeho chronická intracerebroventrikulárna aplikácia zvýšila príjem potravy, energetický výdaj a zlepšila inzulínovú senzitivitu (Sarruf et al., 2010). Pôsobenie FGF21 na cen-

trálnu nervovú sústavu nebolo v našich experimentoch študované. Naše výsledky však ukazujú, že časť zmien v pečeni je možné vysvetliť aj zmenou metabolizmu tukového tkaniva.

Pozorovali sme rovnako významné zníženie hladín cholesterolu a tendenciu k poklesu TAG v plazme vplyvom FGF21, čo je v súlade s predchádzajúcimi pokusmi na myšiach (Veniant et al., 2015) a aj opiciach (Kharitonov et al., 2007).

Ako už bolo naznačené v kapitole 4.1 Účinky FGF21 na jednotlivé orgány, je vplyv FGF21 na lipolýzu v adipocytoch kontroverzný. Predchádzajúce práce (Inagaki et al., 2007) popisovali stimulačný efekt FGF21 na bazálnu lipolýzu na 3T3-L1 adipocytoch. Novšie práce však pri použití rovnakých podmienok pozorujú opačné pôsobenie (Arner et al., 2008). FGF21 pritom znižuje hladiny NEFA v plazme nie iba pri chronickom pôsobení, ale už aj po jednej dávke (Li et al., 2009). Zložitejší vzťah FGF21 a lipolýzy naznačujú štúdie na myšiach s deficienciou v FGF21 (Hotta et al., 2009). Endogénny FGF21 údajne stimuluje lipolýzu u sýtych zvierat a inhibuje ju u hladných. Hladovanie všeobecne zvyšuje hladiny FGF21, ktoré sú u sýtych zvierat veľmi nízke. Možno preto očakávať, že účinok vysokej dávky exogénneho FGF21 bude skôr bližší situácii v hladnom zvierati. Naš záver, že FGF21 tlmí lipolýzu *in vivo*, je preto v súlade s väčšinou dostupnej literatúry.

Neskoršie experimenty zhodne reportujú benefičný účinok FGF21 na glykémiu, zatiaľ čo my žiadne rozdiely v hladine krvnej glukózy nepozorujeme. Spomínané experimenty ovšem často využívali o niečo dlhšie pôsobenie FGF21 12 dní (Coskun et al., 2008); 15 dní (Veniant et al., 2015) a niektoré z nich využívali efektívnejšiu kontinuálnu aplikáciu FGF21 osmotickými pumpami (Coskun et al., 2008). FGF21 by mal ovšem pôsobiť na glykémiu aj akútne, keď sa zvieratám zamedzí v prístupu k potrave (Xu et al., 2009). V našom prípade, rovnako ako vo väčšine chronických experimentov, sa glykémia spravidla meria v stave náhodnej sýtosti, čo môže rozdiely medzi skupinami stierať. Najpodstatnejší rozdiel medzi našim experimentom a predchádzajúcimi prácami však spočíva v miere obezity. Naše zvieratá aj vplyvom dlhodobého chovu v termoneutralnej teplote vážili okolo 45 – 50 g. Keď sú experimenty robené na obéznych zvieratách, ich hmotnosť sa buď neuvádza (Xu et al., 2009), alebo je výrazne nižšia (Coskun et al., 2008). Obezita je naozaj spojená s istou mierou rezistencie k účinkom FGF21 (Fisher et al., 2010), takže je pochopiteľné, že v našom morbidne obéznom modeli nedochádza k manifestácii všetkých skôr popísaných účinkov FGF21, ale iba tých najvýraznejších. Ako sme očakávali (Coskun et al., 2008), (Veniant et al., 2015), (Xu et al., 2009) inzulín bol po 8 dňoch podávania FGF21 znížený. Za pokles inzulínu môže byť pokles jeho sekrecie, zvýšenie biodegradácie inzulínu, alebo kombinácia oboch. Bolo experimentálne dokázané (Wente et al., 2006), že FGF21 skôr ako sekreciu ovplyvňuje biosyntézu inzulínu. Možno očakávať, že celkové

zníženie obsahu lipidov v tele (vrátane ich ektopických depotov) vedie k zvýšenej citlivosti k inzulínu. Za týchto podmienok je potom k udržaniu nezmenenej glykémie treba menšie množstvo inzulínu.

Možno teda konštatovať, že FGF21 znižuje obsah lipidov v organizme (cholesterol, NEFA, TAG) prostredníctvom zmien v tukovom tkanive a následne v pečeni. S tým súvisí aj trend k poklesu telesnej hmotnosti a zlepšenie inzulínovej senzitivity. Efekty sú výraznejšie po 8 dňoch aplikácie než po 4 dňoch.

Aj napriek tomu, že FGF21 iba minimálne ovplyvňoval génovú expresiu, výsledky naznačujú, že FGF21 inhibuje lipidový metabolizmus a aktivuje hnednutie bieleho tukového tkaniva.

8.3 Kombinácia účinkov CL316,243 a FGF21

Keďže účinky FGF21 na lipolýzu neboli výrazné, rozhodli sme sa sledovať účinky FGF21 za podmienok stimulovanej lipolýzy, k čomu sme využili jednorazové podanie β_3 -adrenergného agonistu CL316,243. Je známe, že stimulácia β_3 -adrenergných receptorov spôsobuje lipolýzu vo WAT, BAT a termogénu v BAT (Inokuma et al., 2006), naopak FGF21, zvyčajne lipolýzu tlmí (Arner et al., 2008; Li et al., 2009).

V súlade s predchádzajúcimi prácami na laboratórnych hlodavcoch, ktoré väčšinou skúmali účinky CL pri štandardných izbových teplotách (Grujic et al., 1997; Susulic et al., 1995), aj v našom experimente CL výrazne znižovalo príjem potravy. Mechanizmus tohoto pôsobenia nie je známy. Jedným z kandidátov bol hormón leptín, ktorý reguluje príjem potravy, no podávanie β_3 -adrenergných agonistov potlačuje sekréciu leptínu, čo by naopak malo viesť k zvýšenému príjmu potravy (Mantzoros et al., 1996). Ďalším z kandidátov by mohol byť inzulín, keďže tlmí príjem potravy (Woods et al., 1998) a zároveň sú jeho hladiny po podaní CL akútne zvýšené (Grujic et al., 1997). V neposlednom rade môže byť príjem potravy priamo ovplyvnený aj množstvom uvoľnených mastných kyselín a ketónových látok (viď ďalej). CL znižuje príjem potravy aj po chronickej aplikácii v termoneutralite, no štandardnej izbovej teplote bol ojedinele pozorovaný nárast príjmu potravy, ako prevencia pred stratou telesnej hmotnosti (Xiao et al., 2015).

V našom prípade bol CL aplikovaný iba jednorazovo, takže pokles príjmu potravy nestihol ovplyvniť telesnú hmotnosť. Samotný CL stimuluje lipolýzu (MacPherson et al., 2014), čo sa prejavilo zvýšenými hladinami NEFA v plazme aj obsahom TAG v pečeni (to viedlo až k zvýšeniu hmotnosti celého orgánu). Pečeň potom lipidy opäť expeduje do tela v podobe lipoproteínových partikul, čo bolo v našom prípade reflektované zvýšeným množstvom TAG v plazme. Pri chronickom pôsobení CL však strata hmotnosti vedie k dlhodobému poklesu NEFA (Xiao et al., 2015).

Zaujímavým efektom, ktorý je pripisovaný akútnemu pôsobeniu CL, je okamžitý pokles glykémie (Grujic et al., 1997). Zdalo by sa, že tento pokles bude spôsobený nárastom príjmu glukózy do aktivovaného BAT, ktoré sa vyznačuje mimoriadnou kapacitou pre spaľovanie glukózy aj lipidov. Pokusy s myšami s tkanivovo špecifickou deficienciou β_3 -adrenergného receptora však ukázali, že pre znížovanie glykémie je kľúčové skôr WAT (Grujic et al., 1997). Nevyhnutná sa pre tento efekt zdá byť adrenergná stimulácia lipolýzy vo WAT (MacPherson et al., 2014). Z toho vyplýva, že CL stimuluje lipolýzu vo WAT, čo vedie k zvýšenej hladine NEFA v cirkulácii. Tieto NEFA následne (nie úplne objasneným mechanizmom) stimulujú pankreas k sekrécii inzulínu, čo vedie k poklesu glykémie (Grujic et al., 1997; MacPherson et al., 2014).

Popisované experimenty boli vždy robené na myšiach kŕmených štandardnou diétou a chovaných v štandardnej teplote (MacPherson et al., 2014; Xiao et al., 2015). V tomto ohľade sú mimoriadne zaujímavé účinky akútnej adrenergnej stimulácie v našom modeli obéznych termoneutrálnych zvierat. Aj u nás vedie pôsobenie CL k nárastu NEFA, následne aj inzulínu, avšak krvná glukóza nie je ovplyvnená (merané 24 h po injekcii CL). To by mohlo svedčiť o vysokom stupni inzulínovej rezistencie v našom modeli, takže sa ani extrémne vysoké hladiny inzulínu neprejavia na úrovni krvnej glukózy. Keď sme však glykémiu analyzovali bezprostredne (2 – 3 h.) po injekcii CL, bola glykémia dokonca dramaticky zvýšená, čo je v priamom protiklade k situácii u myší na štandardnej diéte. Tento fenomén si zaslúži ďalší podrobnejší výskum. V nadväzujúcich experimentoch by sme radi zmerali aj hladiny NEFA a inzulínu krátko po injekcii CL, aby sme lepšie porozumeli mechanizmu, akým CL ovplyvňuje krvnú glukózu v našom modeli. Súčasná hypotéza o ose NEFA – inzulín – krvná glukóza sa zdá byť nedostatočná.

Ako už bolo niekoľkokrát poznamenané, v našom modeli FGF21 inhibuje lipolýzu a znižuje hladiny NEFA, čo sa prejavuje najmä v kontexte adrenergnej stimulácie. Absencia nárastu NEFA u adrenergne stimulovaných myší vystavených pôsobeniu FGF21 odpovedala absencii nárastu obsahu TAG v pečeni, aj absencii nárastu inzulínu. Na druhú stranu príjem potravy je inhibovaný pôsobením CL nezávisle na FGF21, čo skôr hovorí proti centrálnej úlohe NEFA a inzulínu v tomto kontexte. Odhliadnuc od inhibície lipolýzy ovšem u myší injikovaných FGF21 došlo bezprostredne po injekcii CL k dramatickému poklesu krvnej glukózy. Aj napriek tomu, že mali všetky naše experimentálne skupiny v zásade rovnakú hmotnosť a mieru adipozity, krvná glukóza bola jednotlivými látkami ovplyvnená diametrálne odlišne. Zatiaľ čo neboli pozorované žiadne signifikantné zmeny v glykémii po pôsobení samotného FGF21, CL hladinu krvnej glukózy akútne výrazne zvyšovalo a naopak, kombinácie FGF21 a CL krvnú glukózu dramaticky znižovala. Zdá sa teda, že pôsobenie FGF21 dokáže u obéznych myší obnoviť potenciál pre akútne zníženie glykémie po adrenergnej stimulácii, ktoré je normálne pozorované u myší na štandardnej diéte

(Grujic et al., 1997; MacPherson et al., 2014). FGF21 a CL teda glykémiu synergisticky ovplyvňujú, čo je najdôležitejším záverom celého projektu s potenciálnym terapeutickým využitím.

FGF21 (Fisher et al., 2012) aj CL (Klaus et al., 2001) taktiež aktivujú UCP1 v BAT aj hnednúce WAT, čím dochádza k navýšeniu energetického výdaju a prípadne k znižovaniu hmotnosti. V prípade FGF21 bol tento záver v súčasnosti spochybnený skutočnosťou, že antiobezogénne účinky FGF21 sú zachované aj v myšiach s UCP1 deficienciou (Samms et al., 2015; Veniant et al., 2015). Napriek tomu, že FGF21 zvyšuje UCP1, tento mechanizmus teda nie je priamo zodpovedný za znižovanie hmotnosti. Aj v našom modeli pozorujeme navýšenie expresie UCP1 ako po CL, tak po FGF21, pričom kombinácia oboch má aditívny účinok.

Skúmanie účinkov FGF21 v podmienkach adrenergnej stimulácie zvýraznilo zmeny v lipolýze a následných dejoch, ktoré neboli v bazálnom stave vždy zjavné. V bazálnom stave boli najvýraznejšie účinky FGF21 pozorované v plazme a pečeni, všetky pozorované efekty však nasvedčovali tomu, že bol ovplyvnený metabolizmus tukového tkaniva. Až po adrenergnej stimulácii sa úplne odhalilo antilipolytické pôsobenie FGF21, ktoré zjavne stálo v pozadí ostatných zmien.

FGF21 má potenciál obnoviť efekt zníženia glukózy vyvolaný β_3 -adrenergnou stimuláciou pri obéznych myšiach. Zdá sa pritom, že riadenie týchto zmien v glykémii nie je závislé iba na hladinách NEFA a inzulínu, ako sa skôr predpokladalo. V ďalšom kroku sa chystáme otestovať reproducibilitu týchto výsledkov a preskúmať mechanizmus znižovania glukózy v bližšom detaile.

9. Záver

Na ciele, ktoré boli na začiatku práce v kapitole č. 5 vytýčené, sme zodpovedali prostredníctvom spomínaných experimentov a analytických metód.

1. V prípravných experimentoch sme overili, že β_3 -adrenergný agonista CL 316,243 výrazne stimuluje lipolýzu v bunkových kultúrach 3T3-L1. Zároveň sme našli koncentráciu CL (10^{-10} mM), pri ktorej je možné lipolýzu ešte ďalej stimulovať alebo inhibovať, teda tieto podmienky by boli v budúcnosti vhodné na meranie účinkov FGF21 na bunkových kultúrach.
2. Štvordenné pôsobenie FGF21 nebolo dostatočné k tomu, aby zmeny v pozorovaných parametroch dosiahli signifikancie. Až po 8 dňoch sme zaznamenali zníženie obsahu lipidov v plazme a v pečeni. Aj napriek minimálnym zmenám v génovej expresii všetkých študovaných tkanív profil lipidov v plazme naznačuje, že by primárnym miestom pôsobenia FGF21 mohlo byť tukové tkanivo, v ktorom dochádza k inhibícii lipolýzy. Zároveň FGF21 po 8 dňoch zjavne stimuluje UCP1, čo sa prejavuje znížením hmotnosti BAT (pravdepodobne v dôsledku zvýšeného spaľovania lipidov) a tendenciou k zvýšenej expresii UCP1 v dorzolumbálnom WAT.
3. Podarilo sa nám zistiť, že FGF21 znižuje hladiny NEFA priamo prostredníctvom zmien v lipolýze a nie prostredníctvom stimulácie ich re-esterifikácie. Miera re-esterifikácie totiž klesá po pôsobení FGF21, čo by teoreticky malo viesť k zvýšenej sekrécii NEFA. Keďže pozorujeme opak, kľúčovým procesom musí byť lipolýza TAG a nie re-esterifikácia mastných kyselín.
4. Samotný FGF21 glykémiu takmer neovplyvňoval, zatiaľ čo β_3 -adrenergná stimulácia viedla k výraznému nárastu glykémie. Kombinácia oboch látok glykémiu synergisticky znižovala. Tieto efekty sa nepodarilo jednoznačne vysvetliť súčasnými teóriami o význame NEFA a inzulínu pre reguláciu glykémie pri adrenergnej stimulácii. Pretože je znižovanie hladiny krvnej glukózy témou s veľkým medicínskym významom, nadväzujú na naše výsledky ďalšie projekty oddelenia s cieľom objasniť príčinu pozorovaných efektov.

Zoznam použitej literatúry

Ahmadian, M., Duncan, R.E., and Sul, H.S. (2009). The skinny on fat: lipolysis and fatty acid utilization in adipocytes. *Trends Endocrin Met* 20, 424-428.

Aquila, H., Link, T.A., and Klingenberg, M. (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *Embo J* 4, 2369-2376.

Arner, P., Pettersson, A., Mitchell, P.J., Dunbar, J.D., Kharitonov, A., and Ryden, M. (2008). FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Lett* 582, 1725-1730.

Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 5, 426-437.

Berry, D.C., Stenesen, D., Zeve, D., and Graff, J.M. (2013). The developmental origins of adipose tissue. *Development* 140, 3939-3949.

Black, B.L., Croom, J., Eisen, E.J., Petro, A.E., Edwards, C.L., and Surwit, R.S. (1998). Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice. *Metabolism* 47, 1354-1359.

Boden, G. (2008). Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37, 635-646, viii-ix.

BonDurant, L.D., Ameka, M., Naber, M.C., Markan, K.R., Idiga, S.O., Acevedo, M.R., Walsh, S.A., Ornitz, D.M., and Potthoff, M.J. (2017). FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cell Metabolism* 25, 935-+.

Bookout, A.L., de Groot, M.H., Owen, B.M., Lee, S., Gautron, L., Lawrence, H.L., Ding, X., Elmquist, J.K., Takahashi, J.S., Mangelsdorf, D.J., et al. (2013). FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med* 19, 1147-1152.

Boon, M.R., van den Berg, S.A., Wang, Y., van den Bossche, J., Karkampouna, S., Bauwens, M., De Saint-Hubert, M., van der Horst, G., Vukicevic, S., de Winther, M.P., et al. (2013). BMP7 activates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity only at subthermoneutrality. *PLoS One* 8, e74083.

Braun, K., Oeckl, J., Westermeier, J., Li, Y., and Klingenspor, M. (2018). Non-adrenergic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissues. *J Exp Biol* 221.

Brunzell, J.D., and Hokanson, J.E. (1999). Dyslipidemia of central obesity and insulin resistance. *Diabetes Care* 22 Suppl 3, C10-13.

Cadoudal, T., Distel, E., Durant, S., Fouque, F., Blouin, J.M., Collinet, M., Bortoli, S., Forest, C., and Benelli, C. (2008). Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes* 57, 2272-2279.

Campbell, P.J., Carlson, M.G., Hill, J.O., and Nurjhan, N. (1992). Regulation of Free Fatty-Acid Metabolism by Insulin in Humans - Role of Lipolysis and Reesterification. *American Journal of Physiology* 263, E1063-E1069.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.

Chau, M.D., Gao, J., Yang, Q., Wu, Z., and Gromada, J. (2010). Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 12553-12558.

Chitraju, C., Mejhert, N., Haas, J.T., Diaz-Ramirez, L.G., Grueter, C.A., Imbriglio, J.E., Pinto, S., Koliwad, S.K., Walther, T.C., and Farese, R.V., Jr. (2017). Triglyceride Synthesis by DGAT1 Protects Adipocytes from Lipid-Induced ER Stress during Lipolysis. *Cell Metab* *26*, 407-418 e403.

Coskun, T., Bina, H.A., Schneider, M.A., Dunbar, J.D., Hu, C.C., Chen, Y., Moller, D.E., and Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* *149*, 6018-6027.

Cuevas-Ramos, D., Almeda-Valdes, P., Aguilar-Salinas, C.A., Cuevas-Ramos, G., Cuevas-Sosa, A.A., and Gomez-Perez, F.J. (2009). The role of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on energy balance, glucose and lipid metabolism. *Curr Diabetes Rev* *5*, 216-220.

Cypess, A.M., Weiner, L.S., Roberts-Toler, C., Franquet Elia, E., Kessler, S.H., Kahn, P.A., English, J., Chatman, K., Trauger, S.A., Doria, A., et al. (2015). Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* *21*, 33-38.

de Souza, C.J., Eckhardt, M., Gagen, K., Dong, M., Chen, W., Laurent, D., and Burkey, B.F. (2001). Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* *50*, 1863-1871.

Declercq, P.E., Debeer, L.J., and Mannaerts, G.P. (1982). Glucagon Inhibits Triacylglycerol Synthesis in Isolated Hepatocytes by Lowering Their Glycerol 3-Phosphate Content. *Biochemical Journal* *202*, 803-806.

Domouzoglou, E.M., and Maratos-Flier, E. (2011). Fibroblast growth factor 21 is a metabolic regulator that plays a role in the adaptation to ketosis. *Am J Clin Nutr* *93*, 901S-905S.

Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., and Wahli, W. (1992). Control of the Peroxisomal Beta-Oxidation Pathway by a Novel Family of Nuclear Hormone Receptors. *Cell* *68*, 879-887.

Dyck, D.J., Steinberg, G., and Bonen, A. (2001). Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle. *Am J Physiol-Endoc M* *281*, E600-E607.

Ellis, B.A., Poynten, A., Lowy, A.J., Furler, S.M., Chisholm, D.J., Kraegen, E.W., and Cooney, G.J. (2000). Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *279*, E554-560.

Festuccia, W.T.L., Guerra-Sa, R., Kawashita, N.H., Garofalo, M.A.R., Evangelista, E.A., Rodrigues, V., Kettelhut, I.C., and Migliorini, R.H. (2003). Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. *Am J Physiol-Reg I* *284*, R1536-R1541.

Fisher, F.M., Chui, P.C., Antonellis, P.J., Bina, H.A., Kharitonov, A., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* *59*, 2781-2789.

Fisher, F.M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* *26*, 271-281.

Fisher, F.M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol* *78*, 223-241.

Flachs, P., Adamcova, K., Zouhar, P., Marques, C., Janovska, P., Viegas, I., Jones, J.G., Bardova, K., Svobodova, M., Hansikova, J., et al. (2017). Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: link to lean phenotype. *International Journal Of Obesity* *41*, 997.

Flatt, J.P. (1970). Conversion of carbohydrate to fat in adipose tissue: an energy-yielding and, therefore, self-limiting process. *J Lipid Res* *11*, 131-143.

Foster, G.D., Wyatt, H.R., Hill, J.O., McGuckin, B.G., Brill, C., Mohammed, B.S., Szapary, P.O., Rader, D.J., Edman, J.S., and Klein, S. (2003). A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med* *348*, 2082-2090.

Franckhauser, S., Munoz, S., Pujol, A., Casellas, A., Riu, E., Otaegui, P., Su, B., and Bosch, F. (2002). Increased fatty acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* *51*, 624-630.

Gaich, G., Chien, J.Y., Fu, H., Glass, L.C., Deeg, M.A., Holland, W.L., Kharitononkov, A., Bumol, T., Schilske, H.K., and Moller, D.E. (2013). The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab* *18*, 333-340.

Garruti, G., and Ricquier, D. (1992). Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* *16*, 383-390.

Gauthier, M.S., Miyoshi, H., Souza, S.C., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Greenberg, A.S., and Ruderman, N.B. (2008). AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J Biol Chem* *283*, 16514-16524.

Giralt, M., and Villarroya, F. (2013). White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* *154*, 2992-3000.

Granneman, J.G., Burnazi, M., Zhu, Z., and Schwamb, L.A. (2003). White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *285*, E1230-1236.

Grauer, W.O., Moss, A.A., Cann, C.E., and Goldberg, H.I. (1984). Quantification of body fat distribution in the abdomen using computed tomography. *Am J Clin Nutr* *39*, 631-637.

Green, A.L., Bagci, U., Hussein, S., Kelly, P.V., Muzaffar, R., Neuschwander-Tetri, B.A., and Osman, M.M. (2017). Brown adipose tissue detected by PET/CT imaging is associated with less central obesity. *Nucl Med Commun* *38*, 629-635.

Grujic, D., Susulic, V.S., Harper, M.E., Himms-Hagen, J., Cunningham, B.A., Corkey, B.E., and Lowell, B.B. (1997). Beta3-adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate beta3-selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake. A study using transgenic and gene knockout mice. *J Biol Chem* *272*, 17686-17693.

Grundy, S.M. (2008). Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *28*, 629-636.

Grundy, S.M. (2015). Adipose tissue and metabolic syndrome: too much, too little or neither. *Eur J Clin Invest* *45*, 1209-1217.

Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., et al. (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* *312*, 734-737.

Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* *269*, 543-546.

Hamann, A., Flier, J.S., and Lowell, B.B. (1996). Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology* *137*, 21-29.

Hellerstein, M.K. (1999). De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr* *53 Suppl 1*, S53-65.

Henninger, A.M., Eliasson, B., Jenndahl, L.E., and Hammarstedt, A. (2014). Adipocyte hypertrophy, inflammation and fibrosis characterize subcutaneous adipose tissue of healthy, non-obese subjects predisposed to type 2 diabetes. *PLoS One* *9*, e105262.

Herzig, S., Long, F.X., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., et al. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* *413*, 179-183.

Heymsfield, S.B., Greenberg, A.S., Fujioka, K., Dixon, R.M., Kushner, R., Hunt, T., Lubina, J.A., Patane, J., Self, B., Hunt, P., et al. (1999). Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* *282*, 1568-1575.

Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., and Itoh, N. (2009). Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* *150*, 4625-4633.

Hsuchou, H., Pan, W., and Kastin, A.J. (2007). The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides* *28*, 2382-2386.

Huang-Doran, I., Sleight, A., Rochford, J.J., O'Rahilly, S., and Savage, D.B. (2010). Lipodystrophy: metabolic insights from a rare disorder. *J Endocrinol* *207*, 245-255.

Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., et al. (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* *5*, 415-425.

Inokuma, K., Okamatsu-Ogura, Y., Omachi, A., Matsushita, Y., Kimura, K., Yamashita, H., and Saito, M. (2006). Indispensable role of mitochondrial UCP1 for antiobesity effect of beta 3-adrenergic stimulation. *Am J Physiol-Endoc M* *290*, E1014-E1021.

Joseph, J., Shamburek, R.D., Cochran, E.K., Gorden, P., and Brown, R.J. (2014). Lipid regulation in lipodystrophy versus the obesity-associated metabolic syndrome: the dissociation of HDL-C and triglycerides. *J Clin Endocrinol Metab* *99*, E1676-1680.

Keipert, S., Kutschke, M., Ost, M., Schwarzmayr, T., van Schothorst, E.M., Lamp, D., Brachthäuser, L., Hamp, I., Mazibuko, S.E., Hartwig, S., et al. (2017). Long-Term Cold Adaptation Does Not Require FGF21 or UCP1. *Cell Metab* *26*, 437-446 e435.

Kharitonov, A., Dunbar, J.D., Bina, H.A., Bright, S., Moyers, J.S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S.F., Knierman, M.D., et al. (2008). FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J Cell Physiol* *215*, 1-7.

Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* *115*, 1627-1635.

Kharitonov, A., Wroblewski, V.J., Koester, A., Chen, Y.F., Clutinger, C.K., Shanafelt, A.B., Etgen, G.J., Tigno, X.T., and Hansen, B.C. (2007). FGF-21 regulates the metabolic state of diabetic monkeys. *Diabetes* *56*, A668-A668.

King, A.J., Segreti, J.A., Larson, K.J., Souers, A.J., Kym, P.R., Reilly, R.M., Zhao, G., Mittelstadt, S.W., and Cox, B.F. (2009). Diacylglycerol acyltransferase 1 inhibition lowers serum triglycerides in the Zucker fatty rat and the hyperlipidemic hamster. *J Pharmacol Exp Ther* 330, 526-531.

Klaus, S., Seivert, A., and Boeuf, S. (2001). Effect of the beta(3)-adrenergic agonist Cl316,243 on functional differentiation of white and brown adipocytes in primary cell culture. *Biochim Biophys Acta* 1539, 85-92.

Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceridelipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism* 3, 309-319.

LeBlanc, J., Dulac, S., Cote, J., and Girard, B. (1975). Autonomic nervous system and adaptation to cold in man. *J Appl Physiol* 39, 181-186.

Lehr, S., Hartwig, S., and Sell, H. (2012). Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl* 6, 91-101.

Leroyer, S.N., Tordjman, J., Chauvet, G., Quette, J., Chapron, C., Forest, C., and Antoine, B. (2006). Rosiglitazone controls fatty acid cycling in human adipose tissue by means of glyceroneogenesis and glycerol phosphorylation. *J Biol Chem* 281, 13141-13149.

Lettner, A., and Roden, M. (2008). Ectopic fat and insulin resistance. *Curr Diab Rep* 8, 185-191.

Li, X., Ge, H., Weizmann, J., Hecht, R., Li, Y.S., Veniant, M.M., Xu, J., Wu, X., Lindberg, R., and Li, Y. (2009). Inhibition of lipolysis may contribute to the acute regulation of plasma FFA and glucose by FGF21 in ob/ob mice. *FEBS Lett* 583, 3230-3234.

Lidell, M.E., Betz, M.J., Dahlqvist Leinhard, O., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., et al. (2013). Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 19, 631-634.

Long, J.Z., Svensson, K.J., Tsai, L., Zeng, X., Roh, H.C., Kong, X., Rao, R.R., Lou, J., Lokurkar, I., Baur, W., et al. (2014). A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab* 19, 810-820.

MacPherson, R.E., Castellani, L., Beaudoin, M.S., and Wright, D.C. (2014). Evidence for fatty acids mediating CL 316,243-induced reductions in blood glucose in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307, E563-570.

Maloney, S.K., Fuller, A., Mitchell, D., Gordon, C., and Overton, J.M. (2014). Translating animal model research: does it matter that our rodents are cold? *Physiology (Bethesda)* 29, 413-420.

Mantzoros, C.S., Qu, D., Frederich, R.C., Susulic, V.S., Lowell, B.B., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (1996). Activation of beta(3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes* 45, 909-914.

Markan, K.R., Naber, M.C., Ameka, M.K., Anderegg, M.D., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Mohammadi, M., and Potthoff, M.J. (2014). Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* 63, 4057-4063.

Morrison, S., and McGee, S.L. (2015). 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. *Adipocyte* 4, 295-302.

- Moyers, J.S., Shiyanova, T.L., Mehrbod, F., Dunbar, J.D., Noblitt, T.W., Otto, K.A., Reifel-Miller, A., and Kharitononkov, A. (2007). Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. *J Cell Physiol* 210, 1-6.
- Muir, L.A., Neeley, C.K., Meyer, K.A., Baker, N.A., Brosius, A.M., Washabaugh, A.R., Varban, O.A., Finks, J.F., Zamarron, B.F., Flesher, C.G., et al. (2016). Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obesity (Silver Spring)* 24, 597-605.
- Nedergaard, J., and Cannon, B. (2014). The Browning of White Adipose Tissue: Some Burning Issues. *Cell Metabolism* 20, 396-407.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., et al. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399, 323-329.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta* 1492, 203-206.
- Nye, C.K., Hanson, R.W., and Kalhan, S.C. (2008). Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *Journal of Biological Chemistry* 283, 27565-27574.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2, REVIEWS3005.
- Owen, B.M., Ding, X., Morgan, D.A., Coate, K.C., Bookout, A.L., Rahmouni, K., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2014). FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab* 20, 670-677.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540-543.
- Pinkney, J.H., Coppack, S.W., and Mohamed-Ali, V. (1998). Effect of isoprenaline on plasma leptin and lipolysis in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48, 407-411.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.
- Reynisdottir, S., Langin, D., Carlstrom, K., Holm, C., Rossner, S., and Arner, P. (1995). Effects of weight reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity. *Clin Sci (Lond)* 89, 421-429.
- Robinson, J., and Newsholme, E.A. (1967). Glycerol Kinase Activities in Rat Heart and Adipose Tissue. *Biochemical Journal* 104, C2-+.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-853.
- Salans, L.B., Cushman, S.W., and Weismann, R.E. (1973). Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *J Clin Invest* 52, 929-941.
- Samms, R.J., Smith, D.P., Cheng, C.C., Antonellis, P.P., Perfield, J.W., Kharitononkov, A., Gimeno, R.E., and Adams, A.C. (2015). Discrete Aspects of FGF21 In Vivo Pharmacology Do Not Require UCP1. *Cell Rep* 11, 991-999.
- Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F., and Gastaldelli, A. (2015). The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* 7, 9453-9474.

Sarruf, D.A., Thaler, J.P., Morton, G.J., German, J., Fischer, J.D., Ogimoto, K., and Schwartz, M.W. (2010). Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* 59, 1817-1824.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270, 26746-26749.

Schlein, C., Talukdar, S., Heine, M., Fischer, A.W., Krott, L.M., Nilsson, S.K., Brenner, M.B., Heeren, J., and Scheja, L. (2016). FGF21 Lowers Plasma Triglycerides by Accelerating Lipoprotein Catabolism in White and Brown Adipose Tissues. *Cell Metab* 23, 441-453.

Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem* 281, 40236-40241.

Schweizer, S., Oeckl, J., Klingenspor, M., and Fromme, T. (2018). Substrate fluxes in brown adipocytes upon adrenergic stimulation and uncoupling protein 1 ablation. *Life Sci Alliance* 1.

Shan, T., Liang, X., Bi, P., Zhang, P., Liu, W., and Kuang, S. (2013). Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *J Lipid Res* 54, 2214-2224.

Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., et al. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7, e49452.

Shi, H., and Clegg, D.J. (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* 97, 199-204.

Smirnova, E., Goldberg, E.B., Makarova, K.S., Lin, L., Brown, W.J., and Jackson, C.L. (2006). ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO Rep* 7, 106-113.

Smith, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J* 8, 1248-1259.

Snijder, M.B., Dekker, J.M., Visser, M., Yudkin, J.S., Stehouwer, C.D., Bouter, L.M., Heine, R.J., Nijpels, G., and Seidell, J.C. (2003). Larger thigh and hip circumferences are associated with better glucose tolerance: the Hoorn study. *Obes Res* 11, 104-111.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-787.

Speakman, J.R., and Keijer, J. (2014). Not so nuanced: Reply to the comments of Gaskill and Garner on 'Not so hot: Optimal housing temperatures for mice to mimic the environment of humans'. *Mol Metab* 3, 337.

Stephens, J.M., and Pekala, P.H. (1992). Transcriptional Repression of the C/Ebp-Alpha and Glut4 Genes in 3t3-L1 Adipocytes by Tumor-Necrosis-Factor-Alpha - Regulation Is Coordinate and Independent of Protein-Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 267, 13580-13584.

Susulic, V.S., Frederick, R.C., Lawitts, J., Tozzo, E., Kahn, B.B., Harper, M.E., Himms-Hagen, J., Flier, J.S., and Lowell, B.B. (1995). Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 270, 29483-29492.

Tan, B.K., Hallschmid, M., Adya, R., Kern, W., Lehnert, H., and Randeve, H.S. (2011). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) in human cerebrospinal fluid: relationship with plasma FGF21 and body adiposity. *Diabetes* 60, 2758-2762.

Tavian, D., Missaglia, S., Redaelli, C., Pennisi, E.M., Invernici, G., Wessalowski, R., Maiwald, R., Arca, M., and Coleman, R.A. (2012). Contribution of novel ATGL missense mutations to the clinical phenotype of NLS-D-M: a strikingly low amount of lipase activity may preserve cardiac function. *Hum Mol Genet* 21, 5318-5328.

Tchkonina, T., Lenburg, M., Thomou, T., Giorgadze, N., Frampton, G., Pirtskhalava, T., Cartwright, A., Cartwright, M., Flanagan, J., Karagiannides, I., et al. (2007). Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E298-307.

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.

Townsend, L.K., Knuth, C.M., and Wright, D.C. (2017). Cycling our way to fit fat. *Physiol Rep* 5.

Trayhurn, P., and Beattie, J.H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60, 329-339.

Varga, T., Czimmerer, Z., and Nagy, L. (2011). PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1812, 1007-1022.

Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 20, 1868-1876.

Veniant, M.M., Sivits, G., Helmering, J., Komorowski, R., Lee, J., Fan, W., Moyer, C., and Lloyd, D.J. (2015). Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the "Browning" of White Adipose Tissue. *Cell Metabolism* 21, 731-738.

Walden, T.B., Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302, E19-31.

Wang, C.Y., and Liao, J.K. (2012). A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Methods Mol Biol* 821, 421-433.

Wang, T., Zang, Y., Ling, W., Corkey, B.E., and Guo, W. (2003). Metabolic partitioning of endogenous fatty acid in adipocytes. *Obes Res* 11, 880-887.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.

Wente, W., Efanov, A.M., Brenner, M., Kharitonov, A., Koster, A., Sandusky, G.E., Sewing, S., Treinies, I., Zitzer, H., and Gromada, J. (2006). Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes* 55, 2470-2478.

Wicker, T., Robertson, J.S., Schulze, S.R., Feltus, F.A., Magrini, V., Morrison, J.A., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Peterson, D.G., Paterson, A.H., et al. (2005). The repetitive landscape of the chicken genome. *Genome Res* 15, 126-136.

Wolfgang, M.J., Kurama, T., Dai, Y., Suwa, A., Asami, M., Matsumoto, S., Cha, S.H., Shimokawa, T., and Lane, M.D. (2006). The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *P Natl Acad Sci USA* 103, 7282-7287.

Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., and Schwartz, M.W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280, 1378-1383.

Woodyatt, R.T. (1921). Objects and method of diet adjustment in diabetes. *Arch Intern Med* 28, 125-141.

Wu, A.L., Kolumam, G., Stawicki, S., Chen, Y.M., Li, J., Zavala-Solorio, J., Phamluong, K., Feng, B., Li, L., Marsters, S., et al. (2011). Amelioration of Type 2 Diabetes by Antibody-Mediated Activation of Fibroblast Growth Factor Receptor 1. *Sci Transl Med* 3.

Wu, J., Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 27, 234-250.

Xiao, C., Goldgof, M., Gavrilova, O., and Reitman, M.L. (2015). Anti-obesity and metabolic efficacy of the beta3-adrenergic agonist, CL316243, in mice at thermoneutrality compared to 22 degrees C. *Obesity (Silver Spring)* 23, 1450-1459.

Xu, J., Bussiere, J., Yie, J.M., Sickmier, A., An, P., Belouski, E., Stanislaus, S., and Walker, K.W. (2013). Polyethylene Glycol Modified FGF21 Engineered to Maximize Potency and Minimize Vacuole Formation. *Bioconjugate Chem* 24, 915-925.

Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y.Y., Hager, T., Patel, J., Ge, H., Weiszmann, J., Lu, S.C., Graham, M., et al. (2009). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models--association with liver and adipose tissue effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E1105-1114.

Yang, W.S., Lee, W.J., Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C.L., Chen, C.L., Tai, T.Y., and Chuang, L.M. (2001). Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3815-3819.

Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kayahara, T., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., and Saito, M. (2013). Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest* 123, 3404-3408.

Zwick, R.K., Guerrero-Juarez, C.F., Horsley, V., and Plikus, M.V. (2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab* 27, 68-83.