

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze  
Katedra buněčné biologie

Diplomová práce

**Vztah n-3 polynenasycených mastných  
kyselin a buněčných senzorů  
energetického stavu AMPK a SIRT1**



**Petr Zouhar**

Školitel: RNDr. Pavel Flachs, Ph.D.

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.  
Oddělení biologie tukové tkáně



Fyziologický ústav  
Akademie věd  
České republiky

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval sám pod vedením RNDr. Pavla Flachse Ph.D. na Fyziologickém ústavu AV ČR, v. v. i. za použití uvedených literárních pramenů.

V Praze dne 11.3.2010

.....

Petr Zouhar

Děkuji svému školiteli RNDr. Pavlu Flachsovi Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Dále chci poděkovat MuDr. Janu Kopeckému DrSc. i všem ostatním členům Oddělení biologie tukové tkáně FgÚ AV ČR za poskytnutou pomoc a přátelské prostředí v laboratoři. Děkuji i všem dalším osobám, které mi pomohly se zvládnutím některých metod. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu a vytvoření pevného zázemí během mého studia.

Práce byla financována z výzkumného projektu MŠMT ČR (1M6837805002) a GAČR (303/08/0664). Další podpora byla poskytnuta firmou EPAX AS (Norsko) a výzkumným projektem AVOZ 50110509.

# 1 Obsah

<b>1</b>	<b>Obsah.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Abstrakt.....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>Klíčová slova .....</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>6</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>10</b>
6.1	Energetický metabolismus .....	10
6.2	Hormonální řízení metabolismu .....	12
6.2.1	<i>Regulace metabolismu ve stresovém stavu.....</i>	<i>13</i>
6.2.2	<i>Glukagon a inzulín .....</i>	<i>14</i>
6.2.3	<i>Inkretiny .....</i>	<i>15</i>
6.2.4	<i>Leptin a ghrelin .....</i>	<i>16</i>
6.2.5	<i>Adiponektin a další adipokiny.....</i>	<i>17</i>
6.3	Transkripční faktory a koaktivátory .....	17
6.3.1	<i>Rodina PPAR a další jaderné receptory .....</i>	<i>18</i>
6.3.2	<i>NRF-1 – řízení mitochondriální biogeneze .....</i>	<i>19</i>
6.3.3	<i>PGC-1<math>\alpha</math> – uzlový bod buněčného katabolismu .....</i>	<i>19</i>
6.4	Senzory energetického stavu buňky .....	20
6.4.1	<i>AMP aktivovaná kináza (AMPK) .....</i>	<i>20</i>
6.4.2	<i>SIRT1 .....</i>	<i>23</i>
6.4.3	<i>Vzájemné působení AMPK a SIRT1 .....</i>	<i>25</i>
6.5	Polynenasycené mastné kyseliny řady n-3 .....	27
6.5.1	<i>Lipidové mediátory - PUFA a zánět.....</i>	<i>29</i>
6.5.2	<i>Ovlivnění jaderných receptorů.....</i>	<i>30</i>
6.5.3	<i>Interakce mezi n-3 PUFA a adipokiny .....</i>	<i>31</i>
6.5.4	<i>n-3 PUFA a AMPK .....</i>	<i>32</i>
6.6	Shrnutí a cíle diplomové práce .....	33
<b>7</b>	<b>Metody.....</b>	<b>35</b>
7.1	Péče o pokusný materiál.....	35
7.1.1	<i>Práce se zvířecím modelem.....</i>	<i>35</i>
7.1.2	<i>Tkáňové kultury.....</i>	<i>36</i>
7.2	Standardní laboratorní metody .....	37
7.2.1	<i>Měření koncentrace DNA.....</i>	<i>37</i>
7.2.2	<i>Měření koncentrace proteinů .....</i>	<i>39</i>
7.2.3	<i>Izolace RNA.....</i>	<i>41</i>
7.3	Kvantitativní RT PCR v reálném čase .....	42
7.3.1	<i>Reverzní transkripce.....</i>	<i>42</i>
7.3.2	<i>Kvantitativní PCR v reálném čase .....</i>	<i>43</i>
7.4	Izolace adipocytů.....	48
7.5	Měření spotřeby kyslíku kyslíkovou elektrodou .....	49
7.6	Spektrofotometrické stanovení obsahu mitochondrií v tkáňovém homogenátu .....	53
7.6.1	<i>Příprava membránové frakce.....</i>	<i>53</i>
7.6.2	<i>Stanovení obsahu cytochromů v tukové tkáni pseudo-duální spektrofotometrií .....</i>	<i>54</i>
7.6.3	<i>Stanovení aktivity cytochrom oxidázy v tukové tkáni .....</i>	<i>56</i>
7.7	Měření oxidace mastných kyselin .....	57
7.8	Statistické vyhodnocení.....	58

7.9	Seznam přístrojů a chemikálií .....	58
7.9.1	<i>Přístroje</i> .....	58
7.9.2	<i>Chemikálie</i> .....	59
<b>8</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>61</b>
8.1	Zavádění metody spektrofotometrického stanovení cytochromů v tukové tkáni ....	61
8.2	Zavádění modelu AMPK $\alpha$ KO MEF .....	63
8.2.1	<i>Experiment 1 – ověřování genotypu buněčné linie</i> .....	63
8.2.2	<i>Experiment 2 – Měření mitochondriální oxidace</i> .....	63
8.2.3	<i>Experiment 3 – Oxidace mastných kyselin stimulovaná aktivátorem AICAR</i> ..	64
8.2.4	<i>Experiment 4 - Oxidace mastných kyselin stimulovaná resveratrolem</i> .....	65
8.3	Pokusy s AMPK $\alpha$ 1 -/- myši – měření genové exprese v gonadálním tukovém depu .....	66
8.4	Měření genové exprese u SIRT1 +/- myši .....	68
8.5	Pokus s kombinací vlivu n-3 PUFA a kalorické restrikce .....	69
8.5.1	<i>Průběh pokusu</i> .....	69
8.5.2	<i>Měření spotřeby kyslíku permeabilizovaných adipocytů</i> .....	71
8.5.3	<i>Spektrofotometrická stanovení kapacity mitochondrií v tukové tkáni</i> .....	73
<b>9</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>75</b>
9.1	Měření obsahu cytochromu b v membránové frakci tukové tkáně .....	75
9.2	Tkáňové kultury AMPK $\alpha$ KO myších embryonálních fibroblastů .....	76
9.3	Pokusy s AMPK $\alpha$ 1 -/- myším modelem .....	78
9.4	Pokusy se SIRT1 +/- myším modelem.....	80
9.5	Kalorická restrikce v kombinaci s n-3 PUFA .....	81
<b>10</b>	<b>Závěry</b> .....	<b>84</b>
<b>11</b>	<b>Seznam obrázků a tabulek</b> .....	<b>85</b>
11.1	Obrázky .....	85
11.2	Tabulky.....	85
<b>12</b>	<b>Použitá literatura</b> .....	<b>86</b>
<b>13</b>	<b>Příloha</b> .....	<b>94</b>

## 2 Abstrakt

Při regulaci metabolických procesů hrají významnou roli regulační proteiny schopné zpětnovazebně reagovat na energetický stav buňky. Velká pozornost je věnována AMP aktivované kináze (AMPK) a NAD<sup>+</sup> aktivované deacetyláze SIRT1. Tyto enzymy spolu vzájemně interagují a jejich stimulace vede mj. k aktivaci mitochondriální biogeneze a oxidace mastných kyselin. Díky tomu působí příznivě proti rozvoji komplikací spojených s obezitou, inzulinovou rezistencí a stárnutím. Hladovění, fyzická námaha i některé antidiabetogenní léky působí prostřednictvím těchto regulátorů.

Polynenasycené mastné kyseliny řady n-3 (n-3 PUFA) jsou rovněž známy svými účinky na mitochondriální biogenezi a  $\beta$ -oxidaci. Z předchozích výsledků naší laboratoře vyplývá, že příjem vysoké dávky n-3 PUFA v potravě vede ke zvýšení aktivity AMPK v bílé tukové tkáni. Data, prezentovaná v této diplomové práci, navíc dokládají, že SIRT1 je nezbytný pro zvýšení exprese genů, jež se podílejí na regulaci  $\beta$ -oxidace (PPAR $\alpha$  a další) v reakci na n-3 PUFA. n-3 PUFA dále zlepšují synergisticky v kombinaci s kalorickou restrikcí metabolický profil. Děje se tak pravděpodobně skrze aktivaci SIRT1/AMPK/PGC-1 $\alpha$  signalizační kaskády specificky v bílém tuku.

The regulatory proteins, which are able to react to energetic state of the cell by feed-back mechanism, are important factors in regulation of metabolic processes. Big attention is focused on the AMP activated kinase (AMPK) and the NAD<sup>+</sup> activated deacetylase SIRT1. These enzymes interact together and their stimulation increases mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation. Due to this fact they function beneficially against the onset of obesity, insulin resistance and ageing. Fasting, exercise and some antidiabetogenic drugs act through these regulators.

n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) are also believed to be beneficial because of their stimulative effects on mitochondrial biogenesis and  $\beta$ -oxidation. Our previous work has showed that intake of higher doses of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in diet leads to increase of AMPK activity in white adipose tissue. New results presented in this thesis show that SIRT1 is essential for increase of  $\beta$ -oxidation stimulators (PPAR $\alpha$  etc) expression in response to n-3 PUFA in diet. n-3 PUFA also improve the metabolic profile synergistically in combination with calorie restriction. It occurs probably through the activation of SIRT1/AMPK/PGC-1 $\alpha$  regulatory pathway.

## 3 Klíčová slova

n-3 polynenasycené mastné kyseliny, AMP-aktivovaná kináza, SIRT1, kalorická restrikce

n-3 polyunsaturated fatty acids, AMP-activated kinase, SIRT1, calorie restriction

## 4 Seznam zkratek

AA	kyselina arachidonová
ADP, AMP	adenosin difosfát, adenosin monofosfát
AMPK	AMP aktivovaná protein kináza
AMPK $\alpha$ KO MEF	model myších embryon. fibroblastů s inaktivací obou $\alpha$ -podjednotek AMPK
AMPK $\alpha$ 1 -/-	model myši s inaktivovanou $\alpha$ 1-podjednotkou AMPK
ATP	adenosin trifosfát
BSA	hovězí sérový albumín ( <i>bovine serum albumine</i> )
cDNA	produkt reverzní transkripce (komplementární DNA)
cHF	vysokotuká dieta ( <i>composite high-fat diet</i> )
cHF+F	vysokotuká dieta s přidavkem n-3 PUFA ( <i>composite high-fat diet + fish oil</i> )
CoA	koenzym A
CR	kalorická restrikce ( <i>calorie restriction</i> )
DAG	diacylglycerol
DHA	kyselina dokosahexaenová
D-MEM	bezsérové médium pro tkáňové kultury
DMSO	dimethylsulfoxid
EPA	kyselina eikosapentaenová
FAD (FADH <sub>2</sub> )	flavin adenin dinukleotid (redukovaná forma FADH <sub>2</sub> )
FCCP	karbonyl kyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon (ionofor)
GPDH	glycerolfosfát dehydrogenáza
HSL	hormon senzitivní lipáza
FFA	volné mastné kyseliny ( <i>free fatty acids</i> )
FBS	fetální sérum ( <i>fetal bovine serum</i> )
KO	vyřazený gen, zvířecí model / buněčná linie s vyřazeným genem ( <i>knock out</i> )
LPL	lipoprotein lipáza
NAD <sup>+</sup> (NADH)	nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma NAD <sup>+</sup> )
PBS	fyzilogický roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PUFA	polyenasycené mastné kyseliny ( <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
SIRT1	histon deacetyláza SIRT1
SIRT1 +/-	model heterozygotní myši s inaktivací jednoho lokusu SIRT1
TG	triglyceridy (triacylglyceroly)
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-fenylendiamin
VLDL	lipoproteinové částice o velmi nízké hustotě ( <i>very low density lipoproteins</i> )

## 5 Úvod

V posledním století došlo v západní společnosti k dramatické proměně zdravotního stavu populace. Díky kvalitní lékařské péči se podařilo významně omezit nebezpečnost někdejších metel lidstva, mezi něž patřily zejména infekční choroby. Střední délka života člověka díky tomu zásadně vzrostla. To však spolu s úbytkem fyzické námahy a zvýšením kalorického příjmu vedlo k masivnímu rozvoji nových, dříve téměř neznámých zdravotních komplikací. V současnosti se již tento trend neomezuje na státy, které jsme si zvykli nazývat rozvinutými, ale objevuje se v zemích celého světa. Morbidní obezita, hypertenze, kardiovaskulární poruchy a necitlivost k inzulínu (shrnované pod společné označení metabolický syndrom) si začínají vybírat svou daň i v zemích typu Mexika nebo Indie. Celosvětový překotný nárůst počtu pacientů trpících těmito onemocněními vyvolává také spekulace o možném vlivu znečištění prostředí a potravních zdrojů těžkými kovy nebo polychlorovanými bifenoly. Fakt, že se obezita stále častěji vyskytuje také u dětí, nás opravňuje k temným předpovědím do budoucna.

Tloustnoucí společnost disponuje dostatkem prostředků, které je ochotna věnovat na výzkum nových možností boje s tímto trendem. Řešení přitom není tak jednoduché, jak by se mohlo zdát. Fyzická aktivita a střídmost v jídle jsou sice účinnou prevencí obezity, aterosklerózy i diabetu druhého typu, ale mají jen omezený efekt na osoby, u nichž už k rozvoji těchto poruch došlo. Metabolismus postižených jedinců není schopen dostatečně flexibilně reagovat na takové zásahy.

Dnes známe hned několik látek, které příznivě působí proti rozvoji metabolického syndromu. Přesný mechanismus jejich účinku je však často zatím neznámý. Mnoho vědeckých týmů pracuje na osvětlení těchto nejasností. Věříme, že lepší porozumění spletité mašinerii řízení energetického metabolismu napomůže při efektivnější aplikaci těchto látek i odhalení nových potenciálních léčiv.

Výše řečené beze zbytku platí o výzkumu polynenasycených mastných kyselin řady n-3 (n-3 PUFA). Známe celou plejádu blahodárných efektů těchto látek, ale mechanismu, jakým působí, dosud detailně nerozumíme. Intenzivně se zkoumá možnost aplikace n-3 PUFA v součinnosti s dalšími prověřenými farmaky a postupy. V poslední době se objevily náznaky, že by snad tyto lipidy mohly přímo regulovat rovnováhu mezi anabolickými a katabolickými buněčnými procesy prostřednictvím tzv. buněčných senzorů energetického stavu, zejména AMP aktivované kinázy (AMPK).



AMPK je představitelem donedávna prakticky neznámých zpětnovazebných regulátorů energetického stavu buňky. Je aktivována vzrůstající hladinou AMP (tedy poklesem energetických zásob) a stimuluje katabolické procesy obnovující hladinu ATP. AMPK je tedy vlastně senzorem energetického stavu buňky. Podobnou roli plní i deacetyláza SIRT1, která je známa díky studiím benefičních účinků kalorické restrikce. Má se za to, že aktivace tohoto enzymu při omezení příjmu potravy vede u laboratorních zvířat k prodlužování života a pozdějšímu nástupu stárnutí.

Výzkum n-3 PUFA je vlajkovou lodí naší laboratoře. V této práci shrnuji výsledky, ke kterým jsem dospěl při studiu vzájemných vztahů mezi n-3 PUFA a těmito senzory energetického stavu buňky (AMPK a SIRT1). Úzce souvisejícím tématem je pak kombinace účinku kalorické restrikce a n-3 PUFA. V rámci své diplomové práce jsem v naší laboratoři mj. zavedl model tkáňových kultur imortalizované linie AMPK $\alpha$ 1,2 -/- myších embryonálních fibroblastů a obnovil jsem práci s několik let nepoužívanou metodou kvantifikace obsahu mitochondrií v tukové tkáni prostřednictvím pseudo-duálního spektrofotometrického stanovení obsahu cytochromu b v membránové frakci.

Výsledky měření obsahu cytochromu b a mitochondriální respirace v tukové tkáni myši pod kombinovaným vlivem kalorické restrikce a n-3 PUFA by se měly stát součástí publikace na toto téma, která se v současnosti v naší laboratoři připravuje.

## 6 Teoretická část

### 6.1 Energetický metabolismus

Organismy jsou z termodynamického hlediska otevřené systémy. Aby mohly udržovat své životní funkce, potřebují neustálý přísun energie. Heterotrofové získávají energii v podobě redukovaných organických látek v potravě. Při postupné oxidaci těchto živin jsou syntetizovány makroergické molekuly, zejména ATP, které pak slouží jako hlavní energetický přenašeč v buňce. Naprostá většina endergonických dějů vyžaduje hydrolýzu ATP. Syntéza ATP je umožněna přísunem energie uvolňované v katabolických (rozkladných) procesech. Tímto způsobem je zajištěn dostatek energie pro základní životní pochody.

Detailní popis biochemických drah podává řada učebnic<sup>1</sup>. Zde se proto omezím jen na připomenutí či shrnutí základních principů, na kterých budu stavět v dalších kapitolách.

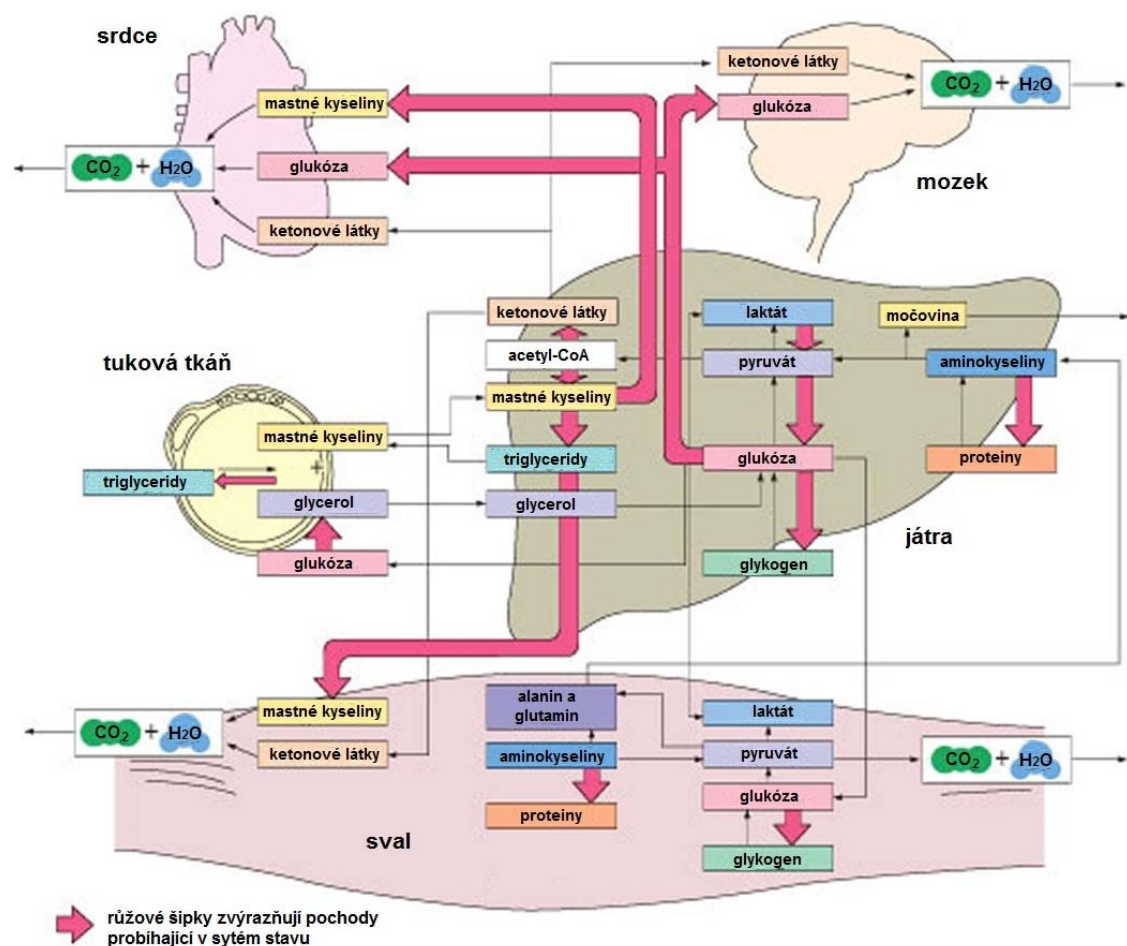
Výchozími organickými látkami pro buněčný katabolismus jsou zejména sacharidy a lipidy. Za podmínek dostatečného přísunu kyslíku jsou látky z obou těchto skupin převáděny na společný meziprodukt acetyl-koenzym A (acetyl-CoA). U sacharidů se tak děje procesem glykolýzy, z lipidů jsou uvolňovány mastné kyseliny a ty se rozkládají v peroxizomech a zejména pak v matrix mitochondrií procesem  $\beta$ -oxidace. Acetyl-CoA prochází citrátovým cyklem a je oxidován až na oxid uhličitý. V průběhu  $\beta$ -oxidace i citrátového cyklu vzniká množství redukovaných přenašečů NADH a  $FADH_2$ .

Za aerobních podmínek odevzdává většina redukovaných elektronových přenašečů své elektrony komplexům dýchacího (respiračního) řetězce na vnitřní mitochondriální membráně. Elektrony jsou mezi komplexy této dráhy předávány ve směru vzrůstajícího redoxního potenciálu až na konečný akceptor, kterým je u aerobních organismů kyslík (přijetím elektronů a protonů je redukován na vodu). Přitom jsou přes membránu pumpovány do mezimembránového prostoru protony. Rozdíl koncentrace protonů mezi oběma stranami membrány (protonový gradient) vyvolává protonmotivní sílu. Membrána je pro protony normálně neprostupná. Proto je protonmotivní sílu možné využít k syntéze ATP, pokud se protony nechají procházet do matrix kanálem  $F_0F_1$  ATPázy (resp. ATP-syntázy), čímž ji pohánějí.

Protonmotivní napětí na vnitřní mitochondriální membráně je však možné "zkratovat" i bez syntézy ATP. K tomuto účelu za fyziologických podmínek slouží odpráhovací proteiny (UCP – uncoupling proteins), které umožňují průchod protonů přes membránu a energii dissipují ve

formě tepla. Např. UCP1 v hnědé tukové tkáni je rozhodujícím hráčem při netřesové termogenezi.

Přísun energetických substrátů není kontinuální. Je proto třeba vytvářet zásobní molekuly pro chvíle nedostatku. Z glukózových jednotek je syntetizován glykogen, mastné kyseliny jsou uloženy ve formě triglyceridů. K ukládání těchto zásobních látek dochází ve specializovaných buňkách. Glykogen je ukládán zejména ve svalech a v játrech. Triglyceridy se vytváří v adipocytech tukové tkáně (tomuto procesu říkáme lipogeneze). Specializaci jednotlivých orgánů k vykonávání určitých metabolických pochodů v nasyceném i hladovém stavu shrnuje obrázek 1.



**Obrázek 1: Orgánová specializace v sytém a hladovém stavu.** Bližší popis v textu. (upraveno podle<sup>2</sup>).

Mozková tkáň vyžaduje stálý přísun glukózy. Už během nočního hladovění je však veškerý glykogen vyčerpán a začínají se odbourávat triglyceridy z tukové tkáně. Lipolýzou triglyceridů vznikají jednak mastné kyseliny, jednak glycerol. Volné mastné kyseliny (FFA) jsou ve vazbě na albumin rozváděny krví do celého těla a představují bohatý zdroj energie pro

většinu tkání (nelze z nich však připravit glukózu). Glycerol je pak z krve vychytáván játry a glukoneogenními pochody převáděn na glukózu pro mozkovou tkáň. Druhým vydatným substrátem pro syntézu glukózy jsou aminokyseliny získávané degradací zejména svalových proteinů. Odbourávání bílkovin by však mohlo v důsledku poškodit základní životní funkce a proto je brzy omezeno. Hladina glukózy klesá a játra začínají metabolizovat acetyl-CoA na ketonové látky, které se stávají náhradním zdrojem energie pro mozek. Zejména v této fázi dochází k intenzivnímu odbourávání triglyceridů. (viz obr. orgánová specializace)

Lipolýza a lipogeneze, glykolýza a glukoneogeneze,  $\beta$ -oxidace a syntéza mastných kyselin jsou v zásadě protisměrné pochody. Jejich vzájemnou vyváženost kontrolují hormony, ale i vnitrobuněčné zpětnovazebné mechanismy. Modelovým příkladem je rovnováha mezi  $\beta$ -oxidací a syntézou mastných kyselin. Oba procesy jsou od sebe odděleny už lokalizací v buňce.  $\beta$ -oxidace probíhá v mitochondriální matrix a aktivované mastné kyseliny tedy musí nejprve projít skrze mitochondriální membránu pomocí karnitinpalmitoyltransferáz (CPT). Limitujícím krokem syntézy mastných kyselin je zase příprava malonyl-CoA enzymem acetyl-CoA karboxylázou (ACC). Malonyl-CoA pak slouží jako prekurzor syntézy acylového řetězce (viz kapitola 3), ale zároveň také inhibuje aktivitu CPT1. Pouhé zvýšení tvorby malonyl-CoA tak vede k inhibici  $\beta$ -oxidace.

## 6.2 Hormonální řízení metabolismu

Součinnost tkání na úrovni celého organismu je sladěna prostřednictvím hormonálního působení. Nejvyšší úroveň představují růstové hormony hypothalamu a thyroïdní hormony, které řídí základní rozhodování mezi růstem a tvorbou zásob. Stresový stav je do celotělového metabolismu promítán prostřednictvím systému hormonů nadledvin. Dlouhodobé působení stresu ovlivňuje sekreci kortizolu, zatímco náhlý stresový podnět působí na energetické zásoby prostřednictvím adrenalinu. Základní regulaci vytváření a uvolňování zásob lipidů a sacharidů zajišťuje systém pankreatických hormonů glukagonu a inzulínu. Sekrece inzulínu a glukagonu je pak řízena celou řadou dalších hormonů, mezi něž patří např. adrenalin a inkretiny. Citlivost tkání k účinku inzulínu je zase ovlivňována působením hormonů vylučovaných z tukové tkáně, z nichž některé (leptin) plní i funkci dlouhodobého regulátoru příjmu potravy. O hormonálním řízení metabolismu se podrobněji zmiňují souhrnné práce např.<sup>3</sup>.

### 6.2.1 Regulace metabolismu ve stresovém stavu

Základním faktorem ovlivňujícím metabolismus v dlouhodobém měřítku je stres. Ve stresovém stavu se na regulaci metabolismu podílí zejména hormony kortizol a adrenalin. Kortizol patří mezi glukokortikoidy ze skupiny steroidních hormonů a je vylučován kůrou nadledvin. Jeho úkolem je zvyšovat pohotovost organismu ve stresových situacích. Setrvalá sekrece je pak příznakem chronického stresu. Kortizol stimuluje produkci glukózy v játrech. Uvolněná glukóza je uchovávána jako substrát pro nervovou soustavu a její příjem do svalu je omezován. Kortizol mobilizuje energetické zásoby a jeho efekt je provázán s účinkem adrenalinu, který má však spíše okamžitý, krátkodobý účinek.

Adrenalin patří mezi hormony ze skupiny katecholaminů a je tedy derivátem aminokyseliny tyrozinu. Je vylučován dřením nadledvin a slouží jako hormon rychlé stresové reakce. Kromě toho je to i klíčový neurotransmitter sympatického systému. Jeho úkolem je mobilizovat energetické rezervy pro útokovou nebo útekovou reakci ("*fight or flight*"). K tomu je nutné zajistit dostatek energetických substrátů v krvi.

Adrenalin účinkuje prostřednictvím adrenergických receptorů, které se dělí do dvou skupin:  $\alpha$  a  $\beta$ .  $\alpha$ -receptory mají nižší afinitu k adrenalinu, takže ten působí v nižších koncentracích zejména skrze  $\beta$ -receptory. Všechny receptory pro adrenalin jsou spřezané s G proteiny,  $\alpha_1$  receptor však dále signalizuje prostřednictvím tzv. druhých posílů inozitoltrifosfátu a diacylglycerolu, zatímco receptory  $\alpha_2$  a  $\beta$  zvyšují hladinu cAMP podobně jako glukagon.

V játrech stimuluje adrenalin glukoneogenezi prostřednictvím  $\alpha_1$  receptoru a glykogenolýzu skrze  $\beta$  receptory. Obojí přispívá k zvýšení glykémie. V tukové tkáni je zase podporováno odbourávání triglyceridů, které zajišťuje dostupnost FFA. Ve svalu je podobně jako v játrech navozena prostřednictvím  $\beta$  receptorů glykogenolýza, ale na rozdíl od reakce na působení kortizolu je výsledná glukóza poté přímo odbourávána glykolýzou, aby se zajistil dostatek ATP pro případnou akci.

Kromě těchto přímých efektů působí adrenalin také prostřednictvím regulace sekrece pankreatických hormonů. Snižuje vylučování inzulínu a podporuje exocytózu váčků s glukagonem.

$\beta$ -adrenergní signalizace navíc prostřednictvím cAMP, PKA a CREB stimuluje expresi PGC-1 $\alpha$  a tedy i mitochondriální biogenezi (viz níže).

## 6.2.2 Glukagon a inzulín

Peptidické hormony slinivky břišní jsou základními regulátory glykémie a obecněji metabolismu cukrů a tuků. Glukagon je vylučován  $\alpha$ -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu ve chvílích, kdy poklesne hladina krevního cukru a nastává hladovění. Váže se na receptory spojené s G-proteinem a prostřednictvím zvýšení hladiny cAMP a aktivity proteinkinázy A stimuluje mobilizaci energetických zásob: v játrech se spouští glykogenolýza a glukoneogeneze, které zajišťují dostatek glukózy v krevním řečišti. V tukové tkáni je pak aktivována hormon-senzitivní lipáza (HSL) a lipáza ATGL<sup>4</sup>, které štěpí TG na glycerol a FFA. Jak už bylo řečeno, glycerol slouží v játrech jako výchozí látka glukoneogeneze, zatímco z FFA jsou vyráběny ketonové látky.

Pokud hladina glukózy v krvi naopak stoupne, začnou  $\beta$ -buňky Langerhansových ostrůvků vylučovat hormon nadbytku - inzulín. Ten aktivuje receptorovou tyrozinkinázu a poté skrze fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K) aktivuje proteinkinázy z rodiny PDK (phosphatidylinositid protein kinases) a proteinkinázu B (PKB nebo též Akt). V tukové tkáni Akt aktivuje fosfodiesterázu 3B<sup>5</sup>, která snižuje koncentraci cAMP a touto cestou blokuje činnost HSL. To má za následek převahu lipogeneze nad lipolýzou a tedy tvorbu zásobních TG. Pro tvorbu TG je ovšem nutná i výroba glycerolu, který vzniká glykolytickou drahou z glukózy. Proto je dalším nezbytným procesem podílejícím se na řízení lipogeneze příjem glukózy do tukové buňky. I ten je stimulován inzulínem, podobně jako příjem glukózy v ostatních periferních tkáních (zejména svalu).

V játrech zase dochází ke stimulaci syntézy glykogenu. Glukoneogeneze je naopak inhibována. Za podmínek vyšší glykémie jsou rovněž mastné kyseliny v játrech převáděny na TG a poté transportovány krví do tukové tkáně v podobě lipoproteinových částic o velmi nízké hustotě (VLDL). Zároveň inzulín inhibuje vylučování glukagonu  $\alpha$ -buňkami.

Inzulín a zvláště pak jemu příbuzné cytokiny IGF-1 a IGF-2 (*insulin-like growth factors*) ovlivňují rovněž proteosyntézu a buněčný růst. Za tyto účinky je odpovědná kináza mTOR (*mammalian target of rapamycin*), která je aktivována prostřednictvím PKB. PKB zároveň vyřazuje z činnosti TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), který působí jako inhibitor mTOR. (Inoki 2002) mTOR pak následně reguluje iniciaci translace proteinů na ribozomech.

### 6.2.2.1 *Inzulínová rezistence*

S nedostatečnou citlivostí periferních tkání k účinku inzulínu (tzv. inzulínovou rezistencí, IR) souvisí rozvoj závažného onemocnění diabetes mellitus 2. typu, které je spojeno s řadou dalších zdravotních komplikací.

V játrech necitlivých k účinku inzulínu neustále probíhá glukoneogeneze a glukóza je vylučována do krve. Glykémie stoupá, ale navzdory tomu trpí periferní tkáně hladem, protože bez stimulace inzulínem nemohou glukózu importovat přes membránu. Rovněž schází inhibice lipolýzy v tukové tkáni. Z uvolněných FFA se v játrech  $\beta$ -oxidací tvoří nadměrné množství ketonových látek, normálně typických pro pozdější fáze hladovění. Protože jsou ketonové látky de facto kyseliny, klesá pH krve. Ledviny se snaží udržet homeostázi vylučováním přebytečných protonů, které však následuje i voda, což vede k dehydrataci organismu. Do moče se dostává i glukóza. Zvýšená glykémie navíc přispívá k zvýšení pravděpodobnosti neenzymatických glykací různých enzymů, čímž bývá narušena jejich funkce. Pankreas zprvu kompenzuje sníženou účinnost inzulínu jeho nadprodukcí, postupně však selhává a sekrece inzulínu je ukončena. Pokročilý neléčený diabetes končí smrtí.

Přesný mechanismus navození inzulínové rezistence není dosud znám. Objevuje se zpravidla ve vyšším věku a bývá spojená s abdominální obezitou. Má se zato, že klíčovou roli při rozvoji IR hraje přetížení tukové tkáně. U obézních jedinců jsou adipocyty hypertrofované a nejsou schopny přijímat nadbytečné lipidy z krve. Naopak v nich dochází k lipolýze a přebytečné FFA se mohou shromažďovat v podobě TG v ostatních tkáních, zejména v kosterním svalu a v játrech. Toto ektopické hromadění lipidů pak různými mechanismy narušují inzulínovou signalizaci a vedou tak k IR (konkrétní mechanismy viz obr.). Podobné příznaky pozorujeme i u pacientů, kteří mají počet adipocytů výrazně snížen.<sup>6</sup> To potvrzuje teorii, podle které je pro správnou funkci inzulínové signální dráhy nutná přítomnost dostatečného množství malých adipocytů, které mohou sloužit jako pufr koncentrace lipidů v krvi.

Obezita je stavem mírného chronického zánětu tukové tkáně. Adipocyty produkují některé prozánětlivé faktory (viz dále), které podporují migraci makrofágů do tukové tkáně a jejich přepnutí z antidiabetogenního stavu M2 do stavu M1 navozujícího inzulínovou rezistenci.<sup>7</sup>

### 6.2.3 *Inkretiny*

Další skupinou hormonů, které ovlivňují hladinu glukózy v krvi, jsou tzv. inkretiny, tedy látky produkované gastrointestinálním traktem a ovlivňující sekreci pankreatických hormonů. Zahrnujeme sem dva izolované a popsání peptidy: GIP (gastric inhibitory peptide, resp.

glucose-dependent insulinotropic peptide) a GLP-1 (glucagon-like peptide). Obě tyto látky snižují glykémii podporou vylučování inzulínu a inhibicí sekrece glukagonu. Jsou proto nadějným léčivem při diabetu. Dávky inkretinových mimetik se vpravují do těla injekčně. Prvním z takovýchto farmak byl exenatid, což je syntetická forma exendinu-4 ze slin korovce jedovatého (*Heloderma suspectum*).

Jak GIP, tak GLP-1 jsou však v těle velice rychle inaktivovány působením dipeptidyl peptidázy 4 (DPP-4). Odštěpením jediné dvojice aminokyselin z N-konce inkretinu ztrácí hormon svou aktivitu. Proto jsou v centru zájmu farmaceutů rovněž specifické inhibitory DPP-4, které mají tu výhodu, že je lze podávat orálně.

#### 6.2.4 Leptin a ghrelin

Leptin je produkován tukovou tkání a plní úkol jakéhosi zpětnovazebného mechanismu regulace velikosti tukových dep. Je totiž vylučován přímo úměrně k velikosti tukové tkáně a prostřednictvím centra hladu v hypothalamu inhibuje kalorický příjem. V hypothalamu působí skrze snižování hladiny neuropeptidu Y a zvýšení sekrece melanocyty stimulujícího hormonu  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH), čímž snižuje chuť k jídlu a reguluje tělesnou hmotnost. Tím je zajištěno, že při expanzi tukové tkáně dojde k omezení příjmu potravy, což opět vrátí tukové zásoby na původní hodnotu.

Opačné (tentokrát orexigenní) působení než leptin má v hypothalamu tkáňový hormon žaludeční stěny ghrelin. Protikladné účinky ghreluinu a leptinu na hypothalamus jsou důležitým regulátorem příjmu potravy.

Hypothalamus krom toho v reakci na stimulaci leptinem pomocí sympatického nervstva a adrenergních receptorů podporuje katabolismus v ostatních tkáních, zejména ve svalu. Leptin však účinkuje prostřednictvím svého receptoru v periferních tkáních i přímo. Bylo zjištěno, že touto cestou i přímo přes vlastní receptor stimuluje oxidaci mastných kyselin<sup>8</sup>. Takto jsou odbourávány mastné kyseliny, které by v játrech a svalu mohly působit lipotoxicky a navozovat IR. S tím souvisí i inhibice enzymu SCD-1 (stearoyl-CoA desaturáza 1), který je klíčovým prvkem při syntéze mononenasyčených mastných kyselin. Leptin tedy současně podporuje katabolismus mastných kyselin a na druhé straně inhibuje jejich syntézu. Výsledkem je antidiabetogenní působení. IR bývá spojena rovněž s leptinovou rezistencí a zvýšenými hladinami leptinu v krvi<sup>9</sup>.

Rovněž ghrelin přímo ovlivňuje i metabolismus ostatních tkání. Má anabolický účinek na tukovou a jaterní tkáň, kde podporuje tvorbu TG<sup>10</sup>. Ghrelin je tak typickým hormonem



vyvolávajícím tvorbu energetických zásob. Zvyšuje chuť k jídlu a podporuje apetit. Jeho hladina v krevním oběhu klesá po přijetí potravy. Obézní jedinci mají naopak hladinu ghrelinu trvale sníženou.

### 6.2.5 Adiponektin a další adipokiny

Vedle leptinu produkuje tuková tkáň další parakrinně i endokrinně působící látky. Tuková tkáň tedy není jen pasivním úložištěm TG, ale prostřednictvím svých hormonů – adipokinů – výrazně ovlivňuje celotělový metabolismus. Některé adipokiny vyvolávají zánět, jiné působí protizánětlivě, další se podílejí na řízení celotělového metabolismu a energetické homeostáze. Rozhodující vliv na tělový metabolismus mají zejména již výše zmíněný leptin a adiponektin. Dalším adipokinem s výrazně antidiabetogenním účinkem je adiponektin. V krvi se vyskytuje v několika formách: buď jako trimer, hexamer, oligomer nebo globulární forma vzniklá proteolytickým štěpením, která může rovněž trimerizovat. Největší účinnost má vysokomolekulární oligomerní forma. Již malé snížení tělesné hmotnosti má za následek výrazný posun ve složení jednotlivých forem ve prospěch vysokomolekulárního adiponektinu. Podobně jako leptin i adiponektin působí skrze AMPK<sup>11</sup>.

Dalšími antidiabetogenními hormony jsou omentin a visfatin. Visfatin by přitom měl vazbou na inzulínový receptor zvyšovat účinnost vazby inzulínu<sup>12</sup>. Zda je tato funkce fyziologická však zůstává otázkou. Krom toho má ještě enzymatickou aktivitu ovlivňující funkci deacetylázy SIRT1 (viz dále).

Naproti tomu ovšem hypertrofovaná tuková tkáň produkuje celou řadu prozánětlivých cytokinů. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) přispívá k infiltraci makrofágů do tukové tkáně<sup>13</sup>. Další látky v čele s TNF $\alpha$  (tumour necrosis factor  $\alpha$ ) a interleukinem 6 poté přispívají k přechodu makrofágů ze stavu M2 do zánětlivého stavu M1. Tím dochází k chronickému zánětu tukové tkáně, který je spojen se vznikem IR.

## 6.3 Transkripční faktory a koaktivátory

Vyváženost katabolických a anabolických procesů v každé buňce musí být precizně regulována a to hned na několika úrovních. Protichůdné procesy se mnohdy vzájemně přímo inhibují, jak bylo ukázáno v kapitole 5.1 na příkladu  $\beta$ -oxidace a syntézy mastných kyselin. Jiné metabolické dráhy však na sebe navazují a potom je nutné zajistit jejich synchronizaci.

Konkrétně např. nestačí stimulovat  $\beta$ -oxidaci, pokud nebude současně zajištěna zvýšená aktivita respiračního řetězce, který regeneruje elektronové přenašeče  $\text{NAD}^+$  a FAD. Expresi jednotlivých enzymů ovlivňují transkripční faktory. Na soulad jejich aktivit pak dohlížejí transkripční koaktivátory.

### 6.3.1 Rodina PPAR a další jaderné receptory

Obzvláště významnou roli při řízení energetického metabolismu hrají intracelulární receptory hormonů procházejících cytoplazmatickou membránou – nukleární receptory. Z této skupiny jsou velmi důležité receptory výše zmiňovaných thyroïdních hormonů (TR). Nukleární receptory heterodimerizují a váží se přímo na DNA, kde pak mohou iniciovat vznik transkripčního komplexu. Součástí většiny takových heterodimerů je retinoidní X receptor.

Kromě klasických hormonů mohou být některé nukleární receptory aktivované i vazbou jiných látek, např. mastných kyselin (viz dále). Z tohoto hlediska jsou zajímavou skupinou jaderných receptorů zejména receptory z rodiny PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*). Všichni členové rodiny PPAR heterodimerizují s retinoidním X receptorem (RXR) a v této podobě se váží do příslušného promotoru obsahujícího PPRE (*peroxisome proliferator hormone response element*). Konsenzuální sekvence PPRE je AGGTCA<sub>2</sub>XAGGTCA<sub>2</sub>, přičemž X představuje náhodný nukleotid.

V různých tkáních hrají jednotliví členové rodiny PPAR různě významné role. V játrech je nejdůležitější PPAR $\alpha$ . Ten zvyšuje expresi enzymů  $\beta$ -oxidace a ketogeneze jako je např. CPT1, nutná pro vstup mastných kyselin do mitochondrie. PPAR $\beta$  (též označovaný za PPAR  $\delta$ ) byl zjištěn ve většině tkání a orgánů. Podílí se na diferenciaci svalů, kůže, tukové tkáně i nervového systému. PPAR $\gamma$  (zejména sestříhová varianta PPAR $\gamma$ 2) je majoritně zastoupen v tukové tkáni. Je důležitý při její diferenciaci a v multilokulárních adipocytech reguluje odpřažení oxidativní fosforylace přes odpřahovací protein 1 (UCP1 - *uncoupling protein 1*). (viz výše).

PPAR $\alpha$  dal celé rodině jméno. Při výzkumech účinků hypolipidemických farmak ze skupiny fibrátů totiž tato molekula zprostředkovávala nárůst počtu peroxizomů. Významným cílem léčebných zásahů zůstávají PPAR i nadále: PPAR $\gamma$  je aktivován antidiabetickými léčivy thiazolidinediony (TZD). Krom toho se na PPAR váží i leukotrieny, prostaglandiny a některé volné mastné kyseliny (viz níže).

Kromě PPAR jsou při řízení transkripce enzymů energetického metabolismu významné další jaderné receptory. ERR $\alpha$  (*estrogen-related receptor  $\alpha$* ) mimo jiné kontroluje expresi

dehydrogenázy středně dlouhých acyl-CoA (MCAD - *medium chain acyl-CoA dehydrogenase*) - významného enzymu  $\beta$ -oxidace. Mastné kyseliny se mohou vedle PPAR vázat rovněž na jaterní X receptory (LXR) a jaterní nukleární faktor 4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ).

### 6.3.2 NRF-1 – řízení mitochondriální biogeneze

Dýchací řetězec je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně. Některé podjednotky jeho komplexů jsou kódovány v mitochondriální DNA, většina genů je však uložena v jádře. Důležitost vyrovnané exprese všech složek je zde proto obzvlášť dobře patrná. Klíčovou roli při jejím zajišťování hraje zejména transkripční faktor NRF1 (*nuclear respiratory factor 1*). V jádře tento transkripční faktor ovlivňuje expresi celé řady mitochondriálních enzymů: podjednotek respiračního řetězce, enzymů biosyntézy hemu i transportérů různých sloučenin přes vnitřní mitochondriální membránu.

Vedle toho však NRF1 řídí i expresi genů POLRMT, Tfam, TFB1M a TFB2M, které jsou nezbytné pro expresi mitochondriálních proteinů<sup>14</sup>. POLRMT představuje gen pro mitochondriální RNA polymerázu. Tfam, TFB1M a TFB2M jsou mitochondriální transkripční faktory, přičemž Tfam (*transcription and mtDNA maintenance factor*) se podílí i na replikaci mtDNA<sup>15</sup>.

Je tedy zřejmé, že NRF1 kontroluje jak mitochondriální, tak nukleární geny pro enzymy dýchacího řetězce.

### 6.3.3 PGC-1 $\alpha$ – uzlový bod buněčného katabolismu

Významným integrativním prvkem působícím na jedné straně na rodinu NRF, na druhé straně na transkripční faktory PPAR a ERR $\alpha$ , jsou koaktivátory z rodiny PGC-1 (*PPAR gamma co-activator 1*). Klíčový je zejména PGC-1 $\alpha$ . Nejprve byla rozpoznána jeho role v termogenezi – prostřednictvím PPAR $\gamma$  totiž stimuluje transkripci odpřahovacího proteinu UCP1 v hnědé tukové tkáni. K efektivní disipaci tepla je ovšem nejprve nutné vytvořit na vnitřní mitochondriální membráně patřičný protonový gradient a je proto pochopitelné, že PGC-1 $\alpha$  působí prostřednictvím transkripčních faktorů NRF na expresi genů dýchacího řetězce. Tato funkce je nedílně spjata se samotnou biogenezí mitochondrií. PGC-1 koaktivátory jsou považovány za ústřední regulátory mitochondriální biogeneze. Další proces odehrávající se v mitochondriích a regulovaný přes PPAR $\alpha$  a ERR $\alpha$  je  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. PGC-1 $\alpha$  se ovšem účastní i regulace dalších metabolických pochodů, např. v játrech (prostřednictvím FOXO1 – *forkhead transcription factor 01*)<sup>15;16</sup>.

Samotná transkripce PGC-1 $\alpha$  pak probíhá v závislosti na vnějších podmínkách (chlad, hladovění) a  $\beta$ -adrenergní signalizaci (viz dále). Aktivitu PGC-1 $\alpha$  ovlivňují rovněž AMP aktivovaná kináza a kalmodulin-dependentní proteinkinázy (CAMK)<sup>17</sup>. Aktivita PGC-1 $\alpha$  je navíc řízena histon-deacetylázou SIRT1.

Dalšími členy rodiny PGC-1 jsou PGC-1 $\beta$  a PRC (PGC-1 $\alpha$  related coactivator). PRC hraje důležitou roli v proliferační fázi vývoje buněk (včetně regulace biogeneze mitochondrií), PGC-1 $\beta$  může suplovat některé funkce PGC-1 $\alpha$ <sup>15</sup>.

## 6.4 Senzory energetického stavu buňky

Vedle vnějšího řízení prostřednictvím působení hormonů má každá živočišná buňka vnitřní zpětnovazebný mechanismus, který sleduje poměr ATP/AMP a NADH/NAD<sup>+</sup> a tím pádem vlastně energetický stav buňky. V případě poklesu zásob ATP nebo NADH dochází ke stimulaci katabolických pochodů, které opět obnoví rovnováhu. Klíčovými enzymy tohoto systému jsou AMP aktivovaná kináza a deacetyláza SIRT1. Tyto regulátory jsou evolučně poměrně konzervované a jejich homology můžeme nalézt už u jednobuněčných eukaryot.

### 6.4.1 AMP aktivovaná kináza (AMPK)

Enzym AMPK je trimerní komplex, který obecně vzato spouští v buňce katabolické procesy produkující ATP a tlumí pochody ATP spotřebovávající v reakci na nárůst koncentrace AMP. Děje se tak jednak prostřednictvím přímé regulace klíčových enzymů, jednak ovlivňováním exprese skrze transkripční faktory a koaktivátory.

U kvasinek je homolog savčí AMPK (nazývaný Snf-1) odpovědný za reakci na nedostatek glukózy<sup>18</sup>. U mechu *Physcomitrella patens* je zase AMPK nezbytná pro růst během temné části dne, kdy nedochází k fotosyntéze<sup>19</sup>. V živočišných tkáních byla jako první prokázána inhibiční fosforylace enzymů ACC (acetyl-CoA karboxyláza, která katalyzuje první krok syntézy mastných kyselin) a HMGR (3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktáza, nezbytná pro syntézu isoprenoidů včetně cholesterolu)<sup>20</sup>. Krom toho AMPK inhibuje i transkripční faktor SRBP-1c (*sterol response element binding protein 1c*) rovněž důležitý pro syntézu lipidů<sup>21</sup>. Dále se má zato, že AMPK inhibuje jaterní glukoneogenezi<sup>22</sup>.

AMPK naopak podporuje katabolické procesy, jako je oxidace mastných kyselin a buněčné dýchání. Už pouhé zablokování činnosti ACC umožní nárůst  $\beta$ -oxidace, protože nevzniká žádný malonyl-CoA, který by inhiboval vstup mastných kyselin do mitochondrií přes CPT1

(viz výše). Kromě toho je známo, že AMPK fosforyluje transkripční koaktivátor PGC-1 $\alpha$ <sup>23</sup>, který pak v součinnosti s transkripčními faktory z rodiny PPAR nebo NRF1 stimuluje expresi genů důležitých pro  $\beta$ -oxidaci i mitochondriální biogenezi.

Poněkud kontraintuitivní je zjištění, že AMPK brzdí lipolýzu v tukové tkáni. Inhibičně totiž fosforyluje Ser565 na HSL a brání tak její aktivaci proteinkinázou A<sup>24</sup>. Tento efekt je vysvětlován skutečností, že za normálních podmínek jsou veškeré nadbytečné FFA v adipocyty esterifikovány na TG. Pokud by se tedy lipolýzou vytvářelo více FFA, než by bylo možné uvolnit do krevního oběhu nebo odbourat v mitochondriích, docházelo by k jalovým cyklům lipolýzy a reesterifikace, což by bylo plýtvání cenným ATP. Proto AMPK inhibuje překotnou lipolýzu a snižuje ji na takovou hladinu, aby stačily být vznikající FFA metabolizovány<sup>25</sup>.

#### 6.4.1.1 Aktivace AMPK

AMPK představuje heterotrimer podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , z nichž každá se vyskytuje v několika izoformách.  $\alpha$  podjednotka má N-terminální kinázovou doménu, zatímco podjednotky  $\beta$  a  $\gamma$  jsou pouze regulační. Podjednotka  $\gamma$  obsahuje čtyři CBS domény (*cystathion beta synthase domains*), které po dvojicích vytvářejí dvě Batemanovy domény. Tyto struktury potom váží AMP a s nižší afinitou rovněž ATP. Vazba ATP další činnost AMPK inhibuje, zatímco vazba AMP zvýší přibližně pětinašobně aktivitu enzymu. Po vazbě AMP navíc dochází ke konformační změně, která vystaví Thr172 v katalytické doméně podjednotky  $\alpha$  působení nadřazených aktivačních kináz. Zároveň s tím klesá afinita  $\alpha$  podjednotky k fosfatázám, které by AMPK opět inhibovaly. Fosforylace Thr172 zvyšuje aktivitu AMPK až stokrát<sup>26</sup>.

Dnes známe dvě nadřazené kinázy AMPK. Jednou z nich je LKB1, která vytváří funkční komplexy s proteiny STRAD a MO25. Kromě AMPK aktivuje ještě asi 12 příbuzných kináz. Je známo, že AMPK funguje jako inhibitor buněčného růstu a proliferace (je aktivována ve chvílích, kdy se nedostává ATP a buněčné dělení tedy není možné). Není proto až tak překvapivé, že LKB1 působí jako antionkogen (*tumor suppressor*). Pokud je v buňce nedostatek ATP, zpřístupní vzrůst hladiny AMP Thr172 kináze LKB1 a AMPK je tak aktivována<sup>27</sup>.

Druhým mechanismem, který patrně hraje roli v některých buněčných typech (jako jsou neurony nebo buňky v glomus caroticum), je signalizace zvýšením intracelulární koncentrace vápenatých iontů, která aktivuje CaMKK (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent kinase kinase*). Přinejmenším některé izoformy tohoto enzymu pak mohou fosforylovat Thr172 na AMPK.

Výlev vápníku do cytoplazmy je většinou spojen se stavy zvýšené spotřeby energie a aktivace AMPK tedy může v těchto situacích dobře posloužit jako pojistka obnovy hladiny ATP<sup>26</sup>.

Farmakologicky lze AMPK aktivovat dodáním 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotidu (AICAR) Tato látka je metabolizována adenzinkinázou za vzniku zvláštního nukleotidu ZMP (AICA monofosfát). ZMP aktivuje AMPK stejným způsobem jako AMP. Již z mechanismu působení tohoto aktivátoru ovšem vyplývá, že jeho účinek není specifický. ZMP ovlivňuje aktivitu i dalších AMP-senzitivních enzymů (např. glykogenfosforylázy a 1,6-bisfosfatázy)<sup>28;29</sup>.

Zvýšit poměr AMP/ATP lze i dalšími způsoby. V naší laboratoři byla v minulosti připravena linie transgenních myši aP2-UCP1, které měly do genomu vnesený gen pro odpráhovací protein UCP1 za promotor aP2 specificky exprimovaný v tukové tkáni. aP2-UCP1 myši si zásluhou odprážených mitochondrií uchovávaly vysokou hladinu AMP, což aktivovalo AMPK. Ta pak v bílé tukové tkáni stimulovala  $\beta$ -oxidaci a mitochondriální biogenezi<sup>30</sup> a inhibovala syntézu mastných kyselin<sup>31</sup>, takže zvířata byla rezistentní k dietou indukované obezitě. Transgenní zvířata zároveň vykazovala sníženou lipolytickou aktivitu v bílé tukové tkáni<sup>32</sup>.

#### 6.4.1.2 AMPK a hormonální řízení metabolismu

AMPK interaguje s některými mezikroky v signálních drahách důležitých hormonů. Z hlediska základního energetického metabolismu je nejvýznamnější působení AMPK a inzulínové kaskády. Jak už bylo řečeno, má inzulín povětšinou anabolické účinky (syntéza glykogenu v játrech a svalu, syntéza TG v tukové tkáni). AMPK naproti tomu vytváří zásoby ATP a působí tedy zpravidla katabolicky (povzbuzování glykolýzy ve svalu, stimulace  $\beta$ -oxidace).

Lze očekávat, že inzulínová dráha a AMPK budou vykazovat protichůdné působení. Tak tomu skutečně v mnoha případech je. Např. inzulín obecně povzbuzuje proteosyntézu, zatímco AMPK ji tlumí. Zatímco PKB (Akt) inhibuje TSC2 a spouští tak mTOR dráhu, AMPK tuto kaskádu blokuje aktivací TSC2. V srdečním svalu se tyto dvě dráhy nejen kříží, ale i vzájemně inhibují. Akt přímo inhibuje AMPK fosforylací serinu v  $\alpha$ -podjednotce, což brání aktivační fosforylaci Thr172 prostřednictvím LKB1<sup>33</sup>.

Existují však i pochody, které jsou shodně regulovány inzulínem i AMPK. Příkladem je inhibice jaterní glukoneogeneze nebo příjem glukózy do svalu. V případě svalu však oba systémy napomáhají stimulací přenosu glukózy do cytoplazmy různým procesům: Inzulín

směřuje k vytváření zásobního glykogenu, zatímco AMPK zajišťuje substrát pro glykolýzu. Obě dráhy v tomto případě patrně působí skrze fosforylaci proteinu AS160, který se účastní translokace váčků s glukózovým přenašečem GLUT4 do membrány<sup>34</sup>.

Účinek AMPK na blokování jaterní glukoneogeneze může mít zásadní význam. Jedno z nejčastěji používaných léčiv proti diabetu 2. typu - metformin - je cíleno právě na snižování produkce glukózy v játrech. Podobný efekt má i adiponektin. Existují studie, které podporují domněnku, že obě tyto látky působí v játrech alespoň částečně skrze AMPK<sup>11;35</sup>.

Díky těmto shodám v působení inzulínu a AMPK je intenzivně zkoumána možnost stimulovat AMPK u pacientů s rozvinutou inzulínovou rezistencí. To by totiž dávalo možnost tyto procesy farmakologicky regulovat. Podobně jako u dalších léčiv však vyvstávají otázky v souvislosti s vedlejšími účinky na tkáň, kde je působení inzulínu a AMPK protichůdné. Shoda efektů ve svalové a jaterní tkáni je však zásadním přínosem a dává do budoucna naději na vytvoření skutečně efektivních léčebných nástrojů.

Rovněž v tukové tkáni inzulín i AMPK působí podobně - inhibují lipolýzu (viz výše). Na jednu stranu sice hypertrofovaná zanícená tuková tkáň navozuje stav inzulínové rezistence, na druhou stranu však snižování hladiny FFA v krevní plazmě prostřednictvím jejich snížené produkce v tuku může v počátečních fázích metabolického syndromu předcházet ektopickému ukládání lipidů v periferních tkáních.

V neuroreceptorech hypothalamu se AMPK účastní řízení kalorického příjmu. Orexigenní hormon ghrelin (viz výše) zde zvyšuje její aktivaci, stejně jako endokanabinoidy<sup>10</sup>. Oproti tomu leptin AMPK v hypothalamu inhibuje. Tímto způsobem pravděpodobně AMPK integruje anorexigenní a orexigenní signály a rozhoduje o potravní strategii. Aktivace AMPK znamená stimulaci příjmu potravy, což v důsledku umožňuje obnovu hladiny ATP v jednotlivých buňkách<sup>36</sup>. Naproti tomu v tukové tkáni a játrech je působení leptinu a ghrelinu na AMPK oproti hypothalamu opačné. Ghrelin zde stimuluje anabolické pochody (inhibicí AMPK), zatímco leptin podporuje prostřednictvím AMPK  $\beta$ -oxidaci a další redukční dráhy vytvářející makroergické sloučeniny<sup>8</sup>.

#### 6.4.2 SIRT1

Zopakujme, že AMPK funguje jako senzor hladiny AMP (potažmo ATP) v buňce. ATP je generováno zejména oxidativní fosforylací v návaznosti na činnost respiračního řetězce. Energie pro tvorbu ATP zde primárně pochází od redukovaných koenzymů NADH a FADH<sub>2</sub>.

Z toho vyplývá, že poměr oxidovaných a redukovaných forem těchto koenzymů je za normálních podmínek rovněž ukazatelem energetického stavu buňky.

Poměr  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  je kontrolován deacetylázou SIRT1. Tento enzym reguluje deacetylaci histonů genovou expresí, ale může i přímo ovlivňovat aktivitu transkripčních faktorů a koaktivátorů. Oxidovaný koenzym  $\text{NAD}^+$  stimuluje SIRT1, zatímco redukovaná forma aktivitu deacetylázy tlumí. Tímto způsobem reaguje SIRT1 na akutní potřebu buňky syntetizovat ATP. Pokud poklesne hladina redukovaných elektronových přenašečů je SIRT1 aktivován a spouští expresi enzymů katabolismu.

Kromě  $\text{NADH}$  je SIRT1 inhibován rovněž nikotinamidem, což je konečný produkt deacetylace proteinů. Tato látka je součástí struktury koenzymu  $\text{NAD}^+$ , do něhož je zabudována činností enzymu nikotinamidfosforibozyltransferáza (Nampt). Lze tedy spekulovat, že činnost deacetylázy SIRT1 byla že původně zpětně inhibována produktem vlastní deacetylace (Nam) a postupně přibyla na základě strukturní podobnosti interakce s koenzymy  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .

Z výše napsaného rovněž vyplývá, že možný způsob jak ovlivňovat aktivitu SIRT1 je regulace činnosti Nampt, která konvertuje inhibitor SIRT1 (NAM) na aktivátor ( $\text{NAD}^+$ ). Je zajímavé, že enzym Nampt je totožný s adipokinem visfatinem (viz výše). Jedna molekula tak slouží jako tkáňový hormon a zároveň nitrobuněčný enzym důležitý pro regulaci aktivity SIRT1<sup>37</sup>. Visfatin je znám jako hormon podporující senzitivitu k inzulínu. Předpokládá se, že interaguje přímo s inzulínovým receptorem<sup>12</sup>. Lze však také spekulovat o tom, že visfatin podporuje inzulínovou signalizaci prostřednictvím aktivace SIRT1.

Aktivace SIRT1 má příznivé účinky při předcházení rozvoji metabolického syndromu (podobně jako AMPK) a významně koreluje s délkou života. Pravděpodobně stimuluje expresi genů, které umožňují předcházet stárnutí (o tom, co vlastně stárnutí způsobuje se ovšem vedou nadále spory). V současnosti je zkoumáno mnoho více či méně specifických aktivátorů SIRT1, aby je bylo možné využít jako léčiva či doplňky stravy. Již klasicky se pro stimulaci SIRT1 používá resveratrol. Jde o polyfenolický antioxidant vyskytující se např. v červeném víně. Aplikací resveratrolu bylo dosaženo prokazatelného prodloužení života u širokého spektra modelových organismů. Tento efekt byl přitom závislý na přítomnosti funkčního genu pro SIRT1<sup>38</sup>.

Jak je již dlouho známo, podobný efekt má rovněž omezení příjmů potravy (McCay 1935 in<sup>39</sup>), které rovněž stimuluje SIRT1. Jak přesně k aktivaci SIRT1 dochází je však stále předmětem sporů. Kalorická restrikce vede obecně k navýšení aerobního metabolismu. Původní teorie tedy vycházely z předpokladu, že SIRT1 je aktivován díky poklesu



koncentrace NADH, které je spotřebováváno v respiračním řetězci<sup>40</sup>. Pokud by tento mechanismus skutečně fungoval, neměly by se blahodárné účinky kalorické restrikce projevit u organismů neschopných oxidativní respirace. To se ovšem neděje<sup>41</sup>.

Mezitím však byla objevena nadějnější dráha: Pro projev účinků kalorické restrikce je nezbytný enzym převádějící NAM na NAD<sup>+</sup>, kterým je u vyšších živočichů Nampt, u kvasinek však PNC1 (*Pyrazinamidase and Nicotinamidase I*)<sup>42</sup>. Zde ovšem vyvstává otázka, jakým způsobem zvyšuje kalorická restrikce aktivitu Nampt. Možnou odpovědí je, že se tak děje prostřednictvím ovlivnění rovnováhy AMP a ATP v buňce (viz dále).

Podobně jako AMPK je i aktivita SIRT1 zvyšována působením adiponektinu. Bylo to demonstrováno na modelu myši s alkoholem navozenou jaterní steatózou. Autoři zmíněné studie navíc zjistili, že pro vzrůst aktivity AMPK v játrech je působení SIRT1 nezbytné<sup>43</sup>. SIRT1 by tedy ležel v případné signalizační kaskádě adiponektinu před AMPK.

### 6.4.3 Vzájemné působení AMPK a SIRT1

Mezi systémy AMPK a SIRT1 existuje několik styčných bodů. V případě obou enzymů existuje mnoho studií, které naznačují jejich účast na nejrůznějších klíčových událostech týkajících se řízení energetického metabolismu a rozvoje metabolického syndromu. V této situaci je jistě oprávněná otázka, které vlivy jsou zprostředkovány kterým z těchto sensorů. V poslední době se ukazuje, že se AMPK a SIRT1 vzájemně přímo ovlivňují. Oba enzymy by tak mohly být součástí jediného komplexního zpětnovazebného řídicího systému<sup>27</sup>.

Máme dostatek podkladů pro domněnku, že AMPK je stimulována deacetylázou SIRT1. Na modelu tkáňových kultur bylo pozorováno, že zvýšený obsah glukózy v médiu inhibuje aktivitu AMPK, aniž by přitom došlo ke změně v hladině AMP<sup>44</sup>. V této studii byla zároveň prokázána anaerobní produkce laktátu v buňkách, což nasvědčuje nárůstu NADH a tedy inhibici SIRT1.

Další práce si kladly za cíl otestovat myšlenku, že SIRT1 způsobuje aktivaci AMPK. Bylo zjištěno, že nadprodukce SIRT1 vede k deacetylaci LKB1 a její translokaci z jádra do cytoplazmy, kde může spolu s adaptory STRAD a MO25 tvořit aktivní komplex stimulující činnost AMPK<sup>45</sup>.

Ukazuje se však, že aktivační působení může být i opačné. Byly navrženy hned dva mechanismy, jakými může AMPK ovlivňovat aktivitu SIRT1. Jde v podstatě o analogické mechanismy k těm, které byly uvažovány v případě zprostředkování efektů kalorické restrikce na SIRT1 (viz výše). AMPK může patrně stimulovat Nampt a tím zajišťovat dostatek NAD<sup>+</sup>

pro aktivaci SIRT1<sup>46</sup>. Druhou možností je potom ovlivňování poměru  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  nezávisle na Nampt stimulací oxidativní respirace<sup>39</sup>.

Jak už bylo výše řečeno AMPK aktivačně fosforyluje PGC-1 $\alpha$ , což vede k stimulaci mitochondriální biogeneze a oxidativní fosforylace. Pro plnou aktivaci PGC-1 $\alpha$  je však nutná také jeho deacetylace, kterou zprostředkovává SIRT1<sup>47</sup>. AMPK tedy spolupracuje se SIRT1 na stimulaci mitochondriální biogeneze. Aktivovaný PGC-1 $\alpha$  pak nasedá mj. na svůj vlastní promotor a pozitivní zpětnou vazbou ovlivňuje svoji expresi<sup>48</sup>. Účinek AMPK je přitom poměrně rychlý (v řádech vteřin až minut, zatímco pozorovatelný efekt stimulace SIRT1 se objevuje až v řádu hodin. Alespoň je tomu tak ve svalových buňkách<sup>27</sup>.

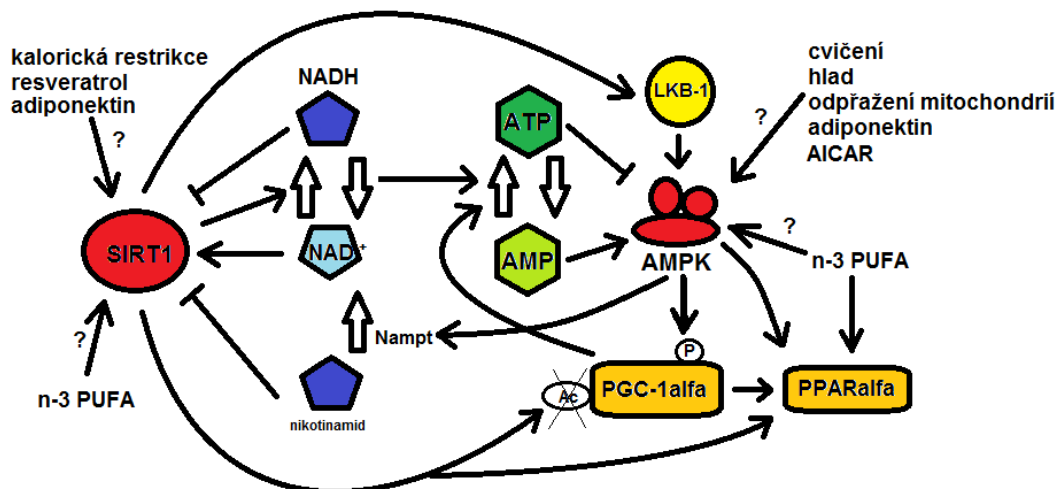
Zesíťování účinků SIRT1 a AMPK může vrhat jiné světlo i na problematiku kalorické restrikce diskutovanou výše. Je pravděpodobné, že je do ní zapojena i AMPK a snad i snížení sekrece inzulínu v důsledku menšího množství potravy. Komplexnější pohled na mechanismus účinku kalorické restrikce představuje obrázek níže.

Výzkum v oblasti vzájemných interakcí senzorů energetického stavu buňky je v plném proudu. Byly již pozorovány aktivity v různých směrech. Je však možné, že část výsledků je falešně pozitivních vlivem nízké specifity aktivátorů SIRT1 a AMPK používaných v některých studiích. O účincích aktivátoru AICAR na další AMP dependentní enzymy vedle AMPK již bylo pojednáno výše. Podobně se zdá, že ani resveratrol nemusí být nijak vysoce specifický. Na nervových buňkách bylo ukázáno, že resveratrol neznámým mechanismem stimuluje AMPK, přičemž k tomu vůbec nevyžaduje SIRT1<sup>49</sup>.

Nedávno dospěla jedna skupina vědců dokonce k závěru, že resveratrol působí na SIRT1 zprostředkovaně skrze AMPK<sup>50</sup>. V těchto pokusech resveratrol neměl žádný efekt na citlivost k inzulínu, ani mitochondriální biogenezi, pokud byl vyřazen gen pro některou z izoform katalytické podjednotky AMPK. Z toho vyplývá, že je AMPK nutná pro zprostředkování příznivého působení resveratrolu. Z dalších výsledků navíc dovozují, že SIRT1 není na rozdíl od AMPK nezbytný pro stimulaci exprese PGC-1 $\alpha$  v reakci na vystavení buněk resveratrolu, zvyšuje však dobu trvání tohoto příznivého efektu. To opět trochu posunuje náš pohled na součinnost SIRT1 a AMPK při aktivaci PGC-1 $\alpha$ .

V této souvislosti se jeví zajímavé zjištění, ke kterému došli Feige a kol. při zkoumání účinků specifického aktivátoru SIRT1 známého pod označením SRT1720<sup>51</sup>. V reakci na aplikaci SRT1720 pozorovali sice deacetylaci PGC-1 $\alpha$ , ta se však na rozdíl od situace u resveratrolu neprojevila zvýšením mitochondriální biogeneze (prostřednictvím NRF1 a Tfam). Byla pozorována mnohem omezenější odpověď: Došlo pouze k vzestupu exprese jaderných receptorů PPAR $\alpha$  a  $\beta$ , což mělo za následek posílení  $\beta$ -oxidace. Pokud resveratrol aktivuje

AMPK mechanismem nezávislým na SIRT1, jak bylo naznačeno výše, může být zvýšená mitochondriální biogeneze po jeho aplikaci spíše důsledkem této dráhy. Naproti tomu aktivace SIRT1 se projeví spíše ovlivněním oxidace mastných kyselin. Na druhou stranu je možné, že pozorovaný efekt nevyovídá tolik o samotném SIRT1 jako spíše o dosud nedokonale prostudovaných zvláštnostech aktivátoru SIRT1720.



Obrázek 2: Zjednodušené schéma působení jednotlivých enzymů SIRT1/AMPK/PGC-1 $\alpha$  signalizační kaskády. Bližší vysvětlení v textu.

## 6.5 Polynenasycené mastné kyseliny řady n-3

Polynenasycené kyseliny (PUFA - polyunsaturated fatty acids) nejsou jen energetickým substrátem, jako ostatní lipidy, ale slouží i jako důležité regulační a signální molekuly. PUFA řady n-3 vykazují významný hypolipidemický efekt a napomáhají tak prevenci rozvoje inzulinové rezistence. Jejich syntéza v těle živočichů však podléhá jistým omezením.

Veškeré mastné kyseliny jsou odvozeny od palmitátu (16:0), který vzniká v cytoplazmě řetěžením dvouuhlíkatých jednotek původem z malonyl-CoA. Ostatní nasycené i nenasycené kyseliny jsou poté syntetizovány činností elongáz a desaturáz v endoplazmatickém retikulu nebo mitochondrii. Při elongaci jsou další jednotky přidávány ke karboxylovému konci. Případné dvojné vazby je proto vhodné počítat od methylového ( $\omega$ ) konce. Desaturázy redukuji specificky vazby v určité vzdálenosti od karboxylového konce. U savců známe  $\Delta^9$ -,  $\Delta^6$ -,  $\Delta^5$ - a  $\Delta^4$ -desaturázy. Vzhledem k tomu, že výchozí látkou je šestnáctiuhlíkový palmitát, nelze u savců vnášet dvojné vazby dále než na devátý uhlík. Proto nelze v tomto systému vyrobit např. kyselinu linolovou (LA, 18:2) a kyselinu  $\alpha$ -linolenovou (ALA, 18:3), které jsou

pro správnou funkci organismu nezbytné. Tyto mastné kyseliny dokáží vyrábět rostliny, které disponují  $\Delta^{12}$ - a  $\Delta^{15}$ -desaturázami, živočichové je musí přijímat v potravě<sup>1</sup>.

Dalšími postupnými elongacemi a desaturacemi se pak z LA připravují PUFA řady n-6 (poslední dvojná vazba je na 6 uhlíku od methylového konce), z nichž nejvýznamnější je kyselina arachidonová (AA, 20:4). Naproti tomu ALA dává vznik řadě n-3, ze které jsou nejdůležitější kyselina eikosapentaenová (EPA, 20:5) a kyselina dokosaheptaenová (DHA, 22:6). Syntéza EPA a DHA z ALA je ovšem v živočišných tkáních značně neefektivní (na DHA se konvertuje přibližně 4-5 % ALA). Desaturaci a elongaci PUFA řad n-3 a n-6 provádějí tytéž enzymy, takže zde může docházet ke kompetici substrátů. Je proto vhodné doplňovat EPA a DHA potravou. Největším producentem těchto PUFA je mořský fytoplankton a tyto kyseliny se proto hromadí v tělech vrcholových predátorů mořského ekosystému. Rybí olej je doporučovanou složkou potravy.

n-3 PUFA tvoří významnou a esenciální složku buněčných membrán zejména v nervové tkáni. Byla dokonce vyslovena domněnka, že rybolov, resp. strava bohatá na mořské ryby byly nezbytným předpokladem pro rozvoj koncového mozku v evoluci člověka<sup>52</sup>.

Bylo prokázáno, že n-3 PUFA mají četné blahodárné účinky na zdravotní stav laboratorních zvířat i lidí. Na myším modelu bylo spolehlivě prokázáno působení n-3 PUFA proti rozvoji obezity, jejich účinek na redukcii TG v plazmě, zvýšení poměru cholesterolu ve formě HDL ku LDL a prevence dietou indukované inzulínové rezistence. Výsledky z pokusů s lidskými pacienty jsou méně jednoznačné, v podstatě však shodné. Zajímavé je, že n-3 PUFA mají obrovský potenciál při prevenci rozvoje metabolického syndromu, ale jen malý efekt na reverzi již jednou narušeného metabolismu k původnímu stavu (shrnuje ve<sup>53;54</sup>).

Blahodárné účinky n-3 PUFA jsou dobře dokumentovány, naše pochopení mechanismu, jakým působí, je však dosud značně neúplné. Z velké části je jejich efekt patrně zprostředkován přes jejich deriváty ze skupin eikosanoidů a dokosanoidů, které souhrnně označujeme za lipidové mediátory. n-3 PUFA však zřejmě mohou ovlivňovat přímo i aktivitu jaderných receptorů. V poslední vyvstává otázka, zda není alespoň část jejich působení dána aktivací AMPK. Vzhledem k provázanosti činnosti AMPK a SIRT1 (viz výše) je deacetyláza SIRT1 dalším možným prostředníkem.

Jak už bylo řečeno, bývají n-3 PUFA v buňce vázány ve formě membránových glycerofosfolipidů. Stejně jako ostatní nenasycené mastné kyseliny se zpravidla vyskytují v pozici sn2. Jejich další zpracování a případný metabolický účinek vyžaduje odštěpení od glycerolu, které zprostředkovává fosfolipáza A<sub>2</sub>.

### 6.5.1 Lipidové mediátory - PUFA a zánět

PUFA s dvaceti uhlíky v řetězci, tedy zejména AA a EPA jsou přeměňovány na parakrinně působící signální molekuly označované jako eikosanoidy. Velmi zjednodušeně lze tvrdit, že eikosanoidy skupiny n-6 vyvolávají zánětlivou reakci, zatímco n-3 eikosanoidy působí spíše protizánětlivě. Jak už bylo řečeno, je možné nahlížet na obezitu jako na stav chronického zánětu tukové tkáně. n-3 PUFA a jejich metabolity rozvoj zánětu brzdí a tím předchází navození IR v adipocytech.

Za normálních okolností ovšem převažuje prozánětlivé působení eikosanoidů odvozených od AA. Prvním klíčovým krokem ovlivňujícím syntézu těchto látek je uvolňování AA a dalších nenasycených mastných kyselin z membránových fosfolipidů fosfolipázami A<sub>2</sub>.

Volné mastné kyseliny jsou poté upravovány enzymy ze skupiny cyklooxygenáz nebo lipoxygenáz. Činností cyklooxygenázy vznikají z AA tromboxany, prostacykliny a prostaglandiny 2. série. Tyto molekuly hrají obecně klíčovou roli při rozvoji zánětu se všemi jeho příznaky (zvýšená teplota, bolestivost, zarudnutí, otok). Cyklooxygenáza metabolizuje ovšem rovněž EPA za vzniku protizánětlivých prostaglandinů a tromboxanů 3. série. Vzhledem k nižší afinitě cyklooxygenázy k n-3 PUFA je však tato aktivita za normálních okolností tlumena<sup>55</sup>.

Vedle toho existují ještě další skupiny eikosanoidů. Nejvýznamnější z nich jsou eikosanoidy vznikající lipoxygenázovou dráhou. U lipoxygenázy je afinita k PUFA oproti cyklooxygenáze opačná: přednostně vznikají leukotrieny 5. série z EPA a až v další řadě potom leukotrieny 4. série z AA<sup>55</sup>.

Receptory eikosanoidů jsou spřaženy s G proteiny. Touto cestou jsou ovlivňovány aktivity jaderných regulátorů exprese, jako jsou proteiny z rodiny PPAR nebo NFκB. Hladiny různých tříd eikosanoidů se tak mohou odrazit v sekreci cytokinů jako IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1 a TNFα.

Dráhy syntézy eikosanoidů lze tedy ovlivňovat na různých úrovních. V tukové tkáni patrně hraje významnou roli fosfolipáza AdPLA ze skupiny fosfolipáz A<sub>2</sub>, která není v jiných tkáních exprimována vůbec. Myš s nefunkčním genem pro AdPLA vykazuje výrazné snížení produkce prostaglandinu E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), rezistenci k obezitě zásluhou zvýšené lipolýzy (Jaworski 2009). To koreluje s obecně sníženou hladinou cAMP v buňce. Byl proto vysloven názor, že PGE<sub>2</sub> za normálních okolností působí jako jeden z hlavních inhibitorů lipolýzy v tukové tkáni tím způsobem, že se váže na receptor EP3 spřažený s G-proteinem. Aktivace G<sub>ai</sub> potom vede k inhibici adenylátcyklázy, poklesu hladiny cAMP a tím pádem i aktivity PKA. PKA poté není schopna dále aktivačně fosforylovat HSL a obrát lipolýzy tudíž klesá. Podle tohoto

modelu působí tedy PGE<sub>2</sub> jako inhibitor glukagonové kaskády (viz výše) a AdPLA může hrát významnou roli při regulaci syntézy PGE<sub>2</sub>.

Dalším důležitým krokem je pak aktivita vlastních cyklooxygenáz a lipoxygenáz. Jelikož jsou jak n-3 PUFA, tak n-6 PUFA substrátem těchto enzymů, může zde docházet ke kompetiční inhibici. Cyklooxygenáza má vyšší afinitu k n-6 PUFA, zatímco lipoxygenáza spíše k n-3 PUFA. Rozlišujeme 2 typy cyklooxygenáz - Cox-1 a Cox-2. Aktivitu obou inhibuje zvýšený přísun n-3 PUFA v potravě. Tím klesá produkce n-6 eikosanoidů, zároveň však mírně stoupá syntéza protizánětlivých n-3 eikosanoidů<sup>55</sup>. Kromě ovlivňování aktivity cyklooxygenázy mohou n-3 PUFA patrně regulovat i expresi Cox-2. Tomu nasvědčují závěry hned několika studií<sup>56;57</sup>.

Inhibice aktivity cyklooxygenáz vede v první řadě ke snížení tvorby zánětlivých molekul z AA. Proto lze tento krok využít při snižování teploty a tlumení bolesti. Inhibitory cyklooxygenázy, jako je kyselina acetylsalicylová (čili aspirin) nebo nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID, např. ibuprofen), se tudíž používají jako analgetika a antipyretika.

Třetí úroveň, ve které může být účinek eikosanoidů regulován je vazba těchto molekul na jejich receptory. Eikosanoidy odvozené od n-3 a n-6 PUFA spolu pravděpodobně o tyto receptory vzájemně kompetují<sup>55</sup>.

Pro syntézu eikosanoidů je z n-3 PUFA nezbytná EPA. Bylo však zjištěno, že substrátem lipoxygenázy je rovněž DHA. Ta je jedním ze zdrojů látek příbuzných eikosanoidům, rozdělovaných do skupiny resolvinů, protektinů a maresinů. Mají rovněž protizánětlivé účinky. Např. bylo ukázáno, že intraperitoneální injekce resolvinu E1 brzdí jaterní steatózu<sup>58</sup>. Vzestup hladiny protektinu D1 a 17S hydroxyDHA v játrech v důsledku zvýšeného obsahu DHA v potravě zase koreluje s poklesem produkce PGE<sub>2</sub> a může se tak významnou měrou podílet na zprostředkování blahodárných efektů n-3 PUFA. DHA snižuje riziko poškození DNA volnými radikály. Předpokládá se, že rovněž tento efekt je zprostředkován lipidovými mediátory<sup>59</sup>.

### 6.5.2 Ovlivnění jaderných receptorů

Ačkoliv je mnoho blahodárných účinků n-3 PUFA na metabolismus spojeno s produkcí protizánětlivých lipidových mediátorů, ukazuje se, že EPA a DHA vedle toho působí jako signální molekuly i samy o sobě. Děje se tak prostřednictvím ovlivňování genové exprese. Ačkoliv může být obtížné odlišit přímé působení mastných kyselin od nepřímého ovlivňování

skrze jejich metabolity, uvádí se běžně mezi zprostředkovateli efektu n-3 PUFA transkripční faktory PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , HNF-4, NF $\kappa$ B, SREBP1 a LXR $\alpha$ <sup>53</sup>. Dokonce bylo zjištěno, že se n-3 i n-6 PUFA váží na RXR, což je receptor heterodimerizující s celou řadou dalších<sup>60</sup>.

Stimulací PPAR $\alpha$  zprostředkovávají n-3 PUFA zvýšené odbourávání mastných kyselin. V játrech k tomu navíc přistupuje inhibice SREBP1, který za normálních okolností povzbuzuje tvorbu lipidů. Snížení aktivity NF $\kappa$ B pak působí protizánětlivě, jak už bylo řečeno v souvislosti s působením eikosanoidů.

V tukové tkáni bylo popsáno výrazné navýšení mitochondriální biogeneze (vyjádřené expresí PGC1 $\alpha$  a NRF1) v reakci na zvýšený přísun n-3 v potravě. Naproti tomu v játrech, ani svalů tento efekt pozorován nebyl<sup>61</sup>. Doposud nebyl uspokojivě vysvětlen mechanismus, jakým k ovlivnění těchto molekul dochází.

Vedle toho se v současnosti při léčbě diabetu 2. typu často využívá agonistů PPAR $\gamma$ , jmenovitě ze skupiny thiazolidindionů (TZD), které mají potenciál příznivě ovlivňovat hladinu krevní glukózy. Aktivace PPAR $\gamma$  v makrofázích tukové tkáně navíc podporuje jejich setrvávání v protizánětlivém stavu M2<sup>62</sup>. Vedle toho se však TZD vyznačují nepříznivými vedlejšími efekty, mezi něž patří zejména zvýšený apetit (pravděpodobně v důsledku poklesu produkce leptinu) a přibírání na váze (zvýšená diferenciací adipocytů z prekurzorových buněk)<sup>63</sup>. Jak ukazuje publikace z naší laboratoře, je k potlačení tohoto nepříznivého účinku vhodné doplnit léčbu právě aplikací n-3 PUFA, které prostřednictvím navození zvýšené  $\beta$ -oxidace a stimulací sekrece adiponektinu působí proti ukládání tuku<sup>64</sup>.

### 6.5.3 Interakce mezi n-3 PUFA a adipokiny

Již několik let je známo, že příjem n-3 PUFA v potravě zvyšuje hladinu adiponektinu v krevní plazmě<sup>65</sup>. Neschen a kol. ukázali, že pro zprostředkování efektu n-3 PUFA na sekreci adiponektinu je nezbytný PPAR $\gamma$ . Naproti tomu myši KO v genu pro PPAR $\alpha$  reagují na n-3 PUFA nezměněně<sup>66</sup>.

Adiponektin by mohl být hledaným prostředníkem při posilování mitochondriální biogeneze. Je známo, že vylučovaný adiponektin stimuluje v cévním endotelu syntézu oxidu dusnatého<sup>67</sup>. NO pak zpětně stimuluje biogenezi mitochondrií v tukové tkáni<sup>68</sup>. Navíc NO pozitivní zpětnou vazbou podporuje další sekreci adiponektinu<sup>69</sup>.

Vedle adiponektinu ovlivňují n-3 PUFA rovněž produkci dalších adipokinů, zejména leptinu<sup>65</sup>. Vzhledem k výše zmiňované spojitosti mezi obezitou a chronickým zánětem tukové tkáně není bez zajímavosti, že n-3 PUFA působí proti rozvoji obezity a

nezávisle na tom i protizánětlivě. Na modelu obezných myší s mutací v receptoru pro leptin (db/db) bylo ukázáno, že podávání n-3 PUFA snižuje pronikání makrofágů do tukové tkáně a blokuje expresi zánětlivých genů, zatímco vlastní objem tukové tkáně zůstává nezměněn<sup>70</sup>. Je tedy možné, že antilipogenní účinky n-3 PUFA jsou z části zprostředkovány působením leptinu, zatímco protizánětlivé působení se odehrává obdobně jako v případě TZD pravděpodobně přes PPAR $\gamma$ .

Některé studie na lidských pacientech naznačují, že n-3 PUFA rovněž snižují sekreci adipokinů vyvolávajících zánět a navozujících inzulinovou rezistenci - např. rezistinu, interleukinu 6 a MCP-1<sup>71</sup>.

#### 6.5.4 n-3 PUFA a AMPK

Jak bylo ukázáno výše, příjem n-3 PUFA v potravě má v tukové tkáni za následek redukcii akumulace lipidů a sníženou lipogenezi, zvýšenou oxidaci mastných kyselin a pokles hladiny TG v plazmě. Prakticky stejné efekty vykazuje i hladovění, zvýšená sekrece leptinu, působení agonistů adrenergních receptorů nebo ektopické odpřažení oxidativní fosforylace pomocí ektopické exprese UCP1<sup>72</sup>. Tyto děje jsou spojeny se zvýšenou aktivitou AMPK, přičemž přinejmenším v případě hladovění a ap2-UCP1 myši je AMPK aktivována poklesem hladiny ATP. Nabízí se tedy otázka, zda nepůsobí n-3 PUFA v tukové tkáni alespoň částečně rovněž prostřednictvím AMPK.

Suchankova a kol. pozorovala u krys nárůst aktivity AMPK v játrech po podávání stravy obohacené o n-3 PUFA<sup>73</sup>. Naproti tomu studie na SCD1-/- myších žádný vliv n-3 PUFA na AMPK neodhalily<sup>74</sup>. Autoři této studie marně doufali, že se jim podaří potvrdit hypotézu o působení SCD1 deficiencie na AMPK skrze nárůst poměru polynenasycených a mononenasycených mastných kyselin.

V naší laboratoři se podařilo prokázat zvýšení fosforylace ACC (substrátu AMPK) v tukové tkáni po podávání diety se zvýšeným obsahem n-3 PUFA<sup>75</sup>. Není však jasné, zda je vzrůst aktivity AMPK nezbytný pro působení mastných kyselin nebo se jedná pouze o vedlejší efekt. S cílem rozhodnout o kauzalitě těchto jevů pracujeme v současnosti s myšimi kmeny s KO v  $\alpha 1$  podjednotce AMPK a v  $\alpha 2$  podjednotce AMPK. Ukazuje se, že  $\alpha 2$  izoforma je aktivní hlavně v játrech, kde se jí daří prostřednictvím AMPK inhibovat lipogenezi. (Jeleník, dosud nepubl.) Význam  $\alpha 1$  podjednotky se předpokládá zejména v tukové tkáni. Předběžné výsledky studia  $\alpha 1$  -/- myši jsou součástí praktické části této práce.



Vzhledem k těsné součinnosti AMPK a SIRT1, jež byla diskutována výše, jsme se zároveň rozhodli vyzkoušet účinky n-3 PUFA na modelu SIRT1 +/- myši.

Aktivita AMPK je stimulována mj. adiponektinem<sup>11</sup>. Na této stimulaci se zřejmě podílí i SIRT1<sup>43</sup>. Rovněž bylo prokázáno, že n-3 PUFA stimulují sekreci adiponektinu z tukové tkáně<sup>76</sup>. Při posuzování mechanismu, kterým n-3 PUFA působí, je proto nutné zvážit i možnost, že se tak děje výlučně prostřednictvím adiponektinu.

## 6.6 Shrnutí a cíle diplomové práce

Jak jsem se pokusil shrnout v předcházející části své diplomové práce, podobá se účinek n-3 PUFA v mnohých aspektech efektu aktivace AMPK. Bylo prokázáno, že vyšší dávky n-3 PUFA v potravě skutečně aktivitu AMPK stimulují, a to specificky v tukové tkáni. Spekuluje se proto o tom, zda by mohla AMPK přímo zprostředkovávat působení n-3 PUFA. Druhou možností je, že je aktivována pouze sekundárně. Do této otázky mohou vnést jasno pouze studie zvířecích nebo buněčných modelů s inaktivovanými geny pro různé komponenty AMPK signalizační kaskády.

Dalším zajímavým problémem je řešení otázky, zda n-3 PUFA působí na AMPK přímo nebo prostřednictvím některého hormonu. Vzhledem k těsné provázanosti systému AMPK s deacetylázou SIRT1 se i zde otvírá široké výzkumné pole.

Podrobnější studium tohoto tématu bude také předmětem mého navazujícího postgraduálního studia v Laboratoři biologie tukové tkáně na Fyziologickém ústavu v. v. i. V rámci diplomové práce jsem si stanovil několik dílčích úkolů, jejichž splnění by mělo přispět k objasnění nastíněné problematiky:

### 1. Provéřit možnosti kvantifikace zastoupení mitochondrií v bílé tukové tkáni metodami stanovení koncentrace cytochromů.

Tato metoda by v budoucnu měla sloužit k prověřování efektu n-3 PUFA u kontrolních myší v porovnání s KO ve sledování genu.

### 2. Metodicky připravit a ověřit použitelnost tkáňových kultur myších embryonálních fibroblastů s inaktivovanými geny pro obě izofomy katalytické podjednotky $\alpha 1$ i $\alpha 2$ (AMPK $\alpha$ KO MEF) pro budoucí výzkum efektu n-3 PUFA *in vitro*.

Tento model by mohl v budoucnu umožnit odlišit potenciální přímé působení n-3 PUFA na AMPK od působení zprostředkovaného hormonu.

**3. Ověřit použitelnost modelu myší s inaktivovanou  $\alpha 1$  podjednotkou AMPK (AMPK $\alpha 1$  -/-) pro zkoumání drah působení n-3 PUFA.**

$\alpha 1$  je katalytická podjednotka AMPK exprimovaná zejména v bílé tukové tkáni, což je místo, kde se vliv n-3 PUFA projevuje obzvláště výrazně.

**4. Pomocí modelu heterozygotních myší s inaktivací jednoho lokusu pro SIRT1 (SIRT1 +/-) ověřit hypotézu, že je SIRT1 zapojen ve zprostředkování efektu n-3 PUFA.**

Takový pokus by pak výrazně pomohl při interpretaci výsledků experimentů s kalorickou restrikcí (viz dále).

**5. Studovat kombinaci působení n-3 PUFA a kalorické restrikce.**

Předpokládá se, že kalorická restrikce působí skrze SIRT1 signalizační dráhu. Pokud n-3 PUFA účinkují toutéž cestou, otvírá se zde pole pro farmakologické uplatnění kombinace n-3 PUFA a kalorické restrikce

# 7 Metody

## 7.1 Péče o pokusný materiál

Paralelně byly prováděny pokusy na zvířecím modelu a na modelu tkáňových kultur.

### 7.1.1 Práce se zvířecím modelem

Experimenty byly prováděny na několika myších kmenech:

1. C57BL/6 myš (standardní laboratorní kmen myší se sklonem k rozvoji dietou indukované obezity)
2. AMPK $\alpha$ 1 -/- myš a AMPK $\alpha$ 1 +/+ kontrolní zvířata (litter mates control)<sup>77</sup>
3. SIRT1 +/- myš a SIRT1 +/+ kontrolní zvířata<sup>78</sup>

Zvířata byla chována v samostatných klecích v místnosti s 12-hodinovým umělým světelným režimem při 22 °C. Při chovu byla zvířata krmena standardní dietou R/MH (firma Ssniff Spezialdiäten, Soest). Během pokusů však byly použity další tři různé diety: Dieta s vysokým obsahem lipidů (cHF) a diety na téže bázi, u nichž však byl určitý podíl lipidů nahrazen preparátem EPAX 1050TG z tuku mořských ryb. V dietě cHF+F bylo nahrazeno 15 % veškerých lipidů, v dietě cHF+F2 bylo nahrazeno 44 % lipidů. Energetické zastoupení jednotlivých tříd živin v dietách shrnuje tabulka 1.

Složení diet

cHF (1 kg): 400 g standardní diety R/MH  
340 g Sunaru  
250 g kukuřičného oleje (Oleofarm)  
210 mg  $\alpha$ -tokoferolu  
10 g kukuřičného škrobu (Maizena)

cHF+F(2) (1 kg): 400 g standardní diety R/MH  
340 g Sunaru  
197,5 g kukuřičného oleje (Oleofarm) u cHF+F, resp. 96 g u cHF+F2  
52,5 g přípravku EPAX 1050TG u cHF+F, resp. 154 g u cHF+F2  
(EPAX obsahuje 150 mg/g EPA, 400 mg/g DHA a 4 mg/g  $\alpha$ -tokoferolu)  
10 g kukuřičného škrobu (Maizena)

V tabulce 1 je ukázáno, jaký podíl na celkovém energetickém obsahu obou diet představují jednotlivé formy živin.

Energetický obsah / dieta	ST	cHF	cHF+F	cHF+F2
Proteiny [%]	25	15	15	15
Lipidy [%]	9	59	59	59
z toho n-3 PUFA [% z celkových lipidů]	0	0	9	15
Sacharidy [%]	66	26	26	26

**Tabulka 1: Energetické složení použitých diet.**

Procentuální zastoupení jednotlivých skupin živin v celkovém energetickém obsahu použitých diet

Během experimentů byly myši každý týden váženy. V pokusech s kalorickou restrikcí byla každý týden vždy zjištěna spotřeba potravy u kontrolní skupiny krmené *ad libitum* a z této hodnoty se vypočetl příděl potravy pro zvířata na 10 % kalorické restrikci.

Myši byly usmrcovány v éterové narkóze cervikální dislokací a odebírané vzorky tkání byly zamrazovány v tekutém dusíku (pro analýzu genové exprese metodou qPCR a pro stanovení obsahu mitochondrií spektrofotometrickým měřením koncentrace cytochromů) nebo inkubovány v médiu (pro měření mitochondriální respirace kyslíkovou elektrodou - viz dále). Pro analýzy obsahu metabolitů a hormonů v krevní plazmě, které však nejsou součástí diplomové práce bylo z krční tepny odebíráno cca 700  $\mu$ l krve do mikrozkrumavky s 5  $\mu$ l 0,5 M EDTA. Krev byla centrifugována 10 min. při 7000 RPM ve 4 °C. a plazma poté odebírána a uchovávána při -20 °C.

### 7.1.2 Tkáňové kultury

Při pokusech na tkáňových kulturách byla používána linie AMPK $\alpha$  KO (AMPK $\alpha$ 1 -/- a AMPK $\alpha$ 2-/-) MEF. Tyto buňky byly poskytnuty spolupracující laboratoří. Inaktivací genu p53 u nich bylo dosaženo imortalizace. Jako kontrola byly při experimentech používány imortalizované wt MEF z téže laboratoře<sup>79</sup>.

Chemikálie

D-MEM (4,5 g glukózy na litr), FBS, penicilin + streptomycin, PBS, versen-trypsin, DMSO

PBS (fyziologický roztok)

Do konečného objemu 3 l rozpustit ve vodě:

24 g NaCl

1,2 g KCl

8,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O

0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH upravit pomocí 1 M NaOH do rozmezí 7,2 až 7,3, filtrovat přes řídký papírový filtr, autoklávovat 20 min. při 121 °C.

Kultivační médium (100 ml)

89 ml D-MEM

10 ml FBS

1 ml směsi penicilin-streptomycin

Buňky byly pěstovány při 37 °C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Jako médium bylo použito D-MEM s přídatkem 10 % fetálního hovězího séra (FBS) a směsi antibiotik penicilinu a streptomycinu (100 µg/ml). Jako kultivační nádoby při množení buněk pro zamrazování nebo analýzy spotřeby kyslíku byly používány plastové láhve s plochou dna 75 cm<sup>3</sup> a speciálním povrchem Nuclon. Pro měření oxidace mastných kyselin se buňky pěstovaly v 24-jamkových destičkách.

Pasážování i výměna média byly prováděny sterilně v laminárním boxu. Při pasážování byly buňky oddělovány ode dna kultivační nádoby 10minutovou inkubací se směsí verzen-trypsinu. K přepočítávání buněk byla použita Bürkerova komůrka.

Sklizené buňky byly zahušťovány krátkou centrifugací při 300 g. Po skončení pokusů byly buňky zamrazovány v médiu s 10 % DMSO v šroubovacích lahvičkách po 1 ml tak, aby v každé lahvičce bylo cca 1 až 1,5 milionu buněk. Uchovávány byly v tekutém dusíku.

## 7.2 Standardní laboratorní metody

### 7.2.1 Měření koncentrace DNA

Přístroje:

termoblok

fluorimetr Victor

### Zásobní roztoky

500 mM TrisCl (pH 7,47)

100 mM EDTA (pH 7,47)

10 % SDS

Proteináza K, 20 mg/ml

NaCl/Na-Pi/EDTA pufr

Hoechst 33258 (bis-benzimid), 1 mg/ml

DNA standard, 0,1 mg/ml – izolát DNA z telecího brzlíku

Proteináza K mix: 20 mM TrisCl

10 mM EDTA

1 % SDS

Proteináza K, 50 µg/ml

NaCl/Na-Pi/EDTA pufr: 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 M NaCl

2 mM EDTA

(pH 7,4)

Hoechst 33258 (neboli bis-benzamidin) je DNA vážící fluorescenční barvivo. Ve vazbě na DNA může být excitován UV zářením (o vlnové délce asi 356 nm) a vyzařuje světlo ve fialové oblasti (458 nm). Fluorimetricky tak lze pomocí této sloučeniny kvantifikovat obsah DNA ve vzorku<sup>80</sup>.

Nejprve jsou všechny proteiny ve vzorku během půldenní inkubace v roztoku proteinázy K při 56 °C. Poměr je dán obsahem biologického materiálu. (Obvykle např. 40 µl buněčné suspenze na 80 µl mixu proteinázy K.)

Po skončení inkubace se vzorky zchladí a připraví se roztoky standardů. Hoechst 33258 je nutné držet ve tmě. Před měřením se smísí zásobní roztok Hoechst s NaCl/Na-Pi/EDTA pufrům v poměru 1:300. Jako standard slouží izolát DNA z telecího brzlíku o známé koncentraci 0,1 mg/ml. Roztoky standardů pro kalibrační přímku a roztoky se vzorky lze připravit podle tabulky 2:

	μg DNA	μl standardu / vzorku	μl NaCl/NA- Pi/EDTA pufru	μl Hoechst 33258 v NaCl/Na-Pi/EDTA
S1 blank	0	0	1000	500
S2	1	10	990	500
S3	2	20	980	500
S4	3	30	970	500
S5	4	40	960	500
S6	6	60	940	500
S7	8	80	920	500
S8	12	120	880	500
Vzorky	X	20	980	500

**Tabulka 2: Příprava standardů a vzorků pro stanovení koncentrace DNA pomocí Hoechst 33258**

Vzorky se poté 3 až 16 hodin inkubují ve tmě. Následně se z nich na 96-jamkovou destičku odebere po 150 μl a na fluorimetru je změřena intenzita vyzářeného světla. Z fluorescence vzorků lze podle kalibrační přímky vypočítat koncentraci DNA.

## 7.2.2 Měření koncentrace proteinů

Pro měření koncentrace proteinů jsem používal metodu BCA a metodu podle Bradfordové.

**Metoda BCA** představuje jednoduchou a rychlou cestu ke změření celkového obsahu proteinu ve vzorku<sup>81</sup>. Jedná se o modifikaci starší Lowryho metody<sup>82</sup>. Je kompatibilní s řadou detergentů a není citlivá k zvýšenému obsahu mastných kyselin, takže se dobře hodí i pro stanovování obsahu proteinů v homogenátech tukové tkáně.

V zásaditém prostředí proteiny redukují měďnaté ionty  $\text{Cu}^{\text{II}}$  na měďné ionty  $\text{Cu}^{\text{I}}$ . Tyto ionty pak tvoří s kyselinou bicinchoninovou (BCA) barevný produkt. Absorpční maximum má tato látka při 562 nm. Porovnáním absorbance vzorku s kalibrační přímkou (viz tabulka X) získanou měřením standardů o známých obsazích proteinu tak zjistíme koncentraci proteinů ve vzorku.

Reakční činidlo musí být vždy připraveno těsně před měřením smísením roztoku  $\text{CuSO}_4$  a roztoku BCA v poměru 1:50.

Roztok A (BCA): 1% disodná sůl kyseliny bicinchoninové ( $\text{BCA-Na}_2$ )

2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
 0,16 % vínan sodný  
 0,95% NaHCO<sub>3</sub>  
 (pH 11,25)

Roztok B: 4 % CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O

standard: roztok BSA o koncentraci

Po 20  $\mu$ l vzorku se potom smísí s 280  $\mu$ l reakčního činidla. Vzorky se 40 minut inkubují při 37  $^{\circ}$ C. Celé měrení lze provádět na 96-jamkové destičce. Jako standard byl použit vzorek BSA ředěný na pět různých koncentrací (viz tab. 3).

	$\mu$ g proteinu	$\mu$ l standardu BSA (0,5 mg/ml)	$\mu$ l H <sub>2</sub> O	$\mu$ l roztok <span>ů</span> A+B
S1	0	0	20	250
S2	2,5	5	15	250
S3	5	10	10	250
S4	7,5	15	5	250
S5	10	20	0	250
vzorky	x	20	0	250
	x/2	10	10	250

**Tabulka 3: Příprava standardů a vzorků pro stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA**

**Metoda podle Bradfordové** je založena na kolorimetrickém měrení nárůstu absorbance barviva Coomassie při 595 nm<sup>83</sup>. Přítomnost proteinů stabilizuje modrou formu barviva a prostým změrením absorbance této látky lze proto podle kalibrační přímky odvodit koncentraci proteinů ve vzorcích. Metoda je ovšem citlivá na řadu chemikálií, jež se ve vzorku mohou snadno vyskytnout (např. detergent SDS).

Rovněž toto měrení bylo prováděno na 96-jamkové destičce a jako standardy byly použity ředěné vzorky BSA. Návod na přípravu standardů i vzorků obsahuje tabulka 4.



	µg proteinu	µl standardu BSA (0,5 mg/ml) / vzorku	µl H <sub>2</sub> O	µl roztoků A+B
S1	0	0	125,00	125
S2	0,63	1,25	123,75	125
S3	1,25	2,5	122,50	125
S4	1,90	3,75	121,25	125
S5	2,50	5	120,00	125
S6	3,80	7,5	117,50	125
S7	5,00	10	115,00	125
vzorky	X	2,5	122,50	125

**Tabulka 4: Příprava standardů a vzorků pro stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové**

### 7.2.3 Izolace RNA

Chemikálie:

TRIzol

Chloroform

Izopropanol

75 % ethanol

RNA byla izolována pomocí guanidium thiokyanát-fenol-chloroformové extrakce<sup>84</sup>. Guanidiumthiokyanát a fenol jsou dodávány firmou Invitrogen ve společném roztoku pod komerčním názvem TRIzol.

Vzorky pro izolaci RNA se uchovávají v tekutém dusíku.

Postup:

Není-li uvedeno jinak, provádí se všechny kroky za pokojové teploty.

Homogenizace tkáně byla prováděna ručním homogenizátorem Ultraturrax v roztoku Trizolu. Doporučuje se cca 1 ml Trizolu na 100 mg tkáně. Špatně homogenizované části byly odstraněny centrifugací (10 minut, 12000 g, 4 °C).

Následně byl přidán roztok chloroformu (0,2 ml chloroformu na 1 ml Trizolu) a po důkladném promíchání byly jednotlivé fáze separovány centrifugací (15 minut, 14000 g, 4 °C). RNA se rozpouští v horní vodné fázi, zatímco DNA zůstává v dolní organické fázi a proteiny se vysráží na fázovém rozhraní.

RNA byla poté vysrážena přidáním 0,5 ml izopropanolu a sedimentována centrifugací (10 minut, 12000 g, 4 °C). Vysrážený pelet byl promýván 1 ml 75 % ethanolu. Po další centrifugaci (5 minut, 12000 g, 4 °C) byl supernatant odebrán a pelet vysušen na vakuové sušičce.

Izolovaná RNA byla rozpuštěna při 60 °C v adekvátním množství vody (pro tukovou tkáň je ideálních 10 µl).

Po skončení procesu izolace je třeba ověřit kvalitu získané RNA. Vždy se analyzuje čistota RNA, pokud se při další práci s RNA objeví nějaké obtíže, lze ověřit rovněž integritu RNA. Čistota se stanovuje fotometricky a je vyjádřena poměrem absorbance při 260 a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$  - nízké hodnoty ukazují na kontaminaci proteiny), popř. poměrem  $A_{260}/A_{230}$  (nízké hodnoty nasvědčují kontaminaci nízkomolekulárními látkami, např. fenolem). Z hodnoty absorbance při 260 nm je rovněž vypočítána koncentrace izolované RNA.

Integrita RNA se nejjednodušeji kontroluje metodou agarózové elektroforézy. Fragmenty RNA jsou rozděleny v gelu podle velikosti. Nejpočetněji zastoupené jsou v buňce rRNA, a to zejména 18S rRNA a 28S rRNA. Pokud RNA není degradovaná, ukážou se po obarvení ethidium bromidem pod UV světlem dva výrazné, ostře oddělené pásy, přičemž 18S rRNA by měla být výraznější.

## **7.3 Kvantitativní RT PCR v reálném čase**

### **7.3.1 Reverzní transkripce**

Pro měření exprese jednotlivých genů se standardně používá metoda kvantitativní PCR (jinak též PCR v reálném čase). V prvním kroku je celková RNA izolovaná z buňky podrobena reverzní transkripci a výsledná cDNA pak může posloužit jako templát pro vlastní PCR. Při měření exprese genů se sleduje poměrné zastoupení jednotlivých mRNA. Abychom dosáhli selektivního přepisu pouze mRNA (a ne např. rRNA, která tvoří většinu RNA v buňce), použijeme jako primer polyT oligonukleotid, který je komplementární k polyA konci mRNA.

Někdy se ovšem 18S rRNA používá jako referenční gen při normalizaci výsledků kvantitativní PCR. V takovém případě je vhodné pro reverzní transkripci použít směs krátkých náhodných oligonukleotidů.

Postup pro reverzní transkripci

1. Připravíme si zásobní roztoky A a B (viz tab. 5). Roztok A se smísí s jednotlivými vzorky tak, aby byl v každé reakci 1 µg RNA a reakční objem před přidáním roztoku B tvořil 12 µl.

	[µl na vzorek]
MIX A	
oligoT primery	0,5
H <sub>2</sub> O	podle c RNA
MIX B	
10x pufr	2
H <sub>2</sub> O	4
směs dNTP	1
M-MLV reverzní transkriptáza	1

**Tabulka 5: Složení roztoků A a B pro reverzní transkripci**

2. Mikroskopické vzorky s vzorkem izolované RNA v roztoku A necháme 5 minut přehřát při 65 °C, aby došlo k rozpletení sekundární struktury RNA. Po zahřátí se vzorky rychle zchladí na ledu.
3. Ke každému vzorku přidáme 8 µl roztoku B (výsledný reakční objem je tedy 12 µl).
4. Necháme probíhat reakci: 50 minut při 37 °C. Na konci reverzní transkripce se zařazuje krátká (10-minutová) denaturace (72 °C), načež se vzorky zchladí na ledu.
5. Pro vlastní PCR je třeba vzorky 10x zředit vodou, aby pufr z reverzní transkripce neovlivňoval podmínky následné reakce.

### 7.3.2 Kvantitativní PCR v reálném čase

Experimentální protokol s parametry jednotlivých částí cyklu polymerázové řetězové reakce přikládám jako tabulky 8 a 10. Jako fluorescenční sonda pro měření fluorescence po každém cyklu bylo použito interkalační barvivo SYBR Green.

Primery byly navrženy pomocí programů ze softwarového souboru Lasergene 7.1 (DNA Star). tak, aby nasedaly přibližně při teplotě 60 °C a aby mezi nimi byl pokud možno vložen nějaký intron (použité primery jsou uvedeny v tabulce 6). Díky tomu bylo možno případnou

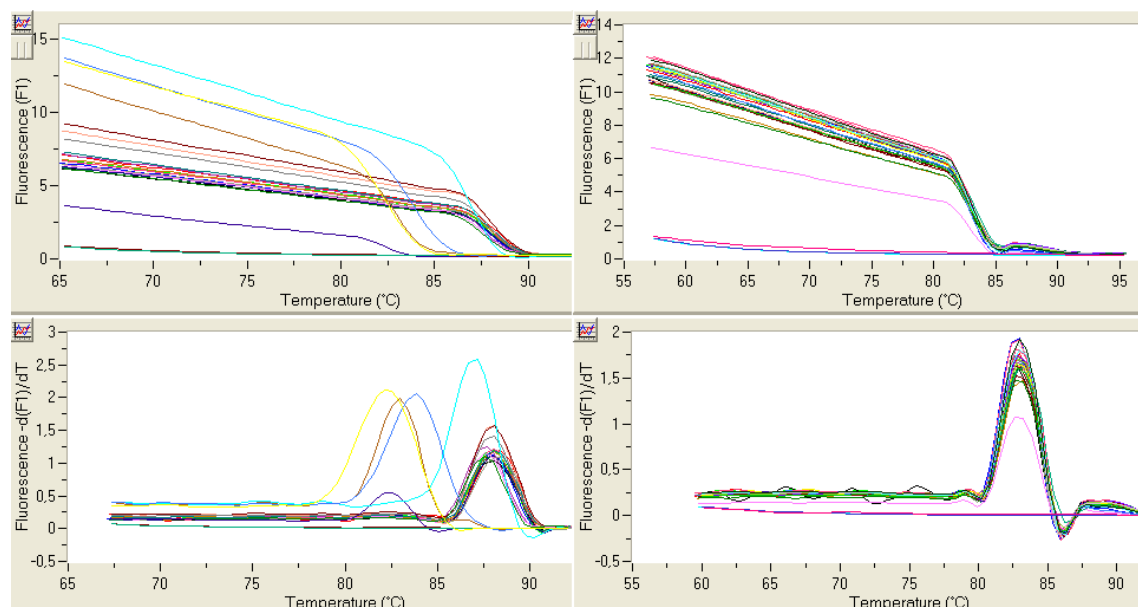
kontaminaci genomickou DNA odlišit pomocí denaturační analýzy. (Při délce intronu přesahující určitou mez se genomická DNA neamplifikuje prakticky vůbec.)

Gen	Kód GenBank	Sekvence	Délka produktu
18S RNA	19791	5'GCCCGAGCCGCCTGGATAC 5'CCGGCGGGTCATGGGAATAAC	299 pb
ACOT2	171210	5'TGGGAACACCATCTCCTACAA 5'CCACGACATCCAAGAGACCA	98 pb
ATGL	66853	5'CAAGGGGTGCGCTATGTGGATGG 5'AGGCGGTAGAGATTGCGAAGGTTG	188 pb
CoxIII	7668711	5'TCATCGTCTCGGAAGTATTTTT 5'ATTAGTAGGGCTTGATTTATGTGG	238 pb
CPT1-It	12894	5'GCAGCTCGCACATTACAAGGACAT 5'AGCCCCCGCCACAGGACACATAGT	413 pb
Cyklofilin- $\beta$	19035	5'ACTACGGGCCTGGCTGGGTGAG 5'TGCCGGAGTCGACAATGATGA	216 pb
EF-1 $\alpha$ -LC	13627	5'TGACAGCAAAAACGACCCACCAAT 5'GGGCCATCTICCAGCTTCTTACCA	192 pb
HSL	16890	5'ACCACATCGCCACAGCAGAGTC 5'CTTGAGCGCCGGGGTCAAAC	355 pb
NRF-1	18181	5'GGCGGGAGGATCTTTTATATGCTTTTGA 5'GGCCTCTGATGCTTGCGTCGTCT	314 pb
PGC-1 $\alpha$	19017	5'TGCCGTGTCTGTAGTGGCTTGATT 5'CCCAAAGGATGCGCTCTCGTT	150 pb
PPAR $\alpha$	19013	5'CCGGGTCATACTCGCAGGAAAGA 5'ATAGCAGCCACAAAAGGGAAATG	471 pb
SCD1	20249	5'TAGCTTTGGGTGCTTTATCTCTTTC 5'CTCTCCAGCCAGCCTCTTGACTATTC	120 pb
UCP1	22227	5'GACGGGGACCTACAATGCTTACAG 5'GGCCGTCGGTCCTTCCTT	337 pb

**Tabulka 6: Seznam použitých primerů pro kvantitativní PCR**

Denaturační analýza nastupuje po proběhnutí všech cyklů PCR a spočívá v postupném kontinuálním zahřívání vzorku z 57 až na 98 °C a současném měření fluorescence. DNA postupně denaturuje, až při určité teplotě (teplotě tání) skokově přechází do jednořetězcové formy. Tím náhle klesá fluorescence interkalačního činidla SYBR Green. Ze záznamu fluorescence během zahřívání tak můžeme odvodit teplotu tání. Pokud jsou primery skutečně specifické objeví se na grafu závislosti derivace fluorescence na teplotě u všech vzorků výrazné maximum při určité teplotě (viz obr. 3). (Pouze výrazně odlišné koncentrace amplifikované DNA mohou toto maximum poněkud posunout.) Pokud je vzorek kontaminován genomovou DNA a primery jsou navrženy tak, že se mezi nimi nachází nějaký intron, bude se amplifikovaný úsek genomické DNA lišit od úseku cDNA svou

velikostí a denaturační analýza tedy odhalí ve vzorku dvě maxima fluorescence. Podobně denaturační analýza odhalí nespecifické amplifikace a dimery primerů.



**Obrázek 3: Ukázky denaturační analýzy.**

Grafy závislosti fluorescence na teplotě (v horní části obrázku), resp. derivace fluorescence na teplotě (v dolní části obrázku). Grafy vlevo obsahují několik vzorků, u nichž došlo k nespecifické amplifikaci (k denuraci dochází při různých teplotách), graf vpravo je ukázkou správného specifického průběhu PCR. Různé barvy znázorňují různé vzorky. (Obrázky z programu LightCycler Data Analysis pro analýzu výsledků reakce na přístroji LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System.)

Při měření byly použity dva cyclery, oba od firmy Roche (USA). LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System má otočný měnič vzorků s 32 pozicemi. Vzorky se vkládají v tenkostěných borosilikátových kapilárách, které umožňují rychlé zprostředkování změn teploty.

LightCycler® 480 Real-Time PCR System má oproti tomu tu výhodu, že měří vzorky na 98-jamkových umělohmotných destičkách a má tedy větší kapacitu.

Pro měření na LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System byl použit DyNAmo Capillary SYBR® Green qPCR Kit firmy Finnzymes obsahující roztok s modifikovanou T<sub>br</sub> DNA polymerázou, fluorescenčním barvivem SYBR Green 1, optimalizovaným PCR puforem, 6 mM MgCl<sub>2</sub> a mixem dNTP. Tabulka 7 popisuje složení reakční směsi pro PCR, tabulka 8 ukazuje experimentální protokol řetězové reakce.

Složka	Přidaný objem [ $\mu$ l]	Výsledná koncentrace
2 x Dynamo kit roztok	5	1 x
5' primery (forward)	0,5	0,5 $\mu$ M
3' primery (reverse)	0,5	0,5 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O	3	
10x ředěný vzorek cDNA	1	
Celkem	10	

**Tabulka 7: Složení směsi pro qPCR na LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System**

	Cílová teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas, po který je teplota udržována [s]	Rychlost změny teploty [ $^{\circ}$ C/s]
Počáteční denaturace	95	600	20
Amplifikace (45 cyklů)			
Denaturace	95	10	20
Nasednutí primerů	60	20	20
Polymerace	72	20	20
Denaturační analýza			
Denaturace	95	0	20
Renaturace	57	15	20
Postupná denaturace	98	-	0,1
Ochlazení na bezpečnou teplotu	40	10	20

**Tabulka 8: Experimentální protokol pro qPCR na LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System.**

Fluorescence je měřena na konci každé polymerace v průběhu amplifikace a poté kontinuálně během postupné denaturace při denaturační analýze.

Pro měření na LightCycler® 480 Real-Time PCR System byl použit DyNAmo Light Cycler® 480 SYBR Green I Master Kit firmy Finnzymes obsahující roztok s modifikovanou FastStart Taq DNA polymerázu, fluorescenční barvivo SYBR Green 1, optimalizovaný PCR pufr, MgCl<sub>2</sub> a mix DTP (s dUTP místo dTTP). Tabulka 9 popisuje složení reakční směsi pro PCR, tabulka 10 ukazuje experimentální protokol řetězové reakce.

Složka	Přidaný objem [ $\mu$ l]	Výsledná koncentrace
2 x Master mix roztok	5	1 x
5' primery (forward)	0,5	0,5 $\mu$ M
3' primery (reverse)	0,5	0,5 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O	3	
10x ředěný vzorek cDNA	1	
Celkem	10	

**Tabulka 9: Složení směsi pro qPCR na LightCycler® 480 Real-Time PCR System**

	Cílová teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas, po který je teplota udržována [s]	Rychlost změny teploty [ $^{\circ}$ C/s]
Počáteční denaturace	95	300	4,4
Amplifikace (45 cyklů)			
Denaturace	95	10	4,4
Nasednutí primerů	60	20	2,2
Polymerace	72	20	4,4
Denaturační analýza			
Denaturace	95	5	4,4
Renaturace	65	60	2,2
Postupná denaturace	97	-	-
Ochlazení na bezpečnou teplotu	40	10	1,5

**Tabulka 10: Experimentální protokol pro qPCR na LightCycler® 480 Real-Time PCR System.**

Fluorescence je měřena na konci každé polymerace v průběhu amplifikace a poté kontinuálně během postupné denaturace při denaturační analýze.

Vyhodnocení:

Vzorky byly měřeny vždy minimálně ve dvou paralelních dubletech. Za spolehlivá přitom byla považována pouze měření, u nichž se koncentrace DNA v alikvotech jednoho vzorku nelišila více než o 20 %.

Aby bylo možné vyjádřit rozdíly v expresi genu u jednotlivých vzorků na reálné škále, je nutné sestavit kalibrační přímku. K tomu slouží ředící řada připravená z jednoho ze vzorků. Pět až šest standardů je dostačující pro proložení kalibrační přímkou. Pokud reakce probíhá správně, měla by se směrnice kalibrační přímkou pohybovat mezi -5,7 a -2,9 a korelační koeficient by měl být nižší než 0,2.

Protože není možné zajistit, aby bylo množství cDNA ve všech vzorcích přesně stejné, je nutné výsledky standardizovat. Ve stejných vzorcích se změní exprese genu, u něhož se vzhledem k jeho funkci nepředpokládá rozdílná exprese u jednotlivých skupin (tzv. referenční nebo též "house-keeping" gen -  $\beta$ -aktin, EF1 $\alpha$ ). Gen je pro tuto standardizaci vhodný tehdy, pokud je jeho průměrná exprese u všech pokusných skupin vyrovnaná. Pokud se pak výsledky měření genu našeho zájmu podělí příslušnými hodnotami exprese referenčního genu, získáme poměrné exprese nezkreslené rozdílnými vstupními koncentracemi cDNA.

## 7.4 Izolace adipocytů

Přístroje a pomůcky:

Termoblok

Vodní třepačka vyhřátá na 37 °C

Centrifuga

Silikonová sítko

Krebs-Ringer-bikarbonátový pufr (KRB) s poloviční koncentrací CaCl<sub>2</sub>:

118,50 mM NaCl

4,75 mM KCl

2,70 mM CaCl<sub>2</sub>

1,19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,09 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

25 mM NaHCO<sub>3</sub>

(připravuje se vždy čerstvý před měřením, probublává se pneumoxidem, pH 7,4)

Ke KRB se poté přidává glukóza (do výsledné koncentrace 5 mM) a albumin (do výsledného hmotnostního poměru 4 %).

Kolagenáza - na jeden vzorek je třeba 7,5 mg kolagenázy rozpuštěné v 2,5 ml KRB s albuminem a glukózou

Tuková tkáň odebíraná při disekci se umísťovala do čerstvého předehřátého KRB nasyceného pneumoxidem. Poté byla tkáň pečlivě nastříhána a během hodinové inkubace ve



37 °C se za stálého třepání rozpuštěna v 2,5 ml KRB media s kolagenázou. Natrávená tkáňová suspenze byla následně filtrována pomocí nálevky přes silikonové sítko do čisté zkumavky. Filtrát se opatrně centrifugoval (150 RPM – 4 g, 1 min). Po krátkém odstátí došlo k oddělení adipocytů, které flotují na hladině, od ostatních buněk a nečistot (stromatovaskulární frakce), které zůstávají suspendovány v roztoku. (Stromatovaskulární frakci je možné zahustit centrifugací a uložit pro analýzy např. genové exprese pomocí kvantitativní PCR.)

Vrstva adipocytů byla opět naředěna pětinasobným objemem KRB a bylo provedeno další kolo centrifugace. Celý postup se opakoval ještě několikrát podle čistoty buněk. Získané adipocyty posloužily jako materiál pro měření spotřeby kyslíku tukovou tkání (viz další kapitola). Takto získané adipocyty však mohou být kromě toho využity i pro měření genové exprese pomocí real time RT PCR a další analýzy.

## 7.5 Měření spotřeby kyslíku kyslíkovou elektrodou

KCl medium: 10 mM Tris-HCl

80 mM KCl

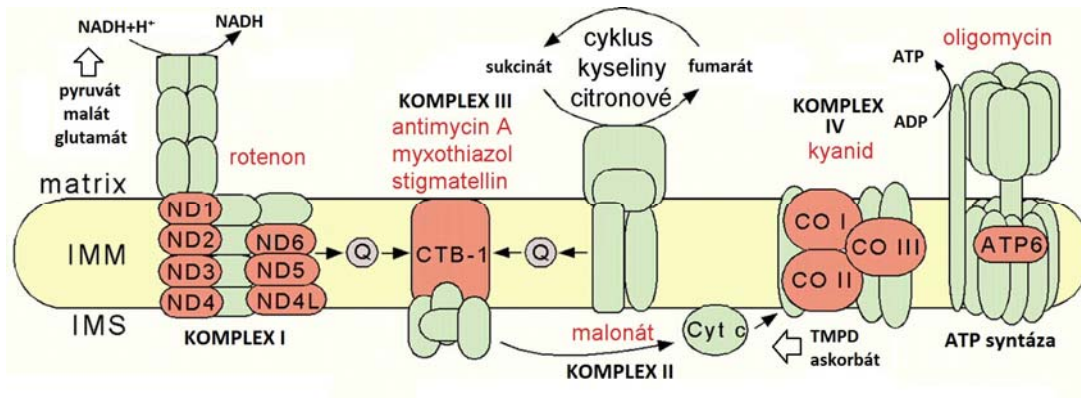
3 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 mM EDTA

pH upraveno na 7,4 (pomocí HCl) (Chowdhury, Drahota 2000)

Pro analýzu funkčnosti dýchacího řetězce a oxidační kapacity mitochondrií bylo použito měření obsahu kyslíku v mediu polarografickou Clarkovou elektrodou. Do komůrky oxygrafu OROBOROS Oxygraph-2k s vysokou rozlišovací schopností bylo přeneseno KCl medium se zkoumanými buňkami a komůrka byla neprodyšně uzavřena. Zátkou potom byly pomocí mikroinjekčních stříkaček vpravovány dovnitř inhibitory a substráty jednotlivých komplexů dýchacího řetězce, jak je uvedeno níže. Změna rychlosti úbytku kyslíku pak odráží rozdíly v úrovni dýchání.



**Obrázek 4: Schéma dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně.**

Vyznačeny jsou substráty jednotlivých komplexů, červeně inhibitory; podjednotky komplexů dýchacího řetězce jsou kódovány buď v jádře (zeleně) nebo v mitochondriálním genomu (oranžově) - na obrázku situace u *Caenorhabditis elegans* (u člověka je v mitochondrii navíc kódována ještě jedna podjednotka ATP syntázy - ATP8); IMM - vnitřní mitochondriální membrána (inner mitochondrial membrane), IMS - mezimembránový prostor (intermembrane space)  
(upraveno a doplněno podle Lemire, 2005)

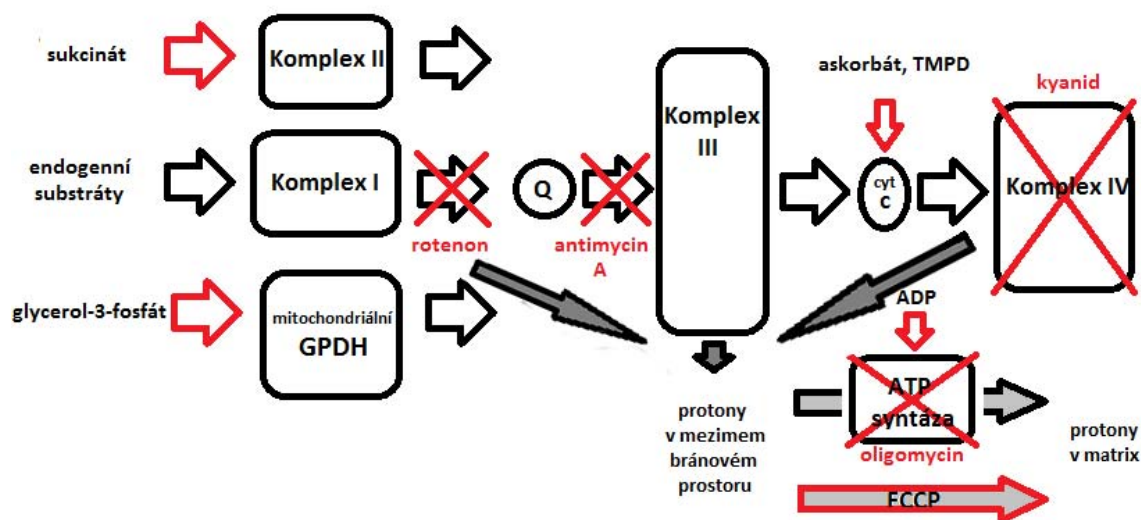
#### Princip metody - ovlivňování funkce dýchacího řetězce

Dýchací řetězec je systémem proteinových komplexů ve vnitřní mitochondriální membráně, jak ukazuje obrázek 4. Redukované přenašeče NADH+H<sup>+</sup> a FADH<sub>2</sub>, vznikající zejména oxidací mastných kyselin a citrátovým cyklem, odevzdávají své elektrony komplexům I a II. Dále pak elektrony putují ve směru vzrůstajícího redoxního potenciálu až ke konečnému akceptoru, kterým je kyslík. Redukcí kyslíku vzniká voda a měřením úbytku kyslíku proto můžeme sledovat aktivitu dýchacího řetězce. Funkci jednotlivých komplexů dýchacího řetězce můžeme ovlivňovat přidáváním specifických inhibitorů. Pokud např. inhibujeme rotenonem aktivitu komplexu I, můžeme sledovat aktivitu komplexu II. Pokud inhibujeme antimycinem A komplex III, zastavíme tím celý dýchací řetězec. (Jeho koncovou část, můžeme ovšem znovu spustit, pokud přidáme askorbát a TMPD - viz dále.)

Při průchodu elektronů komplexem I, III a IV jsou zároveň přes mitochondriální membránu čerpány protony do mezimembránového prostoru. Vzniká tak elektrochemický protonový gradient. Pokud nejsou protony nějakou cestou pouštěny nazpět, může jejich hromadění v mezimembránovém prostoru další průchod elektronů dýchacím řetězcem blokovat. Protony jsou ve většině buněk pouštěny zpět do matrix skrze ATP syntázu. Protonmotivní síla umožňuje tomuto enzymu slučovat ADP a anorganický fosfát za vzniku ATP. Nedostatek ADP jako substrátu ATP syntázy proto může inhibovat spřažený průchod elektronů komplexy I až IV. Pokud je aktivita ATP syntázy inhibována oligomycinem, zastaví se v důsledku hromadění protonů v mezimembránovém prostoru rovněž činnost dýchacího řetězce.

Mitochondrie, u nichž je jedinou cestou protonů z mezimembránového prostoru zpět do matrix ATP syntáza, nazýváme spřažené. Průchod protonů přes membránu však nemusí vést pouze přes ATP syntázu. Pokud v mitochondrii existuje jiná cesta, produkce ATP klesá a mitochondrie se dostává do odpráženého stavu. Kromě přirozených odpráhovačů (UCP – viz výše) mohou protonový gradient rušit i některé chemické látky. Příkladem je FCCP, který rovněž umožňuje protonům přechod přes membránu. Aplikace FCCP tedy odpráhne syntézu ATP od průchodu elektronů dýchacího řetězce. Proto i v mitochondriích s ATP syntázou inhibovanou oligomycinem, dochází po přidání FCCP k dalšímu nárůstu spotřeby kyslíku.

Komplexy I a II se mohou částečně zastupovat, jak vyplývá z obrázků 4 a 5. Pokud je však blokován přenos elektronů na komplex III, je zastavení dýchacího řetězce za fyziologických podmínek nevratné. V laboratorních podmínkách ovšem můžeme přidat substráty, které předávají elektrony přímo cytochromu c a obchází tedy komplex III. K tomuto účelu se používá TMPD a askorbát. Askorbát však může při kontaktu s kyslíkem autooxidovat. Je proto nutné odlišit spotřebu kyslíku na komplexu IV od autooxidace substrátu. Dobře k tomu poslouží inhibice komplexu IV kyanidem. Veškerý úbytek kyslíku je potom způsoben autooxidací a tak můžeme odečíst i aktivitu komplexu IV.



**Obrázek 5: Schéma pokusu měření kapacity dýchacího řetězce.**

Prázdné šipky - předávání elektronů, tmavě šedé šipky - pumpování protonů přes membránu do mezimembránového prostoru, světle šedé šipky - návrat protonů do matrix, červené šipky - dodávané substráty, červené nápisy a přeškrtnutí - dodávané inhibitory. Bližší vysvětlení v textu.

Jak vyplývá z výše řečeného, měření spotřeby kyslíku kyslíkovou elektrodou umožňuje shromáždit značné množství informací o jednotlivých komplexech dýchacího řetězce. V tabulce 11 je uveden protokol, který byl použit při experimentech popisovaných v této práci. Obsahuje pořadí, v jakém byly přidávány jednotlivé substráty a inhibitory, a znovu je zopakována jejich funkce.

Látka	Objem vpravený do komůrky	Účel
KCl médium	2 ml	
BSA	3 $\mu$ l	zajištění osmotických podmínek
Buňky	aby bylo v komůrce cca 1000000 buněk, 1 mg proteinu, nebo 200 $\mu$ l adipocytů	
digitonin (10 mg/ml)	3 $\mu$ l	permeabilizace buněk
rotenon (1 mM)	2 $\mu$ l	inhibice komplexu I
glycerofosfát (1 M)	20 $\mu$ l	substrát GPDH
sukcinát (1 M)	20 $\mu$ l	substrát komplexu II
cytochrom c (4 mM)	10 $\mu$ l	ověření kvality buněk
ADP (0,3 M)	10 $\mu$ l	substrát ATP-syntázy
oligomycin (4 mg/ml)	2 $\mu$ l	inhibitor ATP-syntázy
FCCP (1 mM)	několikrát 0,5 $\mu$ l	Odpřahovač
antimycin A (5 mM)	2 $\mu$ l	inhibitor komplexu III
(0,2 M askorbát, 0,8 M TMPD)	po 10 $\mu$ l	substráty komplexu IV
(1 M KCN)	5 $\mu$ l	inhibitor komplexu IV

**Tabulka 11: Protokol pro měření mitochondriální respirace.**

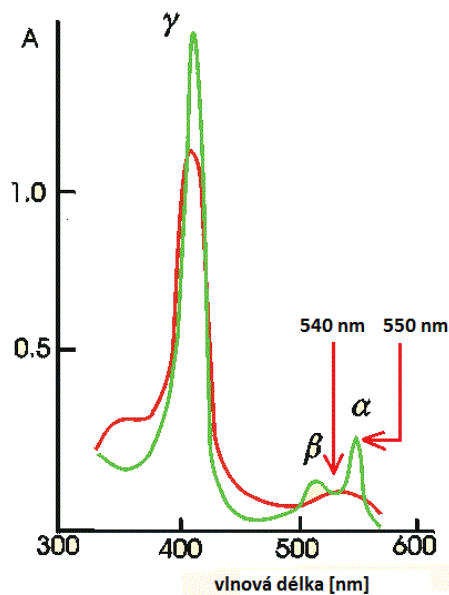
Přidání cytochromu c lze eventuálně zařadit hned za digitonin. Látky uváděné v závorkách nebyly nakonec zahrnuty do výsledků.

## 7.6 Spektrofotometrické stanovení obsahu mitochondrií v tkáňovém homogenátu

Obsah mitochondrií v tkáni lze změřit spektrofotometricky. Cytochromy mají specifické absorpční spektrum, které je závislé na redoxním stavu molekuly (viz obr. 6). Pokud změříme např. spektrum cytochromu c v redukovaném stavu můžeme z rozdílu absorbancí při 550 nm vypočítat podle Lambert-Beerova zákona koncentraci cytochromu ve vzorku.

Měření obsahu cytochromu v tukové tkáni je ovšem ztíženo malým množstvím mitochondrií a možným rušivým působením lipidů ve vzorku. Proto je nutno metodu upravit, aby se zvýšila její citlivost (viz níže).

Malý obsah mitochondrií znemožňuje použití klasického mezikroku při stanovování obsahu cytochromů, kterým je diferenační centrifugace mitochondrií. Místo toho je nutné izolovat celkovou membránovou frakci.



Obrázek 6: Absorpční spektrum cytochromu c v oxidovaném (červeně) a redukovaném stavu (zeleně). Upraveno podle Brdiczka 1999

### 7.6.1 Příprava membránové frakce

Přístroje

Homogenizátor Ultraturrax

Centrifuga

Ultracentrifuga

STE médium: 250 mM sacharóza

50 mM Tris-HCl

5 mM Na<sub>2</sub>EDTA

- pH upravit na 7,5 (pomocí HCl), uchovávat v lednici, trvanlivost maximálně 1 měsíc
- těsně před izolací přidat k médiu inhibitory proteáz, tak aby výsledný roztok obsahoval 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotininu, 1 µg/ml leupeptinu, 1 µg/ml pepstatinu A

Pro izolaci membránové frakce byly nejprve pomocí ručního homogenizátoru Ultraturrax připraveny tkáňové homogenáty ve STE médiu. Následovali dvě pročišťovací centrifugace (10 minut, 600 g, 4 °C). Pro další izolaci byl použit supernatant, zatímco pelet, složený zejména z buněčného debris, a horní lipidová frakce byly odstraněny.

Během následné ultracentrifugace (45 minut, 100 000 g, 4 °C) sedimentovaly veškeré membrány ve vzorku a vytvořily pelet. Po odsátí supernatantu byl pelet s pomocí sonikace resuspendován v malém množství STE média (150 µl). Membránová frakce byla následně rozdělena na několik alikvot: pro stanovení proteinu metodou BCA (30 µl), pro stanovení aktivity cytochrom oxidázy (Cox), pro stanovení obsahu cytochromu b (30-40 µl). Vzorky pro stanovení aktivity Cox a obsahu cytochromu b byly zmrazeny v tekutém dusíku a poté skladovány při -70 °C.

## 7.6.2 Stanovení obsahu cytochromů v tukové tkáni pseudo-duální spektrofotometrií

Přístroje:

Příruční centrifuga

Vortex

Spektrofotometr

Chemikálie: 10 % lauroyl maltosid (LM)

dithioničitan sodný

médium: 24 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

10 mM Tris-HCl

60 mM  $\text{MgCl}_2$

90 mM sacharóza

Princip:

Jak už bylo uvedeno výše lze na koncentraci cytochromů ve vzorku usuzovat podle změny absorbance mezi redukováným a oxidovaným stavem při určitých vlnových délkách (např. pro cytochrom c 550 nm). Citlivost metody lze ale zvýšit tak, že se změří větší výsek spektra v průběhu času a poté se spočte rozdíl vlnové délky, při které se absorbance mění podle redoxního stavu cytochromu, a vlnové délky, při které se absorbance nemění (pro cytochrom c 540 nm - viz obr.; vlnové délky pro další cytochromy viz tabulka 12).

cytochrom	$\lambda$ se stálou absorbancí [nm]	$\lambda$ s měnící se absorbancí [nm]	$\epsilon$ [mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ]
a + a3	590	605	9,7
b	577	563	17,9
c + c1	540	552	19,6

**Tabulka 12: Spektrální vlastnosti cytochromů.**

Vlnové délky ( $\lambda$ ), při kterých se mění absorbance jednotlivých cytochromů a délky ( $\lambda$ ), při kterých zůstává stejná; molární extinkční koeficienty ( $\epsilon$ ) pro jednotlivé cytochromy.

Po přidání redukčního činidla (např. dithioničitanu sodného) se tak zvýší rozdíl mezi těmito dvěma vlnovými délkami a z něho můžeme spočítat koncentraci cytochromů podle vztahu:

$c$  [pmol cyt. / mg prot.] =  $(\Delta A \cdot 1\,000\,000) / (\epsilon$  [mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>].  $l$  [cm].  $c$  [mg prot. / ml  $\odot$ ], kde  $\epsilon$  je molární extinkční koeficient a  $l$  je délka kyvety, kterou prochází paprsek.

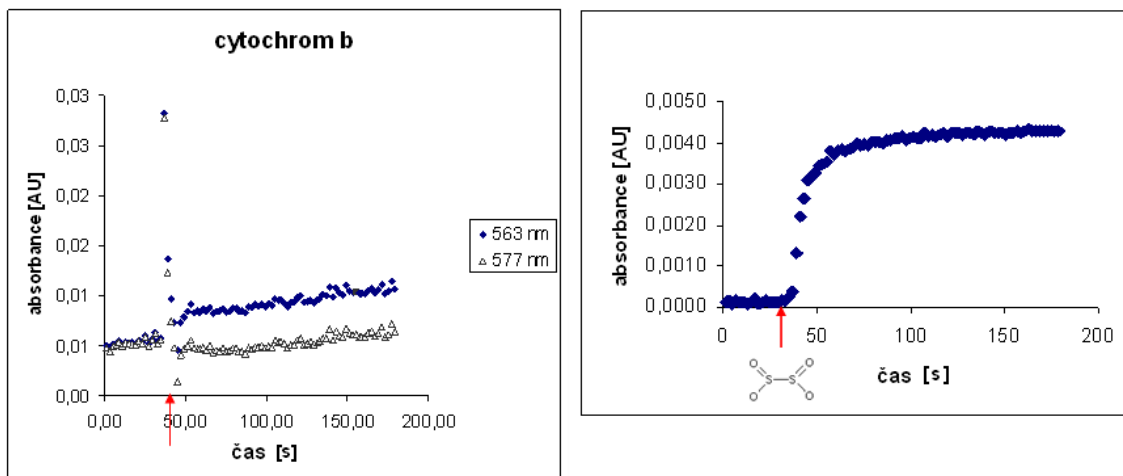
V našem případě bylo měření prováděno po dobu 3 minut, přičemž po 40 s byl k roztoku přidán dithioničitan. Absorbance byla měřena každé 2 s, takže výsledkem bylo řada 90 bodů pro změřené absorbance při dvou vlnových délkách (viz obr. 7). Rozdíl těchto absorbancí se výrazně zvětšil po přidání dithioničitanu. Body v oxidovaném stavu (před přidáním dithioničitanu) a v redukovaném stavu (po přidání dithioničitanu) byly proloženy horizontální přímkami. Rozdíl těchto průměrných absorbancí pak představoval  $\Delta A$  pro výpočet koncentrace cytochromů.

Příprava vzorků:

Rozmrzájící vzorky membránových frakcí z tukové tkáně (o koncentraci 10 až 50 mg/ml) se smísí s 10 % LM v objemovém poměru 4:1 (tedy např. 40  $\mu$ l membránové frakce s 10  $\mu$ l LM). Vzorek se promíchá na vortexu a nechá se inkubovat alespoň 5 minut na ledu, aby došlo k uvolnění membránových proteinů působením detergentu.

Mezitím se ve spektrofotometru vyhřívá na 25 °C kyveta s 1800  $\mu$ l média a magnetickým míchadlem. Po inkubaci se přidá do kyvety vzorek s LM. 3 minuty se nechá míchat a zahřívá a poté započne 3 minutové měření absorbancí ve vybraných vlnových délkách. Po 40 s se ke vzorku, který je neustále magneticky promícháván, přidává několik zrněk dithioničitanu.

Měření a vyhodnocování probíhá, jak bylo popsáno výše.



**Obrázek 7: Měření absorbance cytochromu b.**

Vlevo: Absorbance vzorku jaterní membránové frakce při 563 a 577 nm v průběhu pokusu. Vpravo: Rozdíl absorbancí při vlnových délkách 563 a 577 nm v průběhu pokusu (odpovídá grafu vlevo). Červené šipky označují přidání dithioničitanu sodného.

### 7.6.3 Stanovení aktivity cytochrom oxidázy v tukové tkáni

**Přístroje:** Spektrofotometr Shimadzu

**Chemikálie:**

KPi pufr ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  :  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 38,5 : 61,5; pH 7,0), 20% BSA, 15% LM, 1 mM redukovaný cytochrom c, ferrikyanid draselný

Cytochrom oxidáza (komplex IV dýchacího řetězce) odebírá elektrony z cytochromu c a redukuje jimi kyslík na vodu. Protože má oxidovaný cytochrom při 550 nm nižší absorbanci než redukovaný cytochrom, lze aktivitu cytochrom oxidázy vyjádřit jako úbytek absorbance cytochromu c při 550 nm.

Změna absorbance se měří v plastových kyvetách v 1 ml roztoku. Nejprve se v rohu kyvety nechá krátce inkubovat cca 20  $\mu\text{l}$  membránových frakcí nebo tkáňového homogenátu s 8,6  $\mu\text{l}$  20 % LM. Poté se přidá 40  $\mu\text{l}$  KPi pufru (výsledná koncentrace 40 mM), 5  $\mu\text{l}$  20% BSA (výsledná koncentrace 1 mg/ml) a doplní se vodou do neclého 1 ml (v dalším kroku se přidává ještě určitý objem cytochromu c).

Absorbance tohoto roztoku je stanovena jako nula. Poté se přidá takový objem cytochromu, aby byla výsledná koncentrace jeho redukované formy v roztoku 25  $\mu\text{M}$ . (Koncentraci redukovaného cytochromu c lze předběžně stanovit pomocí měření změny absorbance při 550 nm po přidání oxidačního činidla, např. ferrikyanidu draselného. Výpočet koncentrace



ze změny absorbance je pak obdobný jako v předchozí kapitole, jen se nevztahuje na koncentraci proteinu:  $c = \Delta A / l \cdot \varepsilon$  [mM].)

Problém může představovat zajištění redukováného cytochromu c. Jelikož tato látka na vzduchu snadno oxiduje, je nutné ji redukovat pomocí dithioničitanu sodného, poté redukční činidlo oddělit od cytochromu na sephadexové koloně a alikvoty redukováného cytochromu c poté zaparafilmovat a zamrazit. K pokusům v této práci byl redukováný cytochrom c zapůjčen Bc. Hanou Nůskovou z Oddělení bioenergetiky FgÚ AV ČR.

## 7.7 Měření oxidace mastných kyselin

Oxidace mastných kyselin byla měřena prostřednictvím stanovení rychlosti rozkladu  $1\text{-}^{14}\text{C}$  značeného palmitátu v kultuře buněk. Při experimentech na vzorcích tkáně se standardně používá jímání unikajícího radioaktivního oxidu uhličitého hyamin hydroxidem. Tento protokol však lze v podmínkách tkáňových kultur jen obtížně realizovat a proto bylo použito náhradní stanovení obratu  $\beta$ -oxidace pomocí kvantifikace  $^{14}\text{C}$  značených metabolitů rozpustných v kyselinách (ASM - acid-soluble metabolites).

Buňky byly pěstovány na 24-jamkových destičkách. Před vlastním měřením bylo z jamek odsáto staré médium a přidáno 360  $\mu\text{l}$  nového. Do části jamek byly přidány aktivátory AMPK (AICAR), popř. SIRT1 (resveratrol). Po dvouhodinové inkubaci se do jamek přidalo 40  $\mu\text{l}$  média s 1 % BSA,  $1\text{-}^{14}\text{C}$  značeným palmitátem a neznačeným palmitátem. Výsledná koncentrace  $1\text{-}^{14}\text{C}$  palmitátu v jamce byla 9,5  $\mu\text{M}$  a jeho aktivita 0,09  $\mu\text{Ci}$ , koncentrace neznačeného palmitátu v jamce byla 50  $\mu\text{M}$ . Buňky byly poté dalších 30 minut inkubovány v 37 °C.

Po inkubaci bylo odsáto médium a jamky se promyly roztokem PBS. Poté se na buňky nechalo cca 30 minut působit 400  $\mu\text{l}$  5 %  $\text{HClO}_4$  při laboratorní teplotě. Roztok byl přenesen do mikrozkušavek a centrifugován 10 minut při 13000 g. Následně bylo 300  $\mu\text{l}$  supernatantu přemístěno do scintilačních nádobek. Radioaktivita v roztoku  $\text{HClO}_4$  byla měřena pomocí scintilačního počítače v 5 ml scintilačního roztoku Ultima Gold, Perkin Elmer).

Část jamek nebyla použita pro měření oxidace mastných kyselin, ale buňky z nich byly sklizeny a přepočítány v Bürkerově komůrce nebo v nich byl kvantifikován obsah DNA. K tomuto standardu pak byly vztahovány výsledky oxidace jednotlivých skupin.

## 7.8 Statistické vyhodnocení

Data byla podrobena statistické analýze v programu SigmaStat 3.1 od firmy Systat Software. Za předpokladu normality dat byl použit t-test, resp. jednocestná ANOVA s Holm-Sidak post-hoc testem. Hladina statistické významnosti byla stanovena na  $p < 0,05$ . Všechny výsledné hodnoty jsou uváděny jako výběrové průměry a variability jsou vyjádřeny jako střední chyby výběrového průměru (SE).

## 7.9 Seznam přístrojů a chemikálií

### 7.9.1 Přístroje

Aparatura pro horizontální elektroforézu G45/0 .....	Biometra
Automatické pipety v rozsahu 0,2 - 1000 $\mu$ l .....	Gilson
Centrifuga 3K18 .....	Hettich
Fluorimetr Victor .....	Perkin Elmer
Homogenizátor Ultra-Turrax T8.01 .....	IKA
Light Cycler 2.0 .....	Roche
Light Cycler 480 .....	Roche
Oxygraph 2k .....	Oroboros
pH metr InLab level .....	WTW
Přístroj pro reverzní transkripci .....	Biometra
Spektrofotometr .....	Shimadzu
Spektrofotometr AG Biophotometer .....	Eppendorf
Spektrofotometr UV-Vis8453 .....	Hewlett Packard
Ultracentrifuga .....	Beckman
Ultrasonic disintegrator Soniprep 150 .....	Sanyo
Váhy AEP 150G .....	Adam Instruments
Vakuová sušička .....	Heto

## 7.9.2 Chemikálie

Do seznamu nejsou zahrnuty standardní laboratorní chemikálie jako např. anorganické soli. Ty byly dodány firmami Penta (ČR) nebo Lachema (ČR). Všechny chemikálie byly používány v analytické čistotě.

ADP .....	Sigma
AICAR .....	Sigma
Antimycin A .....	Sigma
Aprotinin .....	Fluka
Asorbát .....	Sigma
BCA .....	Sigma
BSA Serva .....	Serva
Bisbenzimidin Hoechst 33258 .....	Serva
Cytochrom c .....	Sigma
Digitonin .....	Fluka
Dithioničitan sodný .....	Sigma
DMSO .....	Sigma
EDTA .....	Sigma
Ethidium bromid .....	Sigma
1- <sup>14</sup> C palmitát .....	Perkin Elmer
D-MEM .....	Lonza
dNTP (10 mM) .....	Invitrogen
Dynamo Capillary SYBR Green qPCR Kit .....	Finnzymes
FBS (FCS) .....	Lonza
FCCP .....	Sigma
Ferrikyanid draselný .....	Lachema
Glycerol-3-fosfát .....	Sigma
KCN .....	Sigma
Kolagenáza .....	Sigma
Lauroyl maltosid (n-dodecyl-β-D-maltosid) .....	Sigma
Leupeptin .....	Sigma
LightCycler 480 Sybr Green I Master .....	Roche
M-MLV reverzní transkriptáza (200 U/μl) .....	Invitrogen
Oligo T (1 M) .....	Invitrogen

Oligomycin .....	Sigma
Penicilin+streptomycin .....	Lonza
Pepstatin .....	Sigma
PMSF .....	Sigma
Primery pro PCR .....	Invitrogen
Proteináza K .....	Merck
Rotenon .....	Sigma
5x pufr pro reverzní transkripci .....	Invitrogen
Resveratrol ze SIRT1 Fluorimetric Drug Discovery Kit .....	Enzo
Scintilační roztok Ultima Gold .....	Perkin Elmer
Sukcinát .....	Sigma
TMPD .....	Sigma
TRizol .....	Invitrogen
Versen-trypsin .....	Lonza

## 8 Výsledky

### 8.1 Zavádění metody spektrofotometrického stanovení cytochromů v tukové tkáni

Jako příprava na pozdější měření charakteristik obsahu mitochondrií v tukové tkáni mi připadl úkol znovu v naší laboratoři zavést již několik let nepoužívanou metodu kvantifikace množství mitochondrií pomocí měření absorbance cytochromů. K tomuto účelu byly připraveny membránové frakce z kosterního svalu, hnědé tukové tkáně, gonadálního tuku a z jater. V každé membránové frakci byl následně spektrofotometricky stanoven obsah cytochromů a vztažen na množství proteinu změřené metodou BCA. Výsledky shrnuje tabulka 13.

Obsah cytochromu b [pmol cyt / mg prot]	hnědý tuk	sval	játra	gonadální tuk
1. měření	835	694	406	1091
2. měření	850	832	552	764
3. měření	261	571	469	244
4. měření		518	533	3147

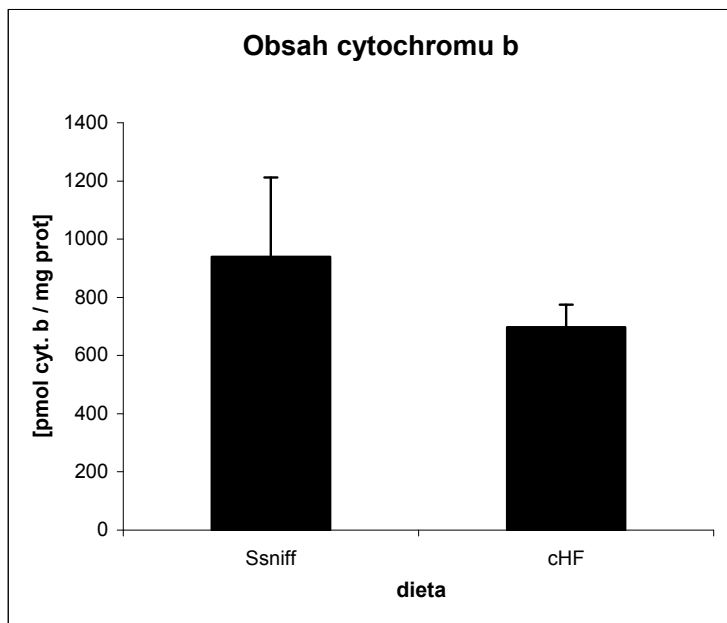
**Tabulka 13: Obsah cytochromu b v různých tkáních.**

Výsledky prvního spektrofotometrického měření obsahu cytochromu b v membránové frakci připravené z různých typů tkání

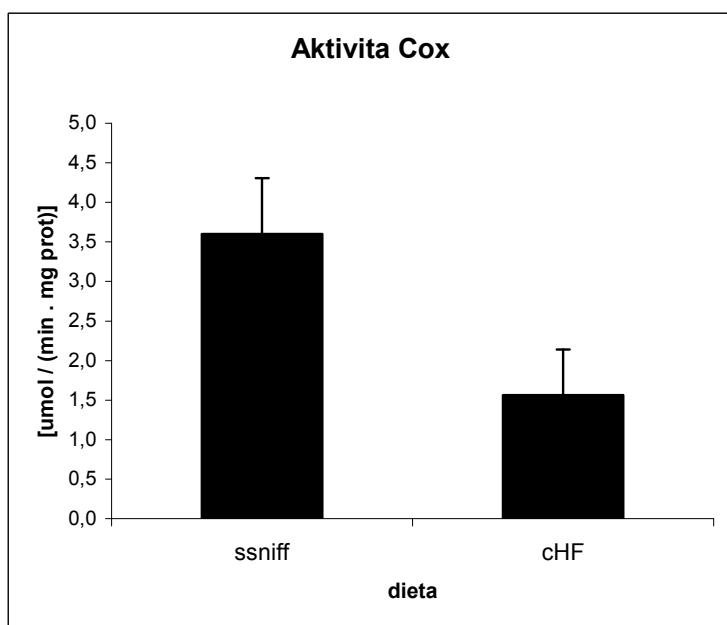
Jak vyplývá z tabulky, lze zaváděnou metodou získat při dostatečném počtu vzorků nebo měření poměrně konzistentní výsledky. Přesto se nelze vyvarovat výskytu odlehých hodnot. Riziko je přitom obzvláště vysoké v případě bílé tukové tkáně (gonadálního tuku), kde je podíl mitochondrií v buňce poměrně nízký a nachází se zde naopak velké množství lipidů, které mohou měření zkreslovat.

V dalším kroku byl učiněn pokus porovnat touto metodou vzorky gonadálního (epididymálního) tuku myši krmených standardní dietou Ssniff s myšmi krmenými cHF dietou. Výsledky shrnuje obrázek obrázku 8. Z grafu je patrný trend snižování obsahu cytochromu b v reakci na zvýšený příjem lipidů v dietě. Rozdíl není průkazný, podobný profil však má i aktivita cytochrom oxidázy měřená paralelně na stejných vzorcích (viz obrázek 9).

**Závěr:** Metoda kvantifikace obsahu mitochondrií prostřednictvím spektrofotometrického stanovení koncentrace cytochromu b v membránové frakci je při dostatečném počtu vzorků použitelná i pro měření v bílé tukové tkáni.



**Obrázek 8: Obsah cytochromu b v membránové frakci z gonadálního tuku myši krměných standardní dietou (Ssniff - n=7) a dietou s vysokým obsahem tuku (cHF - n=3).**



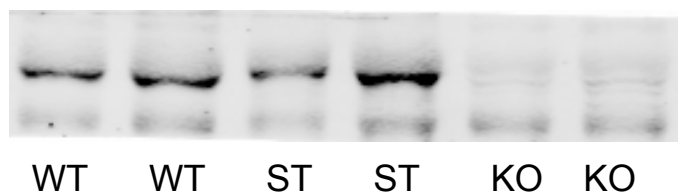
**Obrázek 9: Aktivita cytochrom oxidázy v membránové frakci z gonadálního tuku myši krměných standardní dietou (Ssniff - n=7) a dietou s vysokým obsahem tuku (cHF - n=3).**

## 8.2 Zavádění modelu AMPK $\alpha$ KO MEF

AMPK $\alpha$  KO buněčná linie odvozená od MEF byla poskytnuta spřátelenou laboratoří spolu s kontrolní linií wt buněk. Práce s AMPK $\alpha$  KO buňkami byla rozdělena do čtyř experimentů.

### 8.2.1 Experiment 1 – ověřování genotypu buněčné linie

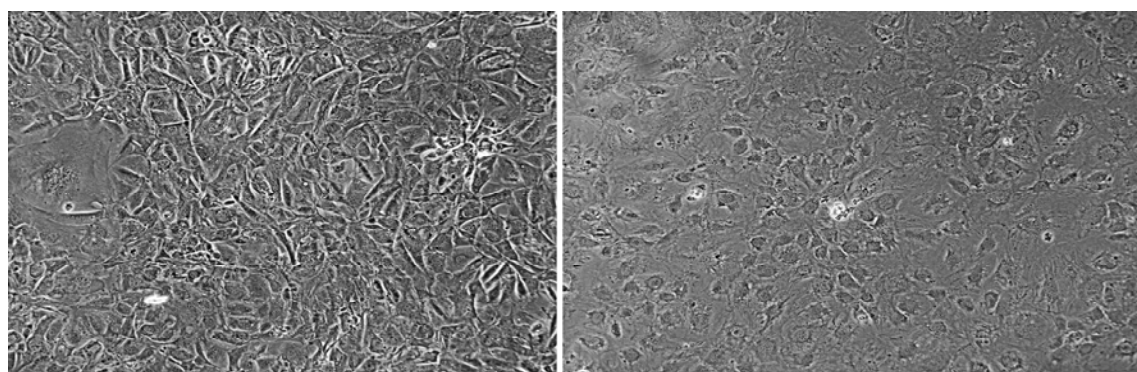
Pro kontrolu, že AMPK je skutečně exprimována pouze u kontrolních wt MEF provedla kolegyně Ing. Petra Janovská imunoblot s protilátkami vážícími se k oběma subtypům katalytické podjednotky AMPK $\alpha$ . Výsledek ukazuje obrázek 10.  $\alpha$  podjednotka je skutečně přítomna pouze ve wt buňkách.



**Obrázek 10: Důkaz KO v AMPK $\alpha$ .**

Imunoblot s protilátkami proti  $\alpha$ -podjednotce AMPK (WT – wt MEF, ST – standard obsahující AMPK $\alpha$ , KO – AMPK $\alpha$  KO MEF)

Odlišný genotyp se přitom projevil i v morfologii buněk v tkáňové kultuře. AMPK $\alpha$  KO MEF dosahovaly mnohem nižších nárůstových hustot a lišili se od wt linie rovněž tvarem buněk (viz obrázek 11).

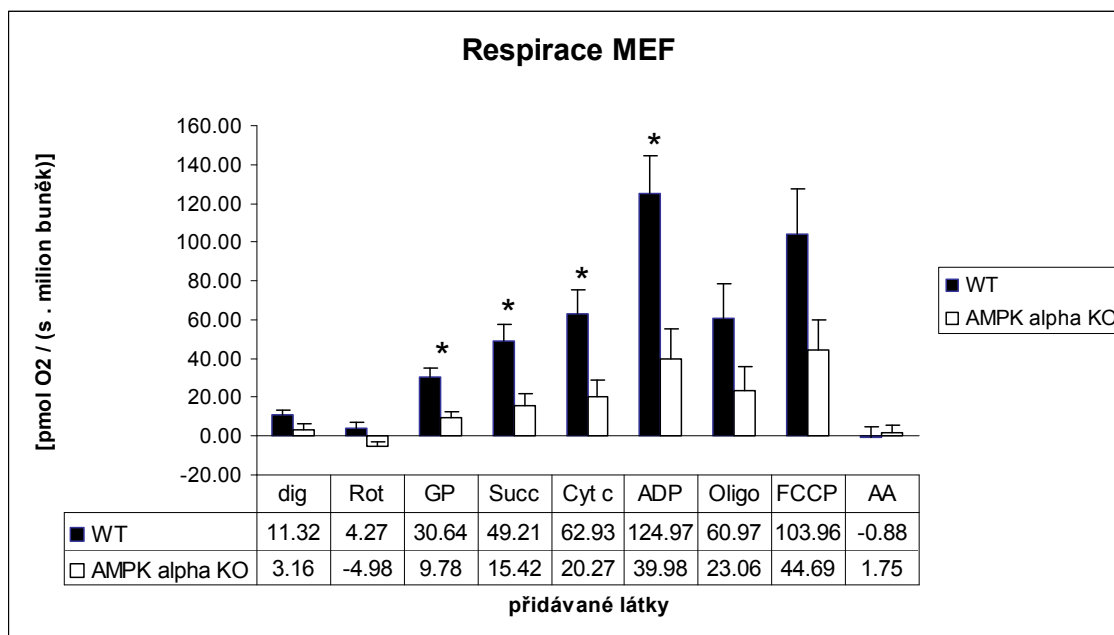


**Obrázek 11: Wt MEF (vlevo) a AMPK $\alpha$  KO MEF (vpravo) týden po pasáži**

### 8.2.2 Experiment 2 – Měření mitochondriální oxidace

Buňky byly sklizeny a za čerstva proměřena jejich mitochondriální respirace. Výsledky 4 opakování experimentu vztažené na počet buněk shrnuje graf na obr. 12. Při aktivaci komplexu II, GPDH a ATP syntázy byla kapacita dýchacího řetězce u AMPK KO MEF

průkazně snížena. Nebyl však zaznamenán žádný rozdíl v míře respirace před a po přidání ADP. Míru spřažení mitochondrií v tomto pokuse nebylo možno vyhodnotit, protože byl přidán příliš velký objem FCCP, který měl na respiraci inhibiční efekt (spotřeba kyslíku byla po přidání FCCP nižší než po přidání ADP). Pro podrobnější komentář výsledků měření spotřeby kyslíku viz kapitolu 8.5.2.



**Obrázek 12: Spotřeba kyslíku permeabilizovanými MEF (AMPK $\alpha$  KO vs. Wt).**

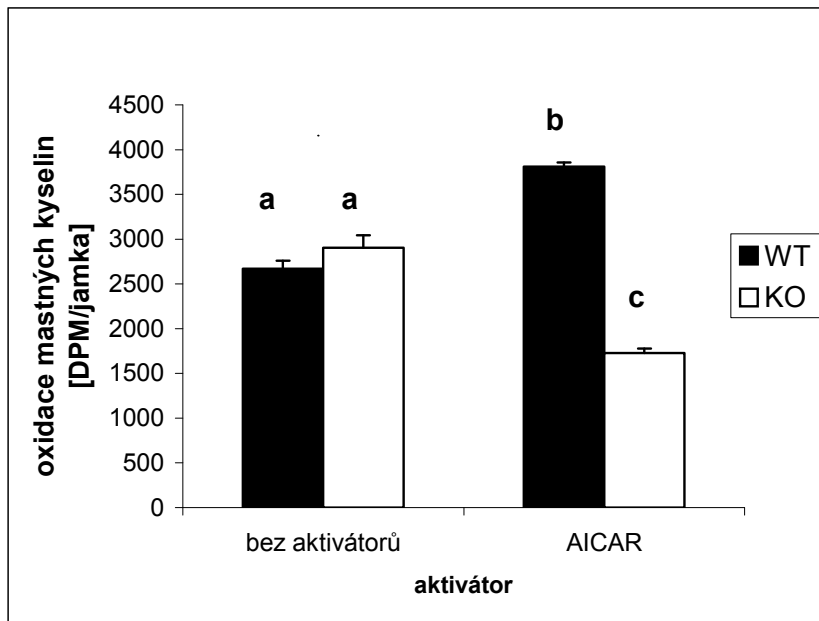
Spotřeba kyslíku během přidávání různých substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů dýchacího řetězce. Průměry čtyř měření. (dig – digitonin, Rot – rotenon, GP – glycerolfosfát, Succ – sukcinát, Cyt c – cytochrom c, Oligo – oligomycin, AA – antimycin A), n=4, \* průkazný rozdíl mezi skupinami (p < 0,05).

### 8.2.3 Experiment 3 – Oxidace mastných kyselin stimulovaná aktivátorem AICAR

Dalším pokusem, který byl na MEF prováděn, bylo měření oxidace mastných kyselin. V prvním kroku byla zkoumána aktivace AMPK hodinovou preinkubací v médiu obohaceném o AICAR (1 mM). Výsledek měření scintilačního počítače v roztoku HClO<sub>4</sub> byl vynásoben poměrem počtu buněk.

Mezi oběma skupinami nebyl zjištěn rozdíl v obratu oxidace mastných kyselin bez přidání aktivátoru. U wt buněk AICAR prokazatelně stimuloval oxidaci mastných kyselin. V souladu s očekáváním nebyl u AMPK $\alpha$  KO buněk tento efekt pozorován. Překvapivý však je signifikantní pokles obratu  $\beta$ -oxidace v reakci na inkubaci s aktivátorem AICAR. Výsledky přehledně shrnuje obrázek 13.





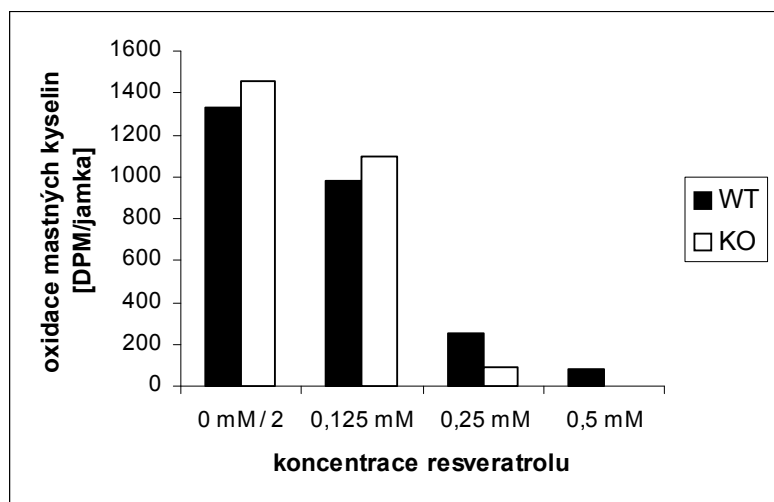
**Obrázek 13: Oxidace mastných kyselin u AMPK $\alpha$  KO a WT MEF.**

Srovnání úrovně oxidace bez inkubace s aktivátorem AICAR, a po dvouhodinové inkubaci s touto látkou. Mezi sloupci označenými různými písmeny jsou prokazatelné rozdíly ( $p < 0,05$ ). (n=6).

#### 8.2.4 Experiment 4 - Oxidace mastných kyselin stimulovaná resveratolem

V dalším experimentu byla studována  $\beta$ -oxidace u obou skupin MEF v reakci na stimulaci resveratolem. Byly použity tři různé výsledné koncentrace resveratrolu v médiu (0,5 mM, 0,25 mM a 0,125 mM) a dvouhodinová inkubace. Jako kontrola byly použity buňky neinkubované s resveratolem. V každé skupině byly měřeny pouze dvě jamky. Byl použit resveratrol z kitu SIRT1 Fluorimetric Drug Discovery Kit firmy Enzo. Zásobní roztok resveratrolu obsahoval DMSO, a proto byla ke kontrolním buňkám přidána odpovídající koncentrace této látky.

Výsledky překvapivě ukázaly dramatický pokles obratu oxidace mastných kyselin po inkubaci s resveratolem ve srovnání s kontrolou. Mezi koncentrací resveratrolu a oxidací mastných kyselin přitom existovala negativní korelace. Zdá se, že vyšší dávky SIRT1 inhibují  $\beta$ -oxidaci. Výsledky shrnuje obrázek 14.



**Obrázek 14: Oxidace mastných kyselin v závislosti na koncentraci resveratrolu při inkubaci.** WT - wt myši embryonální fibroblasty, KO - AMPK $\alpha$  double KO myši embryonální fibroblasty (n=2).

**Závěry:** Bylo zjištěno, že kapacita dýchacího řetězce je v buňkách s vyřazenými geny pro obě katalytické podjednotky ATP syntázy průkazně snížena. Inhibice dýchacího řetězce hromaděním protonů v mezimembránovém prostoru (spřažení mitochondrií, na které ukazuje mj. procentuální rozdíl mezi respirací ve stavu před a po přidání ADP) je však srovnatelná jako u wt buněk.

Při měření oxidace mastných kyselin bylo zjištěno, že wt i AMPK $\alpha$  KO oxidují zhruba se stejnou intenzitou, AMPK $\alpha$  KO buňky však nejsou stimulovány aktivátorem AICAR a reagují naopak poklesem míry oxidace mastných kyselin. Zdá se, že vyšší dávky resveratrolu mohou působit na  $\beta$ -oxidaci inhibičně.

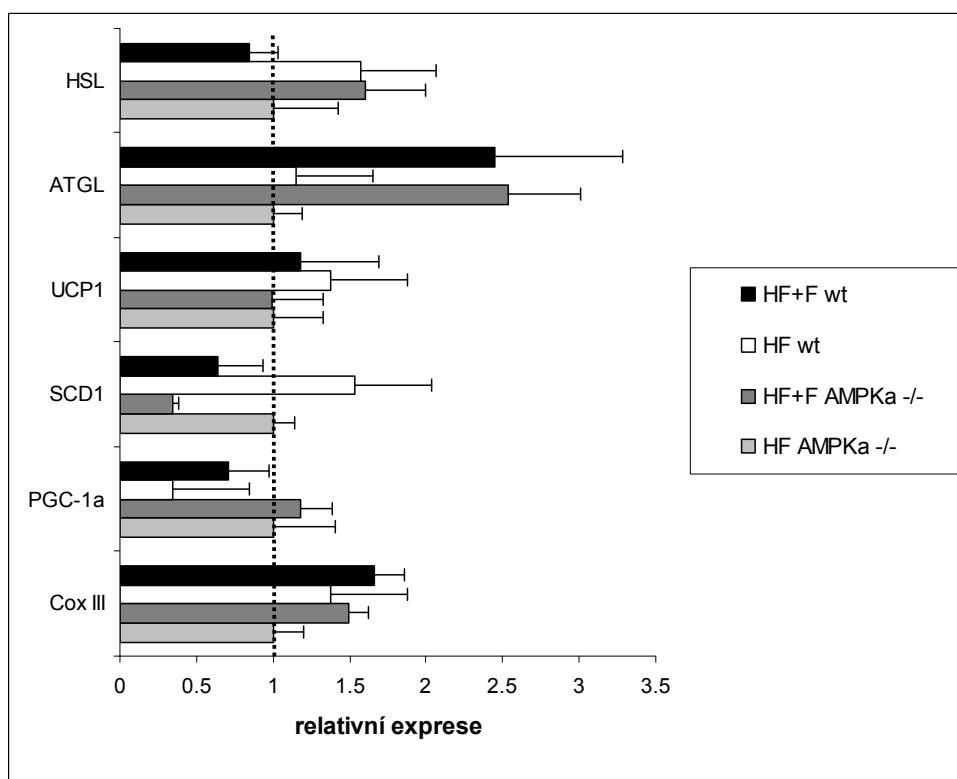
### 8.3 Pokusy s AMPK $\alpha$ 1 -/- myši – měření genové exprese v gonadálním tukovém depu

AMPK $\alpha$ 1 -/- myši a kontrolní wt myši (AMPK $\alpha$ 1 -/-) (na začátku experimentu ve věku 4 měsíce) byly krmeny po dobu 9 týdnů dietami cHF a cHF+F. V průběhu pokusu byla na myších prováděna měření metodou nepřímé kalorimetrie. Na konci pokusu byla odebrána tuková tkáň pro histologickou analýzu velikosti a počtu adipocytů, epididymální (gonadální) tuková tkáň pro analýzu genové exprese a krevní plazma pro stanovení hladiny metabolitů a hormonů.

Mně byla svěřena analýza genové exprese v bílé tukové tkáni metodou kvantitativní RT PCR. Byly zkoumány lipolytické geny (ATGL a HSL), markery mitochondriální biogeneze a

obsahu mitochondrií (PGC-1 $\alpha$  a Cox III), odpřahující protein UCP1 a desaturáza mastných kyselin SCD1, účastníci se syntézy nenasycených mastných kyselin. Hladina exprese zkoumaných genů byla vztažena k obsahu RNA v původním vzorku před reverzní transkripcí, protože žádný z použitých referenčních genů (EF-1 $\alpha$ , cyklofilin  $\beta$ , 18S rRNA) nevykazoval vyváženou expresi u všech skupin. Získané hodnoty byly následně přepočítány tak, aby průměrná exprese u skupiny AMPK $\alpha$  -/- myši na cHF dietě byla rovna hodnotě 1. Výsledky experimentu shrnuje graf na obrázku 15.

Nebyl nalezen žádný průkazný vztah mezi dietou a genotypem. Signifikantní je pouze snížení exprese SCD1 u skupin na dietě cHF+F. Naopak exprese ATGL je cHF+F dietou mírně zvýšena, tento trend však není průkazný.



**Obrázek 15: Genová exprese v tukové tkáni AMPK $\alpha$ 1 -/- myši.**

Výsledky měření relativní genové exprese zkoumaných markerů metabolismu v závislosti na dietě (cHF vs. cHF+F) a genotypu (wt vs. AMPK $\alpha$ 1 -/-). Průměrná hodnota exprese u skupiny cHF AMPK $\alpha$ 1 -/- byla stanovena na hodnotu 1, aby bylo možné porovnat mezi sebou jednotlivé geny. Interakce mezi dietou a genotypem není pro žádný z měřených genů signifikantní.

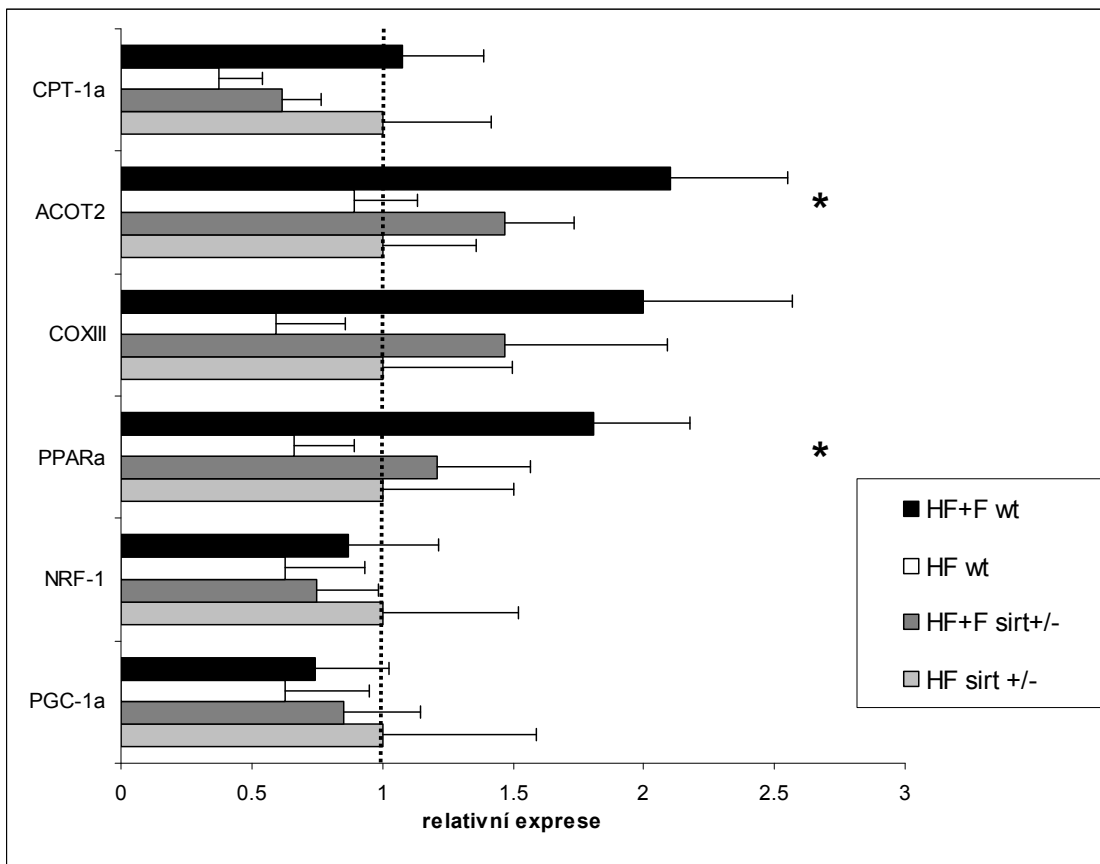
**Závěr:** V gonadálním tukovém depu AMPK $\alpha$ 1 -/- myši nebyly na úrovni genové exprese prokázány žádné významné rozdíly oproti wt myším. Nebyla nalezena žádná interakce mezi genotypem myši a dietou.

## 8.4 Měření genové exprese u SIRT1 +/- myši

SIRT +/- myši a kontrolní SIRT +/+ myši kmene C57BL/6 byly krmeny po 2 týdny CHF dietou. Po další 2 týdny pak byla polovina zvířat krmena CHF+F2 dietou, zatímco druhá polovina zůstala na CHF. Při disekci byla odebrána gonadální tuková tkáň pro analýzu genové exprese.

Byla změřena exprese markerů mitochondriální biogeneze a obsahu mitochondrií (NRF1, PGC-1 $\alpha$ , Cox III), markerů  $\beta$ -oxidace (PPAR $\alpha$ , CPT1) a acyl-CoA thioesterázy 2 (ACOT2), což je enzym regulující peroxizomální oxidaci mastných kyselin. Výsledek byl vztažen na hladinu referenčního genu 18S rRNA a přepočítán tak, aby průměrná exprese u skupiny SIRT1 +/- myši na CHF dietě byla rovna hodnotě 1. Výsledky experimentu shrnuje graf na obrázku 16.

Dieta s vysokým obsahem n-3 PUFA stimulovala u wt zvířat expresi PPAR $\alpha$  a genů, které jsou PPAR $\alpha$  aktivovány (ACOT2, CPT-1). Rovněž byla zvýšena exprese mitochondriální CoxIII, která je závislá na počtu mitochondrií. U SIRT +/- myši nebyl tento účinek pozorován. Interakce mezi genotypem a dietou však byla signifikantní pouze u PPAR $\alpha$  a ACOT2. Nebyly prokázány žádné změny v expresi markerů mitochondriální biogeneze (NRF-1, PGC-1 $\alpha$ ).



**Obrázek 16: Expese v tukové tkáni SIRT1 +/- myši.**

Výsledky měření relativní genové exprese zkoumaných markerů metabolismu v závislosti na dietě (cHF vs. cHF+F) a genotypu (wt vs. SIRT1 +/-), průměrná exprese skupiny HF SIRT1 = 1, \* - signifikantní interakce mezi genotypem a dietou při ovlivňování exprese genu ( $p < 0,05$ ).

**Závěr:** Bylo prokázáno, že je SIRT1 nezbytný pro zprostředkování stimulačního účinku n-3 PUFA na expresi markerů oxidace mastných kyselin.

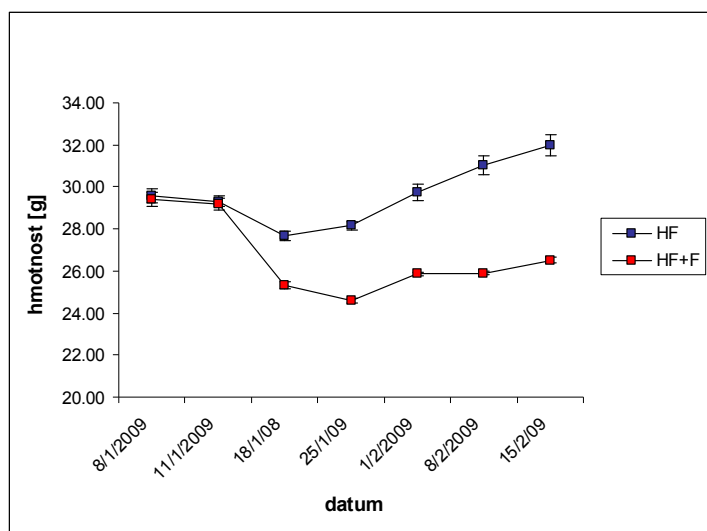
## 8.5 Pokus s kombinací vlivu n-3 PUFA a kalorické restrikce

### 8.5.1 Průběh pokusu

V návaznosti na předchozí pokusy prováděné v minulosti v naší laboratoři byl připraven experiment zkoumající účinky kombinace kalorické restrikce (CR) a n-3 PUFA. Pokus byl uskutečněn ve zjednodušeném provedení s dvěma skupinami: Jedna byla krmená cHF dietou *ad libitum*, druhá cHF+F dietou s 10 % kalorickou restrikcí (skupina cHF+F+CR).

Tomuto experimentu předcházelo 22 pokusů v úplném provedení, při nichž byly porovnávány 4 skupiny: cHF *ad libitum*, cHF s 10 % CR, cHF+F *ad libitum* a cHF+F s 10 % CR. Výsledky těchto experimentů jsou základem publikace, která se v současné době připravuje v naší laboratoři. Cílem mého pokusu bylo poskytnout dostatečný počet vzorků pro měření obsahu cytochromu b a dále podložit předchozí pozorování dalšími druhy analýz – zejména měřením spotřeby kyslíku u izolovaných adipocytů. Z tohoto důvodu byly vybrány pouze dvě skupiny, a to takové, u nichž se na základě předchozích výsledků očekávaly nejvýraznější rozdíly.

Osm myší C57BL/6 bylo po dobu pěti týdnů krmeno cHF dietou a dalších osm myší stejného kmene cHF+F dietou. Před začátkem experimentu byly obě skupiny po 3 dny krmeny cHF dietou, aby se adaptovaly na zvýšený přísun tuků. Skupina na cHF dietě měla přísun potravy *ad libitum* a každý týden byla změřena jejich spotřeba potravy. Na základě tohoto údaje pak byla spočítána velikost přídelu pro myši na cHF+F dietě s 10 % CR. Každý týden byla rovněž měřena hmotnost zvířat. Vývoj hmotnosti obou skupin v průběhu pokusu shrnuje graf na obr. 17.



**Obrázek 17: Průměrná tělesná hmotnost myší krměných *ad libitum* cHF dietou (cHF) a myší na 10 % kalorické restrikci krměných cHF+F dietou v průběhu pětitédenního experimentu. 8.1.2009 byly myši nasazeny na cHF dietu a 11.1.2009 (začátek vlastního experimentu) byly rozděleny na skupiny krměné dále cHF dietou *ad libitum*, resp. cHF+F dietou s 10 % CR.**

Z grafu je patrné, že přechod na dietu cHF (ze standardní diety, kterou jsou zvířata normálně krmena) představoval pro obě skupiny značnou zátěž, což se projevilo počátečním poklesem hmotnosti. Zvířata krměná *ad libitum* tento pokles brzo překonala a začala tloustnout, zatímco skupina s 10 % CR, která byla vystavena další změně diety (na HF+F) sice počáteční pokles po 3 týdnech (25.1.) zastavila, ale nikdy původní ztrátu nevyrovnala. Potíže na počátku experimentu byly patrně spojeny se sníženou dobou adaptace na novou dietu (pouhé 3 dny).

Při disekci byla část tukové tkáně inkubována pro izolaci adipocytů a následné měření kapacity dýchacího řetězce, druhá část byla zamrzána pro pozdější určování obsahu cytochromu.

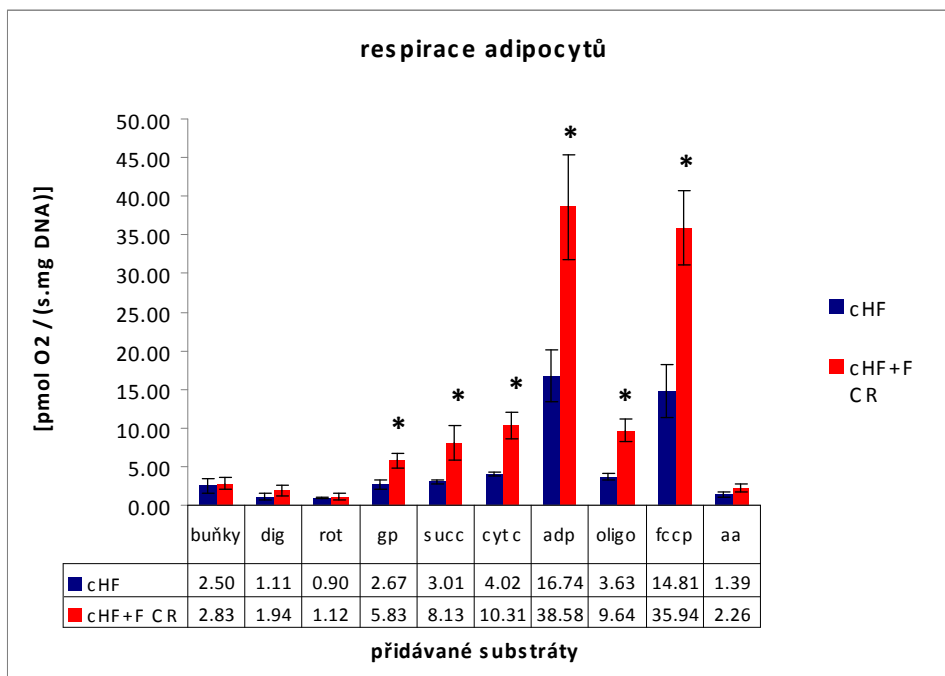
### 8.5.2 Měření spotřeby kyslíku permeabilizovaných adipocytů

Pro měření spotřeby kyslíku adipocyty byly z důvodu nedostatečného množství gonadální tukové tkáně připraveny směsné vzorky vždy ze dvou zvířat. Dvojice byly vybrány tak, aby měla obě zvířata ve směsném vzorku přibližně stejné celkové hmotnosti gonadálních tukových dep.

Spotřeba kyslíku izolovanými adipocyty byla vztažena na obsah DNA ve vzorku. Bylo zjištěno, že kapacita dýchacího řetězce je ve všech měřených stavech prokazatelně zvýšena u skupiny s kombinací vlivu 10 % CR a CHF+F diety (viz obrázek 18).

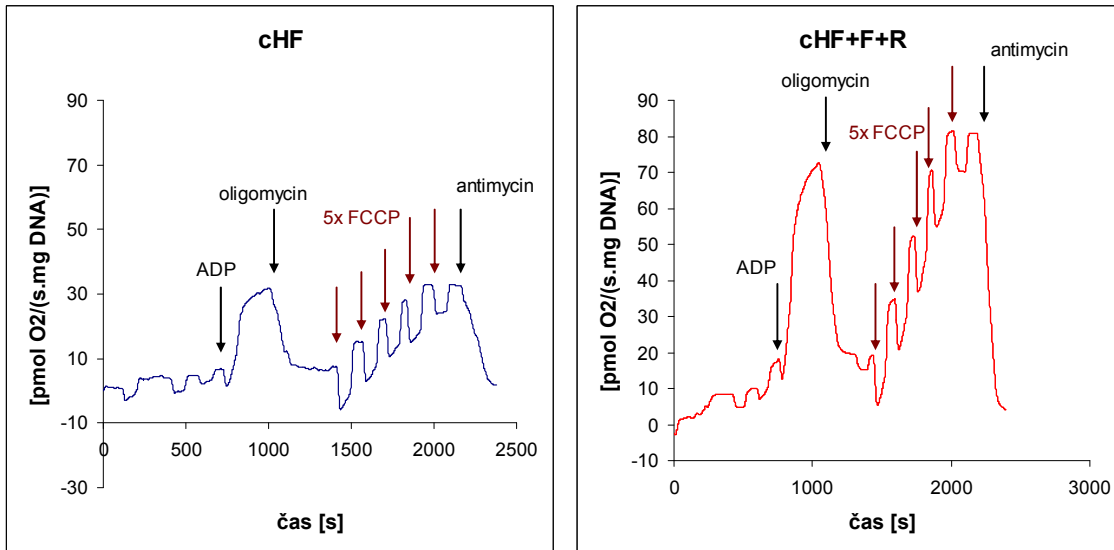
Průběh křivek spotřeby kyslíku odpovídal očekávání: Po přidání rotenonu došlo k mírnému poklesu spotřeby kyslíku v důsledku inhibice komplexu I. Přidání exogenních substrátů komplexu II a GPDH vedlo k navýšení dýchání. Na cytochrom c adipocyty reagovaly pouze mírným zvýšením spotřeby kyslíku, což dokládá, že byly v průběhu měření relativně nepoškozené. Významný nárůst, který nastal u obou skupin po přidání ADP, ukazuje, že mitochondrie adipocytů nejsou odpřažené. Zmíněný nárůst byl zvrácen přidáním inhibitoru ATP syntázy, čímž se potvrdilo, že je rychlost spotřeby kyslíku skutečně limitována dostupností ADP. Procentuální nárůst respirace v reakci na přidání ADP byl přítom u obou skupin stejný.

Míru spřažení mitochondrií v tomto pokuse nebylo možno vyhodnotit, protože byl přidán příliš velký objem FCCP, který měl na respiraci inhibiční efekt (spotřeba kyslíku byla po přidání FCCP v průměru nižší než po přidání ADP). V několika měřeních se však podařilo vytitrovat správné množství FCCP a hodnota respirace tak v odpřaženém stavu skutečně dosáhla maxima. Ukázka dvou takových ideálních křivek je na obrázku 19.



**Obrázek 18: Spotřeba kyslíku permeabilizovanými adipocyty.**

cHF dieta ad libitum vs. cHF+F 10% kalorická resrikce. Průměry čtyř měření. (dig – digitonin, Rot – rotenon, GP – glycerolfosfát, Succ – sukcinát, Cyt c – cytochrom c, Oligo – oligomycin, AA – antimycin A). V tabulce jsou uvedeny výběrové průměry.



**Obrázek 19 Typická křivka spotřeby kyslíku během měření respirace**

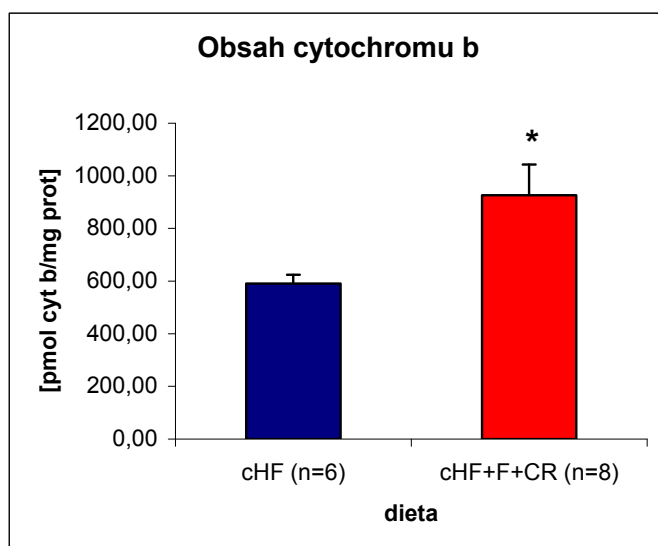
Stimulace spotřeby kyslíku ADP, následná inhibice ATP-syntázy oligomycinem a titrace odpráhovače FCCP, dokud spotřeba kyslíku nedosáhne maxima a už dále neroste (v tomto případě 5 x), koncová inhibice komplexu III antimycinem. Srovnání stavu v adipocytech zvířat krměných cHF a cHF+F na kalorické restrikcii.



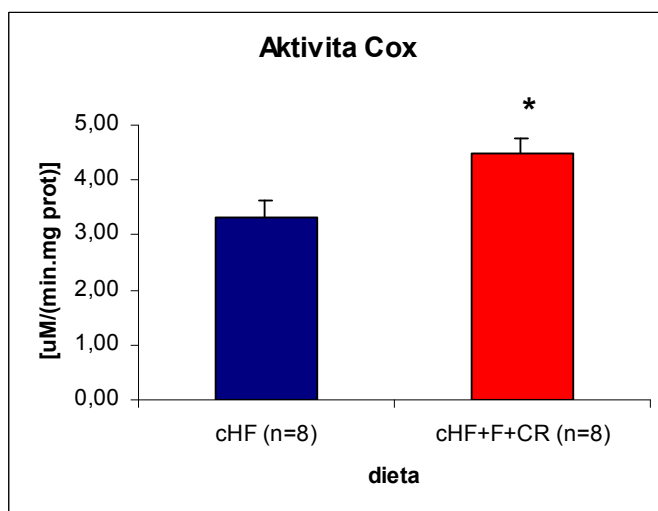
### 8.5.3 Spektrofotometrická stanovení kapacity mitochondrií v tukové tkáni

Při měření obsahu cytochromu b v membránové frakci se nepodařilo u dvou vzorků zaznamenat žádný posun v absorbanci během redukce. Tyto vzorky byly z výsledného shrnutí vyřazeny. Ostatní vzorky však ukazují signifikantní zvýšení obsahu cytochromu b u skupiny myši na CHF+F dietě při 10 % CR (viz obrázek 20).

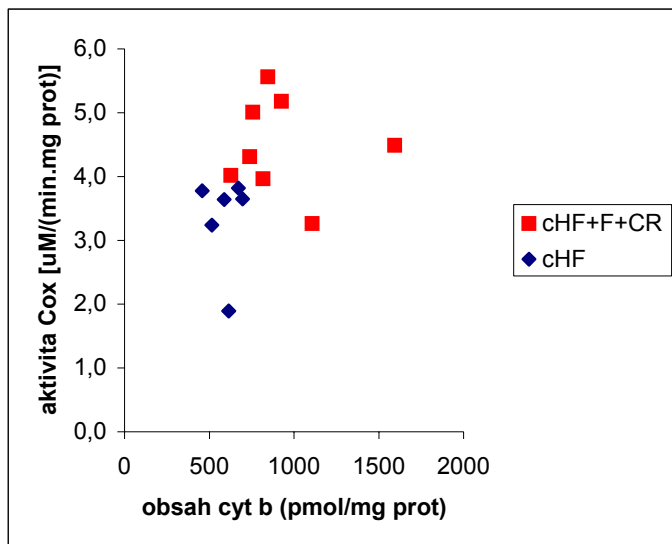
Stejný výsledek byl pozorován i při měření aktivity cytochrom oxidázy v membránové frakci (viz obrázek 21). Aktivita cytochrom oxidázy korelovala s obsahem cytochromu b v jednotlivých vzorcích (viz obrázek 22). To dokládá, že obě metody skutečně poskytují relevantní data, Metodu měření obsahu cytochromu b pseudo-duální spektrofotometrie byla v naší laboratoři čerstvě znovuzavedena (viz kapitola 8.1), takže kontrola efektivity tohoto přístupu byla nutná.



**Obrázek 20: Obsah cytochromu b** ve vzorcích gonadálního tuku zvířat krměných CHF dietou *ad libitum* a zvířat krměných CHF+F dietou při 10 % CR. \* - signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ )



**Obrázek 21: Aktivita cytochrom oxidázy** ve vzorcích gonadálního tuku zvířat krměných CHF dietou *ad libitum* a zvířat krměných CHF+F dietou při 10 % CR. \* - signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ )



**Obrázek 22: Korelace mezi obsahem cytochromu b a aktivitou Cox** ve vzorcích gonadálního tuku zvířat krměných CHF dietou *ad libitum* a zvířat krměných CHF+F dietou při 10 % CR.

**Závěr:** Dieta s přidavkem n-3 PUFA v kombinaci s 10 % CR vyvolává nárůst masy mitochondrií v bílé tukové tkáni. To bylo potvrzeno dvěma metodami: měřením aktivity cytochrom oxidázy a stanovením obsahu cytochromu b. Navýšení počtu mitochondrií má i funkční důsledky ve zvětšení respirační kapacity dýchacího řetězce v gonadální tukové tkáni.

## 9 Diskuze

### 9.1 Měření obsahu cytochromu b v membránové frakci tukové tkáně

Spektrofotometrická kvantifikace obsahu mitochondrií ve vzorku bílé tukové tkáně je velkým problémem. Adipocyty obsahují vzhledem ke svému celkovému objemu jen malý počet mitochondrií a ty navíc nelze účinně izolovat (výsledky předchozích pokusů v naší laboratoři). Jedinou možností, jak se přiblížit použitelným výsledkům, představuje stanovení podílu mitochondriálních proteinů v celkové membránové frakci. Klasické spektrofotometrické měření obsahu cytochromu na základě rozdílu absorbance v maximálně oxidovaném a redukovaném stavu je však málo citlivé. Je třeba použít pseudo-duální metodu v podobě, v jaké byla popsána v kapitole 7.6.2.

Při znovuzavádění metody byly porovnány obsahy cytochromů v jednotlivých tkáních. Toto měření potvrdilo zejména předpoklad, že nejméně přesné výsledky vykazuje právě tuková tkáň. Při stanoveních v tomto tkáňovém typu je třeba zajistit dostatečný počet měření, aby bylo možné odfiltrout veškeré náhodné vlivy. V jiných tkáních je dosaženo uspokojivého výsledku již s malými počty vzorků.

Při porovnávání obsahu mitochondrií v tukové tkáni myši na standardní a cHF dietě nebylo sice dosaženo průkazných výsledků, nicméně k obdobnému profilu vedla jak metoda pseudo-duálního stanovení koncentrace cytochromu c, tak metoda spektrofotometrického určení aktivity cytochrom oxidázy. To naznačuje, že získané výsledky jsou skutečně relevantní.

Ke stejnému závěru vedlo i posuzování obsahu cytochromu b v případě pokusu s kalorickou restrikcí. V tomto experimentu bylo dosaženo nejen shody s výsledky aktivity cytochrom oxidázy, ale rovněž s citlivým měřením spotřeby kyslíku izolovanými adipocyty. Konkrétní výsledky budou diskutovány dále.

Výhoda měření obsahu cytochromu oproti stanovení aktivity cytochrom oxidázy spočívá v tom, že umožňuje dosáhnout absolutních hodnot výsledku. Naproti tomu aktivita Cox je pouze relativní číslo závislé na mnoha dalších faktorech. Aktivitu cytochrom oxidázy lze však eventuálně stanovovat nejen v membránové frakci, ale i přímo v tkáňovém homogenátu, takže takové měření není zatíženo chybou, která vzniká při izolaci membrán. Obecně jsou však spektrofotometrická stanovení pro mnoho účelů nedostatečně citlivá.

Lze uzavřít, že metoda pseudo-duálního spektrofotometrického měření obsahu cytochromů v membránové frakci je vysoce účinná při zkoumání tkáně s dostatečným obsahem mitochondrií (ačkoliv ani zde nejsou vyloučena odlehlá měření). Při dostatečném počtu vzorků je však tato levná a nenáročná metoda použitelná i pro tukovou tkáň, přičemž poskytuje výsledky dobře korespondující s dalšími analýzami.

## 9.2 Tkáňové kultury AMPK $\alpha$ KO myších embryonálních fibroblastů

Buněčný model AMPK $\alpha$  KO MEF může v budoucnosti posloužit při dalším studiu role AMPK v interakci s n-3 PUFA. Jeho výhoda spočívá v tom, že inaktivované jsou obě izoformy katalytické podjednotky AMPK ( $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2). Zvířata s tímto genotypem umírají již během zárodečného vývoje a proto představují tkáňové kultury jedinou možnost uchopení tohoto problému. Paralelní pokusy na zvířecím modelu (AMPK $\alpha$ 1 -/- myš, resp. AMPK $\alpha$ 2 -/- myš) a modelu MEF umožňují v principu odlišení přímého efektu n-3 PUFA na AMPK od působení zprostředkovaného hormonu. (Je přitom známo, že hormonální řízení hraje při aktivaci AMPK mnohdy rozhodující roli.)

Dosud byly tyto buňky použity při studiu vztahu hypoxie a AMPK<sup>85</sup> a dále při důkazu nezbytnosti AMPK pro zprostředkování efektů resveratrolu<sup>50</sup>. Jejich potenciál je však ještě větší. V naší laboratoři byly zatím na tomto modelu provedeny jen některé jednoduché pilotní experimenty, jež si kladly za cíl prozkoumat základní parametry a některé potenciálně zajímavé projevy tohoto modelu.

Hlavní výsledek spočívá ve zjištění, že kapacita respiračního řetězce AMPK KO buněk je oproti kontrole významně snížena, zatímco úroveň oxidace mastných kyselin zůstává v podstatě nezměněna. To je zajímavé, protože oba děje probíhají z větší části v mitochondriích a oba by měly být AMP aktivovanou kinázou ovlivněny.

Nezdá se, že by bylo snížení respirační kapacity v případě AMPK KO způsobeno zasažením mitochondriální biogeneze, protože to by se patrně projevilo i na bazální úrovni  $\beta$ -oxidace. Regulace mitochondriální biogeneze a oxidace mastných kyselin není ovšem dosud detailně známa. Zdá se, že na stimulaci oxidace mastných kyselin se podílí významnou měrou SIRT1, zatímco tvorba mitochondrií je některými vědci dávána spíše do souvislosti s činností AMPK<sup>51</sup>. To by mohlo vysvětlovat pozorované jevy: V důsledku nepřítomnosti katalytické podjednotky AMPK dochází k významnému snížení respirační kapacity, avšak přetrvávající působení SIRT1 zajišťuje nezměněnou úroveň oxidace mastných kyselin. K posouzení

oprávněnosti této hypotézy nemáme v současné době dostatek dat. Ještě se však níže zmíním o pozorování omezeného účinku SIRT1 na oxidaci mastných kyselin, které by do tohoto schématu zapadalo.

Při stimulaci kontrolních buněk AMPK-aktivátorem AICAR bylo zcela v souladu s očekáváním pozorováno navýšení oxidace mastných kyselin. Tuto stimulaci nebylo možno navodit u AMPK $\alpha$  KO buněk, což by nasvědčovalo tomu, že AICAR v tomto případě skutečně stimuluje  $\beta$ -oxidaci prostřednictvím AMPK. Zajímavé je ale to, že po inkubaci s aktivátorem AICAR byl u AMPK $\alpha$  KO buněk pozorován naopak pokles v obratu oxidace mastných kyselin. Tuto skutečnost je pravděpodobně nutné vysvětlit nějakým vedlejším působením AICARu. Je známo, že AICAR stimuluje i některé AMP aktivované enzymy zapojené do metabolismu cukrů (1,5-bisfosfatáza, glykogenfosforyláza)<sup>28,29</sup>. Lze si představit, že v nepřítomnosti AMPK, která by podporovala oxidaci mastných kyselin, převládne stimulační působení AICARu na katabolismus sacharidů a tím dojde k určitému utlumení odbourávání mastných kyselin.

S neúspěchem se bohužel setkaly pokusy s aplikací resveratrolu. Původní experiment byl špatně zorganizován. Byl použit příliš nízký počet vzorků na skupinu a doba inkubace s resveratrolem byla příliš krátká na to, aby se mohly projevit nějaké významné rozdíly. V průběhu experimentu navíc vyšla práce, která na stejném buněčném modelu efekt resveratrolu popisuje<sup>50</sup>, a proto bylo od dalších experimentů v tomto směru upuštěno. Při původním experimentu byl však navzdory všem jeho nedostatkům pozorován zajímavý trend inhibice oxidace mastných kyselin zvýšenými koncentracemi resveratrolu. Zatímco Um a kol. používali koncentraci 50  $\mu$ M, naše nejnižší koncentrace představovala 125  $\mu$ M. I při použití této naší nejnižší koncentrace byl obrat  $\beta$ -oxidace dramaticky snížen a se vzrůstající koncentrací dále klesal.

Použitá doba inkubace (2 hodiny) byla rovněž výrazně nižší oproti údajům, které jsou v souvislosti s efektem SIRT1 obvykle uváděny. Ačkoliv v reakci na fyzickou zátěž stoupá exprese SIRT1 již po dvou hodinách<sup>86</sup>, enzymatické ovlivnění substrátů SIRT1 bylo pozorováno až po delším časovém úseku (standardně např. po 24 hodinách)<sup>87</sup>. Um a kol. ovšem zjistili, že dlouhodobý účinek resveratrolu sice vyžaduje aktivitu SIRT1, resveratrol však může v krátkodobém měřítku fungovat prostřednictvím jiných cest (snad přes AMPK)<sup>50</sup>. Přesto nebyl ani u kontrolní skupiny žádný stimulační projev pozorován.

Výsledky měření mitochondriální respirace hovoří více jednoznačně: U AMPK $\alpha$  KO buněk dochází ke snížení kapacity dýchacího řetězce. Tento efekt přitom není způsoben sníženou aktivitou ATP syntázy, neboť přidavek ADP způsobí procentuálně stejný nárůst spotřeby

kyslíku jako u kontrolní skupiny. Mitochondrie AMPK $\alpha$  KO i wt buněk jsou silně spřažené, protože přidání ADP, stejně jako FCCP má výrazný stimulační efekt na spotřebu kyslíku. Zdá se tedy, že rozdíl musí být v zastoupení nebo v účinnosti hlavních komplexů dýchacího řetězce. Komplex IV nebyl měřen, protože je o něm známo, že se ve vnitřní mitochondriální membráně vyskytuje ve značném nadbytku<sup>88</sup>. Komplex I byl zase na začátku měření inhibován rotenonem, takže výsledky vypovídají o aktivitě komplexů II a III a inhibici celého dýchacího řetězce hromaděním protonů v mezimembránovém prostoru.

Je zajímavé, že se nepřítomnost katalytické podjednotky AMPK projeví i v prostředí s nadbytkem živin, jakým je jak kultivační médium, tak měřicí médium s přidanými substráty. Ukazuje se tak, že AMPK hraje významnou roli ve vývoji řady tkání při navozování mitochondriální biogeneze. To dobře koresponduje se zjištěním, že AMPK $\alpha$  KO buňky mají oproti kontrolám sníženou rychlost dělení i odlišnou morfologii. Na misce nejsou schopny dosahovat takových denzit jako kontrolní buňky. To může být způsobeno tím, že nedokáží v podmínkách sníženého přístupu živin (které nastávají v příliš hustém nárůstu buněk) zefektivnit svůj katabolismus natolik, aby mohly nadále přežít a proliferovat.

### **9.3 Pokusy s AMPK $\alpha$ 1 -/- myším modelem**

Práce se zvířecími i buněčnými modely KO v genech pro AMPK $\alpha$ , resp. SIRT1 měla přispět k odhalení dalšího možného mechanismu působení n-3 PUFA. Jak bylo popsáno v teoretické části, máme dostatek podkladů pro domněnku, že se na zprostředkování benefičních účinků n-3 PUFA nějakým způsobem podílí i AMPK. V naší laboratoři bylo již dříve zjištěno, že v tukové tkáni (ale nikoli v játrech a svaly) dochází ke zvýšení aktivity AMPK v reakci na vysoký podíl n-3 PUFA ve stravě (CHF+F2 dieta)<sup>75</sup>. Teprve studium myších KO v genech pro podjednotky AMPK však může prokázat, že je tento enzym skutečně primárně aktivován n-3 PUFA a podílí se na jejich efektu.

Moji kolegové zjistili, že zvířata s vyřazeným genem pro AMPK $\alpha$ 1 vykazovala nižší hromadění tuku v těle. Příčinou tohoto fenotypu přitom nebyla zvýšená lipolýza, protože hladina glycerolu v plazmě byla oproti kontrolním zvířatům rovněž snížena. Na úrovni genové exprese přitom ovšem nebyl v závislosti na genotypu pozorován pokles ani jednoho z obou známých lipolytických enzymů (HSL a ATGL).

Obecně nebyly nalezeny žádné signifikantní změny, které by bylo možno vysvětlit chybějící AMPK. Ba naopak, i neprůkazné trendy, které se ve výsledcích sporadicky objevují (např.

mírné zvýšení exprese PGC-1 $\alpha$  u KO zvířat), jsou spíše v rozporu s původním očekáváním. Vzhledem k funkci, která je AMPK přisuzována, bychom spíše očekávali, že KO v genu pro katalytickou podjednotku AMPK nebude schopné reagovat na metabolický stres navýšením oxidace mastných kyselin, mitochondriální respirace, ani dalších katabolických procesů. Pokud je pak efekt n-3 PUFA alespoň částečně zprostředkován AMPK, měl by být pozorovatelný u kontrolních zvířat, ale nikoli u AMPK KO. U žádného ze zkoumaných genů nebyl takovýto expresní profil pozorován. Relativní zvýšení exprese PGC-1 $\alpha$  vlivem genotypu AMPK $\alpha$ 1 signalizuje, že tento model patrně nebude vhodný pro posuzování vlivu diety na transkripci tohoto proteinu. Příznivý efekt n-3 PUFA však v tomto pokusu nebyl pozorován ani u wt kontrol. Z našich dosavadních zkušeností s měřením genové exprese v tukové tkáni dovozujeme, že neprůkazné výsledky mohou být ovlivněny přítomností dalších buněk ve vzorku vedle adipocytů. Je možné, že makrofágy, nediferencované fibroblasty a další buňky zkreslují získané hodnoty. Vzhledem k tomu, že n-3 PUFA působí primárně selektivně zejména na adipocyty, plánujeme v příštím pokusu měřit genovou expresi u izolovaných adipocytů.

Jediný průkazný efekt v celém experimentu představuje snížení exprese SCD1 v reakci na dietu obohacenou o n-3 PUFA. Tento výsledek však není nijak závislý na genotypu (AMPK není nezbytná pro snížení exprese SCD1 působením n-3 PUFA) a navíc je již dlouhou dobu znám. V tukové tkáni byl poprvé popsán u obézních kryš<sup>89</sup>. SCD1 je první z řady desaturáz, které vnáší dvojné vazby do řetězce kyseliny stearové. Stojí tak na počátku syntézy veškerých nenasycených mastných kyselin. Příjem nenasycených kyselin v potravě snižuje potřebu endogenní syntézy těchto látek. Jak n-3, tak n-6 PUFA proto snižují expresi SCD1 jak v tukové tkáni, tak v játrech. Ovlivnění SCD1 linolovou kyselinou bylo přitom pozorováno již v 70. letech<sup>90</sup>.

Opačný (povzbuzující) vliv mají n-3 PUFA na expresi ATGL. Tento efekt se však opět objevil jak u kontrolních, tak i u AMPK $\alpha$ 1 -/- zvířat a není tudíž závislý na funkci AMPK.

Experiment s AMPK $\alpha$ 1 KO myši tak nepřinesl žádné nové výsledky, které by významným způsobem osvětlily mechanismus účinku n-3 PUFA. Neznamena to ale, že by AMPK nemohla být zahrnuta do signální kaskády n-3 PUFA. Výsledky jsou sice neprůkazné, příčinou však je pravděpodobně adaptace na změněnou účinnost některých metabolických drah v důsledku nepřítomnosti funkční AMPK, popř. kompenzace chybějící role AMPK $\alpha$ 1 podjednotky podjednotkou  $\alpha$ 2.

AMPK $\alpha$ 1 KO myši vykazují řadu abnormalit. Mají např. výrazně snížený počet erytrocytů. S tím souvisí nápadné zvětšení sleziny, patrně kompenzační zvýšení hladiny erythropoetinu

(Viollet, nepublikované výsledky) a pravděpodobně i snížená obranyschopnost organismu. Tento fenotyp naznačuje, že vyřazení jednoho subtypu katalytické podjednotky AMPK má dalekosáhlé vedlejší účinky na fyziologii zvířete, které mohou potenciálně zastřít i hledané rozdíly. Zatím se zdá, že AMPK $\alpha$ 1 KO myš není vhodným modelem pro studium účinku n-3 PUFA. Je také možné, že je podíl n-3 PUFA v potravě použitý v tomto experimentu příliš nízký na to, aby vyvolal nějakou odezvu. Výše zmiňovaný výsledek aktivace AMPK v tuku byl zjištěn u zvířat krmených dietou CHF+F2 s vyšším obsahem n-3 PUFA. Totéž platí o pokusu se SIRT1 +/- zvířaty (viz následující podkapitola). Nižší podíl n-3 PUFA by však měl být kompenzován delší dobou, po kterou je obohacená dieta zvířatům podávána.

V současnosti se připravuje druhý pokus s těmito zvířaty, který má ještě naposledy prověřit jejich použitelnost pro naše účely. Množení KO zvířat však vyžaduje mnoho času, stejně jako chov dostatečného množství kontrolních AMPK $\alpha$ 1 +/- myší.

Stojí za zmínku, že stejná zvířata byla použita i při experimentech s resveratrolem a AMPK<sup>50</sup>. Výzkumníci zde ovšem nepříliš korektně obešli nutnost zajištění dostatečného množství zvířat tím, že použili klasická C57BL/6 zvířata a nikoli "litter mates" kontroly.

## 9.4 Pokusy se SIRT1 +/- myším modelem

Příznivější výsledky, než práce s AMPK $\alpha$ 1 -/- myší přineslo studium heterozygotů SIRT +/- . U těchto zvířat byly nalezeny dva geny, jejichž exprese je zvyšována působením n-3 PUFA u kontrolních zvířat, zatímco u SIRT1 +/- myší jejich efekt mizí. Zjištěné změny se týkají genů ACOT2 a PPAR $\alpha$ . PPAR $\alpha$  je jaderný receptor účastnící se transkripce genů  $\beta$ -oxidace i biogeneze peroxizomů. ACOT2 je peroxizomální, resp. mitochondriální acyl-CoA thioesteráza, která hraje důležitou roli při regulaci oxidace mastných kyselin v peroxizomech a rovněž při stimulaci peroxizomální biogeneze<sup>91</sup>. PPAR $\alpha$  sám stimuluje expresi ACOT2. Rovněž CPT1 (další enzym významný pro oxidaci mastných kyselin) se blížil signifikantním hodnotám.

Naše experimenty prokázaly, že je vliv n-3 PUFA na oxidaci mastných kyselin přinejmenším z části zprostředkován enzymem SIRT1. Na druhou stranu však nebyl pozorován žádný vliv na mitochondriální biogenezi (markery NRF1, PGC-1 $\alpha$ ), přestože je známo, že PGC-1 $\alpha$  patří mezi substráty SIRT1<sup>47</sup>. Existuje však i publikace, která popisuje nárůst exprese markerů oxidace mastných kyselin, ale nikoli mitochondriální biogeneze, v reakci na specifickou



aktivaci SIRT1<sup>51</sup>. Je možné, že předchozí práce zdůrazňující roli SIRT1 v mitochondriální biogenezi popisují efekty vyvolané z velké části požitím nespécifických aktivátorů mezi něž nepochybně patří i resveratrol<sup>50</sup>

Je ovšem možné, že nemožnost prokázat stimulaci mitochondriální biogeneze působením n-3 PUFA skrze SIRT1 souvisí s použitím heterozygotních zvířat nebo příliš krátkým časem na dietě. Homozygoti SIRT1 -/- existují, mají však výrazně sníženou životaschopnost.

Zjištění, že je SIRT1 esenciální pro stimulaci exprese některých katabolických enzymů v reakci na vysoký podíl n-3 PUFA v potravě je důležitým novým poznatkem, který dobře ilustruje výsledky pokusů s kombinací kalorické restrikce s n-3 PUFA diskutované v následující podkapitole.

## **9.5 Kalorická restrikce v kombinaci s n-3 PUFA**

V současné době je v naší laboratoři připravována k publikaci práce věnovaná kombinaci kalorické restrikce a efektu n-3 PUFA (Flachs P., v přípravě). Součástí této práce budou i výsledky měření obsahu cytochromů a mitochondriální respirace v tukové tkáni kontrolní skupiny krmené cHF dietou a kombinované cHF+F+CR skupiny, prezentované v této diplomové práci.

Naše dosavadní výsledky v této oblasti ukazují příznivé účinky kombinace na prevenci obezity a inzulínové rezistence. Kombinace 10 % kalorické restrikce a n-3 PUFA vykazuje výraznější efekty než obě tyto podmínky odděleně. Výsledky měření nepřímé kalorimetrie ukazují posun k oxidaci lipidů na úkor sacharidů u kombinované skupiny. Rovněž byla pozorována zvýšená oxidace mastných kyselin a zvýšená exprese markerů lipolýzy v tukové tkáni. Tyto výsledky nás vedou k závěru, že spojení příznivých efektů kalorické restrikce a n-3 PUFA vede k přeměně adipocytů ze zásobárny lipidů na buňky aktivně odbourávající mastné kyseliny. Tento zásah by mohl být potenciálně využitelný i v lékařské praxi.

Výsledky měření genové exprese v různých tkáních (viz Příloha) dokládají, že se účinek kalorické restrikce i n-3 PUFA projevuje prakticky výhradně v uniloculární tukové tkáni a to ještě spíše v gonadálním, než v podkožním tukovém depu. Exprese ve svalu zůstává nezměněna a na játra i hnědou tukovou tkáň má kombinace jen nepatrný účinek. V gonadálním tukovém depu pak pozorujeme markantní nárůst exprese PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\alpha$  a dalších genů souvisejících s mitochondriální biogenezi a oxidací mastných kyselin.

Konkrétně moje výsledky do tohoto schématu dobře zapadají. Měření obsahu cytochromů i oxidace mastných kyselin bylo sice prováděno pouze na dvou skupinách zvířat (cHF a cHF+F+CR), nicméně výsledky dobře korespondují s předcházejícími analýzami, takže je lze použít pro ilustraci popisovaných jevů. Navíc předchozí výsledky měření genové exprese mnoha genů i oxidace palmitátu (viz Příloha) naznačují, že zkoumané efekty jsou často pozorovatelné teprve při kombinaci n-3 PUFA a CR. Odděleně tyto zásahy neposkytují většinou signifikantní rozdíly.

Kombinovaná skupina cHF+F+R vykazovala zvýšený obrat mitochondriální respirace. Tento výsledek je významný ze dvou důvodů. Jednak ukazuje, že dříve pozorované změny na úrovni genové exprese mají skutečně vliv na funkci mitochondrií. Druhou významnou okolností je skutečnost, že měření bylo prováděno na izolovaných adipocytech, takže výsledky odráží změny v těchto buňkách a nikoli v celé tkáni. Zastoupení jednotlivých buněčných typů se totiž může v jednotlivých skupinách lišit a tyto rozdíly by mohly způsobit artefakty ve výsledcích.

Jak bylo naznačeno, vykazuje kalorická restrikce i n-3 PUFA účinky podobné fenotypu ap2-UCP1 myši. Bylo by proto možné spekulovat, že rovněž n-3 PUFA navozují odpřažení oxidativní fosforylace. Výsledky měření spotřeby kyslíku však jasně ukazují, že k odpřažení mitochondrií u žádné z obou skupin nedochází (viz nárůst respirace po přidání ADP na obrázcích 18 a 19). Můžeme tak vyloučit, že by n-3 PUFA podporovaly spalování lipidů prostřednictvím některého UCP. Tomu ostatně nasvědčuje i nezměněná exprese v hnědé tukové tkáni.

Za hlavního zprostředkovatele efektu kalorické restrikce je považován SIRT1, ačkoli přesně nerozumíme mechanismu jeho aktivace. Výsledky měření změn genové exprese u SIRT1+/- myši krmených dietou cHF a cHF+F (viz výše) naznačují, že SIRT1 je zapojen i do metabolického účinku n-3 PUFA. n-3 PUFA a kalorická restrikce by se tedy mohly vzájemně částečně nahrazovat a společně působit aditivně, což bylo skutečně pozorováno v předchozích pokusech v naší laboratoři (viz např. vliv kombinace na expresi PGC-1 $\alpha$  v gonadálním tuku v Příloze).

U kombinované skupiny pozorujeme výrazný nárůst mitochondriální biogeneze. Zvýšenému obsahu mitochondrií v tukové tkáni těchto zvířat nasvědčují i výsledky měření obsahu cytochromu b a aktivity cytochrom oxidázy v membránové frakci. Předchozí pokusy se SIRT1 +/- heterozygoty přitom vliv SIRT1 na mitochondriální biogenezi nepotvrdily. Je tedy otázkou, jakým způsobem působí n-3 PUFA na mitochondrie.

Jak už bylo rovněž zmíněno, liší se systémy AMPK a SIRT1 patrně navzájem svým reakčním poločasem. Zatímco aktivace AMPK je považována spíše za okamžitý krátkodobý zásah vedoucí k obnovení energetické rovnováhy, SIRT1 účinkuje spíše v delší časové perspektivě a může tedy odpovídat na dlouhodobější tendence, mezi něž jistě patří i kalorická restrikce. Vzhledem k provázanosti systémů AMPK a SIRT1 je pravděpodobné, že do mechanismu působení kalorické restrikce i n-3 PUFA na mitochondriální biogenezi bude zapojena i AMPK. Naše pokusy s AMPK $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> myši tuto domněnku bohužel nepodpořili. V otázce součinnosti obou systémů tak stále zůstává řada bílých míst.

## 10 Závěry

Pět hlavních cílů vytyčených na základě studia literárních pramenů v kapitole 5.6, k jejichž naplnění směřovaly experimenty prováděné v rámci diplomové práce, bylo naplněno.

**1. Metoda kvantifikace obsahu mitochondrií pomocí pseudo-duálního spektrofotometrického stanovení koncentrace cytochromu b v izolované membránové frakci je použitelná i pro měření v unilokulární tukové tkáni,** pokud je zajištěn dostatek vzorků, aby bylo možné odfiltrovat případná odlehlá měření.

**2. V naší laboratoři byl úspěšně zaveden model AMPK $\alpha$  KO myších embryonálních fibroblastů.** Ačkoliv nelze výsledky získané prací na tomto modelu porovnávat se zvířecím modelem (kvůli nevhodnosti AMPK $\alpha$ 1 myšího modelu), poskytl již první průkazné výsledky: AMPK $\alpha$  KO buňky mají sníženou mitochondriální respiraci. Rozdíly v oxidaci mastných kyselin oproti kontrolní buněčné linii naproti tomu nebyly prokázány. AMPK $\alpha$  KO však reagují na inkubaci s aktivátorem AICAR opačným způsobem než kontrolní buňky.

**3. AMPK $\alpha$ 1 -/- myší model není vhodný pro zkoumání účinků n-3 PUFA.** Zvířata jsou patrně na ztrátu tohoto genu již adaptována a tyto adaptace zastírají jakékoliv další pozorovatelné efekty diety na genovou expresi.

**4. SIRT1 je nezbytný pro stimulaci oxidace mastných kyselin vlivem n-3 PUFA.** Ukazuje se tak na základě měření exprese markerů  $\beta$ -oxidace u SIRT +/- zvířat. Na druhou stranu nebyl prokázán vliv SIRT1 na mitochondriální biogenezi.

**5. Zvýšený obsah cytochromu b v tukové tkáni zvířat na dietě obohacené o n-3 PUFA a 10 % kalorické restrikci stejně jako zvýšená mitochondriální respirace adipocytů těchto zvířat dobře koresponduje s dalšími daty získanými v naší laboratoři. Zdá se, že n-3 PUFA působí alespoň částečně skrze SIRT1 a mohou tak působit synergisticky až aditivně s kalorickou restrikcí.** Kombinace kalorické restrikce a zvýšeného přísunu n-3 PUFA v dietě tak může mít významné protektivní účinky před rozvojem obezity a inzulínové rezistence.

# 11 Seznam obrázků a tabulek

## 11.1 Obrázky

Obrázek 1: Orgánová specializace v sytém a hladovém stavu.....	11
Obrázek 2: Zjednodušené schéma působení enzymů SIRT1/AMPK/PGC-1 $\alpha$ kaskády .....	27
Obrázek 3: Ukázky denaturační analýzy.....	45
Obrázek 4: Schéma dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně.....	50
Obrázek 5: Schéma pokusu měření kapacity dýchacího řetězce.....	51
Obrázek 6: Absorpční spektrum cytochromu c v oxidované a redukované formě.....	54
Obrázek 7: Měření absorbance cytochromu b.....	56
Obrázek 8: Obsah cytochromu b v tukové tkáni myši Ssniff vs. CHF .....	63
Obrázek 9: Aktivita cytochrom oxidázy v tukové tkáni myši Ssniff vs. CHF.....	63
Obrázek 10: Důkaz KO v AMPK $\alpha$ .....	63
Obrázek 11: Wt MEF (vlevo) a AMPK $\alpha$ KO MEF (vpravo) týden po pasáži .....	63
Obrázek 12: Spotřeba kyslíku permeabilizovanými MEF (AMPK $\alpha$ KO vs. Wt).....	64
Obrázek 13: Oxidace mastných kyselin (wt vs. AMPK $\alpha$ KO MEF) - AICAR.....	65
Obrázek 14: Oxidace mastných kyselin (wt vs. AMPK $\alpha$ KO MEF) - resveratrol.....	66
Obrázek 15: Expres v tukové tkáni AMPK $\alpha$ 1 -/- myši.....	67
Obrázek 16: Expres v tukové tkáni SIRT1 +/- myši.....	69
Obrázek 17: Průměrná tělesná hmotnost u myši krmených CHF a CHF+F+CR.....	70
Obrázek 18: Spotřeba kyslíku permeabilizovanými adipocyty.....	72
Obrázek 19: Typická křivka spotřeby kyslíku během měření respirace.....	72
Obrázek 20: Obsah cytochromu b v tukové tkáni myši CHF vs. CHF+F+CR.....	73
Obrázek 21: Aktivita cytochrom oxidázy v tukové tkáni myši CHF vs. CHF+F+CR.....	73
Obrázek 22: Korelace mezi obsahem cytochromu b a aktivitou Cox.....	74

## 11.2 Tabulky

Tabulka 1: Energetické složení použitých diet.....	36
Tabulka 2: Příprava st. a vz. pro stanovení koncentrace DNA pomocí Hoechst 33258 .....	39
Tabulka 3: Příprava st. a vz. pro stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA .....	40
Tabulka 4: Příprava st. a vz. pro stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové .....	41
Tabulka 5: Složení roztoků A a B pro reverzní transkripci.....	43
Tabulka 6: Seznam použitých primerů pro kvantitativní PCR .....	44
Tabulka 7: Složení směsi pro qPCR na LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System .....	46
Tabulka 8: Exp. protokol pro qPCR na LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System.....	46
Tabulka 9: Složení směsi pro qPCR na LightCycler® 480 Real-Time PCR System .....	47
Tabulka 10: Exp. protokol pro qPCR na LightCycler® 480 Real-Time PCR System.....	47
Tabulka 11: Protokol pro měření mitochondriální respirace.....	52
Tabulka 12: Spektrální vlastnosti cytochromů.....	55
Tabulka 13: Obsah cytochromu b v různých tkáních.....	61

## 12 Použitá literatura

1. Voet, D. and Voetová, J. G. Biochemie. Victoria Publishing . 1994.
2. Garrett RH, Grisham CM. Biochemistry. 1998.
3. Nussey S.S., Whitehead S.A. The endocrine pancreas. In: Endocrinology. 2001. Informa Healthcare.
4. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*. 2004;306:1383-1386.
5. Wijkander J, Landstrom TR, Manganiello V, Belfrage P, Degerman E. Insulin-induced phosphorylation and activation of phosphodiesterase 3B in rat adipocytes: possible role for protein kinase B but not mitogen-activated protein kinase or p70 S6 kinase. *Endocrinology*. 1998;139:219-227.
6. Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, Reitman ML. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest*. 2000;105:271-278.
7. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175-184.
8. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002;415:339-343.
9. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24:639-646.
10. Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Hardie DG, Grossman AB, Korbonsits M. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2005;280:25196-25201.
11. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8:1288-1295.
12. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S,

- Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005;307:426-430.
13. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006;116:1494-1505.
  14. Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:1309-1313.
  15. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*. 2006;97:673-683.
  16. Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1576:1-14.
  17. Ojuka EO. Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *Proc Nutr Soc*. 2004;63:275-278.
  18. Schmidt MC, McCartney RR. beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *EMBO J*. 2000;19:4936-4943.
  19. Thelander M, Olsson T, Ronne H. Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO J*. 2004;23:1900-1910.
  20. Carling D, Zammit VA, Hardie DG. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett*. 1987;223:217-222.
  21. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108:1167-1174.
  22. Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes*. 2000;49:896-903.
  23. Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296:350-354.
  24. Garton AJ, Campbell DG, Carling D, Hardie DG, Colbran RJ, Yeaman SJ. Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem*. 1989;179:249-254.
  25. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*. 1997;246:259-273.

26. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007;100:328-341.
27. Ruderman NB MD, Xu XJ PD, Nelson LE, Cacicedo JM PD, Saha AK, Lan FMD, Ido Y. AMPK and SIRT1: A Longstanding Partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010.
28. Vincent MF, Marangos P, Gruber HE, Van den BG. AICARiboside inhibits gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Adv Exp Med Biol.* 1991;309B:359-362.
29. Longnus SL, Wambolt RB, Parsons HL, Brownsey RW, Allard MF. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R936-R944.
30. Rossmeisl M, Barbatelli G, Flachs P, Brauner P, Zingaretti MC, Marelli M, Janovska P, Horakova M, Syrový I, Cinti S, Kopecky J. Expression of the uncoupling protein 1 from the aP2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo. *Eur J Biochem.* 2002;269:19-28.
31. Rossmeisl M, Syrový I, Baumruk F, Flachs P, Janovska P, Kopecky J. Decreased fatty acid synthesis due to mitochondrial uncoupling in adipose tissue. *FASEB J.* 2000;14:1793-1800.
32. Flachs P, Novotný J, Baumruk F, Bardova K, Bourova L, Miksik I, Sponarova J, Svoboda P, Kopecky J. Impaired noradrenaline-induced lipolysis in white fat of aP2-Ucp1 transgenic mice is associated with changes in G-protein levels. *Biochem J.* 2002;364:369-376.
33. Horman S, Vertommen D, Heath R, Neumann D, Mouton V, Woods A, Schlattner U, Wallimann T, Carling D, Hue L, Rider MH. Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem.* 2006;281:5335-5340.
34. Kramer HF, Witczak CA, Fujii N, Jessen N, Taylor EB, Arnolds DE, Sakamoto K, Hirshman MF, Goodyear LJ. Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes.* 2006;55:2067-2076.
35. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* 2005;310:1642-1646.
36. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature.* 2004;428:569-574.
37. Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004;279:50754-50763.



38. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*. 2004;430:686-689.
39. Canto C, Auwerx J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20:325-331.
40. Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarente L. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*. 2002;418:344-348.
41. Kaeberlein M, Powers RW, III. Sir2 and calorie restriction in yeast: a skeptical perspective. *Ageing Res Rev*. 2007;6:128-140.
42. Ghislain M, Talla E, Francois JM. Identification and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamidase gene, PNC1. *Yeast*. 2002;19:215-224.
43. Shen Z, Liang X, Rogers CQ, Rideout D, You M. Involvement of adiponectin-SIRT1-AMPK signaling in the protective action of rosiglitazone against alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298:G364-G374.
44. Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, Cohen RA. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem*. 2004;279:47898-47905.
45. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*. 2008;283:27628-27635.
46. Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell*. 2008;14:661-673.
47. Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J Biol Chem*. 2005;280:16456-16460.
48. Jager S, Handschin C, St Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:12017-12022.
49. Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:7217-7222.
50. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, Kim MK, Viollet B, Chung JH. AMP-Activated Protein Kinase-Deficient Mice Are Resistant to the Metabolic Effects of Resveratrol. *Diabetes*. 2010;59:554-563.
51. Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakis C, Elliott PJ, Auwerx J. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and

- protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* 2008;8:347-358.
52. Broadhurst CL, Wang Y, Crawford MA, Cunnane SC, Parkington JE, Schmidt WF. Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potential impact on early African Homo sapiens. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002;131:653-673.
  53. Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci (Lond).* 2009;116:1-16.
  54. Kopecky J, Flachs P, Rossmeisl M. Vliv vícenenasycených mastných kyselin řady n-3 na citlivost k inzulínu. In: Trendy soudobé diabetologie. Pelikanova T., ed. 2007. Galen, Praha.
  55. Smith WL. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17:174-182.
  56. Vecchini A, Ceccarelli V, Susta F, Caligiana P, Orvietani P, Binaglia L, Nocentini G, Riccardi C, Calviello G, Palozza P, Maggiano N, Di Nardo P. Dietary alpha-linolenic acid reduces COX-2 expression and induces apoptosis of hepatoma cells. *J Lipid Res.* 2004;45:308-316.
  57. Aronson WJ, Glaspy JA, Reddy ST, Reese D, Heber D, Bagga D. Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. *Urology.* 2001;58:283-288.
  58. Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E, Titos E, Martinez-Clemente M, Lopez-Parra M, Arroyo V, Claria J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J.* 2009;23:1946-1957.
  59. Gonzalez-Periz A, Planaguma A, Gronert K, Miquel R, Lopez-Parra M, Titos E, Horrillo R, Ferre N, Deulofeu R, Arroyo V, Rodes J, Claria J. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J.* 2006;20:2537-2539.
  60. Lengqvist J, Mata DU, Bergman AC, Willson TM, Sjoval J, Perlmann T, Griffiths WJ. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3:692-703.
  61. Flachs P, Horakova O, Brauner P, Rossmeisl M, Pecina P, Franssen-van Hal N, Ruzickova J, Sponarova J, Drahotka Z, Vlcek C, Keijer J, Houstek J, Kopecky J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia.* 2005;48:2365-2375.
  62. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007;6:137-143.

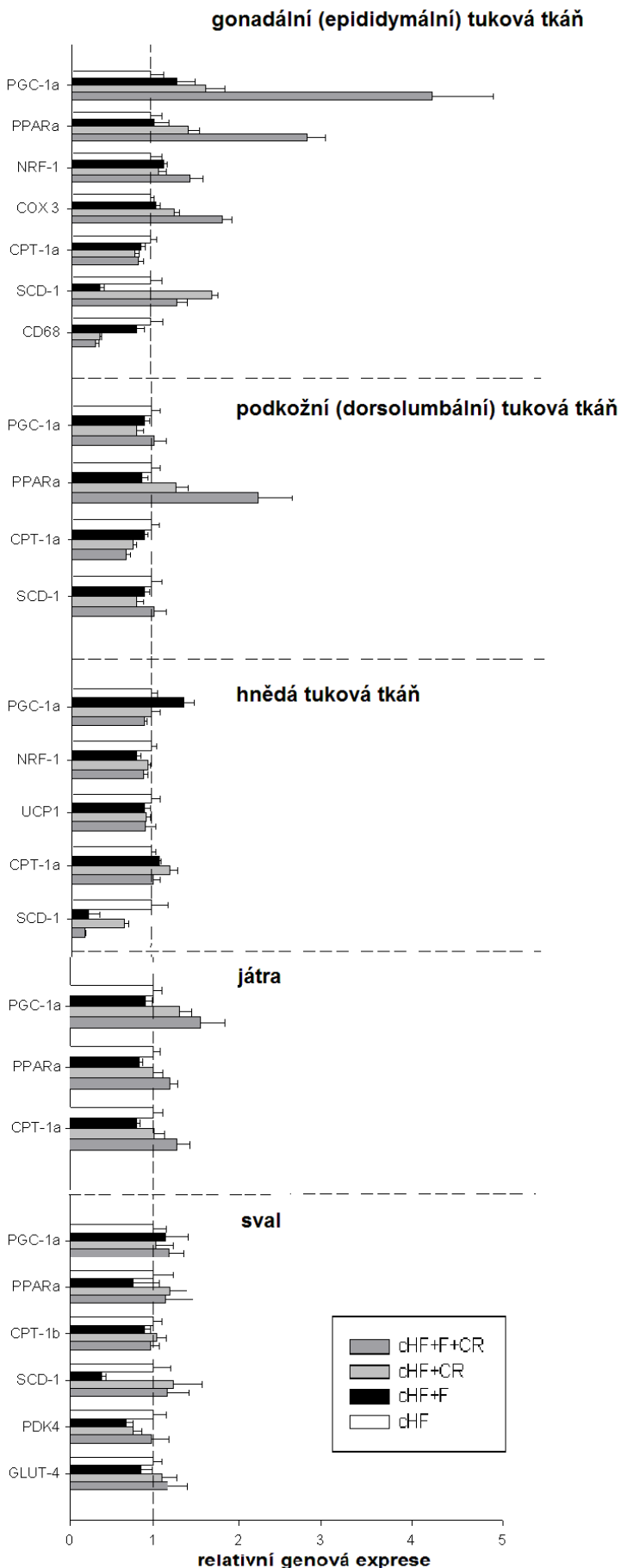
63. Yang X, Smith U. Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? *Diabetologia*. 2007;50:1127-1139.
64. Kuda O, Jelenik T, Jilkova Z, Flachs P, Rossmeisl M, Hensler M, Kazdova L, Ogston N, Baranowski M, Gorski J, Janovska P, Kus V, Polak J, Mohamed-Ali V, Burcelin R, Cinti S, Bryhn M, Kopecky J. n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*. 2009;52:941-951.
65. Rossi AS, Lombardo YB, Lacorte JM, Chicco AG, Rouault C, Slama G, Rizkalla SW. Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289:R486-R494.
66. Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, Gillum M, Shulman GI. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes*. 2006;55:924-928.
67. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278:45021-45026.
68. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. 2005;310:314-317.
69. Hattori S, Hattori Y, Kasai K. Hypoadiponectinemia is caused by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Metabolism*. 2005;54:482-487.
70. Todoric J, Loffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Zeyda M, Waldhausl W, Stulnig TM. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*. 2006;49:2109-2119.
71. Krebs JD, Browning LM, McLean NK, Rothwell JL, Mishra GD, Moore CS, Jebb SA. Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30:1535-1544.
72. Rossmeisl M, Flachs P, Brauner P, Sponarova J, Matejkova O, Prazak T, Ruzickova J, Bardova K, Kuda O, Kopecky J. Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28 Suppl 4:S38-S44.
73. Suchankova G, Tekle M, Saha AK, Ruderman NB, Clarke SD, Gettys TW. Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;326:851-858.
74. Dobrzyn A, Dobrzyn P, Miyazaki M, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acids do not activate AMP-activated protein kinase in mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332:892-896.

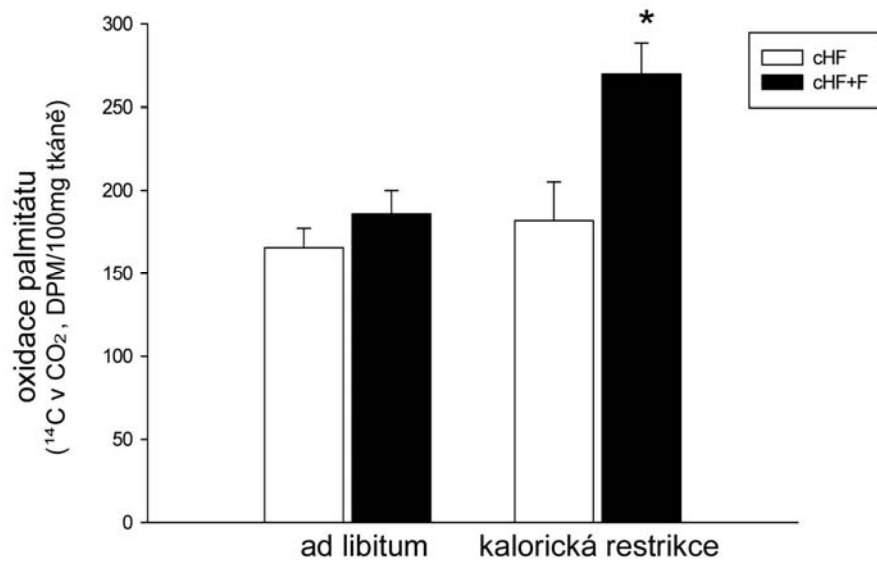
75. Kopecky J, Rossmeisl M, Flachs P, Kuda O, Brauner P, Jilkova Z, Stankova B, Tvrzicka E, Bryhn M. n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proc Nutr Soc.* 2009;68:361-369.
76. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, Kopecky J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia.* 2006;49:394-397.
77. Jorgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frosig C, Birk JB, Schjerling P, Vaulont S, Richter EA, Wojtaszewski JF. Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2004;279:1070-1079.
78. Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10794-10799.
79. Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, Knapp M, Le T, Orduna J, Foretz M, Viollet B. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol.* 2006;26:5336-5347.
80. Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem.* 1980;102:344-352.
81. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76-85.
82. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
83. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
84. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
85. Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, Knapp M, Le T, Orduna J, Foretz M, Viollet B. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol.* 2006;26:5336-5347.
86. Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metabolism.* 2008;57:986-998.
87. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J.

- Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006;127:1109-1122.
88. Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol*. 1998;201:1129-1139.
  89. Jones BH, Maher MA, Banz WJ, Zemel MB, Whelan J, Smith PJ, Moustaid N. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. *Am J Physiol*. 1996;271:E44-E49.
  90. Jeffcoat R, James AT. The control of stearoyl-CoA desaturase by dietary linoleic acid. *FEBS Lett*. 1978;85:114-118.
  91. Ishizuka M, Toyama Y, Watanabe H, Fujiki Y, Takeuchi A, Yamasaki S, Yuasa S, Miyazaki M, Nakajima N, Taki S, Saito T. Overexpression of human acyl-CoA thioesterase upregulates peroxisome biogenesis. *Exp Cell Res*. 2004;297:127-141.

# 13 Příloha

Výsledky měření genové exprese v různých tkáních zvířat v pokusu s kombinací diety obohacené o n-3 PUFA (cHF+F) a 10 % kalorické restrikce. Úroveň exprese u zvířat na kontrolní dietě cHF byla stanovena na hodnotu 1. Výsledky z připravované práce.





Oxidace mastných kyselin u myši krmených dietami cHF a cHF+F ad libitum nebo při 10 % kalorické restrikci. \* - průkazný rozdíl ( $p < 0,05$ )