Streszczenie w języku polskim

Wstęp. Długotrwałe spożywanie diety bogatej w tłuszcze uważane jest za główny czynnik prowadzący do indukcji insulinooporności (IR) i cukrzycy typu 2. Dotychczas zgromadzone dane wiążą nadmierną akumulację lipidów wewnątrzmięśniowych (IMCL), takich jak diacyloglicerol (DAG) i ceramid (Cer), z upośledzeniem sygnalizacji insuliny w mięśniach szkieletowych. Do niedawna niewiele było wiadomo na temat udziału długołańcuchowych acylo-CoA (LCACoA) w akumulacji bioaktywnych lipidów i upośledzeniu działania insuliny w mięśniach szkieletowych. Biorąc pod uwagę szczególne znaczenie *ACSL1* w inicjowaniu większości szlaków metabolicznych związanych z syntezą lipidów, postawiono hipotezę, że modulacja ekspresji *ACSL1* może pozytywnie wpływać na insulinowrażliwość komórek mięśniowych poprzez zmniejszenie akumulacji aktywnych biologicznie lipidów. W związku z powyższym, celem niniejszej rozprawy było zbadanie wpływu lokalnego wyciszenia ekspresji genu *ACSL1* w mięśniu brzuchatym łydki na wewnątrzmięśniową akumulację aktywnych biologicznie lipidów oraz insulinowrażliwość komórek mięśniowych myszy C57BL/6J karmionych dietą bogatotłuszczową. Aby osiągnąć zamierzony cel, zastosowano lokalne wyciszanie wyciszenie *in vivo* w mięśniach szkieletowych, za pośrednictwem elektroporacji plazmidem shRNA w pojedynczym mięśniu brzuchatym łydki myszy C57BL/6J z insulinoopornością ogólnoustrojową indukowaną przez HFD.

Materiał i Metody. Wszystkie procedury na zwierzętach zostały wykonane zgodnie z pozwoleniem (Nr zgody 35/2016) Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie. Badania zostały przeprowadzone na samcach myszy linii Jackson C57BL/6J, początkowy wiek 6 tygodni. Po okresie aklimatyzacji myszy C57BL/6J zostały losowo podzielone na grupę kontrolną (LFD, n = 8) karmioną dietą standardową i grupę karmioną dietą bogatotłuszczową (HFD, n = 8). Przez cały okres eksperymentu myszy miały dostęp *ad libitum* zarówno do diety kontrolnej (zawierającej 70% węglowodanów, 20% białek i 10% tłuszczy), jak i do diety bogatotłuszczowej (zawierającej 20% węglowodanów, 20% białek i 60% tłuszczy; %energii). Wszystkie zwierzęta były karmione odpowiednią dietą przez okres ośmiu tygodni. W drugim tygodniu eksperymentu wykonano elektroporację mięśni brzuchatych łydki odpowiednim plazmidem we wszystkich grupach eksperymentalnych. W skrócie, w grupie kontrolnej

(LFD$_{(+ACSL1)}$) do obydwu mięśni brzuchatych łydki, tylnych łap podano niewyciszające plazmidy shRNA. W celu zbadania wpływu wyciszenia *ACSL1* na akumulację lipidów w mięśniach szkieletowych i szlak sygnalizacji insuliny oraz, aby, usunąć skutki zmienności międzygrupowej wyciszono gen kodujący *ACSL1* w mięśniu brzuchatym łydki jednej łapy zwierząt karmionych HFD (HFD$_{(-ACSL1)}$), podczas gdy przeciwny mięsień tylnej kończyny tej samej myszy został transfekowany niewyciszającym shRNA (HFD$_{(+ACSL1)}$). Dwa tygodnie przed uśmierceniem, zwierzętom wykonano doustny test obciążenia glukozą (OGTT), natomiast tydzień później test tolerancji insuliny (ITT). Na 20 minut przed uśmierceniem do żyły ogonowej podano bolus 2-deoksy-[1,2,3H(N)]-D-glukozy, a następnie dootrzewnowo 0,5U/kg insuliny, dzięki czemu możliwy był pomiar wychwytu glukozy przez tkankę mięśniową oraz fosforylacja białek szlaku insulinowego. Po zakończeniu dożylnej infuzji zwierzęta były poddane eutanazji. Mięsień brzuchaty łydki został pobrany, zamrożony w ciekłym azocie i był przechowywany do czasu analiz w temperaturze -80 °C.

Zawartość lipidów (LCACoA, Cer, DAG) w komórkach mięśniowych została ustalona z użyciem ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas. Stymulowany insuliną wychwyt glukozy przez mięśnie szkieletowe został oznaczony z użyciem cieczowego licznika scyntylacyjnego. Stopień aktywacji szlaku insulinowego oraz ekspresja wybranych białek metabolizmu lipidów (IR, IRS-1, Akt/PKB, AS-160, PI3K, ACSL1, CD36, FATP-1, FABPpm, GLUT4, CPT1B, GADPH) został oznaczona z użyciem metody Western Blotting. Poziom ekspresji *ACSL1* w wyizolowanym mRNA został oznaczony przy użyciu RT-PCR.

Wyniki. Zgodnie z oczekiwaniami, otyłość wywołana dietą spowodowała indukcję insulinooporności, której towarzyszyło podwyższone stężenie kwasów tłuszczowych w osoczu, zwiększone poziomy lipidów IMCL wraz z zahamowaniem szlaku insulinowego oraz upośledzenie wychwytu glukozy w mięśniu brzuchatym łydki. Wyciszanie *ACSL1* poprawiło wrażliwość na insulinę na poziomie mięśni i jednocześnie zmniejszyło zawartość LCACoA (C16:0-CoA, C16:1-CoA, C18:1-CoA, C18:2-CoA i C24:0-CoA), SCACar (C4:0-Car, C6:0-Car, C8:0-Car, C10:0-Car), LCACar (C14:0-Car, C16:0-Car, C18:0-Car i C18:1-Car) zarówno Cer (C18:1-Cer i C24:1-Cer), jak i DAG (C16:0/18:0-DAG, C16:0 /18:2-DAG, C18:0/18:0-DAG). Wyciszenie genu *ACSL1* wiązało się ze zwiększoną fosforylacją białek szlaku insulinowego, w tym tyrozyny (Y632) IRS-1, seryny

(S473) Akt/PKB, seryny (S588) AS160 i poprawą wychwytu glukozy w mięśniu brzuchatym łydki myszy karmionych dietą bogatotłuszczową.

Wnioski. Powyższe wyniki wskazują, że zmniejszenie wewnątrzkomórkowej puli LCACoA bezpośrednio hamuje akumulację aktywnych biologicznie lipidów takich jak Cer i DAG (acylowanych 16-węglowymi oraz 18-węglowymi kwasami tłuszczowymi), na co wskazuje specyficzność substratu ACSL1. Dodatkowo wyciszenie *ACSL1* obniża zawartość SCACar, jak i LCACar, co świadczy o istotnej roli tego enzymu zarówno w szlaku syntezy lipidów wewnątrzmięśniowych, jak i w mitochondrialnej β-oksydacji kwasów tłuszczowych w warunkach obciążenia dietą bogatotłuszczową. Zmniejszone wewnątrzkomórkowe pule DAG i Cer wiążą się ze zwiększoną fosforylacją białek szlaku insulinowego i normalizacją wychwytu glukozy w mięśniu brzuchatym łydki myszy karmionych dietą bogatotłuszczową w warunkach lokalnego wyciszenia ACSL1. Dane te potwierdzają hipotezę, że zmiana stężenia wewnątrzkomórkowego LCACoA, a tym samym stężenia ceramidu i DAG, może pociągać za sobą pozytywne zmiany w aktywacji szlaku insulinowego w mięśniach szkieletowych. Odkrycia te sugerują, że tkankowo swoista modulacja *ACSL1* może być potencjalnym celem w leczeniu insulinooporności. Dalsze badania powinny skupić się na interakcjach zachodzących między białkami biorącymi udział syntezie lipidów, β-oksydacji mitochondrialnej i peroksysomalnej, by scharakteryzować skomplikowane oddziaływania międzycząsteczkowe w powiązaniu do otyłości i insulinooporności.