

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Kamili Stepanow, pt. „**Wpływ diety o zróżnicowanej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6/omega-3 na profil proteomiczny i metabolizm wątroby myszy**”.

Streszczenie

W wielu krajach występuje wzrost spożywania produktów bogatych w nasycone kwasy tłuszczowe (NKT) oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe $n-6$, przy jednocześnie niskim spożyciu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych $n-3$. W konsekwencji stosunek kwasów tłuszczowych $n-6$ do $n-3$ w tej diecie może osiągać 10:1 – 20:1. Stosunek tych dwóch grup WNKT odgrywa istotną rolę ze względu na odmienne działanie ich pochodnych - metabolity kwasów $n-6$ wykazują większe właściwości prozapalne, natomiast kwasów $n-3$ właściwości wygaszające proces zapalny.

Celem projektu było określenie wpływu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych $n-3$ i $n-6$ w diecie na zmiany w profilu białkowym wątroby myszy w zależności od czasu trwania diety - 3 i 6 miesięcy, jak również identyfikacja kluczowych białek funkcjonalnych na podstawie kompleksowej charakterystyki zmian w profilach białkowych wątroby.

W doświadczeniu wykorzystano 64 samców Swiss Webster. Zwierzęta w wieku około 2 miesięcy zostały podzielone na 8 grup żywieniowych ($n=8$). Grupę STD karmiono mieszanką paszową pełnoporcjową dla zwierząt laboratoryjnych hodowlanych - Labofeed H o niskiej zawartości tłuszczu (2%). Pozostałe grupy karmione były paszą o wysokiej zawartości tłuszczu, około 22%. Grupę kontrolną NKT stanowiła pasza Labofeed H z dodatkiem oleju kokosowego otrzymując w ten sposób dietę o wysokiej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych (NKT) i niskiej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT). Grupy doświadczalne były karmione mieszanką paszy Labofeed H z dodatkiem olejów roślinnych o wysokim poziomie WNKT, różniące się stosunkiem kwasu linolowego $18:2n-6$ do α -linolenowego $18:3n-3$ (LA/ALA) wynoszącymi 13,76:1 (grupa 14:1) oraz 5,00:1 (grupa 5:1). Wszystkie grupy otrzymywały pasze *ab libitum*, ze stałym dostępem do świeżej wody. Doświadczenie było prowadzone w dwóch przedziałach czasowych: 3 i 6 miesięcy, po których następnie pobrano wątrobę i krew.

Ekstrakty białkowe wątrób 64 myszy podzielonych na 8 grup żywieniowych ($n=8$) rozdzielono techniką elektroforezy dwukierunkowej (2DE) w dwóch powtórzeniach technicznych. Pierwszy kierunek wykonano w nieliniowym zakresie pH 3-10 (17 cm), a drugi

kierunek na 12% żelu SDS-PAGE (18 cm x 20 cm x 1,00 mm). Analizę 128 obrazów żeli 2DE wykonano w programie PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Ilość spotów na 128 żelach mieściła się w zakresie od 861 do 1071 spotów, ze średnią ilością około 965 spotów na jednym żelu. Ilość spotów dopasowanych we wszystkich żelach wynosiła 510. Współczynnik zmienności dla poszczególnych grup mieścił się w zakresie od 42,04% do 48,33%. Spośród 510 spotów białkowych wykorzystanych w modelu regresji wielorakiej, istotnie statystycznie różnice relatywnej koncentracji w obrębie czasu diety pomiędzy grupami żywieniowymi wykazały 183 spoty. Z użyciem spektrometru mas MALDI TOF/TOF (ultrafleXtreme™, Bruker Daltonik GmbH) i metody identyfikacji białka na podstawie masy fragmentów peptydów (*peptide mass fingerprinting*, PMF) uzyskano wiarygodną identyfikację białek dotyczącą 76 spotów 2DE, w tym 63 spoty zostały zidentyfikowane jako pojedyncze białka, natomiast 13 spotów było mieszaniną kilku białek. Uzyskane wartości dopasowania - *score* mieściły się w zakresie od 61 do 346, ze średnią wartością 156. 75% spotów zostało zidentyfikowanych z pokryciem sekwencji powyżej 32,75% i na podstawie dopasowania więcej niż 11 peptydów.

Po przeprowadzeniu analiz densytometrycznych analizowanych obrazów rozdziału białek w oparciu o elektroforezę 2D, porównań statystycznych oraz identyfikacji w oparciu o spektrometrię mas twierdzono, że po trzech miesiącach diety w grupie STD nastąpiła zmiana relatywnej koncentracji 12 białek w porównaniu do grupy NKT. Zmiany te dotyczyły wzrostu relatywnej ekspresji 6 białek związanych z m.in. przemianami HDL(ALB, APOA1) i metabolizmem aminokwasów (OAT, IVD), oraz spadku relatywnej ekspresji 6 białek związanych z m.in. metabolizmem fruktozy(KHK, TKFC). Pomiędzy grupą 14:1 a grupą NKT zaobserwowano zmiany w ekspresji 10 białek. W tym wzrost relatywnej ekspresji 5 białek związanych z m.in. procesami katabolicznymi i reakcjami utleniania i redukcji (APOA1, GLO1, IVD, PRDX6) oraz spadek 5 białek związanych z m.in. metabolizmem lipidów(GPD1, HMGCS2). Natomiast pomiędzy grupami 5:1 a NKT zmianom uległa ekspresja 14 białek. Zmiany dotyczyły w tym wypadku wzrostu relatywnej ekspresji 6 białek związanych z m.in. procesami odpowiedzi na stres oksydacyjny i reakcjami utleniania i redukcji(ACAT2, CA3, PRDX6) oraz spadku ekspresji 8 białek związanych z m.in. procesami biosyntezy ATP(ATP5F1B, GALK1, TKFC). Trzymiesięczna suplementacja paszy wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi w stosunku LA/ALA zarówno 14:1 jak i 5:1 w porównaniu do diety o wysokiej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych zwiększył poziom peroksyredoksyny 6 (PRDX6) pełniącej funkcję ochronną przed stresem oksydacyjnym, która jest jednocześnie wskaźnikiem wystąpienia tego rodzaju stresu. Wyższy stosunek LA/ALA (14:1) w

porównaniu do niższego stosunku (5:1) zwiększył względną koncentrację apolipoproteiny 1 (APOA1) związanej m.in. ze zwrotnym transportem cholesterolu.

Wyniki uzyskane po 6 miesiącach diety wykazały, że w stosunku do grupy NKT suplementacja diety LA/ALA 14:1 spowodowała zmianę ekspresji 16 białek. W tym zestawieniu stwierdzono obniżenie względnej ekspresji 12 białek związanych m.in. z metabolizmem aminokwasów (HGD, FTCD, OAT). W porównaniu pomiędzy grupami LA/ALA 5:1 a NKT stwierdzono zmianę ekspresji 10 białek. W szczególności wzrost względnej ekspresji 2 białek związanych z m.in. metabolizmem reaktywnych form tlenu (PRDX4 i PRDX6) oraz obniżenie względnej ekspresji 9 białek związanych z m.in. metabolizmem węglowodanów (FBP1, ENO1, GALK1). Największe różnice odnotowano pomiędzy grupą NKT a STD i dotyczyły one zmiany ekspresji 21 białek. W grupie NKT wystąpił istotny wzrost ekspresji 13 białek związanych m.in. z glikolizą i glukoneogenezą (ENO1, FBP1, KHK, TKFC) oraz spadek 9 białek związanych m.in. z przemianami HDL i metabolizmem metioniny (ALB, APOA1, BHMT). Niższy stosunek LA/ALA w diecie w porównaniu do LA/ALA 14:1 obniżył względną koncentrację 10 białek mających udział m.in. w glukoneogenezie i glikolizie (ALDH2, FBP1) oraz niealkoholowym stłuszczeniu wątroby (COX6A1, EIF2S1).

W ostatnim zadaniu zbadano poziom ekspresji na poziomie transkryptomu 4 genów metabolizmu lipidów (*Srebf1*, *Fasn*, *Fads1*, *Fads2*) oraz 4 genów kodujących białka wykazujące zmianę względnej koncentracji w profilach białkowych (*Ces1d*, *Fbp1*, *Prdx6*, *Oat*). W grupach NKT, 14:1 i 5:1 zarówno po 3 jak i po 6 miesiącach suplementacji wykazano na poziomie transkryptomu wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego SREBP-1c i genu podlegającego jego aktywacji - *Fasn*, kodującego syntazę kwasów tłuszczowych. Co może być to dowodem na stymulację *de novo* lipogenezy pod wpływem diety wysokotłuszczowej w porównaniu do grupy niskotłuszczowej STD. Dieta o wysokiej zawartości WNKT zwiększała również względną ekspresję desaturaz $\Delta 5$ (*Fads1*) i $\Delta 6$ (*Fads2*) (enzymów odpowiedzialnych za endogenną syntezę długołańcuchowych WNKT) w porównaniu do grupy STD.

Podjęcie badań modelowych pozwoliło na określenie zmian w proteomie wątroby, w odpowiedzi na dietę o zróżnicowanej zawartości nasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które też różnią się w zależności od czasu trwania diety. Suplementacja diety wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi spowodowała istotne zmiany w względnej ekspresji białek wątroby zaangażowanych w metabolizm lipidów, węglowodanów, biosyntezę i degradację aminokwasów oraz utrzymanie homeostazy redoks. Skład diety zwłaszcza

zawartość i rodzaj kwasów tłuszczowych jest czynnikiem który może istotnie oddziaływać na funkcjonowanie organizmu na co wskazują zmiany w ekspresji białek funkcjonalnych wątroby.

