

Jagoda Drąg², Anna Goździalska^{1,2}, Anna Gawędzka³, Jerzy Jaśkiewicz^{1,2}

Nowe wskaźniki w patomechanizmie rozwoju otyłości — elongazy i desaturazy nienasyconych kwasów tłuszczowych

Abstract

Obesity is a disease caused by a disorder of energy homeostasis and is manifested as an excessive accumulation of fat. Almost all cases of obesity result from a combination of genetic predisposition and a chronic imbalance between energy intake, energy utilization for basic metabolic processes, and energy expenditure from physical activity. Obesity is a risk factor for major causes of death, including cardiovascular disease, numerous cancers, and diabetes, and is linked with markedly diminished life expectancy. Complications of obesity include metabolic syndrome. The metabolic syndrome is characterized by a group of metabolic risk factors such as abdominal obesity (excessive fat tissue in and around the abdomen), atherogenic dyslipidemia (high triglycerides, low HDL cholesterol and high LDL cholesterol) and elevated blood pressure.

The incidence of obesity has increased substantially in recent years and constantly growing number of obese patients necessitates the development of high requirements to reduce the impact of adverse health effects associated with metabolic syndrome. It is important therefore to examine the influence of nutrients, particularly fatty acids, in the development of obesity and metabolic syndrome.

The aim of our study was to determine the influence of the high-carbohydrate diet on hepatic gene expression for Elovl 2, Elovl 5, $\Delta 5$ desaturase, $\Delta 6$ desaturase, Scd1 and Scd2. We demonstrated that mRNA expression level of Elovl 5, $\Delta 5$ desaturase, $\Delta 6$ desaturase and Scd2 in liver of rats fed high-carbohydrate diet was similar to the levels of mRNA for the same enzymes in liver of animals fed standard diet. Statistically significant differences in the levels of mRNA expression were demonstrated for elongases 2 and SCD1 ($\Delta 9$ desaturase-isoform 1).

¹ Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych.

² Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydział Farmaceutyczny, Zakład Analityki Biochemicznej.

³ Akademia Wychowania Fizycznego, Zakład Farmakologii i Biofizyki.

Measuring gene expression of enzymes are not yet implemented as diagnostic markers of the changes, which are characteristic for obesity. The obtained results confirm the current theoretical assumptions that the study of mRNA expression of mentioned enzymes in the near future may be used as an analysis of diagnostically important for disease entities such as obesity and metabolic syndrome.

Key words: fatty acids, elongases, desaturases, metabolic syndrom, obesity

Otyłość to przewlekłe zaburzenie metabolizmu spowodowane głównie nadmierną podażą pokarmu w stosunku do zapotrzebowania energetycznego organizmu, skutkiem czego jest magazynowanie nadmiaru w postaci tkanki tłuszczowej. Prawie wszystkie przypadki występowania otyłości wynikają z połączenia uwarunkowań genetycznych oraz przewlekłego zaburzenia równowagi pomiędzy pozyskiwaniem nadmiaru energii z pożywienia, wykorzystania energii na podstawowe procesy przemiany materii, a także zużyciem energii podczas aktywności fizycznej. Otyłość jest czynnikiem ryzyka rozwoju chorób układu krążenia, licznych nowotworów i cukrzycy uznawanych za główne przyczyny zgonów, ponadto wiąże się ze znacznym skróceniem długości życia. W ostatnich latach częstość występowania otyłości znacznie wzrosła, stając się jedną z najbardziej znaczących kwestii zdrowia publicznego na całym świecie. W krajach rozwiniętych odsetek osób obciążonych otyłością i nadwagą wzrasta. Analogicznie sytuacja wygląda w Polsce. Problem dotyczy już prawie 40% populacji. Największym zagrożeniem obarczeni są mężczyźni, u których waga osiąga szybszy przyrost. Otyłość może prowadzić do rozwoju cukrzycy typu 2, nadciśnienia tętniczego oraz choroby niedokrwiennej serca. Wymienione zaburzenia wywołane są przez kompleks czynników ryzyka, które prowadzą do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, a ich współistnienie zostało nazwane zespołem metabolicznym (zespół polimetaboliczny, zespół X, zespół insulinoporności, zespół Raevena). Diagnostycznie rozpoznaje się to poprzez pomiar takich parametrów, jak cholesterol frakcji HDL, trójglicerydy, ciśnienie tętnicze, glikemia na czczo oraz obwód talii.

Stale zwiększająca się liczba chorych otyłych wymusza opracowanie wysokich wymagań, aby zmniejszyć wpływ negatywnych skutków dla zdrowia, związanych z zespołem metabolicznym. Istotne znaczenie ma zatem zbadanie wpływu składników odżywczych, w szczególności kwasów tłuszczowych, w rozwoju otyłości i zespołu metabolicznego [1–3].

Kwasy tłuszczowe występujące w organizmie człowieka są heterogenną grupą związków organicznych. Szczególną rolę w tworzeniu zmiennej puli kwasów tłuszczowych odgrywają kwasy nienasycone. Związki te są w części syntetyzowane w organizmie, a w części pochodzą z przyjmowanego pokarmu, gdzie stanowią niezbędny składnik diety. Kwasy tłuszczowe mogą następnie ulegać procesom wydłużania i desaturacji do długołańcuchowych nasyconych oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wspomniane torry przemian określane

są jako reakcje elongacji oraz reakcje desaturacji, katalizowane odpowiednio przez elongazy i desaturazy kwasów tłuszczowych. Aktywność tych enzymów jest regulowana przez dietę, hormony oraz czynniki transkrypcyjne.

Elongazy kwasów tłuszczowych występują w retikulum endoplazmatycznym komórki i dzielą się na dwie główne grupy. Pierwszą stanowią elongazy oznaczane jako ELOVL 1, 3 oraz 6 katalizujące wydłużanie nasyconych i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Drugą grupę stanowią elongazy 2 oraz 5 katalizujące elongację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. ELOVL 4, ze względu na specyfikę substratową, nie jest zaliczona do żadnej z wymienionych grup. Natomiast desaturazy kwasów tłuszczowych to enzymy wprowadzające podwójne wiązanie pomiędzy dwa atomy węgla w łańcuchu acylowym. Skutkiem tego procesu, nazywanego reakcją desaturacji jest powstanie nienasyconego wiązania. Desaturazy są obecne u większości organizmów, a u ssaków i ludzi występują jako acyloCoA desaturazy, do których należą $\Delta 5$, $\Delta 6$ oraz $\Delta 9$ desaturaza. Desaturazy kwasów tłuszczowych działają w błonie retikulum endoplazmatycznego i substratami dla tych enzymów są kwasy tłuszczowe przyłączone do koenzymu A (CoA). $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy katalizują syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które głównie są estryfikowane w fosfolipidach błonowych i odpowiadają za płynność błon biologicznych. $\Delta 9$ desaturaza – stearyloCoA desaturaza katalizuje syntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych [4–9].

Produktami katalizowanych przez wspomniane enzymy reakcji są kwasy tłuszczowe długołańcuchowe jedno- i wielonienasycone, które wchodziły w skład ogólnoustrojowej puli tych związków i są substratami niezbędnymi do syntezy lipidowych struktur składników błon biologicznych, a także substratów do syntezy aktywnych biologicznie ikozanoidów.

Zmiany ilościowe i jakościowe kwasów tłuszczowych są istotnym czynnikiem determinującym budowę i funkcję błon komórek. Z tego też powodu bliższe poznanie enzymów modyfikujących skład cząsteczek kwasów tłuszczowych może stanowić istotny czynnik diagnostyczny.

Otyłość stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia, wywołujące dodatkowe konsekwencje. Wśród osób otyłych stwierdza się częstsze, w porównaniu do osób z prawidłową masą ciała, występowanie chorób serca, takich jak zawał serca, zastoinowa niewydolność serca, nagły zgon sercowy, dławica piersiowa lub ból w klatce piersiowej oraz zaburzenia rytmu serca. Takie wskaźniki jak wysokie ciśnienie krwi oraz wysokie stężenie trójglicerydów, którym jednocześnie towarzyszy niskie stężenie cholesterolu HDL, częściej występują u osób otyłych. Zwiększenie masy ciała od 4 do 9 kg zwiększa dwukrotnie ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2, w porównaniu do osób, których masa ciała nie uległa zwiększeniu. Niepokojącym zjawiskiem jest obecność nadwagi u ponad 80% osób chorych na cukrzycę. Ponadto nadwaga i otyłość są związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju nowotworów, takich jak rak macicy, jelita grubego, pęcherzyka żółciowego, prostaty, nerki i postmenopauzalnego raka piersi. U osób

otyłych częściej stwierdza się bezdech senny oraz zwiększoną częstość występowania astmy. Ryzyko zachorowania na zapalenie stawów zwiększa się od 9 do 13% na każdy dodatkowy 1 kg zwiększenia wagi. U kobiet otyłość wiąże się z poważnymi problemami zdrowotnymi w okresie reprodukcyjnym. Należą do nich powikłania ciąży, zwiększone ryzyko rozwoju cukrzycy ciążowej, problemy z porodem oraz zwiększone ryzyko zgonu zarówno dziecka, jak i matki. Ponadto noworodki, których matki były otyłe w okresie ciąży, są bardziej narażone na wysoką wagę urodzeniową oraz na zwiększone ryzyko rozwoju wad wrodzonych, zwłaszcza neuronowych uszkodzeń cewy nerwowej, takich jak rozszczep kręgosłupa. Ponadto u osób otyłych stwierdza się zwiększone ryzyko rozwoju choroby pęcherzyka żółciowego oraz nietrzymania moczu. Ważnym aspektem życia osób otyłych, poza zdrowiem, jest obniżona jakość życia poprzez ograniczone możliwości poruszania się i zmniejszenie wytrzymałości fizycznej oraz powszechne zjawisko dyskryminacji społecznej, obecne w środowisku szkolnym i pracy [10–13].

Otyłość jest złożonym zaburzeniem, na którego rozwój mają wpływ dieta, rozwój osobniczy, wiek, aktywność fizyczna oraz predyspozycja genetyczna. Istotne znaczenie ma zatem zbadanie, przynajmniej wpływu składników odżywczych w rozwoju otyłości i zespołu metabolicznego. Liczne badania sugerują, że stopień nienasycenia kwasów tłuszczowych koreluje z wybranymi markerami otyłości np. BMI. Przyjmuje się że zmiana aktywności desaturaz, przede wszystkim $\Delta 9$ może być jednym z czynników patomechanizmu otyłości oraz zaburzeń związanych z tym stanem patogennym [14–16].

Celem badań było określenie zmian ekspresji mRNA dla elongazy 2 i 5 oraz $\Delta 5$, $\Delta 6$ oraz $\Delta 9$ desaturaz w diecie wysokowęglowodanowej w porównaniu z dietą standardową u zwierząt laboratoryjnych.

Dieta wysokowęglowodanowa powoduje wzrost glukozy we krwi, która konsekwentnie jest przekształcana w wątrobie w glikogen. Jednak jeśli poziom glukozy nadal jest wysoki, to nadwyżka zostaje przekształcona w trójglicerydy i w postaci VLDL przetransportowana z krwią do tkanki tłuszczowej, gdzie uwolnione trójglicerydy stanowią materiał zapasowy.

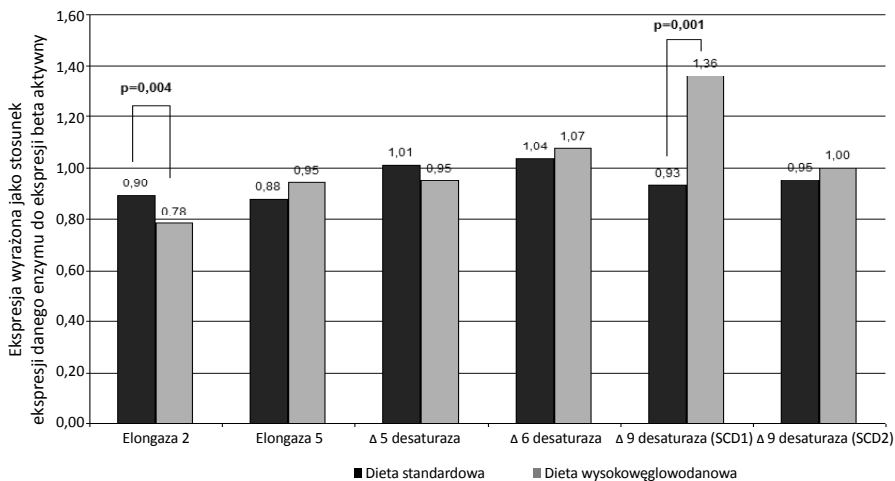
Współcześnie stosuje się liczne modele doświadczalne z udziałem zwierząt laboratoryjnych takich jak szczury i myszy, których celem jest wstępne badanie ekspresji różnych genów pod wpływem określonych czynników środowiskowych. W celu zbadania wpływu diety wysokowęglowodanowej na ekspresję mRNA dla wybranych elongaz i desaturaz, wykorzystano do badań szczury – samce rasy Wistar.

Wszystkie zwierzęta były traktowane zgodnie z zasadami Etyki Zwierząt Doświadczalnych, zaakceptowanej przez komisję do spraw opieki nad zwierzętami doświadczalnymi UJ Collegium Medicum.

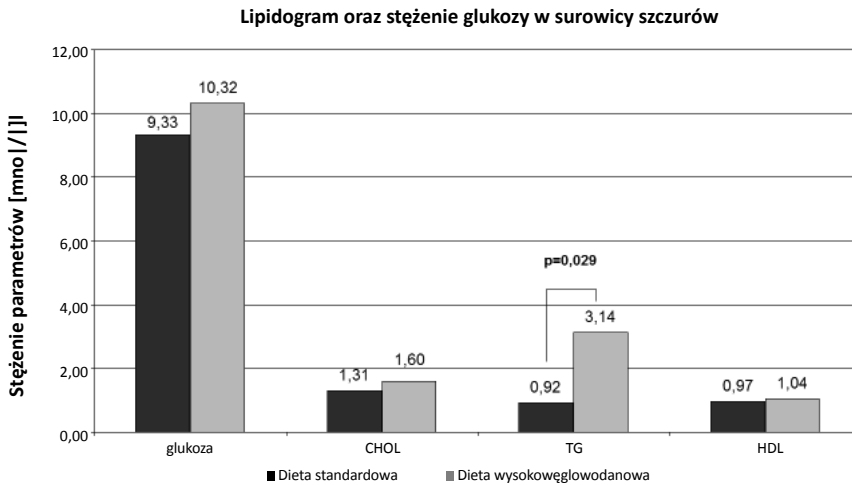
Badania prowadzone były w grupie 12 szczurów, samców rasy Wistar hodowanych w Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego OAM UJ CM. Klatki ze zwierzętami były umieszczone w pomieszczeniach Zwierzętarni, gdzie regulo-

wana była temperatura i wilgotność, a także rytm dnia i nocy. Przez cały okres hodowli zwierzęta miały wolny dostęp do wody i pożywienia. Do osiągnięcia wagi 150 g wszystkie zwierzęta żywione były dietą standardową. Następnie szczury zostały podzielone losowo na 2 grupy. Pierwsza grupa szczurów po osiągnięciu wagi 150 g była karmiona przez okres czterech tygodni dietą standardową (grupa kontrolna), natomiast zwierzęta grupy drugiej (grupa badana) przez okres czterech tygodni były karmione dietą wysokowęglowodanową. Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta poddano terminacji, pobrano krew z żyły udowej, a następnie pobraną tkankę wątrobową zamrożono techniką *freeze clamp*. Izolację RNA z badanej tkanki wykonano zmodyfikowaną techniką Chomczyńskiego z użyciem komercyjnych odczynników. Techniką RT-PCR wykonano oznaczenia poziomu ekspresji mRNA dla wybranych elongaz i desaturaz. Dla każdego enzymu zostały zastosowane specyficzne primery, które zostały wyszukane w programie Primer3 (v. 0.4.0) po uprzednim podaniu sekwencji mRNA poszczególnych genów. Po zakończeniu reakcji PCR próbki zostały poddane elektroforetycznemu rozdzielaniu w żelu agarozowym (1,5% roztwór agarozy w 0,5 M buforze TBE). Po elektroforezie zostały zrobione zdjęcia żeli, które następnie poddano analizie densytometrycznej. Gęstość densytometryczna prążków została odczytana przy użyciu programu Quantity One (BioRad), a uzyskane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem programu Statistica 8. W surowicy krwi zwierząt oznaczono stężenie glukozy, a także trójglicerydów, cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu frakcji HDL, przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów do analiz.

Rycina 1. Wartość ekspresji mRNA dla wybranych elongaz i desaturaz. Pozom ekspresji wyrażony jest jako stosunek ekspresji wybranego enzymu do ekspresji β -aktyny (gen reporterowy)



Rycina 2. Wartości stężeń dla wybranych parametrów biochemicznych oznaczonych w surowicy krwi szczurów



Zaobserwowano podobny poziom ekspresji mRNA dla elongazy 5, $\Delta 5$ desaturazy, $\Delta 6$ desaturazy oraz SCD2 ($\Delta 9$ desaturaza-izofорма 2) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową oraz w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową. Różnice wartości w poziomach ekspresji mRNA wykazano dla elongazy 2 i SCD1 ($\Delta 9$ desaturaza-izofорма 1). Różnice te były znamienne statystycznie. Stwierdzono niższy poziom ekspresji mRNA dla elongazy 2 w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową w porównaniu do ekspresji mRNA dla tego enzymu w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową oraz wyższy poziom ekspresji dla SCD1 w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową w porównaniu do ekspresji mRNA dla tego enzymu w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową. W surowicy krwi uzyskano podobne stężenia dla glukozy, cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu frakcji HDL. Stwierdzono różnicę znamiennej statystycznie w stężeniu trójglicerydów (TG). Stężenie TG było znacznie wyższe w surowicy krwi szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową w porównaniu do szczurów karmionych dietą standardową.

Podobny poziom stężeń glukozy w surowicy pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną, może tłumaczyć brak różnic w poziomach transkryptów dla elongazy 5, $\Delta 5$ desaturazy, $\Delta 6$ desaturazy oraz SCD2. Wiadomo, że ekspresja tych enzymów jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne, takie jak białka wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole (*sterol regulatory element-binding proteins* – SREBP) i receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (*peroxisome proliferator-activated receptors* – PPAR), których aktywność jest zależna od insuliny.

Oprócz działania czynnika transkrypcyjnego SREBP znana jest również regulacja poprzez białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany (*carbohydrate-responsive element-binding protein* – ChREBP), która dotyczy jedynie genu dla *scd1*. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że zwiększona podaż glukozy prowadzi do zmian metabolicznych, które aktywują ChREBP i ostatecznie transkrypcję *scd1*.

Dieta wysokowęglowodanowa powoduje wzrost syntezy kwasów jednonienasyconych, głównych składowych trójglicerydów, które transportowane z krwią (stąd wysoki poziom TG we krwi), są następnie gromadzone w tkance tłuszczowej. Głównymi produktami reakcji katalizowanej przez SCD1 jest kwas palmitoolejowy oraz olejowy. Te dwa kwasy stanowią ponad 50% wszystkich kwasów tłuszczowych zawartych w trójglicerydach w tkance tłuszczowej.

Uzyskane wyniki mogą sugerować, że badanie ekspresji mRNA dla SCD1 może być wykorzystane wraz z badaniami biochemicznymi krwi do poszerzenia badań diagnostycznych w kierunku otyłości.

Otyłość wraz z zespołem metabolicznym to choroby cywilizacyjne stąd szczególnie istotne staje się poszukiwanie nowych miejsc targetowych dla działania środków farmakologicznych.

Paradoksalnie geny, które kiedyś predysponowały człowieka jako istoty o wysokim poziomie adaptacyjności, stały się obecnie powodem chorób cywilizacyjnych.

Bibliografia

- [1] Wyrzykowski B., *Zespół metaboliczny – rozpoznawanie i leczenie*, Alfa Medica Press, Bielsko-Biała 2006, s. 27.
- [2] Zdrojewski T., Bandosz P., Szpakowski P., Konarski R., Manikowski A., Wołkiewicz E., Jakubowski Z., Łysiak-Szydłowska W., Bautembach S., Wyrzykowski B., *Rozpowszechnienie głównych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego w Polsce. Wyniki badania NATPOL PLUS*, „Kardiologia Polska” 2004, t. 61 (supl. IV), s. IV1–IV26.
- [3] Grundy S.M., Brewer H.B., Cleeman J.I., Smith S.C., Lenfant C., *Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute / American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition*, „Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology” 2004, Vol. 2, s. 13–18.
- [4] Jakobsson A., Westerberg R., Jacobsson A., *Fatty Acid Elongases in Mammals: Their Regulation and Roles in Metabolism*, „Progress in Lipid Research” 2006, Vol. 45, s. 237–249.
- [5] Wang Y., Botolin D., Christian B., Busik J., Xu J., Jump D.B., *Tissue-specific, Nutritional, and Developmental Regulation of Rat Fatty Acid Elongases*, „The Journal of Lipid Research” 2005, Vol. 46, s. 706–715.
- [6] Leonard A.E., Pereira S.L., Sprecher H., Yung-Sheng H., *Elongation of Long-chain Fatty Acids*, „Progress in Lipid Research” 2004, Vol. 43, s. 36–54.

- [7] Nakamura M.T., Nara T.Y., *Structure, Function, and Dietary Regulation of Delta6, Delta5, and Delta9 Desaturases*, „Annual Review of Nutrition” 2004, Vol. 24, s. 345–376.
- [8] De Antueno R.J., Knickle L.C., Smith H., Elliot M.L., Allen S.J., Nwaka S., Winther M.D., *Activity of Human Delta5 and Delta6 Desaturases on Multiple n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids*, „FEBS Letters” 2001, Nov. 30, Vol. 509, Issue 1, s. 77–80.
- [9] Pereira S.L., Leonard A.E., Mukerji P., *Recent Advances in the Study of Fatty Acid Desaturases from Animals and Lower Eukaryotes*, „Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids” 2003, Vol. 68, s. 97–106 (Review).
- [10] Horwich T.B., Fonarow G.C., *Glucose, Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes: Relevance to Incidence of Heart Failure*, „Journal of the American College of Cardiology” 2010, Vol. 55, s. 283–293.
- [11] Bray G.A., *Obesity: Special Feature. Medical Consequences of Obesity*, „Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism” 2004, Vol. 89, s. 2583–2589.
- [12] Wilborn C., Beckham J., Campbell B., Harvey T., Galbreath M., La Bounty P., Nassar E., Wismann J., Kreider R., *Obesity: Prevalence, Theories, Medical Consequences, Management, and Research Directions*, „Journal of the International Society of Sports Nutrition” 2005, Vol. 2, s. 4–31.
- [13] Bray G.A., Clearfield M.B., Fintel D.J., Nelinson D.S., *Overweight and Obesity: The Pathogenesis of Cardiometabolic Risk*, „Clinical Cornerstone” 2009, Vol. 9, s. 30–40.
- [14] Popeijus H.E., Saris W.H., Mensink R.P., *Role of Stearoyl-CoA Desaturases in Obesity and the Metabolic Syndrome*, „International Journal of Obesity” 2008, Vol. 32, No. 7, s. 1076–1082.
- [15] Flowers M.T., Ntambi J.M., *Stearoyl-CoA Desaturase and its Relation to High-carbohydrate Diets and Obesity*, „Biochimica et Biophysica Acta” 2009, Vol. 1791, No. 2, s. 85–91. Review.
- [16] Shanmugam M. Jeyakumar, Pratti Lopamudra, Suryaprakash Padmini, Nagalla Balakrishna, Nappan V. Giridharan, Ayyalasomayajula Vajreswari, *Fatty Acid Desaturation Index Correlates with Body Mass and Adiposity Indices of Obesity in Wistar NIN Obese Mutant Rat Strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob*, „Nutrition & Metabolism” 2009, Vol. 6, s. 27.