

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

EFEKT $n-3$ VÍCEHENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN
NA GENOVOU EXPRESI



Diplomová práce

Michal Hensler

Vedoucí diplomové práce : RNDr. Pavel Flachs PhD.

Oddělení biologie tukové tkáně
Fyziologický ústav AV ČR

Praha 2007

Prohlašuji, že předloženou diplomovou práci jsem vypracoval sám pod vedením RNDr. Pavla Flachse PhD. ve Fyziologickém ústavu AV ČR za použití uvedených literárních pramenů.

V Praze dne 30.4.2007

Miloslav Křelík
.....

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli RNDr. Pavlu Flachsovi PhD. za odbornou pomoc při vypracování této diplomové práce. Chtěl bych také poděkovat všem svým spolupracovníkům z laboratoře, za vstřícný přístup a pomoc kdykoliv jsem ji potřeboval. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat MUDr. Janu Kopeckému DrSc. za příležitost vypracovat svou diplomovou práci na Oddělení biologie tukové tkáně. Velký dík patří také mé rodině za to, že mě po čas studia podporovala a vytvořila mi potřebné zázemí pro studium.

Obsah

1. ÚVOD	5
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1. OBEZITA A GENOVÁ PREDISPOZICE.....	9
2.2. MITOCHONDRIE.....	9
2.2.1. Biogeneze mitochondrií.....	11
2.3. TUKOVÁ TKÁŇ.....	11
2.3.1. Lipidový metabolismus.....	13
2.3.2. Tuková tkáň jako endokrinní orgán.....	16
2.4. POLYENASASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY.....	19
2.4.1. n-3 PUFA – efekt na genovou expresi.....	22
2.4.2. Efekt n-3 PUFA na genovou expresi v játrech.....	23
2.4.3. Inzulínová citlivost a vliv n-3 PUFA.....	23
2.4.3.1. Vztah inzulínové rezistence ke svalu.....	23
2.4.3.2. Vztah inzulínové rezistence k játrům.....	24
2.4.4. Polynenasycené mastné kyseliny a zánětlivá reakce.....	24
3. CÍLE PRÁCE	26
4. CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	27
5. MATERIÁLY A METODY	29
5.2. POUŽITÉ METODY:.....	29
5.2.1. Izolace RNA z myších tkání.....	29
5.2.2. Izolace RNA lidských biopsií.....	30
5.2.3. Izolace adipocytů z podkožního a gonadálního tukového depu myši.....	33
5.2.4. Izolace DNA z gelu.....	35
5.2.5. Kvantitativní PCR v reálném čase.....	36
5.2.6. Protokol pro reverzní transkripci.....	39
5.2.7. Stanovení obsahu triacylglycerolů v tkáni.....	40
STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	42
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
6.1.1. EXPERIMENT NA MYŠÍM MODELU.....	43
6.1.2. Hnědá tuková tkáň.....	46
6.1.3. Játra.....	47
6.1.4. Sval.....	47
6.1.5. Bílá tuková tkáň.....	48
6.1.5.1. Genová exprese na úrovni celé tukové tkáně.....	48
6.1.5.2. Genová exprese v izolovaných adipocytech.....	48
6.1.6. Vliv n-3 PUFA na sekreci adipokinů.....	50
6.1.6.1. Ovlivnění genové transkripce adipokinů v gonadálním tukovém depu.....	50
6.1.6.2. Ovlivnění genové transkripce adipokinů v dorso-lumbálním tukovém depu.....	52
6.2. EXPERIMENT NA VZORCÍCH Z LIDSKÝCH PACIENTŮ.....	53
7. DISKUZE	55
7.1. EFEKT N-3 PUFA NA GENOVOU EXPRESI NA MYŠÍM MODELU OBEZITY A INZULÍNOVÉ REZISTENCE... -	55
7.2. VLIV N-3 PUFA NA SEKRECI ADIPOKINŮ.....	56
7.3. OVĚŘIT VÝSLEDKY ZÍSKANÉ NA MYŠÍM MODELU U LIDSKÝCH PACIENTŮ.....	57
8. ZÁVĚR	58

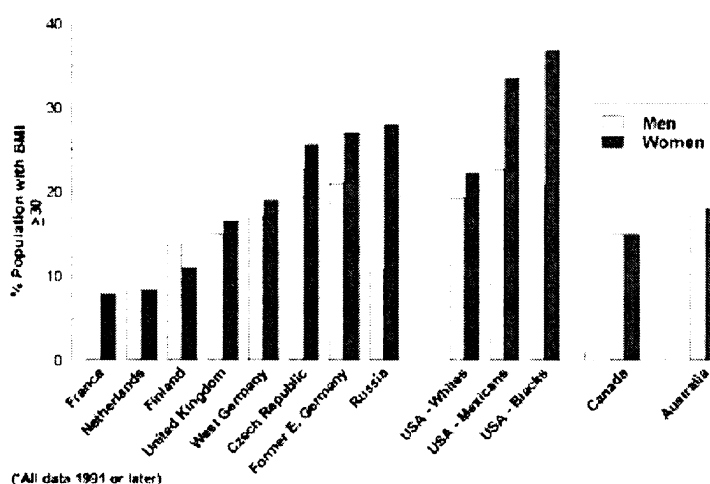
9. SEZNAM ZKRATEK.....	- 59 -
10. LITERATURA.....	- 62 -
11. PŘÍLOHA.....	- 68 -

1. Úvod

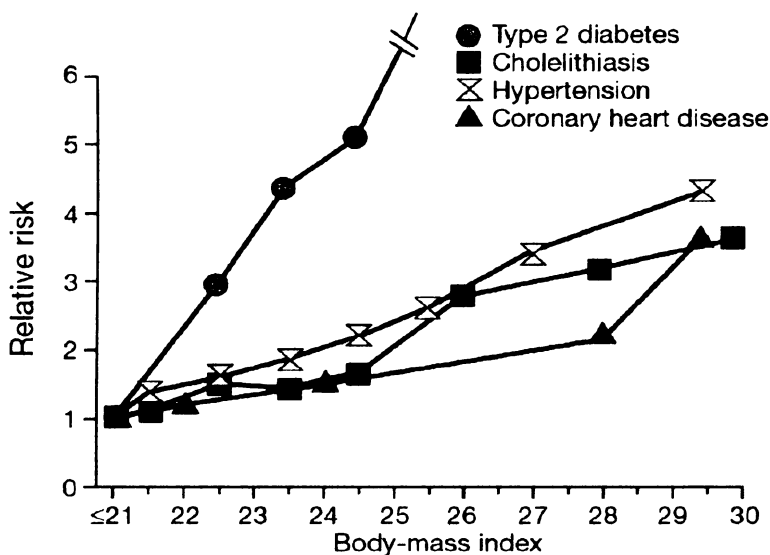
Za velký problém moderního světa je dnes považován celosvětový nárůst obezity. Obezita není jen kosmetický problém. Odvrácenou stranou obezity je soubor doprovodných komplikací či onemocnění, která se nazývají metabolický syndrom. Různé definice metabolického syndromu v poslední době zaznamenávají vývoj ke stále přísnějším kritériím. Definice formulována v roce 2005 organizací „mezinárodní diabetologická federace“ (ALBERTI a spol. 2005) vyžaduje přítomnost centrální obezity (obvod pasu u žen a mužů ≥ 80 , resp. 94 cm, hodnoty platné pro evropské etnikum) a nejméně dvou z dalších faktorů, kterými jsou:

- hypertriglyceridémie (hladina TG v plazmě větší než 150 mg/dl, tedy $1,7$ mmol/l nebo specifická léčba tohoto stavu)
- nižší HDL-cholesterol (menší než 40 mg/dl, tedy $1,03$ mmol/l u mužů a 50 mg/dl, tedy $1,29$ mmol/l u žen, nebo specifická léčba tohoto stavu)
- hypertenze (systolický tlak ≥ 130 , resp. 80 mm Hg, nebo léčba již diagnostikované hypertenze)
- hyperglykémie (glykémie na lačno ≥ 100 mg/dl, tedy $5,6$ mmol/l, nebo již diagnostikovaný T2D).

V České republice je obezita častým jevem dospělé populace. Budeme-li se zabývat nadváhou ($BMI > 25$ kg/m²), nalezneme v naší populaci okolo 50% mužů a 35% žen s tímto BMI. Hlavní příčinou celosvětového nárůstu obezity je změna životního stylu, nedostatek fyzické aktivity a příjem vysokoenergetické stravy bohaté na tuky.



Graf 1: Ukazuje míru obezity ve vybraných zemích.



Kopelman et al. Nature 2000

Graf 2: zvýšená incidence nemocí spojená se zvyšujícím se BMI

Kromě klasifikace podle BMI, je významná i klasifikace kvalitativní podle závažnosti obezity. Podle rozložení tuku v těle rozlišujeme obezitu tzv. mužského typu (androidní, typ jablko, ukládání tuku na břicho a v pase) a obezitu ženského typu (gynoidní, typ hruška, ukládání tuku především na stehnech a hýždích). Je třeba zdůraznit, že tyto formy nejsou vázány na muže a ženy. Obezita mužského typu je provázena řadou metabolických komplikací, včetně rozvoje cukrovky a aterosklerózy. Gynoidní obezita bývá naopak hlavně kosmetickým problémem.

Důležitou roli při studiu a objasňování vzniku obezity hrají modelové organismy. Mezi nejčastěji používané patří hlodavci, a to jak krysy, tak i myši. U myší je vyšlechtěno mnoho linií, které se odlišují náchylností (respektive odolností) k obezitě. Mnoho důležitých poznatků nám také přináší genetické modely myší, které mají nefunkční jeden nebo více genů („knock-out geny“), hrající důležitou roli v lipidovém metabolismu. Svou nezastupitelnou roli zde hrají i transgenní organismy.

V současné době se mnoho vědeckých týmů snaží najít strategii k ovlivnění obezity, inzulínové rezistence a diabetu. Laboratoř, ve které jsem vypracoval svou diplomovou práci, se jmenuje Oddělení biologie tukové tkáně a jedním z jejích cílů je přispět k objasnění vzniku obezity a inzulínové rezistence (IR). Můj přínos v této laboratoři spočíval v měření genové exprese, a to jak v tkáních v experimentech na myších, tak i u lidských vzorků. Práce se skládá ze dvou hlavních částí, kterým odpovídají i oba hlavní cíle. V 1. části jsem se zaměřil na popis unikátního

experimentálního myšího modelu dietou indukované obezity a inzulínové rezistence. Ve 2. části popisují výsledky na lidské studii, která byla prováděna ve spolupráci s Endokrinologickým ústavem (Národní 8, Praha 1). Mezi nadějně kandidáty, kteří ovlivňují prevenci a léčbu obezity a s ní spojené inzulínové rezistence, patří n-3 vícenenasycené mastné kyseliny (n-3 PUFA) a jejich deriváty. Moje diplomová práce se zabývá především vlivem těchto látek na prevenci a léčbu obezity a inzulínové rezistence.

Část výsledků byla publikována v zahraničním časopise (viz. příloha)

2. Literární přehled

2.1. Obezita a genová predispozice

Ačkoliv je obezita podmíněna řadou vnějších faktorů, hraje zde svou podstatnou roli i genetická predispozice. Obezita má především polygenní charakter, tzn. že je ovlivněna kombinacemi polymorfizmů několika různých, na sobě nezávislých genů. V dnešní době je známo přibližně 250 genů přispívajících k rozvoji obezity a jejich počet se stále zvyšuje. Tyto geny nejen že interagují mezi sebou, ale i s řadou faktorů vnějšího prostředí. Studium těchto komplexních vztahů (interakce gen-gen, gen-prostředí) je na počátku, ale ukazuje se, že právě tudy vede cesta k pochopení složitých vztahů genetických predispozic vedoucích k obezitě.

Hlavní podmínkou přežití člověka byla jeho schopnost šetřit energii a překonat různě dlouhá období nedostatku potravy. Přežívali pouze ti jedinci, kteří měli geneticky vhodný soubor „šetrných“ genů umožňujících co nejefektivněji ukládat energii. V dnešní době, kdy nepocítíme nedostatek potravin, nám takto naprogramovaný metabolismus spíše škodí.

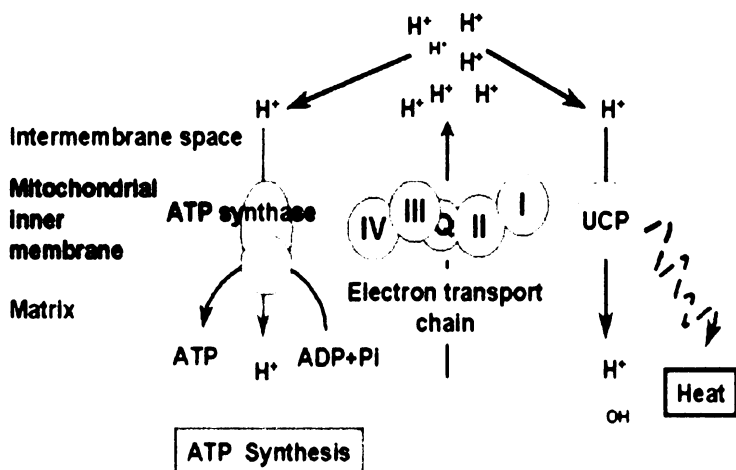
Metabolický syndrom ovlivňuje řadu metabolických drah, signálních transdukcí i patofyziologických systémů. U konkrétního jedince se mohou jednotlivé složky vyskytovat v různé intenzitě, některé mohou zcela chybět. S postupujícím věkem jich obvykle přibývá. Krátkodobě působící pozitivní energetická bilance obvykle aktivuje u zdravých jedinců fyziologické regulační mechanismy, které zabrání vzestupu hmotnosti. U jedinců náchylných ke vzniku obezity bývají tyto regulační mechanismy porušeny. Dlouhodobá pozitivní energetická bilance však vede k hromadění tukových zásob a vzestupu hmotnosti i u jedinců, kteří nemají predispozice pro rozvoj obezity.

2.2. Mitochondrie

Jednou z možností, jak ovlivnit množství triacylglycerolů v tkáních, je ovlivnění přímo energetického metabolismu buňky.

Mitochondrie představují nepostradatelný zdroj ATP pro buňku a ovlivnění jejich oxidační kapacity může vést ke změně metabolismu buňky. Probíhají v nich nejdůležitější katabolické procesy jako citrátový cyklus, β -oxidace a oxidační

fosforylace. Elektrony vznikající během oxidace NADH a FADH₂ jsou postupně přenášeny oxidoredukčními komplexy dýchacího řetězce a současně s tím na několika místech řetězce (komplex I, komplex III, komplex IV) dochází k přenosu protonů do mezimembránového prostoru mitochondrií. Tímto vzniká protonový gradient, kterého se využívá při tvorbě ATP (VOET. 1994).



Obr. 1: Odpřažení oxidační fosforylace (převzato COLLINS et al.1999 ,International Journal of obesity)

Komplexy dýchacího řetězce generují gradient elektrochemického potenciálu H⁺. ATP-synthasa využívá volnou energii tohoto gradientu k tvorbě ATP. Odpřahující proteiny mohou zvyšovat propustnost vnitřní mitochondriální membrány pro H⁺ ionty, které se pak navracejí do matrix jinou cestou než F₀ sektorem ATP-synthasy. Volná energie gradientu elektrochemického potenciálu H⁺ tak není využita k produkci ATP, ale uvolňuje se ve formě tepla.

Energie uložena v elektrochemickém potenciálu však nemusí vždy sloužit jen na tvorbu ATP z ADP pomocí ATP – syntázy. Ionty H⁺ mohou procházet vnitřní mitochondriální membránou, aniž by se tvořilo ATP, za současného uvolňování tepla. Mezi proteinové komplexy umožňující průchod H⁺ iontů patří tzv. odpřahující proteiny (UCP). Odpřažení oxidační fosforylace má za následek snížení syntézy mastných kyselin, klesá koncentrace malonylu-CoA, který blokuje aktivitu karnitin-palmitoyl transferasy (CPT-1) a více mastných kyselin vstupuje do mitochondrií. Odpřažení tedy stimuluje β-oxidaci. U savců bylo zatím popsáno 5 typů UCP. Různé typy UCP se od sebe liší nejenom různým stupněm homologie, ale i místem výskytu (viz.tab. 1).

Protein	Tkáň
UCP1	hnědá a bílá tuková tkáň
UCP2	bílá tuková tkáň slinivka břišní žaludek
UCP3	kosterní a srdeční svalstvo hnědá tuková tkáň
CP4	Mozek
UCP5	mozek a další tkáně

Tab. 1: Lokalizace odpřahujících proteinů u savců, upraveno dle (BRUN a spol. 1999).

2.2.1. Biogeneze mitochondrií

Klíčovou roli zde hraje PGC-1 α (Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Coactivator 1 α), jehož exprese je výrazně stimulovaná chladem nebo adrenergní stimulací (BOSS a spol. 1999). PGC-1 α stimuluje expresi NRF-1 (nuclear respiratory factor 1), který se váže do promotorové oblasti mitochondriálních genů kódovaných v jádře buňky. Jsou to geny pro β -ATP syntasu, cytochrom c, cytochrom-c-oxidasu a mitochondriální transkripční faktor A (mtTFA). mtTFA je translokován z jádra do mitochondrií, kde stimuluje mitochondriální DNA replikaci a transkripci.

PGC-1 α je se však nepodílí jen na biogenezi mitochondrií, ale také na glukózové homeostáze a na stimulaci genů účastnících se oxidace mastných kyselin (LEHMAN a spol. 2000; VEGA a spol. 2000).

2.3. Tuková tkáň

Z morfologického hlediska je tuková tkáň složena z tukových buněk (adipocytů), které jsou usazeny v systému kolagenního vaziva, protkaného hustou sítí kapilár a nervy, spolu s preadipocyty či buňkami imunitního systému. Tuková tkáň je přítomna již při narození a ukládá se v některých obdobích více (puberta), v jiných relativně

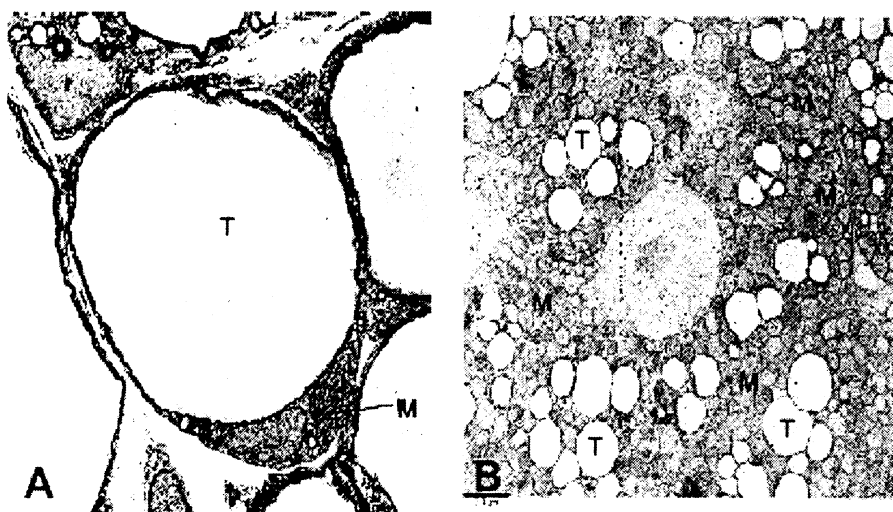
ubývá (SHIMOKATA a spol. 1989). Tuková tkáň je přirozenou součástí lidského těla, pro které má svůj význam: 1. zásobárna energie, 2. sekreční, 3. izolační, 4. funkce mechanické ochrany. Tato tkáň je složená z velkého množství tukových buněk (adipocytů), které si uchovávají svoji energii ve formě nepolárních tuků (triacylglycerolů, TG). Tělo nemá jinou srovnatelnou možnost energie ukládat. Energie uložená v jaterním glykogenu představuje jen „pohotovostní zásobu“, která by byla vyčerpána během několika desítek minut. Tuková tkáň má tedy naprosto nepostradatelnou úlohu pro přežití i v krátkodobých období bez přijímání potravy, jinak by docházelo k odbourávání svalů i jiných bílkovin pro tvorbu ATP.

V lidském těle můžeme nalézt dva hlavní typy tukové tkáně, bílou tukovou tkáň, která je specializována na uchovávání energie ve formě triacylglycerolů a má nezastupitelnou roli v sekreční funkci a hnědou tukovou tkáň (BAT), která slouží jako termogenní orgán. Tyto tkáně se liší nejen fyziologií, ale také morfologií (CINTI. 2005).

Bílá tuková tkáň, jak již bylo řečeno, je specializovaná na uchovávání TG a proto až 90% objemu adipocytu zaujímá tuková kapénka. Ostatní kompartmenty jsou „natlačeny“ k plazmatické membráně. Mitochondrie bílé tukové tkáně jsou menší a méně početné, vyznačují se menší oxidační schopností (CINTI. 2005).

V této práci je používáno označení „gonadální tukové depo“ (GON), pro tukovou tkáň obklopující pohlavní orgány a „dorzo-lumbální tukové depo“ (DL), pro podkožní tukovou tkáň oblasti zad. V gonadálním tukovém depu tvoří adipocyty většinu buněčné masy, dorzo-lumbální tukové depo je z velké části tvořeno intersticiálními buňkami a krevními kapilárami (CINTI. 1999).

Hnědá tuková tkáň je oproti bílé tukové tkáni velmi aktivní. Hnědotukové adipocyty obsahují množství tukových kapének a velké množství mitochondrií (viz. obr 2). V literatuře jsou tyto buňky popisovány jako multilokulární. Vyskytují se v typických lokalizacích mezi lopatkami, mezi žebry, mezi krčními svaly a kolem důležitých cév. Tkáň je silně prostoupena cévami a hustě inervována přes sympatický nervový systém (CINTI. 2005). Pouze kolem 40% buněk hnědé tukové tkáně tvoří zralé hnědé adipocyty, zbytek jsou intersticiální buňky a preadipocyty, které mohou být přeměněny ve zralé hnědé tukové buňky (HIMMS-HAGEN a spol. 1992). Buňky hnědé tukové tkáně se vyznačují vysokou oxidační kapacitou, která vede k vzniku velkého membránového potenciálu. Tento elektrochemický gradient protonů je „zkratován“ přes UCP 1 (NICHOLLS a spol. 1984) a akumulovaná energie se uvolní ve formě tepla.



Obr. 2: (A) Snímek adipocytu bílé tukové tkáně v elektronovém mikroskopu. Unilokulární buňka obsahuje jednu tukovou kapénku (T), mitochondrie (M) jsou spolu s jádrem zatlačeny na periferii buňky. (B) snímek části adipocytu hnědé tukové tkáně. Multilokulární buňka obsahuje více tukových kapének (T) a mnoho mitochondrií (M). Převzato a upraveno podle (CINTI. 2005).

2.3.1. Lipidový metabolismus

Prvním místem vstřebávání tuků je tenké střevo, kde jsou rozloženy na směs mastných kyselin (FFA), monoacylglycerolů (MAG) a diacylglycerolů (DAG). Poté jsou tyto mastné kyseliny převáděny ve střevních buňkách na TG a pomocí chilomikronů transportovány krevním řečištěm do jater, kde jsou převedeny do lipoproteinů (např. VLDL) a uvolněny do krve. Tyto částice jsou ve vlasečnicích tukové či svalové tkáni hydrolyzovány lipoproteinovou lipasou (LPL) na FFA a glycerol. FFA jsou oxidovány nebo uloženy v tukové tkáni (VOET-VOETOVÁ. 1994).

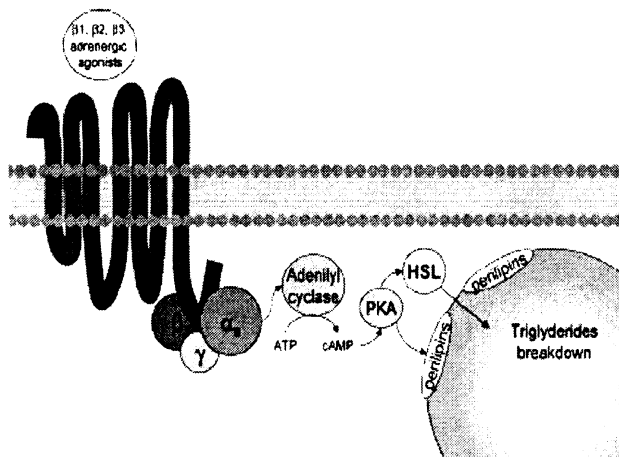
Oxidace mastných kyselin probíhá hlavně v mitochondriích a v peroxisomech. Úlohou peroxisomů je zkracovat dlouhé řetězce mastných kyselin a tím usnadnit jejich zpracování v mitochondriích. Mastná kyselina musí být před vlastní reakcí aktivována enzymem acyl-CoA syntetasou (ACS), kdy je acylový zbytek mastné kyseliny přenesen na koenzym A, za součastné spotřeby ATP. Acyl-CoA je přes vnitřní mitochondriální membránu, která je nepropustná pro Acyl-CoA, transportován prostřednictvím karnitin-

palmitoyl transferázy (CPT-1, CPT-2). Acetyl-CoA je dále metabolizován v citrátovém cyklu (VOET-VOETOVÁ. 1994).

Organismus však není odkázán jen na příjem mastných kyselin z potravy, ale dokáže je taky syntetizovat. Biosyntéza mastných kyselin je však velmi energeticky náročný proces a proto je ATP limitujícím faktorem. Místem biosyntézy mastných kyselin je cytosol jaterních, tukových i jiných buněk. Výchozí molekulou pro *de novo* biosyntézu mastných kyselin je malonyl-CoA, který vzniká reakcí katalyzovanou enzymem Acetyl-CoA-karboxylásou (ACC) z acetylu-CoA. Pomocí enzymu syntásou mastných kyselin (FAS) dochází k dalšímu prodlužování malonylu-CoA až na konečný produkt palmitoyl-CoA. K vytvoření celé škály mastných kyselin dochází v mitochondriální matrix pomocí elongas a desaturas (VOET-VOETOVÁ. 1994).

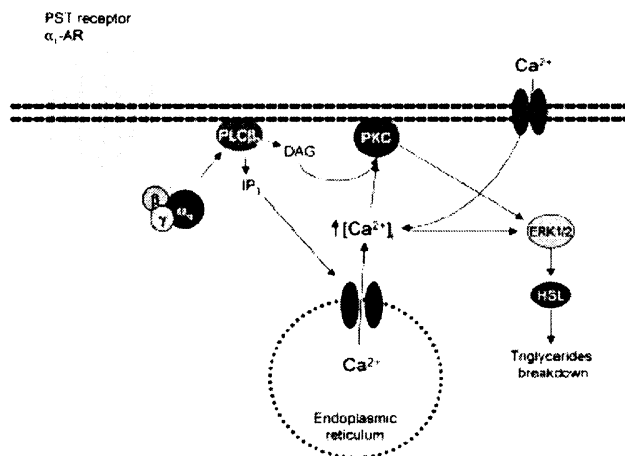
V době hladovění je hydrolyza TG v tukové tkáni na glycerol a FFA esenciální pro mnoho tkání jako jsou játra, svaly a ledviny, které využívají oxidaci mastných kyseliny jako hlavní zdroj energie . Hormon-senzitivní lipasa (HSL) je enzym, který hydrolyzuje intracelulární TG a DG. Je to jedna z klíčových molekul kontrolující lipolýzu. Aktivita HSL je stimulována katecholaminy, glukokortikoidy, TSH a růstovým hormonem. Inhibiční účinek na HSL má zejména inzulin.

Nejlépe prostudovaným mechanismem je cAMP modulovaná lipolýza. Po vazbě ligandu na β 3-adrenergní receptor adipocytu dochází k aktivaci trimérních G-proteinů a tím k aktivaci adenylcyklázy. Zvýšení intracelulární hladiny cAMP vede k aktivaci protein kinázy A (PKA). Nafosforylováním perilipinu dojde k přístupnosti povrchu tukové kapénky hormon senzitivní lipase a následné lipolýze (obr.3) (BELFRAGE a spol. 1980; KAWAMURA a spol. 1981; SCHIMMEL a spol. 1980).



Obr.3: Schématicky znázorňuje lipólýzu závislou na hladině cAMP. Převzato a upraveno podle(CALDER. 2006)

V adipocytech můžeme nalézt i cAMP nezávislou dráhu aktivace HSL. Tato aktivaci začíná vazbou pankreastatinu (PST) na receptor v plazmatické membráně adipocytů. Při transdukci signálů dochází k aktivaci fosfolipázy C (PLC) a uvolňování inositol-1,4,5-trisfosfátu (IP₃). Nárůst intracelulární koncentrace Ca²⁺ vede k aktivaci proteinkinázy (PKC). Tato kináza spolu s Ca²⁺ aktivuje ERK 1/2, která následně zvyšuje aktivitu HSL (obr. 4) (GONZALEZ-YANES a spol. 2000).



Obr. 4: Ukazuje cAMP nezávislou cestu aktivace HSL. Převzato a upraveno podle (CALDER. 2006).

Přesná kontrola lipolýzy je důležitá při udržování stálé hladiny FFA v krvi. Při disregulaci dochází k vysokému nárůstu FFA v plazmě. Vysoká hladina FFA přispívá k inzulínové rezistenci a podílí se na mnoha kardiovaskulárních onemocnění (CHAN a spol. 2002).

2.3.2. Tuková tkáň jako endokrinní orgán

Tuková tkáň je velmi aktivní sekreční orgán. Sekretuje řadu látek, které hrají významnou úlohu v metabolismu tuků, udržování energetické rovnováhy, homeostáze a inzulínové rezistence (TILG a spol. 2006). Mezi proteiny tvořeny tukovými buňkami patří mimo jiné TNF alpha, adipsin, leptin, vistafin, rezistin a adiponectin (FANTUZZI. 2005; TILG a spol. 2006). Jejich funkce jsou různé a zatím ne dost přesně vymezené. Strukturní studie ale jednoznačně prokázaly, že jde o látky obdobné cytokinům, tvořeny buňkami imunitního systému. Proto pro ně bylo zavedeno kolektivní označení adipokiny.

Leptin - Leptin je mediátorem fyziologické reakce na hladovění, kdy dochází k poklesu jeho produkce a sekrece. Hlavním místem produkce je bílá tuková tkáň, dále placenta a žaludek. Leptin a jeho receptor hrají v regulaci tělesné hmotnosti důležitou roli ovlivněním chuti k jídlu (množství přijaté potravy) a regulací energetického výdeje (HUKSHORN a spol. 2004). Leptin působí jednak centrálně, jednak přímo v cílových tkáních. Účinkuje v obloukovitých jádrech hypothalamu a je schopen zablockovat příjem jídla tím, že sníží hladinu neuropeptidu Y a zvýší uvolňování melanocytů stimulující hormonu (alpha-MSH), což má vliv na celkovou tělesnou hmotnost (HILLEBRAND a spol. 2002; KONTUREK a spol. 2005). Leptin nejenže působí přes centrální nervový systém, ale má i parakrinní a autokrinní efekt na adipocyty a jejich tukový metabolismus: inkubace myších adipocytů s leptinem stimuluje lipolýzu intracelulárních TG. I v ostatních tkáních leptin inhibuje lipogenezi a zvyšuje β -oxidaci (MARGETIC a spol. 2002). Významným cílem působení je především kosterní sval.

Leptin přímo působí na 5'-AMP-aktivovanou protein kinasu (AMPK), což má za následek zvýšení katabolických drah, jako jsou β -oxidace mastných kyselin nebo glykolýza. Působí také na mitochondriální biogenezi s následným zvýšením oxidační kapacity mitochondrií (LONG a spol. 2006). Leptin však nepůsobí jen na katabolické dráhy, ale taky na anabolické. Jeden z nejdůležitějších enzymů, který je inhibován

leptinem, je acetyl CoA karboxyláza (ACC) (STEINBERG a spol. 2003). Tento enzym hraje klíčovou roli při syntéze *de novo* mastných kyselin.

Největší naděje pro terapeutické využití se vkládá do **adiponectinu**. Nejčastěji je zmiňován pro svou schopnost zlepšovat senzitivitu tkání k inzulínu. Adiponectin snižuje jaterní glukoneogenezu čímž stoupá vstup glukózy do jater. Zvyšuje také oxidace mastných kyselin a zabraňuje jejich vstupu do netukových tkání, jako jsou například svaly.

Adiponectin se vyznačuje ochrannou funkcí proti mnoha nemocem, jako je například inzulínová rezistence, dyslipidémie, ateroskleróza a ischemické choroby srdeční (KADOWAKI a spol. 2005).

Adiponectin se vyskytuje v několika formách: V plné délce, který může trimerizovat (adiponectin o nízké molekulové hmotnosti), hexamerizovat (adiponectin o střední molekulové hmotnosti) a oligomerizovat (adiponectin o vysoké molekulové hmotnosti) a jako produkt proteolytického štěpení, kterým vzniká globulární forma (TILG a spol. 2006). Tato forma může trimerizovat, avšak už ne oligomerizovat (WAKI a spol. 2005). Hlavním hráčem při tvorbě globulárního adiponectinu z adiponectinu o plné délce jsou buňky imunitního systému (TILG a spol. 2006). Viscerální obezita snižuje hladiny adiponecktinu v plazmě. Nižší hladiny adiponectinu byly také naměřeny u lidí, u kterých se vytvořila inzulínová rezistence. Už při mírném úbytku váhy dochází k nárůstu poměru adiponectinu o vysoké molekulární hmotnosti k adiponectinu o střední molekulové hmotnosti a ke snížení množství adiponectinu o nízké molekulové hmotnosti v krvi (HUG a spol. 2004). Právě tento poměr je důležitý pro zlepšení senzitivity tkání k inzulínu.

Nedávno byly identifikovány dva receptory pro adiponectin (ADIPOR1 a ADIPOR2) (YAMAUCHI a spol. 2003). Zdá se, že globulární adiponectin aktivuje ADIPOR1, zatímco ADIPOR2 je aktivován adiponectinem o plné délce (YAMAUCHI a spol. 2003). Exprese adiponectinu je také regulována prozánětlivými cytokiny, jako je IL-6, který inhibuje transkripci a translaci adiponectinu v adipocytech (FASSHAUER a spol. 2003).

Rezistin- Exprese rezistinu byla nalezena v rozličných tkáních, zahrnujících tukovou tkáň, hypothalamus, kosterní svalstvo, slinivka břišní, zažívací trakt (KUSMINSKI a spol. 2005). Zdá se, že exprese rezistinu u myší je omezena pouze na adipocyty, zatímco u lidí je syntetizován v adipocytech, ve svalech, v buňkách slinivky břišní a v makrofázích. Exprese rezistinu je zvyšována prozánětlivými cytokiny, jako

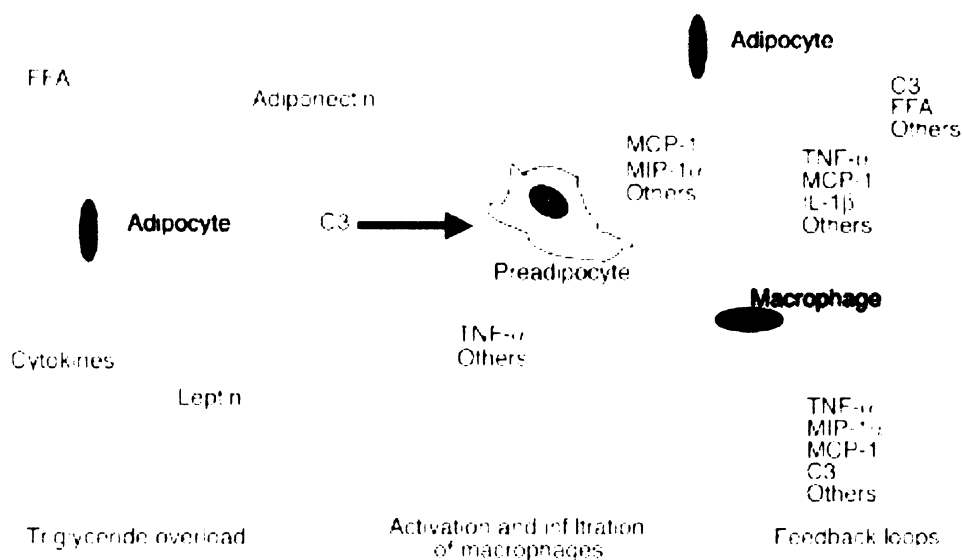
jsou IL-1, IL-6 a TNF (KASER a spol. 2003). Rezistin je dáván do souvislosti s inzulínovou rezistencí a jeho exprese stoupá s množstvím tuku v těle (STEPPAN a spol. 2001).

Adipsin- Tuková tkáň produkuje některé složky alternativní komplementové kaskády, které jsou součástí nespecifické imunitní obrany. Faktor D (adipsin) je serinová proteasa sekretovaná adipocyty a její exprese klesá se vzrůstající obezitou (WHITE a spol. 1992).

Jeden z nedávno objevených adipokinů, který je sekretovaný adipocyty ve viscerálním tuku, je **Visfatin** (FUKUHARA a spol. 2005). Tato molekula aktivuje inzulínový receptor. Předpokládá se, že na inzulínovém receptoru existují nejméně dvě odlišná vazebná místa, a to pro inzulín a visfatin. Visfatin se podílí na glukózovém metabolismu a snižování rizika inzulínové rezistence (TILG a spol. 2006).

Hotamisligil et al. jako první ukázali, že tuková tkáň zvyšuje expresi **Tumor necrosis factor- α** (TNF- α) při obezitě a inzulínové rezistenci. Předtím byl tento prozánětlivý cytokin nalezen u makrofágů jako reakce na zánětlivé onemocnění. TNF- α je inhibitor syntézy adiponektinu, což může vysvětlovat nízké hladiny v séru u obézních pacientů (MAEDA a spol. 2002). TNF- α se také podílí na vzniku inzulínové rezistence tím, že zabraňuje fosforylaci IRS-1 a následně způsobuje inhibici přenosu signálu přes inzulínový receptor (INOKUCHI. 2006). Při obezitě můžeme nalézt i další markery, které nám naznačují, že obezita je v jistém smyslu brána jako zánětlivá reakce, která je charakterizována abnormální produkcí cytokinů a aktivací prozánětlivých signálních drah (WELLEN a spol. 2005). Je to např. IL-6, který potlačuje aktivitu lipoproteinlipázy v tukové tkáni, interleukin-1, CC-chemokine ligand 2 (CCL2, MCP1) a inhibitor-1 plasminogenového aktivátoru (PAI-1). O těchto cytokinech je známo, že jsou to důležití hráči v imunitní reakci.

Obezita je doprovázená infiltrací makrofágů do tukové tkáně (WEISBERG a spol. 2003b; XU a spol. 2003). Počáteční studie na hlodavcích ukazují, že tato infiltrace makrofágů do tukové tkáně má svůj počátek v kostní dřeni. Makrofágy, vyskytující se v tukové tkáni přispívají k zvyšování koncentrace mediátorů zánětlivé reakce (WEISBERG a spol. 2003a). Infiltrace tukové tkáně makrofágy je zapříčiněna vzestupem hladiny MCP1. Makrofágy se zdají být hlavním zdrojem TNF- α . Samotné adipocyty u obézních pacientů přispívají asi 1/3 k celkové koncentraci IL-6 (FANTUZZI. 2005).



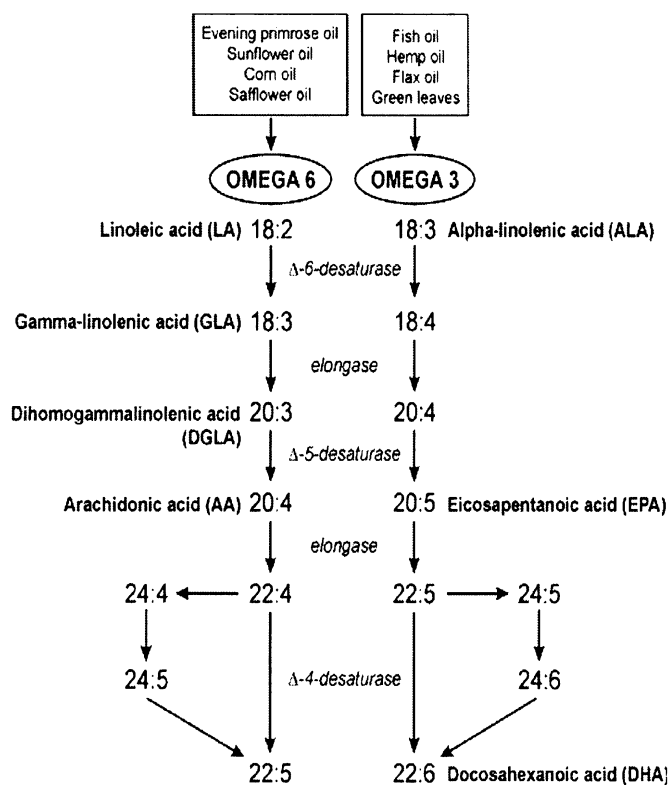
Obr.5: Hypotetický model chronického zánětu a inzulínové rezistence adipocytů. Po dosažení určité velikosti tukové tkáně, dochází k vzestupu sekrece látek, které indukují aktivaci makrofágů a jejich infiltraci do tukové tkáně. Aktivované makrofágy sekretují cytokiny, které snižují senzitivitu adipocytů k inzulínu a dále zvyšují infiltraci tukové tkáně. Preadipocyty, pod vlivem TNF- α , sekretují také mnohé cytokiny podílející se na infiltraci této tkáně makrofágy. Toto zesilování signálu může vést až k navození inzulínové rezistence na systémové úrovni. Obr. převzat z (XU a spol. 2003).

2.4. Polynenasycené mastné kyseliny

Tuky v přiměřeném množství jsou nedílnou součástí naší stravy. Jsou zdrojem nejen energie pro organismus, ale také vitamínů rozpustných v tuku (vitamín A, D, E a K) a esenciálních mastných kyselin (linolové a α -linolenové kyseliny). Mastné kyseliny rozlišujeme na nasycené (v alifatickém řetězci se nevyskytuje žádná dvojná vazba) a nenasycené (některé vodíkové atomy jsou nahrazeny dvojnou vazbou). Dále můžeme třídit mastné kyseliny podle nasycenosti: a to na mononenasycené (MUFA) - obsahují jednu dvojnou vazbu a polynenasycené (PUFA) - dvě a více dvojných vazeb.

PUFA můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: n-6, které se vyznačují první dvojnou vazbou (od metylového konce) na uhlíku 6 a n-3 mající dvojnou vazbu na uhlíku 3. Hlavní zdroj n-6 PUFA jsou např. slunečnicový a kukuřičný olej. Nejvydatnějším zdrojem n-3 PUFA je fytoplankton, základní článek potravinového

řetězce mořských živočichů. Dále jsou obsaženy v zelenině a olejninách (řepka, sója). Každá skupina polynenasycených mastných kyselin má svůj vlastní prekurzor. U n-6 PUFA je to kyselina linolová (LA), u n-3 kyselina alpha-linolenová (ALA). Výchozí esenciální mastné kyseliny (LA, ALA) jsou převážně v játrech elongovány a desaturovány za katalytického působení příslušných enzymů. K metabolické přeměně ALA na dokosahexanovou kyselinu (DHA) dochází u člověka přibližně ze 4 – 5 %. Tato konverze je však pro organismus nedostačující, z čeho vyplývá nutnost přijímat tyto mastné kyseliny v potravě.



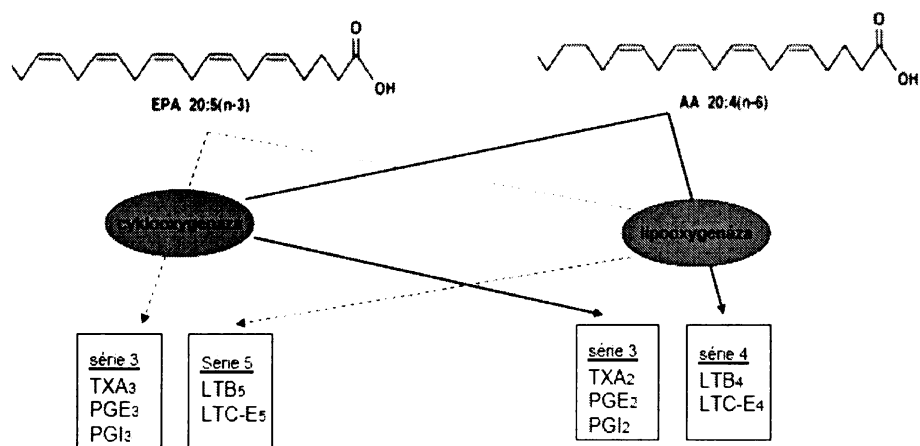
Obr. 6: Biochemická dráha konverze n-3 a n-6 vícenenasycených mastných kyselin z prekurzorů, kdy díky příslušným elongásám a desaturásám se stávají delšími a více nenasycenými. Převzato a upraveno dle M Haag 2005

Z hlediska obsahu n-3 a n-6 PUFA v dietě je důležité nejenom jejich absolutní množství, ale také jejich vzájemný poměr. Zvýšený příjem n-6 PUFA má za následek zvýšenou proliferaci a diferenciaci adipocytů a tím i nárůst obezity (MADSEN a spol.

2005). V dnešní době je hlavním problémem vysoký poměr n-6/n-3 v dietě a tento poměr stále stoupá (BROADHURST a spol. 2002).

Nenasycené mastné kyseliny jsou významnou strukturální součástí plazmatických membrán. Po jejich inkorporaci můžou měnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a tím ovlivňovat i aktivitu enzymů s nimi asociovaných.

Mnoho biologických účinků LC-PUFA řad n-6 a n-3 závisí na působení jejich aktivních metabolitů – eikosanoidů (SMITH. 2005). Tyto látky vznikají po uvolnění LC-PUFA z fosfolipidu jednak z kyseliny arachidonové (AA) – prostaglandiny (PG) a tromboxany (TX) 2.série a leukotrieny(LT) 4.série a jednak z kyseliny eikosapentaenová (EPA) – prostaglandiny a tromboxany 3.série a leukotrieny 5.série. Tvorba prostaglandinů a leukotrienů závisí na aktivitě cyklooxygenázy, pro kterou je lepším substrátem AA než EPA, a aktivitě lipooxygenázy, u které jsou preference opačné (SMITH. 2005). Kompetice mezi LC-PUFA řad n-6 a n-3 o společné metabolické kroky má svůj praktický význam; i malé zvýšení příjmu n-3 LC-PUFA výrazně brzdí syntézu eikosanoidů z AA. Tímto mechanismem lze zřejmě vysvětlit mnoho příznivých vlivů n-3 LC PUFA, zejména potlačení zánětu, krevní srážlivosti, proliferace nádorových a tukových buněk, i bolesti.



Obr. 7: Tvorba eikosanoidů pomocí příslušných enzymů (cyklooxygenázy, lipooxygenázy) z eikosapentaenová a arachidonové kyseliny.

2.4.1. n-3 PUFA – efekt na genovou expresi

Dieta obohacená o n-3 PUFA se podílí na snižování tukové tkáně a potlačení vzniku obezity (FLACHS a spol. 2005; RUZICKOVA a spol. 2004). Ačkoliv bylo identifikováno několik nukleárních receptorů, které jsou stimulovány polynenasycenými mastnými kyselinami, není tento jev stále dostatečně objasněn. n-3 PUFA, jako signální molekuly, působí buď jako aktivátory nebo represory transkripce genů, které se účastní lipidového metabolismu (SAMPATH a spol. 2004). Předpokládá se, že mohou ovlivňovat následující transkripční faktory:

- 1) receptory aktivované peroxisomálními proliferátory (PPAR, „peroxisome proliferator activated receptors“) α , β/δ , γ
- 2) jaterní X receptor (LXR, liver X receptor) typu α a β
- 3) jaterní nukleární faktor-4 α (HNF, hepatic nuclear factor)
- 4) SREBP-1 a -2 (sterol regulatory element-binding factor)

Ve vztahu k metabolismu a působení PUFA n-3 jsou v současné době nejvíce prozkoumány jaderné receptory PPAR. Aktivace všech tří izoform PPAR probíhá v několika krocích. Nejdřív dojde k navázání ligandu (LC-PUFA, fibráty) na PPAR a poté k navázání a vytvoření heterodimeru s receptorem 9-*cis* retinové kyseliny. Takto vytvořený komplex nasedá na odpovídající sekvenci na DNA („peroxisome proliferator response element“, PPRE), čímž dojde k aktivaci nebo k represi cílových genů (DUPLUS a spol. 2002).

Všechny tři izoformy PPAR se liší jednak svou lokalizací v organismu, tak i svou funkcí v příslušné tkáni. V játrech je převážně exprimovaná PPAR α . Její aktivací dochází ke zvyšování exprese bílkovin nutných pro vstup mastných kyselin do nitra buněk (CPT-1) i enzymů zúčastněných v ketogenezi a β -oxidaci. Isoforma PPAR γ se vyskytuje převážně v tukové tkáni, účastní se v diferenciaci adipocytů a uskladňování TG. PPAR β/δ byla zjištěna ve většině tkání a orgánů a podílí se na diferenciaci svalů, kůže, tukové tkáně, buněk nervového systému (ZAK a spol. 2005).

2.4.2. Efekt n-3 PUFA na genovou expresi v játrech

Nejvýznamnější efekty n-3 PUFA v játrech jsou zřejmě spojeny s aktivací PPAR α a následnou zvýšenou β -oxidací mastných kyselin. Nezanedbatelný vliv mají n-3 PUFA na snížení exprese transkripčního faktoru SREBP-1, což vede k inhibici lipogenních enzymů a snížení tvorby mastných kyselin (LOMBARDO a spol. 2006).

2.4.3. Inzulínová citlivost a vliv n-3 PUFA

Inzulínová rezistence, neboli snížená schopnost inzulínu *in vivo* inhibovat jaterní produkci glukózy a stimulovat transport a utilizaci glukózy v periferních tkáních včetně kosterního svalu, jater a tukové tkáně. Přestože je kosterní svalstvo převažujícím místem inzulín dependentnímu využití glukózy ($\approx 80\%$) a pouze 4-5 % je metabolizováno v adipocytech, má tuková tkáň nezastupitelnou roli při regulaci glukózové homeostázy (BLOOMGARDEN. 2004; BODEN. 2002). Děje se tak prostřednictvím volných mastných kyselin (FFA), které jsou uvolňovány z TG a parakrinním a endokrinním působením adipokinů. První známky IR se již projevují v tukové tkáni, která se projevuje ztrátou schopnosti inzulínu potlačovat lipolýzu. Pro organismus je nejbezpečnější skladovat TG v "malých adipocytech", které mají větší kapacitu vychytávat mastné kyseliny než hypertrofované adipocyty. Předpokládá se, že malé buňky fungují jako „pufr“ pro lipidy a omezují tak lipotoxickému poškození ve svaly a dalších tkání (KINTSCHER a spol. 2005).

2.4.3.1. Vztah inzulínové rezistence ke svaly

Zvýšený tok FA do kosterního svalu a jejich akumulace je nejvýznamnějším ukazatelem IR kosterního svalstva. Rozvoj IR v kosterním svalstvu způsobují FA zhruba několika mechanismy: 1. Akutní vzestup FFA způsobí „postvazebný“ typ IR. Zvýšený přísun FA do buňky má za následek jejich využití jako hlavního metabolického substrátu. Dochází ke zvyšování poměru acetyl-CoA/CoA s následným vzestupem hladiny citrátu. Citrát působí jako inhibitor pyruvát dehydrogenasy a fosfofruktokinasy, což vede k intracelulární akumulaci glukózy a inhibici jejího transportu do buňky.

2. Dlouhodobé účinky zvýšeného přísunu FA do kosterního svalu vede k IR odlišným mechanismem. Zvýšený přísun FA do svalů a akumulace intermediálních metabolitů

indukuje expresi protein kinázy C, speciálně izoformem β a δ , které inhibují fosforylaci IRS-1, aktivitu PI3K a translokaci glukózového transportéru (GLUT-4).

3. Významným faktorem inzulínové rezistence svalu je lipotoxicita. Tento jev souvisí s nedostatečným ektopickým ukládání lipidů.

2.4.3.2. Vztah inzulínové rezistence k játrům

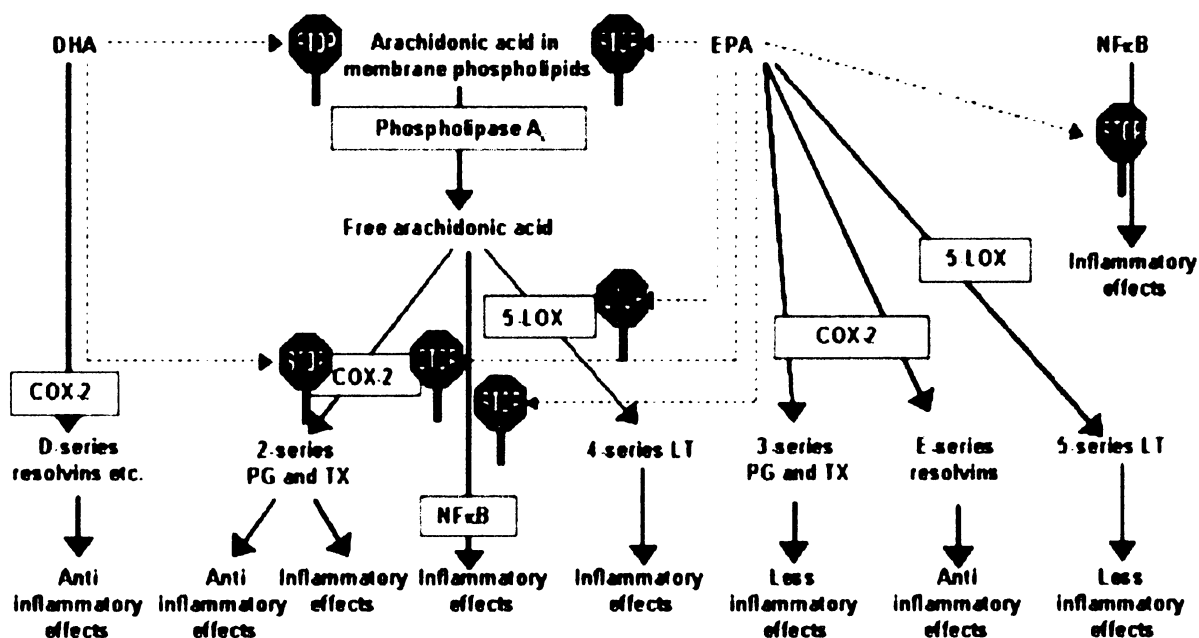
Zvýšený tok FA do jater je spojován s řadou metabolických účinků, které vedou k IR i dalším změnám v samotných játrech: zvyšuje se produkce glukózy, snižuje se citlivost inzulínu k játrům a v neposlední řadě zvýšený přísun FA má za následek vznik aterogenní dyslipidémie. Zvýšená produkce glukózy játry nebo neschopnost potlačení produkce glukózy jako odpověď na hyperinzulinémii dále zhoršuje IR a odsun glukózy periferními tkáněmi (LOWELL a spol. 2005).

Je překvapivé, že EPA i DHA účinně brání rozvoji IR, ale nedokážou již rozvinutou IR zvrátit. Hlavním společným jmenovatelem působení n-3 PUFA na citlivost k inzulínu je prevence ukládání TG a snížení lipotoxicity ve svalu (STORLIEN a spol. 1991). Je pravděpodobné, že EPA, DHA dokáží zamezit ukládání lipidů ve svalu v důsledku přímého působení na tukovou tkáň a játra, zejména inhibicí lipogeneze a aktivací oxidace mastných kyselin. Dojde-li však již k nadměrnému hromadění tuku v těle a TG ve svalu, cestou vedoucí ke snížení jejich obsahu ve svalu pod toxickou hladinu je ve snížení nabídky mastných kyselin z často již hypertrofované tukové tkáně. Zejména je však zapotřebí zvýšit oxidaci mastných kyselin ve svalu. V tomto ohledu jsou samotné n-3 PUFA pravděpodobně málo účinné. Např. u potkanů bylo prokázáno, po podávání EPA a DHA, mocná indukce oxidace mastných kyselin v játrech, ale ne ve svalu (NESCHEN a spol. 2002).

2.4.4. Polynenasycené mastné kyseliny a zánětlivá reakce

Jak již bylo zmíněno, n-6 a n-3 PUFA jsou prekurzory aktivních látek-eikosanoidů. Tyto látky mají důležitou roli jako mediátory a regulátory zánětu. Fosfolipidy imunokompetentních buněk obsahují 6-10% kyseliny linolové, 1-2% dihomog- γ -linolové a 15-20% kyseliny arachidonové. Namísto toho, obsah EPA a DHA přítomných ve fosfolipidech se pohybují okolo 1%, respektive 3% (GIBNEY a spol. 1993). Proto se AA stává hlavním substrátem pro syntézu eikosanoidů. Jedny z nejvíce

prostudovaných eikosanoidů jsou PGE₂ a LTB₄. PGE₂ se podílí na mnoha prozánětlivých reakcích, zahrnujících horečku, zvyšuje vaskulární permeabilitu a vasodilataci. Podílí se také na zvyšování produkce interleukinu-6 (IL-6) makrofágy (BAGGA a spol. 2003). LTB₄ je silný chemotaktický činitel pro leukocyty, zvyšuje tvorbu reaktivního kyslíku a tvorbu zánětlivých cytokinů jako TNFα (tumor necrosis factor α), IL-1 a IL-6. Při zvýšeném příjmu rybích olejů, se zvyšuje koncentrace n-3 PUFA (EPA, DHA) v plazmatické membráně a tím i změna nabídky pro tvorbu eikosanoidů. LTB₅ má prokazatelně menší chemotaktický účinek pro leukocyty než LTB₄ vznikající z n-6 PUFA (GOLDMAN a spol. 1983; LEE a spol. 1984). Protizánětlivý efekt byl také prokázán při účinku PGE₃ jako inhibitor cyklooxygenázy 2 a na produkci IL-6. Mnoho protizánětlivých efektů n-3 PUFA se zdá být zapříčiněno změnou genové exprese a působení na signální dráhy genů účastnících se zánětlivé reakce. Bylo dokázáno, že n-3 PUFA snižuje aktivitu NF-κB (nuclear factor κB). EPA předchází aktivaci NF-κB tím, že inhibuje fosforylaci a následnou degradaci inhibiční podjednotky NF-κB (IκB) (ROSS a spol. 1999). Zdá se, že mnoho benefičních účinků n-3 PUFA na imunitní systém jde právě přes inhibici NF-κB.



Obr.8: Převzato a upraveno (CALDER. 2006)

3. Cíle práce

- 1) Popsat efekt n-3 PUFA na genovou expresi a akumulaci tkáňových lipidů na myším modelu obezity a inzulínové rezistence.
- 2) Ověřit výsledky získané na myším modelu u lidských pacientů

4. Chemikálie a přístroje

Centrifuga 3K18.....	<i>Hettich, Německo</i>
Homogenizátor Ultra-Turrax T8.01.....	<i>IKA, Německo</i>
Spektrofotometr AG BioPhotometer.....	<i>Eppendorf, Německo</i>
Pipety rozsahu 1-1000 µl.....	<i>Gilson, Francie</i>
pH metr InLab level	<i>WTW, Německo</i>
váhy AEP-150G.....	<i>Adam Instruments, USA</i>
spektrofotometr UV-Vis8453.....	<i>Hewlett Packard, USA</i>
aparatura na horizontální elektroforézu nukleových kyselin....	<i>Biometra G45/0, Německo</i>
LightCycler.....	<i>Roche, Švýcarsko</i>
termoblok.....	<i>Biometra TB1, Německo</i>
přístroj na reverzní transkripci.....	<i>Biometra, Německo</i>
vakuová sušička.....	<i>Heto VR-1</i>

Chemikálie

Albumin (hovězí sérový) Serva.....	<i>Lachema, ČR</i>
dietyléter.....	<i>Lachema, ČR</i>
EDTA.....	<i>Sigma, USA</i>
Agaróza pro elektroforézu.....	<i>Invitrogen, Gibco BRL, Německo</i>
TRizol.....	<i>Invitrogen, Vinco BRL, Německo</i>
Chloroform.....	<i>Lachema, ČR</i>
2-izopropanol.....	<i>Penta, ČR</i>
Etanol.....	<i>Lachema, ČR</i>
Ethidium bromid.....	<i>Sigma, USA</i>
Rneasy® Lipid Tissue Mini kit	<i>Qiagen, Německo</i>
Glukóza.....	<i>Penta, ČR</i>
Kolagenóza.....	<i>Sigma, USA</i>
oligo T (100 M).....	<i>Invitrogen, Gibco BRL, Německo</i>
5x pufr pro reverzní transkripci.....	<i>Invitrogen, Gibco BRL, Německo</i>
DTT (0.1M) (1,4-dithio-L-threitol).....	<i>Sigma, USA</i>
dNTP (10mM)	<i>Invitrogen, Gibco BRL, Německo</i>
M-MLV reverzní transkriptáza (200 U/µl)	<i>Invitrogen, Gibco BRL, Německo</i>
Hydroxid draselný.....	<i>Penta, ČR</i>

Kyselina chloristá.....	<i>Acros, USA</i>
Hydroxid sodný.....	<i>Ppenta, ČR</i>
dyNAmo Capillary SYBR Green qPCR KIT.....	<i>Finnzymes, Finsko</i>
Free Glycerol Reagent.....	<i>Sigma, USA</i>
pneumoxid (95%O ₂ ,5%CO ₂).....	<i>Linde, ČR</i>
DNA Marker155-970.....	<i>Top-Bio, ČR</i>
primery pro PCR.....	<i>Invitrogen, Gibco BRL, Německo</i>
chlorid sodný.....	<i>Lachema, ČR</i>
chlorid draselný.....	<i>Lachema, ČR</i>
chlorid vápenatý.....	<i>Lachema, ČR</i>
fosforečnan draselný.....	<i>Lachema, ČR</i>
uhličitan sodný.....	<i>Lachema, ČR</i>
síran hořečnatý.....	<i>Lachema, ČR</i>

5. materiály a metody

5.2. Použité metody:

5.2.1. Izolace RNA z myších tkání

Chemikálie:

TRizol (Gibco BRL)

Chloroform

Izopropanol

Etanol 75% (v DEPC H₂O)

Na vyizolování RNA ze vzorku jsem zvolil izolaci TRizolem. Trizol je monofázický vodný roztok fenolu a guanidiumizothiokyanátu. Přidání chloroformu umožní oddělení fází. Chloroform je organické rozpouštědlo, které se nemísí s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze-horní vodnou a dolní organickou. Protřepáváním dochází k mísení fází, při kterém fenol sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Po protřepání je roztok z centrifugován pro dokonalé oddělení fází. Horní vodná fáze obsahuje RNA, mezifáze proteiny, a dolní fenolová fáze DNA.

Další kroky v izolaci RNA zajišťují její srážení a promytí od solí. Vzorky RNA je potřeba i po izolaci chránit proti působení RNáz skladováním při -70 °C, příp. i přidáním specifického inhibitoru RNáz.

Homogenizace:

1. Do 2 mililitrové mikrozkušavky vložíme vzorek a přidáme 1 ml TRizolu, zhomogenizujeme a necháme odstát 5 minut na ledu.
2. Centrifugujeme 10 minut při 12 000 g ve 4°C. Do nové mikrozkušavky přepipetujeme střední fázi obsahující RNA.
3. Odebranou střední fázi inkubujeme 5 minut za pokojové teploty.
4. **Oddělení fází:**
5. Přidáme 0,2 ml chloroformu a důkladně promícháme a poté inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě.
7. Centrifugujeme 15 minut ve 4 °C při 14 000g. Odebereme do čisté mikrozkušavky vrchní vodnou fázi tak, abychom nenabrali proteinovou mezifázi.

8. Srážení RNA:

9. K odebrané vrchní fázi přidáme 0,5 ml izopropanolu. Vzorke několikrát ručně protřepeme a 10 minut při pokojové teplotě srážíme RNA.

10. Centrifugujeme 10 minut ve 4 °C při 12 000 g.

11. Opatrně odsajeme supernatant tak, abychom neodsáli pelet.

12. Promývání RNA:

13. K peletu přidáme 1 ml 75% etanolu, protřepeme a inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě.

14. Centrifugujeme 5 minut ve 4 °C při 12 000g a odebereme supernatant tak, abychom neodsáli pelet. Centrifugujeme na stolní centrifuze a odebereme zbylý etanol.

15. Sušíme ve vakuovém vysoušeči dokud je v mikroskopické viditelný roztok etanolu. Při sušení vzorky kontrolujeme minimálně jednou za 5 minut, abychom vzorek nepřesušili, což by mohlo způsobit problémy při rozpouštění.

16. Rozpouštění RNA:

17. K vysušenému peletu přidáme 11µl sterilní redestilované vody nebo formamidu.

Rozpouštíme 15 minut při 60°C. Každých 5 minut protřepeme.

5.2.2. Izolace RNA lidských biopsií

Rneasy® Lipid Tissue Mini kit

chemikálie:

Chloroform

70% ethanol,

Sterilní mikroskopické pipety a špičky

Homogenizátor

Chlazená centrifuga 4°C

Kit f. Qiagen. Navržen pro izolaci RNA z tkání bohatých na tuk – tj. Tuková tkáň a mozek. Pomocí tohoto kitu se izolují všechny molekuly RNA > 200 bp. Pomocí tohoto kitu získáme obdobné výsledky jako při centrifugaci přes CsCl gradient, kde malé RNAs nesedimentují.

- Maximální RNA vazebná kapacita kolonek je 100 g
- Max.objem, který je možno nanést na kolonku je 700 μ l
- Min. Eluční objem 30 μ l
- Max. počáteční množství tkáně 100mg

Postup izolace:

1. vyjmeme tkáň ze zvířete nebo z mrazáku a ihned přidáme 1ml Qiazole lysis reagent, umístíme do homogenizátoru.
2. ihned zhomogenizujeme (20-40sec.), mikroskopickou s homogenátem nechat 5min při lab. teplotě v klidu
3. přidáme 200 μ l chloroformu, vortex 15sec., vzorky necháme stát 2-3min při lab. teplotě; centrifugujeme 12 000g/15min/4°C. Po skončení nechat centrifugu pro další použití ohřát na lab. teplotu.
 - po centrifugaci se vzorek rozdělí do 3 fází – horní bezbarvá vodná fáze obsahující RNA, bílá mezivrstva a spodní červená organická fáze. U vzorků s vysokým obsahem tuku může být ještě vidět 4 bílá fáze pod organickou červenou. Objem vodné fáze by měl být ~ 600 μ l
 - před dalším krokem si připravíme a popíšeme 2ml „collection tubes“ s kolonkami
4. odebereme horní vodnou fázi do nové mikroskopické a přidáme stejný objem 70% ethanolu, vortex, necentrifugovat a ihned pokračujeme v dalším kroku
5. přepipetujeme max. 700 μ l vzorku na kolonku, mikroskopickou uzavřít a centrifugovat 10 000 rpm/15ses/lab. teplota. To co prošlo kolonkou vylijeme. Přidáme zbývající část vzorku a opakujeme krok 5.
6. přidáme 700 μ l Buffer RW1 na kolonku, uzavřeme mikroskopickou., centrifugovat 15sec/10000rpm. – promytí kolonky. Prošlý obsah vyhodíme spolu s mikroskopickou.
7. kolonku umístíme do nové 2ml mikroskopické, přidáme 500 μ l Buffer RPE, mikroskopickou uzavřeme a stočíme 15ses/10 000rpm. To co prošlo kolonkou vylijeme
8. přidáme dalších 500 μ l Buffer RPE, mikroskopickou uzavřeme a stočit 2min/10 000rpm. To co prošlo kolonkou vylijeme

9. umístíme kolonku do nové mikroskopické kumavky. a stočit 1min/10 000rpm. – kompletní odstranění jakéhokoliv pufu z membrány kolonky
10. umístit kolonku do nové, sterilní 1.5ml mikroskopické kumavky., přidáme 30-50 μ l H₂O steril. Rnase-free do středu kolonky, uzavřít mikroskopické kumavky. a centrifugace 1min/10 000rpm.
11. opakovat krok 10 s novým objemem sterilní Rnase free water nebo s předchozím eluátem

Na měření integrity RNA jsem používal přístroj Agilent 2100 bioanalyzer.

Tento přístroj je schopen měřit RNA již při koncentracích 500 ng/ μ l.

Materiál:

Agilent RNA 6000 Nano Kit

Agilent RNA 6000 Nano Chips

Postup

Příprava gelu

1. vložíme 550 μ l „RNA 6000 Nano gel matrixu“ na filtr a centrifugovat při 1500g/10min.
2. rozpipetujeme gel na 65 μ l aliquoty

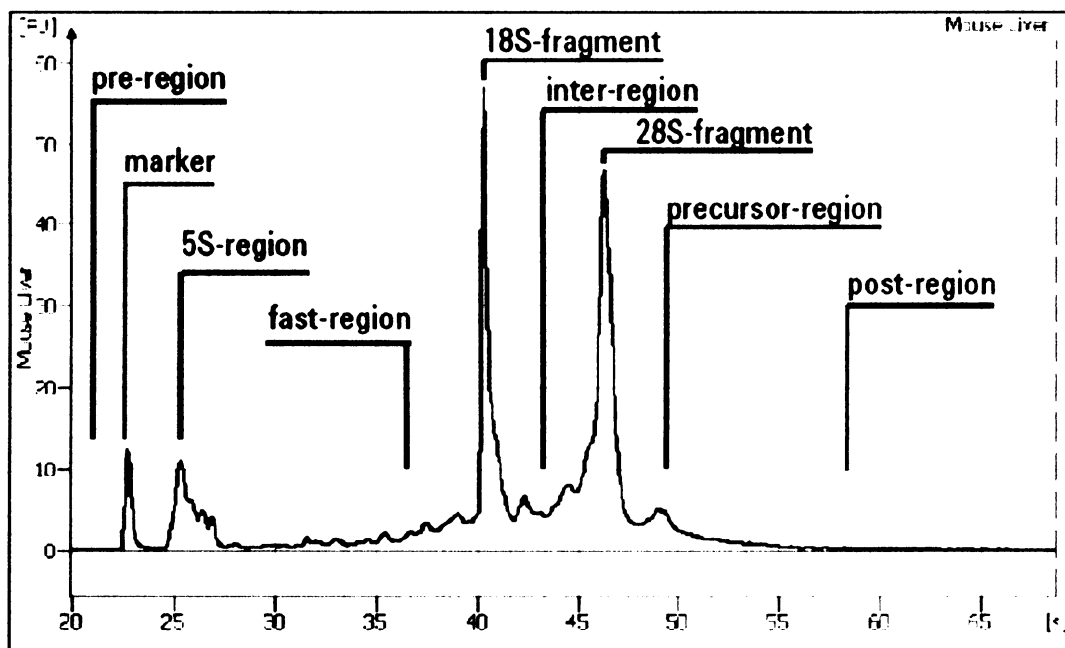
Příprava „ Gel-dye Mix“

1. zvortexujeme „RNA 6000 Nano dye“ 10 sekund, stočíme a odpipetujeme 1 μ l do 65 μ l gelu
2. dokonale zvortexovat a stočit 13000g/10 min při pokojové teplotě

Nanesení gelu

1. vložíme nový RNA čip do „Chip Priming Station“
2. napipetujeme 9 μ l „Gel-dye mixu“ do příslušné pozice a zatlačíme na píst (gel se pod tlakem rozlije po celém povrchu čipu)
3. do každé pozice přidáme 5 μ l RNA 6000 Nano Markeru
4. do příslušných pozic napipetujeme 1 μ l vzorku
5. do pozice pro žebříček napipetujeme 1 μ l RNA 6000 žebříčku

Takto připravený RNA čip se vloží do vortexu na 1 minutu při 2400 rpm. Po dokončení vortexování se vloží RNA čip do přístroje a spustí se příslušný program. Analýza jednoho čipu trvá přibližně 30 minut.



Obr.9: Ukázka ideální křivky nedegradované RNA. Jsou zde vidět hlavní vrcholy pro 5S, 18S, 28S RNA.

5.2.3. Izolace adipocytů z podkožního a gonadálního tukového depa myši

Materiál

- kolagenáza (Collagenasa Cruda) alternativně Collagenasa, SIGMA C6885
- 15 ml polypropylenové centrifugační zkumavky s uzávěrem – sterilní nebo 15 ml

SARSTEDT

- plastové nebo skleněné trychtýře,
- nylonová sítko zatavená do tvaru a velikosti používaného trychtýře. Velikost ok sítko musí být o něco větší než je maximální velikost izolovaných buněk (pro myši adipocyty z epididymální tuku cca 160-200µm). Sítko používáme opakovaně, po použití se namočí na cca 24 hod do nasyceného roztoku NaOH (několik zrníček do redestilované vody) a skladujeme v ethanolu. Před použitím sítko opláchneme a ponoříme do redestilované vody a poté opláchneme KRB mediem.
- jednorázové 2-3 ml plastové pasterovy pipety
- seříznuté 200µl žluté špičky – autoklávované
- dlouhé duté jehly nebo kanyly – autoklávované/sterilní a příslušné injekční stříkačky
- termoblok na 37°C
- jemnější nůžky na tkáň

Roztoky:

Krebs Ringer bikarbonátový pufr s poloviční koncentrací CaCl₂..... KRB
KRB mícháme vždy čerstvé (každý den) ze zásobních roztoků uložených ve 4°C a „probubláme“ 10 min pneumoxidem (95%O₂,5%CO₂). Zkontrolujeme, případně upravíme pH na 7,4. Pokud se pH příliš liší od této hodnoty, je potřeba namíchat nové zásobní roztoky. Zásobní roztoky připravujeme ze sterilní redestilované vody (kvalita pro tkáňové kultury) a skladujeme v lednici (několik týdnů až měsíců).
Po „probublání“ a úpravě pH přidáme:

5mM glukózu	0.116g/cca 128 ml KRB (M=180.2)
4%BSA (frakce 5)	5g/ cca 128 ml KRB (Albumin, bovine, pH 5.2)

Při izolaci používáme zahřáté KRB medium na teplotu 37°C

Postup:

připravíme KRB ze zásobních roztoků, „probubláme“, upravíme pH, doplníme glukózu a BSA

- zapneme lázeň na 37°C, kde máme stále zahřívání KRB
- vypreparujeme tkáň do vyhřátého média, při delším odběru je nutné použít bloček s 24-jamkovou destičkou a 1-2x za hodinu doplnit „probublání“ medium nebo probublání (při odběru na RNA potřebuji na konci 100μl buněk, tj. na začátku cca 200mg tkáň)
- připravíme KRB s kolagenázou.....7,5mg kolagenázy /vzorek(max.1g) do 2,5ml KRB s albuminem a glukózou
- postupně odsajeme z misky s tkání médium a tkáň pečlivě nastříháme na malé kousky (příp. vyjmeme zbytky jiných tkání)
- nastříhanou tkáň dáme do 15ml Sarstedtky a přidáme 2,5ml KRB media s kolagenázou, zkumavku uzavřeme
- inkubujeme GON – 60min a DL – 90 min ve 37°C za stálého mírného třepání (cca 120 ot/min) a občasného promíchání pneumoxidem (1-2x za hodinu)
- připravíme si trychtýřek se sítkem, které navlhčíme a propláchneme malým množstvím KRB (pasterkou)

- natrávenou tkáňovou suspenzi přefiltrujeme pomocí trychtýřku přes silikonové sítko do další 15ml Sarstedky a doplníme zahřátým KRB médiem na stejné objemy (použitá sítko propláchneme vodou a KRB, lze je hned znova použít)
- buněčnou suspenzi opatrně centrifugujeme (150rpm/1 min)
- po stočení došlo k rozdělení adipocytů (horní vrstva) od ostatních buněk a nečistot (spodní vrstva), pomocí pasterky (při zasouvání přes tukovou vrstvu najdeme nejtenčí vrstvu a jemně zahýbáme pasterkou kvůli uvolnění nalepených adipocytů na povrchu) odsajeme spodní vrstvu, kterou schováme nebo vyhodíme.
- Do zbylé vrstvy adipocytů přidáme asi 5-ti násobný objem zahřátého KRB a znovu centrifugujeme. Celý postup opakujeme podle potřeby čistoty buněk (aspoň 1x), spodní vrstvu (pouze při prvním čištění) přidáme k předcházející příp. vyhodíme
- Adipocyty po vyčištění a odsátí spodní vrstvy odsajeme uřízlou žlutou špičkou 100μl adipocytů a zamrazíme v N₂. (zamrazujeme postupně-nejdříve spodek zkumavky a pak celou)

Pro zamražení adipocytů lze použít i TRISOL, 1 ml Trisolu do 100μl adipocytů a zamrazíme v -80°C, takto zamražené lze použít pouze na RNA

Spodní část pod adipocyty lze stočit na 300g po dobu 5 min a pelet rozpustit v 0,5ml nebo 1ml Trisolu a zamrazit v -80°C. (pouze na RNA) – stromato-vaskulární frakce

5.2.4. Izolace DNA z gelu

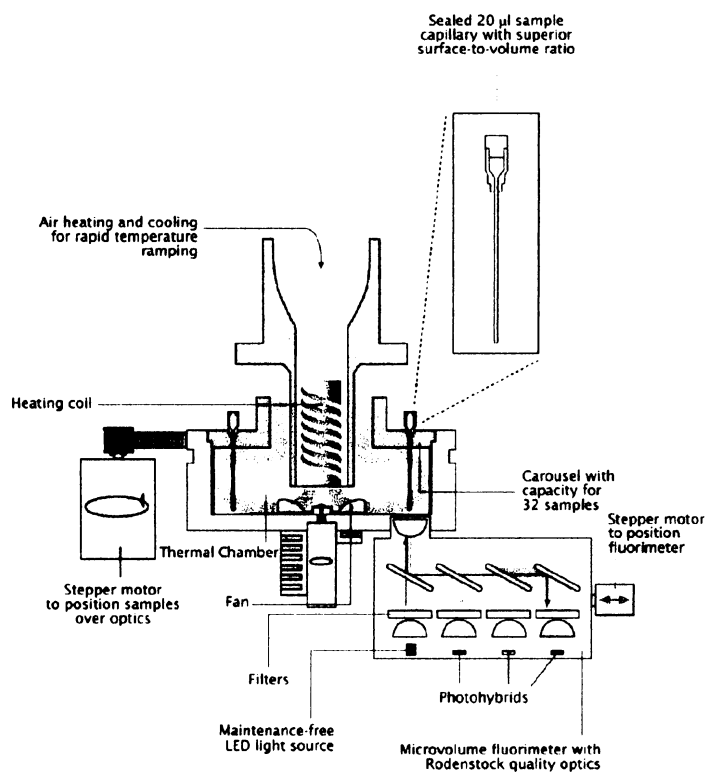
1. Předem si rozehrějeme termobloček na 50°C. Dáme předeřhát TE na 70°C.
2. Vyřízneme fragment z gelu, tak aby objem vyříznutého gelu byl co nejmenší.
3. Vyříznutý gel zvážíme.
4. Zvážený gel umístíme do 1.5ml mikrozukavky (maximálně 400mg na mikrozukavku).Přidáme 30μl Gel Solubilization Buffer (L1) na každých 10 mg gelu(platí pro gel o koncentraci maximálně 2%).
5. Inkubujeme při 50°C o 5 minut déle než gel vypadá rozpuštěně, ale minimálně 15 minut. V průběhu inkubace promícháváme v intervalech 3 min.
6. Kolonku umístíme do 2ml mikrozukavky (2ml „wash tube“).Rozpuštěný gel přepipetujeme do kolonky a centrifugujeme při 12000g 1 minutu. Vylijeme roztok, který prošel kolonkou.

7. (tento krok se doporučuje pokud jsme na jednu kolonku použili více než 250mg gelu) Vrátime kolonku do 2ml mikrozkušavky. Přidáme 500 μ l Gel Solubilization Buffer (L1) do kolonky, inkubujeme 1 min při pokojové teplotě, centrifugujeme při 12000g 1 minutu. Vylijeme roztok, který prošel kolonkou.
8. Kolonku vrátíme do 2ml mikrozkušavky a napipetujeme do ní 700 μ l „Wash Buffer“. Inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě.
9. Stočíme při 12000g 1 minutu. Vylijeme roztok, který prošel kolonkou a znovu centrifugujeme při 12000g 1 minutu.
10. Přendáme kolonku do 1.5ml mikrozkušavky (1.5ml recovery tube). Přidáme 50 μ l přehřátého TE do středu kolonky. Inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě a centrifugujeme při 12000g 2 minuty. Roztok prošlý kolonkou obsahuje izolovanou DNA

5.2.5. Kvantitativní PCR v reálném čase

Princip použitý v systému LightCycler (fa ROCHE) je v současné době jednou z nejvýznamnějších inovací v oblasti PCR. Změny teplot v rámci amplifikačního profilu jednotlivých teplotních kroků PCR cyklu se dosahují mícháním horkého vzduchu ohřátého tepelným zdrojem a vzduchu pokojové teploty přicházejícího zvenčí. Teplotní senzory v termální komoře jsou schopny zajistit naprogramovanou teplotu s přesností $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$. V kombinaci s amplifikačními tenkostěnnými kapilárami vyrobenými z borosilikátového skla. Jejich výhodou je dobrá tepelná a optická vodivost. To umožňuje rychlé změny teplot a snadnou detekci intenzity záření na konci kapiláry. Přístroj je díky tomu rychlejší a přesnější a omezí se degradace enzymu v průběhu PCR reakce.

Schematic of the LightCycler



Obr.10: Převzat z oficiální stránky fa ROCHE

Protokol pro LightCycler:

- 1) Používal jsem DyNamo Capillary SYBR Green qPCR KIT (Finnzymes, Espoo, Finsko).
- 2) Rozpis reagensí na jednu reakci :

	1x (µl)
Dynamo kit	
master mix	
(2x)	5
H ₂ O	3
5`p	0,5
3`p	0,5
Vzorek	1

- 3) vložení vzorků do LightCycleru

Experimentální protokol:

Program:	pre incubation and denaturation			Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

Program:	PCR			Type:	Quantification	Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	60	20	20	0	0	0	None
3	72	20	20	0	0	0	Single

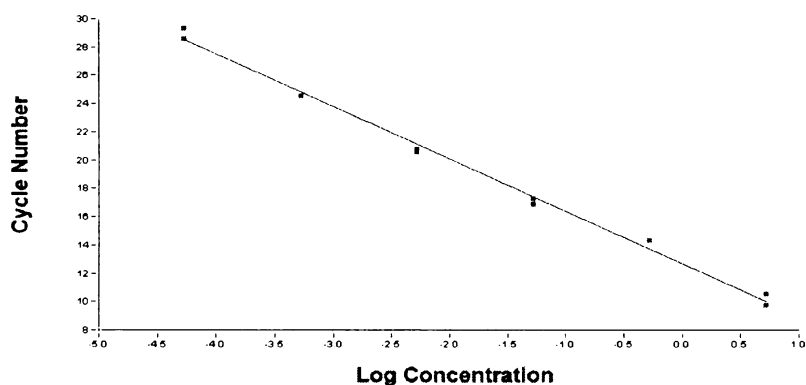
Program:	melting curve			Type:	Melting Curves	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	0	20	0	0	0	None
2	57	15	20	0	0	0	None
3	98	0	0.1	0	0	0	Continuous

Program:	cooling			Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	10	20	0	0	0	None

Vyhodnocení množství původní DNA

Před vlastním měřením je potřeba proměřit kalibrační křivku pro každý jednotlivý transkript. PCR fragment pro tuto křivku získáme ze vzorku RNA, o kterém víme, že příslušný transkript obsahuje, tak že provedeme reverzní transkripci a PCR reakci a vyizolujeme fragment z PCR směsi. Poté změříme koncentraci fragmentu a vytvoříme ředící řadu, kterou na přístroji proměříme.

Pro potřeby vyhodnocení výchozího množství je podstatný téměř lineární úsek v okolí inflexního bodu křivky závislosti fluorescence (na konci amplifikační fáze, kdy je DNA dvouřetězcová) PCR směsi na počtu cyklů. Kalibrace je provedena tak, že přímka protínající křivky fluorescence PCR směsi umožňuje přiřadit každému standardu cyklus, v kterém tato přímka protíná záznam PCR reakce, a tyto hodnoty jsou pak použity k lineárně regresní analýze závislosti na logaritmu výchozí koncentrace fragmentu. Z této regrese poté přístroj vypočítá výchozí koncentraci cDNA.



Kalibrační křivka. Kalibrační křivka je výnosem cyklu, v kterém přímka protne amplifikační křivku oproti logaritmu koncentrace PCR fragmentu. Z tohoto lineárního výnosu přístroj odečítá výchozí koncentraci cDNA.

Ve sterilním boxu byl nejprve připraven master mix (uvedené objemy složek se násobily počtem kapilár) a do každé kapiláry, umístěné ve vychlazeném bločku a dekontaminovaném UV záření, bylo napipetováno 9 μ l tohoto mixu. Mimo sterilní box bylo pak do jednotlivých kapilár napipetováno po 1 μ l desetkrát naředěného produktu reverzní transkripce, kapiláry byly zavíčkovány a krátce (asi 15s) centrifugovány (2 800rpm). Kapiláry byly poté naskládány do karuselu LightCycler a byla spuštěna amplifikace. Všechny vzorky byly měřeny duplicitně. Hladiny měřených genů byly vztáhnuty na množství referenčního genu „housekeeping“ genu. Pro myší experiment jsem používal cyclophilin (Ppib) a elongační faktor 1 α (EF-1 α) a pro lidskou studii EF-1 α a β -actin

Sekvence použitých primerů viz. příloha

5.2.6. Protokol pro reverzní transkripci

Tímto krokem se přepíše vyizolovaná RNA do cDNA s použitím poly dT primeru.

- Přístroj Biometra
- stanovované vzorky RNA o konc. \sim 300 ng / 1 μ l
- reakce: (celkový objem 20 μ l)
 - 1 μ l RNA (stanovovaný vzorek)
 - 0,5 μ l oligo T (100 μ M)
 - 10,5 μ l H₂O
- vortex, vzorky do přístroje a spustit program

- po 10 min. při 70°C - pause, vzorky vyjmout z mašinky a zchladit na ledu
 - přidáme:
 - 5x RT buff. 4 µl
 - 0,1M DTT 2 µl
 - 10mM dNTP 1 µl
-

- nechat 2 min při 37,5°C
- přidáme 1µl enzymu (200 units) M-MLV reverzní transkriptáza (Invitrogen).
 - 1 hod 37,5°C
 - 10 min 72°C (inaktivace enzymu)

5.2.7. Stanovení obsahu triacylglycerolů v tkáni

Přístroje:

spektrofotometr HP 8453 (kyveta QS 1000)

Roztoky:

65% EtOH; 65 ml abs. EtOH a 35 ml H₂O

3M KOH(v 65% EtOH); alcoholic KOH

2,5 N HClO₄

1N NaOH

standard glycerolu (1mg/1 ml); skladován při – 20°C

Free Glycerol Reagent (katalog.číslo F6428); skladováno při 2 - 8°C

Před použitím zředěno v 40 ml rd H₂O.

Postup:

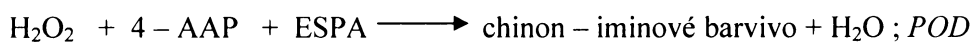
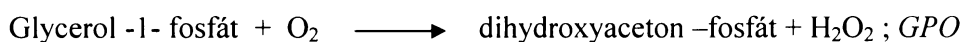
Do mikrozkuvek, obsahujících zhruba 50 mg tkáně přidáme 150 µl KOH („alcoholic“ KOH). Vzorky inkubujeme při 70°C v termobloku po dvě hodiny, během inkubace vzorky dvakrát zvortexujeme. Po inkubaci vzorky krátce centrifugujeme. K 50 µl takto zpracovaného vzorku přidáme 450 µl H₂O a pomocí 2,5 N HClO₄ a 1 N NaOH vzorky zneutralizujeme. Do jiných mikrozkuvek napipetujeme 80 µl „Free Glycerol Reagent“ a k němu přidáme 4 µl vzorku. V případě slepého vzorku k 80 µl „Free

Glycerol Reagent“ připipetujeme 4 μl H_2O a v případě standardu 1 μl standardního roztoku glycerolu. Vzorky promícháme a inkubujeme po dobu 5 minut při 37°C.

Absorbance byla měřena při $\lambda = 540 \text{ nm}$ proti blanku.

Zjištění triacylglycerolů je založeno na stanovení množství volného glycerolu, který je uvolněn zásaditou hydrolýzou triacylglycerolů pomocí KOH a ethanolu. Stanovení je založeno na spřažené enzymové reakci, kdy je volný glycerol přeměněn glycerolkinázou (GK)

na glycerol -1- fosfát, který je dále glycerolfosfát oxidázou (GPO) převeden na dihydroxyacetonfosfát za vzniku H_2O_2 . Vzniklý peroxid vodíku a peroxidáza (POD) se účastní reakce 4 - aminoantipyrinu (4 - AAP) s N-ethyl-N-(3- sulfopropyl)-m-anisidinem (ESPA), kterou vzniká chinon - iminové barvivo. Tato barvivo má absorpční maximum při vlnové délce 540 nm.



Zvýšená absorpce je úměrná koncentraci glycerolu ve vzorku.

$$\text{mg triacylglycerolů na gram tkáně} = \left(\frac{A_v}{A_{\text{std}}} \times 10 \right) / \left(\frac{V \times C}{1000} \right) / 1000$$

A_v – absorpce vzorku

A_{std} – absorpce standartu

V – objem vzorku

C – koncentrace zředěného vzorku

Statistické vyhodnocení

Výsledné hodnoty byly statisticky zpracovány. Statistické testy byly provedeny pomocí programů SigmaStat3.1 od firmy Systat software a NCSS od firmy NCSS Statistical software. Všechny hodnoty jsou uváděny jako *výběrové průměry*, variability jako *střední chyby výběrového průměru* (SE). Za předpokladu na normalitu dat byla použita dvojcestné ANOVA pro vícenásobné porovnání s Holm-Sidak post-hoc testem, pokud není uvedeno jinak. Hladina statistické významnosti byla $p < 0,05$.

Hladiny genové exprese jednotlivých diet, byly vztaženy k genové expresi HF diety příslušné tukové tkáni.

6. Experimentální část

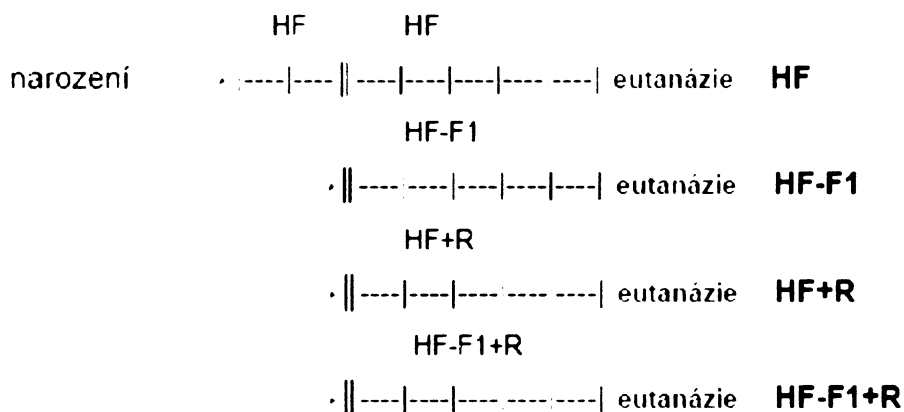
6.11. Experiment na myším modelu

Cíl pokusu: **Popsat efekt n-3 PUFA na genovou expresi na myším modelu obezity a inzulínové rezistence**

V experimentu byly použity samci myšího kmene C57BL/6J, chováni při průměrné teplotě 22°C. V experimentu bylo zahrnuto 12 myší na skupinu. Ve věku 3 měsíců byli rozděleni do 4 skupin a nasazeni na příslušnou dietu. Schéma pokusu se skládá ze dvou diet a jejich modifikací.

1. skupina myší byla krmena vysokotukovou dietou (HF) a měla volný přístup ke krmivu *ad libitum*
2. skupina myší byla převedena na HF dietu obohacenou o n-3 PUFA (HF-F1) a měla volný přístup ke krmivu *ad libitum*
3. skupina zvířat nasazena na HF + o 10% snížený příjem potravy (HF + R)
4. skupina zvířat nasazena na HF- F1 + o 10% snížený příjem potravy (HF-F1 + R)

|----| = 1 týden



Obr.11: Schéma pokusu u myšího modelu. Zvířata po odstavu byla krmena dva měsíce vysokotukovou dietou (HF). Po dvou měsících na této dietě byly myši rozděleny na příslušné diety a jejich modifikace.

HF	g
celkové množství diety [g]	1000
ST1	400
SUNAR	340
Meizena	10
VEGETOL	250
EPAX 1050TG	0
n-3 PUFA (EPA/DHA)	0%

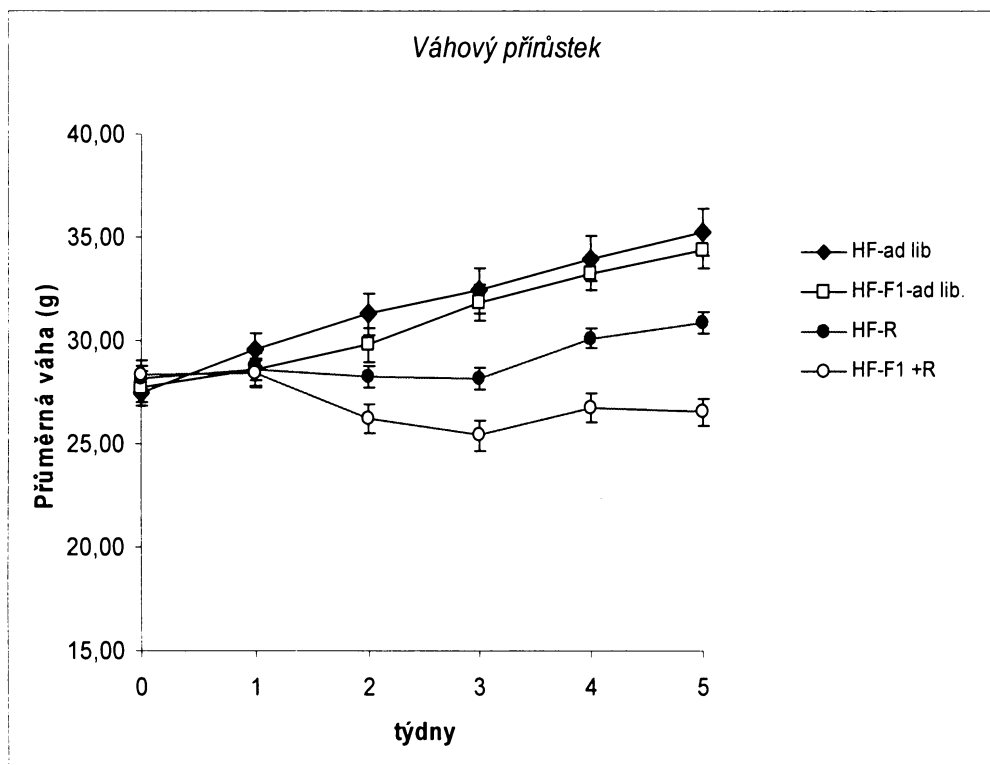
HF- F1	g
celkové množství diety [g]	1000
ST1	400
SUNAR	340
Meizena	10
VEGETOL	195
EPAX 1050TG	55
n-3 PUFA (EPA/DHA)	9,6%

Tab. 2: Ukazuje složení dvou základních diet používaných při experimentu.

Myši po odstavu byly 2 týdny krmeny HF dietou. Po dvou týdnech na této dietě byly rozděleny na dvě diety a jejich modifikace. Po 5 týdnech na dietách byly myši usmrceny a odebrány tkáně na pozdější analýzu.

V tomto pokusu jsme se chtěli dozvědět, jak zareagují myši, které jsou vystaveny různým typům diet a jejich modifikací. Zajímalo nás nejen celkový pohled, jako je změna váhy experimentálních zvířat nebo změny v hmotnosti tukových a jiných tkání, ale také jsme se snažili objasnit příčinu těchto změn. K popisu změn na genové úrovni jsem používal především kvantitativní PCR v reálném čase. Všechny měřené geny byly vztáhnuty na dva referenční geny Ppib a EF-1 α .

Vícenansycené mastné kyseliny řady n-3 mají komplexní vliv na celý organismus i na jednotlivé tkáně. Myši krmené různými typy diet, zareagují odlišně, což můžeme vidět na různém průběhu váhových křivek (graf 3). Změnu ve váhovém přírůstku můžeme vidět již mezi skupinami zvířat krmených na HF a HF-F1. Tento úbytek hmotnosti je výraznější u myší, které byly vystaveny kombinované dietě založené na sníženém příjmu potravy. Z grafu je patrné, že ke snížení váhy přispělo nejen omezení příjmu potravy, ale hraje zde svou roli i EPA/DHA.



Graf 3: Váhový přírůstek myši za uplynulý čas. Každá skupina zahrnovala 12 myši. Myši krmené vysokotukovou dietou přibývají nejvíce na váze, zatímco myši na kombinované dietě obohacené o EPA/DHA prokazatelně ubývají na váze. Rozdíly mezi HF ad libitum a HF+R, HF-F1+R jsou statisticky významné.

Po ukončení pokusu, kdy byly myši usmrceny a odebrány tkáně, jsme se soustředil na analýzu genů, které by mohly hrát důležitou roli při snižování hmotnosti a biogenezi mitochondrií. Tyto kandidátní geny nebyly vybírány náhodně, ale byly získány z předchozích experimentů. Mezi odebrané tkáně patřila hnědá tuková tkáň, gonadální a dorso-lumbální tukové depo, játra a kosterní sval.

Dieta	obsah TG v						
	GON (mg)	D-L (mg)	BAT (mg)	játra (mg)	kosterní sval (mg)	kosterním svalu	obsah TG v játrech
HF	1912,54 ± 135,96	678,92 ± 44,50	192,69 ± 10,14	1701,36 ± 30,75	168 ± 8,29	22,02 ± 3,1	75,00 ± 4,13
HF-F1	1741,08 ± 126,28	639,62 ± 40,36	140,69 ± 5,42	1592,77 ± 68,17	159 ± 7,20	25,75 ± 3,63	52,56 ± 2,46
HF+R	1402,08 ± 72,60	475 ± 23,38	139,42 ± 4,78	1263,58 ± 32,24	164 ± 9,94	29,46 ± 6,87	62,04 ± 3,67
HF-F1+R	917,5 ± 82,44	326,92 ± 16,98	95,58 ± 4,90	1114,58 ± 41,07	154,5 ± 8,83	29,52 ± 6,24	44,91 ± 2,88

Tab. 3: Hmotnosti odebraných tkání při pokusu. V posledních dvou sloupcích jsou uváděny hodnoty naměřených triacylglycerolů v kosterním svalu a v játrech (průměr ± SE).

6.1.2. Hnědá tuková tkáň

Toto tukové depo je důležité pro malé savce jako termogenní orgán. V tomto měření jsem se snažil prokázat, že za snižováním hmotnosti u těchto myší není zodpovědná BAT a její systém odpráhuujícího proteinu 1 (UCP 1). Jak je ukázáno v tab.4, tak geny účastníci se oxidace mastných kyselin a biogeneze mitochondrií se pod vlivem diety nemění.

Gen	dieta			
	cHF	cHF-F1	cHF + R	cHF-F1 + R
CyPH	0,42 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,47 ± 0,04	0,50 ± 0,05
PGC-1α	2,92 ± 0,24	4,12 ± 0,38	2,93 ± 0,30	2,65 ± 0,10
CPT-1α	1,23 ± 0,14	1,13 ± 0,09	1,16 ± 0,07	1,14 ± 0,17
NRF-1	0,87 ± 0,06	0,7 ± 0,05	0,83 ± 0,03	0,78 ± 0,05
UCP-1	40748,38 ± 2176	44694,78 ± 1062	50049,16 ± 4141	41804,78 ± 3576

Tab. 4: Hodnoty naměřených genů v hnědé tukové tkáni vztáhnutých na referenční gen *Ppib* (průměr ± SE).

6.1.3. Játra

EPA/DHA inhibuje v játrech lipogenezi a aktivuje geny, které se účastní oxidace mastných kyselin. V našem pokusu nepozorujeme žádnou změnu mezi dietami HF, HF+R, HF-F1, zatímco největší nárůst pozorujeme u zvířat na kombinované dietě HF-F1 + R. Rozdíly však nejsou signifikantní. Avšak při měření TG v celé tkáni se ukázalo, že i samotná EPA/DHA je schopna snižovat obsah TG v této tkáni.

dieta				
Gen	HF	HF+F1	HF+R	HF-F1+R
PGC-1 α	0,21 \pm 0,03	0,18 \pm 0,02	0,27 \pm 0,04	0,32 \pm 0,04
PPAR α	9,36 \pm 0,68	7,62 \pm 0,53	9,32 \pm 1,06	11,20 \pm 0,80
CPT-1 α	3,33 \pm 0,33	2,61 \pm 0,13	3,35 \pm 0,40	4,23 \pm 0,51

Tab. 5: Průměrná relativní množství mRNA měřených genů v játrech, vztáhnutých na referenční gen *Ppib* (průměr \pm SE).

6.1.4. Sval

Z pokusu vyplynulo, že EPA/DHA v tak malých koncentracích, nedokáže dostatečně stimulovat geny, důležitých pro lipidový a glukózový metabolismus. V této tkáni nebyly nalezeny žádné změny v genové expresi genů, které by napovídaly o zvýšené oxidaci mastných kyselin. Ani při měření množství TG na úrovni celé tkáně nebyly nalezeny žádné změny mezi dietami.

Gen	dieta			
	HF	HF-F1	HF + R	HF-F1 + R
PGC-1 α	0,55 \pm 0,08	0,62 \pm 0,15	0,57 \pm 0,11	0,65 \pm 0,09
PPAR α	0,88 \pm 0,20	0,66 \pm 0,28	1,05 \pm 0,17	0,10 \pm 0,29
CPT-1 β	1,03 \pm 0,10	0,92 \pm 0,08	1,07 \pm 0,11	1,00 \pm 0,10
GLUT-4	0,92 \pm 0,09	0,77 \pm 0,14	1,00 \pm 0,16	1,07 \pm 0,21
PKD 4	0,89 \pm 0,13	0,59 \pm 0,08	0,66 \pm 0,11	0,87 \pm 0,18

Tab. 6: Hladina mRNA měřena v kosterním svalu a vztážena na referenční gen *Ppib* (průměr \pm SE).

6.1.5. Bílá tuková tkáň

Zajímavější změny však můžeme nalézt v bílé tukové tkáni. Abychom dokázali rozlišit specifický efekt buď na adipocyty nebo na stromato-vaskulární frakci, naizolovali jsme adipocyty z tukové tkáně.

6.1.5.1. Genová exprese na úrovni celé tukové tkáně

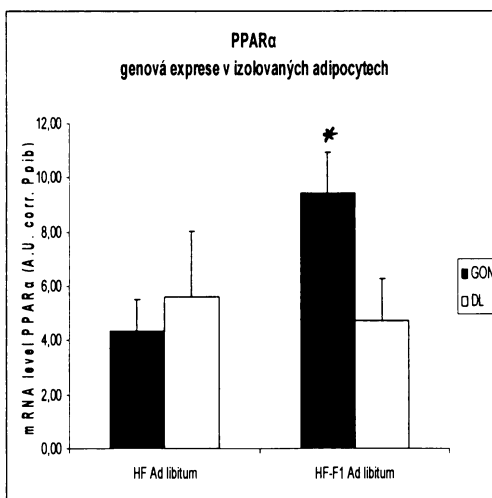
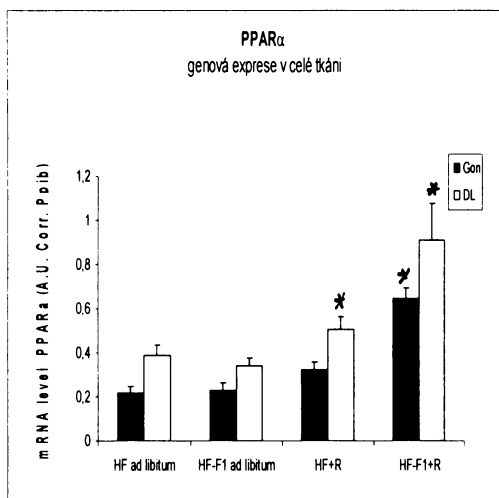
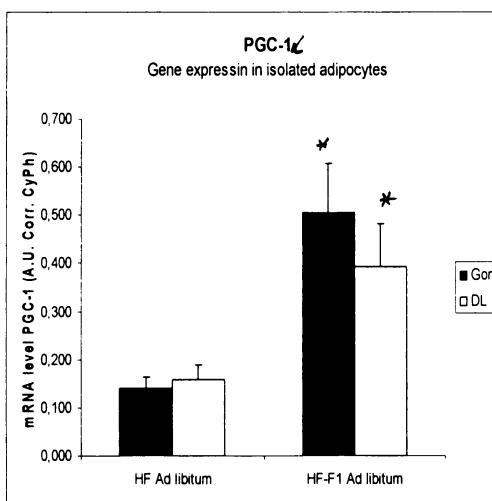
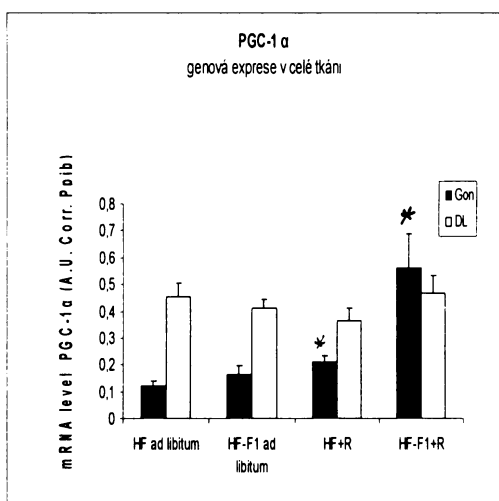
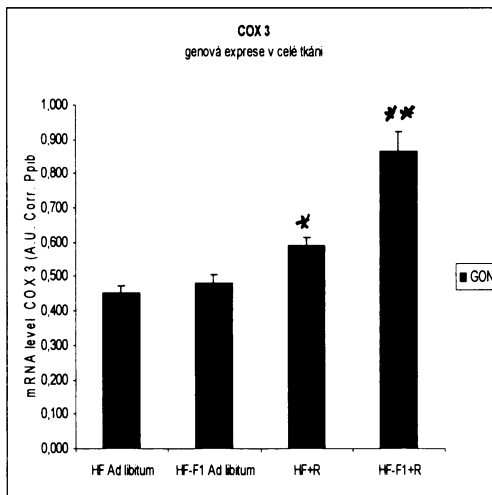
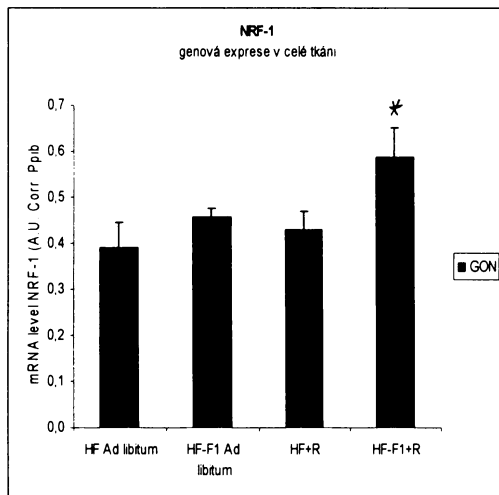
Zdá se, že v gonadální tukové tkáni můžeme pozorovat největší efekt kombinované diety HF-F1+R na expresi genů, účastnících se mitochondriální biogeneze (NRF-1, COX3, PGC-1 α , PPAR α). Tyto změny jsou signifikantně významné. Zdá, že důležitým „katalyzátorem“ stimulace genů n-3 vícenenasycenými mastnými kyselinami je právě omezení přístupu ke krmivu. Nezanedbatelný vliv EPA/DHA je také na genovou expresi SCD-1. Samotná EPA/DHA dokáže expresi tohoto enzymu, důležitého při syntéze FA, signifikantně snižovat. V takto dimenzovaném experimentu jsme neviděli efekt na CPT-1 α . U dorso-lumbálního tukového depa, jsme na úrovni celé tkáně, nenalezli u většiny genů žádné změny v genové expresi mezi jednotlivými dietami. Jedna z mála signifikantních změn, která byla naměřena, byla u PPAR α a CPT-1 α .

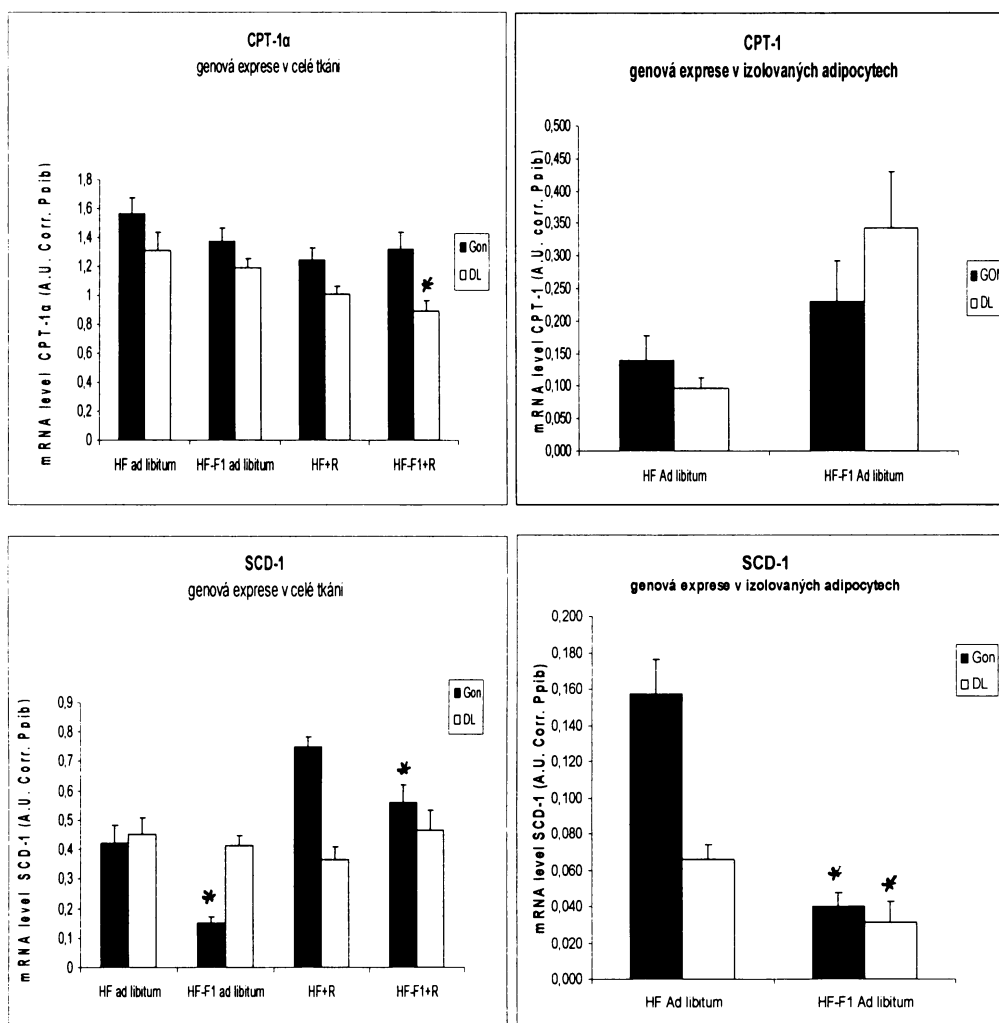
6.1.5.2. Genová exprese v izolovaných adipocytech

Na úrovni izolovaných adipocytů jsme viděli některé změny, které jsme nebyli schopni detekovat na celé tkáni. U dorso-lumbálního tukového depa jsme našli změny v hladinách mRNA u sledovaných genů, mezi vysokotukovou dietou a dietou obsahující EPA/DHA. Ukázal se i efekt na SCD-1, který jsme neviděli na úrovni celé tkáně. Tyto změny byly statisticky významné. Jedině u transkriptu pro PPAR α jsme nepozorovali změnu, která byla viditelná na úrovni celé tkáně.

Na izolovaných adipocytech v GON tuku jsme mohli pozorovat, že i samotná EPA/DHA stimuluje geny, které hrají důležitou roli v biogenezi mitochondrií a v lipidovém metabolismu.

Následující grafy ukazují změny genové exprese u studovaných genů (NRF-1, COX 3, PGC-1 α , PPAR α , CPT-1 α , SCD-1) v gonadálním a dorso-lumbálním tukovém depu (průměr \pm SE). Hladiny genové exprese jednotlivých diet, byly vztaheny k genové expresi HF diety příslušné tukové tkáně.





6.1.6. Vliv n-3 PUFA na sekreci adipokinů

Tento pokus byl dimenzovaný podobným způsobem jako předchozí, avšak při odebrání tkáni bylo odebráno i část tukového depa do KRB média na izolaci adipocytů. Tento pokus měl ukázat, jestli EPA/DHA podporuje sekreci „prospěšných“ adipokinů a tím i zlepšuje celkový lipidový obraz v organismu. V tomto pokusu jsem se také zaměřil na to, zda je rozdíl při měření genové exprese mezi izolovanými adipocyty a adipocyty v celé tukové tkáni.

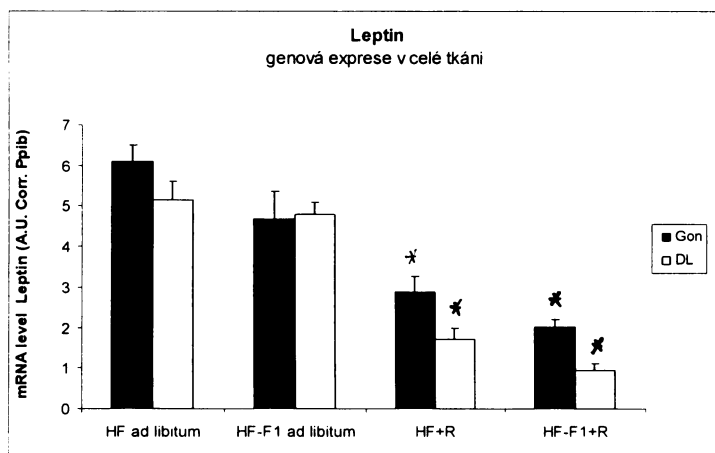
Při tomto pokusu bylo odebráno gonadální a dorso-lumbální tukové depo.

5.1.6.1 Ovlivnění genové transkripce adipokinů v gonadálním tukovém depu

Hladina sekrece leptinu je závislá na množství adipocytů, které ho produkují. Při HF dietě je hladina nejvyšší. Už při nízkých koncentracích EPA/DHA můžeme pozorovat sníženou expresi leptinu. Snížený příjem potravy tuto hladinu dále snižuje a

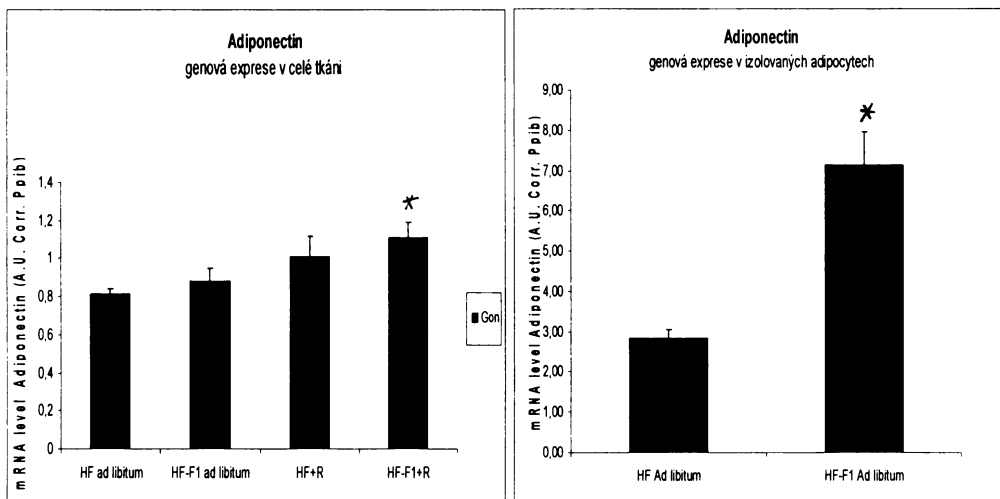


nejvyšší pokles genové exprese vidíme u skupiny myši krměných EPA/DHA spolu se sníženým příjmem potravy.



Graf 4: Množství mRNA leptinu v gonadálním a dorso-lumbálním tukovém depu (průměr ± SE).

U adiponectinu je tento trend opačný. Snížený příjem potravy a EPA/DHA zvyšují transkripci genu pro adiponectin v GON tukovém depu. Ještě výraznější změny se ukáží na izolovaných adipocytech, kdy EPA/DHA prokazatelně stimuluje genovou expresi adiponectinu. Tyto změny jsou signifikantně významné.

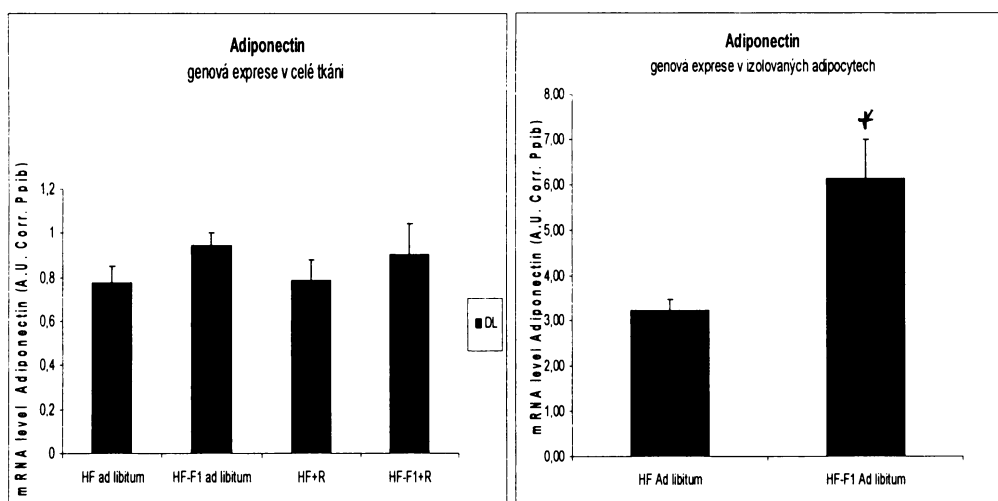


Grafy 5, 6: Ukazují rozdíl v genové expresi v genu pro adiponectin v celé tkáni a v izolovaných adipocytech v gonadálním tukovém depu (průměr ± SE).

6.1.6.2. Ovlivnění genové transkripce adipokinů v dorso-lumbálním tukovém depu

Hladina transkripce pro adiponectin na úrovni celé tkáně se nemění. Signifikantní rozdíly však pozorujeme na izolovaných adipocytech. Zdá se, že EPA/DHA působí i na adipocyty v DL tukovém depu, zvýšením transkripce genu pro adiponectin.

Jak je vidět z grafů, rozdíly naměřené genové exprese adiponectinu, v izolovaných adipocytech a na úrovni celé tukové tkáně jsou nejmarkantnější u dorsol-lumbálního tukového depa. Takto velké rozdíly v měření můžou být způsobené tím, že DL tukové depo neobsahuje pouze adipocyty, ale celou škálu různých buněk. Tyto buňky můžou na různé diety odpovídat různým spektrem transkripce RNA. V izolované RNA teda nemáme pouze RNA z adipocytů, ale právě i RNA z těchto buněk, které nám ovlivňují výsledky měření. Tento problém se však vyřeší izolací adipocytů z tukové tkáně.



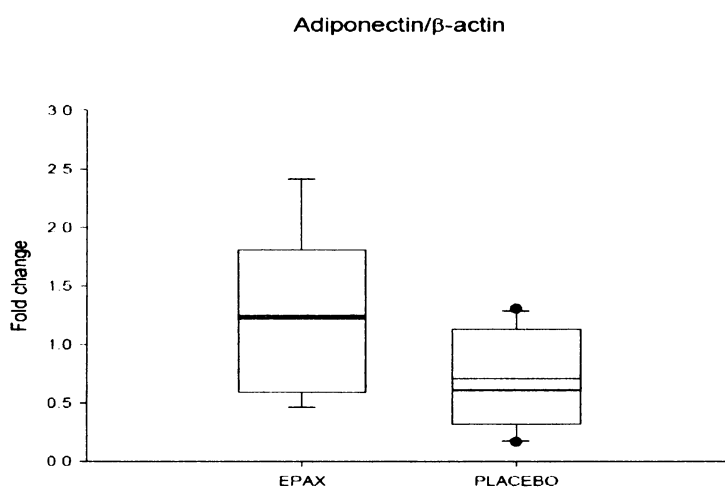
Graf 7, 8: Změny v transkripci pro adiponectin v dorso-lumbálním tukovém depu. Genová exprese je měřena v celé tkáni a v izolovaných adipocytech (průměr ± SE).

6.2. Experiment na vzorcích z lidských pacientů

Cíl pokusu: **Ověřit výsledky získané na myším modelu u lidských pacientů**

Do pokusu byly zařazeny ženy s průměrným BMI 35. Průměrný věk pacientek byl 53 let. Pacientky byly rozděleny do dvou skupin: 1. skupině bylo podáváno placebo, 2. skupina byla léčena EPAX1050TGTM (*Pronova Biocare a.s.*). Dávkování bylo vždy před jídlem 8 ml preparátu. Před začátkem pokusu byla pacientkám odebrána první biopsie (A) (pomocí jehly) viscerálního tuku. Po třech měsících na určitém preparátu byla odebrána druhá biopsie (B) stejným postupem. Takto odebrané vzorky vážily v průměru 70 mg. Vzorky byly zamrazeny v kapalném dusíku až do doby než byly analyzovány. V každé skupině bylo různý počet pacientek. Placebo skupina obsahovala 12 pacientek, skupina na EPAX1050TG obsahovala 9 pacientek.

Bohužel v tomto projektu jsme neprokázali téměř žádné změny genové exprese, které jsme viděli v pokusech na myších. Při měření transkripčních faktorů (NRF-1 α , PGC-1 α , PPAR α , PPAR γ) byla hladina mRNA pod hranicí detekovatelnosti. Po neúspěchu s měřením transkripčních faktorů, jsem se rozhodl zkusit měřit genovou expresi enzymů, které se přímo účastní lipidového metabolismu. Ani tady se však neukázaly žádné rozdíly mezi pacienty na placebo a na EPAX1050TG. Jediný prokazatelný rozdíl je v genové expresi adiponektinu. Adiponectin se u skupiny na EPAX1050TG zvyšuje narozdíl od placebo skupiny.



Graf 9: Vyhodnocení genové exprese pro adiponectin. Gen byl vztáhnut na referenční gen β -actin.

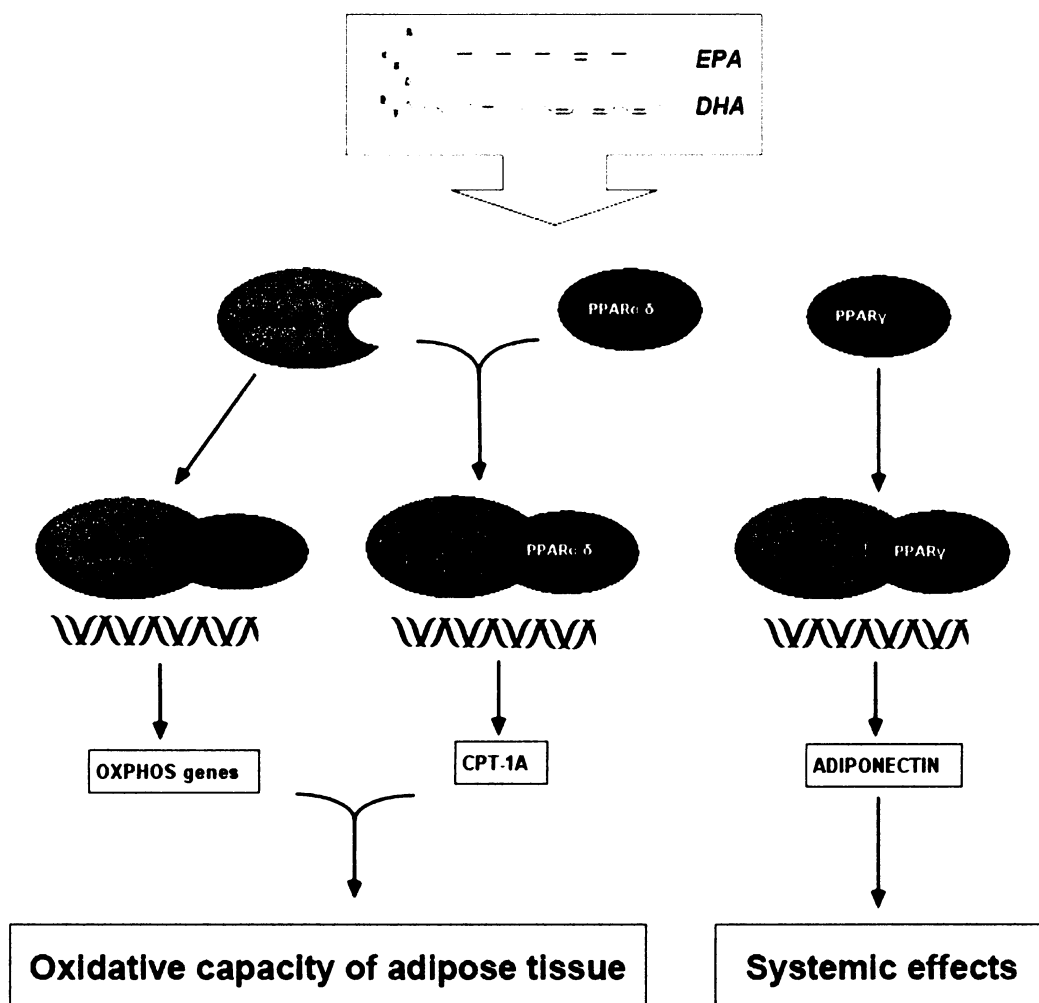
gen	EPAX1050TG		placebo	
	A	B	A	B
SCD-1	5,89 ± 2,2	4,15 ± 1,10	3,18 ± 0,63	3,24 ± 0,53
FAS	1,07 ± 0,25	1,50 ± 0,37	0,57 ± 0,09	0,88 ± 0,16
LEPTIN	1,06 ± 0,23	1,11 ± 0,19	0,81 ± 0,08	1,20 ± 0,22
HSL	0,46 ± 0,08	0,64 ± 0,14	0,35 ± 0,06	0,48 ± 0,12

Tab. 7: Před začátkem pokusu byla pacientkám odebrána první biopsie (A) a po třech měsících užívání určitého preparátu jim byla odebrána druhá biopsie (B). Takto získané vzorky byly dále analyzovány a naměřené hodnoty mRNA vztaheny na referenční gen pro β -actin (průměr ± SE).

7. Diskuze

7.1. *efekt n-3 PUFA na genovou expresi na myším modelu obezity a inzulínové rezistence*

Tímto pokusem bylo prokázáno, že nahrazení části tuků n-3 vícenenasycenými mastnými kyselinami má velký vliv na úbytek váhy a změnu genové exprese lipidového metabolismu. Tento vliv je ještě umocněn sníženým příjmem potravy. n-3 PUFA zvyšují transkripci genů, které se účastní oxidace mastných kyselin a biogeneze mitochondrií. Síla efektu EPA/DHA je však odlišná od typu tkáně. Podle výsledků se zdá, že nejmenší vliv vykazuje kosterní sval. V kosterním svalu se nezvyšuje exprese studovaných genů pod vlivem žádných experimentálních diet. Ani na úrovni celé tkáně nebyly nalezeny žádné změny v množství triacylglycerolů. Ani u hnědé tukové tkáně jsem nenašel žádnou změnu v genové expresi. To však znamená, že za poklesem hmotnosti experimentálních zvířat, není zodpovědná tato tkáň. Mnohem lépe stimulatelnou tkání n-3 vícenenasycenými kyselinami je bílá tuková tkáň. Přednostně EPA/DHA působí na gonadální tukové depo. Zde má EPA/DHA na genovou expresi svou nezastupitelnou roli, avšak největší rozdíly na úrovni celé tkáně, vidíme až při kombinaci EPA/DHA spolu se sníženým množstvím potravy. Při takto upravené dietě, myši zvyšují transkripci genů, účastnících se oxidace mastných kyselin. I geny, které se podílejí na biogenezi mitochondrií byli signifikantně zvýšeny u myši krmených HF-F1 + R dietou. Podobné výsledky byly viditelné i na izolovaných adipocytech. Z těchto výsledků lze usoudit, že i samotná EPA/DHA zvedá metabolický obrat této tkáně. U dorso-lumbálního tukového depa jsou změny, způsobené n-3 PUFA, nejlépe pozorovatelné na izolovaných adipocytech. EPA/DHA toto tukové depo stimuluje, avšak s určitostí nemůžeme říci, jestli tato stimulace vede ke snižování hmotnosti experimentálních zvířat.

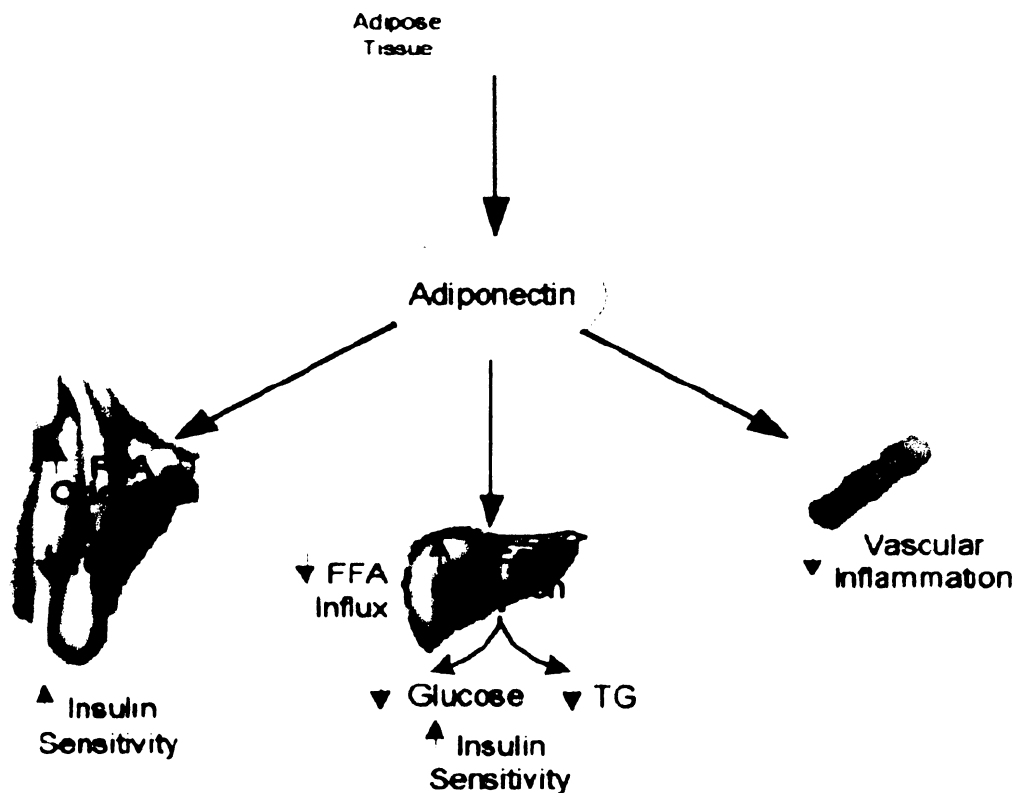


Obr.11: Souhrný obrázek pravděpodobného působení n-3 PUFA na genovou expresi.

7.2. Vliv n-3 PUFA na sekreci adipokinů

Snížený příjem potravy a nahrazení části tuků n-3 vícenenasycenými mastnými kyselinami, má velký vliv na sekreci adipokinů. EPA/DHA je velmi potentní, hlavně co se týče sekrece adiponectinu. Genová exprese adiponectinu se výrazně zvyšuje jak u GON tak i DL tukového depa. Tyto rozdíly mezi HF a HF-F1 dietou se ještě zvýrazní při měření na izolovaných adipocytech. Adiponectin má mnoho pozitivních vlivů na organismus, včetně zvyšování oxidace mastných kyselin (viz.Obr. 12). Je možné, že zvýšená exprese adiponectinu hraje zásadní roli při snižování hmotnosti a vylepšení lipidového profilu u experimentálních zvířat. Část výsledků ohledně aktivace adiponectinu a jeho kladného působení na organismus byla publikována v zahraničním časopise (viz. příloha). Změny exprese leptinu jsou opačná než u adiponectinu. Množství transkriptu pro leptin se mění v závislosti na dietě. Zatímco myši krmené HF

dietou mají nejvyšší hladinu leptinu, tak myši na HF-F1 + R mají tuto hladinu nejnižší. To však může být zapříčiněno tím, že se snižuje hmotnost myši a tím i množství tukové tkáně. Čím je méně tukových buněk tím je i méně transkriptu pro tento gen.

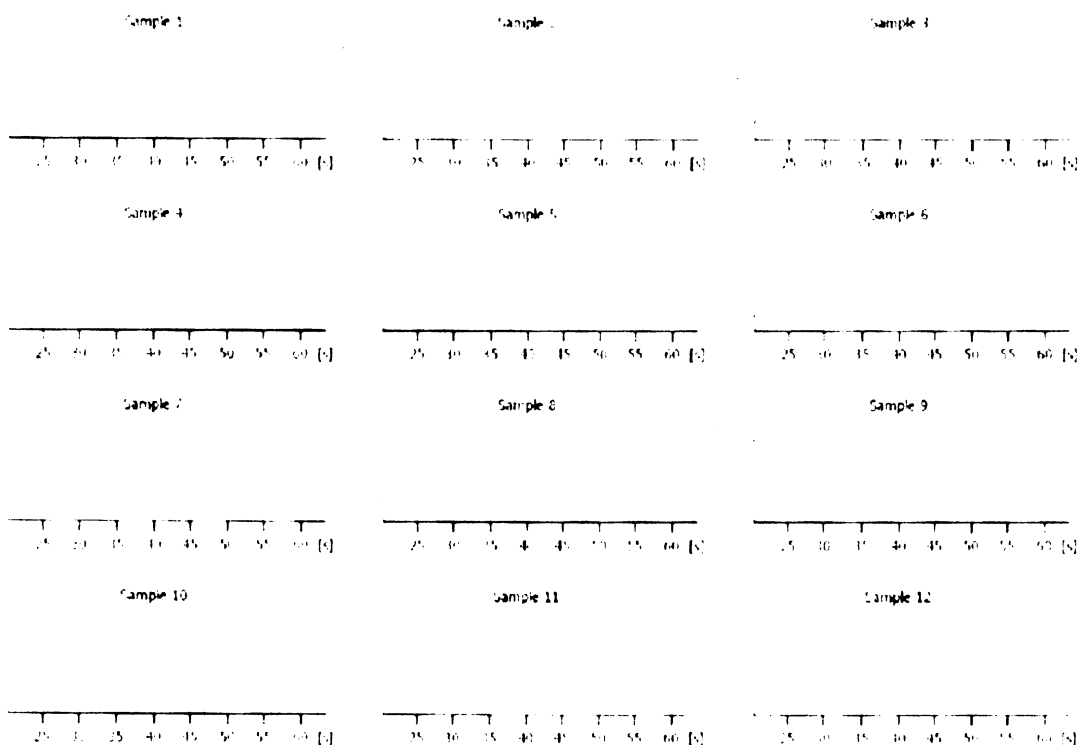


Obr.12: Vliv adiponectinu na různé typy tkání.

7.3. *Ověřit výsledky získané na myším modelu u lidských pacientů*

Experimentální data z lidského projektu nám nepřinesla výsledky, které jsme viděli na myších experimentech. Důvodem by mohlo být, že RNA vyizolovaná z tukové tkáně byla degradovaná. K tomuto závěru jsem došel po testování RNA na Agilent 6000 RNA čipu, který ukázal značný stupeň degradace. I přes tuto informaci jsme se však snažili změřit genovou expresi. Dalším problémem byl nedostatečný počet pacientů ve skupině. To zapříčinilo, spolu s vysokou nehomogenitou výsledků ve skupinách, vzniku velkých standardních odchylek. Pokud EPA/DHA měla nějaký vliv na genovou expresi, pak se tyto změny ztratily právě v těchto odchylkách. Avšak i tento projekt ukázal, že EPA/DHA zvyšuje expresi genu pro adiponectin. V budoucnu bude lepší při takových experimentech odebírat vzorky do RNA

Lateru. Nebylo by taky na škodu zamyslet se nad odebírání biopsií. Výrazně lepší výsledky by přineslo odebírání biopsií operativně a ve větších navázkách.



Obr.13: Záznam 12 vzorků z RNA čipu na kontrolu integrity RNA. Kromě vzorku č.5 není na ostatních vzorcích viditelné vrcholy pro 5S, 18S, 28S RNA. Z toho se dá usuzovat, že tato RNA je degradovaná.

8. Závěr

1) EPA/DHA hrají důležitou roli při prevenci vzniku obezity indukovatelnou dietou a inzulínové rezistence. Zdá se, že tento efekt působí přes ovlivnění bílé tukové tkáně a tento efekt n-3 PUFA se znásobí při kombinaci se sníženým příjmem potravy.

2) Prokázali jsme, že EPA/DHA ovlivňuje množství a složení adipokinů

3) Výsledky lidské studie ukázaly výhodu kombinací různých přístupů, v tomto případě EPA/DHA s kombinací se sníženým příjmem potravy. Avšak v důsledku nízké kvality RNA a nízkému počtu lidských vzorků se nám nepodařilo zcela prokázat výsledky pozorované v myším experimentálním modelu. Prokázali jsme nárůst exprese genu kódujícího adiponectin.

9. Seznam zkratek

AA	kyselina arachidonová („arachidonic acid“)
ACC	acetyl-CoA-karboxyláza („acetyl-CoA carboxylase“)
ACS	acetyl-CoA-syntasa
ADIPOR 1	adiponektinový receptor 1
ADIPOR 2	adiponektinový receptor 2
ALA	α -linolenová kyselina („ α -linolenic acid“)
AMPK	5'-AMP-aktivovatelná protein kináza
ATP	adenosin 5'-trifosfát
BMI	body-mass-index
cAMP	cyklický adenosin 5'-monofosfát
CPT-1	karnitin-palmitoyl transferáza I („carnitine palmitoyl transferase I“)
CPT-2	karnitin-palmitoyl transferáza II („carnitine palmitoyl transferase II“)
DAG	diacylglycerol
DHA	dokosahexaenová kyselina („Docosahexaenoic acid“)
D-L	dorso-lumbální tuková tkáň
EPA	eikosapentaenová kyselina („eicosapentaenoic acid“)
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
FA	mastná kyselina (fatty acid)
FABP-1	„fatty acid binding protein“
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
FAS	syntáza mastných kyselin („fatty acid synthase“)
FAT	(„fatty acid translocase“)
FFA	volné mastné kyseliny („free fatty acid“)
GLUT-4	glukózový transportér 4
GON	gonadální tuková tkáň
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou („high density lipoprotein“)
HNF 4 α	jaterní nukleární faktor-4 α („hepatic nuclear factor 4 α “)
HSL	hormonálně citlivá triacylglycerollipáza („hormone sensitive lipase“)
IL-1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6

IP3	inositol 1,4,5-trifosfát
IR	inzulínová rezistence („insulin resistance“)
IRS-1	(„insulin receptor substrate 1“)
I κ B	inhibiční podjednotky NF- κ B
LA	kyselina linolová („linoleic acid“)
LC-PUFA	polynenasycená mastná kyselina s dlouhým řetězcem
LPL	lipoproteinová lipáza („lipoprotein lipase“)
LT	leukotrieny
LXR	žaterní X receptor („liver X receptor“)
MAG	monoacylglycerol
MPC-1 (CCL2)	„CC-chemokine ligand 2“
mtTFA	mitochondriální transkripční faktor A
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny („monounsaturated fatty acid“)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid („nicotinamide adenine dinucleotide“)
NF- κ B	„nuclear factor κ B“
NRF-1	„nuclear respiratory factor 1“
PAI-1	inhibitor-1 plasminogenového aktivátoru („plasminogen activator inhibitor-1“)
PAK	protein kinasa A
PG	prostaglandiny
PGC-1 α	„Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Coactivator 1 α “
PI3K	fosfatidyl inositol 3 kináza „(Phosphoinositide 3-kinases“)
PLC	fosfolipasa C
PPAR	receptory aktivované peroxisomálními proliferátory
PPRE	peroxisome proliferator response element
PST	pankreastatin
PUFA	vícenenasyčená mastná kyselina (polyunsaturated fatty acid)
SREBP	(„sterol regulatory element binding protein“)
T2D	Diabetes mellitus 2. stupně
TG	triacylglycerol
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TSH	thyroid-stimulating hormone
TX	tromboxany
UCP	odpřahující protein („uncoupling protein“)

VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (very low density lipoprotein)
α -MSH	melanocyty stimulující hormon α („melanocyte-stimulating factor α “)
SCD-1	„stearoyl-CoA desaturase 1
Ppib	cyclophilin
EF-1 α	Elongační faktor 1 α
rpm	Otáčky za minutu

10. LITERATURA

1. Alberti, K. G., Zimmet, P., and Shaw, J. 2005. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*.366, 1059-1062.
2. Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J. A., and Reddy, S. T. 2003. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*100, 1751-1756.
3. Belfrage, P., Fredrikson, G., Nilsson, N. O., and Stralfors, P. 1980. Regulation of Adipose-Tissue Lipolysis - Phosphorylation of Hormone-Sensitive Lipase in Intact Rat Adipocytes. *Febs Letters*.111, 120-124.
4. Bloomgarden, Z. T. 2004. Definitions of the insulin resistance syndrome: the 1st World Congress on the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care*.27, 824-830.
5. Boden, G. 2002. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care*.5, 545-549.
6. Boss, O., Bachman, E., Vidal-Puig, A., Zhang, C. Y., Peroni, O., and Lowell, B. B. 1999. Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun*.261, 870-876.
7. Broadhurst, C. L., Wang, Y., Crawford, M. A., Cunnane, S. C., Parkington, J. E., and Schmidt, W. F. 2002. Brain-specific lipids from marine, lacustrine, or terrestrial food resources: potential impact on early African Homo sapiens. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol*.131, 653-673.
8. Brun, S., Carmona, M. C., Mampel, T., Vinas, O., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. 1999. Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids. *FEBS Lett*.453, 205-209.
9. Calder, P. C. 2006. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*.75, 197-202.
10. Chan, J. C., Tong, P. C., and Critchley, J. A. 2002. The insulin resistance syndrome: mechanisms of clustering of cardiovascular risk. *Semin.Vasc.Med*.2, 45-57.
11. Cinti, S. 1999. Adipose tissues and obesity. *Ital.J.Anat.Embryol*.104, 37-51.
12. Cinti, S. 2005. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*.73, 9-15.
13. Duplus, E. and Forest, C. 2002. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem.Pharmacol*.64, 893-901.

14. Fantuzzi, G. 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.*115, 911-919.
15. Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J., and Paschke, R. 2003. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*301, 1045-1050.
16. Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal, N., Ruzickova, J., Sponarova, J., Drahota, Z., Vlcek, C., Keijer, J., Houstek, J., and Kopecky, J. 2005. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia.*48, 2365-2375.
17. 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., and Shimomura, I. 2005. Visfatin: A protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.*307, 426-430.
18. Gibney, M. J. and Hunter, B. 1993. The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. *Eur.J.Clin.Nutr.*47, 255-259.
19. Goldman, D. W., Pickett, W. C., and Goetzl, E. J. 1983. Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B5 (LTB5) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*117, 282-288.
20. Gonzalez-Yanes, C. and Sanchez-Margalet, V. 2000. Pancreastatin modulates insulin signaling in rat adipocytes - Mechanisms of cross-talk. *Diabetes.*49, 1288-1294.
21. Hillebrand, J. J., de Wied, D., and Adan, R. A. 2002. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides.*23, 2283-2306.
22. Himms-Hagen, J. and Villemure, C. 1992. Number of mice per cage influences uncoupling protein content of brown adipose tissue. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*200, 502-506.
23. Hug, C., Wang, J., Ahmad, N. S., Bogan, J. S., Tsao, T. S., and Lodish, H. F. 2004. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*101, 10308-10313.
24. Hukshorn, C. J. and Saris, W. H. 2004. Leptin and energy expenditure. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care.*7, 629-633.

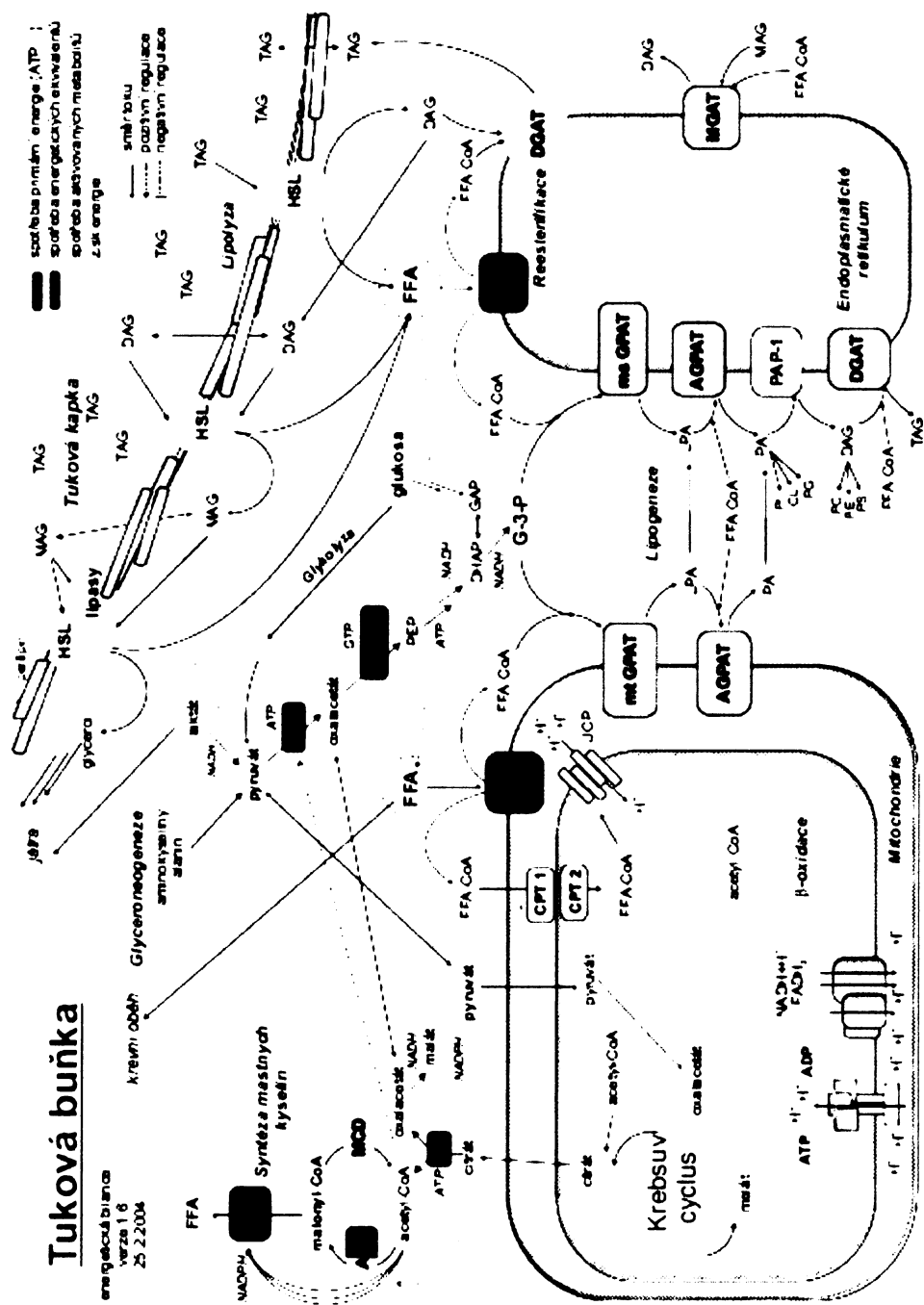
25. Inokuchi, J. 2006. Insulin resistance as a membrane microdomain disorder. *Biol.Pharm.Bull.*29, 1532-1537.
26. Kadowaki, T. and Yamauchi, T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr.Rev.*26, 439-451.
27. Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C. F., Tilg, H., and Patsch, J. R. 2003. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*309, 286-290.
28. Kawamura, M., Jensen, D. F., Wancewicz, E. V., Joy, L. L., Khoo, J. C., and Steinberg, D. 1981. Hormone-Sensitive Lipase in Differentiated 3T3-L1 Cells and Its Activation by Cyclic Amp-Dependent Protein-Kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences.*78, 732-736.
29. Kintscher, U. and Law, R. E. 2005. PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.*288, E287-E291.
30. Konturek, P. C., Konturek, J. W., Czesnikiewicz-Guzik, M., Brzozowski, T., Sito, E., and Konturek, P. C. 2005. Neuro-hormonal control of food intake; basic mechanisms and clinical implications. *J.Physiol Pharmacol.*56 Suppl 6, 5-25.
31. Kusminski, C. M., McTernan, P. G., and Kumar, S. 2005. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clinical Science.*109, 243-256.
32. Lee, T. H., Menica-Huerta, J. M., Shih, C., Corey, E. J., Lewis, R. A., and Austen, K. F. 1984. Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B5 and the double lipoxygenase product. *J.Biol.Chem.*259, 2383-2389.
33. Lehman, J. J., Barger, P. M., Kovacs, A., Saffitz, J. E., Medeiros, D. M., and Kelly, D. P. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J.Clin.Invest.*106, 847-856.
34. Lombardo, Y. B. and Chicco, A. G. 2006. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J.Nutr.Biochem.*17, 1-13.
35. Long, Y. C. and Zierath, J. R. 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J.Clin.Invest.*116, 1776-1783.
36. Lowell, B. B. and Shulman, G. I. 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science.*307, 384-387.

37. Madsen, L., Petersen, R. K., and Kristiansen, K. 2005. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim.Biophys.Acta.*1740, 266-286.
38. Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Medicine.*8, 731-737.
39. Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G., and Hill, R. A. 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity.*26, 1407-1433.
40. Neschen, S., Moore, I., Regittnig, W., Yu, C. L., Wang, Y., Pypaert, M., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. 2002. Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.*282, E395-E401.
41. Nicholls, D. G. and Locke, R. M. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.*64, 1-64.
42. Ross, J. A., Moses, A. G., and Fearon, K. C. 1999. The anti-catabolic effects of n-3 fatty acids. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care.*2, 219-226.
43. Ruzickova, J., Rossmeisl, M., Prazak, T., Flachs, P., Sponarova, J., Veck, M., Tvrzicka, E., Bryhn, M., and Kopecky, J. 2004. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids.*39, 1177-1185.
44. Sampath, H. and Ntambi, J. M. 2004. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr.Rev.*62, 333-339.
45. Schimmel, R. J., Buhlinger, C. A., and Serio, R. 1980. Activation of Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Protein-Kinase and Its Relationship to Cyclic-Amp and Lipolysis in Hamster Adipose-Tissue. *Journal of Lipid Research.*21, 250-256.
46. Shimokata, H., Andres, R., Coon, P. J., Elahi, D., Muller, D. C., and Tobin, J. D. 1989. Studies in the distribution of body fat. II. Longitudinal effects of change in weight. *Int.J.Obes.*13, 455-464.
47. Smith, W. L. 2005. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Curr.Opin.Cell Biol.*17, 174-182.
48. Steinberg, G. R., Rush, J. W., and Dyck, D. J. 2003. AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.*284, E648-E654.

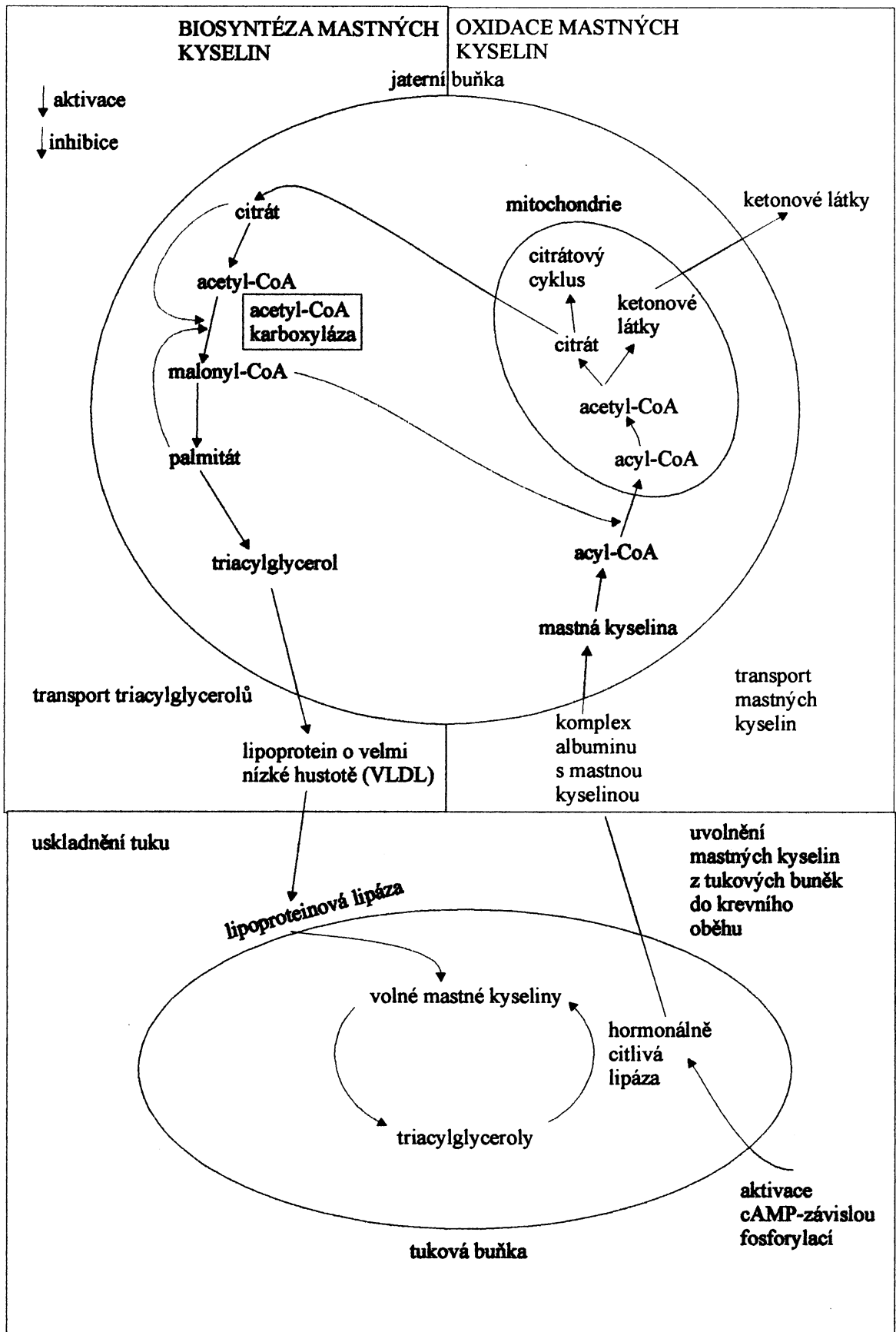
49. Stepan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., and Lazar, M. A. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*.409, 307-312.
50. Storlien, L. H., Jenkins, A. B., Chisholm, D. J., Pascoe, W. S., Khouri, S., and Kraegen, E. W. 1991. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes*.40, 280-289.
51. Tilg, H. and Moschen, A. R. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*.6, 772-783.
52. Vega, R. B., Huss, J. M., and Kelly, D. P. 2000. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol.Cell Biol*.20, 1868-1876.
53. Voet, D., VOETOVÁ, 1994. biochemie.
54. Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Kita, S., Ito, Y., Hada, Y., Uchida, S., Tsuchida, A., Takekawa, S., and Kadowaki, T. 2005. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology*.146, 790-796.
55. Weisberg, S., Mc Cann, D., Desai, M., Murphy, E., Rosenbaum, M., Leibel, R., and Ferrante, A. 2003a. Obesity leads to macrophage accumulation in adipose tissue. *Obesity Research*.11, A6-A7.
56. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. 2003b. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J.Clin.Invest*.112, 1796-1808.
57. Wellen, K. E. and Hotamisligil, G. S. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*.115, 1111-1119.
58. White, R. T., Damm, D., Hancock, N., Rosen, B. S., Lowell, B. B., Usher, P., Flier, J. S., and Spiegelman, B. M. 1992. Human Adipsin Is Identical to Complement Factor-D and Is Expressed at High-Levels in Adipose-Tissue. *Journal of Biological Chemistry*.267, 9210-9213.
59. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., and Chen, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J.Clin.Invest*.112, 1821-1830.
60. Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N. H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., and Kadowaki, T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*.423, 762-769.

61. Zak, A., Tvrzicka, E., Zeman, M., and Vecka, M. 2005. [Pathophysiology of and clinical significance of polyunsaturated fatty acids n-3 family]. Cas.Lek.Cesk.144 Suppl 1, 6-18.

11. PŘÍLOHA



Převzato z diplomové práce Ondry Kudy 2004



Místa regulace metabolismu mastných kyselin.
Převzato a upraveno podle (VOET *et* VOETOVÁ 1995).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka

Použité primery u myšihó experimentu:

Upper

lower

PPAR α NM_011144

5' TGCGCAGCTCGTACAGGTCATCAA 3'

5' CCCCCATTTCCGGTAGCAGGTTAGTCTTA 3'

Ppib

5' ACTACGGGCCTGGCTGGGTGAG 3'

5' TCATCATTTGTCGACTCCGGCA 3'

PGC-1 α NM_008904

5' ATGGGTGGTGATGAGGATGTA 3'

5' AAAACCCCTGAGTCGATAGCT 3'

CPT-1 α NM_013495

5' GCAGCTCGCACATTACAAGGACAT 3'

5' ACTATGTCTCTGTGGCGGGGCT 3'

GLUT-4

5' ACCGGCTGGGCTGATGTGTCT 3'

5' CTATTCAACCAGCATCTTCGAGTCGGC 3'

leptin

5' CCGCCAAGCAGAGGGTCAC 3'

5' AGTTGGATGTTAGCCCTGAATGC 3'

NRF-1 NM_010938

5' GGCGGGAGGATCTTTTATATGCTTTTGA 3'

5' AGACGACGCAAGCATCAGAGGGCC 3'

SCD-1 NM_009127

5' ACTGGGGCTGCTAATCTCTGGGTGTA 3'

5' TAACAAACCCACCAGAGATAAAGCC 3'

UCP-1

5' CACGGGGACCTACAATGCTTACAG 3'

5' GGCCGTCGGTCCCTTCCTT 3'

PK4 NM_013743

5' GGCTTGCCAAATTTCTCGTCTCTA 3'

5' TTCGCCAGGTTCTTCGGTTCC 3'

CPT1b NM_009948

5' GGATGATGGCTACGGGGTCTCTTA 3'

Adiponectin NM_009605

5' TCACAACAGAAAACCCAAAAT 3'

5' AGGGCAGCTGGGGTATCTCTTTTC 3'

5' GCGGAAGGCAGAACAGAAG 3'

Použité primery u lidského experimentu:

Upper

Adiponectin NM_004797

5' TCACAACAGAAAACCCAAAAT 3'

FAS NM_004104

5' TGAGCTTTGCGGCCCGGTCCTTCT3'

HSL NM_005357

5' GCTGCTGGGGCTGAGTTTGAG 3'

SCD-1 NM_005063

5' GCTGAGGGCCCCCAATGTATGTGT 3'

Leptin NM_000230

5' GCGAATTCGTTGCACCTTTGTA 3'

lower

5' CTTCTGTTCTGCCTTCCGC 3'

5' GATGCTACTGCGGGCCCAAGACGGGT 3'


5' ATCTCACCCCACTGCCCCACAC 3'

5' TTCTAACAGTCCTTGCTTTGGGGG 3'

5' CCTGTTGGCTGTTATGGTCTTATGTATTT 3'

Short Communication

Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet

P. Flachs¹, V. Mohamed-Ali², O. Horakova¹, M. Rossmeisl¹, M. J. Hosseinzadeh-Attar², M. Hensler¹, J. Ruzickova¹ and J. Kopecky¹ 

- (1) Department of Adipose Tissue Biology, Institute of Physiology, Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic
- (2) Adipokines and Metabolism Research Group, Department of Medicine, University College London, London, UK

 **J. Kopecky**

Email: kopecky@biomed.cas.cz

Phone: +420-241-062554

Fax: +420-241-062599

Received: 30 June 2005 **Accepted:** 30 August 2005 **Published online:** 6 January 2006

Abstract

Aims/hypothesis Diets rich in *n*-3 polyunsaturated fatty acids, namely eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), protect against insulin resistance and obesity in rodents and increase insulin sensitivity in healthy humans. We tested whether the anti-diabetic effects of EPA and DHA involve enhanced production of the endogenous insulin sensitiser, adiponectin.

Methods We studied the effects, in an obesity-promoting high-fat diet, of partial replacement of vegetable oils by EPA/DHA concentrate (6% EPA, 51% DHA) over a 5-week period in adult male C57BL/6J mice that either had free access to food or had their food intake restricted by 30%. At the end of the treatment, systemic markers of lipid and glucose metabolism and full-length adiponectin and leptin were measured. Adiponectin (*Adipoq*) and leptin (*Lep*) gene expression in dorsolumbar and epididymal white adipose tissue (WAT) and isolated adipocytes was quantified and adipokine production from WAT explants evaluated.

Results In mice with free access to food, plasma triacylglycerols, NEFA, and insulin levels were lower in the presence of EPA/DHA, while glucose and leptin levels were not significantly altered. Food restriction decreased plasma triacylglycerols, glucose, insulin and leptin, but not adiponectin. EPA/DHA increased plasma adiponectin levels,

independent of food intake, reflecting the stimulation of *Adipoq* expression in adipocytes and the release of adiponectin from WAT, particularly from epididymal fat. Expression of *Lep* and the release of leptin from WAT, while being extremely sensitive to caloric restriction, was unaltered by EPA/DHA.

Conclusions/interpretation Intake of diets rich in EPA and DHA leads to elevated systemic concentrations of adiponectin, largely independent of food intake or adiposity and explain, to some extent, their anti-diabetic effects.

Keywords Adipokines - Adiponectin - Adipose tissue - Fish oil - High-fat diet - *n*-3 PUFA

Abbreviations *Adipoq* Gene encoding adiponectin - *AMPK* AMP-activated protein kinase - *cHF diet* Composite high-fat diet based on chow - *cHF-F1 diet* Composite high-fat diet with partial replacement of lipids by fish oil concentrate - *DHA* Docosahexaenoic acid - *EPA* Eicosapentaenoic acid - *EPA/DHA* Concentrate of EPA and DHA from sea fish (6% EPA and 51% DHA) - *Lep* Gene encoding leptin - *Ppib* Gene encoding peptidylpropyl isomerase β , also called Cyclophilin B - *PUFA* Polyunsaturated fatty acids - *qRT-PCR* Quantitative real-time RT-PCR - *Slc2a4* Gene encoding solute carrier family 2 member 4, also called *Glut4* - *WAT* White adipose tissue.

Introduction

Intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA) of marine origin, namely eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5 *n*-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 *n*-3), has numerous beneficial effects on health. EPA and DHA act as hypolipidaemics, exert prophylactic effects on cardiovascular disease, protect against insulin resistance and obesity in rodents fed high-fat diets, and reduce insulin response to glucose in healthy humans [[1](#), [2](#), [3](#) and references therein]. We, and others, have shown [[1](#)] that in a semi-synthetic high-fat diet rich in α -linolenic acid (18:3 *n*-3) partial replacement of lipids with concentrate of EPA and DHA from sea fish (EPA/DHA) resulted in suppression of insulinaemia. It also protected against down-regulation of solute carrier family 2 member 4 (*Slc2a4*, also called *Glut4*) in white adipose tissue (WAT) by the high-fat diet. The effect on *Slc2a4* was part of a complex modulation of WAT gene expression and metabolism, resulting in stimulation of lipid oxidation and inhibition of lipogenesis, especially in the epididymal fat, which led to reduced accumulation of this tissue while food consumption remained unaffected [[1](#), [4](#)].

The aim of this work was to test the hypothesis that the anti-diabetic effects of EPA and DHA involve induction of adiponectin, an adipocyte-derived hormone, which stimulates glucose utilisation and fatty acid oxidation in muscles and decreases hepatic gluconeogenesis as a result of the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) [[5](#)]. We show that partial replacement of dietary lipids with EPA/DHA in a composite high-fat (cHF) diet in rodents stimulates expression of the gene encoding adiponectin (*Adipoq*) and increases adiponectin production in epididymal WAT as well as systemic levels of adiponectin by mechanism(s) relatively independent of food intake or adiposity.

Materials and methods

Animals and diets Experiments were performed on adult male C57BL/6J mice as described previously [1, 4]. Mice were imported from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred at the Institute of Physiology for up to 16 generations. The animals studied were habituated for 2 weeks to the cHF diet, which was derived from standard chow and contained 35% (wt/wt) lipids of very low *n*-3 PUFA content, and then assigned for 5 weeks to the cHF diet, or a diet of the same composition, i.e. a composite high-fat diet, but with partial replacement of lipids by fish oil concentrate (cHF-F1 diet) such that 15% (wt/wt) of lipids was replaced by the EPA/DHA concentrate containing 6% EPA, 51% DHA, and 4 mg/g α -tocopherol as antioxidant (EPAX 1050TG; Pronova Biocare, Lysaker, Norway). Detailed analysis of fatty acid composition of the diets was performed previously [1]. When indicated, the ration was reduced by 30% (caloric restriction) compared with mice on the same type of diet but with free access to chow. Mice were killed by cervical dislocation, and subcutaneous dorsolumbar and epididymal WAT depots were dissected. Tissues were used immediately for explant studies or isolation of adipocytes [4], or stored in liquid nitrogen for RNA analysis (see below). EDTA plasma was obtained from truncal blood and stored at -70°C . The experiments were conducted according to the Institute's guidelines for the use and care of laboratory animals.

WAT explants Tissue (100 mg) was incubated in 1.0 ml of serum-free medium (Cellgro; Mediatech, Herndon, VA, USA) for 24 h at $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$. At the end of the incubation the culture supernatant was stored at -70°C .

Quantification of metabolites and hormones in plasma and supernatant from white adipose tissue explants Triacylglycerol, NEFA, glucose and insulin were estimated as described before [1]. Leptin and full-length adiponectin were measured by 2-site ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) with inter- and intra-assay CVs of 5.8 and 8.9 for leptin and 6.3 and 9.4% for adiponectin.

Quantitative real-time RT-PCR Total RNA was isolated as before [4] and quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) was performed using a qPCR kit (DyNAmoCapillarySYBRGreen; Finnzymes, Espoo, Finland) and LightCycler (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland). Levels of transcripts were standardised using the gene encoding peptidylpropyl isomerase B (*Ppib*, also called cyclophilin B) and expressed in arbitrary units [4]. Lasergene software (DNASTAR, Madison, WI, USA) was used to design oligonucleotide primers (forward/reverse) for the following genes: *Adipoq* – TCCGGGACTCTACTACTTCTCTTACCAC / GTCCCCATCCCCATACACCTG; *Ppib* – ACTACGGGCCTGGCTGGGTGAG / TGCCGGAGTCGACAATGATGA; and leptin (*Lep*) – CCGCCAAGCAGAGGGTCAC / GCATTCAGGGCTAACATCCAAC.

Statistics The data were evaluated by ANOVA as described before [4]. The level of significance of all tests was set at $p=0.05$.

Results

Mice that had free access to cHF or cHF-F1 diets or a calorie-restricted diet for 5 weeks were compared (Table 1). In accordance with our previous results in mice with free access to standard chow [1, 4], the cHF diet induced obesity, while the cHF-F1 diet resulted in 2.7 g lower mean body weight and about 30% reduction of epididymal fat mass, with no change in dorsolumbar fat. Under these conditions, food consumption was not affected [4].

Caloric restriction resulted in net loss of body weight and adipose tissue mass [1, 4] (Table 1). Plasma levels (Table 1) of NEFA were lower in cHF-F1 than cHF mice with free access to food, but they were not affected by the diet in animals on the calorie-restricted diet, and no independent effect of caloric restriction on NEFA levels was seen. In mice with free access to food, levels of triacylglycerols were lower in cHF-F1 than in cHF mice, but the effect of the cHF-F1 diet was masked by caloric restriction, which decreased triacylglycerol levels (Table 1). Glucose and leptin levels were not affected by the cHF-F1 diet, but they were reduced by caloric restriction. Insulin levels were substantially lower in cHF-F1 than cHF mice, independently of food intake. Also caloric restriction decreased insulin levels, but to a much lower degree than the decrease induced by cHF-F1 diet. Levels of adiponectin were increased by cHF-F1 diet to a similar extent in mice with free access to food as in the mice on a calorie-restricted diet (34 and 22%, respectively), with this effect being independent of *caloric restriction*.

Table 1 Effects of EPA/DHA and caloric restriction on body weight, markers of lipid and glucose metabolism, and adipokines in plasma

	Diet				<i>n</i>
	Free access to food		Caloric restriction		
	cHF	cHF-F1	cHF	cHF-F1	
Body weight (g) ^a	37.5±1.2	34.8±1.2 ^b	25.1±0.4 ^c	25.2±0.6 ^c	10
Plasma levels of:	—	—	—	—	—
NEFA (mmol/l)	0.47±0.02	0.33±0.02 ^b	0.44±0.05	0.38±0.05	10
Triacylglycerols (mmol/l)	1.46±0.11	0.79±0.07 ^b	0.51±0.06 ^c	0.52±0.05 ^c	10
Glucose (mmol/l)	10.10±0.22	10.04±0.38	7.55±0.44 ^c	7.27±0.33 ^c	10
Insulin (ng/ml)	2.77±0.52	0.17±0.04 ^b	1.68±0.22 ^c	0.16±0.06 ^b	7
Adiponectin (µg/ml)	9.0±0.3	12.1±0.5 ^b	9.2±1.1	11.2±0.5 ^b	10
Leptin (ng/ml)	42.5±7.9	40.1±0.9	2.4±0.4 ^c	2.5±0.2 ^c	10

Mice had either free access to cHF or cHF-F1 diets or were subject to caloric restriction. Data are means±SEM. ^aAnimals were used in our previous study [1]. ^bSignificant effect of diet. ^cSignificant effect of caloric restriction

The effect of EPA/DHA on the expression of *Adipoq* and *Lep* and production of the adipokines was investigated in WAT of mice with free access to chow (Table 2). At the whole-tissue level, no significant effect of the diet on expression of either *Adipoq* or *Lep* was detected. However, in adipocytes isolated from both depots, transcript levels for both adipokines were much higher than in the whole tissues, and *Adipoq* expression was stimulated by EPA/DHA, while *Lep* expression was unaffected. The stimulation of *Adipoq* expression was more pronounced in epididymal than in dorsolumbar fat (2.5- and 1.9-fold stimulation, respectively). Production of adiponectin was significantly increased by EPA/DHA in explants of epididymal but not dorsolumbar fat, while production of leptin was unchanged in the depots studied.

Table 2 Gene expression and adipokine production in WAT depots of mice with free access to cHF or cHF-F1 diets

	Dorsolumbar fat		Epididymal fat		<i>n</i>
	cHF	cHF-F1	cHF	cHF-F1	
Gene expression	–	–	–	–	–
Tissue	–	–	–	–	–
<i>Adipoq</i> (AU)	0.77±0.08	0.94±0.07	0.82±0.03	0.88±0.06	10
<i>Lep</i> (AU)	0.51±0.05	0.48±0.03	0.61±0.04	0.47±0.07	10
Adipocytes	–	–	–	–	–
<i>Adipoq</i> (AU)	3.21±0.25	6.13±0.87 ^b	2.83±0.23	7.18±0.82 ^b	7–8
<i>Lep</i> (AU)	2.92±0.83	3.57±0.91	1.70±0.40	3.11±1.06	7–8
Adipokine production ^a	–	–	–	–	–
Adiponectin (µg/ml)	0.31±0.04	0.32±0.03	0.32±0.03	0.47±0.03 ^b	9
Leptin (ng/ml)	36.1±3.1	34.7±3.6	33.6±6.4	20.9±3.3	9

Transcript levels were evaluated by qRT-PCR using RNA isolated from whole tissues or collagenase-liberated adipocytes. Tissue explants were used to measure adipokine production. Data are means±SEM. ^aLevels in medium after incubation of WAT explants (see [Materials and methods](#)). ^bSignificant effect of diet. AU, arbitrary units

Discussion

This study demonstrates that caloric restriction and the intake of n-3 PUFA of marine origin both lead to weight loss and a decrease in adipose tissue. The latter treatment, corresponding to about 5.3% of total energy intake derived from EPA and DHA, led to a significant reduction of weight gain, involving preferential reduction of epididymal fat in the abdomen [1]. Of note, however, is the differential effect of these two treatments on glucose and lipid metabolism and systemic adipokines. While changes in circulating glucose and leptin were almost entirely mediated by caloric restriction, NEFA, insulin and adiponectin were regulated predominantly by dietary EPA and DHA, and triacylglycerols levels were decreased by both treatments. Various effects of caloric restriction and EPA/DHA respectively reflect modulation of metabolism in several tissues and all the interactions are difficult to dissect. However, as demonstrated in this report, one of the main effects of EPA/DHA is the stimulation of *Adipoq* expression in mature adipocytes and the production of adiponectin, mainly in epididymal fat, leading to increased plasma adiponectin levels.

Plasma levels of adiponectin decrease in obese humans [6]. In our study, however, the induction of adiponectin by EPA/DHA could not result from reduction of adiposity, since the strong decrease of fat content due to caloric restriction did not influence adiponectin levels. In contrast to adiponectin, leptin plasma levels were decreased dramatically by caloric restriction, but neither these nor *Lep* expression were affected by EPA/DHA, supporting the idea that circulating leptin correlates with adiposity and glucose metabolism

in adipocytes [7]. The induction of adiponectin but not of leptin by EPA/DHA indicates that the mechanisms controlling the expression of genes for these two adipokines are different. As with thiazolidinediones, EPA and DHA may upregulate *Adipoq* by acting as ligands of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , the transcriptional regulator interacting directly with *Adipoq* promoter [8]. The stimulation of *Adipoq* may also depend on the activation of AMPK, since AMPK in adipocytes stimulates *Adipoq* [9] and EPA and DHA activate hepatic AMPK [10].

In accordance with other studies in rodents fed high-fat diets and in healthy humans [1, 3], our insulin data indicate that EPA and DHA exert a large improvement in insulin sensitivity/action. Indeed, EPA/DHA prevented a rise in plasma insulin due to the cHF diet, since insulin levels in mice fed a standard chow diet were much lower than in the cHF mice, i.e. 0.59 ± 0.10 ng/ml [1] (compare with Table 1). Our results suggest that protection against insulin resistance induced by a high-fat diet is at least partially mediated by adiponectin, but not leptin. Since EPA and DHA in humans were able to prevent but not reverse insulin resistance [3], it should be established whether the failure of dietary EPA and DHA to reverse type 2 diabetes is due to an inability to sufficiently induce adiponectin. Interestingly, an association between circulating adiponectin and plasma n-3 PUFA, and DHA in particular, was recently found in healthy humans [11].

In conclusion, we show for the first time that EPA and DHA stimulate *Adipoq* expression and increase the levels of circulating adiponectin, an effect that is relatively independent of food intake and body fat mass. Our findings are relevant for prevention and treatment of obesity-associated pathologies.

Acknowledgements This work was supported by grants from the Academy of Sciences (KJB5011410), Czech Science Foundation (303/05/2580) and Ministry of Education, Youth and Sports (1M6837805002) of the Czech Republic, as well as from the Wellcome Trust (070821/Z/03/Z), and from the European Commission (LSHM-CT-2004-005272), Research Project AV0Z0110509, and by Pronova Biocare (Norway).

References

1. Ruzickova J, Rossmeisl M, Prazak T et al (2004) Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* 39:1177–1185
2. Ruxton CH, Reed SC, Simpson MJ, Millington KJ (2004) The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* 17:449–459
3. Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D (2004) N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev* 44:289–299

4. Flachs P, Horakova O, Brauner P et al (2005) Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia* 48:2365–2375
5. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y et al (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288–1295
6. Arita Y, Kihara S, Ouchi N et al (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79–83
7. Wellhoener P, Fruehwald-Schultes B, Kern W et al (2000) Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1267–1271
8. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N et al (2003). Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52:1655–1663
9. Lihn AS, Jessen N, Pedersen SB, Lund S, Richelsen B (2004) AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 316:853–858
10. Suchankova G, Tekle M, Saha AK, Ruderman NB, Clarke SD, Gettys TW (2005) Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 326:851–858
11. Fernandez-Real JM, Vendrell J, Ricart W (2005) Circulating adiponectin and plasma fatty acid profile. *Clin Chem* 51:603–609