

Streszczenie

Stan zapalny jest reakcją obronną tkanek na uszkodzenie. Ostre zapalenie może przybrać formę przewlekłą i skutkować rozwojem wielu chorób. Badania dotyczące mediatorów stanu zapalnego doprowadziły do identyfikacji potencjału przeciwzapalnego wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT) i ich pochodnych. Kwas eikozapentaenowy (EPA) oraz dokozaheksaenowy (DHA) należą do WNKT szeregu n-3, są prekursorami mediatorów lipidowych o charakterze przeciwzapalnym i wygaszającym zapalenie. Suplementacja EPA lub DHA może, zatem obniżać ryzyko występowania przewlekłych chorób o charakterze zapalnym. Zmiana składu fosfolipidów i organizacji mikrodomen błonowych, jak również przemiany metaboliczne lipidów i modyfikacje szlaków sygnałowych w stanach patologicznych stają się nowymi celami farmakologicznymi.

Tkanka tłuszczowa jest jednym z głównych centrów regulacji metabolizmu energetycznego. Receptory dla kwasów tłuszczowych odgrywają ważną rolę w metabolizmie glukozy. Regulują zarówno wychwyt glukozy w tkance tłuszczowej, poprzez wpływ na ekspresję transporterów glukozy GLUT-4, ekspresję receptora dla insuliny, jak i proces adipogenezy. Zaburzenia procesu adipogenezy, wywołane m.in. stanem zapalnym w obrębie tkanki tłuszczowej prowadzą do insulinooporności, a także do lipotoksyczności oraz stłuszczenia ważnych życiowo narządów.

Czynniki wpływające na rozwój otyłości, to również zmiany w składzie mikroflory, podwyższone stężenia lipopolisacharydu (LPS), prowadzące do wzrostu przepuszczalności jelit i przewlekłego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia, a także wzrostu poboru składników energetycznych przy jednoczesnym zmniejszeniu wydatków energetycznych.

W związku z powyższym w niniejszej rozprawie wykorzystano model *in vitro* adipocytów (zróżnicowane komórki 3T3-L1) oraz enterocytów (komórki Caco-2). W pełni zróżnicowane adipocyty 3T3-L1 posiadają większość morfologicznych i biochemicznych cech typowych dla komórek tkanki tłuszczowej *in vivo*. Ze względu na swoją analogiczność morfologiczną i funkcjonalną, linia Caco-2 jest uważana za odpowiednik enterocytów jelita cienkiego *in vivo*, dlatego uważana jest jako dobry model w badaniach biodostępności.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu kwasów tłuszczowych szeregu n-3, EPA i DHA na fibroblasty 3T3-L1 oraz komórki nabłonkowe jelita Caco-2, aktywowane czynnikami zapalnymi i tym samym ukierunkowane programowanie metabolizmu kwasów tłuszczowych w warunkach zapalnych.

Nie zaobserwowano efektów cytotoksycznych ani apoptozy w komórkach 3T3-L1 przed i po różnicowaniu do adipocytów inkubowanych z EPA lub DHA, metforminą (MET) i lowastatyną (LOVA) oraz w komórkach Caco-2 po suplementacji z EPA i DHA i aktywacji czynnikami zapalnymi.

Mysie embrionalne komórki fibroblastów 3T3-L1 były różnicowane do adipocytów. Komórki inkubowano z 50 μmol EPA przez 48 godzin, a następnie aktywowano lipopolisacharydem (LPS) lub czynnikiem martwicy nowotworu- α (TNF- α). Poziom cyklooksygenazy-2 (syntaza prostaglandyny E2, Ptgs2, COX-2), cytozolowej syntazy prostaglandyny E2 (cPGES), białka wiążącego kwasy tłuszczowe 4 (FABP4), receptora toll-like 4 (TLR4), receptora glukozy typu 4 (GLUT-4) i receptora kannabinoidowego 2 (CB2) oznaczano techniką Western blot. Ekspresję genu fosfolipazy A2 (Pla2g4a) i syntazy prostaglandyny E2 (Ptgs2) analizowano za pomocą qPCR w czasie rzeczywistym. Po aktywacji EPA i IF zaobserwowano istotny spadek poziomu białek COX-2, cPGES i TLR4. Inkubacja komórek z EPA i IF spowodowała represję Ptgs2 i wzrost ekspresji genu Pla2g4a. Istotny wzrost białka CB2 zaobserwowano w adipocytach inkubowanych jednocześnie z EPA i IF. Uzyskane wyniki wskazują na właściwości przeciwzapalne EPA. Aktywacja receptora GLUT4 przez EPA sugeruje wyjątkową rolę tego kwasu tłuszczowego w regulacji metabolizmu adipocytów i zapobieganiu insulinooporności.

W kolejnym eksperymencie preadipocyty i adipocyty suplementowano z 40 μmol EPA, 40 μmol DHA oraz 1 nmol Rezolwiny D1 (RvD1) i aktywowano 1 μmol benzo(a)pirenu (BaP). Identyfikację i oznaczenia ilości izoprostanów 8-iso-prostaglandyny F2 α (8-isoPGF2 α), 8-isoPGF3 α , prostaglandyny F2 α (PGF2 α) oraz PGF3 α wykonano przy użyciu ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej UHPLC UltiMate 3000 RS system sprzężonej ze spektroskopem masowym i analizatorem czasu przelotu. Najwyższe ilości 8-isoPF2 α , 8-isoPGF3 α oraz PGF2 α wykryto w komórkach aktywowanych BaP. Dodatek EPA, DHA oraz RvD1 do komórek 3T3-L1, zarówno przed i po zróżnicowaniu, znacząco zmniejszał ilość izoprostanów, co wskazuje na właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne kwasów tłuszczowych n-3 i ich pochodnych.

Badanie potwierdzające właściwości kwasów tłuszczowych opisano również w kolejnym eksperymencie, gdzie adipocyty inkubowano z 25 μmol EPA lub DHA oraz 10 μmol metforminy (MET) i 2,5 μmol lowastatyny (LOVA). Komórki aktywowano czynnikiem martwicy nowotworu TNF- α . Następnie techniką Western Blot badano poziom białek cyklooksygenazy 2 (COX-2) i transportera dla glukozy (GLUT-4). Wykazano najwyższy

poziom COX-2 w adipocytach aktywowanych TNF- α , natomiast w komórkach 3T3-L1 poziom białka GLUT-4 był najniższy po aktywacji czynnikiem zapalnym. Dodatek metforminy znacząco wpływał na zwiększenie poziomu GLUT-4. Inkubacja komórek z kwasami tłuszczowymi i LOVA, również zwiększała poziom GLUT4, co wskazuje na synergistyczny udział badanych związków w regulacji metabolizmu adipocytów i przeciwdziałaniu cukrzycy. W adipocytach inkubowanych z TNF- α wykazano nadekspresję genu Ptgs2 i Pla2g4a natomiast dla genu Pparg odnotowano statystycznie istotne obniżenie. W komórkach inkubowanych z MET, z LOVA oraz z EPA i DHA obserwowano nadekspresję Pparg. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że EPA i DHA wykazują działanie przeciwzapalne i wygaszające stan zapalny.

Równolegle prowadzone były hodowle ludzkich nabłonkowych komórek jelit Caco-2. W komórkach Caco-2 suplementowanych EPA i aktywowanych LPS, poziom białek prozapalnych był znacząco obniżony, co sugeruje działanie przeciwzapalne kwasu eikozapentaenowego. Suplementacja komórek 10 μ mol EPA i 25 μ mol EPA mimo aktywacji LPS, skutkowała znaczącym obniżeniem poziomu COX-2, cPGES oraz AHR. Po aktywacji LPS odnotowano najwyższe stężenie IL-6 w porównaniu do kontroli. Dodatek EPA znacząco obniżył poziom IL-6 w komórkach Caco-2.

Najwyższy poziom cyklooksygenazy 2, cPGES i receptora FP wykazano w enterocytach inkubowanych z TOXA. Suplementacja kwasem dokozaheksaenowym w stężeniu 10 μ mol oraz 50 μ mol znacząco obniżyła poziom wyżej wymienionych białek, mimo obecności czynnika zapalnego. W komórkach Caco-2 aktywowanych toksyną A i inkubowanych z DHA dowiedziono represji genów kodujących izoforny cyklooksygenaz. Wykazano również znaczące podwyższenie ekspresji fosfolipazy A2 w grupach DHA+TOXA, w porównaniu do wyników uzyskanych dla samej TOXA. Powyższe wyniki świadczą o zmniejszeniu zapalenia wywołanego toksyną A w enterocytach przez kwas dokozaheksaenowy.

Wyniki eksperymentów wskazują na przeciwzapalne i przeciwutleniające właściwości kwasów tłuszczowych n-3 oraz być może przyczynią się do opracowania nowych strategii farmakologicznych w leczeniu otyłości, insulinooporności i stanów zapalnych jelit. Kwasy tłuszczowe i ich metabolity, jako ligandy dla czynników transkrypcyjnych PPAR mogą być stosowane, jako nutraceutyki w regulacji odpowiedzi immunologicznej.