

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Petra Cindori

Učinak Sirtuina 3 u regulaciji lipidnog metabolizma adipocita pod utjecajem zapadnjačke dijeta
ovisno o spolu

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet pod vodstvom prof. dr. sc. Inge Urlić i neposrednim vodstvom dr. sc. Sandre Sobočanec na Zavodu za Molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

POPIS KRATICA:

Acc-1 – Acetil-CoA karboksilaza 1, engl. *Acetyl-CoA Carboxylase 1*

ACN – acetonitril, engl. *acetonitrile*

adipoq – gen za adiponektin, engl. *adiponectin*

Adipoq – Adiponektin, engl. *Adiponectin*

ADP – adenozin difosfat

ANOVA – analiza varijance, engl. *analysis of variance*

Atgl – Lipaza triglicerida masnog tkiva, engl. *Adipose triglyceride lipase*

BAT – smeđe masno tkivo, engl. *brown adipose tissue*

BSA – goveđi serumski albumin, engl. *bovine serum albumin*

BSTFA – N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid, engl. *N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*

BMI – indeks tjelesne mase, engl. *body mass index*

Cpt-1 – Karnitin palmitoiltransferaza 1, engl. *Carnitine palmitoyltransferase 1*

DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindol, engl. *4,6-diamidino-2-phenylindole*

DM – diferencijacijski medij

DMEM – Dulbeccov modificirani Eagleov medij, engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

fabp-4 – gen za protein koji veže masne kiseline 4, engl. *Fatty acid binding protein 4*

FAHFA – hidroksiesteri masnih kiselina, engl. *fatty acyl esters of hydroxy fatty acid*

Fasn – Sintaza masnih kiselina, engl. *Fatty acid synthase*

FBS – seruma fetusa goveda, engl. *fetal bovine serum*

GC – plinska kromatografija, engl. *gas chromatography*

Hadhb – β -podjedinica trifunkcionalnog multienzimskog kompleksa hidroksiacil-CoA dehidrogenaze, engl. *Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit β*

IR – inzulinska rezistencija

KO – *knock-out*

LC – tekućinska kromatografija, engl. *liquid chromatography*

MEF – mišji embrionalni fibroblasti, engl. *mouse embryonal fibroblast*

MS – masena spektrometrija, engl. *mass spectrometry*

NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid, engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*

ORO – Oil red O

pAMPK – aktivirana AMP-proteinska kinaza, engl. *activated AMP-protein kinase*

PBS – fosfatni pufer, engl. *phosphate buffered saline*

PCR - lančana reakcija polimerazom, engl. *polymerase chain reaction*

Plin-1 – Perilipin 1, engl. *Perilipin 1*

PLS-DA – djelomična diskriminantna analiza najmanjih kvadrata, engl. *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*

ppar- γ – gen za receptor aktiviran proliferatorima peroksisoma gama, engl. *peroxisome proliferator activated receptor gamma*

Ppar- γ – Receptor aktiviran proliferatorima peroksisoma gama, engl. *Peroxisome proliferator activated receptor gamma*

PVDF - poliviniliden difluorid, engl. *polyvinylidene fluoride*

QC – kontrola kvalitete, engl. *quality control*

qPCR - kvantitativni PCR, engl. *quantitative PCR*

ReH₂O – redestilirana voda

RIPA pufer – radioimunoprecipitacijski pufer, engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*

ROS – reaktivni kisikovi spojevi, engl. *reactive oxygen species*

RT-qPCR – reverzna transkripcija-kvantitativni PCR, engl. *reverse transcriptase-quantitative PCR*

SDS-PAGE - natrij-dodecil sulfat elektroforeza u poliakrilamidnom gelu, engl. *sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

sirt3 – gen za sirtuin 3

Sirt3 – Sirtuin 3

TEMED – tetrametiletilendiamin

TIC – ukupni ionski kromatogram, engl. *total ion chromatogram*

TMCS – trimetilklorsilan, engl. *trimethylchlorosilane*

VIP – ocjena važnosti varijable u projekciji, engl. *Variable Importance In Projection*

WAT – bijelo masno tkivo, engl. *white adipose tissue*

WB – Western blot

WT – divlji tip, engl. *wild type*

ZD – zapadnjačka dijeta

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1.1 Pretilost	1
1.2 Zapadnjačka dijeta	1
1.3 Masno tkivo	2
1.4 Sirtuini	3
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	5
3. MATERIJALI I METODE	6
3.1 Životinjski model	6
3.2 Uspostavljanje kulture adipocita <i>in vitro</i>	6
3.3 Tretman masnim kiselinama – oponašanje zapadnjačke dijeta	7
3.4 Analiza ekspresije adipogenih gena metodom RT-qPCR	8
3.5 Izolacija proteina	9
3.6 Razdvajanje proteina i Western blot	9
3.7 Detekcija nakupljanja lipida bojanjem Oil red O	11
3.8 Imunocitokemija i konfokalna mikroskopija	12
3.9 Plinska/tekućinska kromatografija-masena spektrometrija	12
3.10 Statistička obrada podataka	14
4. REZULTATI	15
4.1 Uspostava Sirt3 KO miševa	15
4.2 Karakterizacija adipogeno diferenciranih mišjih embrionalnih fibroblasta	15
4.3 Oponašanje zapadnjačke dijeta <i>in vitro</i>	19
4.4 Relativna kvantifikacija veličine, ukupne površine i postotka površine lipidnih kapljica	20
4.5 Relativna ekspresija gena uključenih u adipogenezu i lipogenezu nakon tretmana zapadnjačkom dijetom	22

4.6 Relativna ekspresija proteina uključenih u adipogenezu, lipogenezu, oksidaciju lipida i lipolizu nakon tretmana zapadnjačkom dijetom	23
4.7 Relativna ekspresija proteina uključenih u β -oksidaciju masnih kiselina	25
4.8 Metaboličko profiliranje tekućinskom/plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom	26
4.8.1 Plinska kromatografija-masena spektrometrija	26
4.8.2 Tekućinska kromatografija-masena spektrometrija	29
5. <i>RASPRAVA</i>	31
6. <i>ZAKLJUČCI</i>	36
7. <i>ZAHVALA</i>	38
8. <i>LITERATURA</i>	39
9. <i>SAŽETAK</i>	45
10. <i>SUMMARY</i>	47

1. UVOD

1.1 Pretilost

Pretilost ili gojaznost je složena kronična nezarazna bolest obilježena nakupljanjem povećane količine masnog tkiva (1). Definirana je indeksom tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) većim ili jednakim 30, dok pojedinci s prekomjernom tjelesnom težinom imaju BMI između 25 i 29,9. Više od 890 milijuna odraslih ljudi u svijetu živi s pretilošću, a broj onih koji imaju prekomjernu tjelesnu težinu se u razdoblju od posljednjih tridesetak godina gotovo udvostručio (2). Preko polovice hrvatskog stanovništva starijeg od 16 godina ima prekomjernu tjelesnu težinu ili je pretilo (3). Hrvatska je također pri vrhu europske ljestvice prema udjelu djece s prekomjernom tjelesnom težinom ili pretilošću, pri čemu toj skupini pripada 35,9% djece u dobi od 7 do 9 godina (4). Pretili pojedinci imaju povećan rizik od razvoja drugih bolesti poput dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, nealkoholne masne bolesti jetre, astme i raznih tumora (5). Osim fizičkih, imaju i povećan rizik razvoja mentalnih bolesti poput depresije te su često suočeni sa stigmatizacijama (1, 5). Glavni uzrok pretilosti je energetska neravnoteža odnosno redoviti unos količine kalorija koja nadilazi potrošnju.

1.2 Zapadnjačka dijeta

Zapadnjačka dijeta (ZD) predstavlja suvremeni obrazac ljudske prehrane obilježen povećanim unosom visoko prerađene hrane bogate dodanim šećerima i zasićenim masnim kiselinama te nedostatan unos prehrambenih vlakana. Karakterizirana je i smanjenom konzumacijom voća, povrća i cjelovitih žitarica, a prekomjernom konzumacijom visokokalorične masne i slatke hrane te ugljikohidrata s visokim glikemijskim indeksom, uz učestalu i pretjeranu konzumaciju hrane općenito (6, 7). Visoko prerađena hrana može ometati endogene mehanizme regulacije apetita i sitosti te utjecati na sustave nagrade povezane s unosom hrane, što pak može poticati prejedanje i posljedični razvoj pretilosti (8). Ova opažanja podupiru pretpostavku da ljudska genetika nije prilagođena nagloj i drastičnoj promjeni prehrambenih navika koja je uslijedila nakon industrijske revolucije. Ovakav prehrambeni obrazac pogoduje razvoju metaboličkog sindroma i disfunkciji organa, potičući kroničnu hiperinzulinemiju i inzulinsku rezistenciju (IR). Posljedično tome, dolazi do trajno povišene razine glukoze u krvi, pojačanog skladištenja masti te inhibicije lipolize. Istovremeno se potiče i stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva koji uzrokuju oksidativni stres oštećujući lipide, proteine i genomski materijal, narušavajući tako funkciju mitohondrija koji su

ključan regulator energetske ravnoteže stanice. Organizam pojedinaca koji se hrane ZD-om je u stanju kronične upale niske razine s hiperaktivnim simpatičkim živčanim sustavom i renin-angiotenzin sustavom, što doprinosi razvoju hipertenzije, vaskularne disfunkcije i raznih drugih oštećenja organa (7). Osim genetske predispozicije, značajnu ulogu u razvoju pretilosti imaju i okolišni čimbenici. Nedostatak ili smanjena kvaliteta sna mogu povećati rizik od pretilosti putem hormonalnih promjena i promjena u prehranbenim navikama (9). Sjedilački način života, koji je definiran duljim vremenskim periodima bez fizičke aktivnosti uz puno sjedenja i/ili ležanja pokazuje pozitivnu povezanost s pojavom pretilosti (10). Današnji stil života u kojem većina ljudi provodi prosječno 8 sati dnevno sjedeći na poslu pet dana u tjednu uz konstantni manjak sna u kombinaciji sa zapadnjačkom dijetom, dovodi do razvoja pretilosti koju karakterizira prekomjerno nakupljanje masnog tkiva i poremećena regulacija njegove funkcije.

1.3 Masno tkivo

Masno tkivo je tip vezivnog tkiva građen većinom od zrelih adipocita koje ima ključnu ulogu u regulaciji tjelesnog metabolizma. Suvišna se energija pohranjuje u adipocite u obliku neutralnih triglicerida procesom lipogeneze *de novo*, dok se u uvjetima povećane energetske potrebe, poput gladovanja ili intenzivne fizičke aktivnosti lipolizom pohranjeni neutralni trigliceridi razgrađuju na glicerol i masne kiseline (11). Prema građi i funkciji masno se tkivo dijeli na smeđe i bijelo. Smeđe masno tkivo (engl. *brown adipose tissue*, BAT) je u odrasloj dobi prisutno u manjoj količini, a njegova primarna funkcija je termoregulacijska termogeneza. Postoje naznake da BAT igra ulogu u razvoju pretilosti, ali dodatna istraživanja su potrebna kako bi se to potvrdilo (12). Bijelo masno tkivo (engl. *white adipose tissue*, WAT) osim uloge energetskog spremnika organizma djeluje i kao endokrino tkivo. Izlučuje adipokine, vrstu citokina, od kojih su najpoznatiji leptin i adiponektin te lipide iz porodice hidroksiesteri masnih kiselina (engl. *fatty acyl esters of hydroxy fatty acids*, FAHFA). Ove molekule značajno utječu na metabolizam lipida, osjetljivost na inzulin, regulaciju apetita, upalne procese i održavanje energetske homeostaze. Narušena endokrina funkcija bijelog masnog tkiva može pridonijeti razvoju IR i drugih metaboličkih poremećaja (11, 13). Obzirom na lokaciju, bijelo se masno tkivo dijeli na visceralno i potkožno. Istraživanja pokazuju da je visceralno WAT povezano s metaboličkom disregulacijom i IR, dok je potkožno povezano s metaboličkom zaštitom i smanjenim rizikom razvoja pretilosti (14). Postoje uočljive razlike u količini i raspodjeli masnog tkiva među spolovima. Žene u prosjeku imaju veći udio masnog tkiva općenito pri istim BMI vrijednostima te ga nakupljaju većinski potkožno, za razliku od muškaraca

koji ga pretežno nakupljaju visceralno. Razlike u lokaciji nakupljanja masti, ali i odgovoru adipocita na adipokine (npr. leptin) uzrokovane su spolnim hormonima, poglavito estrogenima i androgenima (15). Smanjenje razine estrogena tijekom menopauze kod velikog broja žena dovodi do metaboličkih promjena, povećanja nakupljanja visceralnog uz smanjenje udjela potkožnog masnog tkiva (16). Disregulacija funkcije masnog tkiva, osobito u pretilosti, usko je povezana s promjenama u djelovanju ključnih metaboličkih regulatora. Sirtuini, kao NAD⁺-ovisne deacetilaze, imaju važnu ulogu u održavanju energetske homeostaze i zaštiti od metaboličkih poremećaja.

1.4 Sirtuini

Sirtuini su skupina evolucijski visoko konzerviranih NAD⁺-ovisnih deacetilaza i/ili mono-ADP-riboziltransferaza. Ovisnost o NAD⁺ za normalnu funkciju povezuje ih s energetske statusom stanice i ukazuje na njihovu važnu ulogu u regulaciji staničnog metabolizma. Kod sisavaca je opisano sedam članova ove proteinske obitelji (Sirt1–Sirt7). Svaki od njih sadrži središnju visoko konzerviranu katalitičku domenu građenu od oko 275 aminokiselina te jedinstvene N- i/ili C-terminalne domene koje određuju njihovu subcelularnu lokalizaciju. Sirt1, Sirt6 i Sirt7 lokalizirani su pretežno u jezgri, Sirt2 uz manji udio Sirt1 u citoplazmi, dok su Sirt3, Sirt4 i Sirt5 smješteni u mitohondrijima (17).

Sirtuin 3 (Sirt3) ima deacetilaznu i mono-ADP-riboziltransferaznu aktivnost (17). Regulira ključne metaboličke puteve uključujući oksidativnu fosforilaciju, β -oksidaciju masnih kiselina i ciklus limunske kiseline (18). Aktivira se pri visokoj unutarstaničnoj razini NAD⁺, odnosno u uvjetima niskog energetskeg statusa stanice. Potiče ekspresiju određenih mitohondrijskih gena odgovornih za mitohondrijsku biogenezu, termogenezu i oksidativnu fosforilaciju u BAT pri niskim temperaturama. Zajedno sa Sirtuinom 1 (Sirt1) u uvjetima kalorijske restrikcije deacetilacijom aktivira acetil koenzim A sintetaze modificirajući tako stopu sinteze masnih kiselina kako bi se pravilno regulirao energetske status stanice. Sudjeluje u regulaciji ionskih kanala i mitohondrijskog membranskog potencijala. Aktiviranjem proteina uključenih u neutralizaciju oksidativnog stresa uzrokovanog reaktivnim kisikovim spojevima djeluje kao supresor tumora. Njegov nedostatak dovodi do hiperacetilacije mitohondrijskih proteina, smanjene β -oksidacije masnih kiselina i disfunkcije WAT što pogoduje nakupljanju lipida i razvoju metaboličkih poremećaja (17, 19-21). Metabolizam lipida kod ženki bez Sirt3 efikasniji je nego kod mužjaka, ali njihove stanice

doživljavaju i veći oksidativni stres (22). Ovi rezultati upućuju na kombinirani učinak spolnih razlika i Sirt3 u regulaciji staničnog metabolizma u uvjetima nutritivnog stresa uzrokovanog ZD-om.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako Sirt3 regulira lipidni metabolizam u adipogeno diferenciranim mišjim embrionalnim fibroblastima (adipocitima) u uvjetima nutritivnog stresa uzrokovanog zapadnjačkom dijetom s obzirom na spol.

Specifični ciljevi rada uključivali su uspostavu Sirt3 *knock-out* (*sirt3*^{-/-}) mišje linije križanjem heterozigotnih (*sirt3*^{+/-}) jedinki te diferencijaciju mišjih embrionalnih fibroblasta u adipocite muškog i ženskog spola, divljeg tipa i Sirt3 *knock-out* genotipa. Simulacija zapadnjačke dijeta provedena je tretmanom otopinama masnih kiselina. Status lipidnog metabolizma adipocita, koji odražava njihovu staničnu funkciju, procijenjen je prije i nakon izlaganja tretmanu kako bi se ustanovio njegov utjecaj. U tu svrhu provedena su mjerenja ekspresije gena i proteina uključenih u metabolizam lipida i održavanje mitohondrijske funkcije. Na temelju tih analiza nastojalo se utvrditi postoje li spolno specifične razlike u odgovoru adipocita na nutritivni stres te razjasniti ulogu Sirt3 u regulaciji tih procesa

3. MATERIJALI I METODE

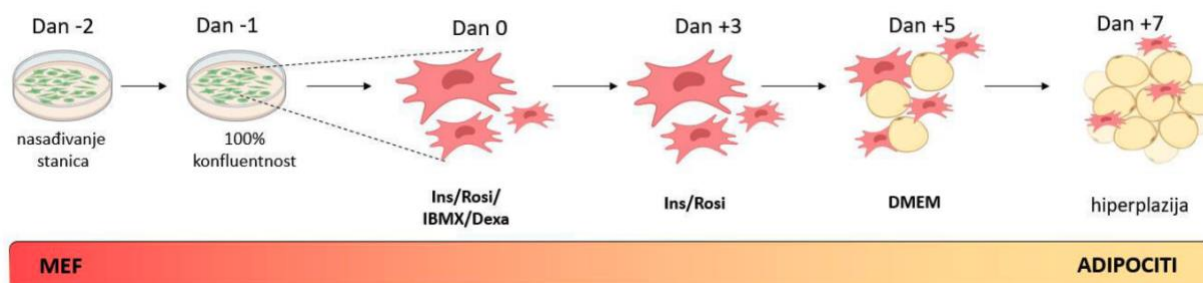
3.1 Životinjski model

Sirt3^{+/+} mužjaci (129S1/SvImJ, kataloški broj: 002448 Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, SAD), *sirt3*^{+/+} ženke (129S1/SvImJ, kataloški broj: 002448 Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, SAD), *sirt3*^{+/-} mužjaci i *sirt3*^{+/-} ženke (kataloški broj: 012755, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, SAD) miševa su nabavljeni od dobavljača Charles River Laboratories, Njemačka. Životinje su po dolasku bile smještene u kaveze u Pogon laboratorijskih životinja Instituta Ruđer Bošković gdje su držane u karanteni 14 dana. Sve postupke odobrilo je Ministarstvo poljoprivrede Hrvatske (br.: UP/I-322-01/15-01/25 525-10/0255-15-2 od 20. srpnja 2015.) i provedeni su u skladu sa smjernicama povezanim s Direktivom EU 2010/63/EU. Miševi su bili smješteni u standardnim uvjetima (tri životinje po kavezu, temperatura 22°C, relativna vlažnost 50-70%, ciklusu od 12 sati svjetla i 12 sati tame). Nakon karantene, miševi su međusobno križani kako bi se dobio adekvatan broj jedinki za planirane eksperimente. Genotipizacija potomaka (F1 generacija) provedena je prema protokolu opisanom od strane Jackson Laboratory za kataloški broj 012755 agaroznom gel elektroforezom PCR produkata dobivenih umnažanjem DNA izolirane iz uzoraka repa miševa pomoću specifičnih *sirt3*-početnica (23). Na temelju veličine dobivenih fragmenata određen je genotip miša tako da je Sirt3 WT (divlji tip; *sirt3*^{+/+}) = 562 bp, Sirt3 H (heterozigot; *sirt3*^{+/-}) = 200 bp i 562 bp te Sirt3 KO (*knock-out*; *sirt3*^{-/-}) = 200 bp.

3.2 Uspostavljanje kulture adipocita *in vitro*

Iz ženki miševa starih 13 dana izolirani su *sirt3*^{+/+} (129S1/SvImJ, kataloški broj: 002448 Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, SAD) i *sirt3*^{-/-} (kataloški broj: 012755, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, SAD) mišji embrionalni fibroblasti (MEF) prema prethodno opisanom protokolu uz specifične modifikacije (24, 25). Spol mišjih embrija određen je izolacijom pojedinačnih embrija na kojima je zatim provedena PCR reakcija s početnicama specifičnim za gen na Y kromosomu koji određuje spol (engl. *sex-determining region Y gene*, SRY). MEF-ovi su potom imortalizirani korištenjem plazmida koji sadrži SV40 promotor. Diferencijacija u adipocite je provedena prema protokolu opisanom u Al-Sayegh i sur., 2020 uz dodatak β-merkaptetanola (26). Stanice su uzgajane u inkubatoru na 37°C i 5% CO₂, u mediju DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) uz dodatak 10% seruma fetusa goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS; Capricorn

Scientific, Njemačka), 1% mješavine antibiotika/antimikotika (Capricorn Scientific, Njemačka), 1% mješavine neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i 50 μ M β -merkaptotetanol. Na pločicu sa šest jažica nasađeno je po 5×10^5 stanica u svaku jažicu. Nakon što su postale konfluentne (otprilike 2 dana nakon nasađivanja), dodan im je diferencijacijski medij (DM) sastavljen od 50 μ M β -merkaptotetanol, 50 μ M 3-izobutil-1-metilksantina (IBMX; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 1 μ M deksametazona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 10 μ g/mL inzulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i 5 μ M roziglitazona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Nakon tri dana, DM je zamijenjen medijem DMEM obogaćenim 50 μ M β -merkaptotetanolom, 10 μ g/mL inzulinom i 5 μ M roziglitazonom. Stanice su u ovom mediju rasle dodatna dva dana nakon čega je on zamijenjen standardnim medijem DMEM (Slika 1.). Sedmi dan nakon dosezanja konfluencije adipociti su bili tretirani pripremljenom otopinom masnih kiselina pri 37°C kako bi se simulirali uvjeti zapadnjačke dijete



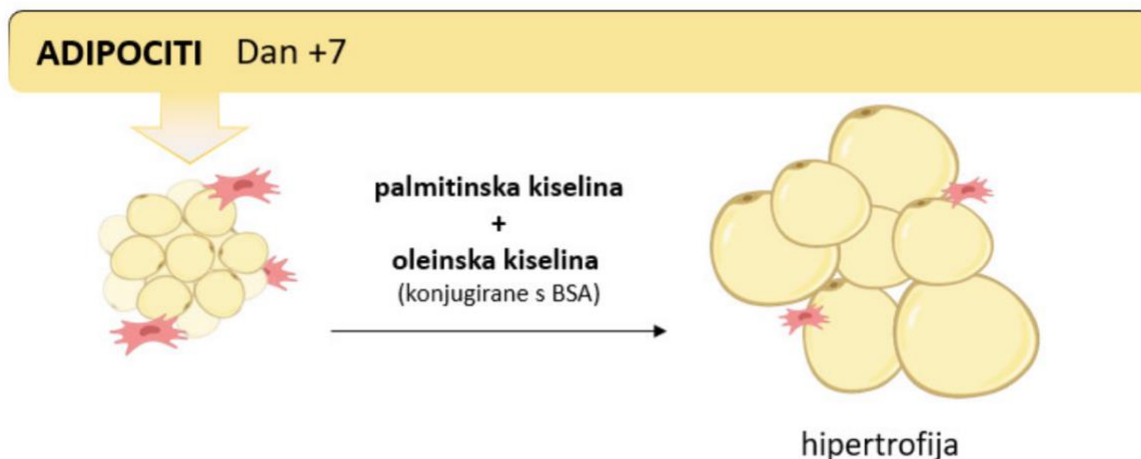
Slika 1. Prikaz protokola diferencijacije MEFova u populaciju adipocita. Dan -2: nasađivanje stanica; dan -1: stanice su 100% konfluentne; dan 0: stanice se tretiraju medijem za diferencijaciju (inzulin, roziglitazon, IBMX, deksametazon); dan +3: stanice se tretiraju inzulinom i roziglitazonom; dan +5: uklanja se medij za diferencijaciju i stanicama se dodaje medij DMEM; dan +7: stanice ulaze u pokus kako bi se provjerila diferencijacija u adipocitnu staničnu liniju.

3.3 Tretman masnim kiselinama – oponašanje zapadnjačke dijete

Za pripremu otopina korištenih u tretmanu masnim kiselinama goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) otopljen je u mediju DMEM do konačne koncentracije 53 mg/mL uz zagrijavanje u vodenoj kupelji na temperaturu od 55°C. Matične otopine oleinske i palmitinske kiseline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) pripremljene su otapanjem svake masne kiseline pojedinačno u etanolu do konačne koncentracije od 300 mM. Pripremljene otopine su razrijeđene dodavanjem medija DMEM koji sadrži BSA do konačne koncentracije od 0,5 mM. Prekonoćnoj

inkubaciji medija na mješalici uslijedila je filter sterilizacija (veličina pora 0,22 μm) nakon čega su alikvoti sterilnih masnih kiselina pohranjeni na -20°C za kasniju upotrebu.

Diferencirani muški i ženski adipociti Sirt3 KO i WT tretirani su pripremljenim radnim otopinama palmitinske i oleinske kiseline u uvjetima visoke koncentracije glukoze, s ciljem oponašanja uvjeta ZD u *in vitro* uvjetima prema protokolu Ricchi i sur., 2009 (Slika 2.) (27).



Slika 2. Shematski prikaz protokola tretmana populacije adipocita kombinacijom palmitinske i oleinske kiseline u BSA.

Stanice su bile izložene uvjetima ZD *in vitro* tijekom 6 sati i 24 sata. Za daljnje je istraživanje odabrano izlaganje stanica uvjetima ZD *in vitro* u trajanju od 6 sati, kako bi se detektirali rani i dinamički odgovori adipocita na ZD.

3.4 Analiza ekspresije adipogenih gena metodom RT-qPCR

Koristeći set NucleoSpin RNA Mini Kit (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača izolirana je ukupna RNA iz muških i ženskih Sirt3 WT i KO adipocita gustoće približno 5×10^5 živih stanica/mL. Izolirana RNA kvantificirana je spektrofotometrom Nanodrop (NanoPhotometer N60/N50, Implen GmbH, München, Njemačka), nakon čega je 1 μg RNA reverzno transkribiran koristeći High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) prema uputama proizvođača. qPCR analiza je provedena na uređaju ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster

City, CA, SAD) koristeći TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i specifične TaqMan probe (Tablica 1.). Prvi korak qPCR reakcije bio je inicijalna inkubacija od dvije minute na 50°C pa denaturacija od deset minuta na 95°C. Potom je provedeno 40 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije na 95°C tijekom 15 sekundi, prijanjanja na 55°C tijekom 30 sekundi i elongacije na 60 °C tijekom 1 minute.

Tablica 1. TaqMan probe korištene u reakciji qPCR.

Gen	Identifikacijski broj probe	Veličina produkta (bp)
<i>ppar-γ</i>	Mm00440940_m1	63
<i>fabp-4</i>	Mm00445878_m1	74
<i>adipoq</i>	Mm04933656_m1	77
<i>srebfl</i>	Mm00550338_m1	62
<i>β-aktin</i>	Mm02619580_g1	143

Relativna ekspresija gena *ppar-γ*, *fabp-4* i *adipoq* određena je metodom $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) prema TaqMan® Gene Expression Assays protokolu. Razina ekspresije gena od interesa normalizirana je prema endogenom genu *β-aktin*, a rezultati su prikazani kao promjena u odnosu na kontrolu. Sve su reakcije izvedene u biološkom triplicatu.

3.5 Izolacija proteina

Stanice su iz jažica uklonjene struganjem u puferu RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 12 mM natrijev deoksikolat, 1% Triton) s dodatkom proteaza i inhibitora fosfataza (cOmplete™ EDTA-free EASYpack, Roche, Basel, Švicarska). Dobiveni stanični lizati sonificirani su dva puta po 20 sekundi pri 80% jačine (Labsonic, Biotech International Ltd., Delhi, Indija), a zatim centrifugirani pri 16000 g u trajanju od 20 minuta na 4°C. Supernatant je prikupljen i prebačen u nove mikroepruvete. Koncentracija proteina u uzorcima određena je pomoću Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).

3.6 Razdvajanje proteina i Western blot

Proteini su razdvojeni prema veličini metodom SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). U tu svrhu izrađen je gel sastavljen od donjeg (razdvajajućeg) gela i gornjeg (sabijajućeg) gela. Donji je gel pripremljen miješanjem 3,75 mL akrilamida (Sigma

Aldrich, SAD), 3,75 mL 4x koncentriranog pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl, pH=8,8), 7,5 mL redestilirane vode (ReH₂O), 150 µL 20% APS (Sigma Aldrich, SAD) te neposredno prije izlijevanja 15 µL TEMED (Sigma Aldrich, SAD). Smjesa je vorteksirana približno 15 sekundi kako bi se osigurala homogenost. Gel je izliven između stakala do otprilike dvije trećine njihove visine, nadslojen izopropanolom i ostavljen da polimerizira 30 minuta. Gornji gel je pripremljen miješanjem 0,5 mL akrilamida, 1,25 mL 4x koncentriranog pufera za sabijanje (0,5 M Tris-HCl, pH=6,8), 3,25 mL ReH₂O, 25 µL 20% APS i naposljetku 5 µL TEMED, nakon čega je vorteksirana na isti način kao smjesa za donji gel. Izopropanol je uklonjen s polimeriziranog donjeg gela, na njega je izliven gornji gel do vrha te je u njega stavljen češljčić.

Otopina za nanošenje uzoraka na gel pripremljena je miješanjem uzorka proteina i SDS-PAGE pufera za elektroforezu (100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 20% glicerol, 4% β-merkaptioetanol, 0.5% bromofenol plavo) u omjeru prilagođenom izmjerenoj koncentraciji proteina kako bi na svaku jažicu bilo nanoseno 10 mikrograma proteina, pri čemu je volumen uzorka iznosio 18 µL. Za kasniju procjenu molekulskih masa proteina korišten je marker molekulskih masa. Elektroforeza je provedena u kadici za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra (BIO-RAD, SAD) s gelovima uronjenim u radni pufer za elektroforezu (30 g/L Tris-HCl, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS, pH=8,5) prvih 45 minuta pri naponu od 90 V, a idućih 120 minuta je napon povišen na 120 V.

Proteini su nakon razdvajanja elektroforezom preneseni s gela na PVDF membranu aktiviranu metanolom (Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting, BIO-RAD, SAD) u trajanju od 18 sati pri 4°C i konstantnoj struji od 100 mA pomoću uređaja Mini Trans-Blot Module (BIO-RAD, SAD) u puferu za prijenos (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicin, 20% metanol, pH=8,5). Membrana je nakon prijenosa obojana bojom Amido Black (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), a potom odbojana inkubacijom u otopini za odbojavanje 60 minuta te isprana pet puta u ReH₂O po dvije minute. Nespecifično vezanje proteina blokirano je tretmanom s I-Block™ Protein-Based Blocking Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, SAD) tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi. Membrane su potom inkubirane preko noći s primarnim poliklonalnim ili monoklonalnim protutijelima na 4°C, a zatim tretirane sekundarnim protutijelima konjugiranim s hrenovom peroksidazom u trajanju od jednog sata na sobnoj temperaturi (Tablica 2.). Proteini na membrani

vizualizirani su primjenom komercijalne otopine luminola (Bio-Rad, Hercules, SAD), a signal je detektiran uređajem Alliance 4.7 Imaging System (UVITEC, Cambridge, UK).

Tablica 2. Primarna i sekundarna protutijela korištena u detekciji proteina metodom Western blot.

Protutijelo	Razrjeđenje	Domaćin	Proizvođač
Anti-Sirt3	1:1000	kunić	Cell Signaling, SAD
Anti-Fasn	1:1000	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti-Ppar- γ	1:500	kunić	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti-Cpt-1	1:500	miš	ProteinTech, SAD
Anti-Hadhb	1:2000	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti-Acc-1	1:1000	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti-Adipoq	1:500	miš	ProteinTech, SAD
Anti-Atgl	1:1000	kunić	ProteinTech, SAD
Anti-Plin-1	1:1000	kunić	ProteinTech, SAD
Anti-Mouse	1:5000	koza	Bio-rad, SAD
Anti-Rabbit	1:5000	koza	Bio-rad, SAD

3.7 Detekcija nakupljanja lipida bojanjem Oil red O

Kako bi se odredila razina nakupljanja lipida, stanice su obojane bojom Oil red O (ORO) (Sigma, 00625). Matična otopina je pripremljena otapanjem 500 mg praha ORO u 100 mL 100%-tnog izopropanola uz prekonoćno miješanje na magnetskoj mješalici. Radna otopina je pripremljena prema potrebi razrjeđivanjem matične otopine redestiliranom vodom u omjeru 6:4 nakon čega je profiltrirana kroz filter papir. Stanice su prije bojanja isprane s 1 mL fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline*, PBS), a zatim fiksirane inkubacijom na sobnoj temperaturi i u mraku s 500 μ L 4%-tnog paraformaldehida. Nakon fiksacije su stanice tri puta isprane s po 1 mL PBS-a te je na njih dodan 1 mL 60%-tnog izopropanola i ostavljen da potpuno ispari. Kada su se jažice potpuno osušile u svaku od njih je dodano 500 μ L filtrirane radne otopine ORO. Inkubacija stanica na sobnoj temperaturi u mraku trajala je 20 minuta. Potom su stanice četiri puta isprane destiliranom vodom te je na njih dodano 500 μ L 100%-tnog izopropanola s 4% nonidetom P-40 s

ciljem olakšavanja snimanja mikroskopom i mjerenja apsorbancije pri 514 nm pomoću TECAN čitača mikrotitarskih pločica.

Nakon bojanja, boja ORO je ekstrahirana iz stanica pomoću izopropanola. Frakcije dobivene ekstrakcijom su analizirane spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 510 nm.

3.8 Imunocitokemija i konfokalna mikroskopija

Diferencirani i kontrolni MEF-ovi uzgajani su na pokrovnim stakalcima u pločicama s 24 jažice. Prije fiksacije s 4% paraformaldehidom u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi, stanice su isprane PBS-om koji sadrži Mg^{2+}/Ca^{2+} . Nakon fiksacije, stanice su blokirane s 1% BSA u PBS-u koji sadrži Mg^{2+}/Ca^{2+} i 1% Triton X-100 u trajanju od jednog sata na sobnoj temperaturi. Kako bi se fluorescentno označile, inkubirane su s primarnim protutijelom (Perilipin 1 – Proteintech-27716-1-AP, zec, razrjeđenje 1:400) tijekom noći. Sljedećeg dana stanice su triput isprane PBS-om s Mg^{2+}/Ca^{2+} prije inkubacije sa sekundarnim protutijelom (Alexa Fluor 488, anti-zec, 1:1000) u trajanju od jednog sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom, stanice su triput isprane PBS-om s Mg^{2+}/Ca^{2+} .

Stanice su nakon označavanja protutijelima inkubirane u radnoj otopini ORO u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su isprane PBS-om pet puta. Zatim su obojane bojom DAPI (1:1000, Sigma Aldrich, SAD) inkubacijom u trajanju od dvije minute. Nakon završnog ispiranja s PBS-om, stanice su montirane pomoću Dako Aqueous Mounting Medium (Agilent Technologies) i promatrane laserskim skenirajućim konfokalnim mikroskopom Leica SP8 X FLIM (Leica, Wetzlar, Njemačka).

3.9 Plinska/tekućinska kromatografija-masena spektrometrija

Masena spektrometrija (MS) u kombinaciji s tekućinskom (LC) i plinskom kromatografijom (GC) omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu širokog spektra metabolita, koji mogu poslužiti kao biomarkeri različitih patofizioloških stanja. Princip metode temelji se na ionizaciji molekula i njihovoj identifikaciji prema omjeru mase i naboja (m/z) (28).

Kako bi se ispitao utjecaj spola i Sirt3 na metabolomski profil adipocita u svaku jažicu ploče sa šest jažica nasadeno je 150000 adipocita u 1800 μ L medija. Napravljeno je šest tehničkih replikata po uvjetu. Stanice su nakon 24 sata isprane PBS-om te lizirane s 300 μ L hladnog metanola na ledu. Stanice su zatim sastrugane, homogenizirane ciklusima vorteksiranja i sonifikacije te centrifugirane (13 000 rpm, 30 min, 4 °C). Supernatanti su pohranjeni na -80 °C. Uzorci su prije analize dodatno homogenizirani sonifikacijom. Koncentracija DNA za potrebe normalizacije određena je mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 260 nm pomoću uređaja NanoPhotometer N60, nakon čega je DNA razrijeđena do konačne koncentracije od 4 500 ng/ μ L dsDNA. Kontrolni uzorci kvalitete (QC) pripremljeni su miješanjem jednakih volumena svih uzoraka (10 μ L) i korišteni za stabilizaciju sustava i provjeru ponovljivosti tijekom analize (29).

Normalizirani uzorci ekstrahirani su u otopini metanola i etanola u omjeru 1:1 te je nakon centrifugiranja 100 μ L uzorka prebačeno u LC vijale. Analize su provedene na LC sustavu Agilent 1200 spojenom na Q-TOF detektor (Agilent 6520). Razdvajanje je izvedeno na C18 koloni pri 40 °C, s gradijentom faza A (H_2O + 0,1% mravlje kiseline) i B (acetonitril, ACN + 0,1% mravlje kiseline), pri protoku od 0,6 mL/min u trajanju od 45 min. Ionizacija je provedena ESI-jem u pozitivnom načinu rada masenog spektrometra (raspon od 50 do 1000 m/z, brzinom skeniranja od 1,02 skeniranja/s).

Za GC-MS analizu uzorci su pripremljeni dodatkom ACN, centrifugiranjem i uparavanjem, a zatim derivatizirani O-metoksiamin hidrokloridom i smjesom N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (engl. *N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*, BSTFA) i 1% trimetilklorosilana (engl. *trimethylchlorosilane*, TMCS). Nakon dodatka internog standarda (metil stearat, 10 ppm), uzorci su analizirani na GC-MS sustavu Agilent 7890A/5975 s DB-5MS kolonom. Ukupna analiza za svaki uzorak trajala je 37 minuta i 30 sekundi. Energija ionizacije elektrona bila je postavljena na 70 eV. Sustav je prikupio masene spektre u rasponu između 50 i 600 m/z brzinom od 2 spektra/s.

Obrada sirovih podataka provedena je u više programskih paketa. Kvaliteta uzoraka i QC-ova provjerena je pregledom ukupnih ionskih kromatograma (TIC) u *MassHunter Qualitative Analysis* programu. GC-MS podatci obrađeni su u *Unknowns Analysis* programu uz identifikaciju pomoću Fiehn i NIST biblioteka, dok su LC-MS podatci obrađeni u *Agilent Mass Hunter Profinder* B.08.00

programu korištenjem *Molecular* i *Recursive Feature Extraction* modula. Matrica podataka dobivena nakon obje analize (GC-MS i LC-MS) prenesena je u *MetaboAnalyst* 5.0 kako bi se provela multivarijantna analiza (30). Razdvajanje grupa analizirano je djelomičnom diskriminantnom analizom najmanjih kvadrata (PLS-DA, engl. *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*). PLS-DA omogućuje odabir varijabli koristeći npr. ocjenu važnosti varijable u projekciji (VIP, engl. *Variable Importance In Projection*).

3.10 Statistička obrada podataka

Za statističku analizu podataka korišten je program *Statistics* 23.9 (IBM, SAD). Prije provođenja analiza, normalnost raspodjele uzoraka provjerena je Shapiro-Wilkovim testom. Za uzorke koji prate normalnu raspodjelu korišteni su parametrijski testovi za višestruke usporedbe, Studentov t-test ili analiza varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) (jednosmjerna, dvosmjerna ili trosmjerna analiza s obzirom na broj neovisnih varijabli s odgovarajućom *post-hoc* analizom). Za podatke koji ne prate normalnu raspodjelu korišteni su neparametrijski testovi. Korišten je Kruskal-Wallis test praćen Dunnovim testom za neovisne uzorke. Za izradu grafičkih prikaza korišten je program GraphPad Prism 9.0. Rezultati s $p < 0,05$ smatrani su značajnima.

4. REZULTATI

4.1 Uspostava Sirt3 KO miševa

F1 generacija dobivena križanjem heterozigotnih miševa genotipizirana je razdvajanjem amplifikacijskih produkata dobivenih metodom PCR elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 3.) prema postupku opisanom u poglavlju *Materijali i metode, 3.1 Životinjski model*. Analizom su identificirane heterozigotne jedinke (1, 3, 4, 11, 14), WT jedinke (2, 6, 7, 9, 10) i KO jedinke (5, 8, 12, 13, 16). Križanjem KO miševa iz F1 generacije uspostavljena je sljedeća generacija KO miševa. Ista shema križanja je primijenjena i u daljnjem uzgoju.



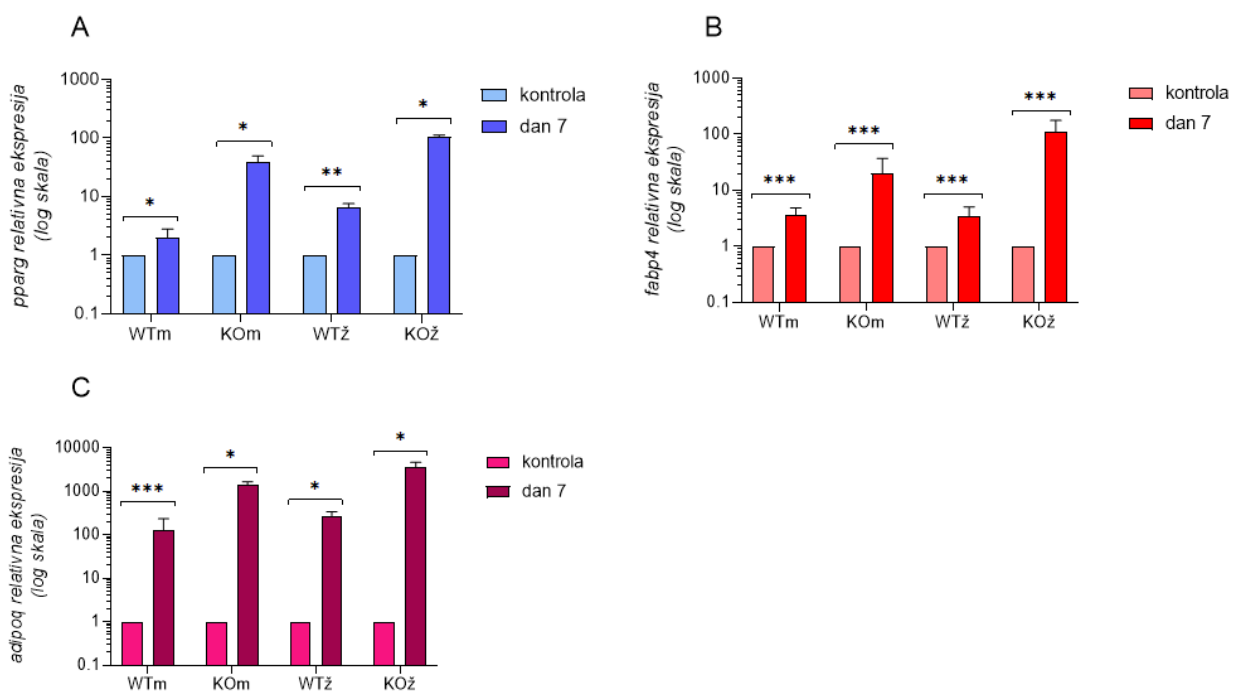
Slika 3. Genotipizacija PCR-om. Gornji red prikazuje uzorke F1 miševa; H: 1, 3, 4, 11, 14; WT – 2, 6, 7, 9, 10; KO: 5, 8, 12, 13, 16. Donji red prikazuje kontrole: H: Sirt3 heterozigot ($sirt3^{+/-}$), WT: Sirt3 WT ($sirt3^{+/+}$), KO: Sirt3 KO ($sirt3^{-/-}$); - je negativna kontrola.

4.2 Karakterizacija adipogeno diferenciranih mišjih embrionalnih fibroblasta

Kako bi se potvrdila uspješna diferencijacija MEFOva u adipocite, provjerena je učinkovitost diferencijacijskog protokola opisanog u *Materijali i metode, 3.2 Uspostavljanje kulture adipocita in vitro*. Prema korištenom protokolu, stanice postižu puni diferencijacijski potencijal nakon sedam do jedanaest dana tretmana, zbog čega je stupanj diferencijacije procijenjen upravo nakon sedmog

i jedanaestog dana, kako bi se omogućila međusobna usporedba i odabir stanica koje bolje predstavljaju adipocite (26).

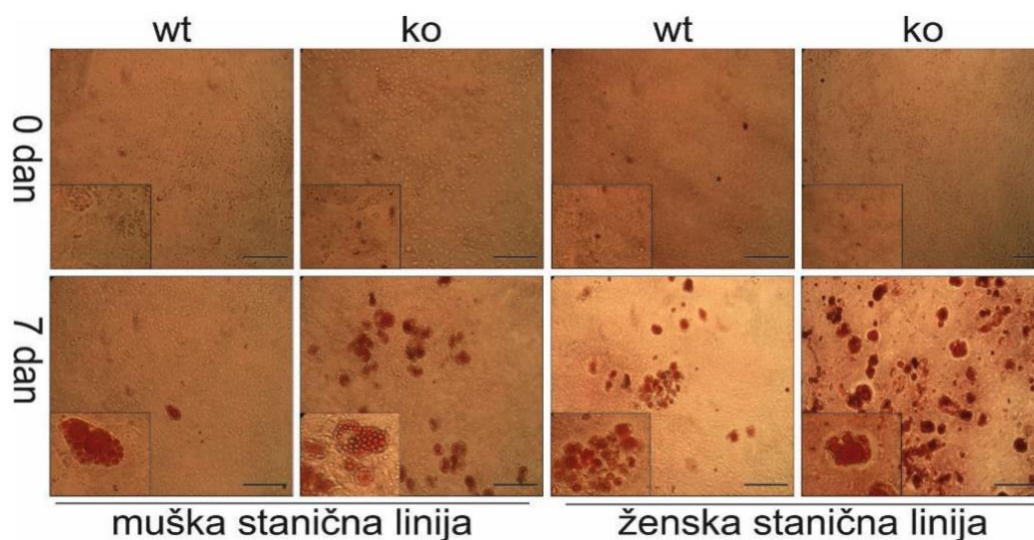
Uspješnost diferencijacije utvrđena je određivanjem ekspresije specifičnih genskih markera adipogeneze reakcijom qPCR. Zabilježeno je značajno povećanje ekspresije odabranih markera (*ppar-γ*, *adipoq*, *fabp-4*) u svim skupinama u odnosu na nediferencirane kontrole nakon sedmog dana diferencijacije (Slika 4.) Povišena ekspresija ovih gena potvrđuje uspješnu diferencijaciju MEFOva u adipocite.



Slika 4. Potvrda diferencijacije Sirt3 WT i Sirt3 KO MEFOva oba spola u adipocitnu staničnu liniju korištenjem metode qPCR. **(A)** *ppar-γ*: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ **(B)** *fabp-4*: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ **(C)** *adipoq*: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Proveden je Studentov t-test za vrijednosti dobivene sedmi dan nakon početka diferencijacije u odnosu na kontrolu. Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija (fold change) $\pm$ SD na logaritamskoj skali, normalizirani na pripadajuće kontrole. WTm: muški Sirt3 WT adipociti; KOM: muški Sirt3 KO adipociti; WTž: ženski Sirt3 WT adipociti; KOž: ženski Sirt3 KO adipociti.

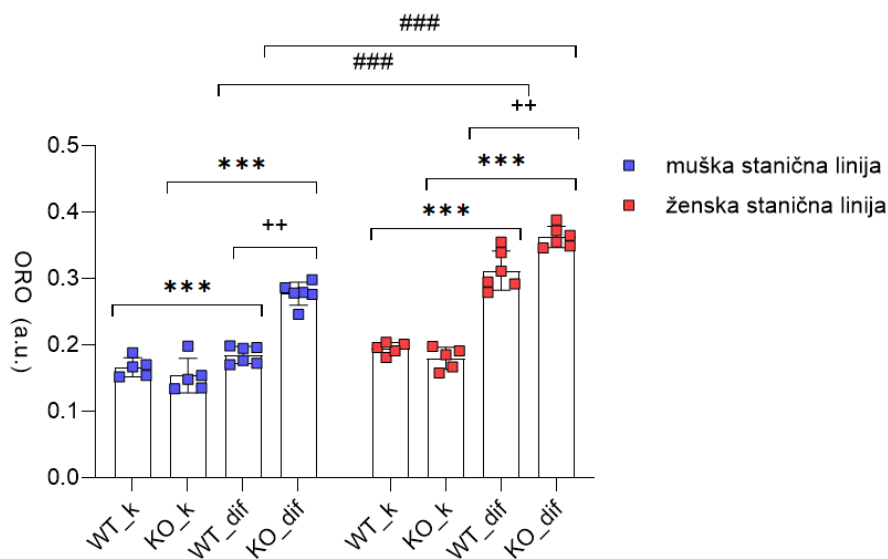
Nedostatak Sirt3 dovodi do povećane ekspresije *ppar-γ*, *fabp-4* i *adipoq* u oba spola. Ženski adipociti dosljedno su pokazivali ekspresiju istraživanih gena višu nego kod mužjaka, neovisno o prisutnosti Sirt3.

Uspješnost diferencijacije MEFOva u adipocite prikazana je i morfološki bojanjem lipidnih kapljica s bojom ORO (Slika 5.).



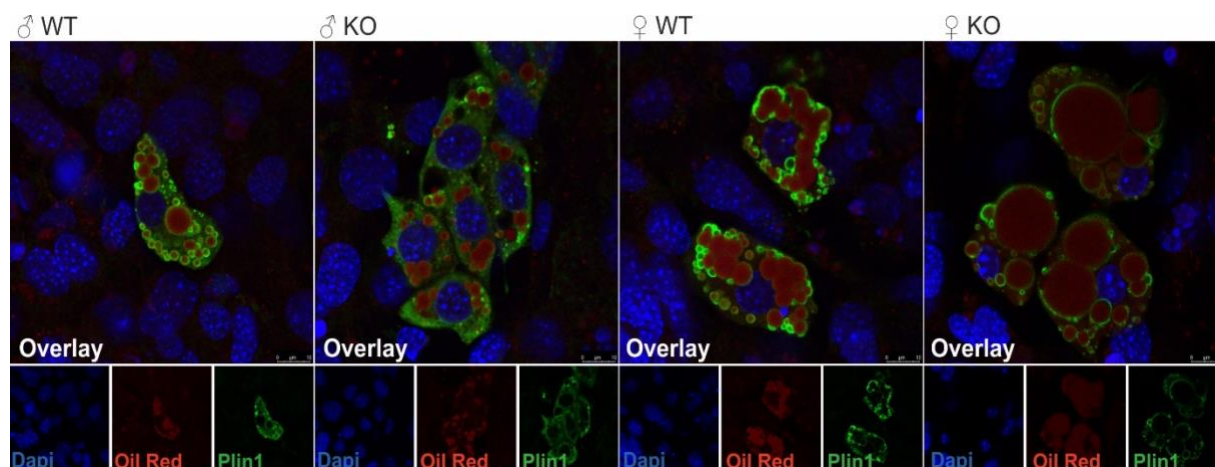
Slika 5. Bojanje lipidnih kapljica u populaciji adipogeno diferenciranih MEFOva bojom ORO nakon sedam dana diferencijacije. Stanice su promatrane pomoću fazno kontrastnog svjetlosnog mikroskopa. Mjerna skala: 100 μm ; povećanje: x10; povećanje umetnute slike: x40. Umetnute slike su povećane četiri puta kako bi se istaknula morfologija lipidnih kapljica. Prikazana je reprezentativna slika. wt označava divlji tip, dok ko značava *knock-out* adipocite.

ORO je potom ekstrahirano iz stanica te je njegova koncentracija određena spektrofotometrijski (Slika 6.).



Slika 6. Spektrofotometrijska kvantifikacija bojanja ORO u populaciji adipogeno diferenciranih MEFova nakon sedam dana diferencijacije. a.u.: proizvoljne jedinice. Značajni učinci Sirt3, spola i diferencijacije te njihove međusobne interakcije određeni su trosmjernim ANOVA testom. Sve usporedbe parova provedne su s primijenjenom Bonferronijevom prilagodbom. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Utjecaj Sirt3: $^{++}p < 0,01$, WT vs. KO; utjecaj diferencijacije: $^{***}p < 0,001$, kontrola vs. diferencijacija; utjecaj spola $^{###}p < 0,001$, muška vs. ženska stanična linija. Plavom je bojom označena muška, a crvenom ženska stanična linija. WT_k: Sirt3 WT kontrolni MEF-ovi; KO_k: Sirt3 KO kontrolni MEF-ovi; WT_dif: Sirt3 WT adipogeno diferencirani MEF-ovi; KO_dif: Sirt3 KO adipogeno diferencirani MEF-ovi.

Detekcija fluorescentno obilježenog proteina Plin-1 lokaliziranog na površini lipidnih kapljica služila je kao dodatna potvrda uspješnosti diferencijacije (Slika 7.) (30). Kao i na slikama dobivenim ORO bojanjem, vidljivo je da KO adipociti nakupljaju više lipidnih kapljica od WT adipocita, pri čemu ih ženski KO adipociti nakupljaju najviše od svih skupina. Lipidne kapljice ženskih KO adipocita su također najveće.

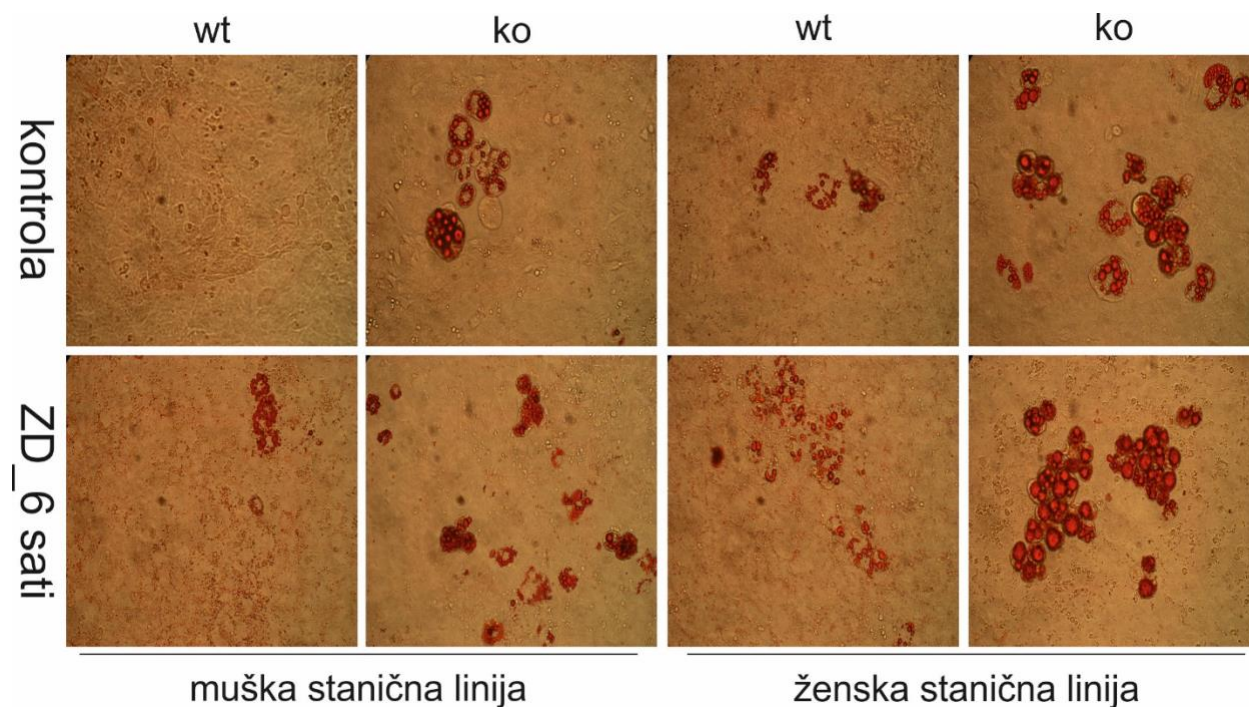


Slika 7. Fluorescentno obilježeni adipogeno diferencirani MEF-ovi vizualizirani konfokalnim mikroskopom. Crvenom bojom označene su lipidne kapljice obojane bojom ORO, zelenom bojom protein Plin1 na površini lipidnih kapljica, a plavom bojom jezgra obojana bojom DAPI. ♂WT: adipogeno diferencirani WT muški MEF-ovi; ♂KO: adipogeno diferencirani KO muški MEF-ovi; ♀WT: adipogeno diferencirani WT ženski MEF-ovi; ♀KO: adipogeno diferencirani KO ženski MEF-ovi. Prikazana je reprezentativna slika.

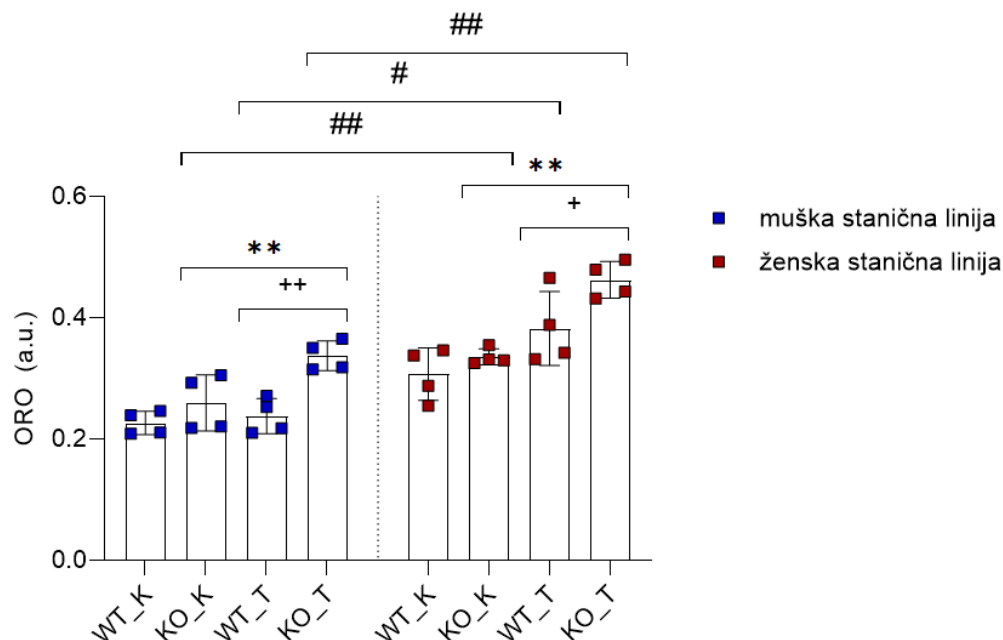
Za daljnje pokuse su odabrani adipociti u sedmom danu diferencijacije budući da je u tom danu ekspresija adipogenih markera bila najveća.

4.3 Oponašanje zapadnjačke dijete *in vitro*

Promjene u obliku nakupljanja lipida u adipogeno diferenciranim MEF-ovima nakon izlaganja ZD tijekom 6 sati praćene su bojanjem staničnih lipida bojom ORO (Slika 8). Akumulacija lipida započela je u svim tipovima stanica nakon samo 6 sati izlaganja uvjetima ZD (Slika 9.)



Slika 8. Bojanje lipidnih kapljica u populaciji adipocita bojom ORO nakon tretmana ZD-om tijekom 6 sati. Prikazana je reprezentativna slika. wt označava divlji tip, dok ko značava *knock-out* stanice. kontrola: adipociti koji nisu tretirani ZD-om; ZD_6 sati: adipociti tretirani ZD-om tijekom 6 sati.



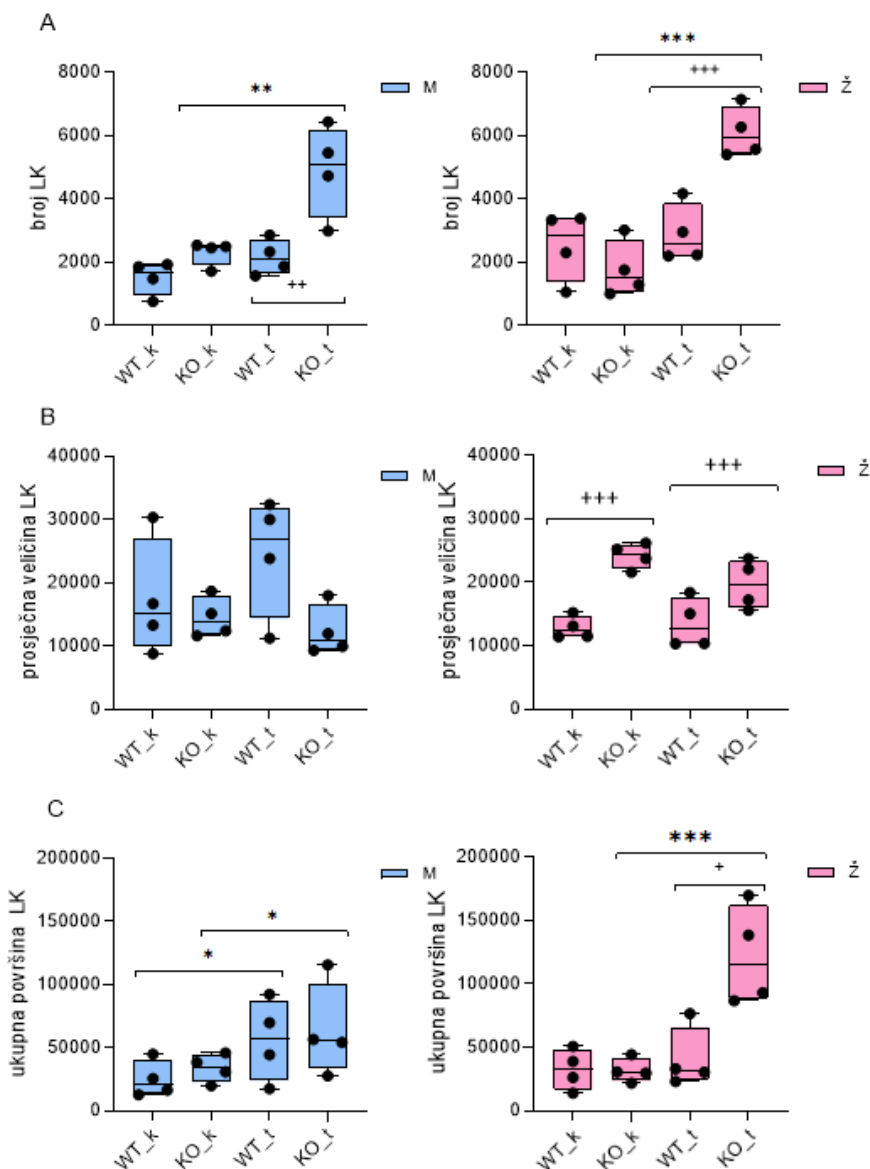
Slika 9. Spektrofotometrijska kvantifikacija bojenja Sirt3 WT i KO muških i ženskih adipocita u *in vitro* tretmanu ZD nakon 6 sati. a.u., proizvoljne jedinice. Značajni učinci genotipa, spola, tretmana te njihove interakcije određeni su trosmjernim ANOVA testom. Sve usporedbe parova provedne su s primijenjenom Bonferronijevom prilagodbom. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Utjecaj Sirt3: $^+p < 0,05$, $^{++}p < 0,01$, WT vs. KO; utjecaj tretmana: $^{**}p < 0,01$, kontrola vs. tretman; utjecaj spola: $^{\#}p < 0,01$, $^{##}p < 0,01$, muška vs. ženska stanična linija. Plavom je bojom označena muška, a crvenom ženska stanična linija. WT_K: Sirt3 WT adipociti koji nisu tretirani ZD-om; KO_K: Sirt3 KO adipociti koji nisu tretirani ZD-om; WT_T: Sirt3 WT adipociti tretirani ZD-om tijekom 6 sati; KO_T: Sirt3 KO adipociti tretirani ZD-om tijekom 6 sati.

Tretman ZD-om dovodi do veće akumulacije lipida u KO adipocita u usporedbi s WT stanicama istog spola. Ženski KO adipociti nakupljaju najviše lipidnih kapljica od svih skupina. Općenito, ženski adipociti pokazuju veću akumulaciju lipida neovisno o tretmanu.

4.4 Relativna kvantifikacija veličine, ukupne površine i postotka površine lipidnih kapljica

Koristeći svjetlosni i konfokalni mikroskop za slikanje te programom za analizu napravljenih slika ImageJ analizirani su učinci ZD na veličinu, površinu i postotak površine koju lipidne kapljice zauzimaju u adipocitu. U nedostatku Sirt3 oba spola pokazuju značajno povećanje broja lipidnih kapljica nakon tretmana ZD-om (Slika 10.A). Kod muških adipocita nije bilo promjene u prosječnoj veličini, dok je kod ženskih prosječna veličina lipidnih kapljica bila veća u KO grupama, bez obzira na tretman (Slika 10.B). Ukupna površina lipidnih kapljica oba genotipa

muških adipocita pokazala je značajno povećanje nakon tretmana ZD-om. Kod ženskih WT adipocita nije došlo do promjene, bez obzira na tretman, dok je kod ženskih KO adipocita došlo do značajnog povećanja ukupne površine lipidnih kapljica nakon tretmana ZD-om (Slika 10.C).

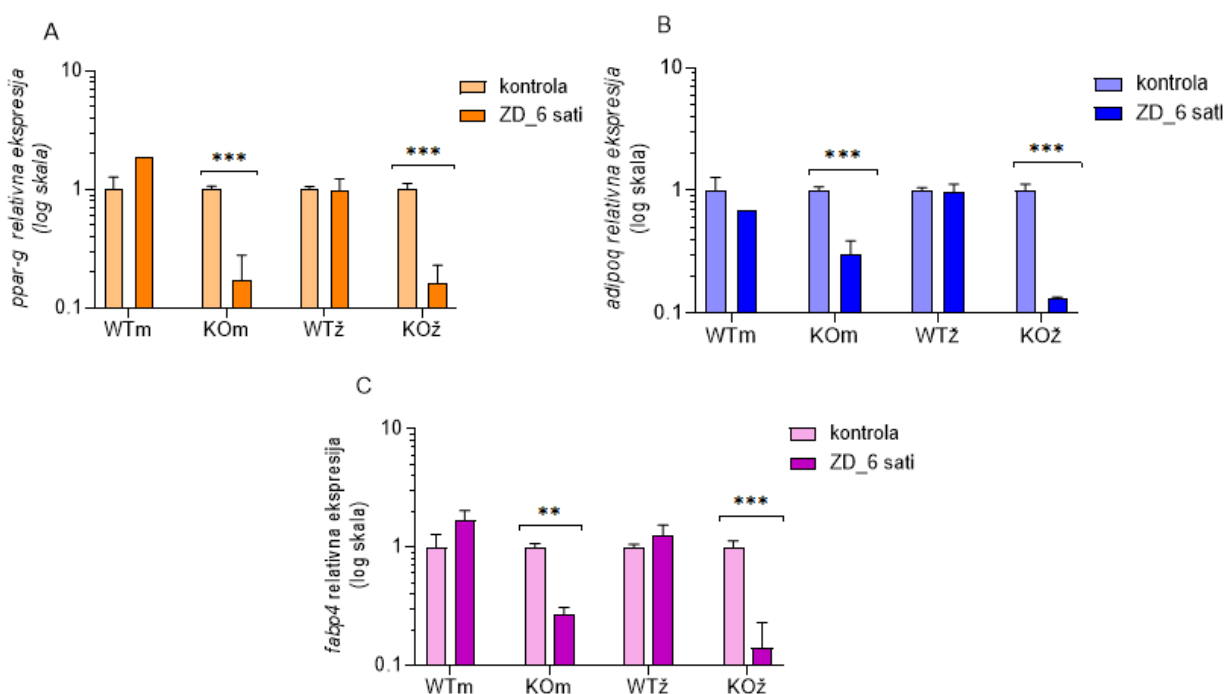


Slika 10. Kvantitativna analiza lipidnih kapljica nakon tretmana ZD-om. (A) broj, (B) prosječna veličina i (C) ukupna površina lipidnih kapljica. Značajni učinci genotipa i tretmana te njihove interakcije u svakom spolu posebno određeni su dvosmjernim ANOVA testom. Sve usporedbe parova provedne su s primijenjenom Bonferronijevom prilagodbom. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Utjecaj Sirt3: $+++p<0,001$, $++p<0,01$, $+p<0,05$, WT vs. KO; utjecaj tretmana: $***p<0,001$, $**p<0,01$, kontrola vs. tretman. Plavom bojom je označena muška (M), a

rozom bojom ženska stanična linija (Ž). WT_k: Sirt3 WT adipociti koji nisu tretirani ZD-om; KO_k: Sirt3 KO adipociti koji nisu tretirani ZD-om; WT_t: Sirt3 WT adipociti tretirani ZD-om tijekom 6 sati; KO_t: Sirt3 KO adipociti tretirani ZD-om tijekom 6 sati.

4.5 Relativna ekspresija gena uključenih u adipogenezu i lipogenezu nakon tretmana zapadnjačkom dijetom

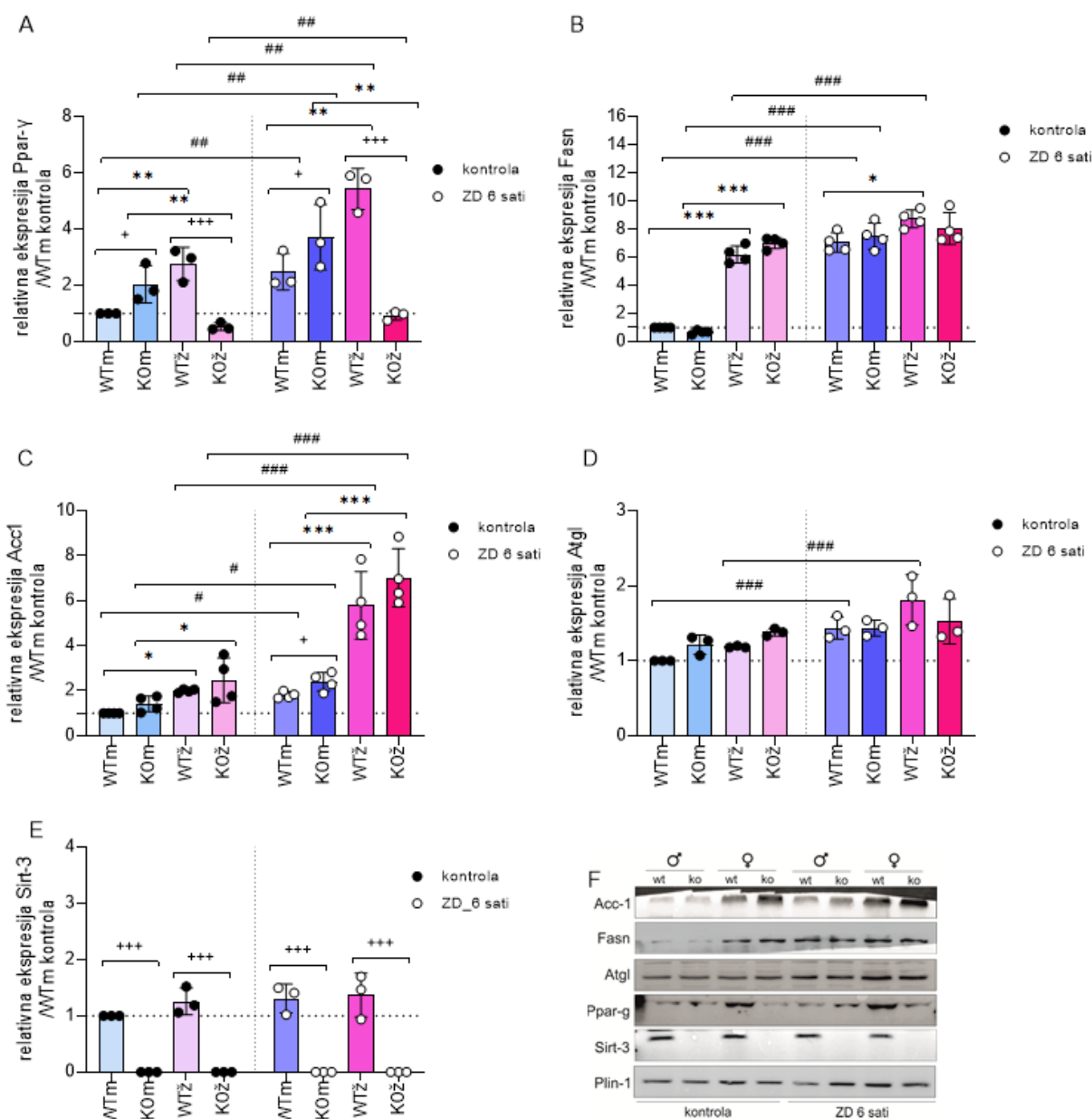
Rezultati dobiveni mjerenjem procesa specifičnih za adipocite, poput nakupljanja lipida te ekspresije specifičnih gena i proteina, normalizirani su u odnosu na specifični adipocitni marker Plin-1. Analiza relativne ekspresije gena pokazala je smanjenu ekspresiju gena *ppar-γ*, *fabp-4* i *adipoq* koji su uključeni u adipogenezu nakon tretmana ZD, ovisno o Sirt3 i spolu (Slika 11.).



Slika 11. Relativna ekspresija (*fold change*) gena za adipogenezu i lipogenezu nakon tretmana ZD-om. (A) *ppar-γ*: *** $p < 0,001$ (B) *adipoq*: *** $p < 0,001$ (C) *fabp-4*: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (D) Proveden je Studentov t-test za neovisne uzorke za usporedbu tretmana u odnosu na kontrolu za svaku staničnu liniju. Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija (*fold change*) $\pm$ SD na logaritamskoj skali, normalizirani na pripadajuće kontrole. Genska ekspresija relativizirana je na Plin-1. WTm: muški Sirt3 WT adipociti; KOm: muški Sirt3 KO adipociti; WTž: ženski Sirt3 WT adipociti; KOž: ženski Sirt3 KO adipociti. ZD_6 sati označava tretman ZD-om u trajanju od 6 sati.

4.6 Relativna ekspresija proteina uključenih u adipogenezu, lipogenezu, oksidaciju lipida i lipolizu nakon tretmana zapadnjačkom dijetom

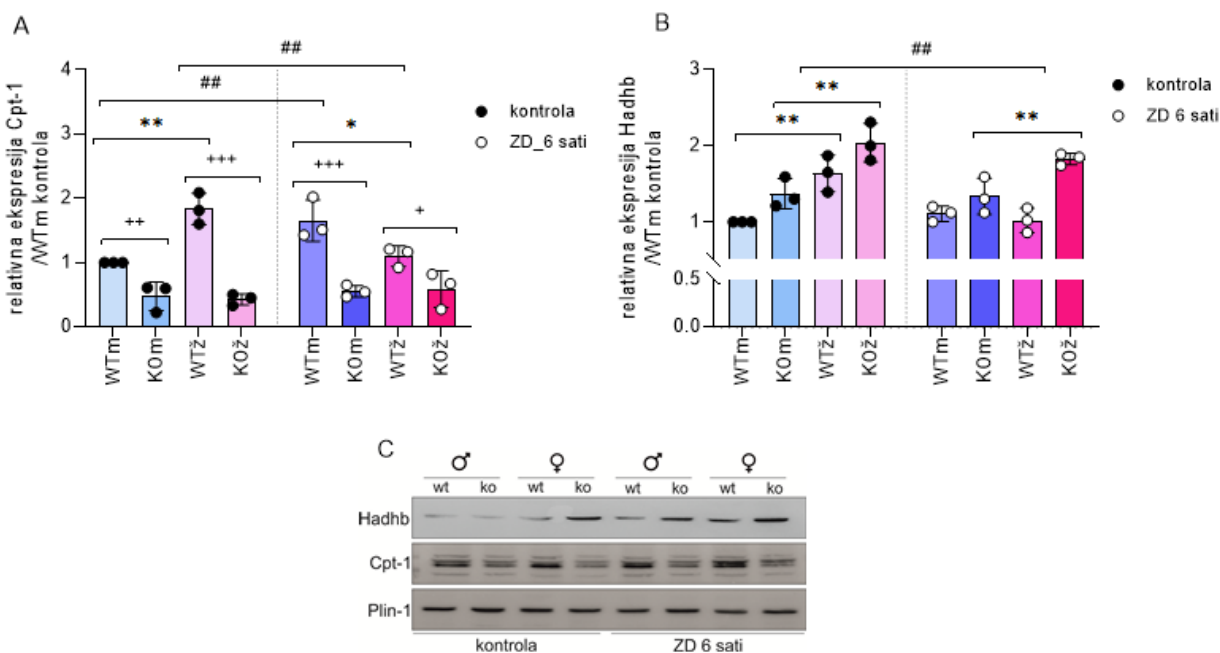
Kako bi se ispitala ekspresija ključnih proteina povezanih s adipogenezom (Ppar- γ), lipogenezom (Fasn, Acc-1), oksidacijom lipida i lipolizom (Cpt-1, Hadhb, Adipoq) provedena je WB analiza odabranih proteina. Rezultati su pokazali da tretman ZD-om povećava ekspresiju proteina uključenih u adipogenezu i lipogenezu u gotovo svim staničnim linijama. Kod WT adipocita zabilježeno je povećanje ekspresije Atgl (Slika 12.).



Slika 12. Relativna ekspresija proteina uključenih u adipogenezu, lipogenezu i lipolizu nakon tretmana ZD-om. Grafički prikaz ekspresije: **(A)** Ppar- γ **(B)** Fasn **(C)** Acc-1 **(D)** ATGL **(E)** Sirt3. Značajni učinci Sirt3, spola i tretmana ZD-om te njihove međusobne interakcije određeni su trosmjernim ANOVA testom. p-vrijednosti prikazane su pored grafikona. Sve usporedbe parova provedne su s primijenjenom Bonferronijevom prilagodbom. $^{+++}p<0,001$, $^{++}p<0,01$, $^{+}p<0,05$ WT vs. KO; $^{***}p<0,001$, $^{**}p<0,01$, $^{*}p<0,05$ muški vs. ženski adipociti; $^{###}p<0,001$, $^{##}p<0,01$, $^{\#}p<0,05$ kontrola vs. tretman. **(F)** Reprezentativni imunoblotovi. Proteinska ekspresija relativizirana je u odnosu na Plin-1. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. N=3-4 uzorka po skupini. WTm: muški Sirt3 WT adipociti; KOm: muški Sirt3 KO adipociti; WTž: ženski Sirt3 WT adipociti; KOž: ženski Sirt3 KO adipociti. ZD_6 sati označava tretman ZD-om u trajanju od 6 sati.

U ženskim KO adipocitima uočena je najniža ekspresija Ppar- γ i najviša ekspresija Acc-1 u usporedbi sa svim ostalim skupinama. Takav obrazac nije prisutan kod muških KO stanica, što upućuje na postojanje spolno-specifičnih razlika u dinamici metabolizma lipida u stanicama pod utjecajem nedostatka Sirt3.

Obzirom da su dosadašnji rezultati ukazali na obrazac prekomjernog nakupljanja lipida uz supresiju Ppar- γ kod ženskih KO adipocita, što upućuje na neravnotežu lipidnog metabolizma, analizirani su dodatni parametri energetskog sustava stanice (pAMPK) i ekspresija proteina ključnog u regulaciji glukoze i oksidaciji masnih kiselina (Adipoq). Upravo su ženski KO adipociti pokazali snažnu redukciju ekspresije pAMPK i Adipoq nakon tretmana ZD-om, što pogoduje smanjenoj energetskej potrošnji i supresiji lipidne oksidacije (Slika 13.).



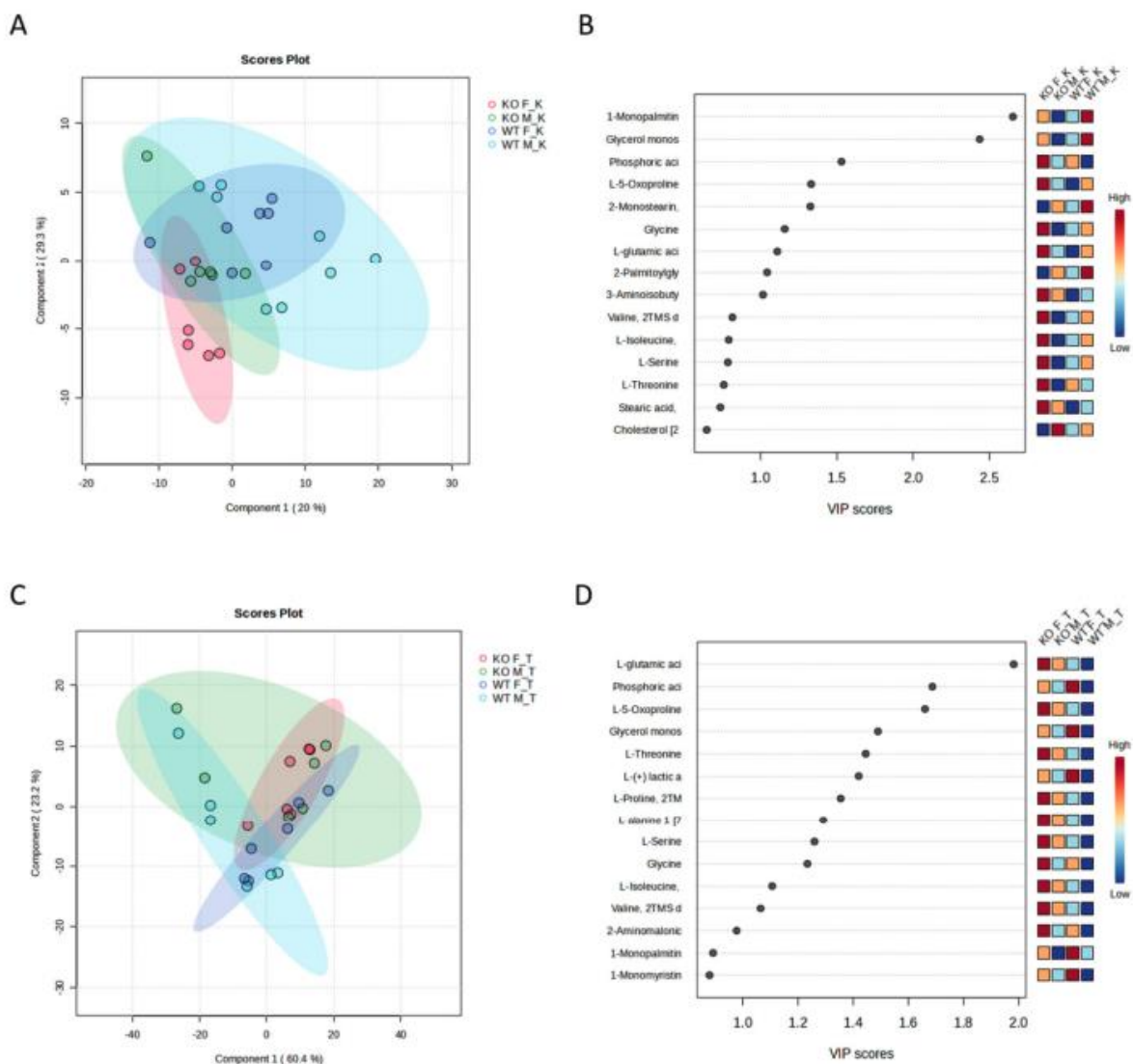
Slika 14. Relativna ekspresija Cpt-1 i Hadhb. Grafički prikaz ekspresije: **(A)** Cpt-1 i **(B)** Hadhb. Značajni učinci Sirt3, spola i tretmana ZD-om te njihove međusobne interakcije određeni su trosmjernim ANOVA testom. p-vrijednosti prikazane su pored grafikona. Sve usporedbe parova provedne su s primijenjenom Bonferronijevom prilagodbom. $+++p<0,001$, $++p<0,01$, $+p<0,05$ WT vs. KO; $***p<0,001$, $**p<0,01$, $*p<0,05$ muški vs. ženski adipociti; $###p<0,001$, $##p<0,01$, $#p<0,05$ kontrola vs. tretman. **(C)** Reprezentativni imunoblotoi. Proteinska ekspresija relativizirana je u odnosu na Plin-1. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. N=3-4 uzorka po skupini. WTm: muški Sirt3 WT adipociti; KOM: muški Sirt3 KO adipociti; WTž: ženski Sirt3 WT adipociti; KOž: ženski Sirt3 KO adipociti. ZD_6 sati označava tretman ZD-om u trajanju od 6 sati.

4.8 Metaboličko profiliranje tekućinskom/plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom

S ciljem analize promjena u koncentracijama pojedinih metabolita u staničnim linijama nakon tretmana ZD-om, provedene su plinska (GC) i tekućinska kromatografija (LC) spregnute s masenom spektrometrijom (MS).

4.8.1 Plinska kromatografija-masena spektrometrija

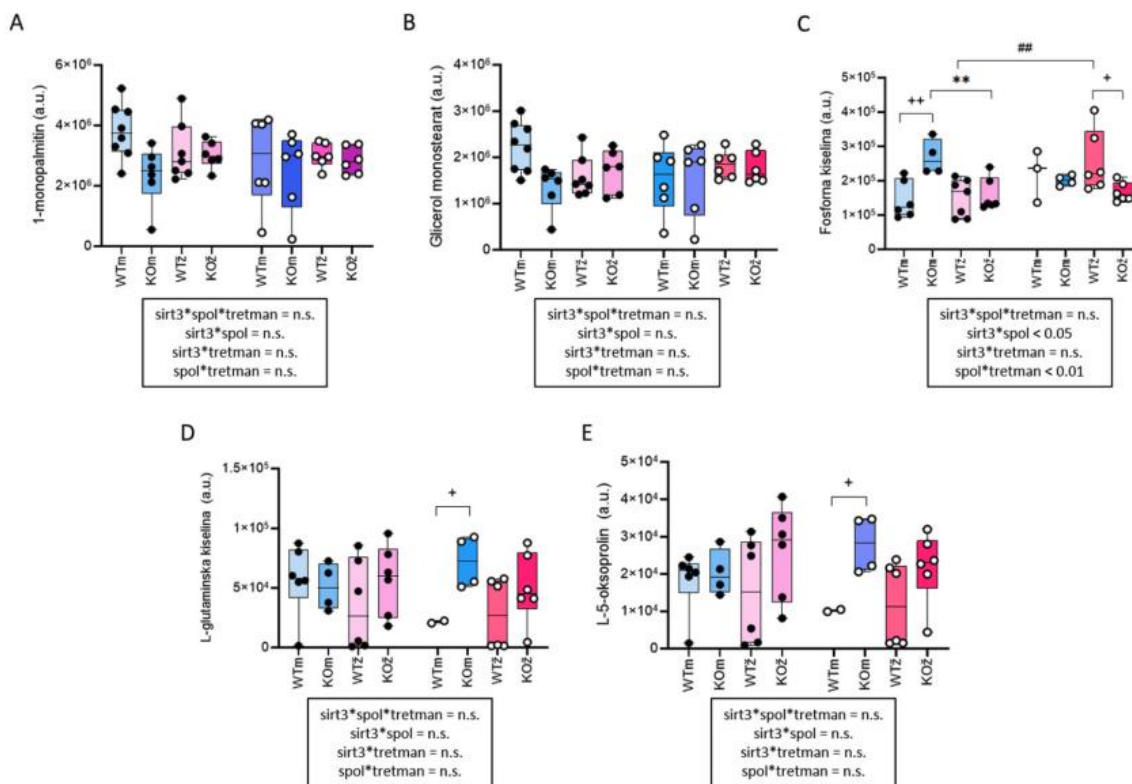
Uzorci su analizirani korištenjem platforme GC-MSD prema opisanom protokolu (29). Provedena je PLS-DA analiza MS podataka dobivenih u pozitivnom modu na stanicama u kontrolnim uvjetima te nakon tretmana ZD-om (Slika 15.)



Slika 15. Rezultati GC-MS. **(A)** Prikaz grupiranja uzoraka nakon provedene PLS-DA analize u kontrolnim uvjetima. **(B)** VIP vrijednosti dobivene temeljem PLS-DA analize u kontrolnim uvjetima. **(C)** Prikaz grupiranja uzoraka nakon provedene PLS-DA analize nakon tretmana ZD-om. **(D)** VIP vrijednosti dobivene temeljem PLS-DA analize nakon tretmana ZD-om. Prikazi su izrađeni korištenjem programa Metaboanalyst 6.0. Slovo M označava mušku, a F žensku staničnu liniju. Slovo K označava kontrolne uvjete, a T tretman ZD-om.

Na temelju dobivenih VIP vrijednosti dobivenih iz PLS-DA analize za daljnju su analizu odabrani metaboliti s $VIP > 1,5$. To su bili 1-monopalmitin, glicerol monostearat i fosforna kiselina za kontrolne grupe te L-glutaminska kiselina, fosforna kiselina i L-5-oksoprolin za grupe tretirane

ZD-om. Određene su relativne količine metabolita koji najviše doprinose razdvajanju grupa kontrolnih i tretiranih stanica (Slika 16.)



Slika 16. Grafički prikaz razina metabolita u staničnim linijama koji najviše doprinose razlikama između grupa u kontrolnim uvjetima i nakon tretmana ZD-om. (A) 1-monopalmitin, (B) glicerol monostearat, (C) fosforna kiselina, (D) L-glutaminska kiselina i (E) L-5-oksoprolin. Značajni učinci Sirt3, spola i tretmana ZD-om te njihove međusobne interakcije određeni su trosmjernim ANOVA testom. p-vrijednosti prikazane su pored grafikona. Sve usporedbe parova provedne su s primijenjenom Bonferronijevom prilagodbom. ++ $p < 0,01$, + $p < 0,05$ WT vs. KO; ** $p < 0,01$ muška vs. ženska stanična linija; ## $p < 0,01$ kontrola vs. tretman. Koncentracije metabolita izražene su u proizvoljnim jedinicama, a.u. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. N=2-8 uzoraka po skupini. WTm: muški Sirt3 WT adipociti; KOm: muški Sirt3 KO adipociti; WTž: ženski Sirt3 WT adipociti; KOž: ženski Sirt3 KO adipociti. ZD_6 sati označava tretman ZD-om u trajanju od 6 sati.

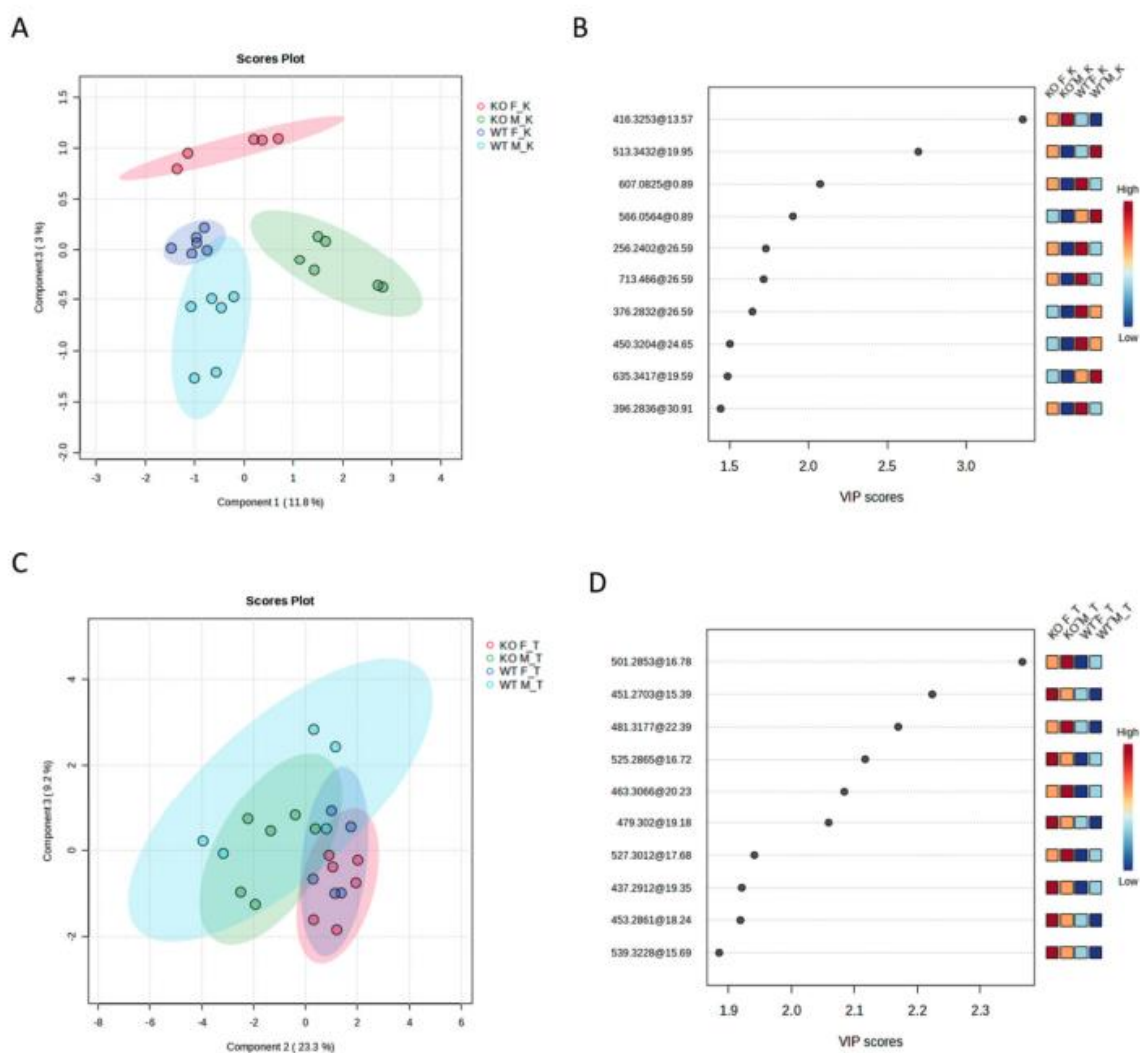
Iako je PLS-DA analizom pokazano kako su 1-monopalmitin i glicerol monostearat najznačajniji metaboliti zaslužni za razdvajanje grupa u kontrolnim uvjetima, detaljnija statistička analiza nije otkrila značajne razlike između pojedinih skupina. Nasuprot tome, utvrđeno je da nedostatak Sirt3 dovodi do povećanja razine fosforne kiseline (fosfatnih iona) u KO muškim adipocitima u

usporedbi s WT muškim adipocitima u kontrolnim uvjetima. Zanimljivo je da tretman ZD-om ne utječe na razinu fosforne kiseline u muškim adipocitima, bez obzira na genotip, dok u ženskim WT adipocitima dolazi do smanjenja razine fosforne kiseline nakon tretmana ZD-om.

Dodatno, u KO muškoj staničnoj liniji zabilježene su povišene razine L-glutaminske kiseline (glutamata) i L-5-oksoprolina u odnosu na WT muške adipocite.

4.8.2 Tekućinska kromatografija-masena spektrometrija

Uzorci su analizirani korištenjem platforme LC-ESI-QTOF-MS u negativnom modu prema opisanom protokolu (29). Provedena je PLS-DA analiza MS podataka dobivenih na stanicama u kontrolnim uvjetima te nakon tretmana ZD-om (Slika 17.)



Slika 17. Rezultati LC-MS. **(A)** Prikaz grupiranja uzoraka nakon provedene PLS-DA analize u kontrolnim uvjetima. **(B)** VIP vrijednosti dobivene temeljem PLS-DA analize u kontrolnim uvjetima. **(C)** Prikaz grupiranja uzoraka nakon provedene PLS-DA analize nakon tretmana ZD-om. **(D)** VIP vrijednosti dobivene temeljem PLS-DA analize nakon tretmana ZD-om. Prikazi su izrađeni korištenjem programa Metaboanalyst 6.0. Slovo M označava mušku, a F žensku staničnu liniju. Slovo K označava kontrolne uvjete, a T tretman ZD-om.

Analizirani su metaboliti odgovorni za razdvajanje grupa u kontrolnim uvjetima odnosno grupa koje su tretirane ZD-om kako bi se odredilo kojoj skupini lipida pripadaju. Za to su ponovno odabrani lipidi čija je $VIP > 1,5$. Metaboliti odgovorni za razdvajanje kontrolnih grupa (Slika 16.B) pripadaju skupinama sterolnih lipida, glicerofosfolipida, pirimidinskih nukleotida i masnih kiselina, što je određeno tentativnom analizom. Istim tipom analize pokazano je da detektirani metaboliti zaslužni za razdvajanje skupina koje su tretirane ZD (Slika 16.D) pripadaju skupini glicerofosfolipida.

5. RASPRAVA

Ranija su istraživanja dokazala postojanje značajnih spolno specifičnih razlika u Sirt3 KO MEF-ovima, uključujući različite adaptivne odgovore na stres, poput povišene ekspresije Hif-1 α u muškim te učinkovitiji antioksidativni kapacitet u ženskim staničnim linijama (25). Pokazano je i kako gubitak Sirt3 ženske MEFOve čini osjetljivijima na genotoksični stres u usporedbi s muškim staničnim linijama (31). Osim toga, poznato je da Sirt3 igra ključnu ulogu u regulaciji metabolizma, kao i da uzrokuje različite metaboličke odgovore stanica jetre muških i ženskih miševa nakon što su hranjeni prehranom bogatom mastima (19, 22). Ovo je istraživanje provedeno polazeći od navedenih spoznaja, a s ciljem ispitivanja uloge Sirt3 u spolno specifičnoj regulaciji metaboličkog odgovora adipocita u uvjetima prehranbenog stresa uzrokovanog zapadnjačkom dijetom. Naglasak je stavljen na ulogu Sirt3 na adipogenezu, metabolizam lipida i funkciju mitohondrija.

Otprije poznato ograničenje korištenog staničnog sustava (adipogeno diferencirani MEF-ovi) je njegova neizbježna heterogenost, odnosno da je dobivena stanična populacija stanica sastavljena od diferenciranih adipocita i nediferenciranih MEFOva (32). Obzirom da je cilj ovog istraživanja bio ispitati učinke Sirt3 i spola na adipocitima diferenciranim iz MEFOva u istim uvjetima diferencijacije, osiguran je valjan pristup ispitivanju tih učinaka, uz pretpostavku da je omjer diferenciranih i nediferenciranih stanica podjednak u svim skupinama. Nadalje, kod ispitivanja procesa karakterističnih za adipocite analizom ekspresije pojedinih gena i proteina, dobiveni su rezultati normalizirani prema markeru specifičnom za adipocite, Plin-1. Spomenuti protein sudjeluje u regulaciji katabolizma lipida kontrolirajući njihovo skladištenje i mobilizaciju (33). Na taj je način osigurano da dobiveni podatci odražavaju prvenstveno biologiju adipocita.

Uspješnost *in vitro* adipogene diferencijacije MEFOva potvrđena je značajno povišenom ekspresijom genskih markera *ppar- γ* , *fabp-4* i *adipoq* specifičnih za adipogenezu nakon sedam dana diferencijacije (34, 35). Gen *ppar- γ* kodira nuklearni receptor koji regulira adipogenezu i metabolizam lipida kontrolirajući ekspresiju gena uključenih u skladištenje masti. Radi se o ligandom aktiviranom transkripcijskom faktoru koji sudjeluje u regulaciji diferencijacije adipocita i homeostaze glukoze (36). Gen *fabp-4* specifičan je za adipocite. Posreduje u unutarstaničnom transportu dugolančanih masnih kiselina te regulira metabolizam lipida (37). Gen *adipoq* kodira

hormon adiponektin kojeg izlučuju adipociti, a koji povećava osjetljivost na inzulin, regulira metabolizam glukoze te ima ulogu u detekciji oksidativnog stresa (38). Ti su diferencirani adipociti u toj fazi zreli i funkcionalni, iako ne prolaze kroz značajnu akumulaciju lipida.

Ekspresija sva tri genska markera bila je viša u KO staničnim linijama oba spola, pri čemu su ženske stanice pokazivale izraženiju ekspresiju od muških. Morfološka usporedba stanica nakon bojanja bojom ORO, kao i spektrofotometrijska kvantifikacija boje ORO ekstrahirane iz stanica pokazuju obrazac jednak genskoj ekspresiji *ppar-γ*, *fabp-4* i *adipoq*. Drugim riječima, uočen je uzorak izraženije adipogeneze i lipogeneze kod KO adipocita općenito, s naglašenijim učinkom u ženskim adipocitima. Ovi rezultati upućuju na to da nedostatak Sirt3 povećava ekspresiju gena uključenih u adipogenezu, odnosno da Sirt3 djeluje kao negativni regulator diferencijacije adipocita i nakupljanja lipida, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (39, 40). Osim toga, postoje naznake da je mehanizam kojim Sirt3 ima takav utjecaj različit u muškim i ženskim adipocitnim stanicama.

Nedostatak Sirt3 u adipocitima oba spola rezultirao je povećanim brojem lipidnih kapljica, što sugerira da gubitak Sirt3 povećava osjetljivost stanica na njihovo formiranje i nakupljanje lipida, opet u skladu s ranijim istraživanjima (39, 40). Ipak, opažene su jasne razlike između spolova u prosječnoj veličini i ukupnoj površini formiranih lipidnih kapljica. Dok je kod ženskih KO adipocita došlo do povećanja prosječne veličine lipidnih kapljica bez obzira na tretman ZD-om, kod muških adipocita to nije bio slučaj. S druge strane, kod muških je adipocita povećanje ukupne površine lipidnih kapljica bilo vidljivo nakon tretmana ZD-om bez obzira na genotip, dok je kod ženskih adipocita takva promjena bila vidljiva isključivo u KO stanicama. Ovi nalazi upućuju na spolno specifičan utjecaj Sirt3 na regulaciju lipogeneze i dinamiku lipidnih kapljica, pri čemu gubitak Sirt3 u ženskim adipocitima posebno pogoduje povećanju njihove prosječne veličine

Prehrambeni suvišak uzrokovan ZD-om u Sirt3 WT stanicama popraćen je povećanom razinom ekspresije *Ppar-γ*, *Acc-1* u ženskim adipocitima i *Fasn* u muškim adipocitima. *Acc-1* karboksilacijom acetil-CoA katalizira sintezu malonil-CoA, kojeg *Fasn* potom koristi kao osnovnu građevnu jedinicu u biosintezi masnih kiselina (41, 42). Ovakav je rezultat u skladu s dosadašnjim saznanjima prema kojima prekomjeran unos hranjivih tvari uzrokuje povećanu ekspresiju stanične enzimske mašinerije koja sudjeluje u pohrani energije u obliku lipida (43).

U istim je stanicama zabilježen i porast razine Atgl, enzima ključnog u oslobađanju masnih kiselina iz triacilglicerola tijekom lipolize, koje se potom koriste za proizvodnju energije putem β -oksidacije. Regulacija ekspresije Atgl u stanici važna je za održavanje ravnoteže između mobilizacije i pohrane lipida. Ovakav porast upućuje na postojanje mehanizma prilagodbe adipocita na uvjete prehranbenog viška povećanom mobilizacijom lipida (44). Porast razine Atgl nije uočen u Sirt3 KO adipocitima, bez obzira na spol, što ukazuje na povezanost Sirt3 s aktivnošću Atgl u kompenzatornoj mobilizaciji lipida, neovisno o spolu.

Ekspresija gena *ppar- γ* je nakon tretmana ZD-om u WT stanicama oba spola ostala je otprilike jednaka u odnosu na stanje prije tretmana, dok je u KO stanicama oba spola doživjela značajni pad. Međutim, ekspresija proteina Ppar- γ se ne podudara u potpunosti s ekspresijom gena *ppar- γ* : u muškim KO adipocitima je ona nakon tretmana bila povećana, dok je u ženskim KO adipocitima nakon tretmana bila smanjena. Ovakav obrazac ekspresije upućuje na moguće postojanje posttranskripcijskih spolno specifičnih mehanizama regulacije Ppar- γ transkripta, koji bi mogli uključivati aktivaciju transkripta pomoću Sirt3 kod ženki (45). Zanimljivo je da je u WT stanicama ekspresija proteina Ppar- γ obrnuta, odnosno i prije i nakon tretmana ZD-om je kod ženki veća nego mužjaka, što još jednom sugerira da i spol i Sirt3 reguliraju njegovu aktivnost.

AMPK je enzim koji funkcionira kao metabolički energetska senzor i fosforilacijom raznih proteina regulira metaboličke i proliferativne stanične procese. Aktivira se fosforilacijom te se njegov aktivni oblik označava kao pAMPK (46). Jedan od njegovih aktivatora je Adipoq (47). pAMPK fosforilacijom inhibira rad Acc-1, smanjujući proizvodnju malonil-CoA. Smanjenjem razine malonil-CoA prestaje inhibicija Cpt-1, koji aktivirane masne kiseline prenosi u mitohondrij omogućujući nizvodne reakcije β -oksidacije masnih kiselina (48, 49). Ovim putem pAMPK inhibira lipogenezu, a potiče lipolizu (49). Smanjena ekspresija Adipoq, pAMPK i Cpt-1, uz istovremeno povećanje ekspresije Acc-1 u ženskim KO adipocitima nakon tretmana ZD-om ukazuje na aktivnost suprotnog metaboličkog puta. U tim stanicama nedostatak Adipoq dovodi do smanjene količine pAMPK, što omogućuje da Acc-1 ostane aktivna. Posljedično, povećana razina malonil-CoA inhibira Cpt-1, a time i lipolizu u obliku β -oksidacije masnih kiselina. Ovakvi rezultati, zajedno s ranijim *in vivo* nalazima, upućuju na to da masna prehrana kod jedinki ženskog spola kojima nedostaje Sirt3 dovodi do smanjene mitohondrijske respiracije i pojačane lipogeneze (22).

Zanimljivo je da je razina Acc-1 povišena nakon tretmana ZD-om u ženskim stanicama oba genotipa, što upućuje na postojanje spolno specifične regulacije ovog enzima u uvjetima prehrambenog viška (50). S druge strane, kod muških je adipocita oba genotipa nakon tretmana ZD-om povišena razina enzima Fasn, koji je kao i Acc-1 dio biosintetskog puta masnih kiselina (41, 42). Drugim riječima, povećana lipogeneza uzrokovana tretmanom ZD-om ostvarena je povećanjem ekspresije različitih enzima istog biosintetskog puta ovisno o spolu.

Smanjena razina Cpt-1 prisutna kod svih KO staničnih linija neovisno o spolu i tretmanu, može se djelomično pripisati nedostatku Sirt3 koji djeluje kao aktivator ovog enzima (51).

Razina Hadhb u ženskim WT adipocitima niža je u odnosu na ženske KO adipocite neovisno o tretmanu. Njegova se razina nakon tretmana ZD-om kod ženskih WT adipocita dodatno smanjila, dok kod ženskih KO adipocita nije došlo do značajne promjene. Budući da Hadhb sudjeluje u β -oksidaciji masnih kiselina, njegova povišena razina u ženskim KO adipocitima može predstavljati pokušaj kompenzacije prekomjernog nakupljanja lipida (52). U muškim adipocitima ovakva promjena nije vidljiva, bez obzira na genotip i tretman, što upućuje na spolnu specifičnost u aktivaciji ovog enzima. Poznato je da Hadhb interagira s estrogenskim receptorom α u mitohondriju, što sugerira da bi njihova interakcija mogla imati važnu ulogu u regulaciji lipidnog metabolizma estrogenom kod ženki (52).

Iako PLS-DA analizom utvrđeno kako su 1-monopalmitin i glicerol monostearat među najznačajnijim metabolitima za razdvajanje skupina u kontrolnim uvjetima, detaljnijom statističkom analizom nisu primijećene specifične razlike između skupina koje bi omogućile diskutiranje promjena u metabolizmu lipida.

Fosfatni ion igra ključnu ulogu u staničnom energetske metabolizmu, a oslobađa se hidrolizom ATP-a, glavne energetske valute stanice (53). Trostrukom protonacijom fosfatnog iona nastaje fosforna kiselina (54). Povišene razine fosforne kiseline u muškoj KO staničnoj liniji u kontrolnim uvjetima mogu biti posljedica pojačanog oksidativnog stresa uzrokovanog mitohondrijskim ROS, čije štetne učinke u WT stanicama ublažava Sirt3 (55). Moguće je da nedostatak Sirt3 povećava energetske potrošnje, što se očituje povećanom razinom fosforne kiseline nastale iz fosfatnih iona, kako bi se aktivirali drugi enzimi uključeni u obranu od oksidacijskog stresa.

U uvjetima metaboličkog stresa stanice mogu usmjeravati metabolizam prema povećanoj razgradnji proteina, što pak može dovesti do nakupljanja glutamata, proteinogene aminokiseline koja nastaje ionizacijom glutaminske kiseline (56, 57). Povišena razina glutamata također može signalizirati poremećaje u ciklusu limunske kiseline ili ukazivati na mitohondrijsku disfunkciju (59). Budući da je Sirt3 važan mitohondrijski protein, njegov nedostatak u KO staničnoj liniji može pridonijeti mitohondrijskoj disfunkciji, što može objasniti akumulaciju glutamata (19). Nadalje, glutamat sudjeluje i u ciklusu γ -glutamila, zajedno s L-5-oksoprolinom, ključnim intermedijerom tog ciklusa u kojem se odvija sinteza i razgradnja glutathiona (58). Glutathion je stanični antioksidans koji štiti stanice od oksidativnog stresa i održava njihov redoks status (59). Povećane koncentracije L-5-oksoprolina mogu biti uzrokovane povećanim obrtajem glutathiona te ukazivati na oksidativni stres ili poremećaje u ciklusu γ -glutamila. Budući da su antioksidativni enzimi poznate mete deacetilacije i aktivacije pomoću Sirt3, njegov nedostatak može smanjiti njihovu učinkovitost, pa stanica mora pronaći drugi način obrane protiv oksidativnog stresa, primjerice povećanom upotrebom glutathiona (19).

Za detaljniju analizu specifičnih molekulskih puteva u koje su uključene navedene skupine spojeva detektirane pomoću LC-MS, potrebno je provesti dodatna istraživanja u kojima bi se potvrdilo o kojim se točno metabolitima radi i koje su njihove međusobne interakcije.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu pokazan je zajednički učinak Sirt3 i spola u regulaciji lipidnog metabolizma u adipocitima u uvjetima nutritivnog stresa uzrokovanog zapadnjačkom dijetom.

Sirt3 igra ključnu ulogu u regulaciji metabolizma adipogeno diferenciranih MEFova i pokazuje spolno specifične učinke u prilagodbi stanica na prehrambeni stres izazvan zapadnjačkom dijetom.

Sirt3 negativno utječe na adipogenu diferencijaciju MEFova, pri čemu je taj učinak izraženiji u ženskim nego u muškim adipocitima. Osim toga, sudjeluje u prilagodbi adipocita na prehrambeni suvišak povećanjem lipolize putem aktivacije Atgl neovisno o spolu.

Aktivnost Ppar- γ modulirana je pomoću Sirt3, pri čemu Sirt3 smanjuje ekspresiju ovog proteina u muškoj staničnoj liniji, dok je u ženskoj potiče. Kako je razina genske ekspresije nakon tretmana zapadnjačkom dijetom slična u oba spola, regulacija Ppar- γ vjerojatno se odvija na posttranskripcijskoj razini.

Aktivacijom Adipoq, Sirt3 posredno aktivira pAMPK, što dovodi do inhibicije Acc-1 i aktivacije Cpt-1 čime se potiče lipoliza u uvjetima prehrambenog suviška. Kod ženskih stanica kojima nedostaje Sirt3 opažen je kompenzacijski mehanizam u obliku povećane ekspresije Hadhb, koji je spolno specifičan jer se ne javlja u muškim stanicama istog genotipa.

Povećana lipogeneza u uvjetima zapadnjačke dijetе ostvaruje se kroz povišenu ekspresiju Acc-1 kod ženske stanične linije, dok se kod muške povećava ekspresija Fasn, neovisno o genotipu. Drugim riječima, povećanje stope lipogeneze pokazuje spolnu specifičnost, pri čemu se aktiviraju različiti enzimi istog biosintetskog puta ovisno o spolu.

Sirt3 negativno regulira nastanak lipidnih kapljica neovisno o spolu, dok na njihovu morfologiju djeluje spolno specifično povećavajući prosječnu veličinu lipidnih kapljica kod ženskih, a ukupnu površinu kod muških staničnih linija.

Nedostatak Sirt3 smanjuje ekspresiju Cpt-1 narušavajući funkcionalnu mitohondrijsku oksidaciju masnih kiselina. Osim toga, dovodi do oksidativnog stresa i poremećaja antioksidativnih puteva u adipogeno diferenciranim MEF-ovima. Uzrokuje povišenu razinu fosforne kiseline u muškim

stanicama, koja potvrđuje spolno specifičnu potrebu za dodatnim adaptivnim odgovorom na ROS uzrokovane nedostatkom Sirt3.

Ovim je istraživanjem pokazano kako Sirt3 djeluje kao ključni negativni regulator lipogeneze i čuvar mitohondrijske funkcije, a njegov gubitak uzrokuje spolno specifične metaboličke promjene. Ženske su stanične linije osjetljivije na posljedice nedostatka Sirt3 od muških, što naglašava važnost uključivanja spola u buduća istraživanja metabolizma.

7. ZAHVALA

Neizmjereno zahvaljujem mentorici dr. sc. Sandri Sobočanec na ukazanom povjerenju i kontinuiranoj pomoći koju mi je pružila tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem i dr. sc. Kate Šešelja, dr. sc. Eni Šimunić te tehničarki Ivi Pešun Međimorec za sve odgovore na moja pitanja i za sve što su me naučile.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ingi Urlić na pruženoj prilici i podršci tijekom izrade ovog rada.

Svim članovima Laboratorija za metabolizam i starenje zahvaljujem na prihvaćanju u njihovu radnu zajednicu i izvrsnoj radnoj atmosferi.

Posebno zahvaljujem voditelju Laboratorija za metabolizam i starenje, dr. sc. Tihomiru Balogu, koji je omogućio da se dio eksperimentalnog rada provede u njegovom laboratoriju.

8. LITERATURA

1. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske. *Akcijski plan za prevenciju debljine 2024.–2027.* 2024 [citirano 23. kolovoza 2025.]. Dostupno na: <https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/2024%20Objave/AP%20za%20prevenciju%20debljine%202024.-%202027..pdf>
2. Svjetska zdravstvena organizacija. *Obesity and overweight* [Internet]. 2025 [citirano 23. kolovoza 2025.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
3. Eurostat. *Overweight and obesity – BMI statistics*. Statistics Explained [Internet]. 2024 [citirano 23. kolovoza 2025.]. Dostupno na: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Overweight_and_obesity_-_BMI_statistics
4. Musić Milanović S, Lang Morović M, Bukal D, Križan H, Buoncristiano M, Breda J. Regional and sociodemographic determinants of the prevalence of overweight and obesity in children aged 7-9 years in Croatia. *Acta Clin Croat.* 2020;59(2):303–311. doi: 10.20471/acc.2020.59.02.14.
5. Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021; 12:706978. doi: 10.3389/fendo.2021.706978.
6. Clemente-Suárez VJ, Beltrán-Velasco AI, Redondo-Flórez L, Martín-Rodríguez A, Tornero-Aguilera JF. Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review. *Nutrients.* 2023;15(12):2749. doi: 10.3390/nu15122749.
7. Kopp W. How Western Diet and Lifestyle Drive the Pandemic of Obesity and Civilization Diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019;12:2221–2236. doi: 10.2147/DMSO.S216791.
8. Juul F, Martinez-Steele E, Parekh N, Monteiro CA. The role of ultra-processed food in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2025;21(7):413–428. doi: 10.1038/s41574-025-01143-7.
9. Muscogiuri G, Barrea L, Annunziata G, Di Somma C, Laudisio D, Colao A i sur. Obesity and sleep disturbance: the chicken or the egg? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(13):2158–2165. doi: 10.1080/10408398.2018.1506979.
10. Silveira EA, Mendonça CR, Delpino FM, Elias Souza GV, Pereira de Souza Rosa L, de Oliveira C i sur. Sedentary behavior, physical inactivity, abdominal obesity and obesity in adults and older adults: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr ESPEN.* 2022; 50:63–73. doi: 10.1016/j.clnesp.2022.06.001.

11. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol.* 2016;231(3): R77–R99. doi: 10.1530/JOE-16-0211.
12. Enerbäck S. Human Brown Adipose Tissue. *Cell Metab.* 2010;11(4):248–252. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.008.
13. Smith U, Kahn BB. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J Intern Med.* 2016;280(5):465–475. doi: 10.1111/joim.12540.
14. Reyes-Farias M, Fos-Domenech J, Serra D, Herrero L, Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol.* 2021; 192:114723. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114723.
15. Karastergiou K, Smith SR, Greenberg AS, Fried SK. Sex differences in human adipose tissues – the biology of pear shape. *Biol Sex Differ.* 2012;3(1):13. doi: 10.1186/2042-6410-3-13.
16. Lizcano F, Guzmán G. Estrogen deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:757461. doi: 10.1155/2014/757461.
17. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007;404(1):1–13. doi: 10.1042/BJ20070140.
18. Hebert AS, Dittenhafer-Reed KE, Yu W, Bailey DJ, Selen ES, Boersma MD i sur. Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome. *Mol Cell.* 2013;49(1):186-199. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.024.
19. Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO i sur. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1479–1514. doi: 10.1152/physrev.00022.2011.
20. Iwahara T, Bonasio R, Narendra V, Reinberg D. SIRT3 functions in the nucleus in the control of stress-related gene expression. *Mol Cell Biol.* 2012;32(24):5022–5034. doi: 10.1128/MCB.00822-12.
21. Hallows WC, Yu W, Smith BC, Devries MK, Ellinger JJ, Someya S i sur. Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction. *Mol Cell.* 2011;41(2):139–149. doi: 10.1016/j.molcel.2011.01.002.

22. Pinterić M, Podgorski II, Popović Hadžija M, Tartaro Bujak I, Dekanić A i sur. Role of Sirt3 in Differential Sex-Related Responses to a High-Fat Diet in Mice. *Antioxidants* (Basel). 2020;9(2):174. doi: 10.3390/antiox9020174.
23. The Jackson Laboratory. Protokol 28225: Standard PCR Assay - Sirt3<tm1.1Fwa>. Version 2.2. [Internet]. Dostupno na: <https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=012755&protocolID=28225>
24. Durkin ME, Qian X, Popescu NC, Lowy DR. Isolation of Mouse Embryo Fibroblasts. *Bio Protoc*. 2013;3(18): e908. doi: 10.21769/bioprotoc.908.
25. Belužić R, Šimunić E, Podgorski II, Pinterić M, Popović Hadžija M, Balog T i sur. Gene Expression Profiling Reveals Fundamental Sex-Specific Differences in SIRT3-Mediated Redox and Metabolic Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2024;25(7):3868. doi: 10.3390/ijms25073868.
26. Al-Sayegh M, Ali H, Jamal MH, ElGindi M, Chanyong T, Al-Awadi K i sur. Mouse Embryonic Fibroblast Adipogenic Potential: A Comprehensive Transcriptome Analysis. *Adipocyte*. 2021;10(1):1–20. doi: 10.1080/21623945.2020.1859789.
27. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A i sur. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(5):830–840. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05733. x.
28. Garg E, Zubair M. Mass Spectrometer. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. [citirano 23. kolovoza 2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589702/>
29. Nikolac Perkovic M, Jaganjac M, Milković L, Horvat T, Rojo D, Zarković K i sur. Relationship between 4-Hydroxynonenal (4-HNE) as Systemic Biomarker of Lipid Peroxidation and Metabolomic Profiling of Patients with Prostate Cancer. *Biomolecules*. 2023;13(1):145. doi: 10.3390/biom13010145.
30. Xia J, Wishart DS. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016; 55:14.10.1–14.10.91. doi: 10.1002/cpbi.11.
31. Šimunić E, Podgorski II, Pinterić M, Popović Hadžija M, Belužić R, Paradžik M i sur. Sirtuin 3 drives sex-specific responses to age-related changes in mouse embryonic fibroblasts. *Mech Ageing Dev*. 2024; 222:111996. doi: 10.1016/j.mad.2024.111996.

32. Dastagir K, Reimers K, Lazaridis A, Jahn S, Maurer V, Strauß S i sur. Murine embryonic fibroblast cell lines differentiate into three mesenchymal lineages to different extents: new models to investigate differentiation processes. *Cell Reprogram*. 2014;16(4):241–252. doi: 10.1089/cell.2014.0005.
33. NCBI gen. *Mus musculus* Plin1, perilipin 1 [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2025. [citirano 24. kolovoza 2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=103968>
34. Munir H, Ward LSC, Sheriff L, Kemble S, Nayar S, Barone F i sur. Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Alters Their Immunomodulatory Properties in a Tissue-Specific Manner. *Stem Cells*. 2017;35(6):1636–1646. doi: 10.1002/stem.2622.
35. Alzaabi M, Khalili M, Sultana M, Al-Sayegh M. Transcriptional Dynamics and Key Regulators of Adipogenesis in Mouse Embryonic Stem Cells: Insights from Robust Rank Aggregation Analysis. *Int J Mol Sci*. 2024;25(17):9154. doi: 10.3390/ijms25179154.
36. NCBI gen. *Mus musculus* Pparg, peroxisome proliferator activated receptor gamma [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2025. [citirano 24. kolovoza 2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19016>
37. NCBI gen. *Mus musculus* Fabp4, fatty acid binding protein 4 [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2025. [citirano 24. kolovoza 2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=11770>
38. NCBI gen. *Mus musculus* Adipoq, adiponectin [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2025. [citirano 24. kolovoza 2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=11450>
39. Barroso E, Rodríguez-Rodríguez R, Zarei M, Pizarro-Degado J, Planavila A, Palomer X i sur. SIRT3 deficiency exacerbates fatty liver by attenuating the HIF1 α -LIPIN 1 pathway and increasing CD36 through Nrf2. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):129. doi: 10.1186/s12964-020-00640-8.
40. Chen T, Liu J, Li N, Wang S, Liu H, Li J i sur. Mouse SIRT3 attenuates hypertrophy-related lipid accumulation in the heart through the deacetylation of LCAD. *PLoS One*. 2015;10(3): e0118909. doi: 10.1371/journal.pone.0118909.
41. NCBI gen. *Mus musculus* Acaca, acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2025. [citirano 24. kolovoza 2025.].

Dostupno

na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=107476>

42. NCBI gen. *Mus musculus* Fasn, fatty acid synthase [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2025. [citirano 24. kolovoza 2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=14104>
43. Qiu H, Schlegel V. Impact of nutrient overload on metabolic homeostasis. *Nutr Rev*. 2018;76(9):693–707. doi: 10.1093/nutrit/nuy023.
44. Cerk IK, Wechselberger L, Oberer M. Adipose Triglyceride Lipase Regulation: An Overview. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19(2):221–233. doi: 10.2174/1389203718666170918160110.
45. Liu LX, Zheng XH, Hai JH, Zhang CM, Ti Y, Chen TS i sur. SIRT3 regulates cardiolipin biosynthesis in pressure overload-induced cardiac remodeling by PPAR γ -mediated mechanism. *PLoS One*. 2024;19(4):e0301990. doi: 10.1371/journal.pone.0301990.
46. Bizzi MF, Drummond JB, Pinheiro SVB, Paulino E, Araújo SA, Soares BS i sur. Activated AMP-protein kinase (pAMPK) is overexpressed in human somatotroph pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol*. 2024; 592:112318. doi: 10.1016/j.mce.2024.112318.
47. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S i sur. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8(10):1288–1295. doi: 10.1038/nm788.
48. Choi J, Smith DM, Scafidi S, Riddle RC, Wolfgang MJ. Carnitine palmitoyltransferase 1 facilitates fatty acid oxidation in a non-cell-autonomous manner. *Cell Rep*. 2024;43(12):115006. doi: 10.1016/j.celrep.2024.115006.
49. Jeon S, Park JE, Do YH, Santos R, Lee SM, Kim BN i sur. Atomoxetine and Fluoxetine Activate AMPK-ACC-CPT1 Pathway in Human SH-SY5Y and U-87 MG Cells. *Psychiatry Investig*. 2023;20(3):212–219. doi: 10.30773/pi.2022.0255.
50. González-Granillo M, Helguero LA, Alves E, Archer A, Savva C, Pedrelli M i sur. Sex-specific lipid molecular signatures in obesity-associated metabolic dysfunctions revealed by lipidomic characterization in ob/ob mouse. *Biol Sex Differ*. 2019;10(1):11. doi: 10.1186/s13293-019-0225-y.

51. Zhang Y, Wen P, Luo J, Ding H, Cao H, He W i sur. Sirtuin 3 regulates mitochondrial protein acetylation and metabolism in tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Cell Death Dis.* 2021;12(9):847. doi: 10.1038/s41419-021-04134-4.
52. NCBI gen. *Mus musculus* Hadhb, hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2025. [citirano 24. kolovoza 2025.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=231086>
53. Wagner CA. The basics of phosphate metabolism. *Nephrol Dial Transplant.* 2024;39(2):190–201. doi: 10.1093/ndt/gfad188.
54. Peacock M. Phosphate Metabolism in Health and Disease. *Calcif Tissue Int.* 2021;108(1):3–15. doi: 10.1007/s00223-020-00686-3.
55. Bell EL, Guarente L. The SirT3 Divining Rod Points to Oxidative Stress. *Mol Cell.* 2011;42(5):561–568. doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.008.
56. Flick K, Kaiser P. Protein Degradation and the Stress Response. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(5):515–522. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.01.019.
57. Levite M. Glutamate, T cells and multiple sclerosis. *J Neural Transm (Vienna).* 2017;124(7):775–798. doi: 10.1007/s00702-016-1661-z.
58. Bachhawat AK, Yadav S. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle. *IUBMB Life.* 2018;70(7):585–592. doi: 10.1002/iub.1756.
59. Averill-Bates DA. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm.* 2023; 121:109–141. doi: 10.1016/bs.vh.2022.09.002.

9. SAŽETAK

Petra Cindori

Učinak Sirtuina 3 u regulaciji lipidnog metabolizma adipocita pod utjecajem zapadnjačke dijeta ovisno o spolu

Pretilost, koja negativno utječe na zdravlje pojedinca povećavajući rizik razvoja brojnih drugih zdravstvenih poteškoća poput dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, nealkoholne masne bolesti jetre, astme, raznih tumora i depresije, sve je prisutnija u današnjem društvu. Neravnoteža u energetske unosu, potaknuta zapadnjačkom dijetom kao suvremenim načinom ljudske prehrane, može uzrokovati metaboličku disfunkciju povezanu s gubitkom funkcije Sirtuina 3 (Sirt3). Sirt3 je mitohondrijska deacetilaza i mono-ADP-riboziltransferaza s ključnom ulogom u regulaciji metabolizma lipida, čiji je spolno specifični učinak u staničnom odgovoru na stres poznat iz ranijih istraživanja. Diferencijacijom mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF) uspostavljene su stanične linije muških i ženskih WT i KO adipocita za gen *sirt3* koji kodira protein Sirt3. Analiza ekspresije gena uključenih u adipogenezu na adipogeno diferenciranim MEF-ovima pokazala je da Sirt3 djeluje kao njen negativni regulator u oba spola, s izraženijim učinkom kod ženskih stanica. Uspješno diferencirani adipociti tretirani su otopinama masnih kiselina u trajanju od šest sati simulirajući kratkoročne uvjete zapadnjačke dijeta, nakon čega je provedena analiza genske i proteinske ekspresije ključnih regulatora adipogeneze, lipogeneze i lipolize. Pokazano je da je ekspresija *Atgl* ovisna o prisutnosti Sirt3 neovisno o spolu, dok je ekspresija *Ppar-γ* bila uvjetovana genotipom i spolom. Pojačana lipogeneza zabilježena je u oba spola neovisno o genotipu, no ostvarena je povećanjem ekspresije različitih proteina istog biosintetskog puta: *Acc-1* kod ženskih, a *Fasn* kod muških adipocita, što upućuje na postojanje spolno specifičnih mehanizama regulacije ekspresije ovih proteina u uvjetima prehranbenog suviška. Potencijalno kompenzatorni mehanizam nedostatka Sirt3 povećanjem ekspresije *Hadhb* pokazuje spolno specifičnost jer je ostvaren samo u ženskim adipocitima. S druge strane, u muškim je adipocitima istog genotipa potaknuta aktivacija adaptivnog odgovora na povećanu razinu reaktivnih kisikovih spojeva kroz povišene razine L-glutaminske kiseline i L-5-oksoprolina. Potvrđen je spolno specifičan učinak Sirt3 na adipogenezu i lipogenezu adipocita, Ženski su adipociti osjetljiviji na posljedice nedostatka Sirt3, što naglašava važnost uključivanja spola u buduća istraživanja metabolizma.

Ključne riječi: mišji embrionalni fibroblasti, adipociti, Sirtuin 3, zapadnjačka dijeta, spolna specifičnost

10. SUMMARY

Petra Cindori

The effect of Sirtuin 3 in regulating adipocyte lipid metabolism under the influence of a western diet in a sex-dependent manner

Obesity, which negatively affects the health of an individual by increasing the risk of developing numerous conditions such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, non-alcoholic fatty liver disease, asthma, various tumors and depression, is becoming increasingly prevalent in today's society. Imbalance in energy intake, further enhanced by the Western diet as a modern way of human nutrition, can lead to metabolic dysfunction associated with the loss of Sirtuin 3 (Sirt3). Sirt3 is a mitochondrial deacetylase and mono-ADP-ribosyltransferase with a crucial role in lipid metabolism, whose sex-specific effects in the cellular stress responses have been described in earlier studies. By differentiating mouse embryonic fibroblasts (MEF), male and female WT and KO adipocyte cell lines for the *sirt3* gene encoding the Sirt3 protein were established. Analysis of the expression of genes related with adipogenesis in adipogenically differentiated MEFs revealed that Sirt3 acts as its negative regulator in both sexes, with a more pronounced effect in female cells. Successfully differentiated adipocytes were treated with fatty acid solutions for six hours to simulate short-term Western diet conditions, followed by gene and protein expression analysis of key regulators of adipogenesis, lipogenesis and lipolysis. The results showed that expression of *Atgl* was dependent on the presence of Sirt3 regardless of sex, whereas *Ppar-γ* expression was influenced by both genotype and sex. Enhanced lipogenesis was observed in both sexes independently of genotype, but it was mediated through the upregulations of different proteins within the same biosynthetic pathway: increased *Acc-1* expression in female and *Fasn* in male adipocytes, which points to the existence of sex-specific mechanisms regulating levels of these proteins under nutrient surplus conditions. Furthermore, the upregulation of *Hadhb* as a potential compensatory mechanism in the absence of Sirt3 was observed only in female adipocytes. In contrast, male adipocytes lacking Sirt3 activated an adaptive response to increased levels of reactive oxygen species, via heightened L-glutamic acid and L-5-oxoproline levels. Sex-specific effect of Sirt3 on adipogenesis and lipogenesis was confirmed. Female adipocytes exhibited a greater sensitivity to the consequences of Sirt3 deficiency, highlighting the importance of including sex as a biological variable in future metabolic research.

Key words: mouse embryonic fibroblasts, adipocytes, Sirtuin 3, Western diet, sex specificity