

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Zakład Analityki Biochemicznej

**Wpływ diety na zmianę ekspresji genów dla elongaz
i desaturaz kwasów tłuszczowych u szczurów**

JAGODA DRAĞ

Promotor pracy: Prof. dr hab. med. Jerzy Jańkiewicz

Kraków 2011

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu Profesorowi
dr hab. med. Jerzemu Jaśkiewiczowi za cenne wskazówki,
opiekę i poświęcony czas, życzliwość oraz pomoc udzieloną
w trakcie realizowania niniejszej pracy.*

*Rodzicom, Rodzinie i Przyjaciołom za wsparcie,
wiarę i cierpliwość*

Dziękuję

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów	1
1. Wstęp	5
1.1. Biosynteza kwasów tłuszczowych – lipogeneza.....	7
1.2. Lipoliza, β -oksydacja kwasów tłuszczowych (β -oksydacja Knoopa) oraz transport kwasów tłuszczowych	10
1.3. Cykl Randla.....	13
1.4. Trawienie i wchłanianie lipidów.....	16
1.5. Wątroba.....	19
1.6. Tkanka tłuszczowa.....	20
1.7. Wprowadzenie do elongaz i desaturaz.	24
1.8. Elongazy.....	26
1.8.1. Elongaza 1	28
1.8.2. Elongaza 2.....	28
1.8.3. Elongaza 3.....	29
1.8.4. Elongaza 4.....	30
1.8.5. Elongaza 5.....	30
1.8.6. Elongaza 6.....	31
1.8.7. Elongaza 7.....	32
1.9. Desaturazy.....	33
1.9.1. $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturaza.....	35
1.9.2. $\Delta 9$ desaturaza.....	39
1.10. Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji.....	43
2. Cel pracy	51
3. Materiał i metody	52

3.1. Materiał	52
3.1.1. Zwierzęta.....	52
3.1.2. Dieta	53
3.2. Metody.....	54
3.2.1. Analiza ekspresji mRNA dla elongaz i desaturaz w tkance tłuszczowej i tkance wątrobowej szczurów	54
3.2.1.1. Ekstrakcja RNA z tkanki wątrobowej oraz z tkanki tłuszczowej	54
3.2.1.2. Oznaczenie stężenia RNA	55
3.2.1.3. Reakcja RT-PCR	55
3.2.1.4. Elektroforetyczny rozdział produktów RT-PCR w żelu agarozowym	59
3.2.2. Określenie składu kwasów tłuszczowych frakcji lipidowych tkanki wątrobowej oraz tkanki tłuszczowej.....	59
3.2.2.1. Ekstrakcja lipidów całkowitych oraz synteza pochodnych metylowych kwasów tłuszczowych.....	59
3.2.2.2. Rozdział estrów metylowych kwasów tłuszczowych techniką chromatografii gazowej.....	60
3.2.2. Analiza profilu lipidowego oraz stężenie glukozy w surowicy krwi zwierząt.....	61
3.2.3. Statystyczne opracowanie danych.....	64
4. Odczynniki.....	65
5. Bufory i roztwory	66
6. Aparatura.....	67
7. Wyniki	68
7.1. RT-PCR	68
7.1.1. Wątroba	68
7.1.2. Tkanka tłuszczowa	84
7.2. Chromatografia	101

7.2.1. Wątroba	101
7.2.2. Tkanka tłuszczowa.....	109
7.3. Profil lipidowy oraz stężenie glukozy	117
8. Dyskusja	127
9. Wnioski	146
10. Spis rycin i tabel	147
11. Streszczenie/Summary	158
12. Piśmiennictwo	161

WYKAZ SKRÓTÓW

- AA** (*arachidonic acid*) - kwasu arachidonowy
- ACBP** (*acyl-CoA (Coenzyme A) binding protein*) - białka transportujące aktywne reszty acylowe
- ACC** (*acetyl-CoA carboxylase*) - karboksylaza acetylo-CoA
- ACP** (*acyl carrier protein*) - białkowy nośnik grup acylowych
- ACP desaturase** (*acyl-acyl carrier protein desaturase*) - desaturaza acylo-ACP
- ACS** (*acetyl-CoA synthetase*) - syntetaza acetylo-CoA
- AMP** (*Adenosine Monophosphate*) - adenozyomonofoforan
- AMPK** (*AMP-activated protein kinase*) - kinaza AMP
- ANP** (*atrial natriuretic peptide*) - przedsiorkowy peptyd antydiuretyczny
- ASP** (*acylating stimulation protein*) - białko stymulujące acylację
- ATP** (*adenosine triphosphate*) – adenozyotryfosforan
- BAT** (*brown adipose tissue*) – brunatna tkanka tłuszczowa, brązowa tkanka tłuszczowa
- bHLH-LZ** (*basic helix-loop-helix - leucine zipper*) - zasadowa domena białkowa o budowie helisa-pętla-helisa-suwak leucynowy
- cAMP** (*cyclic adenosine monophosphate*) - cykliczny 3', 5'-adenozyomonofoforan
- CETP** (*cholesterol ester transfer protein*) - białko transportujące estry cholesterolu
- ChoRE** (*carbohydrate response element*) - sekwencja odpowiedzi na węglowodany
- ChREBP** (*carbohydrate-responsive element-binding protein*) - białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany
- Cig 30** (*Cold-induced glycoprotein of 30 kDa*) – pierwotna nazwa elongazy 3
- CoA** (*Coenzyme A*) - koenzym A
- CPT I** (*carnitine palmitoyltransferase I*) - transferaza palmitynianu karnityny
- D5D** – ($\Delta 5$ destaurase, *delta-5 fatty acid desaturase*) - $\Delta 5$ desaturaza
- D6D** – ($\Delta 6$ desaturase, *delta-6 fatty acid desaturase*) - $\Delta 6$ desaturaza
- DHA** (*docosahexaenoic acid*) - kwas dokozaheksaenowy
- DPA** (*docosapentaenoic acid*) – kwas dokozapentaenowego
- EDTA** (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) - kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas wersenowy

- EFA** (*Essential Fatty Acid*) – niezbędne kwasy tłuszczowe
- EGF** (*epidermal growth factor*) - naskórkowy czynnik wzrostu
- ELOVL** (*elongation of very long chain fatty acids*) – białka z rodziny elongaz katalizujące reakcje wydłużania łańcucha węglowego
- EPA** (*eicosapentaenoic acid*) – kwas eikozapentaenowy
- FABPpm** (*plasma membrane-associated fatty acid-binding protein*) - białko transportujące kwasy tłuszczowe związane z błoną komórkową
- FAD** (*flavin adenine dinucleotide*) - nukleotyd flawino-adeninowy
- FADS** (*fatty acid desaturase*) - destaurazy kwasów tłuszczowych
- FAS** (*fatty acids synthase*) - syntaza kwasów tłuszczowych
- FATP4** (*fatty acid transport protein 4*) - białko transportujące kwasy tłuszczowe typu 4
- FFA** (*free fatty acids*) - wolne kwasy tłuszczowe
- FIAF** (*fasting-induced adipose factor*) - czynnik adipocytarny indukowany głodem
- GIP** (*gastroinhibitory protein*) - peptyd hamujący czynność żołądka
- GLP-1** (*glucagon like peptide-1*) - peptyd glukagonopodobny
- GLUT** (*glucose transporter*) - transporter glukozy
- IGF** (*insulin-like growth factor*) - insulinopodobny czynnik wzrostu
- LBP** (*lipid-binding proteins*) - białka transportujące lipidy
- LCFA** (*long-chain fatty acids*) – długołańcuchowe kwasy tłuszczowe
- LIPID MAPS** - *LIPID Metabolites And Pathways Strategy*
- LPL** (*lipoprotein lipase*) - lipaza lipoproteinowa
- LXR** (*liver X receptor*) - wątrobowy receptor X
- LXRE** (*LXR response element*) - element odpowiedzi na LXR
- MCFA** (*medium-chain fatty acids*) - średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe
- MCP-1** (*monocyte chemotactic protein 1*) - czynnik chemotaktyczny monocytów
- Mlx** (*Max-like factor X*) – czynnik transkrypcyjny
- MT** (*metallothionein*) - metalotioneina
- MUFA** (*monounsaturated fatty acids*) - jednonienasycone kwasy tłuszczowe
- NAD** (*nicotinamide adenine dinucleotide*) - dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (postać utleniona)

- NADH** (*nicotinamide adenine dinucleotide*) - dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (postać zredukowana);
- NEFA** (*non-esterified fatty acids*) - niezestryfikowane kwasy tłuszczowe
- NNKT** - *Niezbędne Nienasycone Kwasy Tłuszczowe*
- PAI-1** (*plasminogen activator inhibitor 1*) - inhibitor aktywatora plazminogenu
- PCD1** (*palmitoilo-CoA desaturase 1*) – desaturaza palmitoilo-CoA
- PCR** (*polymerase chain reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy
- PPAR** (*peroxisome proliferator-activated receptors*) - receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomalne
- PPRE** (*peroxisome proliferator response element*) – element odpowiedzi na proliferatory peroksysomów
- PUFA** (*polyunsaturated fatty acids*) – wielonienasycone kwasy tłuszczowe
- RBP-4** (*retinol binding protein*) - białko wiążące retinol-4
- RT** (*reverse transcription*) - odwrotna transkrypcja
- RXR** (*retinoid X receptor*) - retinowy receptor X
- S1P** (*site-1 protease*) - proteaza jako pierwsza przecinająca SREBP
- S2P** (*site-2 protease*) - proteaza jako druga przecinająca SREBP
- SAT** (*saturated fatty acids*) – nasycone kwasy tłuszczowe
- SCAP** (*SREBP-cleavage activating protein*) - białko aktywujące hydrolizę SREBP
- SCD** (*stearylo-CoA desaturase*) – desaturaza stearylo-CoA
- SCFA** (*short-chain fatty acids*) - krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe
- SFA** (*saturated fatty acids*) – nasycone kwasy tłuszczowe
- SNP** (*single nucleotide polymorphism*) - polimorfizm pojedynczych nukleotydów
- SRE** (*sterol regulatory element*) - sekwencja odpowiedzi na sterole
- SREBP** (*sterol regulatory element-binding protein*) - białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole
- TAG** (*triacylglycerol*) - triacyloglicerol
- TF** (*tissue factor*) - czynnik tkankowy
- TGF- β** (*transforming growth factor β*) - transformujący czynnik wzrostowy β
- TNF α** (*tumor necrosis factor α*) - czynnik martwicy nowotworu
- Tris** (*Tris(hydroksymetylo)aminometan*) - Tris(hydroksymetylo)aminometan

UCP-1 (*uncoupling protein-1*) – termogenina

UNSAT (*unsaturated fatty acids*) – nienasycone kwasy tłuszczowe

VLCFA (*very long chain fatty acid*) - kwasy tłuszczowe o bardzo długim łańcuchu

VLDL (*very-low-density lipoprotein*) - lipoproteiny o bardzo małej gęstości

WAT (*white adipose tissue*) - biała tkanka tłuszczowa, żółta tkanka tłuszczowa

1. WSTĘP

Lipidy to heterogenna grupa związków organicznych, nierozpuszczalnych w wodzie i rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych. Powszechnie znanych jest ok. 22 500 związków lipidowych. W przyrodzie występują głównie jako kwasy tłuszczowe, woski, ikozanoidy, sfingolipidy, sterole, prenole oraz witaminy rozpuszczalne w tłuszczach. W organizmie pełnią rolę budulca błon fosfolipidowych, materiału energetycznego oraz są odpowiedzialne za międzykomórkową transdukcję sygnału. Rozwój lipidomiki oraz metod badawczych w dziedzinie spektrometrii mas lipidów, w połączeniu z zaawansowanymi narzędziami bioinformatycznymi oraz technikami obrazowania dostarczyły znaczną ilość danych, które przyczyniły się do opracowania nowego oraz dokładniejszego systemu klasyfikacji lipidów. Pierwszy międzynarodowy system klasyfikacji, nazewnictwa oraz budowy lipidów opracowany w projekcie LIPID Metabolites And Pathways Strategy (LIPID MAPS) został opublikowany w 2005 roku, a następnie uaktualniony w 2009 roku w *The Journal of Lipid Research*. Zgodnie z przyjętą w projekcie definicją lipidów jako hydrofobowych lub amfipatycznych cząsteczek, które w całości lub w części pochodzą z reakcji kondensacji reszt ketoacylowych i/lub reszt izoprenowych, zostało wyróżnionych 8 głównych kategorii, takich jak rodniki acylowe, glicerolipidy, glicerofosfolipidy, sfingolipidy, sacharolipidy, poliketydy, sterole oraz prenole. Do kategorii rodników acylowych, liczących 3562 związki lipidowe, zostały zaklasyfikowane kwasy tłuszczowe oraz ich koniugaty, które stanowią jedną spośród 14 klas tej kategorii [30,31,139].

Kwasy tłuszczowe są to kwasy karboksylowe zawierające, różnej długości, łańcuch wodorowęglanowy. Znanych jest kilka kryteriów podziału kwasów tłuszczowych. Najczęściej używanymi w oparciu o biomedyczne znaczenie tych związków są podziały ze względu na biologiczny i chemiczny charakter kwasów tłuszczowych. W aspekcie biologicznym można wyróżnić endogenne kwasy tłuszczowe, które są syntetyzowane w organizmie zwierzęcym oraz egzogenne kwasy tłuszczowe tzw. **Niezbędne Nienasycone Kwasy Tłuszczowe** (NNKT, *Essential Fatty Acid* –EFA), które nie mogą być syntetyzowane w organizmie zwierzęcym i muszą być dostarczane w pożywieniu. Chemiczny podział kwasów tłuszczowych uwzględnia obecność, ilość, pozycję oraz konfigurację geometryczną wiązań podwójnych

w łańcuchu węglowym. Wyróżnia się nasycone kwasy tłuszczowe (*saturated fatty acids*, SFA, SAT) nie posiadające wiązań podwójnych oraz nienasycone kwasy tłuszczowe (*unsaturated fatty acids*, UNSAT) zawierające jedno lub więcej wiązań podwójnych. Ze względu na ilość wiązań podwójnych w łańcuchu węglowym kwasy tłuszczowe można podzielić na jednonienasycone (*monounsaturated fatty acids* MUFA) oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe (*polyunsaturated fatty acids* PUFA) [7,25,67,99].

Obecność wiązań podwójnych w łańcuchu węglowym można opisać w dwojaki sposób, posługując się nomenklaturą n-x (ω -x lub omega-x) lub Δ^x (lub delta-x). W pierwszym przypadku x wskazuje położenie wiązania podwójnego poprzez oznaczenie atomu węgla licząc od grupy metylowej łańcucha węglowego, natomiast przy oznaczeniu Δ^x , x wskazuje położenie wiązania podwójnego poprzez oznaczenie atomu węgla licząc od grupy karboksylowej kwasu tłuszczowego. Każde wiązanie podwójne w nomenklaturze Δ^x jest poprzedzone prefiksem cis- lub trans-, wskazując konformację cząsteczki względem podwójnego wiązania [7, 99].

Nazwy zwyczajowe najczęściej pochodzą od nazwy surowca, z którego kwas został wyodrębniony po raz pierwszy. W literaturze spotyka się skrótowy zapis nazw kwasów tłuszczowych, polegający na użyciu samych liczb z pominięciem nazw. Według tej zasady skrócony zapis kwasu linolowego to 18:2 (9, 12) lub 18:2 (9c, 12c), gdzie pierwsza liczba oznacza liczbę atomów węgla, liczba po dwukropku – liczbę wiązań podwójnych, natomiast zapisane w nawiasie kursywą liczby to numery atomów węgla, przy których występuje wiązanie nienasycone.

Obecne w przyrodzie nienasycone kwasy tłuszczowe przyjmują konfigurację „cis” (w zapisie skróconym: c, cis lub Z), co oznacza, że łańcuchy węglowe znajdują się po tej samej stronie podwójnego wiązania. W konfiguracji „trans” (t, trans lub E) w odróżnieniu do typu „cis”, łańcuchy węglowe znajdują się po przeciwnej stronie podwójnego wiązania [7, 25, 99].

Kwasy tłuszczowe mają różną długość łańcucha węglowego, co jest podstawą podziału na krótko-, średnio-, długo- i bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (*short-chain fatty acids*, SCFA) posiadają od 2-6 atomów węgla, średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe (*medium-chain fatty acids*, MCFA) od 8–10, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (*long-chain fatty acids*, LCFA) od 12-18 oraz bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (*very long chain fatty acids*, VLCFA) posiadają 20 i więcej atomów węgla w łańcuchu [25,72,139].

Kwasy tłuszczowe występujące bez połączeń z innymi cząsteczkami nazywane są wolnymi kwasami tłuszczowymi lub niezestryfikowanymi kwasami tłuszczowymi (*free fatty acids* FFA, *non-esterified fatty acids*, NEFA).

Kwasy tłuszczowe pełnią rolę budulca błon fosfolipidowych oraz materiału energetycznego, regulują ekspresję genów odpowiedzialnych za metabolizm związków organicznych, a także wzrost i różnicowanie komórek. Wymienione efekty działania są tkankowo-specyficzne i zależne od struktury kwasów tłuszczowych, a także od ich własnego metabolizmu w określonej tkance [15,21,22,139]. Większość naturalnie występujących kwasów tłuszczowych ma zmienną długość łańcucha, od 4 do 36 lub więcej atomów węgla. Kwasy tłuszczowe pochodzą z katabolizmu triacylogliceroli i fosfolipidów albo z syntezy endogennej, w której substratem jest glukoza [139].

Kwasy tłuszczowe są jednym z podstawowych źródeł energii dla mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych. Triacyloglicerole magazynowane w adipocytach zawierają kwasy tłuszczowe pełniące funkcję energetyczną. 90% całkowitej puli kwasów tłuszczowych w komórkach ssaków stanowią kwasy tłuszczowe zawierające od 16-18 atomów węgla w łańcuchu. Kwasy VLCFA znajdują się we wszystkich tkankach organizmu i pełnią szczególnie istotne funkcje biologiczne to jest ich znacząco mniej niż pozostałych frakcji kwasów tłuszczowych. Ważna jest obecność tych związków w komórkach nerwowych, tkance skórnej, a także niektórych gruczołach wydzielania wewnętrznego, których komórki wyposażone są w większe ilości długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [55,71,135].

1.1 Biosynteza kwasów tłuszczowych – lipogeneza

Synteza kwasów tłuszczowych przebiega przede wszystkim w cytoplazmie komórek wątroby, tkanki tłuszczowej, nerek, płuc i gruczołu sutkowego. Najważniejszym prekursorem jest glukoza, a produktem końcowym jest kwas palmitynowy. Biosynteza kwasów tłuszczowych *de novo* obejmuje szlaki metaboliczne katalizowane przez karboksylazę acetylo-CoA (*acetyl-CoA carboxylase* – ACC, EC 6.4.1.2) oraz syntazę kwasów tłuszczowych (*fatty acids synthase* – FAS, EC 2.3.1.85) [72,139,141]. Substratem dla tego procesu jest acetylo-CoA, pochodzący z przemian szkieletów węglowych glukozy, innych cukrów prostych oraz aminokwasów glukogennych dostarczonych w diecie. Powstały acetylo-CoA musi zostać

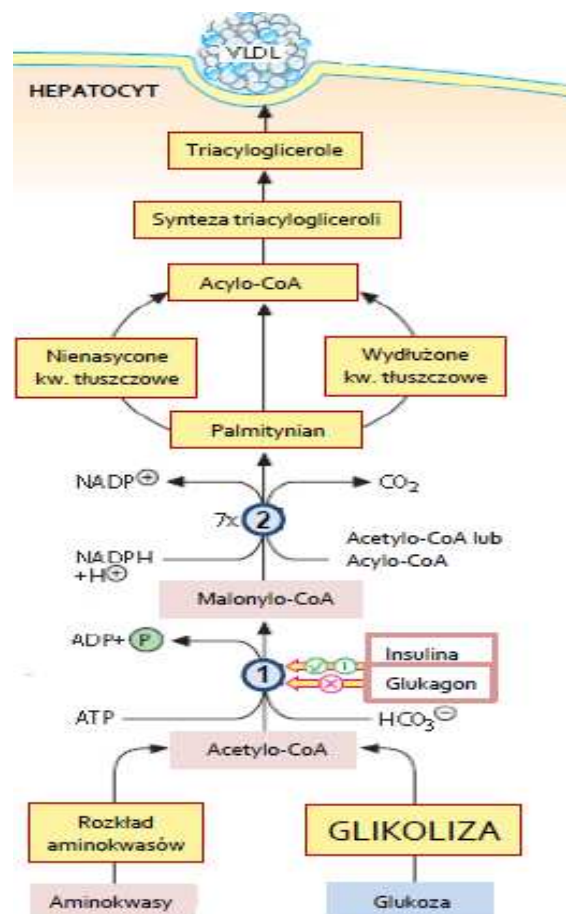
przetransportowany z mitochondriów do cytozolu. Wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla acetylo-CoA i dlatego następuje proces kondensacji acetylo-CoA ze szczawiooctanem z wytworzeniem cytrynianu, który łatwo przenika przez błonę mitochondrialną. W cytozolu, cytrynian ulega rozszczepieniu przez liazę cytrynianową zależną od ATP, co umożliwia odtworzenie cząsteczki acetylo-CoA. Decydującym etapem w syntezie kwasów tłuszczowych jest tworzenie malonylo-CoA [58,95,139]. Proces ten katalizuje karboksylaza acetylo-CoA poprzez przyłączenie CO₂ do cząsteczki acetylo-CoA. ACC występuje w postaci dwóch lizoforn: ACC1 i ACC2. Najmniejszą funkcjonalną podjednostką każdej z izoforn ACC jest homodimer [8,66,98,139]. Izoforma ACC1 występuje w cytoplazmie komórek tkanki tłuszczowej, a także komórek gruczołów piersiowych, gdzie powstały malonylo-CoA funkcjonuje jako donator dwuwęglowych reszt do syntezy kwasów tłuszczowych [14,76]. Izoforma ACC2 znajduje się w cytoplazmie komórek mięśnia sercowego oraz mięśni szkieletowych i katalizuje powstanie malonylo-CoA, który działa jako inhibitor palmitoilotransferazy karnitynowej I (*carnitine palmitoyltransferase I* – CPT I, *EC 2.3.1.21*) regulując transport aktywnych reszt acylowych, które są następnie utleniane w mitochondrium. Obie izoformy są aktywne w cytoplazmie komórek wątrobowych, co wynika ze złożoności przemian metabolicznych zachodzących w hepatocytach. ACC1 i ACC2 wykazują identyczną specyfikę substratową, różnią się natomiast powinowactwem do substratu, wyrażonym różnymi wartościami stałej Km, które dla poszczególnych substratów zostały przedstawione w tab. 1. [8,14,66,76,98,134].

Tab. 1. Powinowactwo (wyrażone jako wartości Km) do substratów izoforn karboksylazy acetylo-CoA [134].

	Wartość Km dla ACC1	Wartość Km dla ACC2
ATP	106.5 +/- 2.6 μM	57.6 +/- 0.9 μM
HCO ₃ ⁻	2.73 +/- 0.29 mM	2.25 +/- 0.10 mM
acetylo-CoA	21.5 +/- 1.0 μM	31.7 +/- 1.5 μM

Kolejnym etapem biosyntezy kwasów tłuszczowych jest połączenie acetylo-CoA oraz malonylo-CoA z białkowym nośnikiem grup acylowych (*acyl carrier protein*, ACP), w wyniku czego powstaje odpowiednio acetylo-ACP oraz malonylo-ACP. Jest to

pierwszy etap katalizowany przez syntazę kwasów tłuszczowych (FAS). Kompleks FAS jest polipeptydem zawierającym 7 aktywności enzymatycznych. Enzym występuje w postaci homodimeru (2x272kDa) i tylko taka struktura jest aktywna biologicznie [6,58,95,121,139]. FAS katalizuje 7 reakcji cząstkowych potrzebnych do syntezy palmitynianu. Enzym posiada rozdział przestrzenny funkcji, w którym można wyróżnić 3 domeny. Domena pierwsza posiada transferazę acetylo-S-[ACP], transferazę malonylo-S-[ACP] i syntazę 3-ketoacylo-[ACP]. Domena druga posiada reduktazę 3-ketoacylo-[ACP], dehydratazę 3-hydroksyacylo-[ACP] i reduktazę enoilo-[ACP] oraz domena trzecia z hydrolazą acylo-[ACP]. Kolejne cykle zachodzą, aż do momentu powstania 16-węglowego palmitoilo-ACP, który nie może być dalej wydłużany i pod wpływem enzymu tioesterazy ulega hydrolizie do palmitynianu i ACP. W biosyntezie nasyconych kwasów tłuszczowych o nieparzystej liczbie atomów węgla zamiast malonylo-ACP występuje propionilo-ACP [6,67,121].



- ① Karboksylaza acetylo-CoA
- ② Syntaza kwasów tłuszczowych

Ryc. 1. Synteza kwasów tłuszczowych [67].

Palmitynian, główny produkt syntezy kwasów tłuszczowych, może ulegać procesom elongacji i desaturacji formując pulę różnych kwasów tłuszczowych. Nowosyntetyzowane kwasy tłuszczowe są zabezpieczone przed procesem β -oksydacji, ponieważ malonylo-CoA hamuje działanie acylotransferazy karnityny, która bierze udział w transporcie kwasów tłuszczowych do mitochondriów celem ich utlenienia.

Synteza kwasów tłuszczowych zachodzi w okresie sytości, a energia jest magazynowana w postaci triacylogliceroli. Kwasy tłuszczowe zanim zostaną przekształcone do triacylogliceroli, muszą zostać aktywowane do pochodnych acylowych. Działaniem acylotransferazy dwa aktywne kwasy tłuszczowe zostają połączone wiązaniem estrowym z dwoma atomami węgla wiązań karboksylowych w cząsteczce glicerolo-3-fosforanu. Produktem reakcji jest kwas fosfatydowy, z którego zostaje odszczepiona reszta kwasu fosforowego w procesie katalizowanym przez fosfatazę. Powstaje diacyloglicerol, do którego przyłącza się trzeci aktywny kwas tłuszczowy formując triacyloglicerol. Taka cząsteczka zostaje następnie upakowana do frakcji VLDL lipoprotein i jest transportowana z wątroby do krwi. Lipaza lipoproteinowa obecna na powierzchni błony tkanki tłuszczowej uwalnia i wprowadza do wnętrza komórki kwasy tłuszczowe z frakcji VLDL, które są ponownie przekształcane w triacyloglicerole i zmagazynowane [7,9,25,67,99].

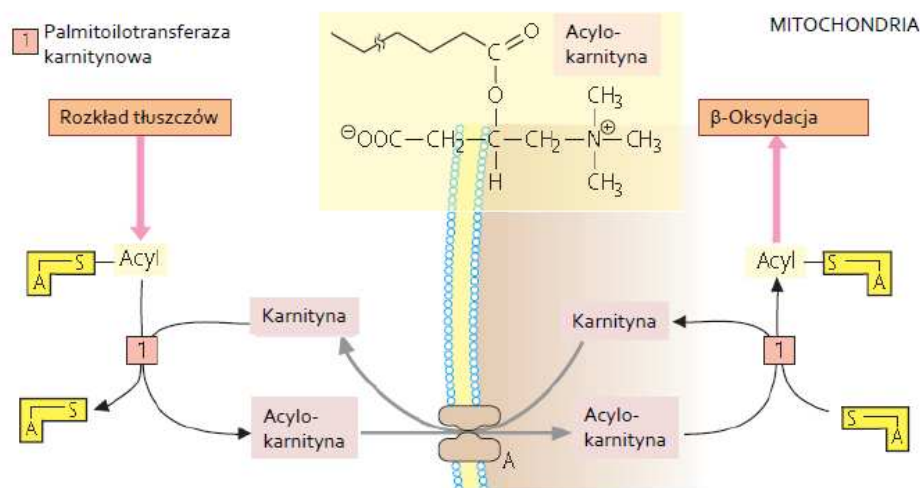
1.2. Lipoliza, β -oksydacja kwasów tłuszczowych (β -oksydacja Knoop) oraz transport kwasów tłuszczowych

Anabolizm kwasów tłuszczowych polega na utlenianiu kwasów tłuszczowych, czemu towarzyszy wytwarzanie ATP. Glukagon i kortyzol, wydzielane w czasie głodu stymulują lipazę hormonowrażliwą. Efektem działania enzymu jest uwolnienie kwasów tłuszczowych i glicerolu z rezerw białej tkanki tłuszczowej. Glicerol zostaje wykorzystany jako substrat w procesie glukoneogenezy, natomiast kwasy tłuszczowe jako substraty w procesie β -oksydacji. Utlenianie kwasów tłuszczowych odbywa się w matrix mitochondrium. Kwasy tłuszczowe muszą najpierw zostać zamienione w aktywny metabolit przez połączenie z koenzymem A. Reakcja ta wymaga udziału ATP jako źródła energii i jest katalizowana przez syntetazę acylo-CoA (tiokinaza), która umiejscowiona jest na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. W całym szlaku degradacji kwasów tłuszczowych jest to jedyny etap, który wymaga energii zawartej w ATP. Dalsze przemiany aktywnych reszt acylowych polegają na ich oksydacji, co

wymaga wprowadzenia kwasów tłuszczowych z cytoplazmy do mitochondrium. Transport odbywa się z wykorzystaniem przenośnika karnitynowego. Do matrix przechodzą tylko aktywne reszty acylowe, koenzym A jest zbyt duży i nie zostaje przetransportowany do wnętrza mitochondrium.

Kwasy tłuszczowe o długim łańcuchu węglowym przenikają przez wewnętrzną błonę mitochondrialną w połączeniu z karnityną. Karnityna obficie występuje w mięśniach. Jest syntetyzowana z lizyny i metioniny w wątrobie i nerkach. Aktywacja niższych kwasów tłuszczowych i ich utlenianie może zachodzić w mitochondriach niezależnie od karnityny.

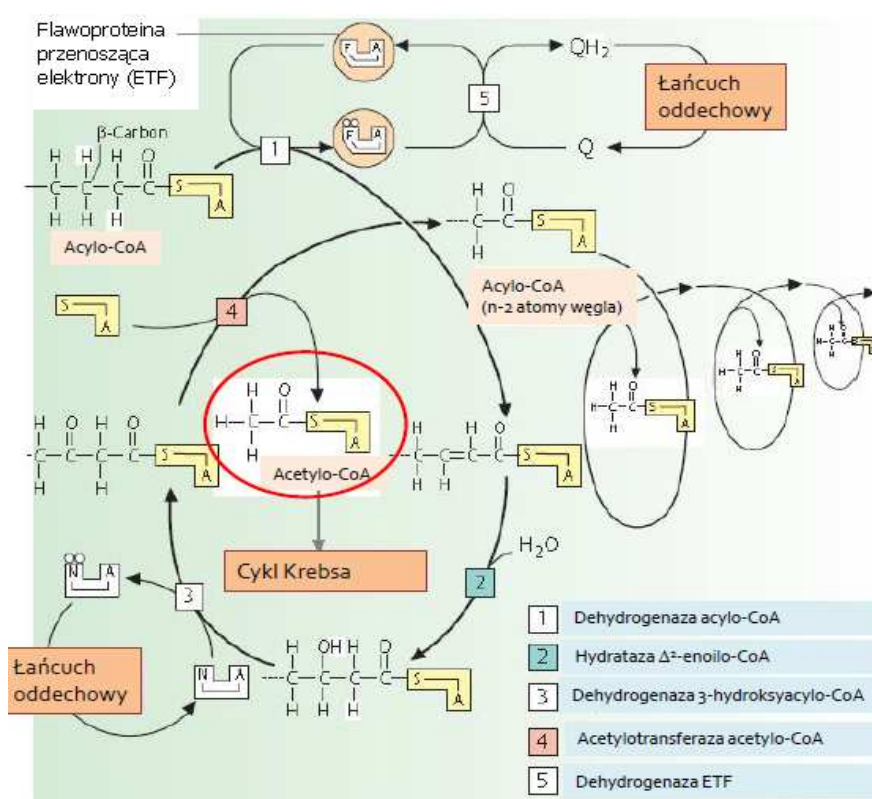
Enzym, palmitoilotransferaza karnitynowa I (CPT I), znajdujący się po zewnętrznej stronie błony mitochondrialnej, katalizuje przekształcenie acylo-CoA w acylokarnitynę, która przenika do mitochondriów, przez co kwasy tłuszczowe stają się dostępne dla szlaku β -oksydacji. Translokaza karnitynoacylokarnitynowa działa jako błonowy wymienny przenośnik karnityny. Transport acylokarnityny do wnętrza mitochondriów jest sprzężony z przeniesieniem jednej cząsteczki karnityny na zewnątrz. W mitochondrium acylokarnityna reaguje z CoA, w wyniku tej reakcji powstają acylo-CoA i wolna karnityna, które są następnie uwalniane do macierzy mitochondrialnej. Reakcja jest katalizowana przez palmitoilotransferazę karnitynową II, związaną z wewnętrzną powierzchnią błony mitochondrialnej [7,9,25,67,99,114].



Ryc. 2. Transport kwasów tłuszczowych [67].

Oksydacja kwasów tłuszczowych obejmuje powtarzające się sekwencje czterech reakcji takich jak utlenianie (przez FAD), uwodnienie, utlenianie (przez NAD) i tiosirolizacja. Reakcje te tworzą cykl degradacji kwasu tłuszczowego, którego produktem jest kolejne

usuwanie jednostek dwuwęglowych w postaci acetylo-CoA z końca łańcucha kwasu tłuszczowego. W przypadku kwasu tłuszczowego o parzystej liczbie atomów węgla, pod koniec ostatniego cyklu acylo-CoA posiada 4 atomy węgla i jest rozszczepiany na 2 cząsteczki acetylo-CoA. W przypadku kwasów tłuszczowych o nieparzystej liczbie atomów węgla, acylo-CoA zawiera 5 atomów węgla i ulega rozszczepieniu na trójwęglowy propionilo-CoA oraz dwuwęglowy acetylo-CoA. Propionilo-CoA ulega przemianie w bursztynylo-CoA i w tej formie włącza się jako substrat do cyklu kwasu cytrynowego. Ponieważ acetylo-CoA może być utleniany do dwutlenku węgla i wody, proces ten przebiega również w mitochondriach, zachodzi całkowite utlenienie kwasów tłuszczowych.



Ryc. 3. Utlenianie kwasów tłuszczowych [67].

Sumaryczna reakcja β-oksydacji kwasu palmitynowego jest następująca:
 $\text{palmitoilo-CoA} + 7\text{FAD} + 7\text{NAD}^+ + 7\text{CoA} + 7\text{H}_2\text{O} = 8 \text{ acetylo-CoA} + 7\text{FADH}_2 + 7\text{NADH} + 7\text{H}^+$

Z oksydacji palmitynianu do CO₂ i H₂O całkowita ilość wytworzonego ATP wynosi 129 cząsteczek [7].

β -oksydacja kwasów tłuszczowych nienasyconych

Utlenianie kwasów tłuszczowych nienasyconych przebiega zmodyfikowanym szlakiem β -oksydacji. Do utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych niezbędne są dwa dodatkowe enzymy: izomeraza i reduktaza. Jeśli kwas tłuszczowy posiada wiązania podwójne przy nieparzystych atomach węgla, β -oksydacja zachodzi tak samo, jak w przypadku nasyconych kwasów tłuszczowych do momentu pojawienia się w trzecim cyklu cis- Δ^3 -enoilo-CoA. Związek ten zostaje wtedy przekształcony przy udziale izomerazy w trans- Δ^2 -enoilo-CoA, który ulega analogicznym reakcjom utleniania jak w przypadku kwasów tłuszczowych o parzystej liczbie atomów węgla.

W przypadku wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, mających wiązania podwójne przy parzystych atomach węgla, na jednym z etapów β -oksydacji powstaje 2,4-dienoilowy związek pośredni, który jest przekształcany przez reduktazę 2,4-dienoilo-CoA w cis- Δ^3 -enoilo-CoA, który następnie zostaje przekształcony przez izomerazę w formę trans, która ulega analogicznym reakcjom utleniania jak w przypadku kwasów tłuszczowych o parzystej liczbie atomów węgla [7,9,25,67,99,114].

1.3. Cykl Randle'a

W 1936 roku Philip Randle zaproponował schemat przemian metabolicznych dotyczących współzawodnictwa substratów energetycznych takich jak glukoza i kwasy tłuszczowe. Cykl Randle'a (cykl glukoza-kwasy tłuszczowe) opisuje biochemiczny mechanizm kontrolujący przepływ i pobieranie substratów energetycznych w tkankach, w koordynacji z hormonami, które kontrolują stężenie substratów w krążeniu. Początkowo opisywane zmiany dotyczyły jedynie mięśni i tkanki tłuszczowej, dając początek rozwojowi nowych koncepcji. Koordynacja regulacji przemian pomiędzy metabolizmem glukozy i kwasów tłuszczowych w zależności od potrzeb energetycznych tkanek jest kluczowa w utrzymaniu homeostazy energetycznej.

W okresie sytości, wzrost stężenia glukozy we krwi stymuluje wydzielanie insuliny. Insulina zwiększa wychwyty glukozy w mięśniach i tkance tłuszczowej, hamuje uwolnienie kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej i zwiększa estryfikację kwasów tłuszczowych w mięśniach i tkance tłuszczowej. Glukoza stanowi wtedy główne źródło energii w procesach metabolicznych, eliminując udział kwasów tłuszczowych.

Po posiłku bogatym w lipidy, w okresie aktywności fizycznej, w okresie głodzenia oraz w cukrzycy, w osoczu może wystąpić wzrost stężenia kwasów tłuszczowych. Glukoza jest katabolizowana w ograniczonym stopniu w komórkach mięśniowych i zostaje zmagazynowana w postaci glikogenu. Podobnie pirogronian, którego cząsteczki nie zostały utlenione w cyklu Krebsa, ulegają karboksylacji do szczawiooctanu i wspomagają udział mediatorów w cyklu kwasu cytrynowego.

W okresie głodu, gdy stężenie glukozy i insuliny jest niskie, następuje lipoliza i wzrost stężenia kwasów tłuszczowych, które zostają wykorzystane w komórkach mięśni do produkcji energii. Ponadto w wątrobie z niecałkowitego katabolizmu kwasów tłuszczowych powstają ciała ketonowe, utleniane następnie w komórkach pozawątrobowych posiadających mitochondria. Kwasy tłuszczowe oraz ciała ketonowe, jako źródło energii, oszczędzają zużywanie glukozy przez inne tkanki, za wyjątkiem tkanek zależnych od glukozy np. mózgu. Inhibicja utleniania glukozy ma miejsce na etapie katalizowanym przez dehydrogenazę pirogronianową, a magazynowane w komórce pirogronian i mleczan są substratami dla glukoneogenezy. Inhibicja utleniania glukozy przez kwasy tłuszczowe została potwierdzona doświadczalnie w mięśniu sercowym, wątrobie i komórkach β -trzustki.

Od czasu pierwszych publikacji Randle'a do czasów obecnych został dobrze poznany wpływ hormonów na metabolizm energetyczny. Wiadomo, że wysoki stosunek insulina/glukagon, charakterystyczny dla fazy sytości, sprzyja magazynowaniu lipidów i glukozy. Przeciwnie, wysoki stosunek glukagon/insulina w fazie głodu, stymuluje proces lipolizy w tkance tłuszczowej oraz uruchamia glukoneogenezę w wątrobie, aby dostarczyć glukozę do tkanek od niej zależnych.

Mechanizm hamowania katabolizmu glukozy przez kwasy tłuszczowe, zaproponowany przez Randle'a, dotyczył krótkoterminowego zablokowania aktywności etapów glikolitycznych. Wśród nich wyróżnić można transport glukozy oraz reakcje fosforylacji dotyczące fosfofruktokinazy 1 i dehydrogenazy pirogronianowej (PDH). Oksydacja kwasów tłuszczowych zwiększa stężenie acetylo-CoA oraz NADH, które są inhibitorami dla PDH. Część puli acetylo-CoA w połączeniu ze szczawiooctanem prowadzi do powstania cytrynianu, który w cytoplazmie hamuje aktywność fosfofruktokinazy 1. Skutkiem procesu inhibicji jest nagromadzenie w cytoplazmie glukozy-6-fosforanu, który jest inhibitorem heksokinazy.

Transport glukozy do komórek odbywa się przez białka GLUT – transportery glukozy. Mechanizm regulacji wychwytu glukozy różni się pomiędzy tkankami i nie

został w całości poznany. GLUT 4 jest odpowiedzialny za wychwyt glukozy w komórkach mięśni szkieletowych, mięśniu sercowym i tkance tłuszczowej. Z założenia, w cyklu Randle'a zaobserwowano zahamowanie translokacji GLUT 4 do błony komórkowej i zmniejszenie wychwytu glukozy. Proces inhibicji jest wynikiem zahamowania ekspresji genu dla GLUT4 regulowanej przez SREBP-1c pod wpływem kwasów tłuszczowych [21,56].

W hepatocytach transport glukozy odbywa się przy udziale GLUT 2, który jest kontrolowany przez stężenie glukokinazy, zatem wysoka aktywność transporterów nie jest w tej tkance decydującym inhibitorem. Aktywne reszty acylowe długołańcuchowych kwasów tłuszczowych bezpośrednio hamują aktywność katalityczną glukokinazy, co może tłumaczyć inhibicję utleniania glukozy przez kwasy tłuszczowe.

Regulacja aktywności dehydrogenazy pirogronianowej jest kompleksowa i obejmuje kontrolę poprzez stężenie substratów i produktów, modyfikacje kowalencyjne przez odwracalną fosforylację oraz regulację na poziomie transkrypcji oraz translacji. Natomiast hamowanie fosfofruktokinazy 1 i 2 odbywa się przez dobrze poznany inhibitor allosteryczny – cytrynian.

Hamowanie utleniania kwasów tłuszczowych przez glukozę zostało opisane przez Randle'a, jednak wyjaśnienie ograniczało się tylko do roli insuliny, nie dostarczając wiarygodnych dowodów. W latach '70 McGarry przedstawił propozycję mechanizmu hamowania utleniania kwasów tłuszczowych, w którym kluczowym mediatorem był malonylo-CoA. Glukoza w szlaku glikolitycznym zostaje utleniona do pirogronianu. Pirogronian zostaje następnie przekształcony do acetylo-CoA. Część ulega utlenieniu w cyklu Krebsa, natomiast część, po regeneracji z cytrynianu w cytoplazmie, zostaje przekształcona do malonylo-CoA. Wzrost stężenia malonylo-CoA hamuje aktywność palmitoilotransferazy karnitynowej I – CPT I oraz aktywuje syntazę kwasów tłuszczowych. Skutkiem inhibicji jest zabezpieczenie nowopowstałych kwasów tłuszczowych przed oksydacją oraz promowanie ich estryfikacji do TAG.

Podstawy założeń cyklu Randle'a zostały poszerzone i uzupełnione dzięki odkryciu w latach '90 nowej funkcji kwasów tłuszczowych jako ligandów dla czynników transkrypcyjnych. Dobrze poznany został także wpływ węglowodanów na ekspresję kluczowych enzymów metabolizmu zarówno lipidów jak i glukozy. Do głównych czynników transkrypcyjnych zalicza się białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole (*sterol regulatory element-binding proteins* - SREBP), receptor

aktywowany przez proliferatory peroksysomalne (*peroxisome proliferator-activated receptors* - PPAR) oraz białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany (*carbohydrate-responsive element-binding protein* - ChREBP).

Ważnym aspektem w cyklu Randle'a jest pojęcie insulinooporności tkanek. Praca Randle'a opublikowana w 1936 roku spowodowała wzrost zainteresowania tą koncepcją, zgodnie z którą zjawisko współzawodnictwa substratów stanowi potencjalny mechanizm przyczyniający się do insulinooporności u osób otyłych i u chorych na cukrzycę typu 2. Randle i wsp. założyli, że stymulowany insuliną metabolizm glukozy ulega zaburzeniu przez podwyższony poziom wolnych kwasów tłuszczowych. Modyfikacje i uzupełnienia koncepcji są w dalszym ciągu tematem licznych badań [38,52,114,124].

1.4. Trawienie i wchłanianie lipidów

Około 90% spożywanych tłuszczów stanowią triacyloglicerole (TAG). Pozostała część składa się z cholesterolu, estrów cholesterolu, fosfolipidów oraz wolnych kwasów tłuszczowych. Trawienie lipidów rozpoczyna się w żołądku, przy udziale lipazy żołądkowej wydzielanej przez gruczoły dna żołądka. Triacyloglicerole nie mogą zostać przetransportowane przez błony komórkowe, ulegają zatem hydrolizie. W żołądku, lipaza żołądkowa trawi częściowo triacyloglicerole do diacylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych. Ten etap jest wystarczający dla dalszej emulsyfikacji. Kolejny etap trawienia triacylogliceroli odbywa się w jelicie cienkim. Zemulgowane krople tłuszczu mieszają się z żółcią, wydzielaną przez pęcherz żółciowy. Sekrecja jest regulowana przez hormon cholecystokininę. Żółć ma silne właściwości zmniejszania napięcia powierzchniowego, dzięki temu proces emulsyfikacji zapoczątkowany w żołądku może być kontynuowany.

Do światła dwunastnicy zostają wydzielone syntetyzowane w trzustce enzymy, a mianowicie lipaza trzustkowa, esteraza i fosfolipaza. Lipaza trzustkowa jest głównym enzymem w hydrolizie TAG, rozkłada wiązania α -glicerolu i ma szczególne powinowactwo do długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Składnikiem soku trzustkowego jest kolipaza, która chroni lipazę trzustkową przed hamującym działaniem soli żółciowych, wspomagając działanie lipazy. Produktami reakcji katalizowanych przez lipazę trzustkową są kwasy tłuszczowe oraz β -monoacyloglicerole.

W soku trzustkowym znajduje się także esteraza, dla której substratami są estry cholesterolu, monoacyloglicerole oraz inne estry lipidowe, takie jak estry witaminy A z kwasami karboksylowymi. W przeciwieństwie do lipazy, esteraza wymaga, dla prawidłowego funkcjonowania, obecności soli żółciowych. Spośród fosfolipaz w soku trzustkowym znajduje się przede wszystkim fosfolipaza A₂. Podobnie jak inne trzustkowe proenzymy jest aktywowana przez tripsynę.

Kwasy żółciowe to naturalne detergenty, które są syntetyzowane przez wątrobę, i magazynowane z żółcią w pęcherzyku żółciowym zanim zostaną wydzielone do dwunastnicy. Związki te syntetyzowane są w postaci koniugatów z glicyną lub tauryną. W żółci występują głównie jako pochodne kwasu cholanowego, a mianowicie kwas cholowy (3,7,12-trihydroksycholanowy), kwas deoksycholowy (3,12-dihydroksycholanowy), kwas chenodeoksycholowy (3,7-dihydroksycholanowy) oraz kwas lithocholowy (3-hydroksycholanowy). W fizjologicznym pH są jonami, dlatego często określenia „sole żółciowe” i „kwasy żółciowe” stosowane są zamiennie. Kwasy żółciowe mają zdolność do tworzenia struktur stabilnych termodynamicznie zwanych micellami. Kwasy wchodzące w skład tych agregatów są równoważone przez wolne kwasy tłuszczowe rozpuszczone w żółci. Dla tworzenia struktur micelarnych konieczne jest ściśle określone, minimalne stężenie kwasów żółciowych, tzw. krytyczne micelarne stężenie. Tworzone micelle mają dobrze zdefiniowaną wielkość < 4nm, mniejszą niż krople tłuszczu. W ten sposób zemulgowane wcześniej krople tłuszczu połączone z micellami zostają rozbite na drobne cząsteczki, co umożliwia ich dalszy transport w wodnym środowisku jelita. Micelle transportują także witaminy rozpuszczalne w tłuszczach. W enterocytach następuje wchłanianie kwasów tłuszczowych oraz β - monoacylogliceroli oraz (30-40%) cholesterolu. Kwasy żółciowe następnie podlegają reabsorpcji w procesie krążenia wątrobowo-jelitowego.

Dalsze przemiany kwasów tłuszczowych wchodzących do enterocytów zależą od długości łańcucha węglowego. Średnio- i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe uwalniane są bezpośrednio do krążenia wrotnego. Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe są transportowane do wnętrza enterocyta poprzez dyfuzję bierną w formie uprotonowanej albo przez połączenie z białkami transportującymi lipidy (*lipid-binding proteins*, LBP). W błonie komórkowej rąbka szczoteczkowego występują trzy białka transportujące kwasy tłuszczowe takie jak białko transportujące kwasy tłuszczowe związane z błoną komórkową (*plasma membrane-associated fatty acid-binding protein*,

FABPpm), białko transportujące kwasy tłuszczowe typu 4 (*fatty acid transport protein 4*, FATP4) oraz transporter kwasów tłuszczowych – CD36. We wnętrzu enterocyta, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe i kwasy tłuszczowe z przyłączonym koenzymem A są odwracalnie wiązane odpowiednio z białkami transportującymi kwasy tłuszczowe (*fatty-acid-binding proteins*, FABPs) oraz z białkami transportującymi aktywne reszty acylowe (*acyl-CoA binding protein*, ACBP). Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe w reakcji tioestryfikacji katalizowanej przez błonową syntazę acetylo-CoA (*acetyl-CoA synthase*, ACS) tworzą aktywne reszty acylowe, które następnie są transportowane do szorstkiego retikulum endoplazmatycznego celem reestryfikacji do TAG [7,9,25,40,46,67,99,101,114].

Glicerol, wymagany dla reakcji reestryfikacji, jest pozyskiwany z β -monoacylogliceroli, powstałych z hydrolizy α,β -diacylogliceroli w świetle jelita, z hydrolizy monoacylogliceroli oraz pochodzącego ze szlaku glikolitycznego glicerolo-3-fosforanu. Glicerol produkowany w świetle jelita z TAG nie jest wykorzystany do resyntezy nowych triacylogliceroli, lecz przechodzi bezpośrednio do krążenia wrotnego. Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe w postaci TAG są następnie wbudowane do chylomikronów. Jest to duża, bogata w lipidy cząsteczka. Głównymi składowymi są triacyloglicerole, estry cholesterolu, fosfolipidy oraz apolipoproteiny, głównie A1 oraz B48. Nowosyntetyzowane chylomikrony w postaci pęcherzyków uwolnionych z aparatu Golgiego, zostają uwolnione do układu limfatycznego na drodze fuzji z błoną plazmatyczną, transportując kwasy tłuszczowe po całym organizmie. Na powierzchni komórek znajdują się receptory dla chylomikronów. Hydroliza wiązań w TAG chylomikronów, działaniem lipazy lipoproteinowej, uwalnia kwasy tłuszczowe, które za pomocą nośników zostają przetransportowane do komórek (głównie do mięśni i tkanki tłuszczowej). Niezestryfikowane kwasy tłuszczowe są następnie przekształcone w aktywne reszty acylowe i wykorzystane w komórce jako materiał zapasowy do budowy triacylogliceroli, jako składniki błony komórkowej albo utlenione do CO₂ i H₂O. Cząsteczka chylomikronu, gdy utraci większość lipidów, nadal pozostaje bogata w estry cholesterolu. W takiej formie cząsteczkę tę określa się jako chylomikron resztkowy. Taka postać, przy użyciu receptorów, zostaje wyłapana na powierzchni komórek wątrobowych, wchłonięta w procesie endocytozy i zmetabolizowana, z ostatecznym uwolnieniem wewnątrz komórki niezestryfikowanego cholesterolu oraz aminokwasów. Natomiast krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, bezpośrednio

wchłonięte z enterocytów do krwiobiegu, zostają wykorzystane przez wątrobę jako wysokokaloryczny składnik diety [7,9,25,40,46,67,99,101,114].

1.5. Wątroba

Wątroba, położona wewnątrztrzewnowo, jest wielofunkcyjnym gruczołem obecnym u wszystkich kręgowców i stanowi część układu pokarmowego. Jednostką strukturalną wątroby jest zrazik wątrobowy. Oś zrazika tworzy żyła centralna. W narożach znajdują się małe skupiska tkanki łącznej, gdzie występują trzy rodzaje struktur międzyzrazikowych: tętnica, żyła i przewód żółciowy. Jest to tzw. triada wątrobowa. Zrazik wypełniają promieniście ułożone szeregi (blaszki) komórek wątrobowych (hepatocytów), a pomiędzy blaszkami, również promieniście, przebiegają naczynia włosowate (zatoki wątrobowe), przez które krew przepływa od obwodu zrazika do żyły centralnej. Ściany zatoki wątrobowej zbudowane są wyłącznie z komórek śródbłonna, które wykazują obecność licznych otworów o różnej wielkości. Na wewnętrznej powierzchni śródbłonna umocowane są dość liczne makrofagi (komórki Browicza-Kupffera), wychwytyjące z krwi drobnoustroje oraz fagocytyjące stare erytrocyty. Na zewnętrznej powierzchni znajdują się adipocyty magazynujące lipidy i witaminę A. Podstawową jednostką strukturalno-czynnościową wątroby jest hepatocyt. Ze względu na różnorodność pełnionych funkcji hepatocyt jest wyposażony we wszystkie organelle komórkowe.

Wątroba jest narządem dobrze ukrwionym, znajduje się tu układ żyły wrotnej utworzony przez bezzastawkowe żyły nieparzystych narządów jamy brzusznej. Krążenie wrotne ma na celu doprowadzenie do wątroby, wchłoniętych w przewodzie pokarmowym, składników pokarmowych. Od sprawności wątroby uzależniona jest sprawność układu trawienia i krążenia, a tym samym całego organizmu. Wątroba spełnia funkcję metaboliczną, wydzielniczą, magazynującą oraz detoksykacyjną. Jest centralnym narządem przemiany cukrów, białek i lipidów. Wątroba odgrywa rolę w regulowaniu składu krwi i w przebiegu procesów chemicznych o podstawowym znaczeniu dla organizmu. Syntetyzuje białka osocza, czynniki krzepnięcia krwi, jak fibrynogen i protrombinę, ponadto cholesterol i triacyloglicerole, insulinopodobne czynniki wzrostu (*insulin-like growth factor*, IGF) oraz angiotensynę. Bierze udział w procesach trawienia poprzez wydzielanie żółci, gromadzonej w pęcherzyku

żółciowym. Wątroba magazynuje glikogen, tłuszcze, białka i witaminy (A, D, E, niewielkie ilości B₁₂ i C). Do funkcji detoksykacyjnej należy neutralizacja substancji szkodliwych, metabolizowanie leków, ponadto gruczoł ten reguluje gospodarkę żelaza i miedzi, które się w niej gromadzą. W hepatocytach odbywa się rozkład hemoglobiny [115].

1.6. Tkanka tłuszczowa

Tkanka tłuszczowa jest odmianą tkanki łącznej właściwej i składa się z elementów morfotycznych – adipocytów oraz istoty międzykomórkowej. Adipocyty rozwijają się z fibroblastów, komórek tkanki łącznej, powstałych w czasie embriogenezy z mezodermy. U dorosłych osobników największa część lipidów jest luźno akumulowana wewnątrz adipocytów utrzymywanych przez sieć włókien kolagenowych. Do składników istoty międzykomórkowej należą komórki podścieliska, komórki naczyń, włókna nerwowe, leukocyty, makrofagi, fibroblasty oraz preadipocyty, odpowiedzialne za integralność struktury. Adipocyty zgromadzone są w charakterystycznych skupiskach zwanych zrazikami. Zraziki są silnie unaczynione, dzięki czemu komórki mają dostęp do substratów niezbędnych do syntezy kwasów tłuszczowych oraz mogą uwalniać do krążenia zarówno produkty lipolizy, jak i liczne substancje czynne.

Wyróżnia się dwa rodzaje tkanki tłuszczowej: białą tkankę tłuszczową (WAT – *white adipose tissue*, zwana także żółtą) i brunatną tkankę tłuszczową (BAT – *brown adipose tissue*, zwana także brązową). Komórki białej tkanki tłuszczowej są prawie w całości wypełnione dużą kroplą tłuszczu bogatą w triacyloglicerole (85-90% masy komórki), z mniejszą, w porównaniu do komórek brunatnej tkanki tłuszczowej, ilością mitochondriów. Jądro jest umiejscowione na obrzeżu komórki. Cienka warstwa cytoplazmy otacza wymienione organelle. W trakcie rozwoju, młode adipocyty zawierają wiele małych kropelek lipidowych, które w momencie dojrzewania komórki zlewają się, tworząc dużą pojedynczą kroplę. Pomimo zmiennej objętości, dojrzałe adipocyty są dużymi komórkami, osiągając rozmiary setki do tysiący razy większe niż krwinek czerwonych, fibroblastów i komórek układu odpornościowego. Ich rozmiar może się znacznie zmieniać w zależności od ilości nagromadzonych triacylogliceroli (TAG). Biała tkanka tłuszczowa spełnia liczne funkcje m.in. jest izolatorem termicznym, amortyzatorem oraz przede wszystkim stanowi źródło energii. Obecność

w całym organizmie, a szczególnie w skórze właściwej i tkance podskórnej, ma istotne znaczenie w termoregulacji. Ze względu na zdolność magazynowania energii oraz jej dostarczenia gdy jest to niezbędne, biała tkanka tłuszczowa jest najważniejszym układem buforowym dla bilansu energetycznego. Komórki WAT tworzą torebki tłuszczowe, otaczające niektóre narządy wewnętrzne jamy brzusznej i śródpiersia oraz skupiska wokół naczyń krwionośnych, chroniąc narządy przed wstrząsami. Tkanka jest aktywna metabolicznie. Wiele substancji syntetyzowanych i wydzielanych przez adipocyty ma znaczenie nie tylko lokalne, ale bierze udział w kontroli homeostazy ogólnoustrojowej.

Drugą postacią jest brunatna tkanka tłuszczowa. W organizmie występuje w mniejszej ilości w porównaniu do białej tkanki tłuszczowej. Drobne i liczne krople tłuszczu oraz liczne mitochondria wypełniają całą komórkę, w której jądro jest umiejscowione na obrzeżu komórki. W okresie dojrzewania, brunatna tkanka tłuszczowa jest mniej aktywna metabolicznie, chociaż w przypadku ekspozycji na zimno może się uaktywnić. U człowieka, brunatna tkanka tłuszczowa pojawia się w ostatnim trymestrze życia płodowego i w rozwiniętej postaci funkcjonuje w okresie niemowlęctwa. U dorosłych osobników ulega zanikowi, a występowanie ogranicza się do tkanki podskórnej okolicy międzyłopatkowej i szyi, śródpiersia oraz okolic dużych tętnic brzusznych i nerek [115, 157].

Brunatna tkanka tłuszczowa specjalizuje się w produkcji ciepła. Zdolność BAT do generowania ciepła jest związana z ekspresją termogeniny (UCP-1 – uncoupling protein-1) na wewnętrznej błonie mitochondriów [4]. Białko to uznaje się za marker tkankowy [117]. Aktywacja tego białka prowadzi do otwarcia kanałów protonowych i uwolnienia energii bez wykorzystania energii chemicznej zmagazynowanej w wysokoenergetycznych związkach ATP [97]. Za najbardziej istotny dla rozwoju BAT uważa się wpływ układu współczulnego. Przekaznikiem jest tu noradrenalina [29,157].

Tkanka tłuszczowa jest aktywnym gruczołem wydzielania wewnętrznego. Adipocyty syntetyzują czynne peptydy zwane adipokinami oraz substancje niebiałkowe, w tym estrogeny, które działają w obrębie tkanki tłuszczowej (działanie autokryne i parakryne) oraz na odległe narządy i tkanki (działanie endokryne). Ich produkcja i uwalnianie jest uwarunkowane w znaczącym stopniu przez stan odżywienia.

Tab. 2. Białka produkowane przez adipocyty [36,44,48,65,104,120,125,130-132].

Cytokiny i białka związane z cytokinami (cytokine related proteins)	Leptyna, czynnik martwicy nowotworów α (<i>tumor necrosis factor α</i> , TNF- α), interleukina 6 (<i>interleukin 6</i> , Il-6), czynnik adipocytarny indukowany głodem (<i>fasting-induced adipose factor</i> , FIAF), metalotioneina (<i>metallothionein</i> , MT)
Białka związane z układem krzepnięcia	Inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (<i>plasminogen activator inhibitor 1</i> , PAI-1), czynnik tkankowy (<i>tissue factor TF</i>);
Składowe dopełniacza i białka związane z układem dopełniacza	Adipsyna (<i>complement factor D</i>), adiponektyna, białko stymulujące acylację (<i>acylating stimulation protein ASP</i>);
Inne białka związane z układem odpornościowym	Czynnik chemotaktyczny monocytów (<i>monocyte chemotactic protein 1</i> , MCP-1);
Lipidy i białka związane z metabolizmem i transportem lipidów	Lipaza lipoproteinowa (<i>lipoprotein lipase</i> , LPL), białko transportujące estry cholesterolu (<i>cholesterol ester transfer protein</i> , CETP), apolipoproteina E;
Enzymy związane z metabolizmem hormonów steroidowych	Aromataza zależna od cytochromu P450, dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa (17 β HSD), dehydrogenaza 11 β -hydroksysteroidowa Typu 1 (11 β HSD1);
Angiotensynogen (białko układu renina–angiotensyna)	
Inne białka (pozostałe adipokiny)	Rezystyna, apelina, wisfatyna, omentyna, waspina, Białko wiążące retinol-4 (<i>retinol binding protein 4</i> , RBP-4)

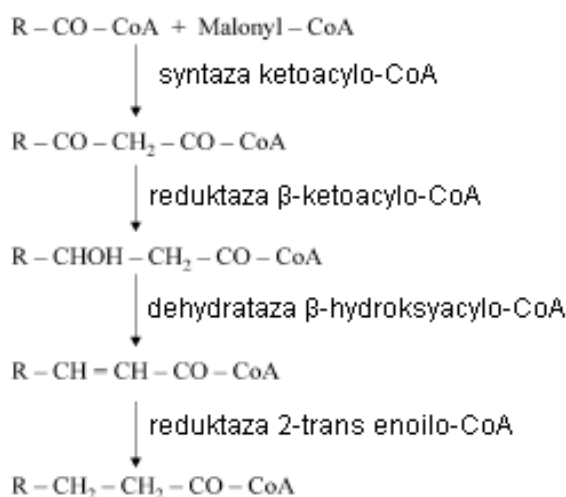
Adipocyty posiadają wiele receptorów, które są odpowiedzialne za ich wrażliwość na regulujące czynniki humoralne, a tym samym umożliwiają interakcje tkanki tłuszczowej z układami dokrewnym, nerwowym i odpornościowym. W tab. 3. przedstawiono ligandy dla hormonalnych receptorów obecnych w adipocytach oraz wpływ tych związków na procesy biologiczne.

Tab. 3. Ligandy receptorów hormonalnych stwierdzonych w adipocytach oraz wpływ tych związków na procesy biologiczne [36].

Receptor	Główny efekt biologiczny
Leptyna	(+) lipoliza i utlenianie kwasów tłuszczowych
Insulina	(+) lipogeneza i wychwytywanie glukozy (-) lipoliza
Glukokortykosteroidy	(+) lipoliza
Glukagon	(+) lipoliza
Katecholaminy	(+) lipoliza
Hormony płciowe	Regulacja rozwoju adipocytów
T3- tyroksyna, T4-trójiodotyronina	(+) lipoliza
Insulinopodobny hormon wzrostu 1 (<i>insulin-like growth factor 1 IGF -1</i>)	(+) adipogeneza
Hormon wzrostu (<i>growth hormone GH</i>)	(+) lipoliza
Prostaglandyny	(-) lipoliza
Czynnik martwicy nowotworów (<i>tumor necrosis factor α TNF-α</i>),	(+) lipoliza i wzrost insulinooporności
Interleukina 6 (<i>interleukin 6 IL-6</i>),	(-) lipoliza lipoproteinowa, (+) lipoliza
Adenozyna	(-) lipoliza (+) wychwytywanie glukozy
Adiponektyna	(+) wrażliwość na insulinę
Gastryna	Regulacja ekspresji leptyny
Cholecystokinina	Regulacja ekspresji leptyny
Peptyd hamujący czynność żołądka (<i>gastroinhibitory protein GIP</i>)	(+) synteza kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli
Peptydu glukagonopodobnego (<i>glucagon like peptide-1 GLP-1</i>),	(+)synteza kwasów tłuszczowych
Białko pobudzające acylację (acylation stimulating protein ASP)	(+)synteza triacylogliceroli
Przedsionkowy peptyd antydiuretyczny (<i>atrial natriuretic peptide ANP</i>)	Regulacja metabolizmu glukozy
Angiotensyna II	(+) lipogeneza, indukcja insulinooporności
Bradykinina	Zwiększenie wrażliwości na insulinę
Naskórkowy czynnik wzrostu (<i>epidermal growth factor EGF</i>)	Regulacja różnicowania adipocytów
Transformujący czynnik wzrostowy β (<i>transforming growth factor TGF -β</i>)	Hamowanie różnicowania adipocytów
Melatonina	Synergistyczne działanie do insuliny

1.7. Wprowadzenie do elongaz i desaturaz

Wydłużanie kwasów tłuszczowych o łańcuchach zbudowanych z więcej niż 16 atomów węgla zachodzi w szlaku elongacyjnym i polega na dołączaniu jednostek dwu- lub trójwęglowych. Zarówno egzogenne jak i endogenne kwasy tłuszczowe mogą ulegać procesowi elongacji do długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Na wydłużanie łańcucha kwasu tłuszczowego składają się cztery etapy, w których biorą udział kolejno następujące enzymy: elongaza (syntaza ketoacylo-CoA), reduktaza β -ketoacylo-CoA, dehydrataza β -hydroksyacylo-CoA oraz reduktaza 2-trans enoilo-CoA [33,64,72,139,142].



Ryc. 4. Reakcja elongacji kwasów tłuszczowych [72].

Elongacja zachodzi przede wszystkim w retikulum endoplazmatycznym (RE), ale także w mitochondrium oraz w peroksysomach komórek wielu tkanek. W RE wydłużanie łańcuchów kwasów tłuszczowych jest procesem bardziej aktywnym w porównaniu do elongacji mitochondrialnej [139]. W elongacji odbywającej się w RE donorem atomów węgla dla wydłużenia cząsteczki kwasu tłuszczowego jest trójwęglowy malonylo-CoA, natomiast w mitochondrium funkcję tę spełnia dwuwęglowy acetylo-CoA [72,139,141,142]. Wiedza na temat wydłużania łańcuchów kwasów tłuszczowych w mitochondrium oraz w peroksysomach wymaga uzupełnienia i dalszych badań.

Desaturacja odbywa się przy udziale transbłonowych desaturaz acylo-CoA w retikulum endoplazmatycznym. Desaturacja w komórkach ssaków wymaga obecności

układu cytochromu b5 niezbędnego w przenoszeniu elektronów. Substratami dla tych enzymów są aktywne reszty acylowe kwasów tłuszczowych.

Naprzemienne reakcje elongacji i desaturacji prowadzą do biosyntezy puli różnorodnych kwasów tłuszczowych. Hashimoto i wsp. wykorzystując metody bioinformatyczne zbadali strukturę 56 eukariotycznych genomów uzyskując 265 homologów elongaz i 275 homologów desaturaz. Wyniki pracy badaczy pokazały dużą różnorodność budowy enzymów, ale z zachowaniem stałych motywów w sekwencji aminokwasów. Na podstawie analizy filogenetycznej elongazy zostały podzielone na dwie podgrupy takie jak elongazy nasyconych/jednonienasyconych kwasów tłuszczowych („S/MUFA Elongase”) oraz elongazy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych („PUFA”). Stosując analogiczne kryteria desaturazy zostały podzielone na cztery podgrupy. Wyróżnić można desaturazy katalizujące wprowadzenie podwójnego wiązania w nasycony łańcuch węglowy („First Desaturase”), pomiędzy już istniejące wiązanie podwójne, a koniec acylowy („Omega Desaturase”), albo pomiędzy już istniejące wiązanie podwójne, a koniec karboksylowy („Front-end Desaturase”). Czwarta grupa to sfingolipidowe desaturazy („Sphingolipid Desaturase”). Każda z wymienionych podgrup ma określoną specyfikę substratową. Znajomość tej specyfiki pozwala na określenie jakie kwasy tłuszczowe mogą być syntetyzowane w obrębie pojedynczego organizmu. Możliwości biosyntezy kwasów tłuszczowych są determinowane przez wzajemnie połączone układy elongaz i desaturaz, charakterystyczne dla danego gatunku [47].

Współcześnie stosuje się liczne modele doświadczalne z udziałem zwierząt laboratoryjnych takich jak myszy i szczury, których celem jest wstępne badanie ekspresji różnych genów pod wpływem określonych czynników środowiskowych. Modele te, podlegając różnorodnym modyfikacjom, stają się cennym źródłem wiedzy pozwalającym zgłębiać procesy molekularne i biochemiczne zachodzące w organizmie człowieka. Ze względu na powszechne użycie zwierząt laboratoryjnych we wspomnianych modelach badań i możliwości budowania analogii w stosunku do organizmu ludzkiego, niniejsza praca ogranicza się do porównania elongaz i desaturaz oraz genów dla tych enzymów, właśnie u myszy, szczurów oraz człowieka.

1.8. Elongazy

Elongazy kwasów tłuszczowych - **EC 2.3.1.** to acylotransferazy katalizujące procesy wydłużania łańcuchów węglowych. Wśród elongaz wyróżnia się trzy grupy. Pierwsza grupa to enzymy katalizujące elongację nasyconych i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych, do których należą ELOVL 1, 3, 6 i 7, druga grupa to enzymy katalizujące elongację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oznaczone jako ELOVL 2 i 5. ELOVL4 wykazuje specyfikę substratową zarówno dla nasyconych jak i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wszystkie enzymy zaliczone do rodziny elongaz charakteryzuje podobieństwo strukturalne [58]. Cechą wspólną dla tej grupy enzymów jest obecność od pięciu do siedmiu regionów transbłonowych, region bogaty w reszty histydynowe (HXXHH) oraz sekwencja sygnału retencji w retikulum endoplazmatycznym (KKXX) [45,58].

Spośród wszystkich genów dla elongaz, geny dla Elov11, Elov15 oraz Elov16 ulegają ekspresji w większości tkanek, podczas gdy geny dla Elov12, Elov13, Elov1 4 oraz Elov17 wykazują ograniczoną specyfikę tkankową [45].

Ekspresja genów dla elongaz pozostaje pod kontrolą diety oraz hormonów i jest regulowana na poziomie transkrypcyjnym poprzez receptory jądrowe i czynniki transkrypcyjne. Aktywność białek enzymatycznych jest determinowana ekspresją genów [58,62,63,64,71,139,142].

Tab. 4. przedstawia zebrane dane dotyczące elongaz u wybranych gatunków ssaków, ich oznakowanie, synonimy nazwy, numer ID oraz lokalizację na chromosomie, według Entrez Gene.

Tab. 4. Dane dotyczące elongaz u wybranych gatunków ssaków, ich oznakowanie, synonimy nazwy, numer ID oraz lokalizację na chromosomie według Entrez Gene.

Elongaza	Organizm	Nazwa	ID - Entrez Gene	Lokalizacja na chromosomie
ELOVL1	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	Ssc1 oraz CGI-88	64834	1p34.2
Elov11	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>		679532	5q36
Elov11	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	Ssc1 AA407424 oraz BB151133	54325	4D2.1

ELOVL2	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	Ssc2 oraz FLJ20334	54898	6p24.2
Elovl2	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>		498728	17p12
Elovl2	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	Ssc2 oraz AI317360	54326	13A3.3
ELOVL3	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	CIG30 CIG-30 oraz MGC21435	83401	10q24.32
Elovl3	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>		309449	1q54
Elovl3	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	CIN-2 i Cig30	12686	19C3
ELOVL4	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	ADMD STGD2 oraz STGD3 Gene].	6785	6q14
Elovl4	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>		315851	8q31
Elovl4	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>		83603	9 E2
ELOVL5	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	HELO1 dJ483K16.1 RP3- 483K16.1	60481	6p21.1-p12.1
Elovl5	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>	rELO1	171400	8q31
Elovl5	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>		68801	9 E1
ELOVL6	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	FAE LCE MGC5487 oraz FLJ23378	79071	4 q25
Elovl6	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>	rELO2 Lce2	171402	2q42
Elovl6	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	FAE LCE C77826 MGC107467	170439	3G3
ELOVL7	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	FLJ23563	79993	5q12.1
Elovl7	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>		361895	2q14
Elovl7	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	AI840082 oraz 9130013K24Rik	74559	13D2

1.8.1. Elongaza 1

Elongaza 1 (ELOVL1) katalizuje syntezę nasyconych i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych od 20 do 26 atomów węgla w łańcuchu [45,72,135,142]. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Yu Wang i in. [142] stwierdzono, że specyficznymi substratami dla tego enzymu są reszty acylowe kwasów tłuszczowych takich jak kwas palmitynowy, oleinowy, arachidowy, dokozanowy oraz tetrakozanowy. W mysich modelach doświadczalnych z niedoborem mieliny zwanych Jimpy i Quaking, wykazano obniżoną elongację kwasów tłuszczowych o długości od 20-22 atomów węgla w łańcuchu, której towarzyszyła zmniejszona ekspresja genu *Elovl1* w mózgu mutantów. Wyniki tych badań sugerują kluczową rolę elongazy 1 w syntezie sfingolipidów oraz w tworzeniu sfingomieliny [103,135].

Brak jest danych na temat badania ekspresji genu dla elongazy 1 w tkankach ludzkich. U szczurów, wykazano ekspresję genu dla elongazy 1 w tkankach takich jak płuca, mózg, nerki oraz serce. Niska ekspresja występuje w wątrobie, brunatnej tkance tłuszczowej oraz skórze. U myszy wykazano wysoką ekspresję genu dla elongazy 1 w żołądku, płucach, nerkach, skórze i jelicie. Umiarkowaną ekspresję stwierdzono w białej tkance tłuszczowej, wątrobie, śledzionie, mózgu, brązowej tkance tłuszczowej, sercu i mięśniach oraz słabą ekspresję w jądrach [5,135].

1.8.2. Elongaza 2

Gen kodujący elongazę 2 został opisany w roku 2000 [135]. Na podstawie badań określono, że mysia i ludzka elongaza 2 biorą udział w elongacji takich kwasów jak arachidonowy, eikozapentaenowy, dokozaetraenowy oraz dokozapentaenowy w transfekowanych drożdżach, a także w ssaczach komórkach HEK293. Wykazano zdolność elongacji kwasu γ -linolenowego w przypadku mysiej ELOVL2 w przeciwieństwie do enzymu ludzkiego. Wyniki badań opublikowanych przez Tikhonenko [128] wykazały spadek ekspresji *Elovl2* i *Elovl4* oraz obniżenie zawartości kwasu dokozaheksaenowego (DHA, C22:6n-3) oraz C32:6n-3 w siatkówce zwierząt, prezentujących model cukrzycowy. Zmiana składu kwasów tłuszczowych w obrębie siatkówki, spowodowała zmianę stosunku n-6/n-3 PUFA, promując działanie prozapalne kwasów tłuszczowych w rozwoju retinopatii cukrzycowej. Spadek ekspresji elongazy 2 oraz elongazy 4 w rozwoju retinopatii cukrzycowej sugeruje udział obu

izoform w syntezie PUFA o długim łańcuchu, niezbędnych dla prawidłowego rozwoju siatkówki oraz procesu widzenia [128]. Stwierdzono, że specyficznymi substratami dla elongazy 2 są reszty acylowe wielonienasyconych kwasów tłuszczowych składających się z 20 do 24 atomów węgla w łańcuchu oraz kwas oleinowy [142]. Brak jest danych na temat badania ekspresji genu w tkankach człowieka. W tkankach szczurzych wysoką ekspresję elongazy 2 oznaczono w wątrobie, płucach, mózgu i nerkach. U myszy, najwyższy poziom ekspresji dla Elovl 2 wykazano w jądrach oraz w wątrobie, a słaby w białej tkance tłuszczowej, płucach, mózgu i nerkach [135].

1.8.3. Elongaza 3

Elovl3 był pierwszym genem zidentyfikowanym i opisanym dla elongaz, początkowo nazwanym Cig 30 (Cold-induced glycoprotein of 30 kDa). U myszy eksponowanych na działanie niskich temperatur zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu kodującego Cig30 w brunatnej tkance tłuszczowej, stąd nawiązanie do pierwotnej nazwy [136].

Elongaza 3 bierze udział w elongacji kwasów tłuszczowych nasyconych i jednonienasyconych o długości do 24 atomów węgla w łańcuchu [135,147]. Specyficznym substratem dla tego enzymu jest reszta acylowa kwasu oleinowego. Wzrost ekspresji dla genu Cig 30 zaobserwowano w badaniach na myszach eksponowanych na działanie temperatury 4°C. Poziom ekspresji genu kodującego Cig30 w komórkach tkanki tłuszczowej w grupie zwierząt przebywających w temperaturze 4°C był 200-krotnie wyższy niż w grupie kontrolnej zwierząt, przebywających w temperaturze 28°C [136]. Kolejne badania prowadzone u zwierząt pozbawionych Elovl 3 wykazały przerost gruczołów łojowych i nadprodukcję TAG oraz wosków w skórze i włosach. Brak syntezy elongazy 3 manifestował się zniszczonym futrem i zwiększoną przezskórną utratą wody u zwierząt, co wynikało z nieprawidłowej zawartości lipidów, z nadmiarem kwasu arachidowego oraz zmniejszonymi ilościami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($C_{\geq 22-26}$) [147]. W ostatnich badaniach zostało wykazane, że u myszy pozbawionych genu kodującego elongazę 3, przebywających w temperaturze 30°C, wystąpiły zaburzenia akumulacji tłuszczu, co sugeruje, że ELOVL3 jest ważna dla utrzymania homeostazy lipidowej [146].

Brak jest danych na temat badania ekspresji genu Elov13 w tkankach ludzkich. U szczurów wykazano obecność mRNA dla elongazy 3 tylko w skórze. U myszy natomiast wykazano różną, zależną od czułości zastosowanych metod detekcji, ekspresję genu dla elongazy 3. Stwierdzono wysoką ekspresję w brunatnej tkance tłuszczowej i wątrobie, niską w skórze, białej tkance tłuszczowej, nerkach i sercu. Nie zaobserwowano ekspresji w płucach, jądrach, mięśniach, śledzionie, mózgu, jelitach oraz grasicy [3,45,57,135,136,146,147].

1.8.4. Elongaza 4

Odkrycia elongazy 4 dokonano podczas badania ekspresji genów związanych z zaburzeniami procesu widzenia u ludzi. U pacjentów tych etiologia choroby - dystrofii plamki Stargardta związana była z wystąpieniem mutacji w obrębie genu Elov14 [43,82,84,152,155].

W badaniach nadekspresji ELOVL4 w hodowli komórek wykazano, że ELOVL4 wymagana jest w syntezie C28 i C30 nasyconych VLCFA w skórze oraz w syntezie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych o długości łańcucha od 28 do 38 atomów węgla w siatkówce [1,88].

U człowieka wysoka ekspresja mRNA dla elongazy 4 występuje w siatkówce oka, niski poziom ekspresji stwierdzono natomiast w mózgu, jądrach i skórze [82,87]. Brak jest danych na temat badania ekspresji genu w tkankach szczura. U myszy stwierdzono ekspresję w czopkach i pręcikach fotoreceptorów, natomiast nie wykazano ekspresji dla elongazy 4 w wątrobie, płucach, sercu, nerkach i śledzionie [58].

1.8.5. Elongaza 5

Substratami dla elongazy 5 są wielonienasycone kwasy tłuszczowe o długości łańcucha od 16 do 22 atomów węgla w cząsteczce [64]. Stwierdzono, że specyficznymi substratami dla tego enzymu są reszty acylowe kwasów tłuszczowych takich jak kwas oleinowy oraz kwas arachidonowy [142].

Wang i wsp. wykorzystali myszy model cukrzycowy (myszy C57BL/6J), w którym przy użyciu adenowirusa indukowano aktywność Elov15 w wątrobie zwierząt. Badania wykazały, że wzrost aktywności enzymu wpłynął na zmiany składu kwasów tłuszczowych w hepatocytach, przede wszystkim wzrost poziomu kwasu dihom-

gamma-linolenowego, co w konsekwencji prowadziło do modyfikacji szlaków metabolicznych regulujących gospodarkę lipidową oraz węglowodanową tkanki wątrobowej. Opisane przez autorów rezultaty mogły dotyczyć zmian w poziomie ekspresji genów regulowanych przez PPAR α [144]. Ten sam materiał badawczy wykorzystał Tripathy [133] do sprawdzenia hipotezy, że wzrost aktywności Elovl5 w wątrobie hamuje rozwój hiperglikemii u chorych zwierząt. Wyniki badań wykazały, że poziom glukozy, insulina, wskaźnik insulinooporności HOMA-IR, a także tolerancja glukozy zostały przywrócone do stanu prawidłowego. Rezultaty przeprowadzonych badań pokazały zależność pomiędzy aktywnością reakcji elongacji oraz metabolizmu glukozy, które zachodzą w wątrobie. Opisane zmiany, jak tłumaczą autorzy, były wynikiem zmian w aktywności enzymów oraz czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w procesy glukoneogenezy. Badacze sugerują możliwość wykorzystania regulatorowej funkcji elongazy 5 w leczeniu hiperglikemii indukowanej dietą [133].

Moon i wsp. przedstawili wyniki badań przeprowadzonych u myszy pozbawionych genu Elovl 5. U tych zwierząt rozwinęło się stłuszczenie wątroby z powiększeniem organu oraz wzrostem stężenia cholesterolu i triacylogliceroli w surowicy krwi. Zmiany te zostały powiązane ze zwiększoną aktywacją białka wiążącego sekwencję odpowiedzi na sterole - 1c (SREBP-1c) oraz jego genów docelowych [96].

Ekspresja elongazy 5 została wykazana w większości tkanek u ludzi i szczurów. W przypadku tkanek ludzkich najwyższą ekspresję genu dla elongazy 5 stwierdzono w jądrach i nadnerczach, w mózgu, płucach i gruczole krokowym [71]. U szczurów ekspresję genu dla elongazy 5 wykazano w wątrobie, płucach, brunatnej tkance tłuszczowej, nerkach, sercu, w mniejszym stopniu w mózgu i skórze [142].

1.8.6. Elongaza 6

Elongaza 6 katalizuje elongację nasyconych i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Substratami są kwasy tłuszczowe zawierające od 12-18 atomów węgla w łańcuchu [58,84]. Stwierdzono, że specyficznym substratem dla tego enzymu jest reszta acylowa kwasu palmitynowego [142].

W badaniach Matsuzaka i wsp. wykazali ochronne działanie niedoboru Elovl 6 na rozwój insulinooporności u myszy z rozwiniętą otyłością i stłuszczeniem wątroby. Ponadto niedobór elongazy chronił zwierzęta przed rozwojem hiperinsulinemii, hiperglikemii oraz hiperleptynemii. Wskutek braku enzymu, uległ modyfikacji skład kwasów tłuszczowych, zmieniły się proporcje C16:1/C16:0 oraz C18:1/C18:0, co spowodowało uruchomienie kaskady zmian na poziomie molekularnym poprzez czynniki transkrypcyjne – SREBP, nie dopuszczając do rozwoju insulinooporności u otyłych zwierząt [69,84,85].

W ostatnich latach zostały podjęte pierwsze próby inhibicji aktywności elongazy 6 jako celu terapeutycznego w leczeniu cukrzycy. W zwierzęcych modelach otyłości indukowanej dietą oraz cukrzycy typu 2, badacze podając zwierzętom związek chemiczny z grupy indoledionów wykazali selektywną inhibicję elongazy 6 oraz zaobserwowali korzystne zmiany w składzie kwasów tłuszczowych w hepatocytach. Uzyskane z pionierskich badań wyniki potwierdzają przydatność badanego związku jako inhibitora dla ELOVL 6 [118,126].

Enzym występuje w większości tkanek, w szczególności w tkankach bogatych w lipidy takich jak brunatna i biała tkanka tłuszczowa, wątroba i mózg. Brak jest danych na temat badania ekspresji genu w tkankach ludzkich. W szczurzych tkankach ekspresja genu dla elongazy 6 została wykazana w mózgu, nerkach, wątrobie, sercu, płucach [58,142]. W mysich tkankach Elovl6 ulega ekspresji nadnerczach, wątrobie białej tkance tłuszczowej, brunatnej tkance tłuszczowej, mózgu, jądrach i skórze [84,86,95].

1.8.7. Elongaza 7

W warunkach fizjologicznych ekspresja Elovl7 jest obecna w nerkach, trzustce, nadnerczach i gruczole krokowym [127]. W roku 2009 Tamura opublikował wyniki badań, z których wynika, że w komórkach nowotworowych prostaty nadekspresja elongazy 7 może być powiązana ze wzrostem nowotworu poprzez metabolizm nasyconych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($C \geq 18$) oraz ich pochodnych. Elongaza 7 jako lipogeniczny enzym może pomóc w wyjaśnieniu powiązania pomiędzy dietą, a rozwojem raka prostaty [127].

1.9. Desaturazy

Desaturazy kwasów tłuszczowych - **EC 1.14.19** – to oksydoreduktazy katalizujące procesy powstawania podwójnych wiązań w specyficznych pozycjach w łańcuchu węglowym. Stopień nienasycenia kwasu tłuszczowego determinuje temperaturę topnienia triacylogliceroli jak również ma wpływ na fizyczne właściwości błon fosfolipidowych. Utrzymanie stabilnej struktury błon lipidowych warunkuje prawidłowe funkcjonowanie komórki.

Reakcje katalizowane przez desaturazy kwasów tłuszczowych wymagają obecności tlenu cząsteczkowego, NAD(P)H, systemu transportu elektronów oraz specyficznej desaturazy. System transportu elektronów występuje w dwóch układach albo jako reduktaza ferredoksyny – NADPH oraz ferredoksyna albo jako reduktaza cytochromu b5 oraz cytochrom b5.

Desaturazy można podzielić na dwie główne grupy. Pierwsza z nich to rozpuszczalne desaturazy acylo-ACP (*acyl-acyl carrier protein* –ACP), które występują w plastydach roślin, posiadają dwa atomy żelaza oraz dwa motywy sekwencji aminokwasów (EXXH), które służą utworzeniu kompleksów z jonami metalu. Układ transportu elektronów wykorzystywany w reakcjach desaturacji katalizowanych przez desaturazy acylo-ACP to reduktaza ferredoksyny – NADPH oraz ferredoksyna. Substratami dla tej grupy enzymów są nasycone kwasy tłuszczowe, przede wszystkim kwas stearynowy [100,139,148].

Desaturazy błonowe to druga grupa enzymów, które można następnie podzielić na dwie podgrupy takie jak desaturazy acylo-lipidowe oraz desaturazy acylo-CoA. Pierwsze z wymienionych białek enzymatycznych zlokalizowane są w tylakoidach cyjanobakterii oraz w plastydach roślin i jako nośnik elektronów wykorzystują układ ferredoksyny albo w retikulum endoplazmatycznym roślin, gdzie jako nośnik elektronów wykorzystują układ z cytochromem b5. Substratami dla tej podgrupy enzymów są kwas stearynowy oraz kwas oleinowy [100,139].

Drugą podgrupą błonowych desaturaz są zlokalizowane w błonie retikulum endoplazmatycznego desaturazy acylo-CoA wykorzystujące układ cytochromu b5 jako nośnika elektronów. Substratami dla tych enzymów są aktywne reszty acylowe kwasów tłuszczowych. Wszystkie desaturazy, które zostały zidentyfikowane u ssaków należą do desaturaz acylo-CoA.

Ekspresja genów dla desaturaz pozostaje pod kontrolą diety oraz hormonów i jest regulowana na poziomie transkrypcyjnym poprzez receptory jądrowe i czynniki transkrypcyjne. Aktywność białek enzymatycznych jest determinowana ekspresją genów [17,18,100,139].

Tab. 5. przedstawia zebrane dane dotyczące desaturaz u wybranych gatunków ssaków, ich oznakowanie, synonimy nazwy, numer ID oraz lokalizację na chromosomie, według Entrez Gene.

Tab. 5. Dane dotyczące desaturaz u wybranych gatunków ssaków, ich oznakowanie, synonimy nazwy, numer ID oraz lokalizacja na chromosomie według Entrez Gene.

Desaturaza	Organizm	Nazwa	ID Entrez Gene	Lokalizacja na chromosomie
FADS1	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	D5D; TU12; FADS6; FADSD5; LLCDL1; FLJ38956; FLJ90273; FADS1 OTTHUMP00000211568; delta(5) desaturase; delta(5) fatty acid desaturase; delta-5 desaturase; delta-5 fatty acid desaturase; linoleoyl-CoA desaturase (delta-6-desaturase)-like 1	3992	11q12.2-q13.1
Fads1	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>	D5D; delta(5) desaturase; delta(5) fatty acid desaturase; delta-5 desaturase	84575	1q43
Fads1	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	D5D; delta(5) desaturase; delta(5) fatty acid desaturase; delta-5 desaturase DSD; AI317215; MGC37858; 0710001O03Rik; A930006B21Rik; Fads1	76267	19
FADS2	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	delta(6) desaturase; delta(6) fatty acid desaturase; delta-6 desaturase; delta-6 fatty acid desaturase; delta-6-desaturase; linoleoyl-CoA desaturase (delta-6-desaturase)-like 2 D6D; DES6; TU13; FADSD6; LLCDL2; SLL0262; FADS2	9415	11q12.2
Fads2	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>	Fadsd6, MGC93365, D6D; delta(6) desaturase; delta(6) fatty acid desaturase; delta-6 desaturase; delta-6 fatty acid desaturase; fatty acid desaturase 6	83512	1q43
Fads2	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	2900042M13Rik, Fadsd2 D6D; delta(6) desaturase; delta(6) fatty acid desaturase; delta-6 desaturase; delta-6 fatty acid desaturase	56473	19 B
FADS3	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	CYB5RP; LLCDL3; FADS3 cytochrome b5-related protein; delta-9 fatty acid desaturase; delta-9-desaturase; linoleoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)-like 3	3995	11q12-q13.1
Fads3	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>		286922	1q43
Fads3	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	MNCb-0629, AI464531	60527	19 B

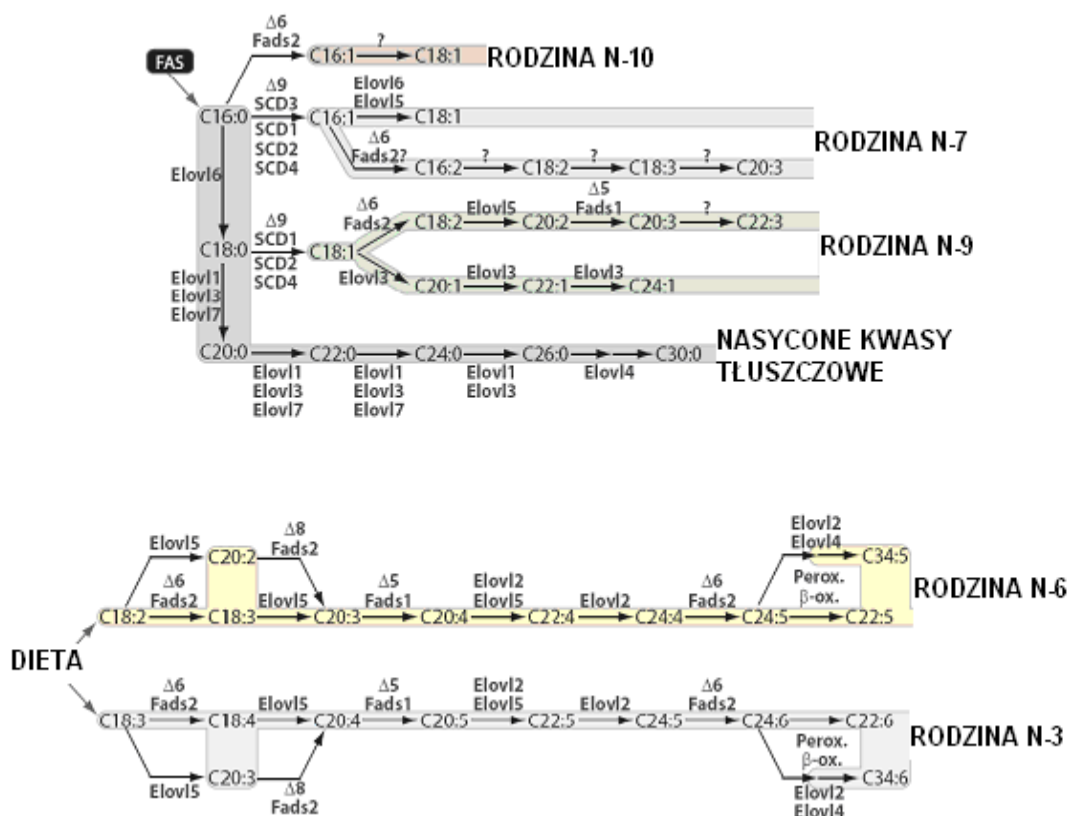
SCD	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	PRO1933, FADS5, MSTP008, SCD1, SCOS; OTTHUMP0000020280; acyl-CoA desaturase; delta(9)-desaturase; delta-9 desaturase; delta-9- desaturase; fatty acid desaturase; predicted protein of HQ0998; stearoyl-CoA desaturase opposite strand	6319	10q24.31
Scd	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>	Scd2, acyl-CoA desaturase 2; delta(9)-desaturase 2; delta-9 desaturase 2; fatty acid desaturase 2; stearoyl-CoA desaturase 2; stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	83792	1q54
Scd1	Szczur wędrowny <i>Rattus norvegicus</i>	acyl-CoA desaturase 1; delta(9)-desaturase 1; delta-9 desaturase 1; fatty acid desaturase 1; stearoyl-CoA desaturase 1	246074	1q54
Scd1	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	AA589638, AI265570, Scd, Scd-1, ab acyl-CoA desaturase 1; asebia; delta(9)-desaturase 1; delta-9 desaturase 1; fatty acid desaturase 1; stearoyl-CoA desaturase 1	20249	19
Scd2	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	Acyl-CoA desaturase 2 (Stearoyl-CoA desaturase 2) (Fatty acid desaturase 2) (Delta(9)-desaturase 2); acyl-CoA desaturase 2; delta(9)-desaturase 2; delta-9 desaturase 2; fatty acid desaturase 2; stearoyl-CoA desaturase 2	20250	19
Scd3	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	stearoyl-coenzyme A desaturase 3 4930513N16Rik, Pcd	30049	19
Scd4	Mysz domowa <i>Mus musculus</i>	ACOD4, MGC48154 stearoyl-CoA desaturase 4	329065	19
SCD5	Człowiek <i>Homo sapiens</i>	ACOD4, FADS4, FLJ21032, HSCD5, SCD2, SCD4 acyl-CoA-desaturase 4; stearoyl-CoA 9- desaturase; stearoyl-CoA desaturase 4	79966	4q21.22

Desaturazy są obecne u większości organizmów eukariotycznych, a u ssaków i ludzi jako desaturazy acylo-CoA, do których należą przede wszystkim $\Delta 5$, $\Delta 6$ oraz $\Delta 9$ desaturazy. Substratami reakcji desaturacji są zarówno endogenne oraz egzogenne kwasy tłuszczowe. Oznaczenie Δ w nazwie enzymu wskazuje na położenie atomu węgla od końca grupy karboksylowej w łańcuchu, przy którym jest formowane wiązanie podwójne [100,139].

1.9.1. $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturaza

$\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturaza są to transbłonowe enzymy katalizujące biosyntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Kodowane są przez geny odpowiednio: *Fads1* oraz *Fads2*. Substratami reakcji, katalizowanych przez desaturazy, są kwasy tłuszczowe posiadające od 16-24 atomów węgla w łańcuchu, z których najważniejsze są pochodzące z diety, kwas α -linolenowy i linolowy. Ponadto $\Delta 6$ desaturaza katalizuje

syntezę kwasu sapienowego (16:1, n-10), który jest głównym kwasem tłuszczowym obecnym w wydzielinie gruczołu łojowego u ludzi. Dla $\Delta 5$ desaturazy specyficznymi substratami są 20 węglowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Specyfika substratowa $\Delta 6$ desaturazy ogranicza się do kwasu palmitynowego oraz 18 i 24 węglowych PUFA [139].



Ryc. 5. Biosynteza długołańcuchowych kwasów tłuszczowych u ssaków [154].

Cechą wspólną błonowych $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturaz są dwie hydrofobowe domeny transbłonowe oraz trzy regiony bogate w motywy histydynowe (His box), które są odpowiedzialne za przyłączenie atomów żelaza oraz funkcjonują jako centrum katalityczne enzymu. Jedna reszta histydynowa jest zastąpiona przez resztę glutaminową, co jest konieczne dla prawidłowej aktywności enzymu. Interesująca w budowie desaturazy jest obecność domeny cytochromu b5 na N-końcu. Cytochrom b5 pojawił się na bardzo wczesnym etapie rozwoju w ewolucji i jest potrzebny do skutecznego przeprowadzenia reakcji desaturacji kwasów tłuszczowych. Jest to białko wiążące hem, zwykle związane z retikulum endoplazmatycznym. W komórce występuje jako składowy element kompleksów multienzymatycznych albo jako domena wbudowana w strukturę desaturazy. $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturaza są przykładem

zmodyfikowanych białek, które na drodze ewolucyjnej fuzji, posiadają domenę cytochromu b5 wbudowaną na N-końcu cząsteczki. Połączenie desaturazy i cytochromu b5 umożliwiło szybszy i bezpośredni transfer elektronów do katalitycznego miejsca desaturazy, usprawniając przebieg całego procesu [42,139].

Geny dla $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy zostały sklonowane u człowieka, szczura oraz myszy. Gen dla $\Delta 6$ desaturazy po raz pierwszy został sklonowany u sinic. Ludzkie geny dla $\Delta 5$ (FADS1) i $\Delta 6$ (FADS2) desaturazy zostały sklonowane pod koniec lat dziewięćdziesiątych [17,18]. Ekspresję mRNA dla $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy stwierdzono w większości tkanek ludzkich, z najwyższym poziomem w wątrobie, sercu oraz mózgu [113,139]. U szczurów wykazano ekspresję mRNA dla $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy na podobnym poziomie dla obu genów w tkankach takich jak wątroba, nerki, mózg, płuca i aorta [108].

FADS3, produkt genu *Fads3*, jest nową poznaną desaturazą. Skład aminokwasowy wskazuje na wysokie podobieństwo FADS3 do $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy. Funkcja nie została poznana. Ekspresja ludzkiego mRNA *Fads3* została stwierdzona w mózgu, łożysku, jajnikach, komórkach β -trzustki, skórze oraz w mózgu u płodu [139]. Pedrono i wsp. po raz pierwszy zaprezentowali wyniki badań obecności transkryptu dla *Fads3* w szczurzych tkankach z najwyższym poziomem w płucach, białej tkance tłuszczowej, aorcie, śledzionie, sercu i nerkach [108].

Badanie ekspresji białka FADS3 w ludzkich hodowlach komórkowych, tkankach szczurzych i mysich wykazało obecność wielu izoform białka FADS3, z różnym poziomem ekspresji oraz specyfiką tkankową, zależnymi od płci oraz gatunku. Uzyskane dane sugerują także, że poziom transkryptu nie koreluje z poziomem białka [108].

$\Delta 6$ desaturaza jest kluczowym enzymem w syntezie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Produktami reakcji desaturacji są m.in. kwas arachidonowy (20:4n-6), kwas ikozapentaenowy (EPA) oraz kwas dokozaheksaenowy (DHA). Pierwszy z wymienionych kwasów jest substratem w syntezie ikozanoidów, które biorą udział w regulacji procesów krążenia oraz filtracji nerkowej, w transdukcji sygnału oraz procesach krzepnięcia krwi. Kwas ikozapentaenowy jest istotny ze względu na właściwości antytrombotyczne oraz działanie ochronne na serce, natomiast DHA jest potrzebny dla prawidłowego rozwoju mózgu, narządu wzroku oraz spermatocytów [102].

Badania z zakresu poznania mechanizmu działania $\Delta 6$ desaturazy w różnych modelach badawczych wskazały istotny udział enzymu w utrzymaniu homeostazy lipidowej oraz prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Williard i wsp. wykazali związek pomiędzy niedoborem $\Delta 6$ desaturazy, a zaburzeniami metabolizmu lipidów. Materiał do badań stanowiły fibroblasty skóry pobrane od pacjentki, u której zaobserwowano wrodzone nieprawidłowości objawiające się obecnością owrzodzeń rogówki, nietolerancji pokarmu, zaburzeń wzrostu, fotofobii oraz nieprawidłowościami m.in. w skórze oraz w mieszkach włosowych. Badania wykazały, że brak enzymu $\Delta 6$ desaturazy jest odpowiedzialny za wystąpienie zaburzeń, w skutek spadku syntezy kwasu arachidonowego, dokozapentaenowego (DPA) oraz kwasu dokozaheksaenowego (DHA) [149]. W celu poznania podłoża molekularnego opisanego zaburzenia Nwankwo wraz ze współpracownikami przeprowadził w 2003 roku badania. Wykorzystując hodowle komórek fibroblastów ludzkich prawidłowych, komórek fibroblastów ludzkich patologicznych (brak enzymu) oraz komórek fibroblastów mysich NIH/3T3 wykazano, że za niedobór $\Delta 6$ desaturazy odpowiedzialna jest insercja nukleotydu adeninowego w sekwencji promotora genu dla tego enzymu [102]. Wyniki tego doświadczenia wskazały na istotny mechanizm regulacji na poziomie transkrypcji, który może być podobny również dla innych desaturaz.

Zmiany składu kwasów tłuszczowych wynikające z dysfunkcji $\Delta 6$ desaturazy w obrębie różnych tkanek były przedmiotem badań dwóch zespołów kierowanych przez Stroud'a i Stoffel'a [122,123]. Wykorzystując różne szczepy myszy, nokautowanych pod względem genu dla $\Delta 6$ desaturazy, badacze wykazali różnice co do ilości i jakości kwasów tłuszczowych występujących w badanych tkankach. Brak enzymu powodował nieprawidłowości w szlakach metabolicznych lipidów, co w konsekwencji prowadziło do rozwoju owrzodzeń skóry, owrzodzeń w obrębie jelita cienkiego oraz splenomegalii. Wyniki eksperymentów obu grup wykazały również zaburzenia w reprodukcji wynikające z niedoboru $\Delta 6$ desaturazy [45,122,123].

W różnych modelach doświadczalnych wykazano, że spadek aktywności $\Delta 6$ desaturazy powodował obniżenie poziomu kwasu arachidonowego (*arachidonic acid*, AA) w tkankach oraz w osoczu, co hamowało rozwój stanu zapalnego. W skutek spadku stężenia prekursora - AA, spowolniony został proces syntezy ikozanoidów, mediatorów stanu zapalnego. W zwierzęcym modelu obrzęku, opisane zmiany korelowały ze zmniejszeniem zmian obrzękowych. W przypadku raka jelita grubego,

w mysim modelu tego typu nowotworu, spadek aktywności $\Delta 6$ desaturazy skutkował zmniejszeniem rozmiaru guza oraz zmniejszeniem przerzutowania [89].

Zmiany w aktywności desaturacji kwasów tłuszczowych oraz związane z tym modyfikacje w obrębie składu kwasów tłuszczowych zostały wykazane w takich stanach patologicznych jak insulinooporność, cukrzyca, syndrom metaboliczny [21,140], hipertriglicerydemia [23] oraz w zaburzeniach afektywnych dwubiegunowych [78].

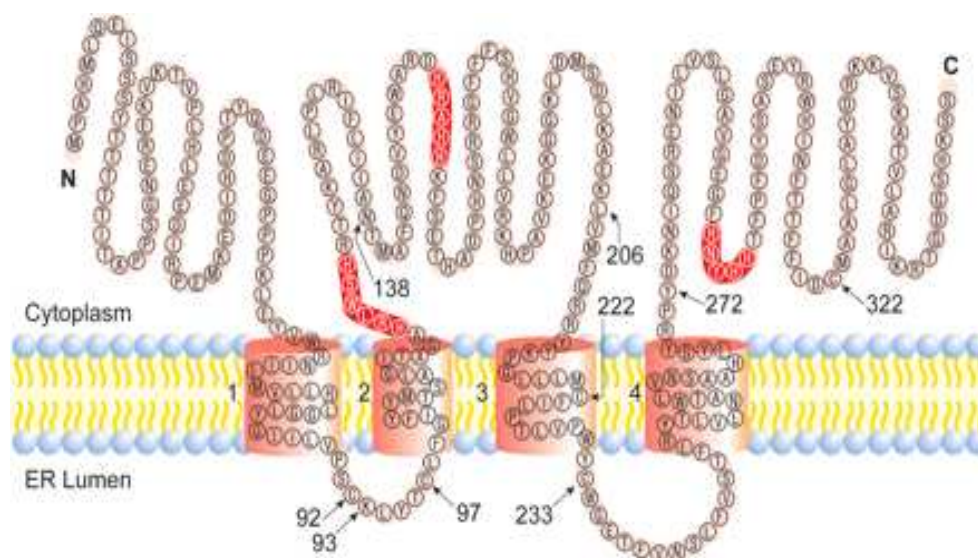
W ostatnich latach prowadzone były badania na temat występowania różnych wariantów genetycznych w genach dla desaturaz w obrębie różnych grup etnicznych. Wyniki doświadczeń wykazały obecność licznych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (*single nucleotide polymorphism*, SNP) wpływające na aktywność desaturaz, a tym samym na modyfikacje składu kwasów tłuszczowych, zarówno w osoczu, jak i w obrębie kwasów tłuszczowych błon krwinek czerwonych. Każda zmiana w sekwencji genu skutkowała odmiennym profilem kwasów tłuszczowych. Fakt ten, naukowcy starali się przełożyć na indywidualną predyspozycję do rozwoju schorzeń takich jak choroba niedokrwienna serca czy zapalenie mięśnia sercowego. Ponadto zaobserwowano charakterystyczne zmiany w SNP w obrębie genów FADS, a okresem karmienia piersią, okresem ciąży oraz rodzajem spożywanego pokarmu. Dalsze badania są prowadzone, w celu wyjaśnienia molekularnych mechanizmów oraz czynników pokarmowych regulujących ekspresję genów FADS. W zależności bowiem od wariantów genetycznych, wymagania dotyczące dostarczania PUFA z dietą, aby uzyskać porównywalne efekty biologiczne mogą się różnić [12,41,83,89,116].

1.9.2. $\Delta 9$ desaturaza

$\Delta 9$ desaturaza, u ssaków występuje także pod nazwą desaturazy stearylo-CoA (*stearylo-CoA desaturase*, SCD), katalizuje biosyntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Substratami reakcji są nasycone kwasy tłuszczowe, a z pośród nich najbardziej preferowane są aktywne reszty acylowe kwasu palmitynowego oraz stearynowego. Wprowadzenie podwójnego wiązania obligatoryjnie rozpoczyna się od usunięcia atomu wodoru najpierw przy węglu C9, a następnie drugiego atomu wodoru przy węglu C10 kwasu tłuszczowego [106]. Powstałe jednonienasycone kwasy tłuszczowe wykorzystywane są w komórkach do syntezy różnych związków lipidowych

takich jak błonowe fosfolipidy, triacyloglicerole oraz estry cholesterolu [100,139]. Kwas palmitooleinowy oraz oleinowy są głównymi produktami reakcji katalizowanej przez $\Delta 9$ desaturazę. Kwas oleinowy jest podstawowym jednonienasyconym kwasem tłuszczowym w ludzkiej tkance tłuszczowej oraz we frakcji fosfolipidów błonowych w erytrocytach. Wzajemna proporcja pomiędzy nasyconymi i jednonienasyconymi kwasami tłuszczowymi wpływa na skład fosfolipidowy błon. Wystąpienie modyfikacji strukturalnej w obrębie błon komórkowych, w skutek zmiany stosunku MUFA/SFA, może być związane z rozwojem różnych stanów patologicznych takich jak choroby sercowo-naczyniowe, otyłość, cukrzyca, choroby neurologiczne oraz nowotwory [100,106,139].

Topologiczny model mysiej $\Delta 9$ desaturazy (ryc. 6.) opisuje ukierunkowanie końców NH_2 i COOH cząsteczki enzymu w stronę cytoplazmy oraz obecność czterech domen transbłonowych. Dodatkowo, trzy regiony, zawierające łącznie osiem reszt histydynowych, tworzą His box, który jest odpowiedzialny za przyłączenie atomów żelaza w centrum katalitycznym desaturazy [81].



Ryc. 6. Topologiczny model mysiej $\Delta 9$ desaturazy [81].

Po raz pierwszy identyfikacji desaturazy dokonał Strittmatter w 1974 roku, wykorzystując szczurzą wątrobę. Pionierskie badania sklonowania genów dla Scd1 i Scd2 - izoform $\Delta 9$ desaturazy zostały podjęte u gryzoni w latach osiemdziesiątych. Rozpoczęcie badań dotyczących ekspresji i regulacji genów dla desaturaz było możliwe dopiero pod koniec lat dziewięćdziesiątych, kiedy badacze Cho oraz Clarke sklonowali

ludzkie geny dla $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturazy [17,18]. U człowieka zidentyfikowano dwie izoformy genu dla $\Delta 9$ desaturazy oznaczone jako SCD1 i SCD5. W genomie myszy wykazano obecność czterech izoform $\Delta 9$ desaturazy, które określono jako Scd1, Scd2, Scd3 oraz Scd4. Z kolei u szczura zostały sklonowane dwie izoformy genu dla $\Delta 9$ desaturazy oznaczone jako Scd1 oraz Scd2 [45,106,139].

Ekspresja opisywanych enzymów podlega regulacji pod wpływem czynników takich jak rozwój, dieta, hormony oraz czynniki środowiskowe [139]. W warunkach fizjologicznych, wysoką ekspresję mRNA dla mysiej Scd1 zaobserwowano w wątrobie, w białej tkance tłuszczowej, w brunatnej tkance tłuszczowej, w gruczołach tarczowych. Pod wpływem diety wysokowęglowodanowej zaobserwowano znaczący wzrost w ekspresji izoformy Scd1 w wątrobie i sercu. Ekspresja Scd1 w wątrobie u myszy uległa aktywacji po okresie karmienia piersią, natomiast we wcześniejszym okresie rozwoju przeważał transkrypt dla Scd2 [26,92,139]. W doświadczeniu Miyazaki wykorzystał nokautowane myszy pod względem genu dla Scd2 i wykazał, że izoforma druga stearylo-CoA desaturazy była konieczna dla prawidłowej syntezy lipidów we wczesnym okresie rozwoju skóry i wątroby zwierząt [92]. Ekspresja Scd2 ulega nasileniu głównie w mózgu i podlega indukcji w okresie mielinizacji u noworodków. Ponadto mRNA dla Scd2 stwierdzono w komórkach B limfocytów, której spadek był zaobserwowany w czasie rozwoju limfocytów T. Scd2 ulega słabszej, w porównaniu do Scd1 ekspresji w tkance tłuszczowej, w nerkach, w śledzionie, w mięśniach szkieletowych, w sercu i w płucach. Ekspresja Scd2 w wątrobie jest wysoka w czasie rozwoju płodowego oraz u noworodków, natomiast ulega obniżeniu u dorosłych osobników. W skórze, w niezróżnicowanych sebocytach wykazano ekspresję dla Scd1, natomiast w zróżnicowanych sebocytach wykazano transkrypt dla Scd3. Ekspresję Scd2 stwierdzono w mieszkach włosowych w skórze myszy. Obecność mRNA dla Scd1, Scd2, Scd3 zaobserwowano w skórze, gruczole napletkowym oraz gruczole Harderiana. Izofорма Scd4 ulega ekspresji głównie w sercu [59,92,106]. W tkankach ludzkich izoforma SCD1 ulega ekspresji w większości tkanek, natomiast najwyższy poziom ekspresji dla izoformy SCD5 stwierdzono w mózgu i trzustce [45]. U szczurów ekspresję izoformy Scd1 wykazano w wątrobie i tkance tłuszczowej, natomiast ekspresję Scd2 stwierdzono w mózgu, śledzionie, sercu, limfocytach oraz płucach [17].

Miyazaki i wsp., wykorzystując analizę kwasów tłuszczowych, przedstawił specyfikę substratową dla każdej z mysich izoform $\Delta 9$ desaturazy. Dla SCD1, SCD2 i

SCD4 substratami był zarówno łańcuch acylowy kwasu palmitynowego jak i stearynowego. Natomiast substratem dla SCD3 okazał się tylko 16:0-CoA i w oparciu o te wyniki autorzy zasugerowali nową nazwę dla mysiej izoformy SCD3 jako palmitoilo-CoA desaturazę (PCD1) [92]. Fizjologiczna rola każdej z izoform oraz przyczyna występowania kilku izoform nadal jest przedmiotem badań.

Nokautowane myszy pod względem opisanych genów (np. SCD1^{-/-}) są dotąd najlepszym i jednocześnie najczęstszym modelem doświadczalnym wykorzystywanym w celu określenia wpływu różnych czynników na poziom ekspresji genów dla desaturazy stearylo-CoA. W wątrobie brak aktywnego genu u myszy spowodował obniżenie syntezy triacylogliceroli i estrów cholesterolu oraz spowolnienie syntezy kwasów tłuszczowych *de novo*. Ponadto u tych zwierząt w osoczu zaobserwowano niski poziom triacylogliceroli we frakcji VLDL oraz LDL cholesterolu. Myszy z nieaktywnym genem *Scd1* były odporne na rozwój stłuszczenia wątroby oraz otyłości indukowanej dietą wysokowęglowodanową lub dietą wysokolipidową. W mięśniach modyfikowanych genetycznie zwierząt (SCD1^{-/-}) zaobserwowano wzmożoną aktywność procesu β -oksydacji kwasów tłuszczowych. Zwiększenie utleniania kwasów tłuszczowych obniżyło poziom wolnych kwasów tłuszczowych, aktywnych reszt acylowych oraz ceramidów w mięśniach szkieletowych. Opisanie zmiany w obrębie wątroby i mięśni były najprawdopodobniej regulowane allosterycznie poprzez fosforylację i defosforylację kinaz AMP (AMP-activated protein kinase, AMPK). Mechanizm działania AMPK, który inaktywuje karboksylazę acetylo-CoA, powodował obniżenie syntezy malonylo-CoA. Niskie stężenie tego związku, który jest allosterycznym inhibitorem CPT-1, powodował zwiększony transport kwasów tłuszczowych do mitochondriów, a następnie ich utlenienie [26]. W brunatnej tkance tłuszczowej myszy nokautowanych pod względem genu dla *Scd1* zaobserwowano wzrost termogenezy, na skutek zwiększonej ekspresji i aktywności termogeniny (UCP-1), która powodowała rozpręganie łańcucha oddechowego, uwalniając nagromadzoną energię w postaci ciepła. Konsekwencją opisanych zmian był spadek lipogenezy, wzrost utleniania kwasów tłuszczowych oraz wzrost termogenezy, które hamowały rozwój stłuszczenia wątroby, przyspieszały metabolizm, zwiększały wrażliwość na insulinę, chroniąc w ten sposób organizm przed rozwojem otyłości oraz syndromu metabolicznego [26,27,34, 106].

W badaniach z ostatnich lat, Liu i wsp. wykazali, że brak genu *Scd1* w obrębie mysiej tkanki tłuszczowej spowolnił rozwój stanu zapalnego i wpłynął na jego regulację

także w makrofagach i komórkach nabłonka [77]. Dalsze badania są konieczne w celu wyjaśnienia precyzyjnego mechanizmu regulacji, która jest istotna w rozwoju chorób metabolicznych.

Sjögren i wsp. przeprowadzili badania w ludzkiej tkance tłuszczowej, w celu poznania współzależności pomiędzy ekspresją genów dla Scd, indeksem desaturacji oraz insulinoopornością. Wyniki badań sugerują, że indeks desaturacji wyrażony stosunkiem kwasu 18:1/18:0 odzwierciedla poziom ekspresji Scd. Zwiększona ekspresja genu prowadzi do większej aktywności SCD w tkance tłuszczowej, której może towarzyszyć rozwój insulinooporności [119].

Wpływ desaturazy stearylo-CoA na homeostazę lipidową organizmu jest istotny, stąd od kilku lat naukowcy sugerują wykorzystanie białka jako markera terapeutycznego w leczeniu otyłości i zespołu metabolicznego [26,27,34,106].

Interesujące wnioski przedstawił Ford między innymi o znaczeniu nasyconych kwasów tłuszczowych oraz desaturazy stearylo-CoA w starzeniu się komórek. Autor wskazał na związek procesu starzenia się komórek, a w tym zaprzestanie podziałów oraz zaburzenia struktury i funkcji organelli, a procesem starzenia całego organizmu. Głównym mediatorem wspomnianych procesów jest gen p53. W starzejących się komórkach, o skróconych telomerach, wykazano wzrost aktywności genu, który spowodował zaprzestanie dalszych podziałów komórkowych. Białko p53 jest ponadto kluczowym supresorem nowotworowym. Usunięcie genu lub obecność mutacji w genie p53 umożliwia niekontrolowany wzrost komórek nowotworowych. Aktywacja p53 powoduje zmiany w metabolizmie kwasów tłuszczowych takie jak obniżenie ekspresji zarówno syntazy kwasu tłuszczowych oraz desaturazy stearylo-CoA. Efektem takiego działania jest podwyższony poziom kwasu palmitynowego w komórkach, co indukuje apoptozę lub proces starzenia się. Stwierdzono, że starzenie się pojedynczych komórek i całego organizmu powodują te same mechanizmy, które chronią przed rozwojem nowotworu [37].

1.10. Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji

Struktura kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład komórek ssaków, podlega modyfikacjom w procesach elongacji oraz desaturacji. Reakcje biosyntezy długołańcuchowych nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych angażują elongazy i desaturazy. Ekspresja genów dla tych enzymów pozostaje pod kontrolą diety

i hormonów [15,21,72,95,139]. Promotory genów dla elongaz i desaturaz zawierają sekwencje rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne, które wiążąc się z DNA umożliwiają rozpoczęcie transkrypcji. Jest to mechanizm, który pozwala organizmom wyższym regulować metabolizm, bez potrzeby zwiększania liczby genów. Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji jest procesem złożonym i niejednokrotnie wymaga obecności wielu czynników jednocześnie. W grupie czynników transkrypcyjnych wyróżnić można receptory jądrowe, które przez przyłączanie specyficznych ligandów, regulują ekspresję licznych genów [2,139].

Regulacja ekspresji genów dla elongaz i desaturaz angażuje przede wszystkim czynniki transkrypcyjne takie jak białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole (*sterol regulatory element-binding proteins* - *SREBP*), receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomalne (*peroxisome proliferator-activated receptors* - *PPAR*), białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany (*carbohydrate-responsive element-binding protein* - *ChREBP*) oraz wątrobowy receptor X (*liver X receptor* - *LXR*) [59,62,63,139].

Białko wiążące element odpowiedzi na sterole (*sterol regulatory element-binding proteins*, *SREBP*) wpływa na ekspresję docelowych genów poprzez przyłączenie do sekwencji SRE (sterol regulatory element) na nici DNA. Białka *SREBP* należą do rodziny tzw. heliks-pętla-heliks – suwak leucynowy (*basic helix-loop-helix - leucine zipper- bHLH - LZ*) czynników transkrypcyjnych, w których pierwszy motyw białkowy - bHLH jest odpowiedzialny za tworzenie dimerów, natomiast suwak leucynowy - LZ wiąże między sobą czynniki transkrypcyjne. Trzy izoformy białek *SREBP* są znane u ssaków, oznaczone jako *SREBP-1a*, *1c* oraz *2*. *SREBP-1a* oraz *SREBP1c* kodowane są przez gen *Srebfl*, natomiast *SREBP-2* jest produktem genu *Sreb2*. Białko *SREBP* jest syntetyzowane w postaci nieaktywnego prekursora związanego z błoną siateczki śródplazmatycznej (ER). W ER prekursorowa postać *SREBP* tworzy kompleks z obecnym w błonie białkiem SCAP (*SREBP cleavage activating protein*). Białko to uczestniczy w transporcie postaci prekursorowej do aparatu Golgiego, gdzie dochodzi do hydrolizy nieaktywnej postaci *SREBP* z udziałem kolejno proteazy S1P i proteazy S2P. Uwolniona N-terminalna domena białka *SREBP* tworzy dimery i w tej postaci stanowi aktywny czynnik transkrypcyjny. W jądrze komórkowym aktywna postać białka wiąże się do sekwencji odpowiedzi na sterole (SRE) lub sekwencji do niej podobnych (SRE-like), które są obecne w rejonach regulatorowych wielu genów. *SREBP-1c* aktywuje transkrypcję genów

zaangażowanych w syntezę kwasów tłuszczowych takich jak np. ACC lub FAS. Izoforma SREBP2 indukuje geny biorące udział w syntezie i metabolizmie cholesterolu, natomiast izoforma SREBP-1a dzieli funkcje obu wymienionych izoform [50,54,62,139].

Aktywność SREBP jest kontrolowana przez komórkowe stężenie steroli. Gdy poziom steroli spada, cięcie proteolityczne w cząsteczce prekursora SREBP uwalnia aktywne białko, które indukuje cholesterogeniczne geny i utrzymuje homeostazę cholesterolu [145]. Opisana regulacja transkrypcji genów jest właściwa dla izoform SREBP- 1a i SREBP- 2, które występują w większości tkanek. SREBP-1c występuje przede wszystkim w tkankach lipogenicznych takich jak wątroba oraz tkanka tłuszczowa. Ekspresja tej izoformy jest indukowana przez insulinę przy udziale czynnika LXR oraz ulega inhibicji przez PUFA [138]. Brak aktywności spowodowanej przez PUFA odbywa się w trojaki sposób, a mianowicie przez obniżenie transkrypcji SREBP-1c z udziałem LXR, przez wzrost degradacji białka oraz przez zwiększony rozpad mRNA dla SREBP-1c [11,24,28,54,62,106,139,151].

Spośród genów dla elongaz i desaturaz, sekwencje SRE w promotorze posiadają Elovl5, Elovl6, $\Delta 5$ desaturaza, $\Delta 6$ desaturaza oraz desaturaza stearylo-CoA [45,100,110,139].

Receptory aktywowane przez proliferatory peroksisomalne (*peroxisome proliferator-activated receptors* – PPAR) pełnią rolę ligandozależnych czynników transkrypcyjnych, które regulują ekspresję licznych genów związanych z metabolizmem węglowodanów, lipidów i białek, a ponadto regulują procesy biologiczne, takie jak rozwój i różnicowanie komórek, nowotworzenie, stany zapalne i gojenie się ran. Wyróżnia się trzy rodzaje receptorów takie jak PPAR- α (NR1C1), PPAR- δ (poprzednio PPAR- β , także NR1C2, NUC-1 lub FAAR) oraz PPAR- γ (NR1C3). PPAR- α odpowiada za katabolizm lipidów i ich przemiany wewnątrzkomórkowe, ponadto odgrywa kluczową rolę w adaptacji hepatocytów w warunkach głodu [105,107]. PPAR- δ bierze udział w metabolizmie lipidów, w rozwoju i proliferacji komórek nabłonka, mielinizacji spoidła wielkiego mózgu oraz pośredniczy w implantacji zarodka. PPAR- γ pełni natomiast ważną rolę w różnicowaniu i dojrzewaniu adipocytów, magazynowaniu glukozy i lipidów oraz w stanach zapalnych [62,109]. Mechanizm działania receptorów PPAR wykazuje trojaki sposób. Pierwsza możliwość to przyłączenie ligandu do receptora, następnie utworzenie heterodimeru z retinowym receptorem X (RXR). Powstały kompleks umożliwia aktywację procesu transkrypcji

przez związanie z fragmentem sekwencji odpowiedzi na proliferator peroksysomów PPRE (PPAR response element – element odpowiedzi na PPAR) w docelowym genie. Drugi sposób to połączenie receptora PPAR z ligandem, ale bez utworzenia kompleksu z RXR, co uniemożliwia połączenie z DNA i hamuje transkrypcję. Trzeci możliwy mechanizm to związanie PPAR z RXR, ale bez wcześniejszego przyłączenia ligandu. Powstały heterodimer wiąże się następnie z PPRE prowadząc do zahamowania ekspresji docelowych genów [105,153]. Ekspresja białka jest indukowana w warunkach głodu oraz pod wpływem nasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast pod wpływem insuliny ekspresja ulega obniżeniu [107,111,138].

Ligandy dla receptorów PPAR są powszechnie wykorzystywane w celach farmakologicznych. Fibraty, stosowane jako leki hipoglikemiczne wiążą się z izoformą PPAR α . U pacjentów z insulinoopornością wykorzystuje się w terapii tiazolidinediony (glitazony), które zwiększają komórkowe działanie insuliny poprzez aktywację receptorów PPAR γ głównie w tkance tłuszczowej i mięśniowej, przez co poprawiają metabolizm lipidów oraz transport glukozy do komórki. Efektem jest zmniejszenie insulinooporności, obniżenie poziomu glikemii oraz obniżenie stężenia lipidów [62,105].

Spośród genów dla elongaz i desaturaz, sekwencje PPRE w promotorze posiadają Elov13, Elov15, Elov16, Elov17, Δ 5 desaturaza, Δ 6 desaturaza oraz desaturaza stearylo-CoA [45,105,111,139].

Białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany (*carbohydrate-responsive element-binding protein* – ChREBP) jest stosunkowo nowym, należącym do rodziny heliks-pętla-heliks – suwak leucynowy bHLH –LZ czynnikiem transkrypcyjnym. Białko ChREBP jest głównym mediatorem w indukcji transkrypcji genów kodujących enzymy zaangażowane w przemiany glikolityczne oraz lipogeniczne [56]. Dystrybucja ChREBP obejmuje większość tkanek, a najwyższą ekspresję białka stwierdza się w wątrobie, białej i brunatnej tkance tłuszczowej, jelicie cienkim, nerkach, mięśniach oraz w trzustce [53]. Badania z ostatnich lat opisują aktywne działanie białka ChREBP tylko w postaci heterodimeru z białkiem Mlx (Max-like factor X). Glukoza aktywuje białko ChREBP. Katabolizm glukozy dostarcza glukozo-6-fosforanu i ksylulozo-5-fosforanu, pod wpływem którego uaktywnia się fosfataza białkowa 2A delta (PP2Adelta), która defosforyluje nieaktywną formę ChREBP. Aktywna postać białka jest następnie transportowana do jądra, ulega dimeryzacji z białkiem Mlx i aktywuje geny docelowe, zawierające sekwencje

odpowiedzi na węglowodany – ChoRE. Dodatkowo, sam gen dla ChREBP posiada w promotorze sekwencję odpowiedzi na wątrobowy receptor X, do której przyłącza się LXR aktywowany przez glukozę i insulinę. PUFA, glukagon, adrenalina oraz cykliczny AMP (*cyclic adenosine monophosphate, cAMP*) hamują aktywność czynnika ChREBP. Wzrost stężenia glukagonu stymuluje syntezę cAMP aktywując białkową kinazę PKA, która fosforyluje i inhibuje ChREBP. W przypadku PUFA inhibicja odbywa się na trzech etapach takich jak zwiększony rozpad mRNA dla ChREBP, zaburzona translokacja czynnika z cytozolu do jądra oraz modyfikacja aktywności białka [24,53,79,80,137]. Wiadomo, że nadwyżka energii jest magazynowana w postaci TAG, których nadmiar prowadzi do otyłości, insulinooporności, ostatecznie rozwijając objawy zespołu metabolicznego. Dokładne poznanie funkcji białka ChREBP, które kontroluje przemiany węglowodanowo-lipidowe, jest czynnym przedmiotem badań w kierunku prewencji rozwoju insulinooporności i zespołu metabolicznego [53].

Spośród genów dla elongaz i desaturaz, sekwencje ChoRE w promotorze posiada tylko desaturaza stearylo-CoA [139,143].

Wątrobowy receptor X (liver X receptor - *LXR*) należy do jądrowych receptorów, który bierze udział w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w syntezę kwasów żółciowych i lipidów, absorpcji glukozy oraz zwrotny transport cholesterolu. [62]. Wyróżnia się dwie izoformy receptora oznaczonych jako *LXR α* (NR1H3) i *LXR β* (NR1H2). Ekspresję *LXR α* stwierdzono w wątrobie, tkance tłuszczowej oraz w makrofagach, natomiast dystrybucja *LXR β* obejmuje większość tkanek [39]. Receptory *LXR* działają jak sensory i w komórce, w warunkach nagromadzenia oksysteroli (utlenionych metabolitów cholesterolu) jako efekt zwiększenia stężenia substratu, *LXR* indukuje transkrypcję genów, które chronią przed przeładowaniem komórek cholesterollem. Działanie *LXR* polega na utworzeniu heterodimeru z *RXR* i związaniu z elementem odpowiedzi na *LXR* (*LXR RE*) w genie docelowym. Naturalnymi indukującymi ligandami są metabolity cholesterolu. Efektem aktywacji genów, pozostających pod kontrolą *LXR* jest wzrost syntezy kwasów żółciowych, które razem z cholesterollem zostają następnie wydzielone do żółci. Naturalnym ligandem dla receptora *LXR* jest także glukoza, która wykazuje niskie powinowactwo do receptora i może regulować aktywność jego transkrypcji w fizjologicznym stężeniu [91]. Genem docelowym dla *LXR* jest także *SREBP-1c*, który w sekwencji promotora posiada miejsce wiązania *LXRE*. Aktywacja genu *SREBP-1c* poprzez udział receptora *LXR* zwiększa produkcję VLDL i dostarcza kwasów tłuszczowych do budowy fosfolipidów,

niezbędnych składników żółci [2,10,75,139,150,156]. Poznanie, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patofizjologicznych, dokładnego mechanizmu działania receptora LXR jest celem prowadzonych badań ze względu na rolę receptora w metabolizmie lipidów i węglowodanów, a powiązanymi z tym metabolizmem schorzeniami takimi jak na przykład dyslipidemia, choroby serca, miażdżyca oraz choroby metaboliczne [32,39,61,129]. Ekspresja LXR jest kontrolowana przez poziom insuliny, której wzrost stymuluje syntezę receptora. Antagonistami receptora są PUFA [138].

Spośród genów dla elongaz i desaturaz, sekwencje LXRE w promotorze posiadają Elov16, $\Delta 5$ desaturaza, $\Delta 6$ desaturaza oraz desaturaza stearylo-CoA [139,142,143].

Tab. 6. Regulacja ekspresji genów dla elongaz i desaturaz przez czynniki transkrypcyjne; czynniki indukujące oraz inhibujące proces transkrypcji.

ENZYM	CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY	INDUKCJA	INHIBICJA
ELOVL1	LXR PPAR α SREBP-1c	głódzenie/karmienie, agoniści PPAR glukoza, fruktoza, insulina, [57,142,143]	-
ELOVL2	SREBP-1a	nadekspresja SREBP-1a [51]	-
ELOVL3	LXR SREBP1a i 1c PPAR	noradrenalina, glukokortykoidy, androgeny i estrogeny [3,13,57,60]	agonista LXR TO- 901317 [57]
ELOVL4	-	-	-
ELOVL5	LXR SREBP-1c PPAR α	agoniści PPAR [139,142,110]	PUFA [139,110]
ELOVL6	LXR SREBP-1 PPAR α	głódzenie/karmienie, agoniści PPAR glukoza, fruktoza, insulina, T3, glukokortykosterydy [95,96,142,143]	adrenalina, glukagon, PUFA [62,86]
ELOVL7	-	-	-
D5D	PPAR α SREBP1c	cholesterol, insulina [94,112] fibraty [49,113] niedobory niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych [73]	PUFA [113,139]
D6D	PPAR α SREBP1c	insulina [94,112] fibraty -WY14643 [49,113] niedobory niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych [73]	PUFA [113,139]
SCD	ChREBP SREBP1c LXR	fruktoza, glukoza, sacharoza, insulina, T3, glukokortykosterydy [34,59,62,92,94,106] nasycone kwasy tłuszczowe [93]	adrenalina, glukagon, PUFA, nasycone kwasy tłuszczowe [138] [70,34] Leptyna [139]

Ze względu na wyspecjalizowane działanie doboru naturalnego skierowanego na preferencje takich kierunków metabolizmu komórkowego, które umożliwiają nagromadzenie jak największych ilości materiałów zapasowych w komórkach celem przetrwania niekorzystnych warunków środowiskowych doszło do wykształcenia populacji osobników szczególnie narażonych na współcześnie nas dotykające choroby cywilizacyjne takie jak otyłość, cukrzyca, insulinooporność, zespół metaboliczny oraz choroby układu sercowo-naczyniowego. Faworyzowane geny stały się dziś przyczyną poważnych chorób. Przy współczesnym modelu żywieniowym bardzo łatwo następuje skierowanie metabolizmu na tory patologicznego magazynowania nadmiaru dostarczonej energii. Poznanie mechanizmu wzajemnych interakcji substrat-szlak metaboliczny-produkt pozwoli zbliżyć się do stworzenia modelu żywieniowego umożliwiającego wyeliminowanie tendencji wzrostowych zapadalności na choroby cywilizacyjne. Istotnym zatem wydaje się być poznanie wpływu diety wysokowęglowodanowej, diety wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe oraz diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe na przebieg procesów metabolicznych dotyczących przemian kwasów tłuszczowych w określonych typach tkanek. Zatem biorąc od uwagę specyfikę tkankową powyższych procesów podjęto badania doświadczalne mające na celu określenie wpływu komponentów diety na regulację metabolizmu kwasów tłuszczowych zwierząt laboratoryjnych jako modelu doświadczalnego.

2. CEL PRACY

Celem pracy było:

1. określenie wpływu diety standardowej, wysokowęglowodanowej, wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe oraz wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe na poziom ekspresji mRNA dla elongazy 2, 5 i 6 oraz $\Delta 5$, $\Delta 6$ i izoformy 1 i 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance wątrobowej;
2. określenie wpływu diety standardowej, wysokowęglowodanowej, wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe oraz wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe na poziom ekspresji mRNA dla elongazy 2, 5 i 6 oraz $\Delta 5$, $\Delta 6$ i izoformy 1 i 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej;
3. określenie wpływu diety standardowej, wysokowęglowodanowej, wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe oraz wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe na profil zmian składu kwasów tłuszczowych w tkance wątrobowej;
4. określenie wpływu diety standardowej, wysokowęglowodanowej, wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe oraz wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe na profil zmian składu kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej;
5. określenie wpływu diety standardowej, wysokowęglowodanowej, wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe oraz wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe na profil lipidowy oraz stężenie glukozy w surowicy krwi.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Zwierzęta

Przewidywane planem badań analizy prowadzone były w grupie 30 samców szczurów rasy Wistar hodowanych w Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego OAM UJ CM. Przez cały okres hodowli zwierzęta miały dostęp do wody i pożywienia. Klatki ze zwierzętami były umieszczone w pomieszczeniach Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego gdzie regulowana była temperatura i wilgotność, a także rytm dnia i nocy. Do osiągnięcia wagi 150g wszystkie zwierzęta były żywione dietą standardową. Następnie szczury losowo były podzielone na 5 grup. Pierwsza grupa stanowiła grupę kontrolną (150g STAN) składającą się z 6 zwierząt, które zostały uśpione w pierwszym dniu rozpoczęcia doświadczenia. Przeprowadzone analizy w tkankach tych zwierząt pozwoliły wyznaczyć wyjściowe wartości ekspresji genów dla wybranych enzymów w tkankach, składu odsetkowego kwasów tłuszczowych oraz parametrów lipidowych i stężenia glukozy w surowicy krwi zwierząt. Kryterium podziału na kolejne grupy stanowiła dieta. 24 zwierzęta zostały rozdzielone na 4 grupy, po 6 zwierząt w każdej. Pierwsza grupa (250g STAN) była żywiona dietą standardową, druga grupa (250g HCOH) była żywiona dietą wysokowęglowodanową, trzecia grupa (250g NS) była żywiona dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz czwarta grupa (250g NN) była żywiona dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Zwierzęta pozostawały na określonej diecie do osiągnięcia wagi 250g. Po osiągnięciu docelowej wagi zwierzęta zostały uśpione. Terminacja szczurów przeprowadzona była poprzez domięśniowe podanie ketaminy w dawce 60mg/kg m.c. Po uśpieniu, od każdego szczura została pobrana krew z żyły udowej (bez dodatku antykoagulantu). Następnie pobrano tkankę wątrobową i tkankę tłuszczową z wykorzystaniem techniki „freeze clamp”. Tkanki przechowywane były do czasu analiz w temp. -80°C. Krew została zwirowana, a w uzyskanej surowicy oznaczony był profil lipidowy oraz stężenie glukozy.

Na prowadzenie powyższych badań uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (decyzja z dnia 19.11.2009r.)

3.1.2. Dieta

Diety do badań zostały zakupione w MP Biomedicals. Wykorzystano dietę wysokowęglowodanową (68%) [nr kat. 960236], dietę wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe [nr kat. 960244] oraz dietę wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe [nr kat. 960242]. Dieta standardowa – Murigran została zakupiona w Wytwórni Kncentratów i Mieszanek Paszowych AGROPOL, Motycz.

Dieta wysokowęglowodanowa [960236]

Składnik	Procentowa zawartość (wagowa)
Kazeina	18%
Sacharoza	68%
Olej z nasion bawełny	8%
Drożdże	2%

Dieta wzbogacona w nienasycone kwasy tłuszczowe [960244]

Składnik	Procentowa zawartość (wagowa)
Kazeina	20.00%
Sacharoza	30.58%
Skrobia kukurydziana	20.00%
Olej roślinny (krokosz barwierski)	20.00%
Celuloza	5.00%

Dieta wzbogacona w nasycone kwasy tłuszczowe [960242]

Składnik	Procentowa zawartość (wagowa)
Kazeina	20.00%
Sacharoza	30.58%
Skrobia kukurydziana	20.00%
Olej kokosowy	20.00%
Celuloza	5.00%

Dieta standardowa – Murigran A-703

Składnik	Procentowa zawartość (wagowa)
Białko	23%
Cukry	55%
Tłuszcz	4,2%
Włókno surowe	4,4%

3.2. Metody

3.2.1. Analiza ekspresji mRNA dla elongaz i desaturaz w tkance tłuszczowej i tkance wątrobowej szczurów

3.2.1.1. Ekstrakcja RNA z tkanki wątrobowej oraz z tkanki tłuszczowej

Ekstrakcja całkowitego RNA z tkanki wykonana została zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego i Sacchi, w temperaturze 4°C. Dokładny sposób postępowania był następujący.

Do sterylnej probówki Eppendorf zostało odważone ok. 100 mg tkanki. Do probówki zostało dodane 500 µl odczynnika TRI Reagent (Sigma, USA), a następnie prowadzony był proces homogenizacji przy użyciu homogenizatora Ultra-Turrax T8. Homogenat tkankowy został poddany inkubacji przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Następnie do probówki zostało dodane 100µl chloroformu (według proporcji: 200µl chloroformu na 1 ml odczynnika TRI Reagent użytego do homogenizacji). Probówka była wytrząsana przez ok. 15 s przy użyciu vortexu, a następnie inkubowana przez ok. 3 min w temperaturze pokojowej. Następnie próbka była wirowana przez 15 min z przyspieszeniem 12 000 x g w temperaturze 4°C. Uzyskana faza wodna po wirowaniu została przeniesiona do sterylnej probówki Eppendorf, do której zostało dodane 250µl ml izopropanolu (według proporcji: 500µl izopropanolu na 1 ml odczynnika TRI Reagent użytego do homogenizacji). Po 5 min. inkubacji w temperaturze pokojowej, próbka była ponownie wirowana przez 15 min w warunkach jak powyżej. W uzyskanej próbce RNA uległo wytrąceniu. Po usunięciu supernatantu osad był dwukrotnie przemywany roztworem 75% etanolu i za każdym razem wirowany przez 5 min z przyspieszeniem 7 500 x g w temperaturze 4°C. Ostatecznie po usunięciu etanolu uzyskany osad zawierający RNA był wysuszony, a następnie rozpuszczony w 45 µl H₂O pozbawionej RNaz. Po wykonaniu oznaczeń stężenia i homogenności RNA w próbce, uzyskany ekstrakt RNA przechowywany był w temperaturze (- 80°C) do chwili wykonania kolejnego etapu badań.

3.2.1.2. Oznaczenie stężenia RNA

Oznaczenie stężenia wyekstrahowanego RNA z tkanki wątrobowej i tkanki tłuszczowej zostało wykonane na podstawie pomiaru absorbancji próbki RNA w spektrofotometrze UV (Photometer UV GeneRay, Biometra) przy długości fali 260nm. Do pomiaru absorbancji przygotowano mieszaninę 2 µl próbki oraz 98 µl wody pozbawionej RNaz. Współczynnik rozcieńczenia wynosił 50, został wprowadzony do programu aparatu i uwzględniony przy pomiarze absorbancji, a następnie przy wyliczeniu stężenia RNA w badanej próbce.

3.2.1.3. Reakcja RT-PCR

Reakcja RT-PCR dzieli się na dwa zasadnicze etapy: reakcja odwrotnej transkrypcji z udziałem odwrotnej transkryptazy oraz amplifikacja – czyli wykładnicze zwielokrotnienie ilości cDNA. Reakcja odwrotnej transkrypcji (*Reverse Transcription*, RT) umożliwia utworzenie cDNA na matrycy RNA, który jest stabilniejszy niż RNA oraz może być amplifikowany za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Reakcja syntezy cDNA może być przeprowadzona z zastosowaniem heksamerów, oligo(dT) lub startera specyficznego dla analizowanego genu. Otrzymany cDNA może być wykorzystany do oceny ekspresji genu na poziomie mRNA w reakcji PCR z użyciem odpowiednich starterów [68].

Po otrzymaniu i obliczeniu stężenia RNA w próbkach wszystkich tkanek, została następnie przeprowadzona reakcja odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu firmy Fermentas - RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Litwa). W badaniach zastosowano starter oligo(dT), który hybryduje z końcami poliadenyłowymi mRNA. Wszystkie etapy przygotowania próbek do reakcji RT wykonywano w komorze DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Łotwa). Mieszaninę przygotowano w sterylnych próbkach, o objętości 200µl, w temperaturze 4°C. Ilość RNA pobrana do analizy RT wynosiła dla każdej próbki 1 µg. Schemat reakcji przedstawiono w tab. 7.

Tab. 7. Schemat reakcji odwrotnej transkrypcji - RT.

SKŁADNIK	ILOŚĆ
matryca RNA	1 µg
primer oligo (dT) (0,5 µg/ µl)	1 µl
H ₂ O _{DEPC}	uzupełnić do 12 µl
inkubacja 70°C, 5 minut	
bufor reakcyjny 5x	4 µl
inhibitor rybonukleaz Ribolock™ [20 U/µl]	1 µl
10mM mix dNTPs	2 µl
inkubacja 37°C, 5 minut	
odwrotna transkryptaza RevertAid™HMinus M-MuLVRT [200U/µl]	1 µl
inkubacja 42°C, 60 minut	
zatrzymanie reakcji w 70°C, 10 minut	
	Objętość końcowa = 20 µl

Reakcję RT wykonywano w termocyklerze Mastercycler gradient EP 5331 (Eppendorf, Niemcy). Po zakończeniu reakcji odwrotnej transkrypcji z udziałem odwrotnej transkryptazy z mieszaniny reakcyjnej każdej z próbek do reakcji PCR zostało pobrane 1,2 µl próbki jako matrycy cDNA. Dla każdego enzymu zostały zastosowane specyficzne primery, które zostały wyszukane w programie Primer3 (v.0.4.0) po uprzednim podaniu sekwencji mRNA dla poszczególnych genów. W tab.8. przedstawiono wybrane sekwencje primerów, które wykorzystano w reakcji PCR (RT-PCR).

Tab. 8. Sekwencje primerów użytych w reakcji PCR (RT-PCR).

Elongaza 2
Nić Sensowna (Kodująca, F) 5'- TCAACAATGGCAGCTCAAAG -3' Nić Antysensowna (Matrycowa, R) 5'- GGGGGATTTACTTGGGAAAA -3'
Elongaza 5
Nić Sensowna (Kodująca, F) 5'- GAGGCATCCTGGTGGTGTAT -3' Nić Antysensowna (Matrycowa, R) 5'- ACGTGCAGGACTGTGATCTG -3'
Elongaza 6
Nić Sensowna (Kodująca, F) 5'- GCTACAACGGAGCAGAGGAC -3' Nić Antysensowna (Matrycowa, R) 5'- CCATTTTCAAGCCAACCAGT-3'
Δ 5 desaturaza
Nić Sensowna (Kodująca, F) 5'- GAAGGAACAGCAGTCCAAGC -3' Nić Antysensowna (Matrycowa, R) 5'- GTCTGGACTCGTGGAAGAGC-3'
Δ 6 desaturaza
Nić Sensowna (Kodująca, F) 5'- ATCTGCCCTACAACCACCAG -3' Nić Antysensowna (Matrycowa, R) 5'- TGTGACCCACACAAACCAGT-3'
Scd1 - izoforma 1 desaturazy stearylo-CoA
Nić Sensowna (Kodująca, F) 5'- CTGTTAGCCCAGCCTCACTC -3' Nić Antysensowna (Matrycowa, R) 5'- GTCTGCAGGAAAACCTCTGC-3'
Scd2 - izoforma 2 desaturazy stearylo-CoA
Nić Sensowna (Kodująca, F) 5'- CCAGAGCGTACCAGCTTTTCTCP -3' Nić Antysensowna (Matrycowa, R) 5'- GGCTGTCACCCAATCAGAAT - 3'
β - aktyna
Nić Sensowna (Kodująca, F) 5'- AGCCATGTACGTAGCCATCC -3' Nić Antysensowna (Matrycowa, R) 5'- CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA -3'

Mieszaninę reakcyjną do PCR przygotowywano w sterylnych próbkach, o objętości 200 μ l, w temperaturze 4°C. Reakcja PCR wykonywana w termocyklerze Mastercycler gradient EP 5331 (Eppendorf, Niemcy). Po wystandaryzowaniu warunków reakcji PCR dla wybranych primerów przeprowadzono reakcje PCR. Tab. 9. przedstawia schemat przygotowania mieszaniny reakcyjnej dla wszystkich zastosowanych primerów.

Tab. 9. Schemat przygotowania mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR.

Enzym Składnik	Elongaza 2	Elongaza 5	Elongaza 6	$\Delta 5$ desaturaza	$\Delta 6$ desaturaza	Scd1	Scd2	β - aktyna
H ₂ O [μ l]	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,3	8,2	8,2
dNTP 2mM [μ l]	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Bufor C [μ l]	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Polimeraza [μ l]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
Primer F [μ l]	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Primer R [μ l]	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Matryca (cDNA) [μ l]	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Warunki reakcji (Stężenie primerów, temp. przyłączenia primerów oraz ilość cykli)	4 μ M 56 ⁰ C 35 cykli	4 μ M 61 ⁰ C 35 cykli	4 μ M 63 ⁰ C 35 cykli	4 μ M 63 ⁰ C 35 cykli	4 μ M 60 ⁰ C 35 cykli	2 μ M 63 ⁰ C 35 cykli	4 μ M 60 ⁰ C 35 cykli	4 μ M 60 ⁰ C 35 cykli
Wielkość produktu uzyskanego w reakcji RT- PCR [bp]	249	247	247	185	248	668	342	228

Przykładowy profil temperaturowy reakcji PCR podano w tab. 10.

Tab. 10. Przykładowy profil temperaturowy reakcji PCR.

Temperatura	Czas
95°C	10min
96°C	15sek
58°C	30sek
72°C	45sek
61°C	30min
4°C	∞

3.2.1.4. Elektroforetyczny rozdział produktów RT-PCR w żelu agarozowym

Po zakończeniu reakcji RT-PCR próbki zostały poddane elektroforetycznemu rozdzielaniu w 1,5% roztworze agarozy w 0,5 M buforze TBE. Agarozą została rozpuszczona poprzez ogrzewanie, następnie po ochłodzeniu do temperatury 45 - 50°C, do roztworu agarozy został dodany roztwór bromku etydyny (5µl/100ml agarozy), a następnie tak sporządzony roztwór został wylany do komory elektroforetycznej z grzebieniem. Po spolimeryzowaniu żelu, komora została wypełniona 0,5 M buforem TBE (Tris, kwas borowy, EDTA).

Po nałożeniu próbek oraz markera wielkości do studzienek, rozdział elektroforetyczny był prowadzony przy napięciu 180 V i 90 mA, przez 25 minut. Po zakończeniu rozdzielania, żel sfotografowano z wykorzystaniem systemu dokumentacji i analizy obrazu żeli PolyDoc, a następnie zdjęcie żelu zostało poddane analizie densytometrycznej przy użyciu programu Quantity One 4.2.1.

3.2.2. Określenie składu kwasów tłuszczowych frakcji lipidowych tkanki wątrobowej oraz tkanki tłuszczowej.

3.2.2.1. Ekstrakcja lipidów całkowitych oraz synteza pochodnych metylowych kwasów tłuszczowych.

Ekstrakcja lipidów z tkanki wątrobowej i tkanki tłuszczowej była prowadzona metodą Folch'a i wsp. [35] stosując jako mieszaninę ekstrakcyjną roztwór chloroform:metanol w stosunku objętościowym 2:1 v/v. Sposób postępowania był następujący. Do około 250 mg próbki było dodane 1ml mieszaniny chloroform:metanol (2:1 v/v), następnie próbkę homogenizowano przy użyciu homogenizatora mechanicznego typ Ultra Tarrax T8 firmy IKA Labortechnik przez 10 min w temperaturze 4°C. W kolejnym etapie do próbki dodano 1ml mieszaniny chloroform:metanol (2:1 v/v) i tak uzyskany homogenat szczelnie zamknięty pozostawiono do dnia następnego w temp. 4°C. W kolejnym etapie próbki sączono na odtłuszczonych w metanolu sączkach i dwukrotnie sączki przemywano mieszaniną chloroform:metanol (2:1 v/v). Do przesączu został następnie dodany roztwór 0,9% chlorku sodu w ilości stanowiącej 20% objętości. Powstała mieszanina była wytrząsana

mechanicznie w wytrząsarce ELPIN typ 357 przez 15 min w temperaturze pokojowej, a następnie została pozostawiona do rozdzielenia faz. Po usunięciu fazy wodnej, faza organiczna była sączona przez odfuszczonego sączonego, na który zostało nałożone około 1g bezwodnego siarczynu (VI) sodu. Przesącz był odparowywany do suchej pozostałości strumieniem azotu w łaźni wodnej typ MLL 147 w temperaturze 37°C. Bezpośrednio po wysuszeniu próbki rozpoczęto syntezę estrów metyloowych kwasów tłuszczowych, którą przeprowadzono zgodnie z metodą Metcalf'a i Schmitz'a [90] stosując roztwór trójfluorku boru w metanolu. Sposób postępowania był następujący. Odparowany przesącz próbki poddano procesowi zmydlania. W tym celu do każdej próbki został dodany roztwór 2,85% wodorotlenku potasu w metanolu i inkubowany w łaźni wodnej typ MLL 147, przez 20 min w temperaturze 70°C. Uzyskane sole potasowe kwasów tłuszczowych metyloowane były przez dodanie 14% roztworu trójfluorku boru w metanolu. Mieszanina inkubowana była w łaźni wodnej typu MLL 147, przez 2 min w temperaturze 100°C. Estry metyloowe kwasów tłuszczowych były ekstrahowane stosując roztwór heptan:woda w stosunku objętościowym 3:2 v/v. Powstała mieszanina była wytrząsana mechanicznie w wytrząsarce ELPIN typ 357 przez 15 min w temperaturze pokojowej, a następnie pozostawiona do rozdzielenia faz. Dokładnie zebrana faza heptanowa była sączona przez odfuszczonego sączonego, na który zostało nałożone około 1g bezwodnego siarczynu (VI) sodu. Przesącz zawierający estry metyloowe kwasów tłuszczowych poszczególnych próbek był odparowywany do suchej pozostałości strumieniem azotu w łaźni wodnej typ MLL 147 w temperaturze 37°C. Sucha pozostałość była rozpuszczona w 100µl n-heksanu, a następnie wszystkie próbki wypełnione azotem szczelnie zamknięto. Do czasu wykonania dalszych oznaczeń próbki będą przechowywane w zamrażarce Hera Freeze firmy Heraeus w temperaturze -86°C.

3.2.2.2. Rozdział estrów metyloowych kwasów tłuszczowych techniką chromatografii gazowej.

Rozdział estrów metyloowych kwasów tłuszczowych frakcji lipidów całkowitych były prowadzone techniką kapilarnej chromatografii gazowej wg metody Li i Watkins modyfikowanej przez Chaves i wsp. [16,74] z użyciem chromatografu gazowego firmy

Hewlett Packard 6890N, wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny i „autosampler”. Sposób postępowania był następujący. n-heksanowy roztwór analizowanej próbki był nałożony na kolumnę, której fazą nośną był 50% cyjanopropylmetylpolisiloksan. Używana była kapilarna kolumna firmy Agilent typ DB - 23 o długości 60m i średnicy wewnętrznej 0,25 mm. Jako gaz nośny był stosowany hel o przepływie 70 ml/min pod ciśnieniem 10 psi. Warunki pracy chromatografu: temperatura detektora 260°C, przepływ powietrza 400 ml/min, N₂ 25 ml/min, H₂ 30 ml/min, temperatura pieca 80°C przez 5 minut, następnie wzrost o 4°C co 1 minutę aż do 190°C. Temperatura 190°C była utrzymywana przez 15 minut i następował wzrost do 240°C. Kolumna DB – 23 o długości 60m i średnicy wewnętrznej 0,25mm. Iniekcja próbki w objętości 2µl.

Powierzchnia pików dla poszczególnych estrów metylowych kwasów tłuszczowych badanych próbek obliczana była przy użyciu automatycznego integratora firmy Hewlett-Packard (USA). Dla określenia składu kwasów tłuszczowych przeprowadzany był rozdział mieszaniny roztworów wzorcowych firmy Supelco® 37 Component FAME Mix (Sigma, Supelco). Dla tych wzorców oznaczano czasy retencji w trzech niezależnych powtórzeniach. Ten sposób postępowania umożliwił zastosowanie automatycznej identyfikacji rozdzielanych kwasów tłuszczowych w badanych próbkach przy użyciu programu ChemStation.

3.2.2. Analiza profilu lipidowego oraz stężenie glukozy w surowicy krwi zwierząt.

Pobrana od zwierząt krew została zwirowana przez 3 minuty przy 12000 x g. Następnie została oddzielona surowica, w której przy użyciu standardowych zestawów do analiz metodą spektrofotometryczną zostały oznaczone stężenie glukozy, a także stężenie cholesterolu całkowitego, triacylogliceroli oraz cholesterolu frakcji HDL. Oznaczenie parametrów wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. Poniższe tabele przedstawiają sposób wykonania oznaczeń dla wymienionych parametrów.

Oznaczenie glukozy wykonano zgodnie z procedurą podaną przez producenta (AQUA-MED, Polska). Tab. 11. przedstawia sposób wykonania analizy.

Tab. 11. Sposób wykonania oznaczenia stężenia glukozy.

	PRÓBA ODCZYNNIKOWA (PO)	WZORZEC/PRÓBKA (PW/PB)
Odczynnik	1000 μ l	1000 μ l
Doprowadzić do temperatury oznaczania, następnie dodać		
Wzorzec / próbka	---	10 μ l
Wymieszać, inkubować 10 min w temperaturze 25 ⁰ C		
Odczytać absorbancję próby wzorcowej i próby badanej wobec próby odczynnikowej przy długości fali 490-550nm		
Obliczenia: stężenie glukozy = absorbancja próby badanej (PB)/absorbancja próby wzorcowej (PW)		

Oznaczenie cholesterolu całkowitego wykonano zgodnie z procedurą podaną przez producenta (BioMaxima, Polska). Tab. 12. przedstawia sposób wykonania analizy.

Tab. 12. Sposób wykonania oznaczenia stężenia cholesterolu całkowitego.

	PRÓBA ODCZYNNIKOWA (PO)	WZORZEC/PRÓBKA (PW/PB)
Odczynnik	1000 μ l	1000 μ l
Doprowadzić do temperatury oznaczania następnie dodać		
Wzorzec / próbka	---	10 μ l
Wymieszać, inkubować 10 min w temperaturze 25 ⁰ C		
Odczytać absorbancję próby wzorcowej i próby badanej wobec próby odczynnikowej przy długości fali 490-550nm		
Obliczenia: stężenie cholesterolu całkowitego = absorbancja próby badanej (PB)/absorbancja próby wzorcowej (PW)		

Oznaczenie triacylogliceroli wykonano zgodnie z procedurą podaną przez producenta (BioMaxima, Polska). Tab.13. przedstawia sposób wykonania analizy.

Tab. 13. Sposób wykonania oznaczenia stężenia triacylogliceroli.

	PRÓBA ODCZYNNIKOWA (PO)	WZORZEC/PRÓBKA (PW/PB)
Odczynnik	1000 μ l	1000 μ l
Doprowadzić do temperatury oznaczania następnie dodać		
Wzorzec / próbka	---	10 μ l
Wymieszać, inkubować 10 min w temperaturze 25 ⁰ C		
Odczytać absorbancję próby wzorcowej i próby badanej wobec próby odczynnikowej przy długości fali 490-550nm		
Obliczenia: stężenie triacylogliceroli = absorbancja próby badanej (PB)/absorbancja próby wzorcowej (PW)		

Oznaczenie cholesterolu frakcji HDL wykonano zgodnie z procedurą podaną przez producenta (AQUA-MED, Polska). W pierwszym etapie analizy do próbek Eppendorf napipetowano 500 μ l próbki oraz 500 μ l odczynnika. Mieszaninę dokładnie wymieszano, pozostawiono w temperaturze pokojowej na 20 minut inkubacji, a następnie odwirowano przy $\geq 4000xg$ przez 10 minut. Zebrano supernatant, który wykorzystano w kolejnym etapie analizy do oznaczenia frakcji HDL cholesterolu według poniższego schematu. Tab.14. przedstawia sposób wykonania analizy.

Tab. 14. Sposób wykonania oznaczenia stężenia cholesterolu frakcji HDL.

	PRÓBA ODCZYNNIKOWA (PO)	WZORZEC/PRÓBKA (PW/PB)
Odczynnik	1000 μ l	1000 μ l
Doprowadzić do temperatury oznaczania następnie dodać		
Wzorzec / próbka	---	50 μ l
Woda destylowana	50 μ l	---
Wymieszać, inkubować 10 min w temperaturze 25 ⁰ C		
Odczytać absorbancję próby wzorcowej i próby badanej wobec próby odczynnikowej przy długości fali 490-550nm		
Obliczenia: stężenie cholesterolu frakcji HDL = absorbancja próby badanej (PB)/absorbancja próby wzorcowej (PW)		

3.2.3. Statystyczne opracowanie danych

Opracowanie wyników wykonano za pomocą pakietu statystycznego STATISTICA 9.0 oraz GraphPad Prism wersja 5.02. W celu wyeliminowania obserwacji odstających stosowano test Grubbs'a. Ocenę typu rozkładu danych statystycznych dokonano testem Shapiro Wilka. Testem Levene'a sprawdzano jednorodność wariancji. Dla wykazania różnic pomiędzy grupami testowymi wykorzystano testy parametryczne takie jak jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz test post hoc Tukeya. W przypadku analiz nieparametrycznych posłużono się testem Kruskala-Wallisa oraz testem post hoc Dunn'a.

4. ODCZYNNIKI

Agaroza (GenoPlast Biochemicals, Polska)

Bromek etydyiny (Sigma-Aldrich, USA)

Bufor reakcyjny 10x AmpliBuffer C (EURx, Polska)

Chloroform (POCh, Polska)

Deoksyrybonukleotydy dNTP (EURx, Polska)

Etanol (POCh, Polska)

Eter dietylowy kwasu pirowęglowego DEPC (Sigma, USA)

Fluorek Boru, 14% w metanolu (Aldrich, USA)

Izopropanol (POCh, Polska)

Kwas borowy (POCh, Polska)

Marker wielkości - GeneRuler™ 1kb Plus DNA ladder (Fermentas, Litwa)

Metanol (POCh, Polska)

n- heksan (POCh, Polska; Merck, Niemcy)

n- heptan (POCh, Polska; Merck, Niemcy)

Odczynnik do ozn. stężenia cholesterolu całkowitego (BioMaxima, Polska)

Odczynnik do ozn. stężenia frakcji HDL metoda strąceniową (AQUA-MED, Polska)

Odczynnik do oznaczania stężenia glukozy (AQUA-MED, Polska)

Odczynnik do oznaczania stężenia triacylogliceroli (BioMaxima, Polska)

Polimeraza Perpetual OptiTaq polimeraza DNA ^{HOT START} (Eurx, Polska)

Primery OLIGO(DT)12-18 PRIMER 18418012 (ALAB, Polska)

RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Niemcy)

Siarczan amonu (bezwodny) (Chempur, Polska)

Startery komplementarne do sekwencji w genie dla wybranych elongaz i desaturaz oraz β -aktyny (DNA Gdańsk, Polska)

TRI Reagent (Sigma, USA)

Tris(hydroksymetylo)aminometan (POCh, Polska)

Wodorotlenek potasu (POCh, Polska)

Wzorce dla określenia składu kw. tł. - Supelco® 37 Component FAME Mix (Sigma, Supelco)

Zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji - K1632 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Litwa)

5. BUFORY I ROZTWORY

1. Elektoroforeza kwasów nukleinowych

Bufor TBE, 5x stężony

Tris- base	54g
H ₃ BO ₃	27,5g
EDTA	2,92g
H ₂ O destylowana	Uzupełnić do do 1000ml

1,5% Żel agarozowy

Agarozą	1,5g
0,5x TBE	100ml

2. Chromatografia

2,85% KOH w metanolu

KOH	2,85 g
metanol	100ml

6. APARATURA

Aparat fotograficzny Canon Power Shot G5 (Canon Inc., Japonia)
Chromatograf gazowy 6890N Model G1530N (Agilent, USA)
Homogenizator Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Niemcy)
Kolumna DB 23 (J&W Scientific, USA)
Komora DNA/RNA UV- Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Łotwa)
Kuwety BRAND UV Cuvette micro (Brandtech Scientific, USA)
Łaźnia wodna typ MLL 147 (AJL, Polska)
Mieszadło magnetyczne MS 11H (Wigo, Polska)
Mikrowirówka „Sprout” (Heathrow Scientific, USA)
pH-metr Seven Easy (Mettler Toledo, Szwajcaria)
Spektrofotometr UV (Photometer UV GeneRay, Biometra, Niemcy)
System dokumentacji i analizy obrazu żeli PolyDoc A
Termocykler Mastercycler gradient EP 5331 (Eppendorf, Niemcy)
Transiluminator ECX20 (Vilber Lourmat, Francja)
Waga analityczna WPA-60K (RADWAG, Polska)
Waga elektroniczna WPS 1200 (RADWAG, Polska)
Wirówka laboratoryjna (Qualiton, USA)
Wirówka laboratoryjna MPW- 52 (MPW Med.- Instruments, Polska)
Wirówka laboratoryjna z chłodzeniem MPW- 350 R (MPW Med.- Instruments, Polska)
Wytrząsarka Polymax 1040 (Heidolph Instruments, Niemcy)
Wytrząsarka z łaźnia wodną ELPIN typ 357 (Elpin Plus, Polska)
Zasilacz Power Pac HC (Bio-Rad, USA)
Zestaw do elektroforezy horyzontalnej SUBDNA (Kucharczyk, Polska)

7. WYNIKI

7.1. RT-PCR

Metoda RT-PCR została wykorzystana w celu oznaczenia ekspresji mRNA dla wybranych elongaz i desaturaz w tkance wątrobowej oraz tkance tłuszczowej szczurów, żywionych opisanymi powyżej dietami. Jako gen referencyjny (ang. housekeeping gene) zastosowano β -aktynę. Geny referencyjne, jako podlegające stałej ekspresji na tym samym poziomie, służą jako kontrola równoległych reakcji. Normalizacja względem genu o stałym poziomie ekspresji, jest obecnie powszechnie akceptowaną metodą korekcji nieznacznych zmian spowodowanych różnicą w wydajności odwrotnej transkrypcji, jak również wyjściowej ilości RNA [19].

7.1.1. Wątroba

Oznaczono ekspresję mRNA dla elongazy 2 (E2), elongazy 5 (E5), elongazy 6 (E6), Δ 5 desaturazy (D5), Δ 6 desaturazy (D6) oraz dla izoform 1 (S1) i 2 (S2) desaturazy stearylo-CoA w tkance wątrobowej szczurów.

W celu określenia typu rozkładu uzyskanych danych dla mRNA w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą standardową (grupa kontrolna 150g STAN oraz grupa 250g STAN), dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH), dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS) oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN) obliczono miary rozkładu. Zgodność z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Tab. 15. przedstawia wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), a także wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych enzymów (E2, E5, E6, D5, D6, S1 oraz S2) we wszystkich grupach testowych (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS) w tkance wątrobowej.

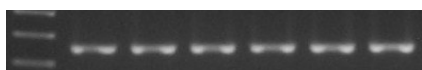
Tab. 15. Wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), a także wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych enzymów (E2, E5, E6, D5, D6, S1 oraz S2) we wszystkich grupach testowych w tkance wątrobowej.

150g STAN – WĄTROBA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	81,2	78,0	74,2	96,2	93,9	88,2	85,3
<i>SD</i>	3,2	4,5	5,9	4,1	7,2	2,0	2,4
<i>p=</i>	<u>0,17</u>	<u>0,56</u>	<u>0,14</u>	<u>0,09</u>	<u>0,55</u>	<u>0,96</u>	<u>0,68</u>
250 STAN – WĄTROBA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	80,2	79,4	73,6	92,9	90,6	84,9	88,9
<i>SD</i>	3,1	2,3	5,0	3,6	3,7	4,9	4,2
<i>p=</i>	<u>0,96</u>	<u>0,69</u>	<u>0,61</u>	<u>0,95</u>	<u>0,92</u>	<u>0,06</u>	<u>0,89</u>
250g HCOH – WĄTROBA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	81,2	98,9	84,8	97,3	107,7	143,4	103,1
<i>SD</i>	4,7	6,7	10,8	3,2	9,5	7,4	7,0
<i>p=</i>	<u>0,90</u>	<u>0,85</u>	<u>0,90</u>	<u>0,49</u>	<u>0,80</u>	<u>0,99</u>	<u>0,91</u>
250g NS -WĄTROBA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	83,8	117,1	104,5	103,0	140,5	94,5	102,9
<i>SD</i>	3,8	4,4	4,3	1,9	7,9	7,0	6,1
<i>p=</i>	<u>0,95</u>	<u>0,12</u>	<u>0,88</u>	<u>0,16</u>	<u>0,91</u>	<u>0,93</u>	<u>0,66</u>
250g NN -WĄTROBA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	73,5	100,5	91,3	80,5	95,2	100,0	75,2
<i>SD</i>	1,6	2,6	4,8	6,4	6,8	4,9	6,0
<i>p=</i>	<u>0,79</u>	<u>0,35</u>	<u>0,24</u>	<u>0,12</u>	<u>0,71</u>	<u>0,71</u>	<u>0,59</u>

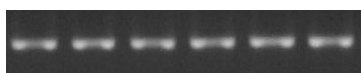
Rozkład danych ekspresji dla wszystkich mRNA w badanych grupach jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$).

Ekspresja mRNA dla elongazy 2

Poniższe ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla elongazy 2 w wątrobie szczurów wszystkich badanych grup testowych.



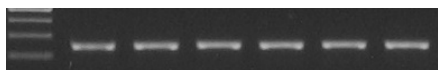
Ryc. 7. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



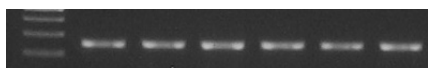
Ryc. 8. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 9. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



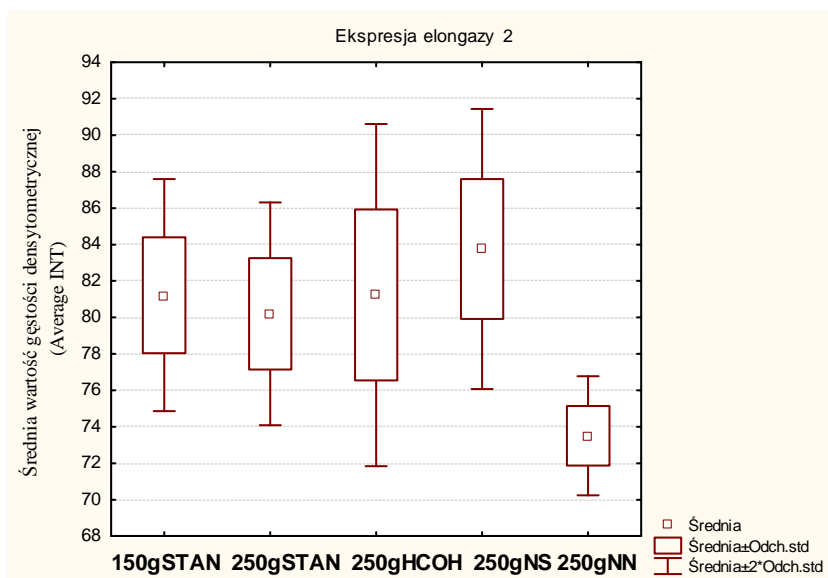
Ryc. 10. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 11. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla elongazy 2 w wątrobie zwierząt pomiędzy wszystkimi badanymi grupami testowymi (150 g STAN, 250 g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 12. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 2 w wątrobie szczurów.



Ryc. 12. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 2 w wątrobie szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tabela 16. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

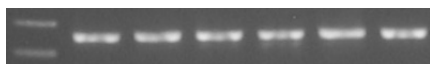
Tab. 16 Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 2 w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,98				
250g HCOH	1,00	0,98	1,00		
250g NS	0,71	0,41	0,72		
250g NN	0,01*	0,04*	0,01*	0,001*	

* różnica znamienne statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla elongazy 5

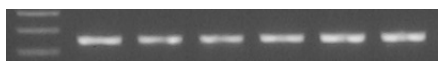
Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla elongazy 5 w wątrobie szczurów wszystkich badanych grup testowych.



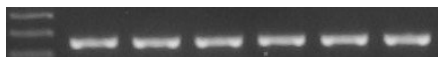
Ryc. 13. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



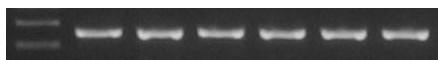
Ryc. 14. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 15. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



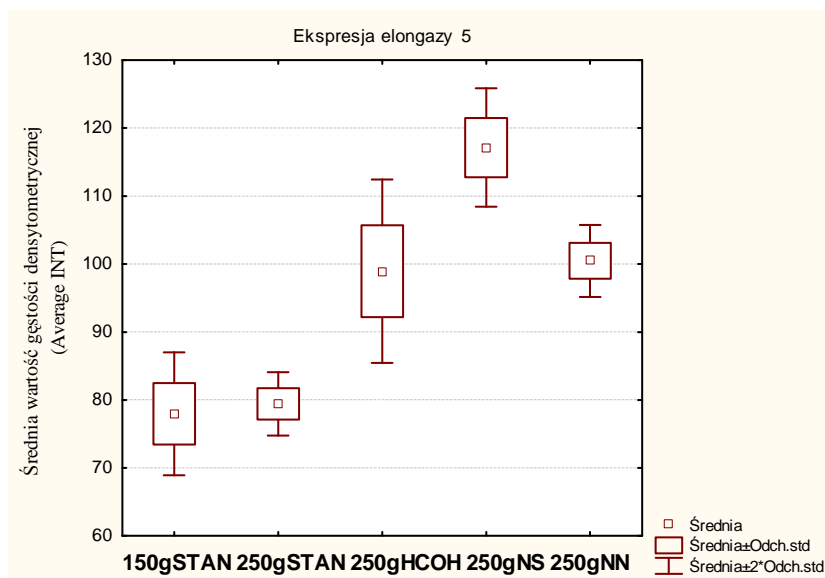
Ryc. 16. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 17. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla elongazy 5 pomiędzy grupami zwierząt karmionych różnymi dietami (150 g STAN, 250 g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 18. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 5 w wątrobie szczurów.



Ryc. 18. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 5 w wątrobie szczurów.

We wszystkich badanych grupach wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 17. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

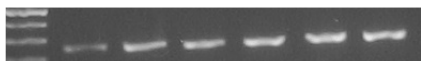
Tab. 17. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 5 w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,984949				
250g HCOH	0,000126*	0,000128*			
250g NS	0,000126*	0,000126*	0,000127*		
250g NN	0,000126*	0,000126*	0,975538	0,000133*	

* różnica znamiennej statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla elongazy 6

Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla elongazy 6 w wątrobie szczurów wszystkich badanych grup testowych.



Ryc. 19. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



Ryc. 20. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 21. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



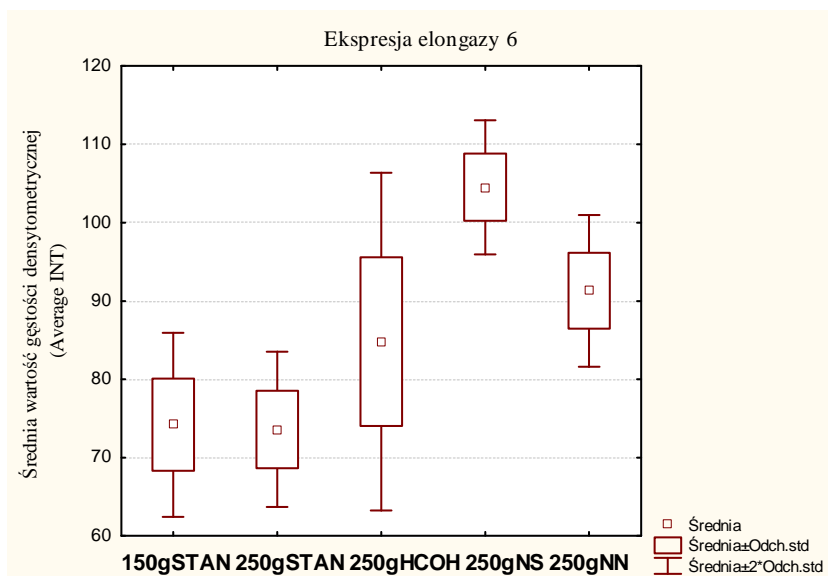
Ryc. 22. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 23. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla elongazy 6 pomiędzy grupami zwierząt karmionych różnymi dietami (150 g STAN, 250 g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 24. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 6 w wątrobie szczurów.



Ryc. 24. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 6 w wątrobie szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 18. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 18. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 6 w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,999918				
250g HCOH	0,114759	0,051302			
250g NS	0,000127*	0,000126*	0,000371*		
250g NN	0,003585*	0,001021*	0,453679	0,015929*	

* różnica znamienne statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy

Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla $\Delta 5$ desaturazy w wątrobie szczurów wszystkich badanych grup testowych.



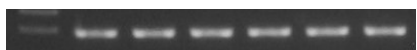
Ryc. 25. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



Ryc. 26. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 27. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



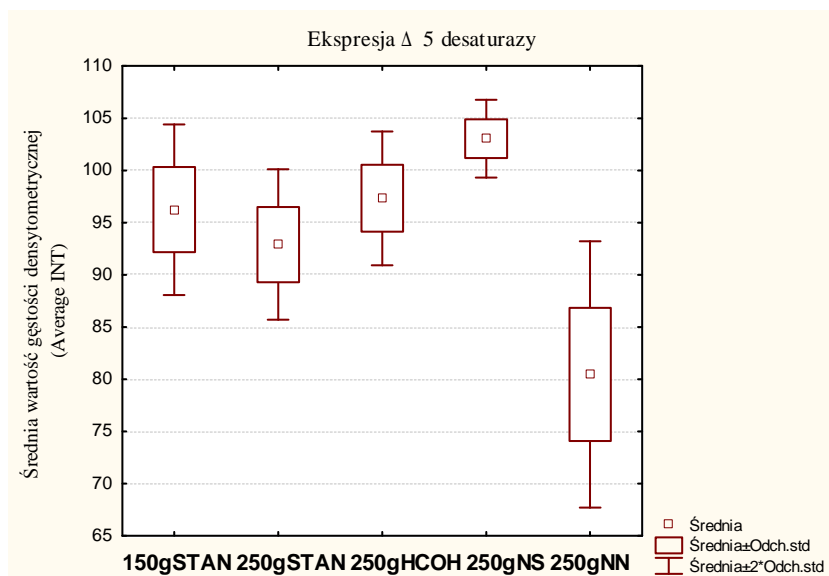
Ryc. 28. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 29. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy pomiędzy grupami zwierząt karmionych różnymi dietami (150 g STAN, 250 g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 30. przedstawia średnie wartości gęstości densytometrycznej dla $\Delta 5$ desaturazy w wątrobie szczurów.



Ryc. 30. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla Δ 5 desaturazy w wątrobie szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 19. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 19. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla Δ 5 desaturazy w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,709845				
250g HCOH	0,993490	0,461408			
250g NS	0,064398*	0,006529*	0,224318		
250g NN	0,000134*	0,000896*	0,000138*	0,000129*	

* różnica znamionna statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy

Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla $\Delta 6$ desaturazy w wątrobie szczurów wszystkich badanych grup testowych.



Ryc. 31. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



Ryc. 32. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 33. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



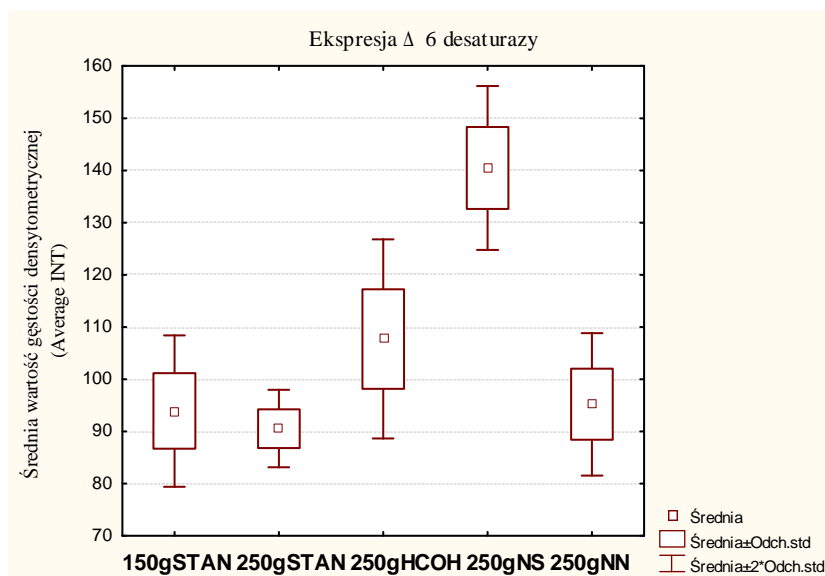
Ryc. 34. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 35. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy pomiędzy grupami zwierząt karmionych różnymi dietami (150 g STAN, 250 g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 36. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla $\Delta 6$ desaturazy w wątrobie szczurów.



Ryc. 36. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla Δ 6 desaturazy w wątrobie szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 20. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 20. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla Δ6 desaturazy w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,926779				
250g HCOH	0,023310*	0,003444*			
250g NS	0,000130*	0,000130*	0,000130*		
250g NN	0,998078	0,800443	0,046035	0,000130*	

* różnica znamienna statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA

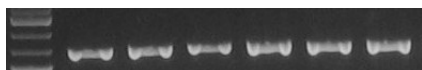
Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów wszystkich badanych grup testowych.



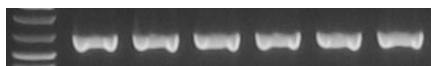
Ryc. 37. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



Ryc. 38. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 39. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



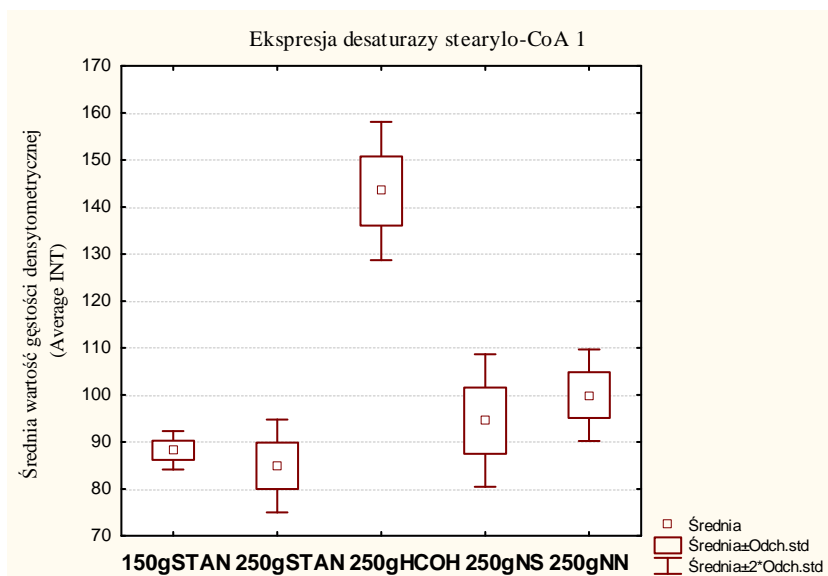
Ryc. 40. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 41. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA pomiędzy grupami zwierząt karmionych różnymi dietami (150 g STAN, 250 g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 42. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów.



Ryc. 42. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 21. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

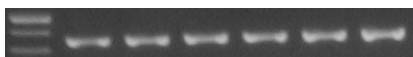
Tab. 21. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,885386				
250g HCOH	0,000126*	0,000126*			
250g NS	0,418295	0,050796	0,000126*		
250g NN	0,024677*	0,001128*	0,000126*	0,481580	

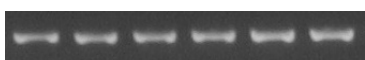
* różnica znamienna statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA

Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów wszystkich badanych grup testowych.



Ryc. 43. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



Ryc. 44. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 45. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



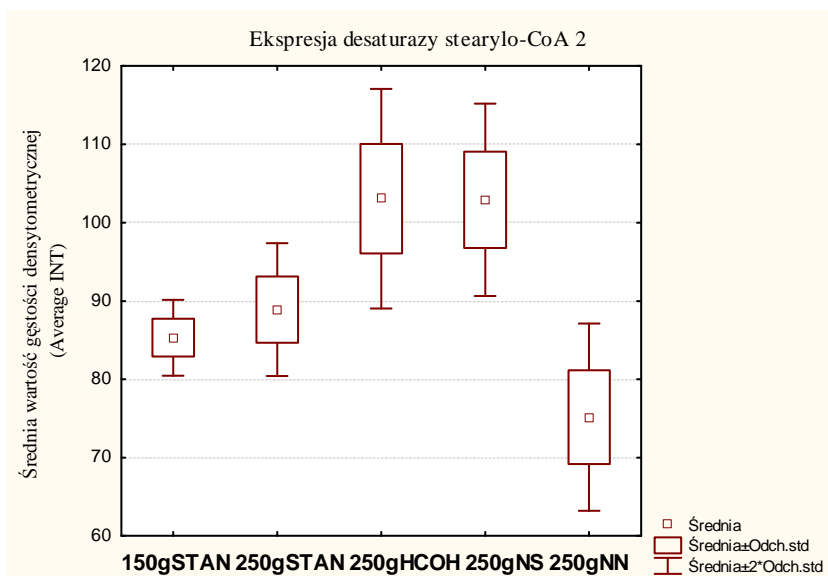
Ryc. 46. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 47. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla stearylo-CoA 2 pomiędzy grupami zwierząt karmionych różnymi dietami (150 g STAN, 250 g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 48. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów.



Ryc. 48. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 22. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

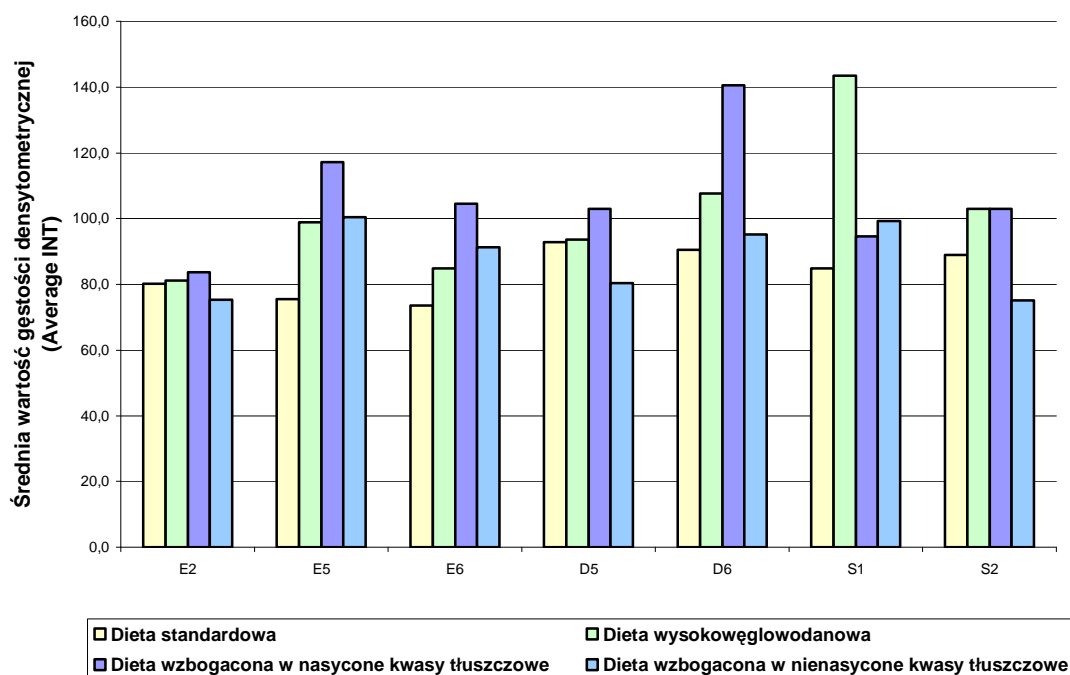
Tab. 22. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,781609				
250g HCOH	0,000184*	0,001190*			
250g NS	0,000191*	0,001331*	0,999999		
250g NN	0,024908*	0,001653*	0,000130*	0,000130*	

* różnica znamionna statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 49. przedstawia histogram z poziomami ekspresji mRNA dla wszystkich badanych enzymów we wszystkich grupach testowych w tkance wątrobowej. Poziomy ekspresji wyrażono jako średnie wartości gęstości densytometrycznej (Average INT).

Ekspresja elongaz i desaturaz w tkance wątrobowej szczurów



Ryc. 49. Ekspresja elongaz i desaturaz w tkance wątrobowej szczurów; elongaza 2 (E2), elongaza 5 (E5), elongaza 6 (E6), Δ 5 desaturaza (D5), Δ 6 desaturaza (D6) oraz izoforma 1 (S1) i 2 (S2) desaturazy stearylo-CoA.

7.1.2. Tkanka tłuszczowa

Oznaczono ekspresję mRNA dla elongazy 2 (E2), elongazy 5 (E5), elongazy 6 (E6), Δ 5 desaturazy (D5), Δ 6 desaturazy (D6) oraz dla izoform 1 (S1) i 2 (S2) stearylo-CoA desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów.

W celu określenia typu rozkładu uzyskanych danych dla mRNA w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą standardową (grupa kontrolna 150 g STAN oraz grupa 250 g STAN), dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH), dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS) oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN) obliczono miary rozkładu. Zgodność z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Tab. 23. przedstawia wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), a także wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych enzymów (E2, E5, E6, D5, D6, S1 oraz S2) we wszystkich grupach testowych (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Tab. 23. Wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), a także wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych enzymów (E2, E5, E6, D5, D6, S1 oraz S2) we wszystkich grupach testowych w tkance tłuszczowej.

150g STAN - TKANKA TŁUSZCZOWA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	64,0	66,4	71,1	73,6	97,0	80,0	85,8
<i>SD</i>	6,0	3,4	3,0	3,1	10,5	2,0	4,4
<i>p=</i>	<u>0,64</u>	<u>0,18</u>	<u>0,23</u>	<u>0,90</u>	<u>0,80</u>	<u>0,30</u>	<u>0,13</u>
250g STAN - TKANKA TŁUSZCZOWA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	82,9	73,3	72,3	76,1	116,6	83,8	97,9
<i>SD</i>	22,8	6,3	4,9	7,5	12,3	6,9	7,0
<i>p=</i>	<u>0,59</u>	<u>0,83</u>	<u>0,44</u>	<u>0,10</u>	<u>0,26</u>	<u>0,99</u>	<u>0,90</u>
250g HCOH - TKANKA TŁUSZCZOWA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	65,8	104,7	84,2	93,0	90,2	142,0	90,6
<i>SD</i>	8,2	6,2	7,3	7,4	9,4	11,8	8,1
<i>p=</i>	<u>0,35</u>	<u>0,44</u>	<u>0,26</u>	<u>0,87</u>	<u>0,81</u>	<u>0,78</u>	<u>0,74</u>
250g NS - TKANKA TŁUSZCZOWA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	104,6	114,1	106,8	95,0	132,7	108,9	128,4
<i>SD</i>	7,5	3,6	6,2	6,9	6,0	2,9	4,5
<i>p=</i>	<u>0,41</u>	<u>0,12</u>	<u>0,27</u>	<u>0,53</u>	<u>0,24</u>	<u>0,12</u>	<u>0,55</u>
250g NN - TKANKA TŁUSZCZOWA							
	<u>E2</u>	<u>E5</u>	<u>E6</u>	<u>D5</u>	<u>D6</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>
<i>ŚREDNIA</i>	71,5	103,4	85,9	74,5	90,6	102,0	88,1
<i>SD</i>	10,2	7,5	4,1	2,4	14,0	4,6	3,0
<i>p=</i>	<u>0,28</u>	<u>0,45</u>	<u>0,19</u>	<u>0,80</u>	<u>0,16</u>	<u>0,47</u>	<u>0,65</u>

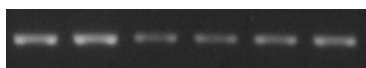
Rozkład danych ekspresji dla wszystkich mRNA w badanych grupach jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$).

Ekspresja mRNA dla elongazy 2

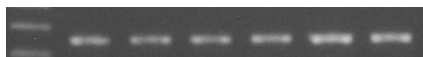
Poniższe ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla elongazy 2 w tkance tłuszczowej szczurów wszystkich badanych grup testowych.



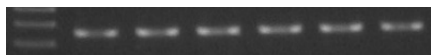
Ryc. 50. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



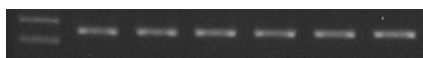
Ryc. 51. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 52. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



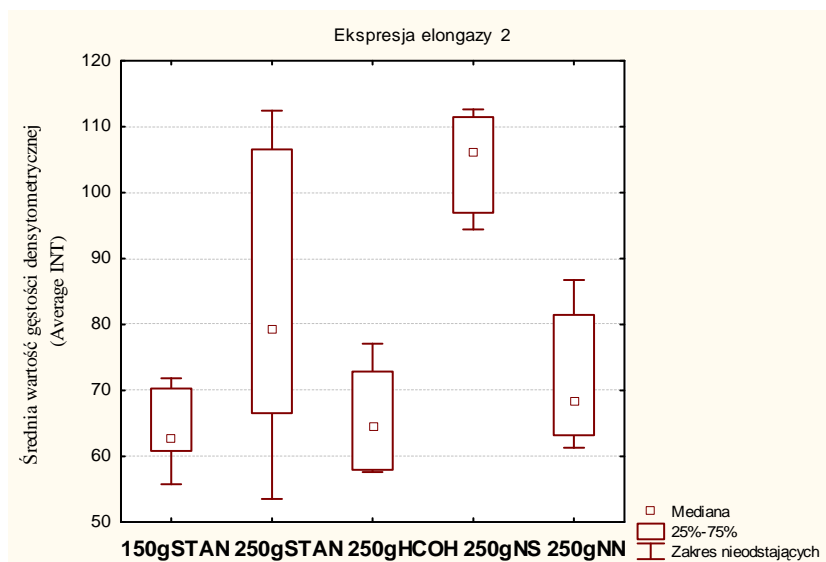
Ryc. 53. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 54. Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla elongazy 2 w tkance tłuszczowej zwierząt pomiędzy wszystkimi badanymi grupami testowymi (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 55. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 2 w tkance tłuszczowej szczurów.



Ryc. 55. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 2 w tkance tłuszczowej szczurów.

W badanych grupach testowych sprawdzono testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Analiza danych wykazała brak jednorodności wariancji. Wykazanie różnic pomiędzy grupami testowymi weryfikowano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się nieparametrycznym testem post-hoc Dunn'a. Tab. 24. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

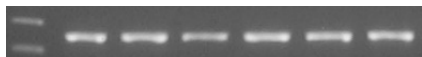
Tab. 24. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla ekspresji mRNA dla elongazy 2 w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

Test Dunn'a	Difference in rank sum	P < 0.05
150g STAN vs 250 g STAN	-8,250	No
150g STAN vs 250g HCOH	-0,6667	No
150g STAN vs 250g NS	-16,75*	Yes
150g STAN vs 250g NN	-4,750	No
250g STAN vs 250g HCOH	7,583	No
250g STAN vs 250g NS	-8,500	No
250g STAN vs 250g NN	3,500	No
250g HCOH vs 250g NS	-16,08*	Yes
250g HCOH vs 250g NN	-4,083	No
250g NS vs 250g NN	12,00	No

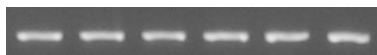
* różnica znamienne statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla elongazy 5

Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla elongazy 5 w tkance tłuszczowej szczurów wszystkich badanych grup testowych.



Ryc. 56. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



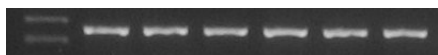
Ryc. 57. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 58. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



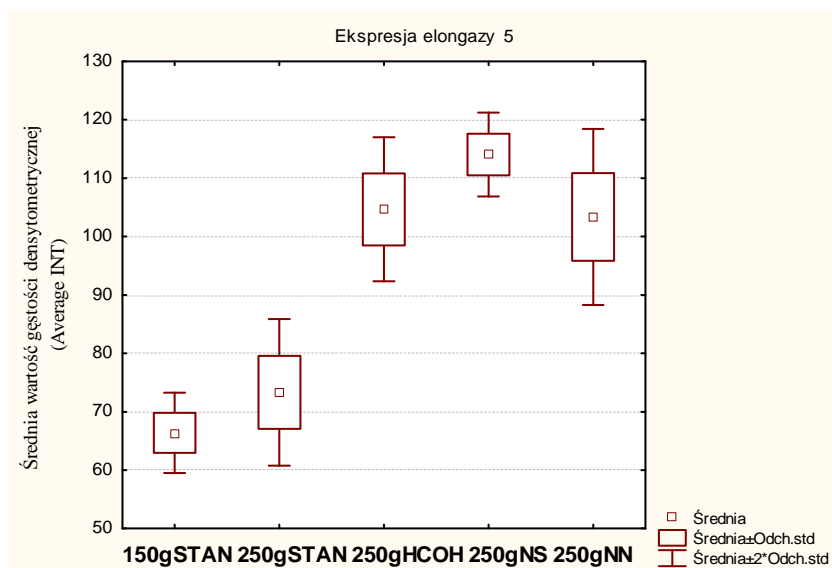
Ryc. 59. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 60. Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla elongazy 5 w tkance tłuszczowej zwierząt pomiędzy wszystkimi badanymi grupami testowymi (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 61. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 5 w tkance tłuszczowej szczurów.



Ryc. 61. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 5 w tkance tłuszczowej szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 25 przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 25. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 5 w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,247046				
250g HCOH	0,000126*	0,000126*			
250g NS	0,000126*	0,000126*	0,101763		
250g NN	0,000126*	0,000126*	0,994542	0,048263*	

* różnica znamionna statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla elongazy 6

Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla elongazy 6 w tkance tłuszczowej szczurów wszystkich badanych grup testowych.



Ryc. 62. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



Ryc. 63. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 64. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



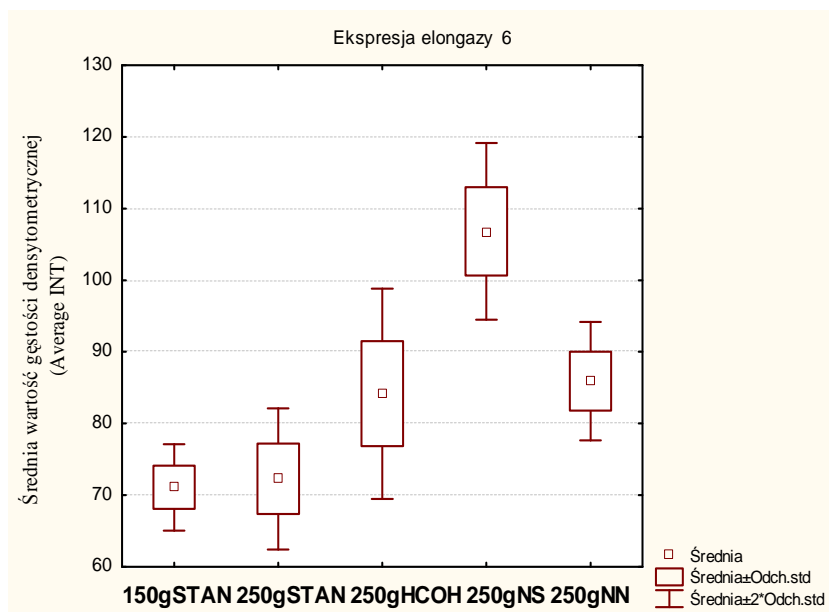
Ryc. 65. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 66. Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla elongazy 6 w tkance tłuszczowej zwierząt pomiędzy wszystkimi badanymi grupami testowymi (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 67. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 6 w tkance tłuszczowej szczurów.



Ryc. 67. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 6 w tkance tłuszczowej szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 26 przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 26. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 6 w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,995158				
250g HCOH	0,002350*	0,005922*			
250g NS	0,000130*	0,000130*	0,000130*		
250g NN	0,000658*	0,001542*	0,979068	0,000139*	

* różnica znamienne statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy

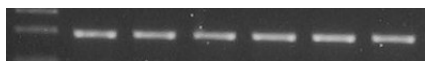
Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla $\Delta 5$ desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów wszystkich badanych grup testowych.



Ryc. 68. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



Ryc. 69. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 70. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



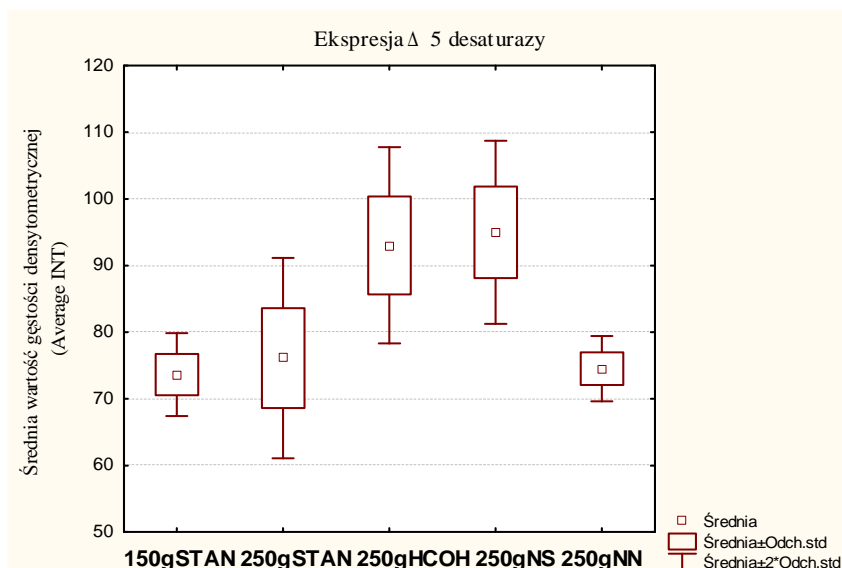
Ryc. 71. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 72. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy w tkance tłuszczowej zwierząt pomiędzy wszystkimi badanymi grupami testowymi (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 73. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla $\Delta 5$ desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów.



Ryc. 73. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla Δ 5 desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 27. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

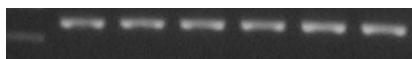
Tab. 27. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla Δ5 desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,947492				
250g HCOH	0,000181*	0,000477*			
250g NS	0,000145*	0,000204*	0,977458		
250g NN	0,998888	0,989851	0,000228*	0,000155*	

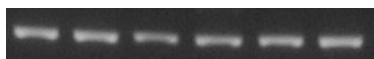
* różnica znamionna statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy

Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla $\Delta 6$ desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów wszystkich badanych grup testowych.



Ryc. 74. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



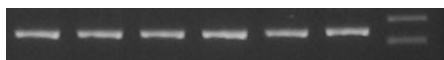
Ryc. 75. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 76. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



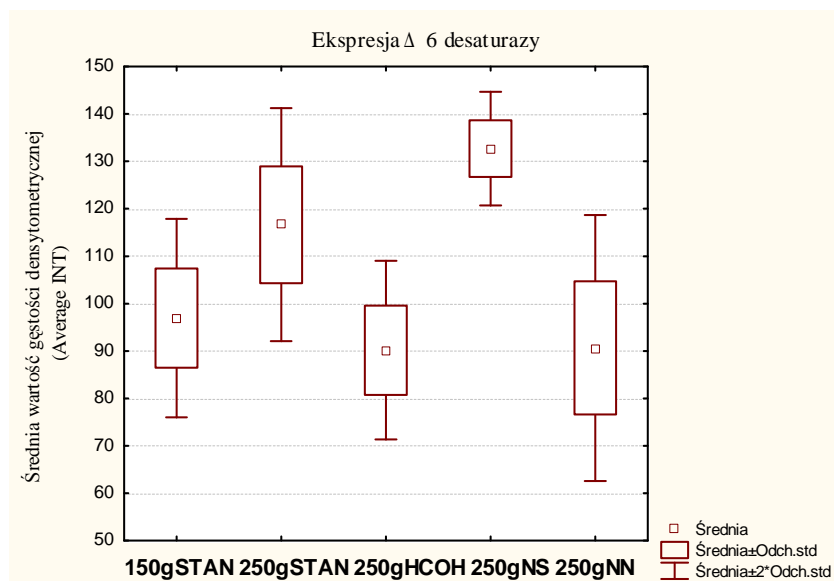
Ryc. 77. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 78. Elektroforegram mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy w tkance tłuszczowej zwierząt pomiędzy wszystkimi badanymi grupami testowymi (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 79. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla $\Delta 6$ desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów.



Ryc. 79. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla $\Delta 6$ desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 28. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 28 Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,030881*				
250g HCOH	0,811365	0,002360*			
250g NS	0,000178*	0,105428	0,000139*		
250g NN	0,846439	0,002807*	0,999994	0,000139*	

* różnica znamionna statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA

Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów wszystkich badanych grup testowych.



Ryc. 80. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



Ryc. 81. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową(250g STAN)



Ryc. 82. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową 250g HCOH)



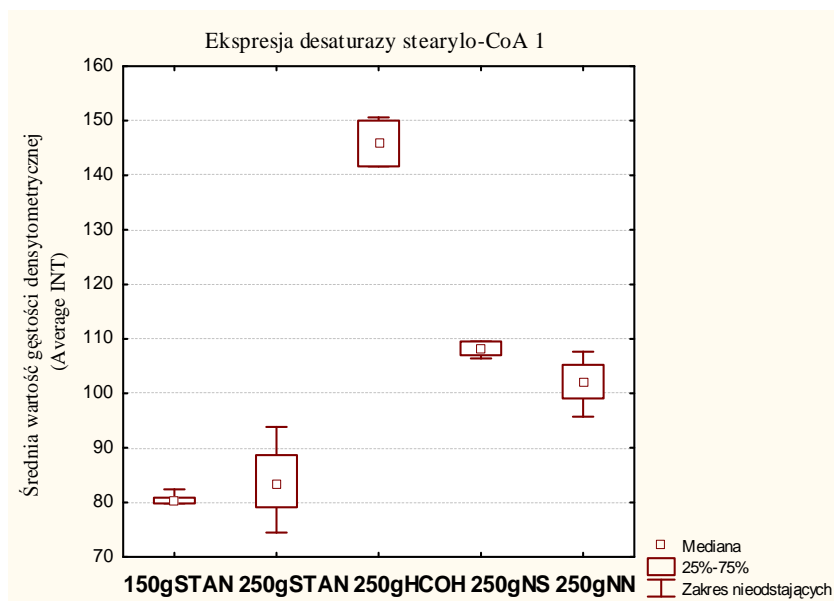
Ryc. 83. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe(250g NS)



Ryc. 84. Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej zwierząt pomiędzy wszystkimi badanymi grupami testowymi (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 85. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów.



Ryc. 85. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów

W badanych grupach testowych sprawdzono testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Analiza danych wykazała brak jednorodności wariancji. Wykazanie różnic pomiędzy grupami testowymi weryfikowano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się nieparametrycznym testem post-hoc Dunn'a. Tab. 29. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 29. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla ekspresji mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

Test Dunn'a	Difference in rank sum	P < 0.05?
150g STAN vs 250 g STAN	-2,000	No
150g STAN vs 250g HCOH	-21,50*	Yes
150g STAN vs 250g NS	-15,58	Yes
150g STAN vs 250g NN	-10,42	No
250g STAN vs 250g HCOH	-19,50*	Yes
250g STAN vs 250g NS	-13,58	No
250g STAN vs 250g NN	-8,417	No
250g HCOH vs 250g NS	5,917	No
250g HCOH vs 250g NN	11,08	No
250g NS vs 250g NN	5,167	No

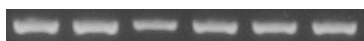
* różnica znamienne statystycznie ($p < 0,05$)

Ekspresja mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA

Poniżej ryciny przedstawiają elektroforegramy produktów reakcji RT-PCR dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów wszystkich badanych grup testowych.



Ryc. 86. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)



Ryc. 87. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)



Ryc. 88. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH)



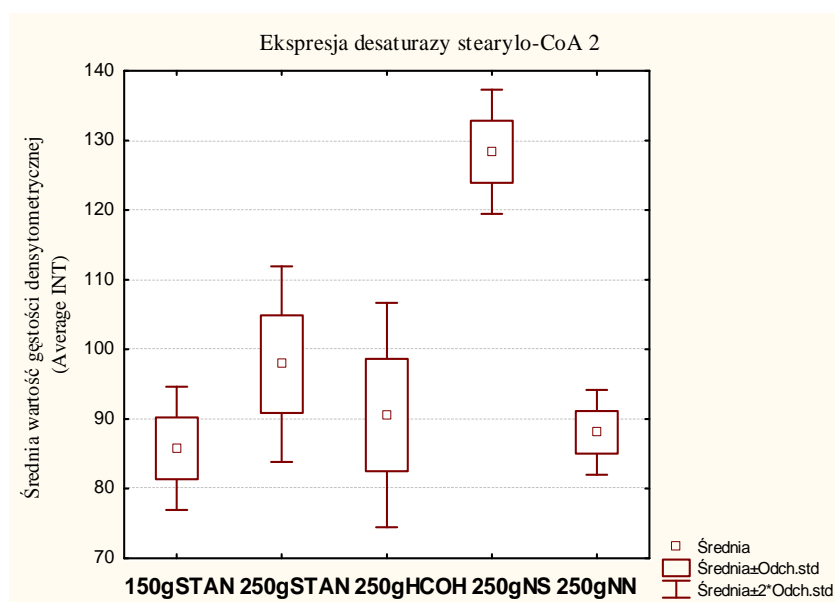
Ryc. 89. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)



Ryc. 90. Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN)

Wykonano analizy statystyczne mające na celu porównanie ekspresji mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej zwierząt pomiędzy wszystkimi badanymi grupami testowymi (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Ryc. 91. przedstawia wykres średnich wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów.



Ryc. 91. Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów.

W badanych grupach testowych wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w ekspresji mRNA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 30. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

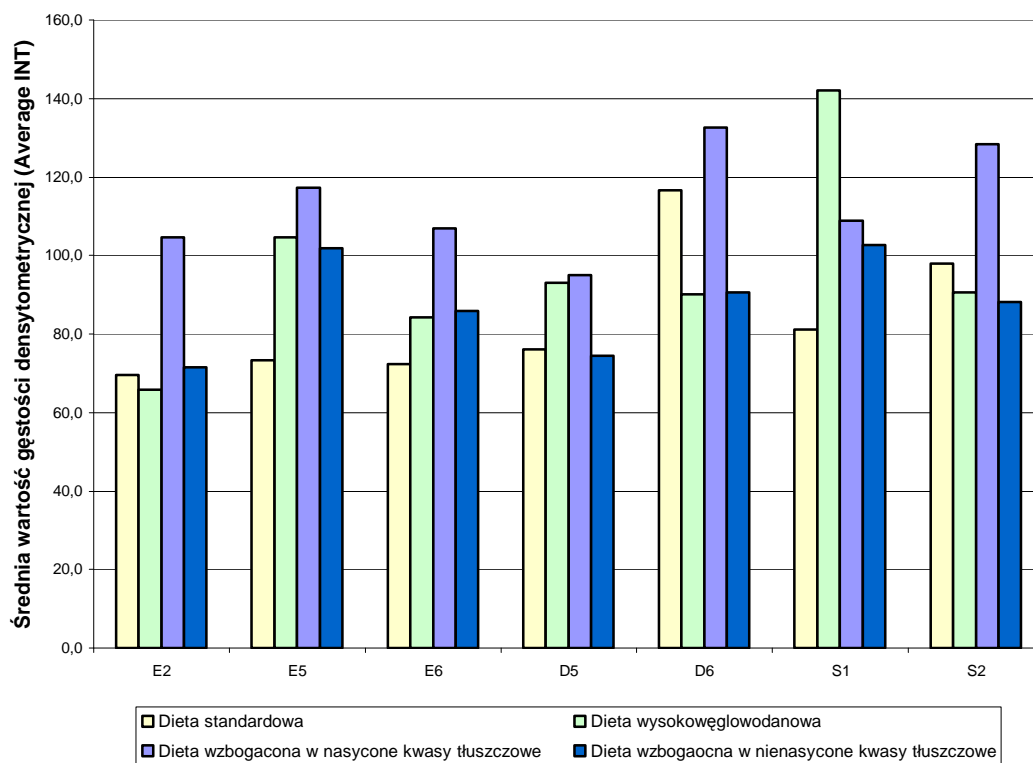
Tab. 30. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250G NN
150g STAN					
250g STAN	0,009454*				
250g HCOH	0,604170	0,205908			
250g NS	0,000130*	0,000130*	0,000130*		
250g NN	0,954578	0,047044*	0,943005	0,000130*	

* różnica znamienne statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 92. przedstawia histogram z poziomami ekspresji mRNA dla wszystkich badanych enzymów we wszystkich grupach testowych w tkance tłuszczowej. Poziomy ekspresji wyrażono jako średnie wartości gęstości densytometrycznej (Average INT).

Ekspresja mRNA dla elongaz i desaturaz w tkance tłuszczowej szczurów



Ryc. 92. Ekspresja elongaz i desaturaz w tkance tłuszczowej szczurów; elongaza 2 (E2), elongaza 5 (E5), elongaza 6 (E6), Δ 5 desaturaza (D5), Δ 6 desaturaza (D6) oraz izoforma 1 (S1) i 2 (S2) desaturazy stearylo-CoA.

7.2. Chromatografia

7.2.1. Wątroba

Techniką chromatografii gazowej oznaczono odsetkowy skład kwasów tłuszczowych w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS). W każdej grupie testowej uzyskano sześć chromatogramów dla tkanki wątrobowej. Wyliczono średnie procentowej zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych. Uzyskane dane pogrupowano na cztery wskaźniki zgodnie z właściwościami kwasów tłuszczowych, a mianowicie na kwasy tłuszczowe nasycone (SAT), kwasy tłuszczowe nienasycone (UNSAT), jendonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA).

Tab. 31. przedstawia średnie procentowych zawartości kwasów tłuszczowych w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

Tab. 31. Średnie procentowych zawartości kwasów tłuszczowych w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

Czas retencji	Kwas tłuszczowy	Nazwa zwyczajowa	150g STAN	250g STAN	250g HCOH	250g NS	250g NN
12,8	C12:0	laurynowy	0,9	0,4	0,4	1,9	0,5
17,8	C14:0	mirystynowy	2,4	1,1	2,2	4,5	1,5
24,9	C16:0	palmitynowy	23,6	21,1	28,0	30,3	21,1
26,1	C16:1	palmitooleinowy	4,5	1,5	4,5	4,8	1,6
28,3	C17:0	heptadekanowy	2,8	0,5	0,4	0,2	0,2
31,4	C18:0	stearynowy	12,5	12,9	6,1	7,6	8,6
32,4	C18:1 n-9	oleinowy	18,7	16,6	23,0	23,2	18,3
34,1	C18:2 n-6	linolowy	15,5	22,8	22,7	19,1	34,2
35,2	C20:0	arachidowy	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
36,38	C18:3 n-6	gammalinolenowy	1,1	1,2	3,5	0,6	0,6
41,72	C21:0	henekozanowy	0,0	0,0	0,4	1,6	0,7
43,15	C22:0	behenowy	1,8	1,2	0,5	0,6	0,6
44,1	C20:3 n-6	cis-8,11,14-eikozatrienowy	6,6	9,5	6,0	3,1	10,5
47,1	C20:4 n-6	arachidonowy	2,0	2,8	0,4	0,1	0,0
55,5	C20:5 n-3	EPA	1,9	2,2	0,6	0,1	0,0
57,6	C22:6 n-3	DHA	5,8	6,2	1,4	2,3	0,9

W celu określenia typu rozkładu uzyskanych danych dla opisanych wskaźników w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą standardową (grupa kontrolna 150g STAN oraz grupa 250g STAN), dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH), dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS) oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN) obliczono miary rozkładu. Zgodność

z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Tab. 32. przedstawia wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), wartości mediany oraz dolnych i górnych kwartyli, a ponadto wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych wskaźników (SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA) we wszystkich grupach testowych (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Tab. 32. Wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), wartości mediany oraz dolnych i górnych kwartyli oraz wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych wskaźników (SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA) we wszystkich grupach testowych wątrobie.

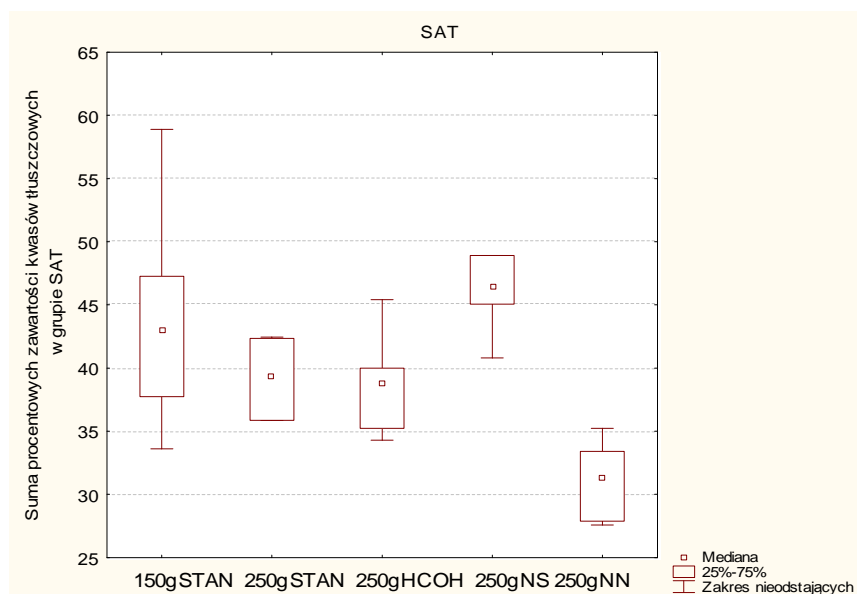
150g STAN - WĄTROBA					
	<u>SAT</u>	<u>UNSAT</u>		<u>MUFA</u>	<u>PUFA</u>
<i>MEDIANA</i>	43,0	57,0	<i>ŚREDNIA</i>	18,9	32,9
<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	38/47	53/62	<i>SD</i>	3,7	16,3
<i>p=</i>	0,77	0,77	<i>p=</i>	0,27	0,35
250g STAN – WĄTROBA					
	<u>SAT</u>	<u>UNSAT</u>		<u>MUFA</u>	<u>PUFA</u>
<i>MEDIANA</i>	39,4	60,6	<i>ŚREDNIA</i>	15,4	44,7
<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	36/42	58/64	<i>SD</i>	1,5	3,2
<i>p=</i>	0,042*	0,04*	<i>p=</i>	0,80	0,35
250 HCOH – WĄTROBA					
	<u>SAT</u>	<u>UNSAT</u>		<u>MUFA</u>	<u>PUFA</u>
<i>MEDIANA</i>	38,7	61,3	<i>ŚREDNIA</i>	28,1	33,2
<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	35/40	60/65	<i>SD</i>	1,5	3,6
<i>p=</i>	0,60	0,60	<i>p=</i>	0,22	0,96
250 NS – WĄTROBA					
	<u>SAT</u>	<u>UNSAT</u>		<u>MUFA</u>	<u>PUFA</u>
<i>MEDIANA</i>	46,5	53,5	<i>ŚREDNIA</i>	26,3	26,5
<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	45/49	51/55	<i>SD</i>	3,3	4,4
<i>p=</i>	0,83	0,83	<i>p=</i>	0,89	0,27
250 NN – WĄTROBA					
	<u>SAT</u>	<u>UNSAT</u>		<u>MUFA</u>	<u>PUFA</u>
<i>MEDIANA</i>	31,3	68,7	<i>ŚREDNIA</i>	17,2	51,7
<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	28/33	67/72	<i>SD</i>	2	4,7
<i>p=</i>	0,63	0,63	<i>p=</i>	0,26	0,92

* różnica znamiennej statystycznie ($p < 0,05$)

Rozkład danych zsumowanych wartości odsetkowych kwasów tłuszczowych we wskaźnikach SAT oraz UNSAT w grupie 250g STAN nie jest rozkładem normalnym ($p>0,05$). W dalszych analizach statystycznych wskaźników SAT oraz UNSAT były przeprowadzone analizy nieparametryczne, dlatego dla ujednoczenia wartości, w tab. 32. podano wartości mediany oraz dolnego i górnego kwartylu dla wszystkich grup testowych w wątrobie szczurów.

Rozkład danych zsumowanych wartości odsetkowych kwasów tłuszczowych we wskaźnikach MUFA oraz PUFA we wszystkich badanych grupach testowych jest rozkładem normalnym ($p>0,05$).

Ryc. 93. przedstawia zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika SAT w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 93. Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika SAT w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

W grupie 250g STAN wykazano niezgodność z rozkładem normalnym. Ten fakt narzuca wykorzystanie w dalszych analizach statystycznych testów nieparametrycznych. Wykazanie różnic w wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika SAT pomiędzy wszystkimi testowymi grupami przeprowadzono z zastosowaniem testu Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p<0,05$). Dalsze postępowanie weryfikacji hipotezy zerowej o braku

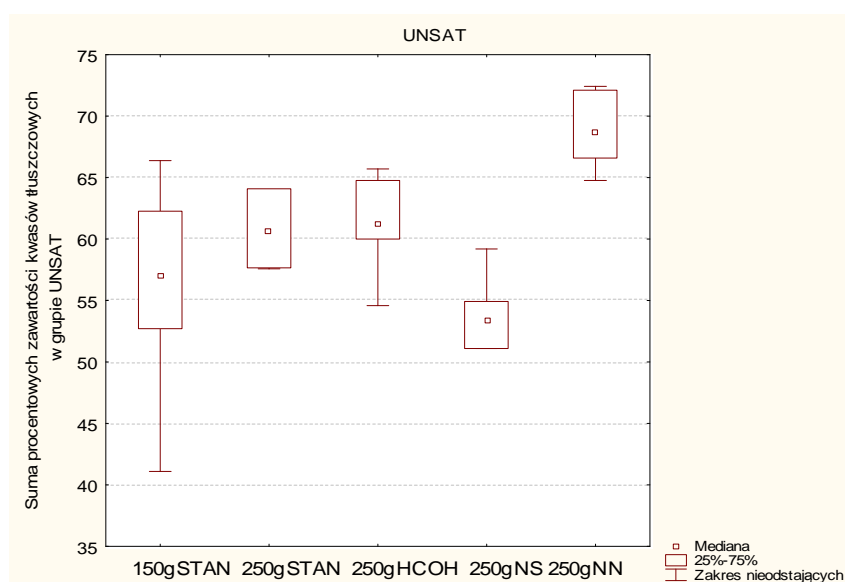
różnic pomiędzy grupami testowymi przeprowadzono testem post-hoc Dunn'a. Tab. 33. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 33. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika SAT w tkance wątrobowej szczurów ($p < 0,05$).

Test Dunn'a	Difference in rank sum	P < 0.05?
150g STAN vs 250 g STAN	5,500	No
150g STAN vs 250g HCOH	5,250	No
150g STAN vs 250g NS	-5,333	No
150g STAN vs 250g NN	14,58*	Yes
250g STAN vs 250g HCOH	-0,2500	No
250g STAN vs 250g NS	-10,83	No
250g STAN vs 250g NN	9,083	No
250g HCOH vs 250g NS	-10,58	No
250g HCOH vs 250g NN	9,333	No
250g NS vs 250g NN	19,92*	Yes

* różnica znamienne statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 94. przedstawia zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika UNSAT w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 94. Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika UNSAT w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

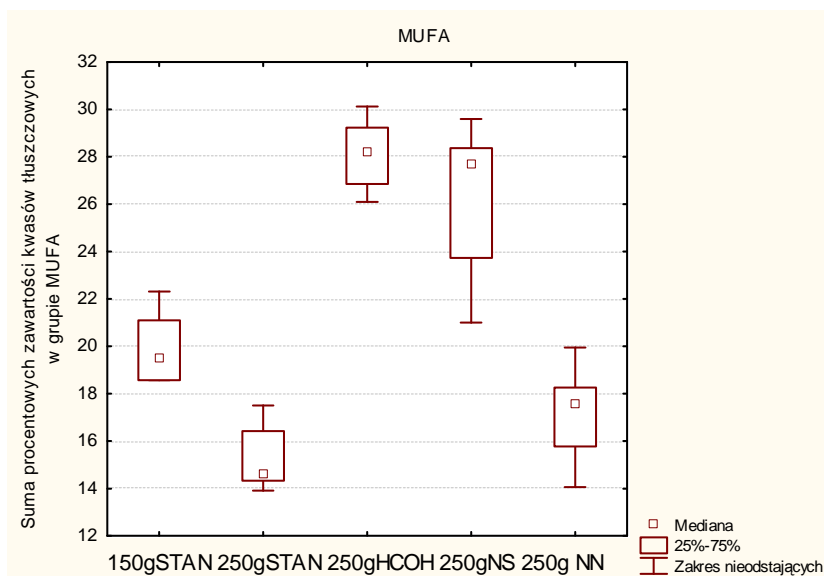
W grupie 250g STAN wykazano niezgodność z rozkładem normalnym. W dalszych analizach statystycznych posłużono się testami nieparametrycznymi. Wykazanie różnic w wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika UNSAT pomiędzy wszystkimi testowymi grupami przeprowadzono z zastosowaniem testu Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dalsze postępowanie weryfikacji hipotezy zerowej o braku różnic pomiędzy grupami testowymi przeprowadzono testem post-hoc Dunn'a. Tab. 34. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 34. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika UNSAT w tkance wątrobowej szczurów ($p < 0,05$).

Test Dunn'a	Difference in rank sum	P < 0.05?
150g STAN vs 250 g STAN	-5,500	No
150g STAN vs 250g HCOH	-5,250	No
150g STAN vs 250g NS	5,333	No
150g STAN vs 250g NN	-14,58*	Yes
250g STAN vs 250g HCOH	0,2500	No
250g STAN vs 250g NS	10,83	No
250g STAN vs 250g NN	-9,083	No
250g HCOH vs 250g NS	10,58	No
250g HCOH vs 250g NN	-9,333	No
250g NS vs 250g NN	-19,92*	Yes

* różnica znamienna statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 95. przedstawia zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika MUFA w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 95. Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika MUFA w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

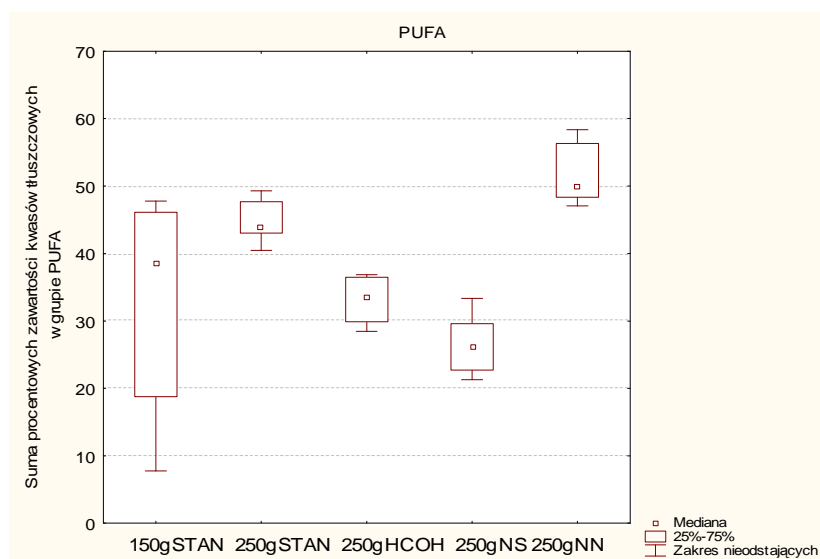
We wszystkich grupach testowych dla wskaźnika MUFA wykazano zgodność z rozkładem normalnym i w dalszych analizach testem Levene'a wykazano jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika MUFA pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 35. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 35. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla wskaźnika MUFA w tkance wątrobowej szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250G NS	250GNN
150g STAN					
250g STAN	0,223240				
250gHCOH	0,000189*	0,000129*			
250g NS	0,001061*	0,000132*	0,747900		
250g NN	0,833461	0,785833	0,000129*	0,000144*	

* różnica znamienna statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 96. przedstawia zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika PUFA w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 96. Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika PUFA w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

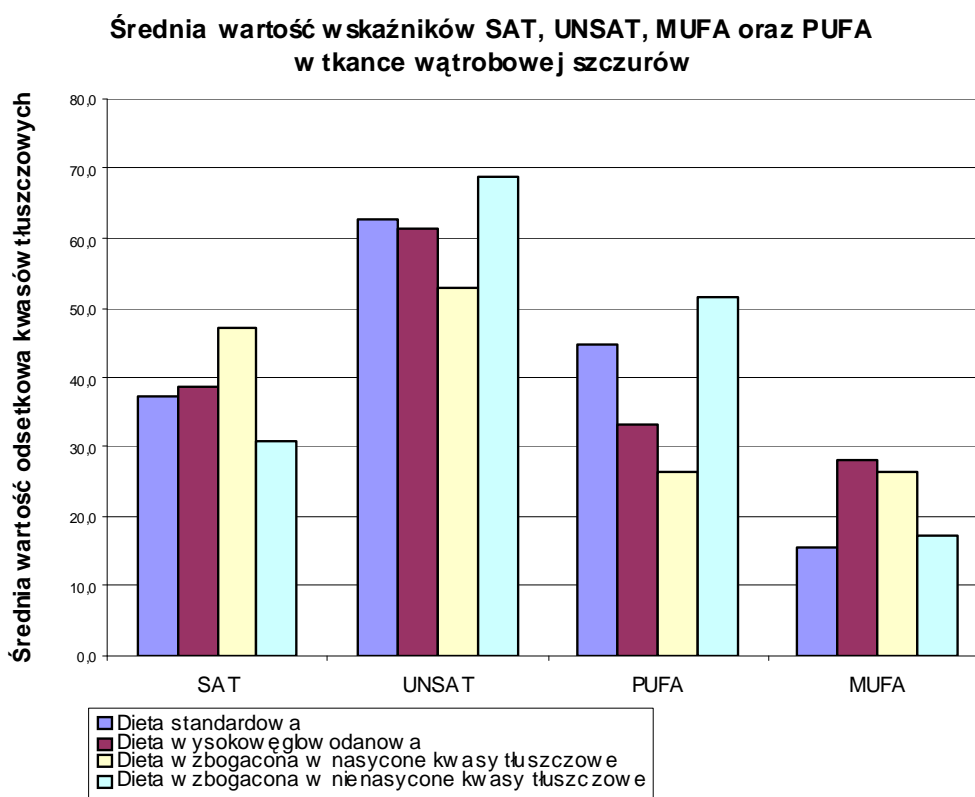
We wszystkich badanych grupach testowych dla wskaźnika PUFA wykazano testem Shapiro-Wilka zgodność z rozkładem normalnym. Testem Levene'a wykazano brak jednorodności wariancji ($p < 0,05$). W dalszych analizach statystycznych wykorzystano testy nieparametryczne. Wykazanie różnic w wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika PUFA pomiędzy wszystkimi testowymi grupami przeprowadzono z zastosowaniem testu Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dalsze postępowanie weryfikacji hipotezy zerowej o braku różnic pomiędzy grupami testowymi wykonano testem post-hoc Dunn'a. Tab. 36. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 36. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika PUFA w tkance wątrobowej szczurów ($p < 0,05$).

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?
150g STAN vs 250 g STAN	-7,667	No
150g STAN vs 250g HCOH	1,500	No
150g STAN vs 250g NS	6,667	No
150g STAN vs 250g NN	-13,83	No
250g STAN vs 250g HCOH	9,167	No
250g STAN vs 250g NS	14,33*	Yes
250g STAN vs 250g NN	-6,167	No
250g HCOH vs 250g NS	5,167	No
250g HCOH vs 250g NN	-15,33*	Yes
250g NS vs 250g NN	-20,50*	Yes

* różnica znamiennej statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 97. przedstawia histogram ze średnimi wartościami wskaźników SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA w tkance wątrobowej we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 97. Średnia wartość wskaźników SAT, UNSAT, PUFA oraz MUFA w tkance wątrobowej szczurów

7.2.2. Tkanka tłuszczowa

Techniką chromatografii gazowej oznaczono odsetkowy skład kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS). W każdej grupie testowej uzyskano sześć chromatogramów dla tkanki tłuszczowej. Uzyskane dane pogrupowano na cztery wskaźniki zgodnie z właściwościami kwasów tłuszczowych, a mianowicie na kwasy tłuszczowe nasycone (SAT), kwasy tłuszczowe nienasycone (UNSAT), jendonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA).

Tab. 37. przedstawia średnie procentowej zawartości kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

Tab. 37. Średnie procentowych zawartości kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

Czas retencji	Kwas tłuszczowy	Nazwa zwyczajowa	150g STAN	250g STAN	250g HCOH	250g NS	250g NN
17,8	C14:0	mirystynowy	3,7	2,9	1,6	14,7	0,8
19,4	C14:1	mirystooleinowy	0,2	0,2	0,0	0,6	0,0
21,4	C15:0	pentadekanowy	0,5	0,5	0,2	0,1	0,1
24,9	C16:0	palmitynowy	24,6	26,6	27,8	27,4	13,5
26,1	C16:1	palmitooleinowy	4,8	5,9	3,3	6,4	1,4
28,3	C17:0	heptadekanowy	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1
29,4	C17:1	cis-10-heptadekanowy	0,3	0,4	0,1	0,1	0,0
31,4	C18:0	stearynowy	3,6	3,3	3,9	5,1	2,8
32,4	C18:1 n-9 C	oleinowy	25,9	27,4	25,9	24,3	18,7
34,1	C18:2 n-6 C	linolowy	23,3	21,7	35,3	3,1	60,0
36,38	C18:3 n-6	gammalinolenowy	5,8	5,5	0,6	0,2	0,3
39,4	C18:3n3	linolenowy	0,6	0,6	0,2	0,0	0,2
41,72	C21:0	heneikozanowy	0,3	0,2	0,2	0,0	0,3
43,15	C22:0	behenowy	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
44,1	C20:3 n-6	cis-8,11,14-eikozatrienowy	0,7	0,5	0,5	0,0	1,3
47,1	C20:4 n-6	arachidonowy	0,8	0,7	0,0	0,0	0,0
55,5	C20:5 n-3	EPA	0,9	0,9	0,0	0,0	0,0
57,6	C22:6 n-3	DHA	1,6	1,5	0,0	0,0	0,0

W celu określenia typu rozkładu uzyskanych danych dla opisanych wskaźników w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą standardową (grupa kontrolna 150g STAN oraz grupa 250g STAN), dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH), dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS) oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN) obliczono miary rozkładu. Zgodność

z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Tab. 38. przedstawia wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), wartości mediany oraz dolnych i górnych kwartyli, a ponadto wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych wskaźników (SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA) we wszystkich grupach testowych (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Tab. 38. Wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), wartości mediany oraz dolnych i górnych kwartyli oraz wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych wskaźników (SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA) we wszystkich grupach testowych tkance tłuszczowej.

150g STAN - TKANKA TŁUSZCZOWA					
	SAT	UNSAT	PUFA		MUFA
<i>ŚREDNIA</i>	35,0	65,0	33,7	<i>MEDIANA</i>	31,4
<i>SD</i>	3,4	3,4	2,6	<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	30,9/32,4
<i>p=</i>	0,56	0,56	0,26	<i>p=</i>	0,21
250g STAN - TKANKA TŁUSZCZOWA					
	SAT	UNSAT	PUFA		MUFA
<i>ŚREDNIA</i>	34,9	65,1	31,3	<i>MEDIANA</i>	34,1
<i>SD</i>	1,4	1,4	2,3	<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	33,6/35
<i>p=</i>	0,91	0,91	0,35	<i>p=</i>	0,25
250g HCOH - TKANKA TŁUSZCZOWA					
	SAT	UNSAT	PUFA		MUFA
<i>ŚREDNIA</i>	36,0	64,0	33,4	<i>MEDIANA</i>	30,5
<i>SD</i>	1,3	1,3	2,9	<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	29,1/32,3
<i>p=</i>	0,49	0,49	0,49	<i>p=</i>	0,60
250g NS -TKANKA TŁUSZCZOWA					
	SAT	UNSAT	PUFA		MUFA
<i>ŚREDNIA</i>	65,3	34,7	7,7	<i>MEDIANA</i>	25,8
<i>SD</i>	3,1	3,1	1,7	<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	25,3/28,8
<i>p=</i>	0,23	0,23	0,64	<i>p=</i>	0,042*
250g NN -TKANKA TŁUSZCZOWA					
	SAT	UNSAT	PUFA		MUFA
<i>ŚREDNIA</i>	21,4	78,6	56,7	<i>MEDIANA</i>	22,1
<i>SD</i>	0,8	0,8	1,4	<i>DOLNY/GÓRNY KWARTYL</i>	21,1/22,3
<i>p=</i>	0,92	0,92	0,83	<i>p=</i>	0,08

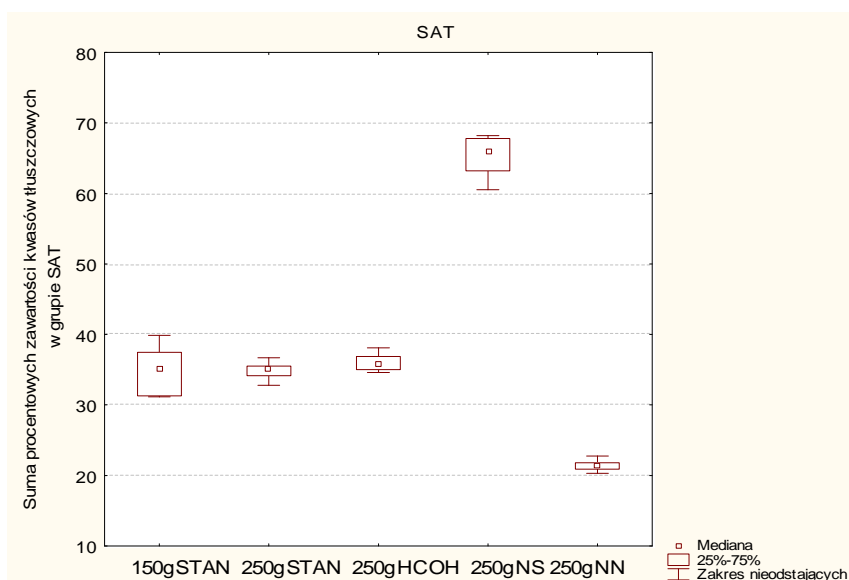
* różnica znamiennej statystycznie ($p < 0,05$)

Rozkład danych zsumowanych wartości odsetkowych kwasów tłuszczowych dla wskaźnika MUFA w grupie 250g NS nie jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$).

W dalszych analizach statystycznych dla tego wskaźnika w tkance tłuszczowej szczurów były przeprowadzone analizy nieparametryczne, dlatego dla ujednoczenia wartości, w tab. 38. podano wartości mediany oraz dolnego i górnego kwartyłu dla wszystkich grup testowych.

Rozkład danych zsumowanych wartości odsetkowych kwasów tłuszczowych we wskaźnikach SAT, UNSAT oraz PUFA we wszystkich badanych grupach testowych w tkance tłuszczowej jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$).

Ryc. 98. przedstawia zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika SAT w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 98. Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika SAT w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

We wszystkich badanych grupach testowych dla wskaźnika SAT wykazano testem Shapiro-Wilka zgodność z rozkładem normalnym. Testem Levene'a wykazano brak jednorodności wariancji ($p < 0,05$). W dalszych analizach statystycznych przeprowadzono testy nieparametryczne. Dla wykazania różnic w wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika SAT pomiędzy wszystkimi testowymi grupami w tkance tłuszczowej zastosowano test Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dalsze postępowanie weryfikacji hipotezy

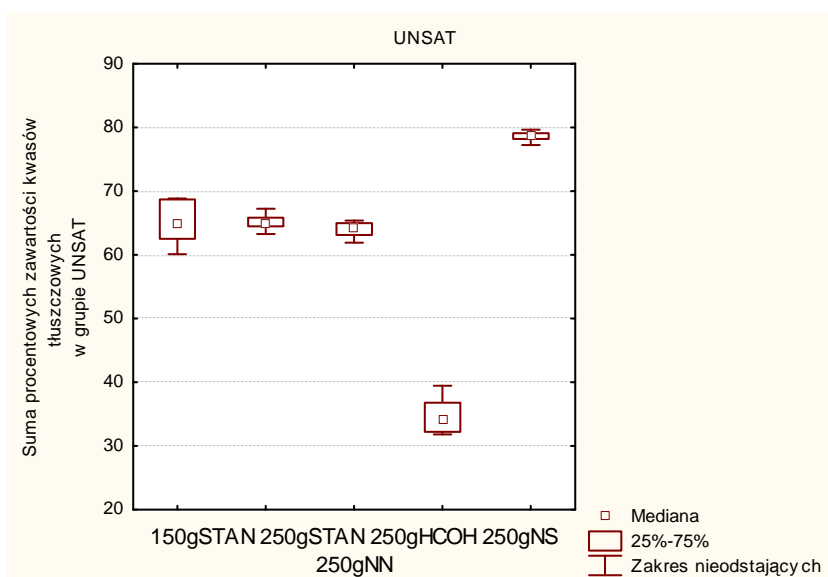
zerowej o braku różnic pomiędzy grupami testowymi przeprowadzono testem post-hoc Dunn'a. Tab. 39. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 39. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika SAT w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

Test Dunn'a	Difference in rank sum	P < 0.05?
150g STAN vs 250 g STAN	0,8333	No
150g STAN vs 250g HCOH	-2,083	No
150g STAN vs 250g NS	-12,42	No
150g STAN vs 250g NN	11,58	No
250g STAN vs 250g HCOH	-2,917	No
250g STAN vs 250g NS	-13,25	No
250g STAN vs 250g NN	10,75	No
250g HCOH vs 250g NS	-10,33	No
250g HCOH vs 250g NN	13,67	No
250g NS vs 250g NN	24,00*	Yes

* różnica znamienna statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 99. przedstawia zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika UNSAT w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 99. Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika UNSAT w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

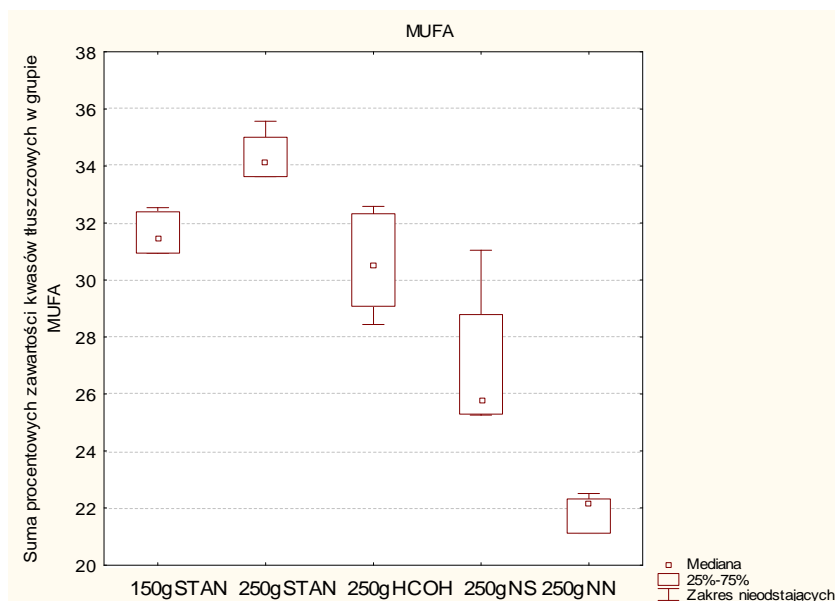
We wszystkich badanych grupach testowych dla wskaźnika UNSAT wykazano testem Shapiro-Wilka zgodność z rozkładem normalnym. Testem Levene'a wykazano brak jednorodności wariancji ($p < 0,05$). Ten fakt narzuca wykorzystanie w dalszych analizach statystycznych testów nieparametrycznych. Dla wykazania różnic w wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika UNSAT pomiędzy wszystkimi testowymi grupami w tkance tłuszczowej zastosowano test Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dalsze postępowanie weryfikacji hipotezy zerowej o braku różnic pomiędzy grupami testowymi przeprowadzono testem post-hoc Dunn'a. Tab. 40. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 40. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika UNSAT w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

Test Dunn'a	Difference in rank sum	P < 0.05?
150g STAN vs 250 g STAN	-0,8333	No
150g STAN vs 250g HCOH	2,083	No
150g STAN vs 250g NS	12,42	No
150g STAN vs 250g NN	-11,58	No
250g STAN vs 250g HCOH	2,917	No
250g STAN vs 250g NS	13,25	No
250g STAN vs 250g NN	-10,75	No
250g HCOH vs 250g NS	10,33	No
250g HCOH vs 250g NN	-13,67	No
250g NS vs 250g NN	-24,00*	Yes

* różnica znamienna statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 100. przedstawia zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika MUFA w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 100. Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika MUFA w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

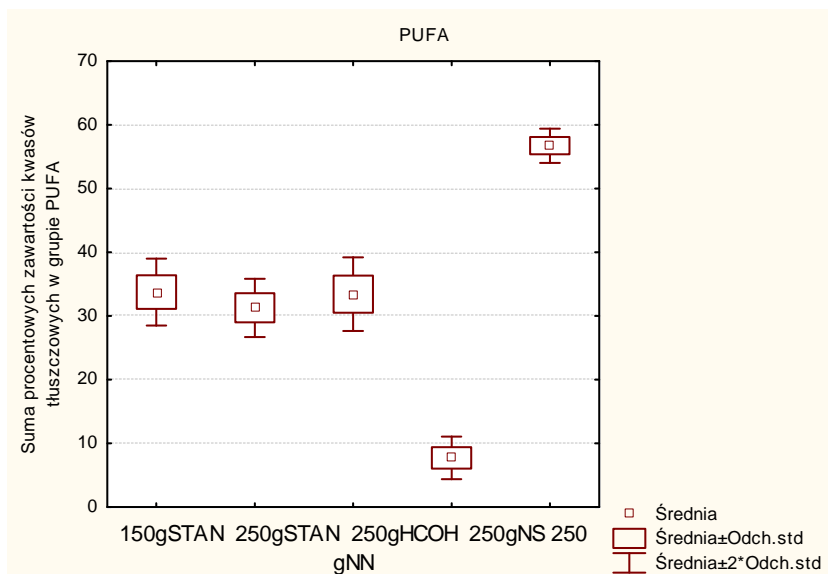
W grupie 250g NS wykazano niezgodność z rozkładem normalnym. W dalszych analizach statystycznych wykorzystano testy nieparametryczne. Dla wykazania różnic w wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika MUFA pomiędzy wszystkimi testowymi grupami w tkance tłuszczowej zastosowano test Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dalsze postępowanie weryfikacji hipotezy zerowej o braku różnic pomiędzy grupami testowymi przeprowadzono testem post-hoc Dunn'a. Tab. 41. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 41. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika MUFA w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

Test Dunn'a	Difference in rank sum	P < 0.05?
150g STAN vs 250 g STAN	-6,417	No
150g STAN vs 250g HCOH	2,417	No
150g STAN vs 250g NS	8,667	No
150g STAN vs 250g NN	16,17*	Yes
250g STAN vs 250g HCOH	8,833	No
250g STAN vs 250g NS	15,08*	Yes
250g STAN vs 250g NN	22,58*	Yes
250g HCOH vs 250g NS	6,250	No
250g HCOH vs 250g NN	13,75	No
250g NS vs 250g NN	7,500	No

* różnica znamionna statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 101. przedstawia zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika PUFA w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 101. Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika PUFA w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.

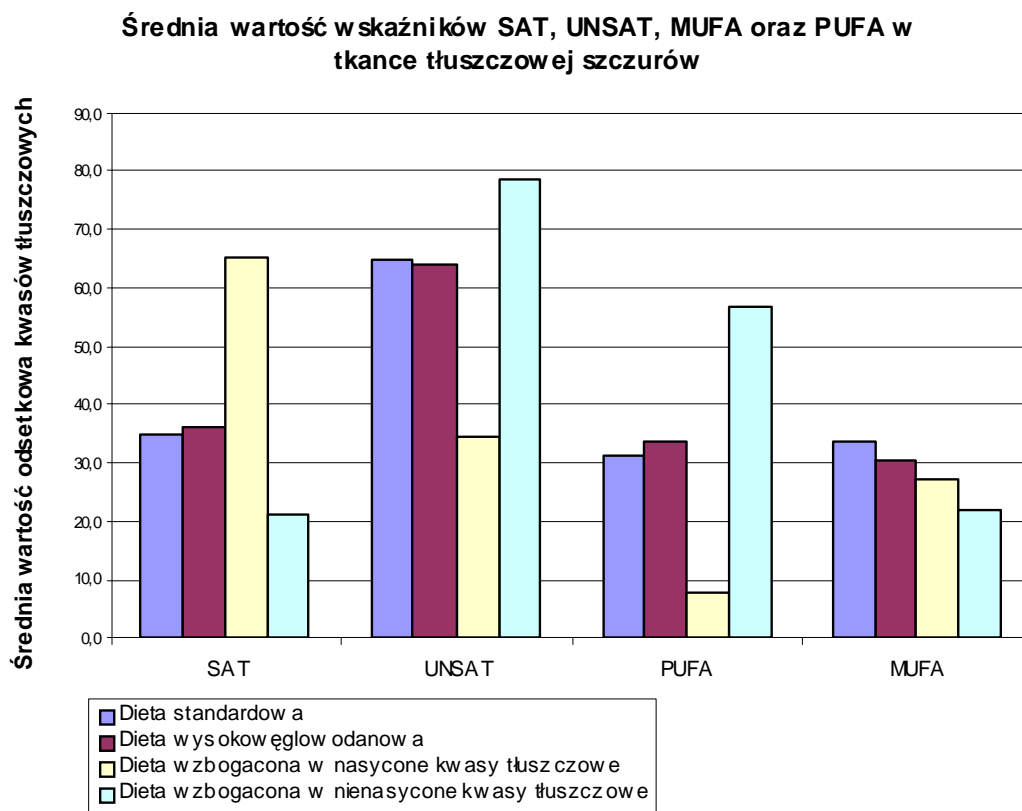
We wszystkich grupach testowych dla wskaźnika PUFA wykazano zgodność z rozkładem normalnym. W dalszych analizach statystycznych testem Levene'a wykazano jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic w wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika PUFA pomiędzy grupami testowymi w tkance tłuszczowej posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 42. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 42 Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla wskaźnika PUFA w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).

	150G STAN	250G STAN	250G HCOH	250GNS	250G NN
150gSTAN					
250gSTAN	0,324210				
250gHCOH	0,999677	0,516000			
250gNS	0,000130*	0,000130*	0,000130*		
250gNN	0,000130*	0,000130*	0,000130*	0,000130*	

* różnica znamienna statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 102. przedstawia histogram ze średnimi wartościami wskaźników SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA w tkance tłuszczowej we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 102. Średnia wartość wskaźników SAT, UNSAT, PUFA oraz MUFA w tkance tłuszczowej szczurów

7.3. Profil lipidowy oraz stężenie glukozy

Przy użyciu standardowych zestawów do analiz metodą spektrofotometryczną zostały oznaczone stężenie glukozy, a także stężenie cholesterolu całkowitego, triacylogliceroli oraz cholesterolu frakcji HDL we wszystkich grupach testowych (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Glukoza

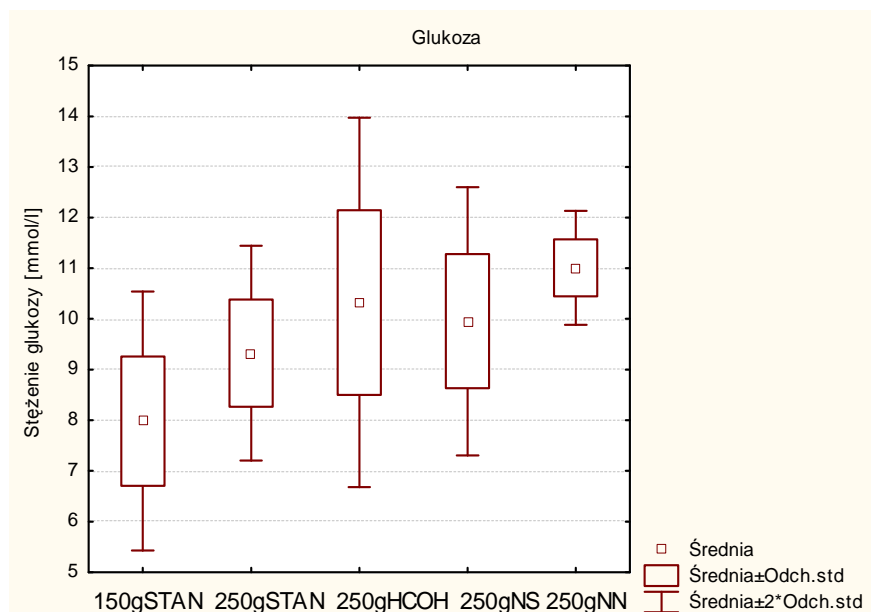
W celu określenia typu rozkładu uzyskanych danych dla stężenia glukozy w surowicy krwi szczurów żywionych dietą standardową (grupa kontrolna 150g STAN oraz grupa 250g STAN), dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH), dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS) oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN) obliczono miary rozkładu. Zgodność z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Tab. 43. przedstawia wartości średnich oraz odchyłeń standardowych, a ponadto wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka we wszystkich grupach testowych (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Tab. 43. Statystyki opisowe - glukoza

Statystyki opisowe - glukoza			
	Średnia	Odch.std	p=
Glukoza150g STAN	7,98	1,28	0,052
Glukoza250g STAN	9,33	1,06	0,42
Glukoza250g HCOH	10,32	1,82	0,72
Glukoza250g NS	9,96	1,32	0,54
Glukoza250g NN	11,01	0,56	0,21

Rozkład danych dla stężenia glukozy w surowicy krwi szczurów we wszystkich badanych grupach testowych jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$).

Ryc. 103. przedstawia wartości stężeń glukozy w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 103. Wartości stężeń glukozy w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych

We wszystkich badanych grupach wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic dla stężeń glukozy pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 44. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 44. Wartości p uzyskane w teście Tukey'a dla stężeń cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi szczurów ($p < 0,05$).

	150g STAN	250g STAN	250g HCOH	250g NS	250g NN
150g STAN					
250g STAN	0,384895				
250g HCOH	0,029601*	0,661046			
250g NS	0,086839	0,910546	0,986694		
250g NN	0,003269*	0,182748	0,881925	0,614172	

* różnica znamienna statystycznie ($p < 0,05$)

Cholesterol całkowity

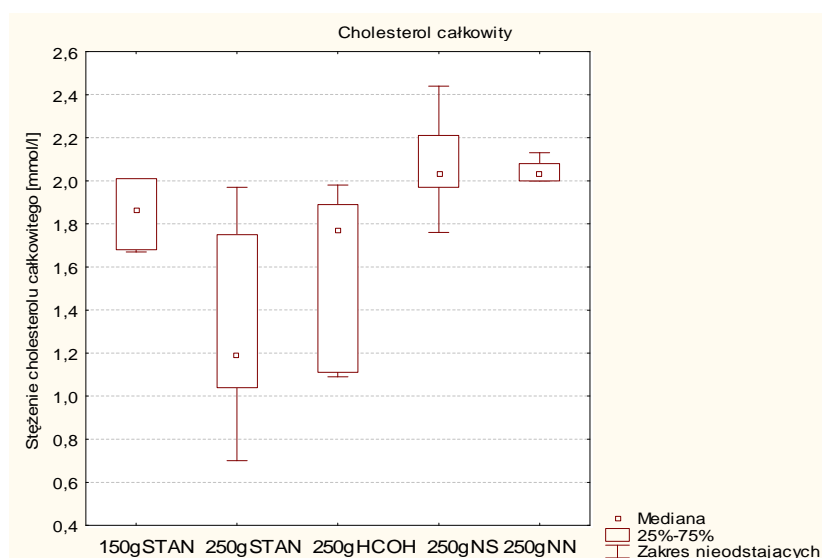
W celu określenia typu rozkładu uzyskanych danych dla stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów żywionych dietą standardową (grupa kontrolna 150g STAN oraz grupa 250g STAN), dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH), dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS) oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN) obliczono miary rozkładu. Zgodność z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Tab. 45. przedstawia wartości średnich oraz odchyłeń standardowych, a ponadto wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka we wszystkich grupach testowych (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Tab. 45. Statystyki opisowe – cholesterol całkowity

Statystyki opisowe - cholesterol całkowity			
	Średnia	Odch.stand.	p=
Chol. Całk. 150g STAN	1,85	0,16	0,18
Chol. Całk. 250g STAN	1,31	0,47	0,68
Chol. Całk. 250g HCOH	1,60	0,40	0,07
Chol. Całk. 250g NS	2,08	0,23	0,93
Chol. Całk. 250g NN	2,02	0,11	0,29

Rozkład danych dla stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów we wszystkich badanych grupach testowych jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$).

Ryc. 104. przedstawia wartości stężeń cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 104. Wartości stężeń cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.

Rozkład danych stężenia cholesterolu całkowitego we wszystkich badanych grupach testowych jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$). Testem Levene'a wykazano brak jednorodności wariancji ($p < 0,05$). W dalszych analizach statystycznych wykorzystano testy nieparametryczne. Dla wykazania różnic w stężeniach cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów pomiędzy wszystkimi testowymi grupami w zastosowano test Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dalsze postępowanie weryfikacji hipotezy zerowej o braku różnic pomiędzy grupami testowymi przeprowadzono testem post-hoc Dunn'a. Tab. 46. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 46. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla stężeń cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów ($p < 0,05$).

Test Dunn'a	Difference in rank sum	P < 0.05?
150g STAN vs 250 g STAN	7,750	No
150g STAN vs 250g HCOH	3,917	No
150g STAN vs 250g NS	-8,167	No
150g STAN vs 250g NN	-7,667	No
250g STAN vs 250g HCOH	-3,833	No
250g STAN vs 250g NS	-15,92*	Yes
250g STAN vs 250g NN	-15,42*	Yes
250g HCOH vs 250g NS	-12,08	No
250g HCOH vs 250g NN	-11,58	No
250g NS vs 250g NN	0,5000	No

* różnica znamienne statystycznie ($p < 0,05$)

Triacyloglicerole

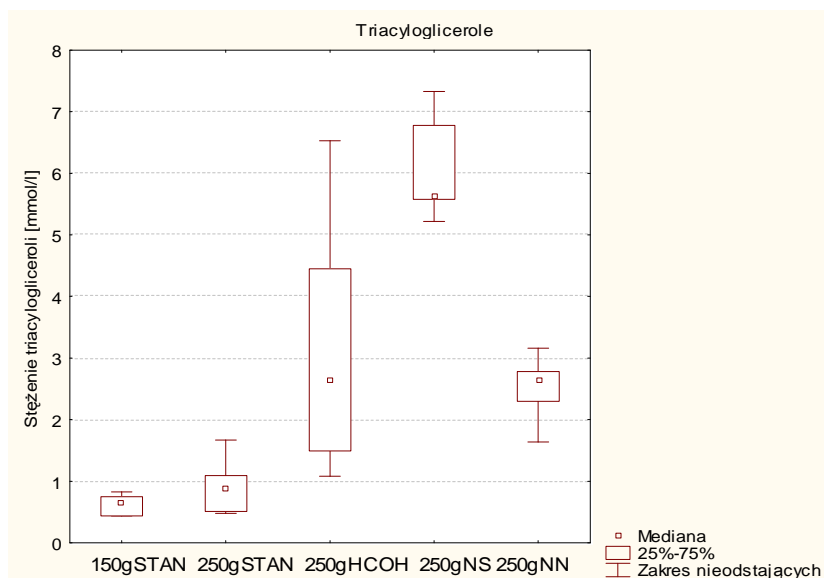
W celu określenia typu rozkładu uzyskanych danych dla stężenia triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów żywionych dietą standardową (grupa kontrolna 150g STAN oraz grupa 250g STAN), dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH), dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS) oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN) obliczono miary rozkładu. Zgodność z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Tab. 47. przedstawia wartości mediany oraz dolnych i górnych kwartyli, a ponadto wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka we wszystkich grupach (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Tab. 47. Statystyki opisowe - triacyloglicerole

Statystyki opisowe - triacyloglicerole			
	Średnia	Odch.stand.	p=
TAG150g STAN	0,63	0,16	0,39
TAG250g STAN	0,92	0,45	0,45
TAG250g HCOH	3,14	2,09	0,45
TAG250g NS	6,03	0,83	0,12
TAG250g NN	2,53	0,52	0,67

Rozkład danych dla stężenia triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów we wszystkich badanych grupach testowych jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$).

Ryc. 105. przedstawia wartości stężeń triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 105. Wartości stężeń triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.

Rozkład danych stężenia cholesterolu całkowitego we wszystkich badanych grupach testowych jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$). Testem Levene'a wykazano brak jednorodności wariancji ($p < 0,05$). W dalszych analizach statystycznych wykorzystano testy nieparametryczne. Dla wykazania różnic w stężeniach triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów pomiędzy wszystkimi testowymi grupami w zastosowano test Kruskala-Wallisa. Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dalsze postępowanie weryfikacji hipotezy zerowej o braku różnic pomiędzy grupami testowymi przeprowadzono testem post-hoc Dunn'a. Tab. 48. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 48. Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla stężeń triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów ($p < 0,05$).

Test Dunn'a	Difference in rank sum	P < 0.05?
150g STAN vs 250 g STAN	-3,500	No
150g STAN vs 250g HCOH	-13,75	No
150g STAN vs 250g NS	-13,08	No
150g STAN vs 250g NN	-21,75*	Yes
250g STAN vs 250g HCOH	-10,25	No
250g STAN vs 250g NS	-9,583	No
250g STAN vs 250g NN	-18,25*	Yes
250g HCOH vs 250g NS	0,6667	No
250g HCOH vs 250g NN	-8,000	No
250g NS vs 250g NN	-8,667	No

* różnica znamionna statystycznie ($p < 0,05$)

Cholesterol frakcji HDL

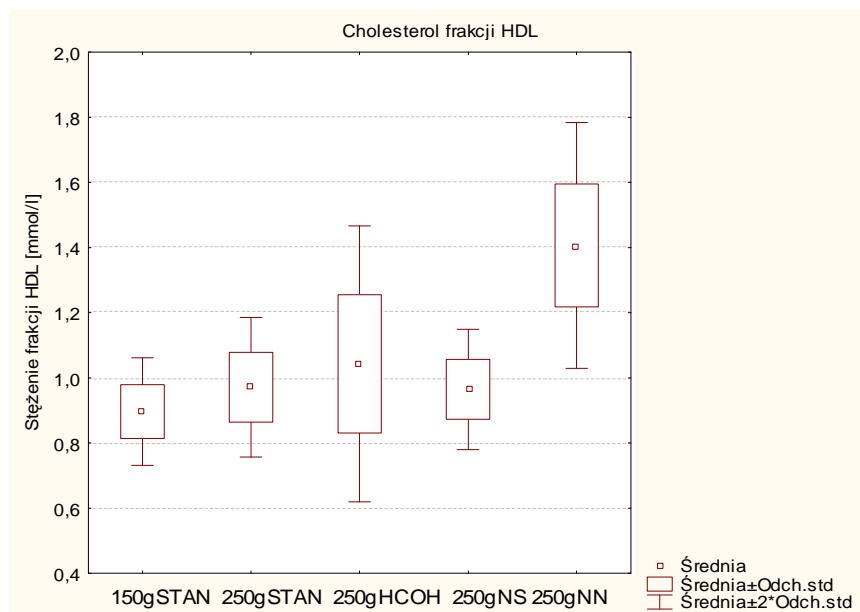
W celu określenia typu rozkładu uzyskanych danych dla stężenia cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi szczurów żywionych dietą standardową (grupa kontrolna 150g STAN oraz grupa 250g STAN), dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH), dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS) oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN) obliczono miary rozkładu. Zgodność z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Tab. 49. przedstawia wartości przedstawi wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), a ponadto wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka we wszystkich grupach (150g STAN, 250g STAN, 250g HCOH, 250g NN oraz 250g NS).

Tab. 49. Statystyki opisowe - cholesterol HDL

Statystyki opisowe - cholesterol HDL			
	Średnia	Odch.std	p=
HDL 150g STAN	0,90	0,08	0,77
HDL 250g STAN	0,97	0,11	0,92
HDL 250g HCOH	1,04	0,21	0,79
HDL 250g NS	0,97	0,09	0,64
HDL 250g NN	1,41	0,19	0,74

Rozkład danych dla stężenia cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi szczurów we wszystkich badanych grupach testowych jest rozkładem normalnym ($p > 0,05$).

Ryc. 106. przedstawia wartości stężeń cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 106. Wartości stężeń cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.

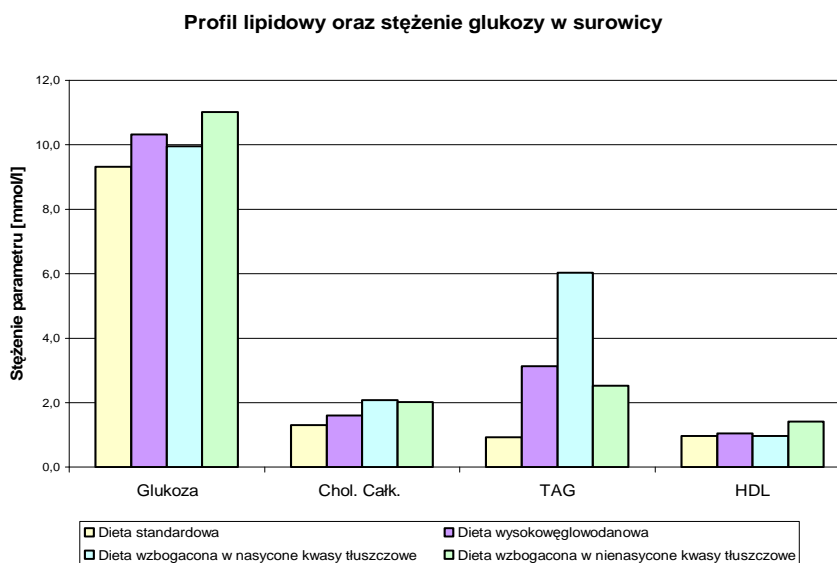
We wszystkich badanych grupach wykazano testem Levene'a jednorodność wariancji ($p > 0,05$). Uzyskane wyniki pozwoliły na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Stwierdzono istotność statystyczną ($p < 0,05$). Dla wykazania różnic dla stężeń cholesterolu frakcji HDL pomiędzy grupami testowymi posłużono się testem post-hoc Tukeya. Tab. 50. przedstawia wartości p uzyskane w teście post hoc. Stwierdzono różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tab. 50. Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla stężeń glukozy w surowicy krwi szczurów ($p < 0,05$).

	150g STAN	250g STAN	250g HCOH	250g NS	250g NN
150g STAN					
250g STAN	0,899150				
250g HCOH	0,432464	0,913052			
250g NS	0,925767	0,999991	0,884075		
250g NN	0,000155*	0,000364*	0,002083*	0,000312*	

* różnica znamienne statystycznie ($p < 0,05$)

Ryc. 107. przedstawia histogram ze średnimi wartościami stężeń parametrów profilu lipidowego oraz glukozy w surowicy krwi we wszystkich grupach testowych.



Ryc. 107. Profil lipidowy oraz stężenie glukozy w surowicy krwi szczurów

W tab. 51-53. przedstawiono średnie wartości ekspresji mRNA dla badanych izoform enzymów oraz średnie wartości wskaźników SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA w wybranych modelach tkankowych, a także średnie wartości oznaczanych parametrów profilu lipidowego oraz stężenia glukozy w surowicy krwi.

Tab. 51 Wartości średnich oznaczanych parametrów w tkance wątrobowej szczurów żywnych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe.

Strzałki wskazują na kierunek zmian względem wartości parametrów oznaczonych w tkance wątrobowej zwierząt żywnych dietą standardową.

TKANKA WĄTROBOWA	DIETA STANDARDOWA	DIETA WYSOKOWĘGŁOWODANOWA	DIETA WZBOGACONA W NASYCONY KWASY TŁUSZCZOWE	DIETA WZBOGACONA W NIENASYCONY KWASY TŁUSZCZOWE
Elongaza 2	80,2	81,2 (↑)	83,8 (↑)	73,5(↓)
Elongaza 5	79,4	98,9 (↑)	117,1 (↑)	100,5 (↑)
Elongaza 6	73,6	84,8 (↑)	104,5 (↑)	91,3 (↑)
D5 desaturaza	92,9	97,3 (↑)	103,0 (↑)	80,5 (↓)
D6 desaturaza	90,6	107,7 (↑)	140,5 (↑)	95,2 (↑)
Izoforma 1 stearylo-CoA desaturazy	84,9	143,4 (↑)	94,5 (↑)	100,0 (↑)
Izoforma 2 stearylo-CoA desaturazy	88,9	103,1 (↑)	102,9 (↑)	75,2 (↓)
SAT	37,2	38,7 (↑)	47,1 (↑)	31,1 (↓)
UNSAT	62,8	61,3 (↓)	52,9 (↓)	68,9 (↑)
MUFA	15,4	28,1 (↑)	26,3 (↑)	17,2 (↑)
PUFA	44,7	33,2 (↓)	26,5 (↓)	51,7 (↑)

Tab. 52. Wartości średnich oznaczanych parametrów w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe.

Strzałki wskazują na kierunek zmian względem wartości parametrów oznaczonych w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą standardową.

TKANKA TŁUSZCZOWA	DIETA STANDARDOWA	DIETA WYSOKOWĘGLOWODANOWA	DIETA WZBOGACONA W NASYCONY KWASY TŁUSZCZOWE	DIETA WZBOGACONA W NIENASYCONY KWASY TŁUSZCZOWE
Elongaza 2	82,9	65,8(↓)	104,6 (↑)	71,5 (↓)
Elongaza 5	73,3	104,7 (↑)	114,1 (↑)	103,4 (↑)
Elongaza 6	72,3	84,2 (↑)	106,8 (↑)	85,9 (↑)
D5 desaturaza	76,1	93,0 (↑)	95,0 (↑)	74,5 (↓)
D6 desaturaza	116,6	90,2 (↓)	132,7 (↑)	90,6 (↓)
Izoforma 1 stearylo-CoA desaturazy	83,8	142,0 (↑)	108,9 (↑)	102,0 (↑)
Izoforma 2 stearylo-CoA desaturazy	97,9	90,6 (↓)	128,4 (↑)	88,1 (↓)
SAT	34,9	36,0 (↑)	65,3 (↑)	21,4 (↓)
UNSAT	65,1	64,0 (↓)	34,7 (↓)	78,6 (↑)
MUFA	33,9	30,6 (↓)	27,0 (↓)	21,9 (↓)
PUFA	31,3	33,4 (↑)	7,7 (↓)	56,7 (↑)

Tab. 53. Wartości średnich oznaczanych parametrów w surowicy krwi szczurów żywionych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe.

Strzałki wskazują na kierunek zmian względem wartości parametrów oznaczonych w surowicy krwi zwierząt żywionych dietą standardową.

SUROWICE	DIETA STANDARDOWA	DIETA WYSOKOWĘGLOWODANOWA	DIETA WZBOGACONA W NASYCONY KWASY TŁUSZCZOWE	DIETA WZBOGACONA W NIENASYCONY KWASY TŁUSZCZOWE
Glukoza [mmol/l]	9,3	10,3 (↑)	10,0 (↑)	11,0 (↑)
Triacyloglicerole [mmol/l]	0,9	3,1 (↑)	6,0 (↑)	2,5 (↑)
Cholesterol całkowity [mmol/l]	1,3	1,6 (↑)	2,1 (↑)	2,0 (↑)
Cholesterol frakcji HDL [mmol/l]	1,0	1,0 (-)	1,0 (-)	1,4 (↑)

8. DYSKUSJA

Kwasy tłuszczowe to heterogenna grupa związków. W organizmie pełnią rolę budulca błon fosfolipidowych, materiału energetycznego oraz są odpowiedzialne za międzykomórkową transdukcję sygnału. Skład oraz struktura kwasów tłuszczowych determinują prawidłową budowę oraz funkcjonowanie komórki. Właściwy stosunek nienasyconych do nasyconych kwasów tłuszczowych wpływa na dynamikę reakcji zachodzących w obrębie błony komórkowej. Zmiany tego stosunku są odpowiedzialne za rozwój różnych schorzeń, m.in. chorób układu krążenia, otyłości, cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, chorób neurologicznych, zaburzeń odporności oraz nowotworów. Kwasy tłuszczowe są ważnymi regulatorami w kontroli homeostazy energetycznej u ssaków. Związki te są syntetyzowane *de novo* lub są dostarczone z dietą. Procesy kataboliczne oraz anaboliczne kwasów tłuszczowych podlegają wzajemnej kontroli regulowanej indywidualnym zapotrzebowaniem tkanek. Wymienione efekty działania są tkankowo-specyficzne. W tkance wątrobowej, głównym narządzie utrzymującym homeostazę organizmu, przebiegają reakcje odpowiedzialne zarówno za syntezę oraz utlenianie kwasów tłuszczowych. Tkanka tłuszczowa spełnia przede wszystkim funkcję magazynującą kwasy tłuszczowe, której rezerwy energetyczne są uwalniane w sytuacji niedoboru substratów energetycznych w organizmie.

Kwasy tłuszczowe mogą ulegać reakcjom elongacji oraz reakcjom desaturacji, katalizowanym odpowiednio przez elongazy i desaturazy kwasów tłuszczowych. Endogenne i egzogenne kwasy tłuszczowe stanowią pulę różnorodnych związków lipidowych, które jednocześnie biorą udział w regulacji syntezy nowych kwasów tłuszczowych poprzez wpływ na ekspresję enzymów lipogennych, a wśród nich na ekspresję elongaz i desaturaz. Ekspresja elongaz i desaturaz jest regulowana przez dietę, a także przez hormony oraz czynniki transkrypcyjne.

Elongazy (EC 2.3.1.) oraz desaturazy (EC 1.14.19) kwasów tłuszczowych to enzymy katalizujące przemiany, których produktami są nasycone oraz nienasycone długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Rodziny tych enzymów występują powszechnie zarówno u roślin jak i zwierząt. Możliwość biosyntezy puli różnych kwasów tłuszczowych jest charakterystyczna w obrębie gatunku, ponieważ jest determinowana przez wzajemne kombinacje właściwych elongaz i desaturaz. Badania eksperymentalne dotyczące tych enzymów są intensywnie prowadzone w ostatnich latach, w związku

z odkryciem nowej funkcji kwasów tłuszczowych jako ligandów dla czynników transkrypcyjnych.

Tkanka wątrobowa ze względu na złożoność przemian metabolicznych oraz utrzymanie homeostazy węglowodanowo-lipidowej całego organizmu jest przedmiotem wielu badań. W celu zbadania ekspresji dla elongaz i desaturaz wykorzystywano przede wszystkim zwierzęta laboratoryjne takie jak myszy oraz szczury. Znaczna większość badań prowadzona była na zwierzętach modyfikowanych genetycznie, nokautowanych pod względem genów lub modelach chorób, oraz w hodowlach komórkowych, co umożliwiło w znacznym stopniu (zamiast precyzyjne) poznanie mechanizmów regulujących ekspresję genów dla elongaz i desaturaz. Badany był wpływ składników pokarmowych – glukozy i kwasów tłuszczowych oraz hormonów [58,110,113,139,142-144]. Eksperymenty dotyczące regulacji na poziomie transkrypcji z wykorzystaniem czynników transkrypcyjnych takich jak PPAR, SREBP, LXR oraz ChREBP przeprowadzone były przede wszystkim na modyfikowanych genetycznie myszach. Badane enzymy wykazują specyfikę substratową, tkankową oraz gatunkową. Zatem nie wszystkie wyniki uzyskane w niniejszej pracy mogły zostać wytłumaczone w odniesieniu do publikowanych prac ze względu na różnorodność modelu doświadczalnego.

W niniejszej pracy badano wpływ diety standardowej, diety wysokowęglowodanowej, diety wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe oraz diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe na ekspresję mRNA dla wybranych elongaz i desaturaz w tkance wątrobowej oraz tkance tłuszczowej szczurów. Spośród elongaz badano ekspresję izoformy 2, 5 oraz 6, natomiast spośród desaturaz badano ekspresję izoformy $\Delta 5$, $\Delta 6$ oraz $\Delta 9$. $\Delta 9$ desaturaza (stearoyl-CoA desaturase, SCD) występuje w tkankach szczurów w dwóch izoformach oznaczonych odpowiednio jako Scd1 oraz Scd2. Nie badano ekspresji mRNA dla elongazy 1, ponieważ dwukrotnie zaprojektowane primery, po wykonaniu analizy techniką RT-PCR wykazały obecność produktów niespecyficznych, co mogłoby negatywnie wpłynąć na prawidłowe oznaczenie poziomu ekspresji mRNA dla tej elongazy. Nie badano ekspresji mRNA dla elongazy 7, która jest najnowszą poznaną elongazą i podana w bazie Entrez Gene sekwencja nukleotydów nie została zatwierdzona, zatem utrudniło to zaprojektowanie odpowiednich primerów dla tej izoformy. Nie oznaczono ekspresji mRNA dla elongazy 3 oraz elongazy 4, ponieważ specyfika tkankowa tych enzymów odbiega od wybranych modeli tkankowych. Elongaza 3 jest specyficzna dla tkanki skórnej oraz brunatnej

tkanki tłuszczowej oraz elongaza 4 jest specyficzna dla siatkówki. W niniejszej pracy oznaczono skład kwasów tłuszczowych lipidów całkowitych metodą chromatografii gazowej oraz profil lipidowy i stężenie glukozy w surowicy krwi zwierząt. Należy zwrócić uwagę, że wyniki uzyskane dla zwierząt o wadze 150 gramów żywionych dietą standardową stanowiły punkt wyjścia dla zwierząt o wadze 250 gramów żywionych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. W interpretacji wyników, dla wykazania różnic lub ich braku, wykorzystano wyniki tylko dla zwierząt o wadze 250 gramów, aby wykluczyć udział innych niż dieta czynników.

W przeprowadzonych badaniach, w tkance wątrobowej oraz tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe wykazano ekspresję genów dla elongazy 2, 5 oraz 6 oraz dla $\Delta 5$, $\Delta 6$ oraz $\Delta 9$ desaturazy (izoforny 1 oraz izoforny 2).

Wyniki analizy chromatograficznej interpretowano jako procentową zawartość kwasów tłuszczowych. Uzyskane wartości zostały pogrupowane zgodnie ze stopniem nasycenia łańcuchów kwasów tłuszczowych: nasycone kwasy tłuszczowe (SAT), nienasycone kwasy tłuszczowe (UNSAT), jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) oraz wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA).

Analiza chromatograficzna wykazała odmienne wartości wskaźników (SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA) w tkance wątrobowej szczurów. W hepatocytach, dla wskaźnika SAT wykazano porównywalne wartości przy zastosowaniu diety standardowej oraz diety wysokowęglowodanowej. Ilość dostarczanych nasyconych kwasów tłuszczowych pomiędzy dietą standardową oraz dietą wysokowęglowodanową mogła się nieznacznie różnić, co tłumaczyłoby porównywalne poziomy w zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych. W porównaniu z dietą standardową wykazano większą procentową zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych dla diety wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe oraz mniejszą procentową zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych dla diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe. Nie wykazano znamienych statystycznie różnic w wartości wskaźnika SAT w tkance wątrobowej pomiędzy grupą karmioną dietą standardową i dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz grupą karmioną dietą standardową i wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Kwasy tłuszczowe obecne w tkankach

pochodzą z syntezy endogennej oraz diety, zatem w przypadku diety wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe (90% składu oleju kokosowego to nasycone kwasy tłuszczowe) zwiększona jest zawartość tego typu kwasów w tkance wątrobowej. W przypadku diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe (10% składu oleju z krokosza barwierskiego to nienasycone kwasy tłuszczowe), zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych w tkance wątrobowej była niższa w porównaniu z dietą standardową. Wartości wskaźnika SAT wykazały znamienność statystyczną pomiędzy grupą żywioną dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz grupą żywioną dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe.

Dla wskaźnika UNSAT w tkance wątrobowej szczurów wykazano podobne wartości przy zastosowaniu diety standardowej oraz diety wysokowęglowodanowej. W porównaniu z dietą standardową wykazano mniejszą procentową zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w wątrobie zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz większą procentową zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych dla diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe. Ponieważ kwasy tłuszczowe obecne w tkankach pochodzą z syntezy endogennej oraz diety, naturalnym zjawiskiem wydaje się być w przypadku diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe zwiększona zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w tkance wątrobowej. Przy niskiej zawartości lub braku nienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie, jak w przypadku diety wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe, zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w tkance wątrobowej była niższa w porównaniu z dietą standardową. Wartości wskaźnika UNSAT wykazały znamienność statystyczną pomiędzy grupą żywioną dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz grupą żywioną dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe.

Dla wskaźnika MUFA w tkance wątrobowej wykazano odmienne wartości. W porównaniu z dietą standardową, zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w wątrobie zwierząt karmionych dietą wysokowęglowodanową oraz dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe wykazała wyższe wartości. Różnice były istotne statystycznie. Nie zaobserwowano różnic w wartości wskaźnika MUFA w wątrobie zwierząt pozostających na diecie wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe, a diecie standardowej, wynik wykazał brak istotności statystycznej. Żywienie zwierząt dietą wysokowęglowodanową, powoduje kaskadę procesów metabolicznych, których skutkiem jest zwiększone wydzielanie insuliny. Hormon

aktywuje poprzez czynnik transkrypcyjny SREBP, zwiększoną ekspresję elongazy 6 oraz izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (Scd1), katalizujących syntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. W dostępnym piśmiennictwie autorzy tłumaczą także regulację ekspresji genów dla elongaz i desaturaz pod wpływem glukozy. Monosacharyd działa poprzez czynnik transkrypcyjny ChREBP, powiązany z Mlx. Badania przeprowadzone w hodowli komórek wątrobowych [143] pokazały, że takiej regulacji spośród elongaz i desaturaz podlegają tylko elongaza 6 oraz izoforma 1 desaturazy stearylo-CoA (Scd1). W przeprowadzonych badaniach ekspresja tych enzymów w tkance wątrobowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową była wyższa niż ekspresja tych enzymów w wątrobie szczurów żywionych dietą standardową. Wyniki analizy statystycznej wykazały znamienność statystyczną dla desaturazy stearylo-CoA (Scd1) oraz tendencję statystyczną w przypadku ekspresji dla elongazy 6 ($p=0,051$). Zwiększoną syntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w tkance wątrobowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową może wspomagać dodatkowo wyższa ekspresja izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (Scd2). Nieliczne dane z piśmiennictwa podają specyfikę tkankową dla dwóch izoform desaturazy stearylo-CoA w tkankach szczurów, w której nie wykazano ekspresji mRNA dla Scd2 w wątrobie szczurów. Dane pochodzą z końca lat '90 i nie zostały uaktualnione [17]. Możliwe, że zastosowane wówczas metody cechowała niska czułość, która uniemożliwiła precyzyjne oznaczenie ekspresji. W przeprowadzonych badaniach wykazano wyraźną ekspresję Scd2 w tkance wątrobowej oraz znaczny wzrost ekspresji dla tej izoformy u zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową, w porównaniu z dietą standardową. Różnica jest znamienna statystycznie. Prawdopodobnie, przez podobieństwo strukturalne do izoformy Scd1, regulacja izoformy Scd2 również dokonuje się przez wspomniane czynniki transkrypcyjne, stąd zrozumiała jest podwyższona ekspresja izoformy Scd2 w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą wysokowęglowodanową.

W tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe wykazano wyższą zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w porównaniu z dietą standardową. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono wyższą ekspresję dla izoformy 1 oraz izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu do ekspresji w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą standardową. Wyniki analizy statystycznej przeprowadzonych badań

wykazują tendencję ($p=0,0507$) w przypadku izoformy Scd1 oraz znamienność statystyczną dla izoformy Scd2. Nasycone kwasy tłuszczowe indukują ekspresję izoformy Scd1, możliwe, że także izoformy Scd2 [70]. W wątrobie zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu do zwierząt żywionych dietą standardową wykazano wyższą ekspresję dla elongazy 6. Uzyskany wynik jest znamienny statystycznie.

W tkance wątrobowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe, wykazano wyższą ekspresję mRNA dla elongazy 6 oraz izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA oraz niższą ekspresję izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA niż ekspresja mRNA tych enzymów w tkance wątrobowej zwierząt żywionych dietą standardową. Uzyskane wyniki były znamienne statystycznie. Dieta lipidowa (wzbogacona w nasycone lub nienasycone kwasy tłuszczowe) dostarcza ligandów dla receptora PPAR, który aktywuje enzymy lipogeniczne w celu kompensacji niedoboru nienasyconych kwasów tłuszczowych lub w sytuacji nadmiaru składników lipidowych w komórkach uaktywnia szlaki metaboliczne utleniania kwasów tłuszczowych. Genami docelowymi dla PPAR są geny dla elongazy 6 oraz desaturazy stearylo-CoA. Dieta wzbogacona w nasycone kwasy tłuszczowe może nie pokrywać zapotrzebowania na jednonienasycone kwasy tłuszczowe (tylko 7% składu oleju kokosowego to kwas oleinowy 18:1, n-9), zatem poprzez zwiększoną ekspresję genów dla enzymów syntetyzujących jednonienasycone kwasy tłuszczowe tłumaczyć można mechanizm kompensujący niedobór tych związków w tkance. Innym wytłumaczeniem może być aktywacja PPAR przez obecność ligandów. Nasycone kwasy tłuszczowe, podobnie jak nienasycone kwasy tłuszczowe są agonistami receptora. W sytuacji nadmiaru substratów energetycznych w komórce indukowany PPAR odpowiada za regulację metabolizmu komórkowego przez zwiększenie oksydacji kwasów tłuszczowych. Zatem zwiększona ekspresja genów dla elongazy 6 oraz desaturazy stearylo-Coa może być dodatkowym kierunkiem przemian, przebiegającym w znacznie mniejszym stopniu niż docelowy katabolizm lipidów.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że poziomy ekspresji mRNA dla elongazy 6 oraz izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA są niższe w tkance wątrobowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe niż w tkance wątrobowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Różnice istotne statystycznie stwierdzono dla elongazy 6 oraz izoformy 2 stearylo-CoA desaturazy. Mechanizm regulacji ekspresji mRNA dla wymienionych enzymów to

regulacja aktywności na poziomie transkrypcji przez udział nienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). Nienasycone kwasy tłuszczowe inhibują czynniki SREBP-1c i LXR α oraz indukują PPAR. Wszystkie wymienione czynniki transkrypcyjne posiadają miejsca wiązania w promotorach genów dla elongazy 6 oraz desaturazy stearylo-CoA. W piśmiennictwie dostępne są dane na temat hamującego wpływu PUFA na ekspresję genów docelowych. W przeprowadzonych badaniach taki efekt uzyskano tylko dla diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu do diety wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe. Przedstawiona obserwacja sugeruje, że zarówno rodzaj (nasycone oraz nienasycone) jak i źródło (endogenne oraz egzogenne) kwasów tłuszczowych mogą w odmienny sposób regulować aktywność czynników transkrypcyjnych i wpływać na ich wzajemną kooperację. Takiej zależności nie wykazano dla mRNA izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA, której ekspresja była wyższa w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu do ekspresji w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Uzyskany wynik wymaga dalszych badań.

Dla wskaźnika PUFA w tkance wątrobowej wykazano odmienne wartości. W porównaniu z dietą standardową, wykazano mniejszą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w wątrobie szczurów żywionych dietą wysokowęglowodanową oraz dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Znamienność statystyczną wykazano tylko dla różnic pomiędzy grupą żywioną dietą standardową, a grupą żywioną dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. W porównaniu z dietą standardową, wykazano większą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w wątrobie szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Różnica była istotna statystycznie.

Mniejszą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową oraz dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe można tłumaczyć mniejszą zawartością tego typu składnika odżywczego w wymienionych dietach. Ze względu na istotność funkcji, jakie spełniają nienasycone kwasy tłuszczowe, w organizmie zachodzą przemiany metaboliczne w kierunku syntezy tych związków. W przypadku diety wysokowęglowodanowej regulacja odbywa się przez udział glukozy i insuliny, które aktywują czynniki transkrypcyjne SREBP oraz LXR. Wymienione czynniki transkrypcyjne posiadają miejsca wiązania, odpowiednio SRE oraz LXRE

w promotorach genów dla $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy. Taki sposób regulacji powoduje indukcję ekspresji mRNA dla tych enzymów. W przeprowadzonych badaniach wykazano wyższy poziom ekspresji dla $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową. Dla $\Delta 5$ desaturazy różnica ta nie wykazała istotności statystycznej, natomiast dla $\Delta 6$ desaturazy różnica była znamienne statystycznie. Ekspresja mRNA dla elongazy 5 w wątrobie szczurów żywionych dietą wysokowęglowodanową była wyższa w porównaniu do ekspresji mRNA dla elongazy 5 w wątrobie szczurów żywionych dietą standardową. Różnica była znamienne statystycznie. Promotor genu dla elongazy 5, która katalizuje syntezę nienasyconych kwasów tłuszczowych posiada miejsce wiązania dla SRE, stąd regulacja przez działanie insuliny wydaje się być prawdopodobna także dla elongazy 5. W piśmiennictwie zostały opisane badania, w których ekspresja elongazy 5 podlega regulacji wyłącznie przez czynnik SREBP-1c mediowany udziałem LXR, którego miejsce wiążące tzn. LXRE znajduje się w promotorze genu dla czynnika SREBP 1c [110]. Aktywacja LXR przez insulinę indukuje SREBP-1c, który aktywuje transkrypcję genu dla elongazy 5.

W przeprowadzonych badaniach wykazano wyższy poziom ekspresji dla elongazy 5, $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu do ekspresji genów dla tych enzymów w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą standardową. Wszystkie różnice były znamienne statystycznie. Regulacja odbywa się poprzez receptor PPAR. Podobnie jak przypadku syntezy jednonienasyconych kwasów tłuszczowych ekspresja genu dla elongazy 6 oraz stearylo-CoA, przyłączenie ligandu do PPAR indukuje transkrypcję genów docelowych dla elongazy 5 oraz $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturazy, katalizujących syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W promotorach genów dla elongazy 5, $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy znajdują się miejsca wiązania dla PPAR – PPRE. Czynniki transkrypcyjny PPAR wykazuje dwufunkcyjność, która w zależności od warunków energetycznych obecnych w tkance polega na aktywacji genów lipogenicznych w celu kompensacji niedoboru niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych lub w sytuacji nadmiaru składników lipidowych w komórkach uaktywnia szlaki metaboliczne utleniania kwasów tłuszczowych. Dieta wzbogacona w nasycone kwasy tłuszczowe może nie pokrywać zapotrzebowania na niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (tylko 2% składu oleju kokosowego to kwas linolowy 18:2, n-6), dlatego indukcja transkrypcji elongaz i desaturaz może kompensować niedobory składników, lub w

przypadku nadmiaru składników lipidowych w komórkach, indukcja genów katalizujących syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest procesem dodatkowym, o niewielkim znaczeniu dla przeważających przemian katabolicznych w komórce.

W przeprowadzonych badaniach wykazano mniejszą ekspresję mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy w wątrobie szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe a dietą standardową. Różnica była istotna statystycznie. Ekspresja mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy była porównywalna w wątrobie szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe w stosunku do wyników uzyskanych w grupie zwierząt karmionych dietą standardową. Ekspresja mRNA dla elongazy 5 była wyższa niż ekspresja mRNA dla tego enzymu w wątrobie szczurów żywionych dietą standardową. Różnica była istotna statystycznie. Tripathy w swoich badaniach wykazał, że niedobór aktywności może prowadzić do stłuszczenia wątroby, stąd możliwe że podwyższony poziom ekspresji tego enzymu odgrywa istotną rolę w homeostazie lipidowej, zabezpieczając tkanki przed rozwojem schorzenia. Elongaza 5 zgodnie z wieloma badaniami wykazuje wysoką ekspresję w tkance wątrobowej u człowieka, szczura oraz myszy [72,110,139,142-144]. Regulacja ekspresji mRNA dla elongazy 5 podlega współdziałaniu czynników transkrypcyjnych takich jak SREBP oraz LXR. Wymienione receptory ulegają inhibicji lub aktywacji przez glukozę, insulinę oraz kwasy tłuszczowe. Wpływ takich właśnie związków jako ligandów obrazuje ważność przemian w utrzymaniu homeostazy węglowodanowo-lipidowej organizmu. Liczne badania wskazują na przeważającą rolę elongazy 5, spośród całej grupy elongaz, w regulacji metabolizmu glukozy oraz syntezy kwasów tłuszczowych w wątrobie [91]. Zróznicowanie ekspresji mRNA dla $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy w wątrobie szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu do ekspresji mRNA dla tych enzymów w wątrobie szczurów żywionych dietą standardową obrazuje odmienność w procesach regulacji wynikającą z rodzaju kwasów tłuszczowych obecnych w diecie. Prawdopodobne jest, że $\Delta 6$ desaturaza uznawana za kluczowy, regulujący proces przemian wielonienasyconych kwasów tłuszczowych enzym, ulega słabszej ekspresji przy dużej podaży wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie, aby zwrotnie hamować proces syntezy tych związków. Jednak dokładne wytłumaczenie uzyskanych wyników wymaga dalszych badań.

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że poziomy ekspresji mRNA dla elongazy 5 oraz $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturazy są niższe w tkance wątrobowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe niż w tkance wątrobowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Różnice istotne statystycznie stwierdzono dla wszystkich izoform enzymów. Mechanizm regulacji ekspresji mRNA dla wymienionych enzymów to regulacja aktywności na poziomie transkrypcji przez udział nienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). W przeprowadzonych badaniach taki efekt uzyskano tylko dla diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu do diety wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe. Przedstawiona obserwacja potwierdza wcześniejsze wyniki uzyskane dla elongazy 6 oraz stearylo-CoA desaturazy, że zarówno rodzaj (nasycone oraz nienasycone) jak i źródło (endogenne oraz egzogenne) kwasów tłuszczowych mogą w odmienny sposób regulować aktywność czynników transkrypcyjnych i wpływać na ich wzajemną kooperację.

W tkance tłuszczowej szczurów wykazano porównywalne wartości nasyconych kwasów tłuszczowych (wskaźnik SAT) przy zastosowaniu diety standardowej oraz diety wysokowęglowodanowej. Ilość dostarczanych nasyconych kwasów tłuszczowych pomiędzy dietą standardową oraz dietą wysokowęglowodanową mogła się nieznacznie różnić, co tłumaczyłoby porównywalne poziomy w zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych. Podobne wyniki uzyskano dla wskaźnika SAT pomiędzy wymienionymi dietami w tkance wątrobowej szczurów.

W porównaniu z wartością wskaźnika SAT w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą standardową uzyskano wyższą wartość SAT dla zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz niższą wartość SAT dla zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Nie wykazano znamienych statystycznie różnic w wartości wskaźnika SAT w tkance tłuszczowej pomiędzy grupą standardową i grupą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz grupą standardową i grupą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Podobne wyniki uzyskano dla wskaźnika SAT pomiędzy wymienionymi dietami w tkance wątrobowej szczurów.

Dla wskaźnika UNSAT w tkance tłuszczowej szczurów wykazano porównywalne wartości przy zastosowaniu diety standardowej oraz diety wysokowęglowodanowej. W porównaniu z dietą standardową wykazano mniejszą procentową zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w wątrobie zwierząt

żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz większą procentową zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych dla diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe. Nie wykazano znamienych statystycznie różnic w wartości wskaźnika UNSAT w tkance tłuszczowej pomiędzy grupą standardową i grupą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz grupą standardową i grupą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Podobne obserwacje dla wskaźnika SAT oraz UNSAT jak w tkance tłuszczowej wykazano w tkance wątrobowej szczurów. Wartości wskaźnika UNSAT wykazały znamienność statystyczną pomiędzy grupą żywioną dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz grupą żywioną dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe.

W przeprowadzonych badaniach wykazano różnice w wartościach MUFA (jednonienasycone kwasy tłuszczowe) pomiędzy wszystkimi testowymi grupami. W porównaniu z dietą standardową, w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone oraz nienasycone kwasy tłuszczowe wykazano niższą zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Różnice znamienne statystycznie dla wskaźnika MUFA w tkance tłuszczowej wykazano tylko pomiędzy dietą standardową i wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą standardową oraz wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Uzyskane wyniki wykazały odwrotną zależność w porównaniu do zawartości MUFA w tkance wątrobowej, co pokazuje specyfikę tkankową przemian kwasów tłuszczowych. Syntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych katalizuje elongaza 6 oraz desaturaza stearylo-CoA. Stwierdzono wyższy poziom ekspresji mRNA dla elongazy 6 oraz desaturazy stearylo-CoA 1 w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową w porównaniu z grupą zwierząt żywionych dietą standardową. Różnice wykazały znamienność statyczną. Aktywacja elongazy 6 oraz desaturazy stearylo-CoA, podobnie jak w tkance wątrobowej, może być regulowana przez białko ChREBP, indukowane stężeniem glukozy oraz czynnikiem transkrypcyjny SREBP indukowany wydzielaniem insuliny. Brak jest danych w piśmiennictwie na temat prowadzonych badań w takim zakresie. Stwierdzono porównywalny poziom ekspresji mRNA dla stearylo-CoA desaturazy 2 w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą standardową oraz wysokowęglowodanową. W przeprowadzonych badaniach izoforma 2 desaturazy stearylo-CoA ulega ekspresji w tkance tłuszczowej co zaprzecza danym z piśmiennictwa, które podają obecność transkryptu w mózgu, śledzionie, sercu, limfocytach oraz płucach. Różnice mogą wynikać z zastosowanych

metod. Brak jest danych na temat regulacji Scd2 w tkance tłuszczowej szczurów. W przeciwieństwie do tkanki wątrobowej, transport glukozy do adipocytów odbywa się przez GLUT 4. Wewnątrzkomórkowe stężenie glukozy różni się pomiędzy tymi tkankami. Aktywacja Scd2 poprzez ChREBP, przy niższym niż w hepatocytach stężeniu, może nie być wystarczające dla aktywacji transkrypcji. Wyjaśnienie ekspresji mRNA dla Scd2 w tkance tłuszczowej szczurów wymaga dalszych badań.

U zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe, pomimo niższej zawartości jednonienasyconych kwasów tłuszczowych, ekspresja mRNA dla elongazy 6 oraz izoformy 1 i 2 desaturazy stearylo-CoA była wyższa niż ekspresja mRNA tych enzymów w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą standardową. Różnice istotne statycznie wykazano tylko dla elongazy 6 oraz izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA.

U zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe, ekspresja mRNA dla elongazy 6 oraz izoformy 1 i 2 desaturazy stearylo-CoA była wyższa niż ekspresja mRNA tych enzymów w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą standardową. Różnice istotne statycznie wykazano dla elongazy 6 oraz izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA.

Dieta wzbogacona w nasycone lub nienasycone kwasy tłuszczowe dostarcza ligandów dla receptora PPAR. Genami docelowymi dla PPAR są geny dla elongazy 6 oraz desaturazy stearylo-CoA. Dieta wzbogacona w nasycone kwasy tłuszczowe może nie pokrywać zapotrzebowania na jednonienasycone kwasy tłuszczowe (tylko 7% składu oleju kokosowego to kwas oleinowy 18:1, n-9), zatem poprzez zwiększoną ekspresję genów dla enzymów syntetyzujących jednonienasycone kwasy tłuszczowe tłumaczyć można mechanizm kompensujący niedobór tych związków w tkance. Innym wytłumaczeniem jest aktywacja PPAR przez bezpośrednią obecność ligandów. W sytuacji nadmiaru substratów energetycznych (dieta wzbogacona w nasycone oraz nienasycone kwasy tłuszczowe) w komórce indukowany PPAR odpowiada za regulację metabolizmu komórkowego przez zwiększenie oksydacji kwasów tłuszczowych. Zatem zwiększona ekspresja genów dla elongazy 6 oraz desaturazy stearylo-Coa może być dodatkowym kierunkiem przemian, przebiegającym w znacznie mniejszym stopniu niż docelowy katabolizm lipidów.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że poziomy ekspresji mRNA dla elongazy 6 oraz izoformy 1 i 2 desaturazy stearylo-CoA są niższe w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe niż w tkance

tłuszczowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Różnice istotne statystycznie stwierdzono dla elongazy 6 oraz izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA. Uzyskane wyniki są analogiczne jak w tkance wątrobowej, stąd mechanizm regulacji ekspresji mRNA dla wymienionych enzymów może być podobny. Nienasycone kwasy tłuszczowe inhibują czynniki SREBP-1c i LXR α oraz indukują PPAR. Wszystkie wymienione czynniki transkrypcyjne posiadają miejsca wiązania w promotorach genów dla elongazy 6 oraz desaturazy stearylo-CoA. Przedstawiona obserwacja ponownie sugeruje, że zarówno rodzaj (nasycone oraz nienasycone) jak i źródło (endogenne oraz egzogenne) kwasów tłuszczowych mogą w odmienny sposób regulować aktywność czynników transkrypcyjnych i wpływać na ich wzajemne oddziaływanie.

Dla wskaźnika PUFA w tkance tłuszczowej wykazano odmienne wartości. W porównaniu z dietą standardową, wykazano porównywalną zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą wysokowęglowodanową. W porównaniu z dietą standardową, wykazano niższą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Wykazano znamienność statystyczną pomiędzy grupą żywioną dietą standardową, a grupą żywioną dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. W porównaniu z dietą standardową, wykazano większą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Różnica była istotna statystycznie.

W tkance tłuszczowej stwierdzono porównywalną zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych u szczurów karmionych dietą standardową oraz wysokowęglowodanową. Mniejszą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w adipocytach szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu tego parametru u zwierząt żywionych dietą standardową można wyjaśnić ich ogólną, mniejszą zawartością w diecie. Ze względu na istotność funkcji, jakie spełniają nienasycone kwasy tłuszczowe, w organizmie zachodzą przemiany metaboliczne w kierunku syntezy tych związków. W przypadku diety wysokowęglowodanowej regulacja odbywa się za pośrednictwem glukozy oraz insuliny, które aktywują czynniki transkrypcyjne SREBP oraz LXR. Genami targetowymi dla wymienionych czynników są geny dla elongazy 5, Δ 5 oraz Δ 6 desaturazy. W przeprowadzonych badaniach wykazano wyższy poziom ekspresji dla

elongazy 5 oraz Δ 5 desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową w porównaniu do ekspresji mRNA tych enzymów w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową. Dla poziomów ekspresji elongazy 5 oraz Δ 5 desaturazy różnice te wykazały istotność statystyczną. Indukcję ekspresji mRNA dla elongazy 5 oraz Δ 5 desaturazy można tłumaczyć działaniem insuliny. Wykazano niższy poziom ekspresji mRNA dla Δ 6 desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową w porównaniu do ekspresji mRNA tego enzymu w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową. Różnica była znamienne statystycznie. Uzyskany wynik wymaga dalszych badań.

W przeprowadzonych badaniach wykazano wyższy poziom ekspresji dla elongazy 5, Δ 5 oraz Δ 6 desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Różnice znamienne statystycznie wykazano dla poziomu ekspresji mRNA dla elongazy 5 oraz Δ 5 desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe a dietą standardową. Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie dla Δ 6 desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe a dietą standardową. Regulacja odbywa się poprzez receptor PPAR. Podobnie jak przypadku syntezy jednonienasyconych kwasów tłuszczowych ekspresja genu dla elongazy 6 oraz stearylo-CoA, przyłączenie ligandu do PPAR indukuje transkrypcję genów docelowych dla elongazy 5 oraz Δ 5 i Δ 6 desaturazy, katalizujących syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Dieta wzbogacona w nasycone kwasy tłuszczowe może nie pokrywać zapotrzebowania na niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (tylko 2% składu oleju kokosowego to kwas linolowy 18:2, n-6), dlatego indukcja transkrypcji elongaz i desaturaz może kompensować niedobory składników, lub w przypadku nadmiaru składników lipidowych w komórkach, indukcja genów katalizujących syntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest procesem dodatkowym, o niewielkim znaczeniu dla przeważających przemian katabolicznych w komórce.

W tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe zaobserwowano wyższą ekspresję mRNA dla elongazy 5, porównywalną ekspresję mRNA dla Δ 5 desaturazy oraz niższą ekspresję mRNA dla Δ 6 desaturazy w porównaniu do ekspresji mRNA dla tych enzymów u zwierząt żywionych dietą standardową. Różnice istotne statystycznie wykazano dla elongazy 5 oraz Δ 6

desaturazy. Ekspresja elongazy 5 jest regulowana przez aktywację SREBP-1c. Linolenian (18:2, n-6) główny składnik pokarmowy diety wzbogaconej w nienasycone kwasy tłuszczowe jest bezpośrednim substratem dla $\Delta 6$ desaturazy, ale także agonistą dla receptora PPAR. Podobne zróżnicowanie w ekspresji mRNA dla $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy uzyskano w wątrobie szczurów żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Prawdopodobne jest, że $\Delta 6$ desaturaza uznawana za kluczowy, regulujący proces przemian wielonienasyconych kwasów tłuszczowych enzym, ulega słabej ekspresji przy dużej podaży wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie, aby zwrotnie hamować proces syntezy tych związków. Porównując ekspresję mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy pomiędzy tkankami zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe zaobserwowano, że regulacja syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych może przebiegać intensywniej w tkance tłuszczowej, gdzie wykazano znacząco niższą ekspresję dla badanej desaturazy. Jednak dokładne wytłumaczenie uzyskanych wyników wymaga dalszych badań., ponieważ ogólny mechanizm inhibicji ekspresji przez wpływ PUFA może przebiegać w odmienny sposób w tkance tłuszczowej angażując dodatkowe procesy oraz czynniki transkrypcyjne.

W pracy oznaczono ekspresję mRNA dla elongazy 2 w tkance wątrobowej oraz tkance tłuszczowej szczurów. W hepatocytach ekspresja mRNA dla elongazy 2 była na porównywalnym poziomie u zwierząt karmionych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową oraz dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie. Ekspresja elongazy 2 w wątrobie zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe była niższa niż w wątrobie zwierząt żywionych dietą standardową. Wykazana różnica była znamienna statystycznie.

W tkance tłuszczowej ekspresja mRNA dla elongazy 2 była na porównywalnym poziomie u zwierząt karmionych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie. Ekspresja elongazy 2 w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe była wyższa niż w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą standardową. Uzyskana różnica wykazała tendencję statystyczną.

Dane z piśmiennictwa wskazują na brak wpływu składników odżywczych na poziom ekspresji mRNA dla elongazy 2 oraz brak udziału czynnika PPAR, SREBP oraz LXR w regulacji transkrypcji. Znaczna część uzyskanych w badaniach wyników potwierdza te dane. Stwierdzono odmiennosc w ekspresji mRNA dla elongazy 2, która w porównaniu z dietą standardową wykazała wartości niższe w wątrobie zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe oraz wartości wyższe w tkance tłuszczowej zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Znane mechanizmy regulacji elongaz i desaturaz, zgodnie z dostępnymi danymi, nie są właściwe dla elongazy 2 [139,142-144]. Zróżnicowanie uzyskanych danych wymaga dalszych badań.

W każdej grupie testowej, wyniki ekspresji mRNA dla badanych izoform enzymów wykazały różne poziomy pomiędzy tkanką wątrobową oraz tkanką tłuszczową. W grupie zwierząt żywionych dietą standardową wykazano w tkance wątrobowej w porównaniu do tkanki tłuszczowej wyższy poziom ekspresji mRNA dla elongazy 2, $\Delta 5$ desaturazy oraz izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA, podobny poziom ekspresji mRNA dla elongazy 5 oraz 6, a także niższy poziom ekspresji mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy oraz izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA. W grupie zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową stwierdzono w tkance wątrobowej w porównaniu do tkanki tłuszczowej wyższy poziom ekspresji mRNA dla elongazy 2, $\Delta 6$ desaturazy oraz izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA, podobny poziom ekspresji mRNA dla elongazy 6, $\Delta 5$ desaturazy oraz izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA, a także niższy poziom ekspresji mRNA dla elongazy 5. W grupie zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe wykazano w tkance wątrobowej w porównaniu do tkanki tłuszczowej wyższy poziom ekspresji mRNA dla $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy, podobny poziom ekspresji mRNA dla elongazy 5, a także niższy poziom ekspresji mRNA dla elongazy 2 oraz 6, izoformy 1 oraz 2 desaturazy stearylo-CoA. W grupie zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe wykazano w tkance wątrobowej w porównaniu do tkanki tłuszczowej wyższy poziom ekspresji mRNA dla elongazy 2, $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturazy, podobny poziom ekspresji mRNA dla elongazy 5, a także niższy poziom ekspresji mRNA dla elongazy 6 oraz izoformy 1 i 2 desaturazy stearylo-CoA.

W grupach zwierząt żywionych określoną dietą stwierdzono odmienny skład kwasów tłuszczowych pomiędzy tkanką wątrobową oraz tkanką tłuszczową. W grupie

zwierząt żywionych dietą standardową wykazano w tkance wątrobowej większą zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), podobną zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SAT) oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych (UNSAT), a także mniejszą zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w porównaniu do tkanki tłuszczowej. W grupie zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową wykazano w tkance wątrobowej większą zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SAT), podobną zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), a także mniejszą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych (UNSAT) oraz jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w porównaniu do tkanki tłuszczowej. W grupie zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe wykazano w tkance wątrobowej większą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych (UNSAT) oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), a także znacząco mniejszą zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SAT) oraz jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w porównaniu do tkanki tłuszczowej. W grupie zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe stwierdzono w tkance wątrobowej większą zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SAT), a także mniejszą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych (UNSAT), jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w porównaniu do tkanki tłuszczowej.

W surowicy krwi zwierząt oznaczono profil lipidowy oraz stężenie glukozy. W porównaniu do zwierząt żywionych dietą standardową wykazano wyższe stężenie glukozy w grupie zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Nie wykazano różnic istotnych statycznie. U zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową podwyższone stężenie glukozy w surowicy krwi może być efektem wysokiej podaży tego związku w diecie. W przypadku zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone lub nienasycone kwasy tłuszczowe zwiększony poziom glukozy w surowicy może wynikać z zaburzonego wychwytu glukozy. Prawdopodobny mechanizm opisuje cykl Randle'a, w szczególności w komórkach mięśni szkieletowych, mięśni sercowym i tkance tłuszczowej. W cyklu Randle'a zaobserwowano zahamowanie translokacji GLUT 4 do błony komórkowej i zmniejszenie wychwytu glukozy. Ponadto kwasy tłuszczowe wpływają na proces glikolizy hamując działanie glukokinazy. Zdolność metabolizowania nadmiaru glukozy

przez tkankę wątrobową może nie być wystarczająca, stąd poziom parametru jest podwyższony w surowicy krwi zwierząt żywionych dietą lipidową w porównaniu do diety standardowej.

W porównaniu do zwierząt żywionych dietą standardową stężenie cholesterolu całkowitego było porównywalne u zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową. Różnica nie była istotna statystycznie. W porównaniu do zwierząt żywionych dietą standardową stężenie cholesterolu całkowitego było wyższe u zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Uzyskane różnice wykazały znamienność statystyczną.

Cholesterol pochodzący z pożywienia wpływa w nieznacznym stopniu na poziom w surowicy, ponieważ tylko ok. 30% ulega wchłonięciu w jelitach. Znaczna część cholesterolu produkowana jest z acetylo-CoA przede wszystkim w wątrobie, ale także w jelitach. Stężenie cholesterolu w surowicy jest wypadkową zawartości w lipoproteinach (LDL, VLDL oraz HDL) oraz obecności formy niezestryfikowanej. Podwyższony poziom cholesterolu u zwierząt żywionych w obu wzbogaconych w kwasy tłuszczowe dietach można tłumaczyć zwiększoną syntezą endogenną.

W porównaniu do zwierząt żywionych dietą standardową stężenie triacylogliceroli było wyższe u zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe. Uzyskane różnice wykazały znamienność statystyczną.

Kwasy tłuszczowe pochodzą z diety oraz z syntezy endogennej. Dostarczone w diecie wzbogaconej zarówno w nasycone jak i nienasycone kwasy tłuszczowe, związki te w procesie wchłaniania tworzą estry z cząsteczką glicerolu, tworząc triacyloglicerole, wbudowane w strukturę chylomikronów, które transportują TAG po całym organizmie. Dieta wysokowęglowodanowa dostarcza substrat energetyczny, glukozę, która jest metabolizowana do acetylo-CoA. Przy stałym nadmiernym dostarczaniu glukozy, zwiększa się aktywność syntezy kwasów tłuszczowych. Nowosyntetyzowane kwasy tłuszczowe są transportowane w postaci TAG do tkanki tłuszczowej. Nadmiar substratu energetycznego w diecie wysokowęglowodanowej odpowiada za wzrost stężenia TAG w surowicy zwierząt.

W porównaniu do zwierząt żywionych dietą standardową stężenie cholesterolu frakcji HDL było porównywalne u zwierząt żywionych dietą wysokowęglowodanową oraz zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. W surowicy zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe

zaobserwowano wyższe stężeniu cholesterolu HDL w porównaniu do stężenia tego parametru w surowicy zwierząt żywionych dietą standardową. Różnica w stężeniu cholesterolu HDL była znamienne statystycznie. Wiadomo, że wzbogacenie diety w nienasycone kwasy tłuszczowe wywiera pozytywny wpływ na organizm. PUFA obniżają poziom cholesterolu LDL, podnoszą HDL, ale także obniżają poziom TAG. Opisane efekty działania zostały potwierdzone w przeprowadzonych badaniach. Stężenie triacylogliceroli było wyższe w surowicy zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe, a dietą standardową. Poziom ten był jednak zdecydowanie niższy w surowicy krwi zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe niż w diecie wzbogaconej w nasycone kwasy tłuszczowe. Ponadto poziom cholesterolu HDL był znacząco wyższy w surowicy krwi zwierząt żywionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu do pozostałych rodzajów diety.

Uzyskane wyniki dla ekspresji badanych enzymów potwierdzają specyfikę tkankową oraz regulację na poziomie transkrypcji. Wpływ na wymienione czynniki transkrypcyjne mają zarówno kwasy tłuszczowe, a także glukoza. Oba te związki są składnikami diety. Zatem regulacja zachodzących w komórce procesów jest zależna od komponent pokarmowych. W niniejszej pracy wykazano, że ten sam składnik pokarmowy wywołuje odmienny skutek w badanych tkankach: wątrobowej i tłuszczowej. Mimo ogromu wiedzy odnoszącego się do sposobu działania mechanizmów regulatorowych dotyczących elongaz i desaturaz, ciągle niejasnych jest wiele procesów. Celowym wydaje się być dalsze prowadzenie badań w celu wyjaśnienia brakujących ogniw w przemianach kwasów tłuszczowych katalizowanych przez elongazy i desaturazy w modelach zwierzęcych. Uzyskanie kompletnej wiedzy dotyczącej procesów regulatorowych pozwoli przenieść ideę modelu zwierzęcego na model dotyczący tkanek ludzkich. To z kolei pozwoli poszukiwać nowych miejsc targetowych dla działania środków farmakologicznych w terapii schorzeń cywilizacyjnych takich jak otyłość, cukrzyca, syndrom metaboliczny oraz nowotwory.

9. WNIOSKI

1. W zależności od rodzaju zastosowanej w żywieniu zwierząt diety, wykazano odmienność w poziomach ekspresji mRNA dla elongaz i desaturaz zarówno w wątrobie jak i tkance tłuszczowej.
2. W każdej grupie testowej, pomiędzy tkanką wątrobową oraz tkanką tłuszczową uzyskano różne poziomy ekspresji mRNA dla badanych izoform enzymów.
3. W tkance wątrobowej oraz tkance tłuszczowej wykazano zróżnicowany odsetkowy skład kwasów tłuszczowych w zależności od zastosowanej diety.
4. W każdej grupie testowej, pomiędzy tkanką wątrobową oraz tkanką tłuszczową stwierdzono odmienny skład kwasów tłuszczowych.
5. Analiza profilu lipidowego oraz stężenia glukozy w surowicy krwi zwierząt wykazała różne poziomy parametrów w zależności od rodzaju diety.

10. SPIS RYCIN I TABEL

Ryc. 1.	Synteza kwasów tłuszczowych.....	9
Ryc. 2.	Transport kwasów tłuszczowych.....	11
Ryc. 3.	Utlenianie kwasów tłuszczowych.....	12
Ryc. 4.	Reakcja elongacji kwasów tłuszczowych.....	24
Ryc. 5.	Biosynteza długołańcuchowych kwasów tłuszczowych u ssaków.....	36
Ryc. 6.	Topologiczny model mysiej $\Delta 9$ desaturazy.....	40
Ryc. 7.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	70
Ryc. 8.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN).....	70
Ryc. 9.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	70
Ryc. 10.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	70
Ryc. 11.	Elektroforegram mRNA dla mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	70
Ryc. 12.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 2 w wątrobie szczurów.....	71
Ryc. 13.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	72
Ryc. 14.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN).....	72
Ryc. 15.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	72
Ryc. 16.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	72
Ryc. 17.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	72

Ryc. 18.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 5 w wątrobie szczurów.....	73
Ryc. 19.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	74
Ryc. 20.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN).....	74
Ryc. 21.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	74
Ryc. 22.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	74
Ryc. 23.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	74
Ryc. 24.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 6 w wątrobie szczurów.....	75
Ryc. 25.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	76
Ryc. 26.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN).....	76
Ryc. 27.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	76
Ryc. 28.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	76
Ryc. 29.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe(250g NN).....	76
Ryc. 30.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla Δ 5 desaturazy w wątrobie szczurów.....	77
Ryc. 31.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	78
Ryc. 32.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)	78

Ryc. 33.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	78
Ryc. 34.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	78
Ryc. 35.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	78
Ryc. 36.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla Δ 6 desaturazy w wątrobie szczurów.....	79
Ryc. 37.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	80
Ryc. 38.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową(250g STAN).....	80
Ryc. 39.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową 250g HCOH).....	80
Ryc. 40.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe(250g NS).....	80
Ryc. 41.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	80
Ryc. 42.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów.....	81
Ryc. 43.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	82
Ryc. 44.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN).....	82
Ryc. 45.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	82

Ryc. 46.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	82
Ryc. 47.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w wątrobie szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	82
Ryc. 48.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów.....	83
Ryc. 49.	Ekspresja elongaz i desaturaz w tkance wątrobowej szczurów.....	84
Ryc. 50.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	86
Ryc. 51.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)....	86
Ryc. 52.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	86
Ryc. 53.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	86
Ryc. 54.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 2 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)....	86
Ryc. 55.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 2 w tkance tłuszczowej szczurów.....	87
Ryc. 56.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)....	88
Ryc. 57.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)....	88
Ryc. 58.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	88
Ryc. 59.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	88

Ryc. 60.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 5 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	88
Ryc. 61.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 5 w tkance tłuszczowej szczurów.	89
Ryc. 62.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN)....	90
Ryc. 63.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN)....	90
Ryc. 64.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	90
Ryc. 65.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	90
Ryc. 66.	Elektroforegram mRNA dla elongazy 6 (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	90
Ryc. 67.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla elongazy 6 w tkance tłuszczowej szczurów.....	91
Ryc. 68.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	92
Ryc. 69.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN).....	92
Ryc. 70.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	92
Ryc. 71.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	92
Ryc. 72.	Elektroforegram mRNA dla Δ 5 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe(250g NN).....	92
Ryc. 73.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla Δ 5 desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów.....	93

Ryc. 74.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	94
Ryc. 75.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN).....	94
Ryc. 76.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	94
Ryc. 77.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS).....	94
Ryc. 78.	Elektroforegram mRNA dla Δ 6 desaturazy (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	94
Ryc. 79.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla Δ 6 desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów.....	95
Ryc. 80.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	96
Ryc. 81.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową(250g STAN).....	96
Ryc. 82.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową 250g HCOH).....	96
Ryc. 83.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe(250g NS).....	96
Ryc. 84.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	96
Ryc. 85.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów.....	97
Ryc. 86.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (150g STAN).....	98

Ryc. 87.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą standardową (250g STAN).....	98
Ryc. 88.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wysokowęglowodanową (250g HCOH).....	98
Ryc. 89.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe (250g NS)	98
Ryc. 90.	Elektroforegram mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA (technika RT-PCR) w tkance tłuszczowej szczurów karmionych dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe (250g NN).....	98
Ryc. 91.	Średnie wartości gęstości densytometrycznej dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów.....	99
Ryc. 92.	Ekspresja elongaz i desaturaz w tkance tłuszczowej szczurów.....	100
Ryc. 93.	Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika SAT w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	103
Ryc. 94.	Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika UNSAT w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	104
Ryc. 95.	Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika MUFA w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	106
Ryc. 96.	Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika PUFA w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	107
Ryc. 97.	Średnia wartość wskaźników SAT, UNSAT, PUFA oraz MUFA w tkance wątrobowej szczurów.....	108
Ryc. 98.	Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika SAT w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	111
Ryc. 99.	Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika UNSAT w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	112
Ryc. 100.	Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika MUFA w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	114

Ryc. 101.	Zsumowane wartości odsetkowych zawartości kwasów tłuszczowych wskaźnika PUFA w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	115
Ryc. 102.	Średnia wartość wskaźników SAT, UNSAT, PUFA oraz MUFA w tkance tłuszczowej szczurów.....	116
Ryc. 103.	Wartości stężeń glukozy w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.....	118
Ryc. 104.	Wartości stężeń cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.....	120
Ryc. 105.	Wartości stężeń triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.....	122
Ryc. 106.	Wartości stężeń cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi szczurów we wszystkich grupach testowych.....	124
Ryc. 107.	Profil lipidowy oraz stężenie glukozy w surowicy krwi szczurów.....	125

Tab. 1.	Powinowactwo (wyrażone jako wartości Km) do substratów izoform karboksylazy acetylo-CoA.....	8
Tab. 2.	Białka produkowane przez adipocyty.....	22
Tab. 3.	Ligandy receptorów hormonalnych stwierdzonych w adipocytach oraz wpływ tych związków na procesy biologiczne.	23
Tab. 4.	Dane dotyczące elongaz u wybranych gatunków ssaków ich oznakowanie, synonimy nazwy, numer ID oraz lokalizacja na chromosomie według Entrez Gene.	26
Tab. 5.	Dane dotyczące desaturaz u wybranych gatunków ssaków, ich oznakowanie, synonimy nazwy, numer ID oraz lokalizacja na chromosomie według Entrez Gene.....	34
Tab. 6.	Regulacja ekspresji genów dla elongaz i desaturaz przez czynniki transkrypcyjne, Czynniki indukujące oraz inhibujące proces transkrypcji.....	49
Tab. 7.	Schemat reakcji odwrotnej transkrypcji - RT.....	56
Tab. 8.	Sekwencje primerów użytych w reakcji PCR (RT-PCR).....	57
Tab. 9.	Schemat przygotowania mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR.....	58
Tab. 10.	Przykładowy profil temperaturowy reakcji PCR.....	58
Tab. 11.	Sposób wykonania oznaczenia stężenia glukozy.....	62
Tab. 12.	Sposób wykonania oznaczenia stężenia cholesterolu całkowitego.....	62
Tab. 13.	Sposób wykonania oznaczenia stężenia triacylogliceroli.....	63
Tab. 14.	Sposób wykonania oznaczenia stężenia cholesterolu frakcji HDL.....	63
Tab. 15.	Wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), a także wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych enzymów (E2, E5, E6, D5, D6, S1 oraz S2) we wszystkich grupach testowych w tkance wątrobowej.....	69
Tab. 16.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 2 w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).	71
Tab. 17.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 5 w wątrobie szczurów ($p < 0,05$)	73
Tab. 18.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 6 w wątrobie szczurów ($p < 0,05$)	75
Tab. 19.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).	77
Tab. 20.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy w wątrobie szczurów ($p < 0,05$).....	79
Tab. 21.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów ($p < 0,05$)....	81

Tab. 22.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w wątrobie szczurów ($p < 0,05$)....	83
Tab. 23.	Wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), a także wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych enzymów (E2, E5, E6, D5, D6, S1 oraz S2) we wszystkich grupach testowych w tkance tłuszczowej.....	85
Tab. 24.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla ekspresji mRNA dla elongazy 2 w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).....	87
Tab. 25.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 5 w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).	89
Tab. 26.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla elongazy 6 w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).....	91
Tab. 27.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla $\Delta 5$ desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).....	93
Tab. 28.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla $\Delta 6$ desaturazy w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).....	95
Tab. 29.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla ekspresji mRNA dla izoformy 1 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).	97
Tab. 30.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla ekspresji mRNA dla izoformy 2 desaturazy stearylo-CoA w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).....	99
Tab. 31.	Średnie procentowych zawartości kwasów tłuszczowych w tkance wątrobowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	101
Tab. 32.	Wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), wartości mediany oraz dolnych i górnych kwartyli, a ponadto wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych wskaźników (SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA) we wszystkich grupach testowych wątrobie.....	102
Tab. 33.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika SAT w tkance wątrobowej szczurów ($p < 0,05$)	104
Tab. 34.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika UNSAT w tkance wątrobowej szczurów($p < 0,05$).	105
Tab. 35.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla wskaźnika MUFA w tkance wątrobowej szczurów ($p < 0,05$).	106
Tab. 36.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika PUFA w tkance wątrobowej szczurów ($p < 0,05$).	108

Tab. 37.	Średnie procentowych zawartości kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej szczurów we wszystkich grupach testowych.....	109
Tab. 38.	Wartości średnich oraz odchyłeń standardowych (SD), wartości mediany oraz dolnych i górnych kwartyli, a ponadto wartości p uzyskane w teście Shapiro-Wilka dla wszystkich badanych wskaźników (SAT, UNSAT, MUFA oraz PUFA) we wszystkich grupach testowych tkance tłuszczowej.....	110
Tab. 39.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika SAT w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$)	112
Tab. 40.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika UNSAT w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).	113
Tab. 41.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla wskaźnika MUFA w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).	114
Tab. 42.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla wskaźnika PUFA w tkance tłuszczowej szczurów ($p < 0,05$).....	115
Tab. 43.	Statystyki opisowe - glukoza.....	117
Tab. 44.	Wartości p uzyskane w teście Tukey'a dla stężeń cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi szczurów ($p < 0,05$).....	118
Tab. 45.	Statystyki opisowe – cholesterol całkowity.....	119
Tab. 46.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla stężeń cholesterolu całkowitego w surowicy krwi szczurów ($p < 0,05$).....	120
Tab. 47.	Statystyki opisowe - triacyloglicerole.....	121
Tab. 48.	Wartości p uzyskane w teście Dunn'a dla stężeń triacylogliceroli w surowicy krwi szczurów ($p < 0,05$).	122
Tab. 49.	Statystyki opisowe - cholesterol HDL.....	123
Tab. 50.	Wartości p uzyskane w teście Tukeya dla stężeń glukozy w surowicy krwi szczurów ($p < 0,05$).	124
Tab. 51.	Wartości średnich oznaczanych parametrów w tkance wątrobowej szczurów żywionych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe...	125
Tab. 52.	Wartości średnich oznaczanych parametrów w tkance tłuszczowej szczurów żywionych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe.	126
Tab. 53.	Wartości średnich dla oznaczanych parametrów w surowicy krwi szczurów żywionych dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe.	126

11. STRESZCZENIE/SUMMARY

Kwasy tłuszczowe to heterogenna grupa związków. W organizmie pełnią rolę budulca błon fosfolipidowych oraz materiału energetycznego, regulują ekspresję genów odpowiedzialnych za metabolizm związków organicznych, a także wzrost i różnicowanie komórek. Struktura kwasów tłuszczowych występujących w organizmie może ulegać modyfikacji w procesach elongacji oraz desaturacji, katalizowanych odpowiednio przez elongazy i desaturazy kwasów tłuszczowych. Powstałe w wyniku wydłużania oraz desaturacji długołańcuchowe jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe wchodzi w skład ogólnoustrojowej puli tych związków i są substratami niezbędnymi do syntezy lipidowych składników błon biologicznych, a także związków metabolicznie czynnych. W obrębie gatunku, procesy elongacji i desaturacji zarówno endogennych jak i egzogennych kwasów tłuszczowych są katalizowane w tkankach działaniem tych samych elongaz i desaturaz. Enzymy charakteryzuje specyfika substratowo-tkankowa. Regulacja ekspresji genów dla elongaz i desaturaz odbywa się na etapie transkrypcji genów i jest regulowana przez składniki pokarmowe oraz hormony. Elongazy i desaturazy są transbłonowymi enzymami i występują przede wszystkim w retikulum endoplazmatycznym. Elongazy 1, 3, 6 oraz 7 katalizują wydłużanie nasyconych i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast elongazy 2 oraz 5 katalizują elongację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Elongaza 4 katalizuje syntezę długołańcuchowych zarówno nasyconych jak i nienasyconych kwasów tłuszczowych. $\Delta 5$ oraz $\Delta 6$ desaturaza katalizują przemiany wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast $\Delta 9$ desaturaza katalizuje syntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych.

Celem pracy było poznanie dynamiki zmian w zakresie ekspresji genów dla elongazy 2, 5 oraz 6 oraz $\Delta 5$, $\Delta 6$ oraz $\Delta 9$ desaturazy w tkance wątrobowej i tkance tłuszczowej szczurów rasy Wistar w odpowiedzi na stosowanie różnego typu diety. Dalszym celem było określenie zmian składu kwasów tłuszczowych frakcji lipidów całkowitych tkanki wątrobowej oraz tkanki tłuszczowej, a także zmian profilu lipidowego w surowicy krwi jak również stężenia glukozy.

Wykorzystano model badawczy z użyciem samców rasy Wistar, które żywione były dietą standardową, dietą wysokowęglowodanową, dietą wzbogaconą w nienasycone kwasy tłuszczowe oraz dietą wzbogaconą w nasycone kwasy tłuszczowe. Ekspresja genów dla elongaz i desaturaz była badana przy użyciu techniki

RT-PCR. W celu określenia profilu kwasów tłuszczowych lipidów całkowitych była zastosowana metoda chromatografii gazowej. W surowicy krwi zwierząt oznaczono, przy użyciu standardowych zestawów do analiz metodą spektrofotometryczną, profil lipidowy oraz stężenie glukozy.

W zależności od rodzaju zastosowanej w żywieniu zwierząt diety, wykazano odmienność w poziomach ekspresji mRNA dla elongaz i desaturaz zarówno w wątrobie jak i tkance tłuszczowej. W każdej grupie testowej, pomiędzy tkanką wątrobową oraz tkanką tłuszczową uzyskano różne poziomy ekspresji mRNA dla badanych izoform enzymów. W tkance wątrobowej oraz tkance tłuszczowej wykazano zróżnicowany odsetkowy skład kwasów tłuszczowych w zależności od zastosowanej diety. W każdej grupie testowej, pomiędzy tkanką wątrobową oraz tkanką tłuszczową stwierdzono odmienny skład kwasów tłuszczowych. Analiza profilu lipidowego oraz stężenia glukozy w surowicy krwi zwierząt wykazała odmienne poziomy parametrów w zależności od rodzaju diety.

Słowa kluczowe: elongazy, desaturazy, tkanka wątrobowa, tkanka tłuszczowa, dieta wysokowęglowodanowa, dieta wzbogacona w nasycone kwasy tłuszczowe, dieta wzbogacona w nienasycone kwasy tłuszczowe.

Summary

Fatty acids are a heterogenous group of compounds. In the body, fatty acids serve as building blocks of phospholipid membranes and as a source of energy, as well as regulate the expression of genes responsible for the metabolism of organic compounds, cell growth and differentiation. The structure of fatty acids is a subject to modification in the process of elongation and desaturation, catalyzed by fatty acid elongases and desaturases, respectively. Long chain mono- and polyunsaturated fatty acids, products of elongation and desaturation reactions, are part of the whole body pool of these compounds and are necessary substrates for the synthesis of lipid components of biological membranes, and other metabolically active compounds. Within species, the processes of elongation and desaturation of both endogenous and exogenous fatty acids are catalyzed by the action of the same desaturases and elongases. These enzymes are tissue-specific and substrate-specific. Regulation of gene expression of desaturases

and elongases takes place on the stage of gene transcription and is regulated by different nutrients and hormones. Elongases and desaturases are transmembrane enzymes found primarily in the endoplasmic reticulum. Elongases 1, 3, 6 and 7 catalyze the elongation of saturated and monounsaturated fatty acids, while elongases 2 and 5 catalyze the elongation of polyunsaturated fatty acids. Elongase 4 catalyzes the synthesis of both long-chain saturated and unsaturated fatty acids. $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturase catalyze the metabolism of polyunsaturated fatty acids, while the $\Delta 9$ desaturase catalyzes the synthesis of monounsaturated fatty acids.

The aim of this study was to investigate the dynamics of changes in gene expression of mRNA for elongases 2, 5 and 6 and $\Delta 5$, $\Delta 6$ and $\Delta 9$ desaturases in liver and adipose tissue in response to different types of diets. A further objective was to determine changes in fatty acid composition of total lipids of liver and adipose tissue, as well as changes in lipid profile and glucose concentration in blood serum.

The research model was used with male Wistar rats that were fed a standard diet, a high-carbohydrate diet, a diet enriched in unsaturated fatty acids and a diet enriched in saturated fatty acids. Expression of genes for elongases and desaturases was investigated using RT-PCR method. In order to determine the fatty acid composition of total lipids gas chromatography was performed. In the blood serum of animals a lipid profile and glucose level were determined using standard kits.

In response to different diet, in liver and adipose tissue results showed differences in expression levels of mRNA for desaturases and elongases and in fatty acid composition. In the liver of animals fed the same diet, varied levels of expression of mRNA for elongases and desaturases as well as a different fatty acid composition were observed in comparison with adipose tissue. In rats' serum, a lipid profile and glucose level were different depending on the type of diet.

Key words: elongases, desaturase, liver, adipose tissue, a high-carbohydrate diet, diet enriched in saturated fatty acids, diet enriched in unsaturated fatty acids.

12. PIŚMIENNICTWO

1. Agbaga M.P., Brush R.S., Mandal M.N., Henry K., Elliott M.H., Anderson R.E. Role of stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105:12843-12848.
2. Alaynick W.A. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion.* 2008; 8(4):329-37. Review.
3. Anzulovich A., Mir A., Brewer M., Ferreyra G., Vinson C., Baler R. Elov13: a model gene to dissect homeostatic links between the circadian clock and nutritional status *J Lipid Res* 2006; 47: 2690–2700.
4. Argyropoulos G., Harper M.E.: Uncoupling proteins and thermoregulation. *J. Appl. Physiol.* 2002; 92 (5): 2187–2198
5. Asadi A., Jørgensen J., Jacobsson A.. Elov11 and p55Cdc Genes Are Localized in a Tail-to-Tail Array and Are Co-expressed in Proliferating Cells *J Biol Chem* 2002; 277:18494–185001.
6. Asturias F.J., Chadick J.Z., Cheung I.K., Stark H., Witkowski A., Joshi A.K., Smith S. Structure and molecular organization of mammalian fatty acid synthase *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 225–32.
7. Bańkowski E. *BIOCHEMIA: podręcznik dla studentów uczelni medycznych.* Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2009, wyd. 2, 158-181
8. Barber M.C., Price N.T., Travers M.T. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1733:1-28.
9. Baynes J., Dominiczak M. *Medical Biochemistry, 2nd Edition* Mosby, 2004, pp113-123, str. 225-232
10. Bełtowski J. Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia. *Cardiovasc Ther.* 2008; 26(4):297-316.
11. Bordoni A., Di Nunzio M., Danesi F., Biagi P.L. Polyunsaturated fatty acids: From diet to binding to ppars and other nuclear receptors. *Genes Nutr.* 2006 Jun;1(2):95-106.
12. Brenna J.T., Kothapalli K.S., Park W.J. Alternative transcripts of fatty acid desaturase (FADS) genes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010; 82(4-6):281-5.

13. Brolinson A., Fourcade S., Jakobsson A., Pujol A., Jacobsson A. Steroid hormones control circadian Elov13 expression in mouse liver. *Endocrinology*. 2008; 149(6):3158-66.
14. Brownsey R.W. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2006; 34:223-227.
15. Calder P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75:197–202.
16. Chaves Das Neves H.J., Vasconcelos A.M.P. Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic-weight spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic-weight spectrometric detection of the N,O (S)-test-butyltrimethylsilyl derivatives. *J Chromatogr* 1987; 392:249-258.
17. Cho H.P., Nakamura M., Clarke S.D. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase. *J Biol Chem* 1999; 274:471–477.
18. Cho H.P., Nakamura M., Clarke S.D. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem* 1999; 274: 37335–37339.
19. Ciesielska A., Sikorski M.M. Zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym do walidacji eksperymentu mikromacierzowego *Biotechnologia* 2008; 4:88-100
20. Dalen K.T., Ulven S.M., Bamberg K., Gustafsson J.A., Nebb H.I. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem*. 2003; 278(48):48283-91.
21. Das U.N. Biological significance of essential fatty acids. *J Assoc Physicians India* 2006; 54:309-19.
22. Das U.N. Essential fatty acids and acquired immunodeficiency syndrome. *Med Sci Monit* 2006; 11:206-211.
23. Demcakova E., Sebokova., Ukropec J., Gasperikova D., Klimes I. Delta-6 desaturase activity and gene expression, tissue fatty acid profile and glucose turnover rate in hereditary hypertriglyceridemic rats. *Endocr Regul*. 2001; 35(4):179-86.

24. Dentin R., Denechaud P.D., Benhamed F., Girard J., Postic C. Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr.* 2006; 136:1145-9.
25. Devlin T.M. *Textbook Of Biochemistry With Clinical Correlations*, 7th Edition John Wiley & Sons 2010, pp 662-694
26. Dobrzyń A., Dobrzyń P. Stearoyl-CoA desaturase-a new player in skeletal muscle metabolism regulation. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57Suppl 10:31-42.
27. Dobrzyń A., Ntambi J.M. The role of stearyl-CoA desaturase in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005; 73:35-41. Review.
28. Eberlé D., Hegarty B., Bossard P., Ferré P., Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004; 86:839-48.
29. Enerbäck S. Brown adipose tissue in humans. *Int J Obes (Lond).* 2010;34 Suppl 1:S43-6.
30. Fahy E., Subramaniam S., Brown H., Glass C., Merrill J.A., Murphy R., Raetz C., Russell D., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., Vannieuwenhze M., White S., Witztum J., Dennis E.A. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res* 2005; 46: 839-861.
31. Fahy E., Subramaniam S., Murphy R., Nishijima M., Raetz C., Shimizu T., Spener F., van Meer G., Wakelam M., Dennis E.A. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 2009; 50: S9-S14.
32. Faulds M.H., Zhao C., Dahlman-Wright K. Molecular biology and functional genomics of liver X receptors (LXR) in relationship to metabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10(6):692-7.
33. Ferdinandusse S., Denis S., Dacremont G., Wanders R.J.A. Studies on the metabolic fate of n-3 polyunsaturated fatty acids *J Lipid Res* 2003; 44: 1992–1997.
34. Flowers M.T., Ntambi J.M. Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1791(2):85-91.
35. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226:497-509.

36. Fonseca-Alaniz M.H., Takada J., Alonso-Vale M.I., Lima F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2007; 83:S192-203
37. Ford J.H. Saturated fatty acid metabolism is key link between cell division, cancer, and senescence in cellular and whole organism aging. *Age* 2010; 32(2):231-7
38. Frayn K.N. The Glucose/Fatty Acid Cycle 1963–2003: A Tribute to Sir Philip Randle. The glucose–fatty acid cycle: a physiological perspective. *Biochemical Society Transactions* 2003; 31:6
39. Geyeregger R., Zeyda M., Stulnig T.M. Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(5):524-39.
40. Gibson M.D., Harris R.A. Metabolic regulation In mammals. Taylor & Francis, 2002; 156-196
41. Glaser C., Heinrich J., Koletzko B. Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism*. 2010; 59(7):993-9.
42. Gostincar C., Turk M., Gunde-Cimerman N. The evolution of fatty acid desaturases and cytochrome b5 in eukaryotes. *J Membr Biol* 2010; 233 (1 - 3):63-72.
43. Grayson C., Molday R.S. Dominant negative mechanism underlies autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy linked to mutations in ELOVL4 *J Biol Chem* 2005; 280:32521-30.
44. Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse *Diabetes Metab* 2004, 30:13-9
45. Guillou H., Zadavec D., Martin P.G., Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 2010; 49(2):186-99.
46. Gumińska M. *Zarys biochemii ogólnej dla studentów farmacji i analityki medycznej* Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 1998
47. Hashimoto K., Yoshizawa A.C., Okuda S., Kuma K., Goto S., Kanehisa M. The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *J Lipid Res*. 2008; 49(1):183-91.
48. Hausman G. J., Richardson R. L.: Adipose tissue angiogenesis. *J. Anim. Sci.* 2004; 82 (3): 925–934

49. He W.S., Nara T.Y., Nakamura M.T. Delayed induction of delta-6 and delta-5 desaturases by a peroxisome proliferator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 299:832–38
50. Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 2002;109:1125–31
51. Horton J.D., Shimomura I., Ikemoto S., Bashmakov Y. and Hammer R.E.. Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. *J. Biol. Chem* 2003; 278:36652-36660.
52. Hue L., Taegtmeier H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 297(3):E578-91.
53. Iizuka K., Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J.* 2008; 55(4):617-24
54. Im S.S., Kwon S.K., Kang S.Y., Kim T.H., Kim H.I., Hur M.W., Kim K.S. and Ahn Y.H. Regulation of GLUT4 gene expression by SREBP-1c in adipocytes. *Biochem. J.* 2006; 399:131-139.
55. Innis S.M., Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res.* 2008; 1237:35-43.
56. Ishii S., Iizuka K., Miller B.C., Uyeda K. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15597-602.
57. Jakobsson A., Jörgensen JA., Jacobsson A., Differential regulation of fatty acid elongation enzymes in brown adipocytes implies a unique role for Elovl3 during increased fatty acid oxidation *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E517-26.
58. Jakobsson A., Westerberg R., Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism *Prog Lipid Res* 2006; 45:237–249.
59. Jazurek M., Dobrzyń P., Dobrzyń A. Regulation of gene expression by long-chain fatty acids. *Postepy Biochem* 2008; 54(3):242-50.

60. Jørgensen J.A., Zadavec D., Jacobsson A. Norepinephrine and rosiglitazone synergistically induce Elovl3 expression in brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293(5):E1159-68.
61. Joseph S.B., Tontonoz P. LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr Opin Pharmacol.* 2003; 3(2):192-7.
62. Jump D.B. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41(1):41-78.
63. Jump D.B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19:242-7.
64. Katsuya I., Aki T., Fukuda Y., Kawamoto S., Shigeta S., Ono K., Suzuki O. Identification and Expression of Rat Fatty Acid Elongase Involved in the Biosynthesis of C18 Fatty Acids *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 613-621.
65. Kershaw E.E., Flier J.S.: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2548–2556.
66. Kim K.W. Expression purification and characterization of human acetyl-CoA carboxylase 2. *Protein Expr Purif* 2007; 53:16–23.
67. Koolman J., Röhm K.H., Węglarz L. *Biochemia Ilustrowany przewodnik* Wydawnictwo Lekarskie PZWL , 2005, s: 162-172
68. Korcz A., Lipiński D., Mikołajczyk- Stecyna J., Słomski R. Synteza cDNA na matrycy RNA W: *Analiza DNA teoria i praktyka.* Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 2008; s: 176- 182
69. Kumadaki S., Matsuzaka T., Kato T., Yahagi N., Yamamoto T., Okada S., Kobayashi K., Takahashi A., Yatoh S., Suzuki H., Yamada N., Shimano H. Mouse Elovl-6 promoter is an SREBP target. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 368(2):261-6.
70. Lee J.S., Pinnamaneni S.K., Eo S.J., Cho I.H., Pyo J.H., Kim C.K., Sinclair A.J., Febbraio M.A., Watt M.J. Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol.* 2006 May;100(5):1467-74.
71. Leonard A.E., Kelder B., Bobik E.G., Chuang L.T., Lewis C.J., Kopchick J.J. Identification and Expression of Mammalian Long-Chain PUFA Elongation Enzymes. *Lipids* 2002; 37: 733–740.

72. Leonard A.E., Pereira S.L., Sprecher H., Yung-Sheng Huang. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 2004; 43:36–54.
73. Li Y., Nara T.Y., Nakamura M.T. Peroxisome proliferator-activated receptor α is required for feedback regulation of highly unsaturated fatty acid synthesis. *J. Lipid Res* 2005;46:2432–2440.
74. Li Y., Watkins B.A. Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids*; 1998; 33:417-425.
75. Liang G., Yang J., Horton J.D., Hammer R.E., Goldstein J.L., Brown M.S. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:9520–28
76. Liang T., Harwood Jr H.J. Acetyl-Coenzyme A Carboxylases: Versatile Targets for Drug Discovery. *J Cell Biochem* 2006; 299:1476–1488.
77. Liu X., Miyazaki M., Flowers M.T., Sampath H., Zhao M., Chu K., Paton C.M., Joo D.S., Ntambi J.M. Loss of Stearoyl-CoA desaturase-1 attenuates adipocyte inflammation: effects of adipocyte-derived oleate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(1):31-8.
78. Liu Y., McNamara R.K. Elevated Delta-6 desaturase (FADS2) gene expression in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2011; 45(2):269-72.
79. Ma L., Robinson L.N., Towle H.C. ChREBP*MLx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem.* 2006; 281(39):28721-30.
80. Ma L., Tsatsos N.G., Towle H.C. Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J Biol Chem.* 2005; 280(12):12019-27.
81. Man W.C., Miyazaki M., Chu K., Ntambi J.M. Membrane topology of mouse stearyl-CoA desaturase 1.. *J Biol Chem.* 2006; 281(2):1251-60.
82. Mandal M.N., Ambasudhan R., Wong P.W., Gage P.J., Sieving P.A., Ayyagari R. Characterization of mouse orthologue of ELOVL4: genomic organization and spatial and temporal expression *Genomics* 2004; 83:626–635.
83. Martinelli N., Girelli D., Malerba G., Guarini P., Illig T., Trabetti E., Sandri M., Friso S., Pizzolo F., Schaeffer L., Heinrich J., Pignatti P.F., Corrocher

- R., Olivieri O. FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(4):941-9.
84. Matsuzaka T., Shimano H. Elovl6: a new player in fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *J Mol Med.* 2009; 87(4):379-84.
85. Matsuzaka T., Shimano H., Yahagi N., Kato T., Atsumi A., Yamamoto T., Inoue N., Ishikawa M., Okada S., Ishigaki N., Iwasaki H., Iwasaki Y., Karasawa T., Kumadaki S., Matsui T., Sekiya M., Ohashi K., Hastay A.H., Nakagawa Y., Takahashi A., Suzuki H., Yatoh S., Sone H., Toyoshima H., Osuga J., Yamada N. Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2007; 13(10):1193-202.
86. Matsuzaka T., Shimano H., Yahagi N., Yoshikawa T., Amemiya-Kudo M., Hastay A.H., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Takahashi A., Yato S., Sone H., Ishibashi S., Yamada N. Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res.* 2002; 43(6):911-20.
87. McMahon A., Butovich I.A., Mata N.L., Klein M., Ritter R., Richardson J. Retinal pathology and skin barrier defect in mice carrying a Stargardt disease-3 mutation in elongase of very long chain fatty acids. *Mol Vis* 2007; 13:258-72.
88. McMahon A., Kedzierski W. Polyunsaturated very-long-chain C28-C36 fatty acids and retinal physiology *Br J Ophthalmol.* 2010; 94(9):1127-32.
89. Merino D.M., Ma D.W., Mutch D.M. Genetic variation in lipid desaturases and its impact on the development of human disease. *Lipids Health Dis.* 2010; 9:63. Review.
90. Metcalfe L.D., Schmitz A.A. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 1961; 33: 363-364.
91. Mitro N., Mak P.A., Vargas L., Godio C., Hampton E., Molteni V., Kreuzsch A., Saez E. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature.* 2007; 445(7124):219-23.
92. Miyazaki M., Bruggink S.M., Ntambi J.M. Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Delta9-desaturase. *J Lipid Res.* 2006;47(4):700-4.

93. Miyazaki M., Dobrzyn A., Man W.C., Chu K., Sampath H., Kim H.J., Ntambi J.M. Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2004; 279(24):25164-71.
94. Montanaro M.A., González M.S., Bernasconi A.M., Brenner R.R. Role of liver X receptor, insulin and peroxisome proliferator activated receptor alpha on in vivo desaturase modulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Lipids.* 2007; 42(3):197-210.
95. Moon Y., Shah N.A., Mohapatra S., Warrington J.A., Horton J.D. Identification of a Mammalian Long Chain Fatty Acyl Elongase Regulated by Sterol Regulatory Element-binding Proteins *J Biol Chem* 2001; 276: 45358–45366.
96. Moon Y.A., Hammer R.E., Horton J.D. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J Lipid Res* 2009; 50: 412-23.
97. Morrison S.F. Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News Physiol. Sci.* 2004; 19: 67–74
98. Munday M.R. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:1059-64.
99. Murray R.K., Granner D.K., Rodwell V.W. (tłumaczenie Kokot F i wsp.). *Biochemia Harpera ilustrowana.* Wyd. Lekarskie PZWL 2006
100. Nakamura M.T., Cheon Y., Li Y., Nara T.Y. Mechanisms of Regulation of Gene Expression by Fatty Acids. *Lipids* 2004; 39:1077-83.
101. Niot I., Poirier H., Tran T.T., Besnard P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res.* 2009;48(2):101-15.
102. Nwankwo J.O., Spector A.A., Domann F.E. A nucleotide insertion in the transcriptional regulatory region of FADS2 gives rise to human fatty acid delta-6-desaturase deficiency. *J Lipid Res.* 2003; 44(12):2311-9.
103. Ohno Y., Suto S., Yamanaka M., Mizutani Y., Mitsutake S., Igarashi Y., Sassa T., Kihara A. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(43):18439-44.
104. Olszanecka-Glinianowicz M., Kocełak P., Orlik B, Handzlik G, Juszczak Ł. Nowe adipokiny – korzystne czy niekorzystne w aspekcie patogenezy

- insulinooporności? *Endocrinology, Obesity and Metabolic Disorders* 2009, 5:236–244
105. Oosterveer M.H., Grefhorst A., van Dijk T.H., Havinga R., Staels B., Kuipers F., Groen A.K., Reijngoud D.J. Fenofibrate simultaneously induces hepatic fatty acid oxidation, synthesis, and elongation in mice. *J Biol Chem.* 2009; 284(49):34036-44.
106. Paton C.M., Ntambi J.M. Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 297(1):E28-37.
107. Patsouris D., Reddy J.K., Müller M., Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *Endocrinology.* 2006; 147(3):1508-16
108. Pédrone F., Blanchard H., Kloareg M., D'andrea S., Daval S., Rioux V., Legrand P. The fatty acid desaturase 3 gene encodes for different FADS3 protein isoforms in mammalian tissues. *J Lipid Res.* 2010; 51(3):472-9
109. Peters J.M., Lee S.S., Li W., Ward J.M., Gavrilova O., Everett C., Reitman M.L., Hudson L.D., Gonzalez F.J. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol.* 2000; 20(14):5119-28.
110. Qin Y., Dalen K.T., Gustafsson J.A., Nebb H.I. Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXR alpha-SREBP-1c. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791:40-7.
111. Rakhshandehroo M., Knoch B., Müller M., Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* 2010;
112. Rimoldi O.J., Finarelli G.S., Brenner R.R. Effects of diabetes and insulin on hepatic delta 6 desaturase gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 283:323–26
113. Rodriguez-Cruz M., Tovar A.R., Palacios-González B., Del Prado M., Torres N. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of Delta5 and Delta6 desaturases, SREBP-1, PPARalpha, and PGC-1. *J Lipid Res.* 2006; 47(3):553-60

114. Salway J.G., red. wyd. pol. Krystyna Tyrpie. *Biochemia w zarysie. Podręcznik dla studentów wydziałów medycznych.* Górnicki Wydawnictwo Medyczne, Wrocław 2009, wyd. 1
115. Sawicki W., *Histologia. Wydanie IV poprawione i uzupełnione, 2005,* PZWL, str.134-139, 430-438
116. Schaeffer L., Gohlke H., Müller M., Heid I.M., Palmer L.J., Kompauer I., Demmelmair H., Illig T., Koletzko B., Heinrich J. Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(11):1745-56.
117. Scherer P.E., Williams S., Fogliano M., Baldini G., Lodish H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (45): 26746–26749
118. Shimamura K., Nagumo A., Miyamoto Y., Kitazawa H., Kanesaka M., Yoshimoto R., Aragane K., Morita N., Ohe T., Takahashi T., Nagase T., Sato N., Tokita S. Discovery and characterization of a novel potent, selective and orally active inhibitor for mammalian ELOVL6. *Eur J Pharmacol.* 2010; 630(1-3):34-41.
119. Sjögren P., Sierra-Johnson J., Gertow K., Rosell M., Vessby B., de Faire U., Hamsten A., Hellenius M.L., Fisher R.M. Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance. *Diabetologia.* 2008; 51(2):328-35.
120. Skowrońska B, Michna M, Michna P. Rola tkanki tłuszczowej w układzie dokrewnym. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 2005, 1: 21–29
121. Smith S., Witkowski A., Joshi A.K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* 2003; 42:289–317.
122. Stoffel W., Holz B., Jenke B., Binczek E., Günter R.H., Kiss C., Karakesisoglou I., Thevis M., Weber A.A., Arnhold S., Addicks K. Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* 2008; 27(17):2281-92.
123. Stroud C.K., Nara T.Y., Roqueta-Rivera M., Radlowski E.C., Lawrence P., Zhang Y., Cho B.H., Segre M., Hess R.A., Brenna J.T., Haschek W.M., Nakamura M.T. Disruption of FADS2 gene in mice impairs male

- reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J Lipid Res.* 2009; 50(9):1870-80.
124. Sugden M.C. In appreciation of Sir Philip Randle: the glucose-fatty acid cycle. *Br J Nutr.* 2007; 97(5):809-13.
125. Szopa M., Skupień J. Omentyna-nowa adipokina w kontekście założeń nowej definicji zespołu metabolicznego (IDF 2005) *Diabetologia Praktyczna* 2007, 8:35-39
126. Takahashi T., Nagase T., Sasaki T., Nagumo A., Shimamura K., Miyamoto Y., Kitazawa H., Kanesaka M., Yoshimoto R., Aragane K., Tokita S., Sato N. Synthesis and evaluation of a novel indoledione class of long chain fatty acid elongase 6 (ELOVL6) inhibitors. *J Med Chem.* 2009; 52(10):3142-5.
127. Tamura K., Makino A., Hullin-Matsuda F., Kobayashi T., Furihata M., Chung S. Novel lipogenic enzyme elovl7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. *Cancer Res* 2009; 69:8133–40.
128. Tikhonenko M., Lydic TA., Wang Y., Chen W., Opreanu M., Sochacki A., McSorley K.M., Renis R.L., Kern T., Jump D.B., Reid G.E., Busik J.V. Remodeling of retinal Fatty acids in an animal model of diabetes: a decrease in long-chain polyunsaturated fatty acids is associated with a decrease in fatty acid elongases Elovl2 and Elovl4. *Diabetes.* 2010; 59(1):219-27.
129. Tontonoz P., Mangelsdorf D.J. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol.* 2003; 17(6):985-93.
130. Trayhurn P., Beattie J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ *Proc Nutr Soc* 2001, 60:329-339
131. Trayhurn P., Bing Ch., Wood I.S. Adipose Tissue and Adipokines-Energy Regulation from the Human Perspective, *J Nutr* 2006, 136:1935 -1939
132. Trayhurn P., Wood I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92: 347–355.
133. Tripathy S., Torres-Gonzalez M., Jump D.B. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity corrects dietary fat-induced hyperglycemia in obese C57BL/6J mice. *J Lipid Res.* 2010; 51(9):2642-54.
134. Trumble G.E., Smith M.A., Winder W.W. Purification and characterization of rat skeletal muscle acetyl-CoA. carboxylase *Eur J Biochem* 1995; 31:192 - 8.

135. Tvrdik P., Asadi A., Kozak L.P., Nedergaard J., Cannon B., Jacobsson A. Role of a New Mammalian Gene Family in the Biosynthesis of Very Long Chain Fatty Acids and Sphingolipids. *J Cell Biol* 2000; 149:707–717.
136. Tvrdik P., Asadi A., Kozak L.P., Nedergaard J., Cannon B., Jacobsson A. Cig30 a Mouse Member of a Novel Membrane Protein Gene Family Is Involved in the Recruitment of Brown Adipose Tissue. *J Biol Chem* 1997; 272:31738–31746.
137. Uyeda K., Yamashita H., Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63(12):2075-80. Review.
138. Vallim T., Salter A.M. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010; 82(4-6):211-8.
139. Vance D.E., Vance J.E. (Eds) *Biochemistry of Lipids Lipoproteins and Membranes.* (5th Edn) Elsevier, Amsterdam 2008; 155-212.
140. Wakil S.J., Abu-Elheiga L.A. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2009; 50 Suppl:S138-43.Review.
141. Wallis J.G., Watts J.L., Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci* 2002; 27:467.
142. Wang Y., Botolin D., Christian B., Busik J., Xu J., Jump D.B. Tissue-specific nutritional and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res* 2005; 46: 706–715.
143. Wang Y., Botolin D., Xu J., Christian B., Mitchell E., Jayaprakasam B., Nair M., Peters J.M., Busik J., Olson L.K., Jump D.B. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lipid Res.* 2006; 47: 2028–2041.
144. Wang Y., Torres-Gonzalez M., Tripathy S., Botolin D., Christian B., Jump D.B. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition. *J. Lipid Res.* 2008; 49: 1538–1552.
145. Weber L.W., Boll M., Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: Sterol regulatory element-binding proteins *World J Gastroenterol.* 2004; 10(21):3081-7.
146. Westerberg R., Månsson J.E., Golozoubova V., Shabalina I.G., Backlund E.C., Tvrdik P., Retterstøl K. ELOVL3 Is an Important Component for Early

- Onset of Lipid Recruitment in Brown Adipose Tissue. *J Biol Chem* 2006; 281:4958–4968.
147. Westerberg R., Tvrdik P., Undén A.B., Månsson J.E., Norlén L., Jakobsson A. A Role for ELOVL3 and Fatty Acid Chain Length in Development of Hair and Skin Function. *J Biol Chem* 2004; 279:5621–5629.
148. Whitney H.M., Sayanova O., Pickett J.A., Napier J.A. Isolation and expression pattern of two putative acyl-ACP desaturase cDNAs from *Bassia scoparia*. *J Exp Bot.* 2004; 55(397):787-9
149. Williard D.E., Nwankwo J.O., Kaduce T.L., Harmon S.D., Irons M., Moser H.W., Raymond G.V., Spector A.A. Identification of a fatty acid delta6-desaturase deficiency in human skin fibroblasts. *J Lipid Res.* 2001; 42(4):501-8.
150. Wójcicka G., Jamroz-Wiśniewska A., Horoszewicz K., Bełtowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw* 2007; 61:736-59. Review.
151. Wong R.H., Sul H.S. Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10(6):684-91.
152. Xian-Mei Zhang, Yang Z., Karan G., Hashimoto T., Baehr W., Yang X.J. Elov14 mRNA distribution in the developing mouse retina and phylogenetic conservation of Elov14 genes. *MolVis* 2003; 9:301-7.
153. Yessoufou A., Wahli W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly.* 2010; 140:w13071.
154. Zadavec D. Metabolic significance of fatty acid elongation. Doctoral thesis. 2010 Stockholm, Stockholm University Library (ISBN 978-91-7155-993-7)
155. Zhang K., Kniazeva M., Han M., Li W., Yu Z., Yang Z. A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy *Nat Genet* 2001; 27:89-93.
156. Zhao C., Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol.* 2010; 204(3):233-40.
157. Zingaretti M.C., Crosta F., Vitali A., Guerrieri M., Frontini A., Cannon B., Nedergaard J., Cinti S. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J.* 2009; 23(9):3113-20.